



**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOLAJEN PEPTİTLERİNİN VURGULU ELEKTRİK ALAN DESTEKLİ
ENZİMATİK HİDROLİZ YÖNTEMİYLE ÜRETİMİ VE BİYO-FONKSİYONEL
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Mehmet TEMEL
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ABD**

**ŞANLIURFA
2026**



**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOLAJEN PEPTİTLERİNİN VURGULU ELEKTRİK ALAN DESTEKLİ
ENZİMATİK HİDROLİZ YÖNTEMİYLE ÜRETİMİ VE BİYO-FONKSİYONEL
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Mehmet TEMEL
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ABD**

DANIŞMAN: Doç. Dr. Ümran CANSU

**ŞANLIURFA
2026**

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmamın her aşamasında desteği ile bana rehberlik eden, bilgi ve deneyimleri ile yol gosteren öğrettiklerinden dolayı hep minnettar kalacağım danıőmanım sayın Doç. Dr. Ümran CANSU hocama őükranlarımı sunarım. Tez çalıőmam sırasında vurgulu elektrik alan destekli cihazımızın tasarımında, yapımında ve kurulumunda gerek cihaz paylaşımı ve gerekse bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Serdal ASLAN hocama teőekkürlerimi sunarım.

Yönlendirmeleriyle doğru verileri elde etmemi sağlayan saygıdeğer Prof. Dr. Gökhan BORAN hocama teőekkür ederim. Desteklerinden dolayı sayın Doç. Dr. Mehmet Emin AYDEMİR hocama teőekkür ederim. Gıda Teknolojisi Meslek Yüksek Okul mezuniyetimden; Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans tezime kadar değerli bilgileri ile emek veren ve düşünme yetimi geliőtiren tüm hocalarıma teőekkür ederim. Analizler süresince laboratuvarında destek veren stajyer öğrenciler; Mina'ya, Yasemin'e, Zikra'ya, Ali'ye, Betül'e ve Merve'ye teőekkür ederim. Sabırları ve sevgileriyle her zaman yanımda olan canım eşime ve sevgili kızlarım Duru'ya ve Azra'ya teőekkür ederim. Bu süreçte doğrudan ve dolaylı olarak katkıda bulunan herkese teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
KISALTMALAR	v
SİMGELER.....	vi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
3. GEREÇ ve YÖNTEM	9
3.1. Gereç	9
3.2. Yöntem	9
3.2.1. <i>Farklı Kaynaklardan Jelatin Üretimi</i>	9
3.2.2. <i>Vurgulu Elektrik Alan Sistemi Tasarımı</i>	11
3.2.2.1. <i>Elektronik Kontrol Kartı</i>	11
3.2.2.2. <i>Silindirik Elektrot Sistemi</i>	12
3.2.3. <i>Jelatin Örneklerinin Vurgulu Elektrik Alan (VEA) ile Hidrolizi</i>	14
3.2.4. <i>Jelatin Örneklerinin Enzimatik Hidrolizi</i>	14
3.2.5. <i>Jelatin Örneklerinin VEA Destekli Enzimatik Hidrolizi</i>	15
3.2.6. <i>Hidroliz Derecesinin Tespiti</i>	15
3.2.6.1. <i>Titrasyon Yöntemiyle Hidroliz Derecesinin Tespiti</i>	15
3.2.6.2. <i>OPA Reaktif Yöntemiyle Hidroliz Derecesinin Tespiti</i>	16
3.2.7. <i>Peptit Örneklerinin Antioksidan Aktivitesi</i>	17
3.2.7.1. <i>DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Yöntemi</i>	17
3.2.7.2. <i>ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi Yöntemi</i>	17
3.2.8. <i>Peptitlerin Antimikrobiyal Analizi</i>	17
3.2.9. <i>UV Absorbsiyon Spektrumu Analizi</i>	18
3.2.10. <i>Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Analizi (FTIR)</i>	18
3.2.11. <i>Viskozite Analizi</i>	18
3.2.12. <i>Su Tutma Kapasitesi (STK) ve Yağ Bağlama Kapasitesi (YBK) Analizi</i> ..	19
3.2.13. <i>İstatistiksel Analizler</i>	19
4. BULGULAR	20
4.1. Jelatin Örneklerinin Vurgulu Elektrik Alan ile Hidrolizi.....	20
4.2. Jelatin Örneklerinin Enzimatik Hidrolizi	21
4.3. Jelatin Örneklerinin VEA Destekli Enzimatik Hidrolizi.....	24
4.4. Hidrolizatların Antioksidan Aktivite Değerleri.....	25
4.5. Hidrolizatların Antimikrobiyal Aktivite Değerleri.....	27
4.6. Hidrolizatların Fiziko-Kimyasal Özellikleri.....	28
4.7. Hidrolizatların UV Görünür Bölge Spektrumları.....	30
4.8. Hidrolizatların Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları ..	31
5. TARTIŞMA	36
5.1. Jelatin Örneklerinin VEA ile Hidrolizi	36
5.2. Jelatin Örneklerinin Enzimatik Hidrolizi	37
5.3. Jelatin Örneklerinin VEA Destekli Enzimatik Hidrolizi	38
5.4. Hidrolizatların Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivite Değerleri	39

5.5. Hidrolizatların Fiziko-Kimyasal Özellikleri.....	41
5.6. Hidrolizatların UV Görünür Bölge Spektrumları ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	42
6. SONUÇLAR	45
7. ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR.....	48
ÖZ GEÇMİŞ	55

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOLAJEN PEPTİTLERİNİN VURGULU ELEKTRİK ALAN DESTEKLİ ENZİMATİK HİDROLİZ YÖNTEMİYLE ÜRETİMİ VE BİYO-FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Mehmet TEMEL

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ABD

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ümran CANSU

Yıl: 2026, Sayfa: 55

Kolajen hayvanlarda deri, kemik, kıkırdak ve tendon gibi farklı bağ dokularında bulunan yapısal bir proteindir. Deri ve kemiklerden elde edilen ve molekül ağırlığı 200-500 kDa ağırlığında değişen kolajen proteininin ekstraksiyonuyla jelatin elde edilmektedir. Elde edilen bu jelatinin enzimatik veya asidik hidroliz yoluyla daha ileri derecede parçalanması sonucu daha küçük molekül ağırlığına (<30 KDa) sahip kolajen hidrolizatı veya kolajen peptitleri elde edilmektedir. Üretilen peptitler başta gıda sanayisi olmak üzere, kozmetik, eczacılık ve tıp alanlarında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu çalışmada, deri, kemik ve balık pulu kaynaklı jelatinlerin vurgulu elektrik alan (VEA) destekli enzimatik hidrolizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen hidrolizatların yapısal, fonksiyonel ve biyolojik özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla jelatin örneklerine ön işlem olarak VEA uygulanmış, ardından hidroliz işlemi yalnızca pepsin enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jelatin hidrolizatları; hidroliz derecesi, antioksidan aktivite, UV-Vis absorpsiyon spektrumu, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve bazı fonksiyonel özellikler açısından değerlendirilmiştir. Hidroliz sonrası örneklerde hidroliz derecesi (HD) değerlerinin, yalnızca enzim uygulanan kontrol örneklerine kıyasla anlamlı düzeyde arttığı ($p < 0.05$) gözlemlenmiştir. Özellikle VEA ön işlemi uygulanan jelatin hidrolizatlarında HD değerlerinde belirgin bir yükselme meydana gelmiş, bu durum protein zincirlerinin daha küçük peptitlere ayrıldığını göstermiştir. FTIR analizleri, VEA ve pepsin uygulamalarının hem ayrı ayrı hem de kombine olarak protein omurgasında gevşeme, hidrojen bağlarının zayıflaması ve sekonder yapı değişiklikleri oluşturduğunu göstermiştir. Elde edilen hidrolizatların antioksidan aktivitelerinde; VEA + pepsin kombinasyonunun antioksidan kapasiteyi anlamlı biçimde artırdığı saptanmıştır. Antioksidan aktivitedeki artış, hidroliz derecesindeki yükselişle paralel olduğu belirlenmiştir. UV absorpsiyon spektrumları incelendiğinde, hidrolizat örneklerinde özellikle aromatik amino asitlere atfedilen absorpsiyon bölgelerinde artış gözlemlenmiş, bu durum düşük molekül ağırlıklı peptitlerin oluşumunu desteklemiştir. Bulgular birlikte değerlendirildiğinde, VEA ön işleminin jelatinlerin enzimatik hidrolizini kolaylaştırdığı ve biyolojik aktivitesi yüksek hidrolizatların elde edilmesine katkı sağladığı sonucuna varılmıştır. Elde edilen bulgular, VEA'nın jelatin hidrolizi için etkili bir ön işlem yöntemi olduğunu ve pepsin ile birlikte kullanımının fonksiyonel ve biyoaktif özellikleri geliştirilmiş jelatin hidrolizatlarının üretimi açısından önemli bir potansiyel sunduğunu ortaya koymaktadır.

ANAHTAR KELİMELER: Biyoaktif peptit, Vurgulu elektrik alan, Kolajen, Hidroliz

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

PRODUCTION OF COLLAGEN PEPTIDES BY PULSED ELECTRIC FIELD-ASSISTED ENZYMATIC HYDROLYSIS AND DETERMINATION OF BIO FUNCTIONAL PROPERTIES

Mehmet TEMEL

**HARRAN UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL
FOOD ENGINEERING ABD**

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Ümran CANSU

Year: 2026, Page: 55

Collagen is a structural protein found in various connective tissues of animals, including skin, bone, cartilage, and tendons. Gelatin is obtained through the extraction of collagen from skin and bone, with molecular weights ranging from 200 to 500 kDa. Further enzymatic or acidic hydrolysis of this gelatin produces collagen hydrolysates or collagen peptides with lower molecular weights (<30 kDa). These peptides have wide-ranging applications in the food industry, as well as in cosmetics, pharmaceuticals, and medical fields. In this study, gelatin derived from skin, bone, and fish scales was subjected to pulsed electric field (PEF)-assisted enzymatic hydrolysis, and the structural, functional, and biological properties of the resulting hydrolysates were investigated. Gelatin samples were pretreated with PEF, followed by hydrolysis using only pepsin. The hydrolysates were evaluated in terms of degree of hydrolysis (DH), antioxidant activity, UV-Vis absorption spectra, Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy, and selected functional properties. Results showed that DH values of the hydrolysates significantly increased ($p < 0.05$) compared to control samples treated with enzyme alone. Notably, hydrolysates pretreated with PEF exhibited a pronounced increase in DH, indicating the formation of smaller peptide fragments. FTIR analysis demonstrated that both PEF and pepsin, individually and in combination, caused loosening of the protein backbone, weakening of hydrogen bonds, and changes in secondary structure. Antioxidant activity assays revealed that the PEF + pepsin combination significantly enhanced antioxidant capacity, which correlated with the increased DH. UV-Vis spectra showed elevated absorption in regions associated with aromatic amino acids, supporting the generation of low-molecular-weight peptides. Overall, the findings suggest that PEF pretreatment facilitates enzymatic hydrolysis of gelatin and contributes to the production of hydrolysates with enhanced biological activity. The results indicate that PEF is an effective pretreatment method for gelatin hydrolysis, and its combined use with pepsin offers significant potential for producing hydrolysates with improved functional and bioactive properties.

KEYWORDS: Bioactive peptide, Pulsed electric field, Collagen, Hydrolysis

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Vurgulu elektrik alan deneme tasarımı	14
Çizelge 3.2.	Jelatin örneklerine ait enzimatik hidroliz deney tasarımı	15
Çizelge 4.1.	Jelatin örneklerinin VEA uygulamasına ait koşulları ve hidroliz derecesi	21
Çizelge 4.2.	Tavuk derisi jelatininin enzimatik hidrolizine ait enzim oranları ve hidroliz derecesi	22
Çizelge 4.3.	Tavuk kemiği jelatininin enzimatik hidrolizine ait enzim oranları ve hidroliz derecesi	22
Çizelge 4.4.	Balık pulu jelatininin enzimatik hidrolizine ait enzim oranları ve hidroliz derecesi	23
Çizelge 4.5.	Jelatin örneklerinin VEA destekli enzimatik hidrolizine ait işlemler ve hidroliz derecesi	24
Çizelge 4.6.	Hidrolizat örneklerinin antioksidan aktivite değerleri	26
Çizelge 4.7.	Hidrolizat örneklerinin antimikrobiyal aktivite değerleri	27
Çizelge 4.8.	Jelatin hidrolizatlarına ait fizikokimyasal sonuçlar	28

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Deri, kemik ve puldan jelatin üretim proses akışları	10
Şekil 3.2.	Devre tasarımı görünüşü ve kanal çıkışları (a), Uygulamada kullanılan elektronik kart (b)	12
Şekil 3.3.	Elektrot sistemi bileşenleri (a), birleştirilmiş parçaların diametrik kesiti (b), tüm modelin görünüşü (c)	13
Şekil 3.4.	Tasarlanan vurgulu elektrik alan sistemi görüntüleri	14
Şekil 4.1.	Hidrolizatların UV görünür bölge spektrumları	30
Şekil 4.2.	Deri jelatini ve hidrolizatlarına ait FTIR sonuçları	32
Şekil 4.3.	Kemik jelatini ve hidrolizatlarına ait FTIR sonuçları	33
Şekil 4.4.	Pul jelatini ve hidrolizatlarına ait FTIR sonuçları	34

KISALTMALAR

FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
VEA	Değişken Elektrik Alan Uygulaması
UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Spektroskopisi
HD	Hidroliz Derecesi
OPA	Orto-ftalaldehit Yöntemi
STK	Su Tutma Kapasitesi
YBK	Yağ Bağlama Kapasitesi

SİMGELER

°C	Santigrat derece
cm⁻¹	Dalga sayısı (FTIR spektrumu)
kDa	Kilo dalton
mL	Mililitre
pH	Aktif asitlik
mbar	Milibar
g	Gram
cP	Santipoise (viskozite birimi)
rpm	Dakikada dönme sayısı

1. GİRİŞ

Kolajen hayvanlarda deri kemik kırık ve tendon gibi farklı bağ dokularında bulunan yapısal bir proteindir. Kolajen, memelilerde bol miktarda bulunan ve vücudun toplam protein kütlelerinin yaklaşık %30'unu oluşturan uzun ve lifli bir protein olmakla birlikte, bilinen kolajen ailesinde 28'den fazla tip yer almaktadır (Wang vd., 2023). Bunlar arasında en yaygınları ise tip I, tip II ve tip III kolajenleri yer alır ve tip I kolajen hayvanlarda en bol bulunanıdır (%90). Tip I kolajenler kemik, deri, tendon ve bağ dokularında en yaygın görülen kolajen tipidir, tip II kolajen özellikle kırık dokusunda baskındır. Tip III kolajen: İnce lifli bağ dokularında ve organ destek ağlarında bulunmaktadır. (Sun vd., 2025). Karakteristik bir üçlü sarmal yapıya sahip olan kolajen proteini üç adet α -polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Kolajenin yapısını oluşturan peptid zincirleri amino asit düzeyinde belirgin bir tekrar deseni ile karakterizedir ki bu desende her üç amino asitten biri glisin (\approx %33), prolin ve hidroksiprolinden oluşmaktadır. Kolajenin yapısındaki bu zincirler sol yönlü poliprolin II tipi heliks konformasyonuna sahiptir ve birlikte sağ yönlü bir üçlü heliks şeklini oluşturur. Bu yapı, kolajenin mekanik stabilitesini ve elastik dayanıklılığını sağlayan temel unsurdur.

Kolajen, bağ dokularının ana yapısal protein olmakla beraber yüksek biyo-uyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilir bir yapıya sahiptir. Kolajenden hidroliz yoluyla farklı amaçlara yönelik farklı kolajen ürünleri üretilebilmektedir. Bunların başında; kısmi hidroliz ile jelatin (>30 kDa) ve aşırı hidroliz ile de kolajen peptitleri (<30 kDa) üretilmektedir. Tüm kolajen türleri üç özdeş veya farklı α zincirinden oluşur ve en az bir üçlü sarmal yapı içerir (Silver vd., 2018) ve bu yapıyı stabilize eden molekül içi, molekül dışı kovalent bağlar ve hidrojen bağları kırılıp yeni ürünlere dönüşebilmektedir. Ortalama molekül ağırlığı 330 kDa olan kolajenin bağlarının kopması sonucu ortaya çıkan polipeptid karışımı molekül ağırlığı >30 kDa'nın üzerinde olanlar jelatin olarak değerlendirilmektedir (Alipal vd., 2021). Ayrıca, jelatinin kimyasal yapısı α zincirleri (tek polimer/tek zincir), β zincirleri (kovalent olarak çapraz bağlanmış iki α zinciri) ve γ zincirleri (kovalent olarak çapraz bağlanmış üç α zinciri) gibi farklı polipeptid zincirlerinden oluşur (Abdalbasit Adam vd., 2013). Kolajen molekülünü oluşturan bağların aşırı hidrolizi ile de kolajen peptitleri (<30 kDa) elde edilmektedir.

Son yıllarda sürdürülebilir üretim yaklaşımlarının önem kazanması ve hayvansal yan ürünlerin katma değeri yüksek bileşenlere dönüştürülmesine yönelik artan ilgi, jelatin ve jelatin türevlerinin kullanım alanlarını önemli ölçüde genişletmiştir. Jelatin, kolajenin kısmi hidroliziyle elde edilen, biyouyumluluğu, jel oluşturma, emülsiyonlaştırma, köpürme ve film oluşturma özellikleri gibi protein yan zincir gruplarıyla ilgili birçok fonksiyonel özelliğe sahiptir. Söz konusu fonksiyonel özellikleri nedeniyle jelatin; gıda başta olmak üzere farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Gómez-Guillén vd., 2011; Tang vd., 2022). Jelatin üretimi için ham maddeler tipik olarak farklı hayvan yan veya atık ürünleri oluşturmaktadır. Öyle ki jelatinlerin %29,4'ü ve %23,1'i sığır derisi ve kemiklerinden, %46'sı domuz derisinden ve yaklaşık %1,5'i diğer kaynaklardan üretilmektedir (Sultana vd., 2018; Lv vd., 2019). Kolajence zengin dokulardan jelatin eldesi genellikle 3 temel aşamadan oluşmaktadır. Bunların başında (I) hayvansal dokuların temizlenmesi, yağ vb. safsızlıkların giderilmesi ve kolajence zengin dokunun asit ve alkali ile muamele edilerek kolajen molekülünün yıpratılması ve kolajenin izole edilmesi gelmektedir. (II) 40 °C üstündeki sıcaklıklarda jelatin ekstraksiyonu ve (III) ekstraksiyon çözeltilisinin süzülmesi, yoğunlaştırılması ve kurutulmasıdır (Ahmed vd., 2020). Elde edilen toz jelatin farklı fonksiyonel özellikler barındırmasına karşın, doğal jelatin yapısının sınırlı biyolojik aktiviteye sahip olması, jelatinin kontrollü şekilde hidrolize edilerek fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerinin artırılmasına yönelik çalışmaları ön plana çıkarmıştır.

Kolajen hidrolizatı, kolajen veya jelatinin kimyasal ya da enzimatik hidrolizi sonucu elde edilen, farklı boyutlardaki peptitlerin ve çeşitli amino asitlerin bir karışımını temsil etmektedir. Kolajen proteininden hidrolizat üretiminde temel amaç, biyolojik ve besinsel değerini artırmak, farklı molekül ağırlığında peptitler oluşturmak ve yüksek katma değerli ticari ürünler elde etmektir (Al Hajj vd., 2024). Hidrolizat üretimi genellikle üç aşamada gerçekleşir: (1) kolajence zengin hammaddeyi safsızlıklardan arındırma, (2) kimyasal veya enzimatik hidroliz yoluyla kolajen hidrolizi, (3) elde edilen hidrolizatların molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlanması ve kurutulması (Hong vd., 2019).

Kolajen, biyoaktif özelliklere sahip peptitlerin izolasyonu için değerli bir kaynak oluşturmaktadır (Safari & Yaghoobzadeh 2020). Düşük molekül ağırlıklı kolajen hidroli-

zatları daha yüksek sindirilebilirlik ve biyoyararlanım gösterir ve kolajen/jelatinden daha büyük biyolojik aktivite sergilemektedir (Hong vd., 2019). Bu durum çeşitli hayvansal yan ürünlerden kolajen hidrolizatının hazırlanmasını teşvik etmektedir. Ayrıca kolajenden ileri gelen düşük molekül ağırlıklı peptitlerin, özellikle Pro ve Hyp içerikleri, sindirim sistemindeki peptidazların etkisine daha dirençli oldukları için daha iyi biyoaktif ve fonksiyonel aktivitelere sahip oldukları bildirilmiştir. (Ucak vd., 2021). Bu nedenle, düşük molekül ağırlıklı peptitlerin uygulama alanları, amino asit dengesi, iyi sindirilebilirlik ve hızlı tüketim gibi iyi fonksiyonel ve fizikokimyasal özelliklere sahip olmaları nedeniyle daha da genişlemektedir. Kolajen peptitleri genellikle kolajen/jelatinin asit, alkali veya enzimatik hidroliziyle elde edilmekte ve düşük molekül ağırlıklı peptitlerden oluşan kolajen peptitleri özellikle antioksidan, antihipertansif ve antimikrobiyal aktiviteleri ile dikkat çekmektedir (Fu vd., 2019; Hong vd., 2019). Enzimatik hidroliz, kolajen/jelatin hidrolizatlarının üretiminde en yaygın kullanılan yöntem olmakla birlikte, hidroliz verimi ve elde edilen peptitlerin özellikleri büyük ölçüde hidroliz koşullarına ve kullanılan enzime bağlı olarak değişmektedir (Hong vd., 2019).

Pepsin ve Proteinase K, kolajenin enzimatik hidrolizinde farklı proteolitik derinlik sağlayan iki önemli proteazdır. Pepsin, asidik pH'ta aktif olan bir aspartik proteaz olup, hidroliz süresi ve enzim konsantrasyonu artırıldığında pepsin orta ve düşük molekül ağırlıklı kolajen peptitlerinin üretiminde de etkili olabilmektedir. Sınırlı pepsin sindirimi sonucunda yaklaşık 30 kDa civarında düşük molekül ağırlıklı kolajen fraksiyonlarının oluştuğu ve bu peptitlerin fonksiyonel özellikler gösterebildiği bildirilmiştir. Ayrıca pepsin ile elde edilen peptitler daha ileri işlemler (örneğin subkritik su veya ikinci bir proteaz uygulaması) ile <2 kDa seviyesine kadar parçalanabildiği ve antioksidan aktiviteye sahip hidrolizatların üretilmediği rapor edilmiştir (Asaduzzaman vd., 2020; Harris vd., 2021). Buna karşılık Proteinase K, geniş substrat özgüllüğüne sahip bir serin proteaz olup denatüre proteinler üzerinde dahi yüksek aktivite gösterebilmesi sayesinde kolajeni daha ileri derecede parçalayarak çok daha düşük molekül ağırlıklı peptitlerin ve serbest amino asitlerin oluşumunu sağlar; bu nedenle derin hidroliz ve kısa zincirli biyoaktif peptit üretiminde tercih edilmektedir (Harris vd., 2021).

Vurgulu elektrik alan (VEA) teknolojisi, kısa süreli ve yüksek voltajlı elektrik darbelerinin uygulanmasıyla biyomoleküllerin yapısında fiziksel ve kimyasal değişikliklere neden olan termal olmayan bir işlem olarak tanımlanmaktadır. Proteinler üzerinde yapılan çalışmalar, VEA uygulamasının elektrik alan şiddeti, darbe süresi ve işlem sıcaklığına bağlı olarak protein agregasyonu, denatürasyon veya kısmi yeniden katlanma gibi farklı yapısal sonuçlara yol açabileceğini göstermektedir. Özellikle 5 – 20 kV/cm aralığında uygulanan alan şiddetlerinde proteinlerin α -heliks yapısında azalma ve β -sheet yapısında artış gözlenmiş, bu durum proteinlerin daha reaktif hale gelmesine neden olmuştur (Zhu vd., 2025). Kolajen, üçlü heliks yapısı ve yoğun çapraz bağları nedeniyle enzimatik olarak hidrolizi zor olan bir proteindir. Bu nedenle kolajen hidrolizatlarının üretiminde VEA gibi fiziksel ön işlemler giderek daha fazla araştırılmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda, VEA ön işleminin kolajen lif yapısını gevşettiği, moleküller arası çapraz bağları zayıflattığı ve böylece enzimlerin peptit bağlarına erişimini kolaylaştırdığı bildirilmiştir (Sharifi vd., 2025).

VEA uygulaması sırasında oluşan yüksek elektrik alan, protein moleküllerinde dipol yönelmesi, elektrostatik kuvvetlerde değişim ve lokal ısınma gibi etkiler meydana getirerek sekonder ve tersiyer yapıların kısmen açılmasına neden olabilir. Bu yapısal açılma, hidrofobik bölgelerin ve enzimatik kesim noktalarının açığa çıkmasını sağlayarak proteolitik enzimlerin substrata erişimini kolaylaştırır (Barba vd., 2015; Han vd., 2018; Marín-Sánchez vd., 2024; Malik vd., 2024). Bu nedenle VEA genellikle doğrudan peptit bağlarını kıran bir hidroliz yöntemi değil, enzimatik hidrolizi hızlandıran ve derecesini artıran bir ön işlem olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle VEA genellikle enzimatik hidrolizden önce bir ön işlem olarak uygulanmakta ve proteinlerin proteazlara duyarlılığını artırarak daha kısa sürede ve daha yüksek verimle düşük molekül ağırlıklı peptitlerin elde edilmesine olanak tanımaktadır (Marín-Sánchez vd., 2024). Özellikle balık işleme yan ürünleri üzerine yapılan çalışmalarda, VEA uygulamasının hem protein ekstraksiyon verimini hem de elde edilen hidrolizatların antioksidan ve anti-inflamatuar biyolojik aktivitelerini artırdığı gösterilmiştir (Chatzimitakos vd., 2023; Bashir vd., 2026). Kolajen üzerine yapılan deneysel bir çalışmada, VEA ön işlemi uygulanmış örneklerin enzimatik hidrolize karşı duyarlılığının arttığı, aynı hidroliz derecesine geleneksel yöntemle kıyasla daha kısa sürede ulaşıldığı ve daha düşük

molekül ağırlıklı peptitlerin oluştuğu bildirilmiştir (Sharifi vd., 2025). Bu bulgular, VEA teknolojisinin protein yapısını kontrollü biçimde modifiye ederek hem ekstraksiyon hem de enzimatik hidroliz süreçlerini iyileştiren, kolajen ve diğer yapısal proteinlerden fonksiyonel peptit üretiminde etkili bir ön işlem yöntemi olduğunu ortaya koymaktadır.

VEA'nın enzimatik hidrolizle birlikte kullanılması, protein yapısının daha etkin şekilde parçalanmasını sağlayarak hidroliz derecesini ve biyolojik aktiviteyi artırma potansiyeline sahiptir. Ancak jelatin kaynaklarının farklılığı, uygulanan işlem parametreleri ve enzim türü, elde edilen hidrolizatların özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle, VEA ve enzimatik hidrolizin birlikte kullanımına ilişkin mekanizmaların ve sonuçların detaylı olarak ortaya konması gerekmektedir.

Bu çalışmada; farklı yapısal özelliklere sahip olan deri kemik ve pul ana materyallerinde bulunan kolajen molekülü standart yöntemler ile jelatine indirgenmiştir (Cansu & Boran, 2015; Cansu & Boran, 2022; Cansu, 2023). Elde edilen farklı jelatinlerin vurgulu elektrik alan uygulaması ile parçalanması ve kolajen hidrolizatı elde edilmesindeki etkisinin yanı sıra, enzimatik hidroliz öncesinde vurgulu elektrik alan işleminin enzimatik hidroliz sürecine olan katkısı da değerlendirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, tavuk derisi ve kemiği ile sazan pullarından elde edilen toz jelatinlere; vurgulu elektrik alan (VEA) uygulaması, enzimatik hidroliz (pepsin ve Proteinaz K kullanılarak) ve her iki işlemin ardışık uygulanması gerçekleştirilmiştir. Uygulanan bu farklı işlem kombinasyonları sonucunda kolajen hidrolizatları elde edilmiştir. Üretilen kolajen hidrolizatlarının hidroliz derecesi, fonksiyonel özellikleri, antimikrobiyal aktiviteleri, antioksidan aktiviteleri, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve UV – Vis absorpsiyon spektrumlarını karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Elde edilen bulguların, VEA destekli enzimatik hidrolizin jelatin hidrolizatlarının üretiminde potansiyel bir yöntem olarak değerlendirilmesine katkı sağlaması amaçlanmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kimyasal hidroliz yöntemleri, asit/alkali uygulamaları ile peptid amid bağlarını parçalayabilir ve molekül ağırlığı değişen amino asitler ve küçük peptitler elde edilebilir. Avantajları maliyet etkinliği ve işlem basitliği iken, ürünlerin bileşiminin öngörülebilmesi ve sürecin kontrolünün zor olması önemli dezavantajlardır (Hou & Chen, 2023). Enzimatik hidroliz ise spesifik peptid bağlarını hedef alarak daha kontrol edilebilir ve öngörülebilir ürünler sağlar; ancak yüksek çapraz bağlı kolajenlerin hidrolizinde kimyasal yöntemlere göre daha düşük verim göstermektedir (Sharifi vd., 2025). Son yıllarda yapılan çalışmalar, enzimatik ve kimyasal hidroliz yöntemleriyle elde edilen kolajen peptitlerinin biyolojik aktivitelerinin, kullanılan yöntem ve peptid boyutuna bağlı olarak değiştiğini ortaya koymuştur (Marín-Sánchez vd., 2024; Tawalbeh vd., 2025).

Tawalbeh vd. (2025), kolajen hidrolizatları ve peptitlerinin teknolojik ve biyolojik özelliklerini değerlendiren bir derleme çalışması gerçekleştirmiştir. Bulgular, bu bileşiklerin antioksidan, antimikrobiyal ve fonksiyonel özellikler açısından zengin olduğunu ve gıda endüstrisinde fonksiyonel bileşen olarak kullanımının giderek arttığına işaret etmektedir (Tawalbeh vd., 2025).

Kolajen peptitlerinin biyolojik aktiviteleri arasında antioksidan, anjiyotensin I dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör aktivitesi, antikanserojen ve antimikrobiyal etkiler öne çıkmaktadır (Yang vd., 2019; Tawalbeh vd., 2025). Sığır, tavuk derisi, balık kemikleri ve derisi, balık pulları gibi farklı kaynaklardan elde edilen kolajen peptitlerinin antioksidan aktiviteleri spesifik amino asit dizilerine ve peptid moleküler ağırlıklarına bağlı olarak değişmektedir (González-Serrano vd., 2022; Hernandez-Ruiz vd., 2023; Shaik vd., 2024). Örneğin, serbest radikalleri temizleme, lipid peroksidasyonu inhibe etme ve metal iyonlarını şelatlama gibi mekanizmalar, kolajen peptitlerinin antioksidan kapasitesini belirleyen başlıca etkenlerdir (Xu vd., 2024; Tawalbeh vd., 2025).

Atef vd. (2021), mersin balığı derisi kolajeninden ticari enzimler kullanılarak elde edilen peptid fraksiyonlarının antimikrobiyal özelliklerini araştırmıştır. Çalışmada; kolajen peptitlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin molekül ağırlığı ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bulgular, bazı peptid fraksiyonlarının (<10 kDa) özellikle *Salmonella* türlerine karşı inhibitör

etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca peptidomik analizler ile bu biyolojik aktivitenin belirli peptit dizilerinden kaynaklandığı belirlenmiştir (Atef vd., 2021).

Lin vd. (2021), balık derisi kolajeninden demir bağlayıcı peptitlerin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Çalışmada, elde edilen peptitlerin yüksek metal şelatlama kapasitesine sahip olduğu ve demir ile stabil kompleksler oluşturduğu belirlenmiştir. Bu peptitlerin fonksiyonel gıda bileşeni olarak kullanılabilmesi ifade edilmiştir (Lin vd., 2021).

Qian vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, sığır tip I kolajeni pepsin ile hidrolize edilerek optimal pH ve sıcaklık koşulları belirlenmiş ve 2.1 – 4.5 arası pH ve 30 – 40 °C'nin pepsin için en uygun koşullar olduğu ve peptid üretiminin bu parametrelere bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca pepsin ile hidrolizin kolajen telopeptidlerini parçalayarak moleküler ağırlığı düşük peptitlerin oluşumuna katkıda bulunduğu ve ticari hidrolizat üretiminde pepsinin etkin bir katalizör olduğu rapor edilmiştir (Qian vd., 2016).

Vidal vd. (2018), farklı kolajen kaynaklarından elde edilen hidrolizatların fonksiyonel özelliklerini incelemek amacıyla pepsin ile enzimatik hidrolizi ultrason destekli olarak gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda ultrason uygulamasının hidroliz derecesini artırdığı ve elde edilen hidrolizatların çözünürlük, emülsifikasyon ve köpük oluşturma kapasitesi gibi fonksiyonel özelliklerini iyileştirdiği belirlenmiştir. Bu durumun, ultrasonun protein yapısını açarak enzimatik erişilebilirliği artırmasından kaynaklandığı ifade edilmiştir (Vidal vd., 2018).

Yapılan deneysel bir çalışmada, farklı hayvan kaynaklı kolajenlerin proteinase K ile hidroliz edilmesinin serbest radikal süpürme aktivitesi gibi önemli biyolojik aktiviteler ürettiğini göstermiştir (Ilie vd., 2022). Bu çalışmada, özellikle balık kolajenlerinden elde edilen peptitlerin proteinase K ile hidroliz edildiğinde amino asit kompozisyonu ve moleküler ağırlık dağılımının daha etkin antioksidan özellikler sunduğu rapor edilmiştir, bu da proteinase K'nin kolajen ana zincirini etkin bir biçimde kesebildiğini göstermektedir.

Marín-Sánchez vd. (2024), VEA uygulamasının protein ekstraksiyonu, yapısal modifikasyonu ve enzimatik aktivite üzerindeki etkilerini incelemiştir. Çalışmada, VEA uygulamasının proteinlerin üç boyutlu yapısını değiştirerek enzimlerin substrata erişimini

artırdığı ve hidroliz verimini yükselttiği belirtilmiştir (Marín-Sánchez vd., 2024).

Sharifi vd. (2025) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, vurgulu elektrik alan (VEA) ve ultrasonik ön işlemin kolajen hidrolizinde etkinliğini karşılaştırmıştır. Elde edilen VEA ön uygulaması, enzimatik hidrolizle kıyaslandığında kolajen moleküllerinin 10 kDa'dan daha düşük moleküler ağırlıklı peptitlere dönüşümünü artırmış ve bu peptitlerin antioksidan aktivitelerini yükseltmiştir (Sharifi vd., 2025). Bu sonuçlar, VEA'nın kolajen moleküllerinde ikincil ve üçüncül yapıların açılmasına ve enzimlerin hidroliz edilmesi için daha fazla erişilebilir bölgeler oluşturmasına yardımcı olarak hidroliz verimini artırdığını göstermektedir.

Herrera Lavados vd. (2025), somon işleme yan ürünlerinden biyoaktif peptit üretiminde VEA teknolojisinin enzimatik hidrolizi geliştirme üzerindeki etkisini araştırmıştır. Sonuçlar, VEA ön işleminin protein yapısını modifiye ederek enzimatik hidroliz verimini artırdığını ve elde edilen peptitlerin antioksidan aktivitesinin yükseldiğini göstermiştir. Elde edilen bulgular VEA teknolojisinin geleneksel enzimatik hidroliz süreçlerine entegre edilebilecek güçlü bir ön işlem işlem olduğunu göstermiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

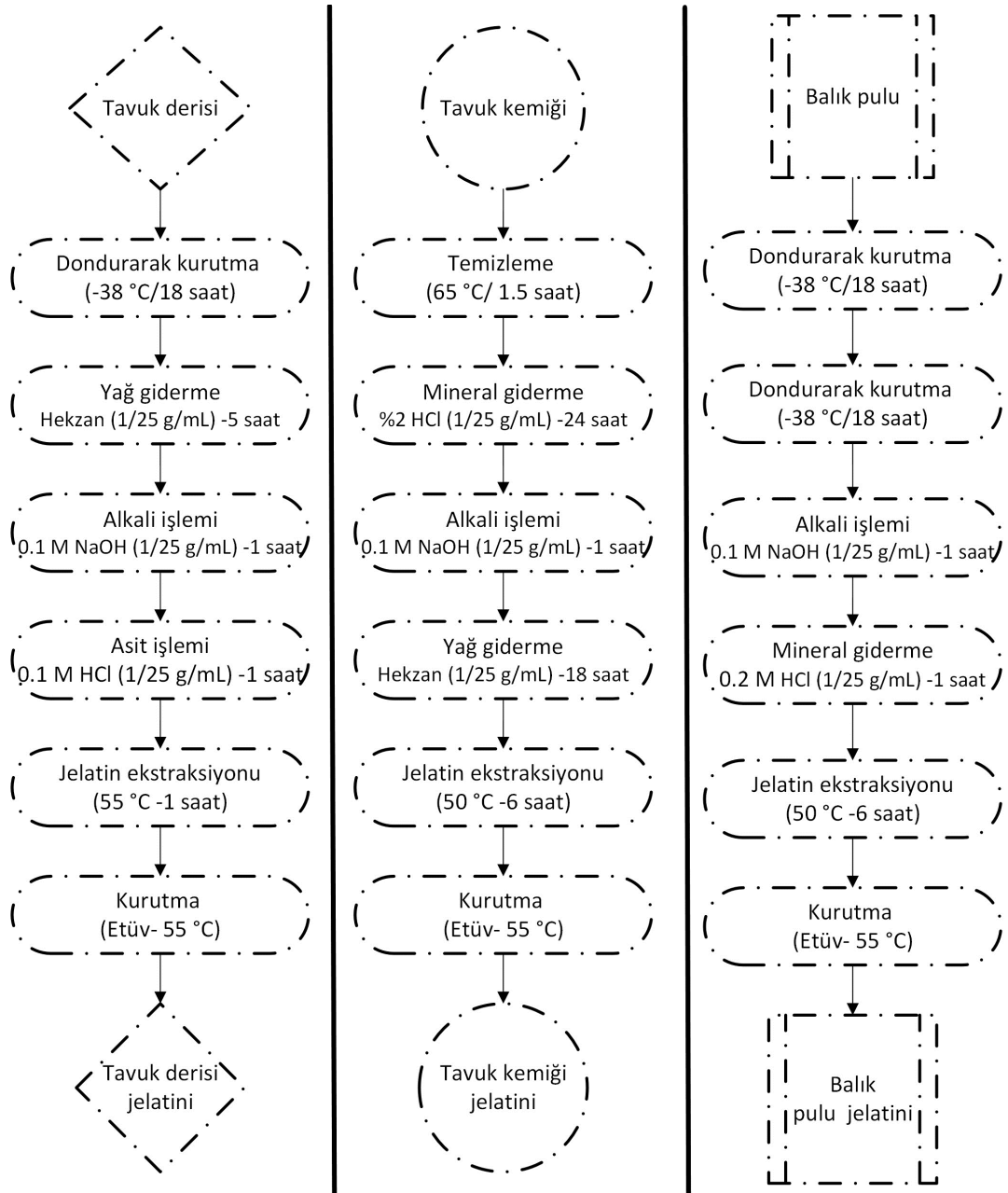
3.1. Gereç

Farklı jelatinlerin üretimi için sazan balığı (*Carasobarbus luteus*) pulları, tavuk derisi ve kemikleri hammadde olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tavuk derisi ve kemikleri Şanlıurfa da bulunan yerel marketlerden temin edilmiştir. Balık pulları için Atatürk baraj gölünde yetiştirilen sazan balığı (*Carasobarbus luteus*) derisi yerel marketlerden temin edilmiştir. Tavuk derisi ve balık derisi hammaddeleri; 20 mbar mutlak basınçta ve -35 ila -44 °C kondenser sıcaklığında yaklaşık 18 saat boyunca bir dondurarak kurutma cihazı (Armfield Limited-FT33) ile kurutulmuştur. Kurutulan balık derilerinden pullar el ile ayrılmıştır. Hidroliz aşaması için kullanılan enzimler, pepsin ve Proteinase K, (Novozymes Co. Kalundborg, Danimarka) şirketinden tedarik edildi. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Farklı Kaynaklardan Jelatin Üretimi

Tavuk derisinden jelatin üretimi için; öncelikle hammadde olarak kullanılan tavuk derileri, bir dondurarak kurutucu cihazda (Armfield, Limited-FT33) 18 saat süreyle kurutulmuş ve ardından kenar uzunluğu 4 cm olacak şekilde kare parçalara ayrılmıştır. Deri yapısında bulunan yağın uzaklaştırılması amacıyla örnekler, 1/25 (g/mL) oranında hekzan ile muamele edilerek çalkalamalı inkübatörde (Lab-Line, ABD) 5 saat boyunca bekletilmiştir. Yağ giderme işlemi sonrasında deri yüzeyinde kalan hekzan, 50 °C'ye ayarlanmış etüv kullanılarak uzaklaştırılmıştır (Sarbon vd., 2013; Cansu & Boran, 2022). Kurutulup yağından arındırılan tavuk derileri, 1/25 (g/mL) oranında 0.1 M NaOH çözeltisi ile 1 saat süreyle işleme tabi tutulmuştur. Bunu takiben, kolajenin suda çözünürlüğünü artırmak amacıyla örnekler 1/20 (g/mL) oranında 0.1 M HCl çözeltisi ile muamele edilmiştir. Alkali ve asit uygulamalarının ardından deri örnekleri musluk suyu ile üç kez yıkanarak süzülmüştür (Cansu & Boran, 2022). Temizleme, alkali ve asit işlemlerinden geçirilen örneklerden jelatin ekstraksiyonu 55 °C'de 4 saat süresince gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jelatin çözeltileri etüv (50 °C) yardımıyla kurutulup toz haline getirilmiştir.



Şekil 3.1. Deri, kemik ve puldan jelatin üretim proses akışları

Kemik jelatini için; piyasadan temin edilen tibia tavuk kemikleri kullanılmıştır. Üzerindeki safsızlıkları uzaklaştırılan tavuk kemiklerinin temizleme, yağdan arındırma ve mineral maddelerin uzaklaştırılması için Cansu ve Boran (2015)'nin belirlediği yöntem kullanılmıştır. Bu işlemler sırasıyla; 65 °C'de 90 dakika temizleme, %2'lik HCl çözeltisinde 24 saat demineralizasyon ve 35 °C'de 18 saat n-heksan ekstraksiyonu ile yağdan arındırma işlemlerini içermektedir. Elde edilen tavuk kemikleri jelatin ekstraksiyonu için kullanılmıştır.

Jelatin ekstraksiyonu 50 °C'de 6 saat süresince gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jelatin çözeltileri etüv (50 °C) yardımıyla kurutulup toz haline getirilmiştir.

Pul jelatini için sazan balığı (*Carasobarbus luteus*) pulları kullanılmıştır. Balık derisinden pulların kolaylıkla alınması için öncelikle dondurarak kurutucuda (Armfeld Limited-FT33) 20 mbar mutlak basınç ve -35 ila -44 °C kondenser sıcaklığında yaklaşık 18 saat boyunca kurutulmuştur. Kurutulan derilerden alınan pullar oda sıcaklığında (24 °C) ve 1/25 pul/çözelti (g/mL) oranında 0,1 M NaOH ile 1 saat muamele edilmiştir. Alkali çözelti içindeki pul örnekleri 15 dakika aralıklarla çalkalanmıştır. Ardından musluk suyuyla yıkanan pullar demineralizasyon aşamasına alınmıştır. Demineralizasyon için Cansu (2023) tarafından belirlenen yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemde balık pulları 1/25 pul/çözelti (g/mL) oranında 0.2 M HCl içinde 60 dakika bekletilmiştir. Mineralden arındırılan pullar jelatin ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Jelatin ekstraksiyonu 50 °C'de 6 saat süresince gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jelatin çözeltileri etüv (50 °C) yardımıyla kurutulup toz haline getirilmiştir.

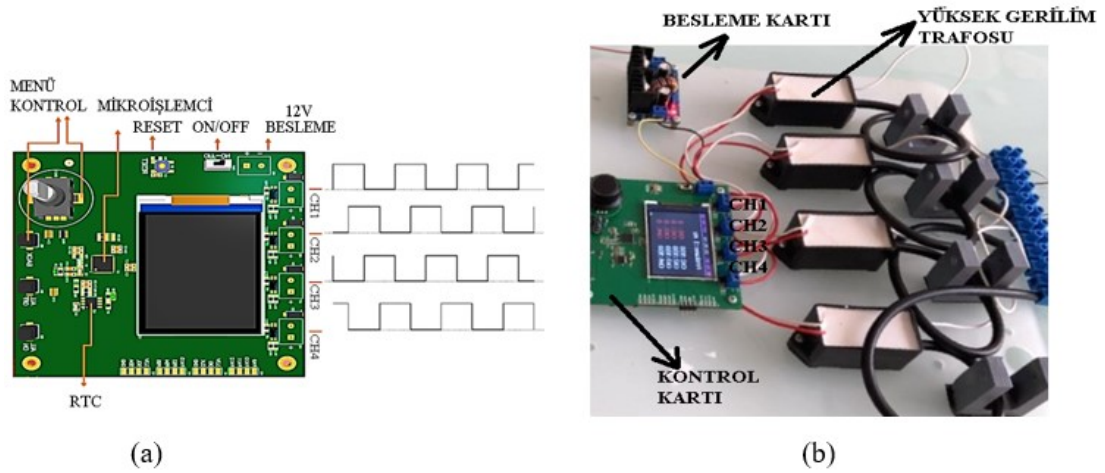
3.2.2. Vurgulu Elektrik Alan Sistemi Tasarımı

Elde edilen jelatinlerin ileri hidrolizini gerçekleştirmek için vurgulu elektrik alan sistemi tasarlanmış ve parçaları Şanlıurfa'da bulunan elektronik malzeme marketlerinden temin edilmiştir. Oluşturulan vurgulu elektrik alan sistemi elektrik açıdan darbeleri yüksek gerilim kontrol kartı ve silindirik elektrot sistemi ünitesi olmak üzere iki ana kısımdan oluşmaktadır.

3.2.2.1. Elektronik Kontrol Kartı

Sistemde kullanılan elektronik kontrol kartı; 11KV, 1-5 Hz tek yönlü kare dalga ve görev süresi ayarlanabilecek şekilde tasarlanan kartın üzerinden uygulama yapılmıştır. Elektrik şebekesine bağlanan adaptör ile kartın beslemesi sağlanmıştır. Aynı ebatlardaki sistemler için farklı deneylerin gerçekleştirilebilmesi için kartta 4 kanal (çıkış) bulunmaktadır. Her bir kanal aşağıda gösterilen kare dalga çıkış vermektedir. Çıkış gerilimini yükseltmek amacıyla her bir kanala transformatör yerleştirilmiştir. Her bir kanal için görev süresi ayarlanarak tanımlanan parametrelere göre çalışmaktadır. Yarıca kanallar bağımsız olarak çalıştırılabilmekte ve programlanabilmektedir. Sistemin enerjisi kesildiğinde devre RTC

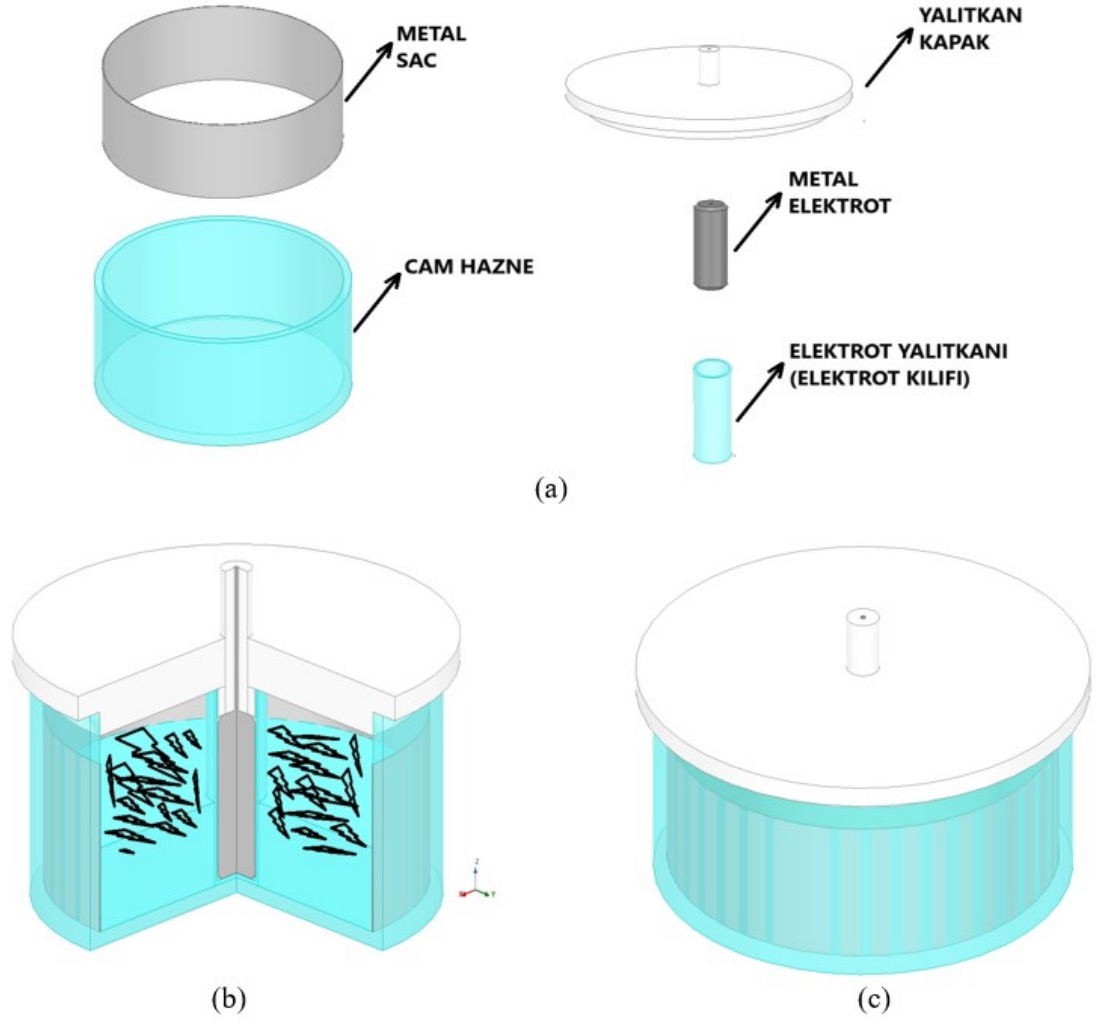
(Gerçek Zaman Saati) bilgisini hafızada tutmakta ve enerji verildiğinde kaldığı yerden saymaya devam edebilmektedir. Yine aynı şekilde otomatik çalışma programlandığı zaman bilgiler hafızaya kaydedilir ve yine bir kesinti halinde bilgiler kaydedilmektedir. Programlanan bilgiler devre üzerinde bulunan renkli TFT LCD ekran üzerinden takip edilebilmektedir (Şekil 3.2)



Şekil 3.2. Devre tasarımı görünüşü ve kanal çıkışları (a), Uygulamada kullanılan elektronik kart (b)

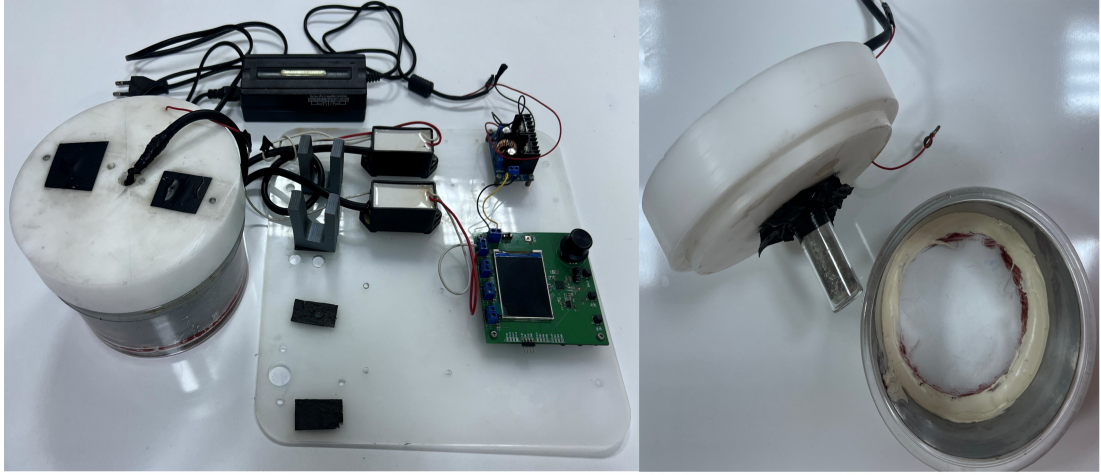
3.2.2.2. Silindirik Elektrot Sistemi

Çalışmada kullanılacak olan elektrot sistemi elektrik-elektronik mühendisliği alanı yüksek gerilim tekniği konusu içerisinde yer alsa da uygulama bakımından tıp, tekstil hatta gıda uygulamalarında son yıllarda yaygınlaşmaktadır. Yüksek gerilimli cihazlarda izolasyon, malzeme dayanımı ve elektrik alan değişimi önem arz etmektedir. Elektrik izolasyonu ve malzeme dayanımı ile ilgili problemler kısmen çözülebilmeye karşın uygun elektrik alan değerinin elde edilememesi sistemin çalışmasını olumsuz etkilemektedir. Bu çalışmada özellikle elektrik alan dağılımının düzgün, hesaplanabilir olması amacıyla silindirik elektrot sistemi tercih edilmiştir (Özkaya, 1996). (Şekil 3.3). Elektrot sistemlerine yönelik tasarlanan modellerin uygun silindirik elektrot tasarımında uygulanan yüksek potansiyelden düşük potansiyele doğru elektrik alan değerinin azaldığı belirtilmiştir (Özkaya, 1996; Arslan vd., 2021).



Şekil 3.3. Elektrot sistemi bileşenleri (a), birleştirilmiş parçaların diyametrik kesiti (b), tüm modelin görünüşü (c)

Şekil 3.3 temelde iki kısımdan oluşmaktadır. Bunlardan birinci kısımda toprak potansiyelinin uygulandığı metal sac ve cam muhafazadan oluşmaktadır. İkinci kısım da ise gerilimin uygulandığı çelik elektrot, yalıtkan ve kapak kısımlarından oluşmaktadır. Jelatin örneklerinin vurgulu elektrik alan ile hidroliz aşaması için öncelikle her bir jelatin örneğinin %5'lik saf su ile çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan cam hazne içine farklı kaynaklardan elde edilen jelatinlerin çözeltileri eklenerek elektrotun sabitlendiği kapak kapatılmıştır (Şekil 3.3 a-b). Denemeler esnasında yüksek gerilim orta kısımda yer alan metal malzemeye ve dış kısımdaki sac malzemeye 0 V gerilim uygulanmıştır. Sistemi tamamen dış ortamdan izole edebilmek için cam yalıtkan kapak kullanılmıştır (Şekil 3.3 c).



Şekil 3.4. Tasarlanan vurgulu elektrik alan sistemi görüntüleri

3.2.3. *Jelatin Örneklerinin Vurgulu Elektrik Alan (VEA) ile Hidrolizi*

Tasarlanan vurgulu elektrik alan sisteminin jelatini ne düzeyde parçaladığını tespit etmek amacıyla ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Yapılan ön denemeler sonucundan vurgulu elektrik alan sisteminin özellik farklı frekanslarda etkisinin değiştiği gözlemlenmiştir. Bunun için farklı frekanslarda ve 3 er saatlik uygulama ile yapılan vurgulu elektrik alan etkisinin tespiti Çizelge 3.1’de belirtilen deneme tasarımı ile belirlenmiştir. Hidroliz derecesi bağımsız değişken olarak değerlendirilmiştir. Denemler sonucunda en yüksek hidroliz derecesine sahip koşullar (Frekans) tespit edilmiş ve optimum vurgulu elektrik alan koşulları olarak uygulanmıştır.

Çizelge 3.1. Vurgulu elektrik alan deneme tasarımı

Deneme	Frekans (Hz)
1	1
2	3
3	5

3.2.4. *Jelatin Örneklerinin Enzimatik Hidrolizi*

Jelatin örneklerinin enzimatik hidrolizi için her bir jelatin örneğinden 5'er g tartılmış ve 100 mL saf su eklenerek ve 60 °C’de su banyosunda çözündürülmüştür. Hazırlanan çözeltiler Çizelge 3.2’de belirtilen deneme tasarımı uygulanmıştır. Enzim uygulamasından önce pepsin enzimi için çözeltilerin pH derecesi %3’lük HCl ile 2’ye ayarlanmış ve 37 °C’de 3 saat enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Proteinaz-K enzimi için pH değeri 7,0’a 0,1 N

NaOH ile ayarlanmış ve 55°C'de 3 saat muamele edilmiştir. Her enzim uygulamasından sonra enzim inaktivasyonu için çözeltiler 90 °C'de 15 dakika bekletilmiştir.

Çizelge 3.2. Jelatin örneklerine ait enzimatik hidroliz deney tasarımı

Deneme	Enzim karışım oranları (g /10 g)	
	Pepsin	Proteinaz-K
1	1	-
2	0,75	0,25
3	0,5	0,5
4	-	1

Elde edilen hidrolizatlar polipropilen tabaklara dökülerek 60 °C deki etüvde (Nüve NF500, Türkiye) kurutulup toz haline getirilmiştir (Herrera-Lavados vd., 2025). Kurutulan toz örneklerde hidroliz derecesi iki farklı metot ile tespit edilmiştir. Denemeler sonucunda en yüksek hidroliz derecesine sahip enzim ve/veya oranları tespit edilmiş ve optimum enzimatik hidroliz koşulları olarak uygulanmıştır.

3.2.5. *Jelatin Örneklerinin VEA Destekli Enzimatik Hidrolizi*

Jelatinin etkili bir şekilde hidrolizi için ayrı ayrı gerçekleştirilen VEA sistemi ve enzimatik hidroliz için belirlenen optimum koşullar ardı ardına uygulanmıştır. Bunun için; Jelatin örnekleri öncelikle en iyi VEA koşullarından hidroliz edilmiş ardından ön denemeler sonucunda en yüksek hidroliz koşullarının veren enzim ve/veya enzim oranı ve koşullarında hidroliz edilmiştir. Hidrolizat çözeltileri, 30 kDa moleküler ağırlığa sahip santrifüj tipi ultrafiltrasyon tüplerinden (Amicron Ultra-15 Santrifüj Filtreler) geçirilmiştir. Elde edilen filtratlar etüv (Nüve NF500, Türkiye) yardımıyla kurutulup toz haline getirilmiştir. Her iki işlemin sonunda elde edilen kolajen peptitlerinin hidroliz dereceleri tespit edilmiştir (Herrera-Lavados vd., 2025).

3.2.6. *Hidroliz Derecesinin Tespiti*

3.2.6.1. *Titration Yöntemiyle Hidroliz Derecesinin Tespiti*

Jelatin örneklerinden her bir hidroliz işlemi sonunda elde edilen hidrolizatlarda hidroliz derecesinin (HD) tespiti amacıyla titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Titrasyon yöntemi için, 1,5 g kurutulmuş kolajen/jelatin hidrolizatı, 50 mL damıtılmış suda çözüldü ve 0,1 N NaOH ile pH 7,0±0,1 ayarlandı. Daha sonra, bu çözeltilere 10 mL formaldehit

(%38, v/v) eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Her bir örnek için titrasyon, pH $8,5 \pm 0,1$ 'e ulaşana kadar NaOH (0,1 N) ile gerçekleştirildi. Hidroliz derecesinin tespiti sırasında örneklerin asitliği bir pH metre (Hanna, edge, woonsocket, RI, USA) yardımı ile sürekli ölçüldü. Toplam nitrojen miktarı kjeldahl yöntemi kullanılarak belirlendi. Kullanılan NaOH miktarı not edildi ve hidroliz derecesi (HD) aşağıdaki denklemlerle (Denklem 1 ve 2) belirlendi. (Noman vd., 2018).

$$\text{Serbest amino grup (\%)} = \frac{(Ax Bx 0.1400007)}{C} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Hidroliz derecesi (\%)} = \frac{\text{Serbest amino grup}}{\text{Toplam nitrojen}} \times 100 \quad (2)$$

A: NaOH miktarı (mL),

B: NaOH konsantrasyonu (0,1 M)

C: numune miktarı (1,5 g)

3.2.6.2. OPA Reaktifi Yöntemiyle Hidroliz Derecesinin Tespiti

Jelatin örneklerinden her bir hidroliz işlemi sonunda elde edilen hidrolizatlarda hidroliz derecesinin tespiti OPA (O-ftalaldehit)reaktifi yöntemiyle de belirlenmiştir. OPA tekniği için, 25 mL 100 mM sodyum tetraborat çözeltisi, 2,5 mL %20 (a/h) SDS (sodyum dodesil sülfat), 40 mg OPA (1 mL metanol içinde) ve 21,5 mL damıtılmış su içeren 3,4 mL OPA reaktifi, 10 µL filtrat ile karıştırıldı. Daha sonra, bu karışıma 100 µL β-merkaptolanol eklendi ve $35,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de (2 dakika) bekletildi. Kör olarak; 3,4 mL OPA reaktifi ve 10 µL saf su karıştırılarak kullanılmıştır. Sürenin sonunda, 340 nm'deki absorbans okundu. Hidroliz derecesi aşağıda verilen denkleme göre hesaplandı (Silva & Silveira., 2013).

$$\text{Hidroliz derecesi (\%)} = \frac{Ax 1924x SF}{C} \quad (3)$$

A: örneklerin absorbansı,

SF: seyreltme faktörü

C: protein numunesinin konsantrasyonu (g/L).

3.2.7. Peptit Örneklerinin Antioksidan Aktivitesi

3.2.7.1. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Yöntemi

Hidrolizat örneklerinin antioksidan aktivitesi, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikal temizleme testi kullanılarak değerlendirildi. DPPH çözeltisi (0,10 mM) metanolde taze olarak hazırlandı ve ışıktan korunarak saklandı. Peptit örneklerinin seri seyreltmeleri, 0,005 ila 0,04 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlandı. Her bir örneğin 1.5 mL çözeltisi alınarak 0,50 mL DPPH çözeltisi ile karıştırıldı. Hazırlanan karışım reaksiyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, her reaksiyon karışımının absorbansı bir UV-VIS spektrofotometresi (Shimadzu UV-1800, Japonya) kullanılarak 517 nm'de ölçüldü. DPPH radikallerinin %50'sini temizlemek için gereken örnek konsantrasyonu olarak tanımlanan IC₅₀ değerleri (mg/mL) olarak ifade edildi (Amangeldinova vd., 2024).

3.2.7.2. ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi Yöntemi

Hidrolizat örneklerinin antioksidan aktivitesi, ABTS (2,2 -azino-bis 3- etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal katyon temizleme aktivitesi, kullanılarak belirlendi. 7 mM ABTS stok çözeltisi saf su ile hazırlanarak ABTS radikal katyonunu oluşturmak için 2,45 mM potasyum persülfat (K₂S₂O₈) ile reaksiyona sokuldu. Peptit örneklerinin seri seyreltmeleri, 0,005 ila 0,04 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlandı. Deney için, 0,5 mL peptit çözeltisi 2,5 mL ABTS çalışma çözeltisi ile karıştırıldı. Hazırlanan karışımlar sonra oda sıcaklığında 30 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, absorbans 734 nm'de bir UV - VIS spektrofotometre (Shimadzu UV-1800, Japonya) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar, ABTS radikallerinin %50'sini temizlemek için gereken örnek konsantrasyonunu temsil eden IC₅₀ değerleri (mg/mL) olarak ifade edildi (Amangeldinova vd., 2024).

3.2.8. Peptitlerin Antimikrobiyal Analizi

Hidrolizat örneklerinin antimikrobiyal etkilerinin tespiti için belirlenen *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli O157:H7* (ATCC 43894) ve *Listeria monocytogenes* (RSKK 472) patojen suşlarına karşı disk difüzyon yöntemi kullanılarak

belirlendi. Patojen mikroorganizmaların aktivasyonu için 100 µL bakteri solüsyonu 9.9 mL Tyryptic soy broth içerisine konulup tüpler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, tüpler 4200 × g'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildi ve süpernatantlar uzaklaştırıldı. Peletler, 2 mL % 0,1 peptonlu su kullanılarak çözdürülüp elde edilen peletlerin, 1×10^7 hücre/mL bakteriye karşılık gelen 0,5 McFarland standardına göre ayarlandı. Bu bakteri solüsyonlarından 150 µL Mueller-Hinton Agarların yüzeylerine steril drigalski çubuklarıyla yayıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilerek bakterilerin yüzeye yapışmaları sağlandı. Daha sonra hidrolize peptit örneklerinden 100 µL agar üzerindeki 6 mm çapındaki bir deliğe dolduruldu. Pozitif kontrol olarak gentamisin kullanıldı. Ardından petri kutuları 18-24 saat 37 °C'de inkübe edildi ve inkübasyon süresi sonunda petrilerdeki berrak zonların çapları dijital kumpas ile ölçüldü (Şimşek vd., 2020; Karaaslan vd., 2021).

3.2.9. UV Absorbsiyon Spektrumu Analizi

Jelatin hidrolizatlarının UV absorpsiyon spektrumu için 25'er mg hidrolizat örneği alınıp 50 mL fosfat tampon çözeltisi (pH 7,2) ve %0,5 'lik asetik asit içinde çözüldürülmüştür. Hazırlanan hidrolizat çözeltilerinde spektrofotometre yardımıyla (UV - Mini 1240 UVVIS, Shimadzu, Kyoto, Japonya) 190 - 330 nm aralığında ve 0,2 nm/s tarama hızında spektrum profili tespit edilmiştir (Ruan vd., 2023).

3.2.10. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Analizi (FTIR)

Kurutulup toz haline getirilen jelatin hidrolizatlarının fonksiyonel gruplarının belirlenmesi amacıyla Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi (IRTracer-100, Shimadzu, Kyoto, Japonya) kullanılmıştır. Analizler, ortam sıcaklığında, 1 cm^{-1} çözünürlükte ve $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında gerçekleştirilmiştir (Aisha vd., 2014).

3.2.11. Viskozite Analizi

Jelatin hidrolizatlarından %6.67 lik çözeltileri saf su ile 60 °C'deki su banyosu yardımıyla hazırlanmıştır. Hidrolizat çözeltileri kalibre edilmiş Cannon Fenske (CANNON, State College, PA, USA) rutin viskozimetre ile 60 °C'de ölçülmüştür. Hidrolizat çözeltilerinin viskozimetreden geçiş hızı ölçülerek aşağıdaki formüller kullanılmış ve viskozite değerleri hesaplanmıştır. (GMIA, 1986).

$$\text{Kinematik viskozite } \left(\frac{\text{mm}^2}{\text{s}}\right) = \text{Orneğin gecis hız (s)} \times \text{Viskozimetre sabiti } \left(\frac{\text{mm}^2}{\text{s}^2}\right) \quad (4)$$

$$\text{Viskozite (cP)} = \text{Kinematik viskozite } \left(\frac{\text{mm}^2}{\text{s}^2}\right) \times \text{Yogunluk } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) \quad (5)$$

3.2.12. Su Tutma Kapasitesi (STK) ve Yağ Bağlama Kapasitesi (YBK) Analizi

Toz haline getirilmiş jelatin hidrolizatlarından 1'er g alınarak, önceden tartılmış 50 mL'lik Falcon tüplerine alınmış ve su tutma kapasitesinin (STK) belirlenmesi amacıyla 20 mL saf su ile; yağ bağlama kapasitesinin (YBK) değerlendirilmesi için ise 20 mL bitkisel yağ ile karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımlar oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiş ve her 15 dakika da bir vorteks cihazı ile karıştırılmıştır. Ardından örnekler, 6500 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant filtre kâğıdından süzülmüştür. Su tutma kapasitesi (STK), suyun tutulmasına bağlı olarak meydana gelen ağırlık artışı üzerinden hesaplanmış ve gram hidrolizat başına tutulan su miktarı (g su/g hidrolizat) cinsinden ifade edilmiştir. Benzer şekilde, yağ bağlama kapasitesi (YBK), yağın tutulmasına bağlı ağırlık artışı esas alınarak hesaplanmış ve gram hidrolizat başına tutulan yağ miktarı (g yağ/g hidrolizat) olarak raporlanmıştır (Cho vd., 2004).

3.2.13. İstatistiksel Analizler

Çalışmada deneysel analizler en az üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS v22.0 (Chicago, IL, ABD) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiş; veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve %95 güven düzeyinde Tukey'nin HSD testi ile analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Jelatin Örneklerinin Vurgulu Elektrik Alan ile Hidrolizi

Farklı kaynaklardan elde edilen jelatin örneklerinin tasarımı gerçekleştirilen Vurgulu Elektrik Alan (VEA) sistemi kullanılarak hidroliz edilmiştir. Farklı frekans değerlerinde gerçekleştirilen denemelere ait hidroliz düzeyi iki farklı yöntem ile belirlenmiş ve Çizelge 4.1’de verilmiştir. Sonuçlar, VEA frekansındaki artışın jelatin hidrolizi üzerinde belirgin bir etki oluşturduğunu ve bu etkinin jelatin kaynağına bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Deri jelatini için hidroliz derecesi (Titrasyon yöntemi), 1 Hz frekansta $4,35 \pm 0,20$ olarak belirlenirken, frekansın 3 Hz ve 5 Hz’ye yükseltilmesiyle birlikte hidroliz derecesinde sırasıyla; $5,18 \pm 0,13$ ve $5,50 \pm 0,12$ değerlerine ulaşılmış ve istatistiksel olarak sonuçlar farklı bulunmuştur ($p < 0,05$). Benzer şekilde artış OPA reaktif yöntemiyle de elde edilmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. 1, 3 ve 5 Hz frekanslarda sırasıyla; $1,22 \pm 0,01$, $1,40 \pm 0,08$ ve $1,74 \pm 0,09$ olarak gerçekleşmiştir. Bu artış, VEA uygulamasının frekansa bağlı olarak deri jelatininde peptit bağlarının parçalanmasını kolaylaştırdığını ve hidrolitik etkinliği artırdığını göstermektedir. Kemik jelatini örneklerinde ise hidroliz derecelerinin deri ve pul jelatinlerine kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiştir. Titrasyon yöntemiyle belirlenen hidroliz derecesi (HD) değerleri (%); 1 Hz frekansta $3,56 \pm 0,05$ olan HD, 3 Hz’de $3,80 \pm 0,15$ ’e ve 5 Hz’de $4,06 \pm 0,23$ ’e yükselmiştir. Her iki yöntemde de elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak farklılık göstermiştir ($p < 0,05$). OPA yöntemiyle 1, 3 ve 5 Hz frekanslarında elde edilen sonuçlar ise sırasıyla; $0,93 \pm 0,02$, $1,01 \pm 0,03$ ve $1,15 \pm 0,00$ olarak gerçekleşmiştir. Frekans artışı kemik jelatininde de hidrolizi teşvik etmesine rağmen, artışın hem deri hem de pul jelatinlere nazaran sınırlı kalması, kemik jelatininin daha yoğun ve stabil bir kolajen yapısına sahip olmasıyla ilişkilendirilebilir.

Pul jelatini örneklerinde ise frekans artışına bağlı olarak daha belirgin bir hidroliz artışı gözlenmiştir. Hidroliz derecesi (titrasyon yöntemi) 1 Hz’de $3,98 \pm 0,01$ iken, 3 Hz’de $4,70 \pm 0,31$ ’e ve 5 Hz’de $5,87 \pm 0,10$ ’e yükselmiştir. Benzer şekilde OPA yönteminde de yükseliş gerçekleşmiş ve 1,3 ve 5 Hz’de sırasıyla $1,08 \pm 0,10$, $1,25 \pm 0,05$ ve $1,95 \pm 0,01$ olarak tespit edilmiştir. Özellikle 5 Hz frekansta elde edilen yüksek hidroliz derecesi, pul jelatininin VEA uygulamasına karşı daha duyarlı olduğunu ve yapısal olarak elektrik alan etkisiyle

daha kolay parçalanabildiğini göstermektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde, VEA frekansındaki artış tüm jelatin kaynaklarında hidroliz derecesini artırmış, ancak bu artışın düzeyi jelatin kaynağına bağlı olarak farklılık göstermiştir. En yüksek hidroliz derecesi pul jelatininde, en düşük değerler ise kemik jelatininde elde edilmiştir. Bu bulgular, jelatin kaynağının yapısal özelliklerinin VEA ile indüklenen hidroliz sürecinde belirleyici bir rol oynadığını göstermektedir.

Çizelge 4.1. Jelatin örneklerinin VEA uygulamasına ait koşulları ve hidroliz derecesi

Deneme	VEA koşulları Frekans (Hz)	Hidroliz derecesi (%)	
		Titrasyon yöntemi	OPA yöntemi
Deri jelatini	1	4.35±0.20 ^c	1.22±0.01 ^c
	3	5.18±0.13 ^b	1.40±0.08 ^b
	5	5.50±0.12 ^a	1.74±0.09 ^a
Kemik jelatini	1	3.56±0.05 ^c	0.93±0.02 ^c
	3	3.80±0.15 ^b	1.01±0.03 ^b
	5	4.06±0.23 ^a	1.15±0.00 ^a
Pul jelatini	1	3.98±0.01 ^c	1.08±0.10 ^c
	3	4.70±0.31 ^b	1.25±0.05 ^b
	5	5.87±0.10 ^a	1.95±0.01 ^a

Aynı sütundaki a-c küçük harfleri, her bir örneğin farklı koşullardaki istatistiksel farklılıklarını gösterir.

4.2. Jelatin Örneklerinin Enzimatik Hidrolizi

Farklı kaynaklardan elde edilen jelatinlerin enzimatik hidrolizine ait hidroliz dereceleri, kullanılan enzim türü ve enzim karışım oranlarına bağlı olarak önemli farklılıklar göstermiştir (Çizelge 4.2 - 4.4). Genel olarak, tek enzim kullanımı ile elde edilen hidroliz derecelerinin, enzim karışımlarına kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Öyle ki pepsin enziminin tek başına kullanımının tüm jelatin örneklerinde daha yüksek hidroliz derecesine ulaşılmıştır. Tavuk derisi jelatini için en yüksek hidroliz derecesi, yalnızca pepsin kullanılan koşulda %7,75±0,25 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Pepsin oranının azaltılarak proteaz ilavesinin artırıldığı karışımlarda ise hidroliz derecesinin kademeli olarak düştüğü gözlenmiştir. Özellikle pepsin/proteinaz-K oranının 0,5/0,5 olduğu karışımda hidroliz derecesinin (titrasyon yöntemi) %5,73±0,30'e, yalnızca proteaz kullanılan örnekte ise %5,62±0,20'ye gerilediği belirlenmiştir. Benzer sonuçlar OPA yöntemiyle de elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda 3 hidroliz derecesi ile sadece pepsin enzimin kullanıldığı denemeler ön plana çıkmış, Pepsin/Proteinaz-K enzim karışımında hidroliz derecesinin düştüğü tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, tavuk derisi jelatininde pepsinin proteolitik etkinliğinin daha baskın

olduğunu göstermektedir. Ayrıca titrasyon yöntemi hidroliz derecesi değerleri sadece pepsin enzimi kullanıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmıştır.

Çizelge 4.2. Tavuk derisi jelatininin enzimatik hidrolizine ait enzim oranları ve hidroliz derecesi

Deneme	Enzim karışım oranları (g/10 g jelatin)		Hidroliz derecesi (%)	
	Pepsin	Proteinaz-K	Titrasyon yöntemi	OPA yöntemi
1	1	-	7.75±0.25 ^a	4.51±0.08 ^a
2	0.75	0.25	5.80±0.15 ^b	1.79±0.11 ^b
3	0.5	0.5	5.73±0.30 ^b	1.64±0.05 ^{bc}
4	-	1	5.62±0.20 ^b	1.48±0.07 ^c

Aynı sütundaki a-c küçük harfleri, örnekler arasındaki istatistiksel farklılıkları gösterir.

Tavuk kemiği jelatini örneklerinde ise hidroliz derecelerinin tavuk derisi jelatine kıyasla belirgin şekilde daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir (Çizelge 4.3). Yalnızca pepsin kullanılan denemede hidroliz derecesi %11,80±0,22 (titrasyon yöntemi) ile en yüksek değere ulaşmıştır. Enzim karışımlarında hidroliz derecesi düşüş göstermiş; pepsin/proteinaz-K oranının 0,75/0,25 olduğu koşulda %7,50±0,11 (titrasyon yöntemi), 0,5/0,5 oranında ise %6,53±0,30 (titrasyon yöntemi) olarak belirlenmiştir. Sadece proteinaz-K kullanılan örnekte elde edilen hidroliz derecesi %6,01±0,24 (titrasyon yöntemi) olarak gerçekleşmiş ve kemik jelatininde proteinaz-K'nın pepsine kıyasla daha sınırlı bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Hidroliz derecesinin tespiti için kullanılan OPA yönteminde ise sadece pepsin enziminin kullanıldığı örneklerin en yüksek hidroliz derecesine (%5,37±0,04) ulaştığı tespit edilmiştir. Bu değeri, %4,31±0,12 olarak (0,75/0,25 g/10) pepsin/ proteinaz-K enzim oranında olduğu ve istatistiksel olarak diğer enzim karışımlarından farklı olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Tavuk kemiği jelatininin enzimatik hidrolizine ait enzim oranları ve hidroliz derecesi

Deneme	Enzim karışım oranları (g/10 g jelatin)		Hidroliz derecesi (%)	
	Pepsin	Proteinaz-K	Titrasyon yöntemi	OPA yöntemi
1	1	-	11.80±0.22 ^a	5.37±0.04 ^a
2	0.75	0.25	7.50±0.11 ^b	4.31±0.12 ^b
3	0.5	0.5	6.53±0.30 ^c	2.05±0.03 ^c
4	-	1	6.01±0.24 ^c	1.98±0.09 ^c

Aynı sütundaki a-c küçük harfleri, örnekler arasındaki istatistiksel farklılıkları gösterir.

Balık pulu jelatini, tüm enzim uygulamaları arasında en yüksek hidroliz derecelerinin elde edildiği jelatin kaynağı olmuştur (Çizelge 4.4). Pepsin ile gerçekleştirilen hidrolizde hidroliz derecesi (titrasyon yöntemi) $13,85 \pm 0,20$ olarak belirlenmiş ve bu değer diğer tüm jelatin türleri arasında en yüksek sonuç olarak öne çıkmıştır. En yüksek hidroliz aynı zamanda OPA yöntemiyle de $5,65 \pm 0,02$ olarak tespit edilmiştir. Enzim karışımlarında hidroliz derecesi azalmış; pepsin/proteinaz-K oranının 0,75/0,25 olduğu denemede $10,00 \pm 0,10$, 0,5/0,5 oranında ise $7,88 \pm 0,32$ değerleri elde edilmiştir. Sadece proteaz kullanılan örnekte hidroliz derecesinin $7,29 \pm 0,20$ 'ye düştüğü gözlenmiştir. Benzer bir hidroliz derecesindeki düşüş OPA yönteminde de görülmüştür. Ancak 0,5/0,5 pepsin/ proteinaz-K ve sadece proteinaz-K uygulamalarında elde edilen her iki hidroliz derecesi değerleri istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır.

Çizelge 4.4. Balık pulu jelatininin enzimatik hidrolizine ait enzim oranları ve hidroliz derecesi

Deneme	Enzim karışım oranları (g/10 g jelatin)		Hidroliz derecesi (%)	
	Pepsin	Proteinaz-K	Titrasyon yöntemi	OPA yöntemi
1	1	-	$13,85 \pm 0,20^a$	$5,65 \pm 0,02^a$
2	0,75	0,25	$10,00 \pm 0,10^b$	$5,01 \pm 0,00^b$
3	0,5	0,5	$7,88 \pm 0,32^c$	$4,62 \pm 0,01^c$
4	-	1	$7,29 \pm 0,20^c$	$4,31 \pm 0,05^c$

Aynı sütundaki a-c küçük harfleri, örnekler arasındaki istatistiksel farklılıkları gösterir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, jelatin kaynağı ve kullanılan enzim türü enzimatik hidroliz üzerinde belirleyici faktörler olarak öne çıkmaktadır. Tüm jelatin kaynaklarında pepsin, proteinaz-K kıyasla daha yüksek hidroliz derecelerinin elde edilmesini sağlamıştır.

Deneyel tasarım kapsamında jelatin örnekleri önce vurgulu elektrik alan (VEA) işlemine tabi tutulmuş, daha sonra enzimatik hidroliz aşamasında sadece pepsin enzimi kullanılmıştır. VEA uygulamasında en yüksek hidroliz derecesini (hem titrasyon hem de OPA yöntemi) veren koşullar; frekans, 5 Hz, uygulama süresi 3 saat olarak kullanılmıştır. Bu işlemin akabinde yine en yüksek hidroliz derecesine ulaşılan enzim veya karışımları göz önünde bulundurularak sadece pepsin enzimi kullanılmıştır. Yapılan ön denemelerin sonucunda pepsin enzimi için hidroliz koşulları; g enzim /10 g örnek, uygulama süresi 3 saat, pH: 2 ve sıcaklık 37 °C olarak belirlenmiştir. Farklı jelatin örnekleri üzerinde ve söz

konusu koşullarda art arda uygulama gerçekleştirilmiştir.

4.3. Jelatin Örneklerinin VEA Destekli Enzimatik Hidrolizi

Jelatin örneklerinde vurgulu elektrik alan (VEA) ve pepsin uygulamalarının hidroliz derecesi üzerindeki bireysel ve kombine etkileri, titrasyon ve OPA yöntemleri ile belirlenmiş olup sonuçlar Çizelge 4.5’de sunulmuştur. Her iki analiz yöntemine ait bulgular genel olarak benzer eğilimler göstermiştir. Çizelgede farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$) belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, VEA ve pepsin uygulamalarının tek başına hidroliz derecesini artırdığını, ancak en belirgin artışın bu iki işlemin ardışık olarak uygulandığı koşullarda ortaya çıktığını göstermektedir. **Çizelge 4.5.** Jelatin örneklerinin VEA destekli enzimatik hidrolizine ait işlemler ve hidroliz derecesi

Deneme	İşlem	Hidroliz derecesi (%)	
		Titrasyon yöntemi	OPA yöntemi
Deri jelatini	VEA	5.50±0.12 ^a	1.74±0.09 ^a
	Pepsin	7.75±0.25 ^b	4.40±0.08 ^b
	VEA + Pepsin	17.13±0.20 ^c	6.24±0.19 ^c
Kemik jelatini	VEA	4.06±0.23 ^a	1.15±0.00 ^a
	Pepsin	11.80±0.22 ^b	5.37±0.04 ^b
	VEA + Pepsin	16.62±0.40 ^c	5.98±0.16 ^c
Pul jelatini	VEA	5.87±0.10 ^a	1.95±0.01 ^a
	Pepsin	13.85±0.20 ^b	5.65±0.02 ^b
	VEA + Pepsin	21.48±0.35 ^c	6.82±0.06 ^c

Aynı sütundaki a-c küçük harfleri, her bir örneğin farklı koşullardaki istatistiksel farklılıklarını gösterir.

Deri jelatini örneklerinde, titrasyon yöntemine göre yalnızca VEA uygulaması %5,50±0,12, pepsin uygulaması %7,75±0,25 ve VEA+pepsin uygulaması %17,13±0,20 hidroliz derecesi sağlamıştır. OPA yönteminde ise aynı sıralama korunmuş olup değerler sırasıyla; %1,74±0,09, 4,40±0,08 ve 6,24±0,19 olarak belirlenmiştir. Her iki yöntemde de tüm gruplar arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve en yüksek hidroliz derecesinin kombine uygulamada elde edildiği görülmektedir. Bu durum, VEA’nın jelatin yapısında oluşturduğu konformasyonel değişimlerin pepsinin proteolitik etkinliğini artırarak sinerjik bir etki oluşturduğunu göstermektedir.

Kemik jelatini için de benzer bir eğilim gözlenmiştir. Titrasyon yöntemine göre yalnızca VEA uygulaması %4,06±0,23, pepsin uygulaması %11,80±0,22 ve VEA+pepsin

uygulaması $\%16,62\pm0,40$ hidroliz derecesi sağlamıştır. OPA yönteminde ise bu değerler sırasıyla; $\%1,15\pm0,00$, $5,37\pm0,04$ ve $5,98\pm0,16$ olarak belirlenmiştir. Her iki yöntemde de gruplar arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$) ve en yüksek değer VEA destekli pepsin uygulamasında elde edildiği görülmektedir. Özellikle daha yoğun ve stabil bir yapıya sahip olan kemik jelatininde, VEA ön işleminin protein yapısını kısmen açarak enzim-substrat etkileşimini artırdığı ve hidrolizi anlamlı ölçüde kolaylaştırdığı anlaşılmaktadır.

Pul jelatini örneklerinde ise her iki yöntemde göre de en yüksek hidroliz dereceleri elde edilmiştir. Titrasyon yöntemine göre VEA uygulaması $\%5,87\pm0,10$, pepsin uygulaması $\%13,85\pm0,20$ ve VEA+pepsin uygulaması $\%21,48\pm0,35$ hidroliz derecesi sağlamıştır. OPA yönteminde ise bu değerler sırasıyla; $\%1,95\pm0,01$, $5,65\pm0,02$ ve $6,82\pm0,06$ olarak belirlenmiştir. Tüm gruplar arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$) ve en yüksek hidroliz derecesinin yine kombine uygulamada elde edildiği görülmektedir. Pul jelatininde gözlenen bu belirgin artış, VEA uygulamasının protein yapısını daha fazla gevşeterek pepsinin etki alanını genişlettiğini ve enzimatik hidrolizin etkinliğini artırdığını göstermektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde hem titrasyon hem de OPA yöntemlerinden elde edilen sonuçlar birbiriyle uyumlu olup, tüm jelatin türlerinde VEA ve pepsin uygulamalarının birlikte kullanımının tekil uygulamalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek hidroliz dereceleri sağladığı belirlenmiştir. Bu bulgular, VEA uygulamasının jelatin yapısında meydana getirdiği yapısal değişiklikler sayesinde enzim-substrat etkileşimini artırarak enzimatik hidrolizi belirgin şekilde kolaylaştırdığını ve sürecin etkinliğini artıran kritik bir ön işlem olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

4.4. Hidrolizatların Antioksidan Aktivite Değerleri

Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresi azaltabilen moleküllerdir ve biyolojik sistemlerde hücreleri oksidatif hasardan korurlar. Jelatin hidrolizatları gibi protein bazlı peptitler, özellikle kısa zincirli peptitler, radikal süpürücü özellikleri nedeniyle antioksidan kapasiteye katkıda bulunmaktadır. Antioksidan testlerde elde edilen IC_{50} değerleri, belirli bir radikali $\%50$ etkili şekilde süpürmek için gerekli olan

peptit konsantrasyonunu gösterir; daha düşük IC₅₀ değerleri daha yüksek antioksidan kapasiteyi ifade eder. Hidrolizatların antioksidan kapasiteleri, DPPH ve ABTS radikal giderme aktiviteleri kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar IC₅₀ değerleri ile regresyon katsayıları (R²) olarak sunulmuştur (Çizelge 4.6). Tüm örneklerde yüksek R² değerleri (≥0.94), ölçümlerin güvenilirliğini ve regresyon analizinin doğruluğunu göstermektedir. Hidrolizatlar arasında antioksidan aktivite açısından istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur (P < 0,05). Deri jelatini hidrolizatlarında, DPPH ve ABTS testleri pepsin ve VEA uygulamalarının antioksidan kapasiteyi artırdığını göstermiştir. Pepsin uygulamasında IC₅₀ değerleri sırasıyla; %0,54±0,06 mg/mL ve 0,60±0,03 mg/mL olarak ölçülürken, VEA uygulamasında değerler %0,61±0,09 mg/mL ve %0,70±0,08 mg/mL olmuştur. Buna karşın VEA + pepsin kombinasyonu ile elde edilen hidrolizatlarda IC₅₀ değerleri DPPH ve ABTS testlerinde belirgin şekilde artmış (%1,86±0,10 mg/mL ve %1,10±0,12 mg/mL), dolayısıyla antioksidan aktivitenin azaldığı görülmüştür.

Çizelge 4.6. Hidrolizat örneklerinin antioksidan aktivite değerleri

Örnek	İşlem	DPPH		ABTS	
		R ²	IC ₅₀ (mg/mL)	R ²	IC ₅₀ (mg/mL)
Deri jelatini	VEA	0.99	0.61±0.09 ^b	0.99	0.71±0.08 ^b
	Pepsin	0.99	0.54±0.06 ^b	0.98	0.60±0.03 ^b
	VEA + Pepsin	0.99	1.86±0.10 ^a	0.98	1.10±0.12 ^a
Kemik jelatini	VEA	0.99	4.67±0.23 ^a	0.99	2.32±0.12 ^b
	Pepsin	0.99	4.22±0.21 ^a	0.99	5.51±0.14 ^a
	VEA + Pepsin	0.99	3.07±0.20 ^b	0.99	5.53±0.21 ^a
Pul jelatini	VEA	0.99	2.81±0.16 ^a	0.98	1.57±0.16 ^b
	Pepsin	0.99	1.27±0.10 ^b	0.95	0.90±0.06 ^c
	VEA + Pepsin	0.99	2.87±0.12 ^a	0.99	1.78±0.12 ^a

Aynı sütündeki a-c küçük harfleri, her bir örneğin farklı koşullardaki istatistiksel farklılıklarını gösterir.

Kemik jelatini hidrolizatlarında ise DPPH testi, VEA + pepsin uygulamasında (%3,07±0,20 mg/mL) en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterirken, pepsin ve VEA uygulamaları sırasıyla; %4,22±0,21 mg/mL ve 4,67±0,23 mg/mL ile daha düşük aktivite sergilemiştir. ABTS testinde ise pepsin ve VEA + pepsin uygulamaları birbirine yakın sonuçlar vermiştir (%5,51±0,14 mg/mL ve %5,53±0,21 mg/mL), VEA uygulaması ise daha düşük antioksidan kapasite göstermiştir (%2,32±0,12 mg/mL). Bu durum, kemik jelatini hidrolizatlarında kullanılan test yöntemine bağlı olarak farklı antioksidan yanıtlar oluşabileceğini ortaya koymaktadır. Pul jelatini hidrolizatları incelendiğinde, pepsin

uygulaması hem DPPH (%1,27±0,10 mg/mL) hem ABTS (%0,90±0,06 mg/mL) testlerinde en düşük IC₅₀ değerine sahip olup, en yüksek antioksidan kapasiteyi göstermiştir. VEA ve VEA + pepsin uygulamalarında ise IC₅₀ değerleri artmış, dolayısıyla antioksidan aktivite azalmıştır. Özellikle VEA destekli pepsin uygulamalarında antioksidan kapasitenin düşmesi, aşırı hidroliz sonucu oluşan kısa peptitlerin radikal süpürücü etkinliğinin sınırlanması ile açıklanabilir. Pepsin ile elde edilen hidrolizatların çoğu durumda daha düşük IC₅₀ değerleri göstererek daha yüksek antioksidan aktivite sergilediği, VEA destekli pepsin uygulamalarının ise hidroliz derecesini artırmasına rağmen her jelatin kaynağı için aynı düzeyde olumlu etki oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, jelatin kaynağı, uygulanan işlem türü ve kullanılan antioksidan test yönteminin antioksidan aktiviteyi belirlemede kritik rol oynadığını göstermektedir.

4.5. Hidrolizatların Antimikrobiyal Aktivite Değerleri

VEA, pepsin ve bunların kombinasyonu ile muamele edilen kemik, pul ve deri örneklerinin *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* üzerindeki antimikrobiyal etkileri disk difüzyon yöntemi ile değerlendirilmiştir (Çizelge 4.7). Tüm hidrolizat örneklerinde ölçülen inhibisyon zon çaplarının 6,12 – 6326 mm aralığında olduğu ve değerlerin disk çapına oldukça yakın seyrettiği belirlenmiştir. Bu durum, örneklerin test edilen mikroorganizmalara karşı belirgin bir antimikrobiyal aktivite göstermediğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.7. Hidrolizat örneklerinin antimikrobiyal aktivite değerleri

Örnek	İşlem	İnhibisyon zon çapı (mm)		
		<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Deri jelatini	VEA	6.14±0.03 ^b	6.14±0.02 ^b	6.14±0.01 ^b
	Pepsin	6.19±0.02 ^b	6.17±0.01 ^b	6.22±0.04 ^b
	VEA + Pepsin	6.26±0.01 ^b	6.12±0.01 ^b	6.24±0.02 ^b
Kemik jelatini	VEA	6.12±0.02 ^b	6.16±0.03 ^b	6.13±0.03 ^b
	Pepsin	6.14±0.02 ^b	6.18±0.01 ^b	6.14±0.01 ^b
	VEA + Pepsin	6.23±0.03 ^b	6.13±0.02 ^b	6.12±0.03 ^b
Pul jelatini	VEA	6.13±0.02 ^b	6.13±0.02 ^b	6.13±0.01 ^b
	Pepsin	6.18±0.03 ^b	6.14±0.02 ^b	6.20±0.02 ^b
	VEA + Pepsin	6.12±0.01 ^b	6.12±0.04 ^b	6.17±0.02 ^b
Kontrol (Gentamisin)		26.00±0.00 ^a	25.00±0.00 ^a	22.00±0.00 ^a

Aynı sütündeki a-c küçük harfleri, her bir örneğin farklı koşullardaki istatistiksel farklılıklarını gösterir.

Buna karşılık, pozitif kontrol olarak kullanılan gentamisin, *S. Typhimurium*, *E. coli O157:H7* ve *L. monocytogenes* için sırasıyla 26,00 mm, 25,00 mm ve 22,00 mm inhibisyon zonları oluşturarak güçlü bir antimikrobiyal etki sergilemiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan steril suda ise herhangi bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir. Farklı jelatinlerden elde edilen hidrolizatların antimikrobiyal etkilerinin tespiti için kullanılan disk difüzyon yönteminde, inhibisyon zon çapının disk çapından anlamlı derecede büyük olması beklenmektedir. Bu çalışmada VEA, pepsin ve VEA+pepsin uygulanan tüm hidrolizat örneklerinde inhibisyon zonlarının yaklaşık 6 mm kalması, söz konusu hidrolizatların *S. Typhimurium*, *E. coli O157:H7* ve *L. monocytogenes* üzerinde agar difüzyon testine göre etkili olmadığını göstermektedir. Bu durum, test edilen materyallerin bakteriyel büyümeyi inhibe edecek düzeyde aktif bileşen içermediğini ya da bu bileşenlerin agar ortamına yeterli düzeyde difüze olamadığını göstermektedir.

4.6. Hidrolizatların Fiziko-Kimyasal Özellikleri

VEA, pepsin ve VEA+pepsin uygulamalarıyla elde edilen jelatin hidrolizatlarının su tutma kapasitesi (STK), yağ bağlama kapasitesi (YBK) ve viskozite değerleri Çizelge 4.8'de sunulmuştur. Elde edilen bulgular hem uygulanan işlem türünün hem de jelatin kaynağının fonksiyonel özellikler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklara ($p < 0.05$) neden olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca sonuçlar, hidroliz derecesi ile fonksiyonel özellikler arasında doğrusal bir ilişki bulunmadığını, aksine işlem şiddetine bağlı olarak değişen kompleks bir etkileşim söz konusu olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.8. Jelatin hidrolizatlarına ait fizikokimyasal sonuçlar

Deneme	İşlem	Su tutma kapasitesi (g su/g hidrolizat)	Yağ bağlama Kapasitesi (g yağ/g hidrolizat)	Viskozite (cP)
Deri jelatini	VEA	0.92±0.06 ^a	1.00±0.02 ^a	1.02±0.02 ^a
	Pepsin	0.79±0.20 ^b	1.01±0.12 ^a	0.90±0.01 ^b
	VEA + Pepsin	0.83±0.00 ^b	0.80±0.00 ^b	0.81±0.01 ^b
Kemik jelatini	VEA	0.96±0.10 ^a	0.68±0.01 ^c	1.73±0.08 ^a
	Pepsin	0.95±0.13 ^a	1.16±0.05 ^a	1.21±0.02 ^b
	VEA + Pepsin	0.94±0.30 ^a	1.08±0.03 ^b	0.94±0.05 ^c
Pul jelatini	VEA	0.90±0.12 ^a	0.92±0.02 ^b	1.57±0.09 ^a
	Pepsin	0.85±0.03 ^{ab}	0.95±0.02 ^{ab}	0.91±0.02 ^b
	VEA + Pepsin	0.77±0.08 ^b	1.03±0.06 ^a	0.81±0.01 ^c

Aynı sütündeki a-c küçük harfleri, her bir örneğin farklı koşullardaki istatistiksel farklılıklarını gösterir.

Deri jelatini örneklerinde, VEA+pepsin uygulaması en yüksek hidroliz derecesini sağlamasına rağmen, STK ($0,83\pm 0,00$) ve viskozite ($0,81\pm 0,01$ cP) değerlerinde aynı gruptaki diğer uygulamalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($p<0.05$) meydana gelmiştir. Buna karşılık yalnızca VEA uygulanan örneklerde STK ($0,92\pm 0,06$) ve viskozite ($1,02\pm 0,02$ cP) değerlerinin daha yüksek olduğu ve bu farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bu durum, ileri düzey hidrolizin protein zincirlerini aşırı derecede parçalayarak su tutma kapasitesi ve viskoziteyi olumsuz etkilediğini göstermektedir. Aynı zamanda hidrolizin suyu bağlayan protein yapılarını azalttığı ve dolayısıyla hidrolizatların daha az viskoz yapılar sergilediği anlaşılmaktadır. YBK açısından değerlendirildiğinde ise pepsin uygulamasının (1.01 ± 0.12) diğer işlemlere göre daha yüksek değerler sağladığı ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir.

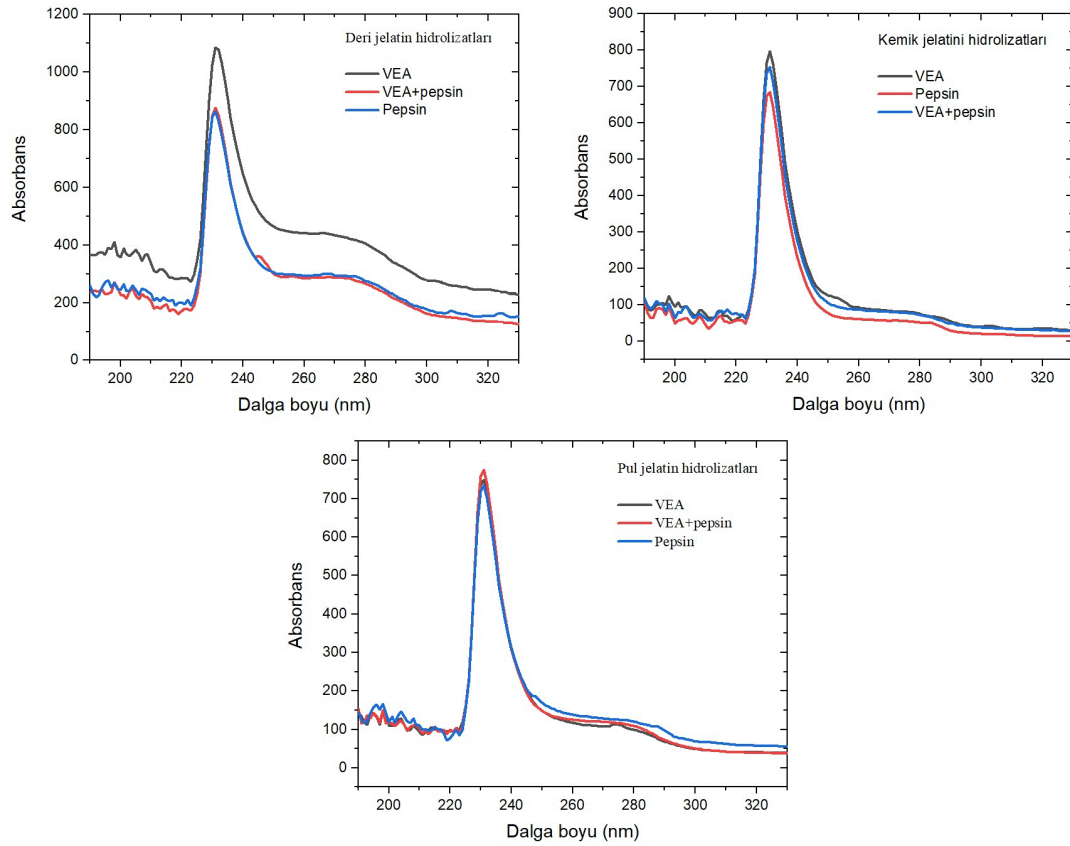
Kemik jelatini hidrolizatlarında, VEA+pepsin uygulaması hidroliz derecesini artırmasına rağmen STK değerlerinde önemli bir değişim oluşturmazken ($p>0.05$), viskozite değerlerinde anlamlı bir düşüş ($p<0.05$) meydana getirmiştir. Pepsin uygulaması, YBK açısından en yüksek değer ($1,16\pm 0,05$) elde edilmesini sağlamış ve bu değer diğer uygulamalardan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuçlar, kemik jelatininde orta düzey hidrolizin hidrofobik etkileşimleri artırarak yağ bağlama kapasitesini iyileştirdiğini göstermektedir.

Pul jelatini örneklerinde ise VEA+pepsin uygulaması, en yüksek hidroliz derecesine paralel olarak STK ($0,77\pm 0,08$) ve viskozite ($0,81\pm 0,01$ cP) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaya ($p<0.05$) yol açmıştır. Buna karşın YBK değerinin ($1,03\pm 0,06$) artış göstermesi, kısa zincirli peptitlerin hidrofobik bölgelerinin yağ ile etkileşimini artırdığını düşündürmektedir. Pepsin uygulaması ise tüm parametreler açısından daha dengeli bir profil sergilemiş olup, değerler arasındaki farkların kısmen sınırlı ve bazı durumlarda istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$).

Yüksek hidroliz derecesinin (özellikle VEA+pepsin uygulaması) viskozite ve su tutma kapasitesini düşürdüğü, buna karşılık yağ bağlama kapasitesi üzerinde olumlu etkiler oluşturabildiği ve bu etkilerin jelatin kaynağına bağlı olarak değiştiği istatistiksel olarak ortaya konmuştur.

4.7. Hidrolizatların UV Görünür Bölge Spektrumları

Jelatin hidrolizatlarının UV – Vis absorpsiyon spektrumları incelendiğinde, en yüksek absorpsiyon değerlerinin vurgulu elektrik alan (VEA) uygulanan örneklerde elde edildiği görülmüştür. Tüm hidrolizatlarda 200 – 230 nm aralığında belirgin absorpsiyon bantları gözlenmiş olup, bu bölge peptit bağları ve düşük molekül ağırlıklı peptitlerin varlığı ile ilişkilendirilmektedir. VEA uygulamasında bu bantların daha yüksek yoğunluk göstermesi, elektrik alan etkisiyle jelatin yapısında meydana gelen fiziksel ve konformasyonel değişimlerin peptit bağlarının daha erişilebilir hale gelmesine katkı sağladığını düşündürmektedir.



Şekil 4.1. Hidrolizatların UV görünür bölge spektrumları

VEA uygulanan hidrolizatlarda ayrıca 260 – 280 nm dalga boyu aralığında da absorpsiyon artışı tespit edilmiştir. Bu bölgedeki absorpsiyon, aromatik amino asitlerin (tirozin, triptofan ve fenilalanin) varlığına atfedilmekte olup, VEA işleminin jelatin zincirlerinde aromatik yan grupların açığa çıkmasını veya ortamla etkileşimini artırmış

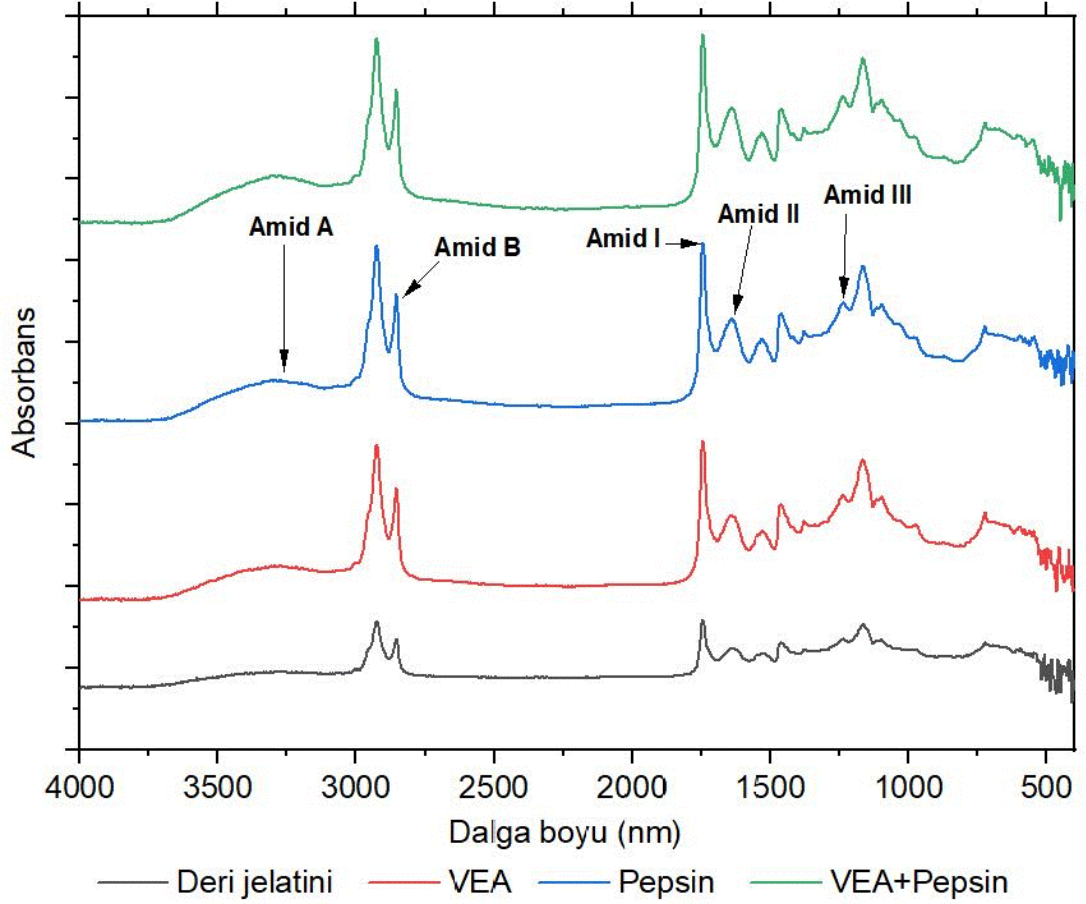
olabileceğini göstermektedir. Bu bulgu, daha önce belirlenen hidroliz derecesi sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, VEA'nın enzimatik hidrolize kıyasla daha sınırlı bir hidroliz sağlamasına rağmen yapısal yeniden düzenlenmeyi etkin biçimde tetiklediğini ortaya koymaktadır.

Antioksidan aktivite sonuçları ile UV – Vis spektrumları birlikte değerlendirildiğinde, VEA uygulamasında gözlenen yüksek absorpsiyon değerlerinin her zaman daha yüksek antioksidan aktivite ile örtüşmediği dikkat çekmektedir. Bu durum, absorpsiyon artışının yalnızca peptit miktarı ile değil, aynı zamanda peptitlerin amino asit kompozisyonu ve dizilimi ile de ilişkili olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, fonksiyonel özelliklerde (su tutma kapasitesi ve viskozite) VEA uygulamasının daha yüksek değerler sergilemesi, bu yapısal değişimlerin jelatin ağ yapısının kısmen korunmasına olanak tanıdığını açıklamaktadır.

4.8. Hidrolizatların Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları

FTIR analizine ait dalga boyu değerleri, jelatin ve jelatin hidrolizatlarının yapısal özelliklerinde meydana gelen değişimleri ortaya koymakta olup, özellikle Amid bantlarındaki kaymalar protein yapısındaki bağlanma düzeni ve değişimler hakkında bilgi sağlamaktadır.

Deri jelatini ve hidrolizatlarına ait FTIR sonuçları incelendiğinde, Amid A bandının ($3280 - 3307 \text{ cm}^{-1}$) N–H gerilme titreşimleri ile ilişkili olduğu ve hidrojen bağlarının göstergesidir. Saf deri jelatininde 3280 cm^{-1} olarak belirlenen bu bant, VEA ve pepsin uygulamalarında sınırlı değişim gösterirken, VEA+pepsin uygulamasında 3307 cm^{-1} 'ye kayarak daha zayıf hidrojen bağlanmasına işaret eden bir artış göstermiştir. Amid B bandı (2850 cm^{-1}), CH_2 gerilme titreşimleri ile ilişkili olup tüm uygulamalarda benzer kalmış, bu durum alifatik zincir yapısının büyük ölçüde korunduğunu göstermektedir. Amid I bandı (1743 cm^{-1}), C=O gerilme titreşimleri ile protein sekonder yapısını yansıtırken önemli bir değişim göstermemiştir. Buna karşılık Amid II bandında ($1632 - 1640 \text{ cm}^{-1}$) gözlenen küçük kaymalar, özellikle hidrolizatlarda protein zincirlerinde kısmi açılma ve sekonder yapı değişimlerini işaret etmektedir. Amid III bandındaki ($1234 - 1239 \text{ cm}^{-1}$) sınırlı artışlar ise C–N gerilmesi ve N–H bükülmeleri ile ilişkili olup, hidroliz sonrası oluşan yapıları desteklemektedir.

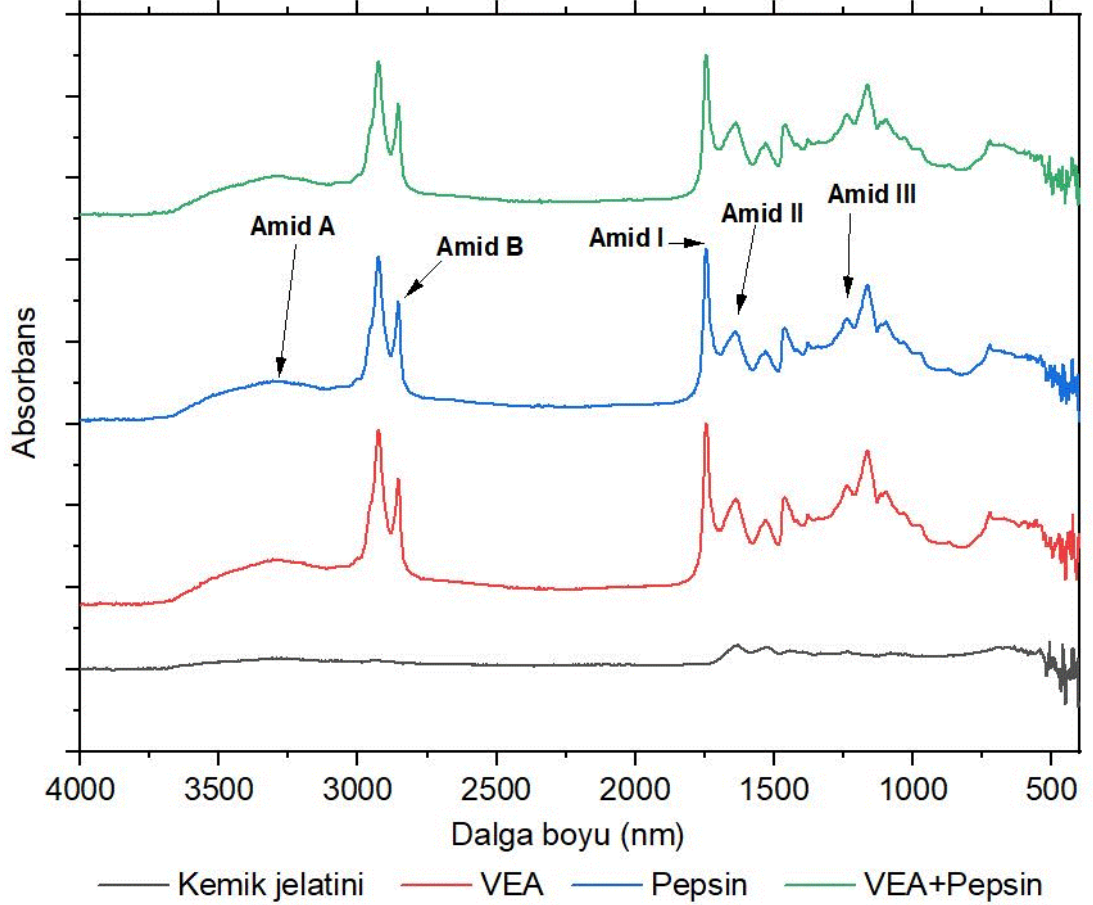


Bölge	Dalga boyu (nm)			
	Deri jelatini	VEA	Pepsin	VEA+Pepsin
Amid A	3280	3275	3286	3307
Amid B	2925	2854	2854	2854
Amid I	1743	1743	1743	1743
Amid II	1632	1639	1640	1639
Amid III	1234	1237	1238	1239

Şekil 4.2. Deri jelatini ve hidrolizatlarına ait FTIR sonuçları

Kemik jelatini örneklerinde Amid A bandının saf örnekte 3292 cm^{-1} 'den hidrolizatlar-
da $3305 - 3307 \text{ cm}^{-1}$ aralığına kayması, hidrojen bağlarının zayıfladığını ve protein yapısının
daha gevşek hale geldiğini göstermektedir. Amid B bandında saf örnekte daha yüksek bir
değer (2925 cm^{-1}) gözlenirken, hidrolizatlarda 2854 cm^{-1} seviyesine düşmesi, hidroliz ile
birlikte alifatik zincir çevresinde bağlarda değişiklikler meydana geldiğini göstermektedir.
Amid I bandının saf örnekte 1631 cm^{-1} iken hidrolizatlarda 1743 cm^{-1} 'ye kayması, C=O
gerilme titreşimlerinde belirgin bir değişim olduğunu ve sekonder yapının önemli ölçüde

etkilendiğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde Amid II bandındaki artış (1529'dan ~1638 – 1639 cm^{-1} 'ye) protein omurgasında yeniden düzenlenmeye işaret etmektedir. Amid III bandındaki küçük artışlar ise hidroliz sonrası peptit zincirlerinde kısmi yeniden yapılanmayı desteklemektedir.

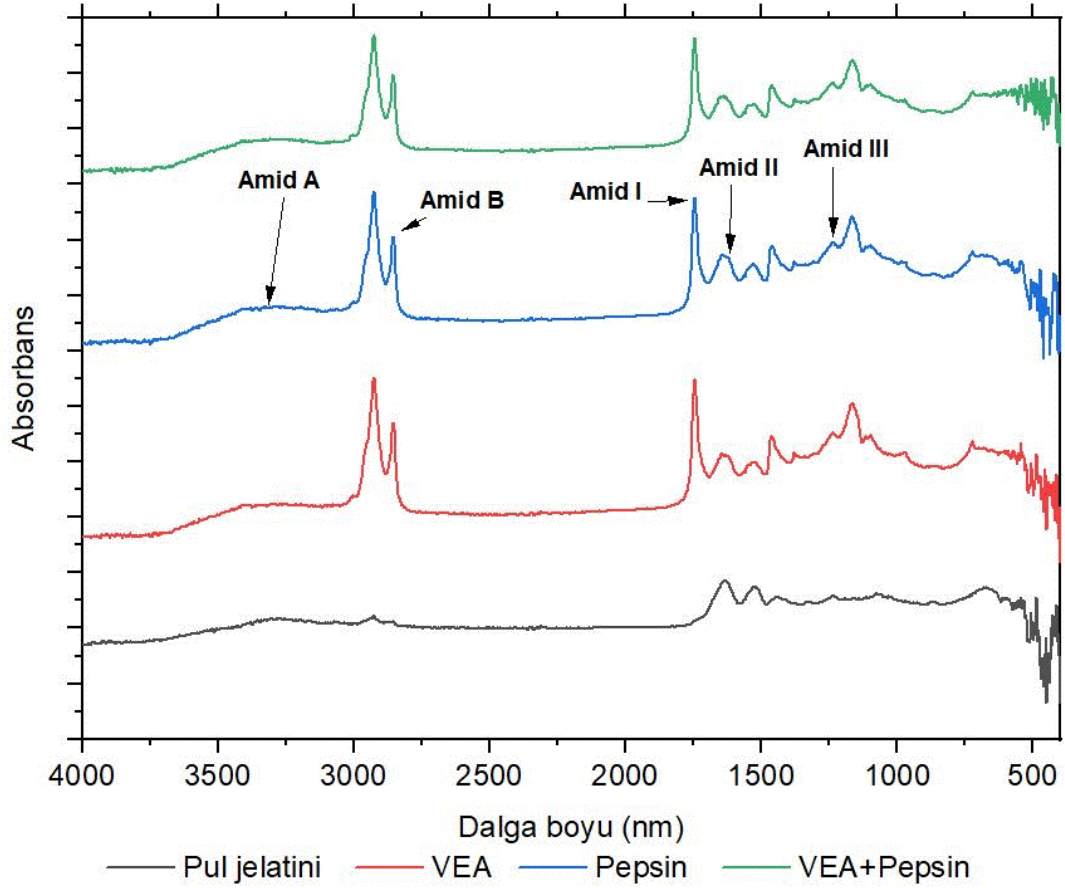


Bölge	Dalga boyu (nm)			
	Kemik jelatini	VEA	Pepsin	VEA+Pepsin
Amid A	3292	3305	3307	3307
Amid B	2925	2854	2854	2854
Amid I	1631	1743	1743	1743
Amid II	1529	1639	1639	1638
Amid III	1234	1234	1236	1238

Şekil 4.3. Kemik jelatini ve hidrolizatlarına ait FTIR sonuçları

Pul jelatini örneklerinde Amid A bandının saf örnekte 3289 cm^{-1} 'den VEA ve VEA+pepsin uygulamalarında 3305 – 3307 cm^{-1} 'ye kayması, kemik jelatinine benzer şekilde hidrojen bağlarının zayıfladığını ve yapının daha açık hale geldiğini göstermektedir. Pepsin

uygulamasında ise daha düşük bir değer (3275 cm^{-1}) elde edilmesi, enzimatik hidrolizin farklı bir bağlanma düzeni oluşturduğunu göstermektedir. Amid B bandı tüm hidrolizatlarda sabit kalarak yapısal bütünlüğün kısmen korunduğunu göstermiştir. Amid I bandının saf örnekte 1631 cm^{-1} 'den hidrolizatlarda 1745 cm^{-1} 'ye yükselmesi, sekonder yapıdaki belirgin değişimlerin göstergesidir.



Bölge	Dalga boyu (nm)			
	Pul jelatini	VEA	Pepsin	VEA+Pepsin
Amid A	3289	3305	3275	3307
Amid B	2924	2854	2854	2854
Amid I	1631	1745	1745	1745
Amid II	1529	1649	1639	1647
Amid III	1234	1234	1234	1234

Şekil 4.4. Pul jelatini ve hidrolizatlarına ait FTIR sonuçları

Amid II bandındaki artışlar (1529 'dan $1639 - 1649 \text{ cm}^{-1}$ 'ye) ve Amid III bandının sabit kalması veya çok sınırlı değişmesi, hidroliz sonrası özellikle omurga titreşimlerinde değişim

olduğunu ancak bazı lokal yapıların korunduğunu ortaya koymaktadır. FTIR sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, saf jelatin örneklerinde belirgin olan Amid I (1600 – 1700 cm⁻¹), Amid II (1500 – 1600 cm⁻¹) ve Amid III (1200 – 1300 cm⁻¹) bantlarının protein yapısına özgü düzenli sekonder yapıyı yansıttığı görülürken, uygulamalar sonrası elde edilen jelatin hidrolizatlarında bu bantlarda şiddet azalması ve kısmi kaymalar dikkat çekmektedir. Pepsin uygulanan örneklerde peptit bağlarının enzimatik olarak parçalanmasına bağlı olarak özellikle Amid I ve II bölgelerinde zayıflama gözlenmiş, bu durum protein yapısının daha küçük peptitlere ayrıldığını göstermiştir. VEA uygulamasında ise elektrik alan etkisiyle hidrojen bağları ve zayıf etkileşimlerin bozulmasına bağlı olarak bantlarda sınırlı değişimler meydana gelmiş, yapının kısmen açıldığı anlaşılmıştır. VEA+pepsin kombinasyonunda ise bu etkilerin daha belirgin hale geldiği hem yapısal gevşemenin hem de enzimatik hidrolizin birlikte etkisiyle Amid bantlarında daha fazla azalma ve kayma olduğu görülmektedir. Bu durum, VEA uygulamasının enzimin substrata erişimini kolaylaştırarak hidrolizi artırdığını ve sonuçta daha düşük molekül ağırlıklı, yapısal olarak daha da düzensiz jelatin hidrolizatlarının oluştuğunu göstermektedir.

5. TARTIŞMA

5.1. Jelatin Örneklerinin VEA ile Hidrolizi

Bu çalışmada, farklı jelatin kaynaklarına (deri, kemik ve pul) uygulanan vurgulu elektrik alan (VEA) işleminin hidroliz derecesi üzerine etkisi incelenmiş ve frekans artışına bağlı olarak tüm örneklerde hidroliz derecesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir ($p < 0.05$). Özellikle 1 Hz'den 5 Hz'e çıkıldığında hem titrasyon hem de OPA yöntemine göre tüm örneklerde düzenli bir artış eğilimi gözlenmiştir. Bu durum, VEA uygulamasının protein moleküllerinde yapısal esneklik sağlayarak peptid bağlarının kırılmasını kolaylaştırdığını göstermektedir. Benzer şekilde, Herrera Lavados vd. (2025) deri jelatini üzerinde yaptığı çalışmada yüksek voltajlı elektrik alan uygulamasının hidroliz verimliliğini artırdığını rapor etmiştir. Ayrıca, Marín-Sánchez vd. (2024) VEA'nın moleküler zincirlerde kısmi açılmaya yol açarak enzimatik hidrolizi kolaylaştırdığını belirtmiştir. Frekans artışı ile artan hidroliz trendi, VEA uygulamasının frekans ve şiddet parametrelerinin hidroliz etkinliğini artırıcı rolünü desteklemektedir (Bhat vd., 2019).

Tüm jelatin örneklerinde hidroliz derecesinin frekans artışıyla birlikte hem titrasyon yöntemine göre hem de OPA yöntemine göre yükselmesi, VEA uygulamasının protein yapısında oluşturduğu değişikliklerin enzim-substrat etkileşimini artırdığını göstermektedir. Elektrik alan etkisiyle protein zincirlerinde meydana gelen kısmi açılmalar, pepsin gibi proteolitik enzimlerin bağlanma bölgelerine erişimini kolaylaştırmaktadır. Bu durum, VEA uygulamalarının protein sindirilebilirliğini ve hidroliz kinetiğini artırdığını bildiren çalışmalarla paralellik göstermektedir (Bhat vd., 2019). Ayrıca, fiziksel ön işlemlerin protein yapısını gevşeterek enzimatik reaksiyonları hızlandırdığı da rapor edilmiştir (Sampaio vd., 2022).

Kemik jelatini örneklerinde tüm frekanslarda daha düşük hidroliz dereceleri elde edilmesi kemik kolajeninin daha yüksek çapraz bağ yoğunluğuna ve daha kompakt bir yapıya sahip olmasıyla açıklanabilir. Protein yapısının daha düzenli ve stabil olması durumunda enzimatik hidrolizin daha sınırlı gerçekleştiği belirtilmektedir (Bhat vd., 2019). Pul jelatini örneklerinde ise en yüksek hidroliz derecesine ulaşılmıştır (titrasyon: %5,87; OPA: %1,95). Bu durum, balık kaynaklı kolajenin daha düşük çapraz bağ içeriğine sahip olması ve daha

gevşek bir yapıda olduğunu göstermektedir. Deniz yan ürünlerden elde edilen proteinlerin daha kolay hidrolize olduğu ve biyolojik aktivitesi yüksek peptitlerin üretiminde avantaj sağladığı rapor edilmiştir (Sila & Bougategf, 2016). Ayrıca, somon yan ürünlerinden elde edilen proteinlere uygulanan VEA işleminin hidroliz derecesini artırdığı ve biyolojik aktiviteyi geliştirdiği bildirilmiştir (Herrera-Lavados vd., 2025).

5.2. Jelatin Örneklerinin Enzimatik Hidrolizi

Enzimatik hidroliz sonuçları, jelatin kaynağı ve enzim kompozisyonunun hidroliz derecesi üzerinde belirleyici olduğunu göstermektedir. Ölçüm yöntemleri açısından tüm örneklerde titrasyon yöntemi OPA yöntemine göre daha yüksek hidroliz derecesi vermiştir. Bu fark, titrasyon yönteminin toplam protein parçalanmasını daha genel bir yaklaşımla değerlendirmesine karşın OPA yönteminin yalnızca serbest amino gruplarını ölçmesinden kaynaklanmaktadır. Benzer şekilde farklı hidrolizat sistemlerinde de OPA yönteminin daha düşük ancak daha spesifik sonuçlar verdiği, titrasyon yönteminin ise daha geniş kapsamlı hidroliz eğilimini yansıttığı bildirilmiştir (Alemán vd., 2011; Tkaczewska vd., 2020).

Çalışmada elde edilen bulgular, özellikle enzim türü ve oranının hidroliz verimini önemli ölçüde değiştirdiğini bildirilmektedir. Nitekim farklı substratlar üzerinde yapılan çalışmalarda, enzim tipi ve kombinasyonunun hidroliz derecesini doğrudan etkilediği ve her enzim sisteminin farklı kesim spesifikliği gösterdiği rapor edilmiştir. Feng vd. (2024), balık pulundan elde edilen jelatin üzerinde pepsin, alkalaz ve papain gibi farklı proteazları karşılaştırmış ve özellikle alkalazın daha yüksek hidroliz sağladığı, pepsinin ise daha sınırlı fakat daha kontrollü parçalanma oluşturduğu rapor edilmiştir (Fawale vd., 2023; Feng vd., 2024). Benzer şekilde farklı kaynaklardan elde edilen jelatinlerde yapılan çalışmalar, hidroliz veriminin hem enzim türüne hem de substrat yapısına bağlı olarak değiştiği vurgulanmıştır (Zhang vd., 2019; Yang vd., 2019).

Bu çalışmada tüm örneklerde yalnızca pepsin kullanılan sistemlerde en yüksek hidroliz dereceleri elde edilmiştir. Tavuk kemiği jelatininde 1:0 pepsin oranında %11,80 (titrasyon) ve %5,37 (OPA), balık pulu jelatininde %13,85 ve %5,65, tavuk derisi jelatininde ise %7,75 ve %4,51 değerleri ölçülmüştür. Bu bulgular, pepsinin jelatinin özellikle aromatik amino asitler içeren bölgelerinde yüksek hidrolitik aktivite gösterdiğini ve enzimatik hidrolizde

önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Pepsin oranı azaldıkça ve Proteinaz-K sisteme dahil edildikçe tüm örneklerde hidroliz derecesi düzenli olarak düşmüştür. Mohammad vd. (2015), tilapia pullarından jelatin üretiminde enzimatik hidroliz optimizasyonu yapmış ve enzim konsantrasyonu arttıkça hidroliz derecesinin yükseldiğini, ancak belirli bir noktadan sonra artışın sınırlı kaldığını bildirmiştir. Özellikle pepsin oranı azaldıkça hidroliz değerinin düşmesi ve enzim/substrat oranının kritik bir parametre olduğunu vurgulanmıştır. Bu durum, pepsinin kolajen kökenli proteinlerde daha hedeflenmiş kesim bölgelerinde etkili olmasıyla açıklanabilirken, Proteinaz-K'nin daha geniş substrat spektrumuna rağmen jelatin yapısında daha düşük verimli hidroliz oluşturmasıyla ilişkilendirilebilir. Benzer şekilde enzim türünün hidroliz verimi üzerindeki etkisi farklı substratlarda da doğrulanmış ve enzim seçiminin hidroliz profilini belirgin şekilde değiştirdiği gösterilmiştir (Fawale vd., 2023; Tabarestani vd., 2024). Ancak, bazı çalışmalarda enzim karışımlarının sinerjik etki gösterdiğini bildirmişken, proteinaz-K'nin geniş spektrumlu ancak daha düşük etkinlikteki hidrolitik yapısını ve pepsin ile kombinasyonunun sinerjik etki yaratmadığı anlaşılmıştır.

Ayrıca enzimatik hidrolizin etkinliğinin artırılması için birçok çalışmada hidrotermal, asidik ve/veya alkali muamele vb. gibi ön işlemler uygulanmaktadır. Zhang vd. (2019), balık pullarının hidrotermal ön işlem sonrası pepsin ve alkalaz ile hidrolizi üzerine yaptıkları çalışmada, ön işlem uygulanmış örneklerde enzimatik parçalanmanın belirgin şekilde arttığını ve özellikle balık pullarının kolajen yapısının açılmasıyla enzim erişiminin kolaylaştığını göstermiştir.

5.3. Jelatin Örneklerinin VEA Destekli Enzimatik Hidrolizi

Farklı jelatin kaynaklarına (deri, kemik ve pul) uygulanan vurgulu elektrik alan (VEA) ve enzimatik hidroliz işlemlerinin hidroliz derecesi (HD) üzerindeki etkileri incelenmiş ve hem işlem türü hem de jelatin kaynağına bağlı olarak anlamlı farklılıklar ortaya konmuştur. Elde edilen bulgular, tüm örnek gruplarında VEA+pepsin kombinasyonunun en yüksek hidroliz derecesini sağladığını açıkça göstermektedir. Bu durum, VEA uygulamasının protein yapısını modifiye ederek enzimatik hidrolizi destekleyen bir ön işlem olarak işlev gördüğünü ortaya koymaktadır.

VEA uygulamasının tek başına sınırlı düzeyde hidroliz sağlaması (örneğin deri

jelatininde titrasyon yöntemi ile %5,50; kemik jelatininde %4,06) beklenen bir durumdur. Çünkü VEA, doğrudan peptit bağlarını parçalamaktan ziyade proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında değişikliklere yol açarak yapısal açılma sağlamaktadır. Sonuç olarak Zhu vd. (2025), VEA uygulamasının protein zincirlerinde yeniden düzenlenmeye ve yapısal gevşemeye neden olduğunu, ancak tek başına ileri düzey hidroliz oluşturmadığını bildirmiştir. Bu nedenle, çalışmamızda VEA uygulamasının düşük HD değerleri ile sınırlı kalması, yöntemin doğrudan hidrolitik değil, yardımcı (ön işlem) niteliğini desteklemektedir.

Pepsin enziminin tek başına uygulamasında hidroliz önemli ölçüde artmış, VEA ön işlemi ile pepsin uygulamasının sinerjik etkisi sonucu hidroliz derecesinde meydana gelen belirgin artıştır. Örneğin pul jelatininde HD değerinin titrasyon yöntemine göre %13,85'ten %21,48'e yükselmesi, yalnızca enzimatik etkinin değil, aynı zamanda substrat yapısındaki değişimin de sürece önemli katkı sağladığını göstermektedir. Herrera-Lavados vd. (2025) tarafından da VEA uygulamasının enzimatik hidrolizi artırdığı ve daha yüksek biyolojik aktiviteye sahip peptitlerin elde edilmesini sağladığı rapor edilmiştir. Benzer şekilde Akaberi vd. (2019), VEA ön işleminin protein yapısını gevşeterek enzimlerin substrata erişimini artırdığını ve reaksiyon hızını yükselttiğini belirtmiştir. Bu bağlamda, çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda VEA + pepsin uygulamasında gözlenen yüksek HD değerleri, enzim-substrat etkileşiminin artması ve erişilebilir bağ sayısının çoğalması ile açıklanabilir.

Çalışmada elde edilen bulgularda jelatin kaynakları arasında oldukça yüksek farklılıklar gözlemlenmiştir. Tüm işlem gruplarında pul jelatini en yüksek hidroliz derecesine ulaşırken, kemik jelatini görece daha düşük değerler göstermiştir. Bu durum, ham materyalin yapısal özellikleri ile ilişkilidir. Sharifi vd. (2025) VEA uygulaması kolajenin üçlü sarmal yapısını kısmen bozarak hidrolize duyarlılığı artırdığını, ancak bu etkinin derecesi başlangıç materyalinin yapısına bağlı olarak değiştiğini rapor etmiştir.

5.4. Hidrolizatların Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivite Değerleri

Deri, kemik ve pul ile uygulanan işlemler sonucunda (VEA, pepsin ve VEA+pepsin) antioksidan aktivite üzerindeki etkisi DPPH ve ABTS radikal giderme yöntemleri ile değerlendirilmiştir. DPPH ve ABTS sonuçlarına göre, düşük IC₅₀ değerleri daha yüksek antioksidan aktiviteyi ifade etmektedir.

Deri jelatininden elde edilen hidrolizatların genel olarak daha yüksek antioksidan kapasite sergilediği belirlenmiştir. Deri jelatini örneklerinde, en düşük IC₅₀ değerlerinin pepsin uygulamasında elde edildiği (DPPH: 0,54 mg/mL; ABTS: 0,60 mg/mL) ve dolayısıyla en yüksek antioksidan aktivitenin bu grupta olduğu belirlenmiştir. Enzimatik hidroliz sonucu proteinlerin daha küçük molekül ağırlıklı peptitlere parçalanması, serbest amino gruplarının açığa çıkması ve özellikle hidrofobik amino asitlerin radikal süpürücü aktiviteye katkı sağlaması bu durumu açıklamaktadır. Benzer şekilde, Liu vd. (2020) jelatin hidrolizatlarında hidroliz derecesinin artmasıyla DPPH ve ABTS aktivitelerinin yükseldiğini bildirmiştir. Ayrıca, Xie vd. (2021) sığır kolajen peptitlerinde düşük molekül ağırlıklı fraksiyonların daha yüksek radikal giderme kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Buna karşılık, deri jelatininde VEA + pepsin kombinasyonunun daha yüksek IC₅₀ değerleri göstermesi (DPPH: 1,86 mg/mL; ABTS: 1,10 mg/mL), bu işlemin beklenen sinerjik etkiyi oluşturmadığını göstermektedir. Bu durum, aşırı hidroliz sonucu biyolojik olarak aktif peptit dizilerinin parçalanması veya optimum peptit uzunluğunun kaybolması ile açıklanabilir. Benzer şekilde, Panjaitan vd. (2024) peptitlerin antioksidan aktivitesinin yalnızca hidroliz derecesine değil, aynı zamanda amino asit dizilimi ve yapısal özelliklerine bağlı olduğunu vurgulamaktadır.

Kemik jelatini örneklerinde genel olarak daha yüksek IC₅₀ değerleri elde edilmiş olup bu durum daha düşük antioksidan aktiviteye işaret etmektedir. Bununla birlikte, VEA + pepsin uygulamasının DPPH değerini düşürerek (3,07 mg/mL) göreceli bir iyileşme sağladığı görülmektedir. Pul jelatini sonuçları değerlendirildiğinde, pepsin uygulamasının en düşük IC₅₀ değerlerini verdiği (DPPH: 1,27 mg/mL; ABTS: 0,90 mg/mL) ve yüksek antioksidan aktiviteyi sağladığı belirlenmiştir. Bu bulgular, Hernandez-Ruiz vd. (2023) ve González-Serrano vd. (2022) tarafından rapor edilen, balık kaynaklı kolajen hidrolizatlarının güçlü antioksidan aktivite göstermesi ile paralellik göstermektedir.

Çalışmada deri, kemik ve pul jelatinlerinden elde edilen ve 30 kDa altı molekül ağırlığına sahip hidrolizatların antimikrobiyal aktiviteleri Salmonella Typhimurium, Escherichia coli O157:H7 ve Listeria monocytogenes üzerine inhibisyon zon çapları ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tüm örneklerde inhibisyon zonlarının yaklaşık 6.12–6.26 mm aralığında olduğu ve bu değerlerin Gentamisin kontrolüne kıyasla

oldukça düşük kaldığı belirlenmiştir. Bu bulgular, elde edilen hidrolizatların incelenen mikroorganizmalar üzerinde sınırlı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Mevcut çalışmalar düşük molekül ağırlıklı peptitlerin (özellikle <10 kDa) antimikrobiyal aktivite açısından daha etkili olduğu sıklıkla vurgulanmaktadır (Nikoo vd. 2023). Bu çalışmada kullanılan fraksiyonların 30 kDa altı olması, teorik olarak biyolojik aktivite açısından avantajlı bir durum olarak değerlendirilse de elde edilen sonuçlar bu molekül ağırlığı aralığının antimikrobiyal aktivite için tek başına yeterli olmadığını göstermektedir. Benzer şekilde, Lima vd. (2015) ve Vidal vd. (2022) kolajen hidrolizatlarının antimikrobiyal etkisinin yalnızca molekül ağırlığına değil, aynı zamanda peptitlerin amino asit dizilimi, yük dağılımı ve hidrofobik karakterine bağlı olduğunu bildirmiştir.

5.5. Hidrolizatların Fiziko-Kimyasal Özellikleri

Hidrolizatların fonksiyonel özelliklerinden su tutma kapasitesi incelendiğinde (STK), deri ve pul jelatininde en yüksek değerlerin VEA uygulamasında elde edildiği, enzimatik hidroliz ve özellikle kombine (VEA + pepsin) işlemin STK değerlerinde azalmaya yol açtığı görülmüştür. Buna karşılık kemik jelatininde işlemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu durum, hidroliz işlemi sırasında protein yapısının parçalanmasına bağlı olarak suyu tutan üç boyutlu ağ yapısının bozulmasıyla açıklanabilir. Tang vd. (2022) kolajenin hidrolizi sonucu yapısal bütünlüğün kaybolduğunu ve bunun su tutma gibi fonksiyonel özelliklerde azalmaya neden olabileceğini bildirmiştir. Bununla birlikte, ön işlem uygulamalarının protein yapısı üzerindeki etkisi de bu değişimde önemli rol oynamaktadır. Ultrases gibi yardımcı işlemlerin protein yapısını gevşeterek daha açık bir yapı oluşturduğu, ancak ileri hidroliz ile uygulandığında yapısal bütünlüğün daha fazla bozulmasına neden olabileceği rapor edilmiştir (Lee vd. 2022; Hu vd. 2023). Yağ bağlama kapasitesi (YBK) sonuçları ise daha kompleks bir eğilim göstermiştir. Deri jelatininde kombine işlem YBK değerini düşürürken, kemik ve pul jelatininde özellikle pepsin ve VEA + pepsin uygulamaları ile daha yüksek YBK değerleri elde edilmiştir. Bu farklılık, hidroliz sırasında açığa çıkan hidrofobik amino asitlerin miktarı ve dağılımına bağlı olarak açıklanabilir (Tawalbeh vd. 2025).

Viskozite parametresi tüm örneklerde benzer bir eğilim göstermiş olup, en yüksek

değerler VEA uygulamasında, en düşük değerler ise VEA + pepsin kombinasyonunda elde edilmiştir. Bu durum, proteolitik ve fiziksel işlemlerin sinerjik etkisiyle polipeptit zincir uzunluğunun azalması ve moleküler ağırlık dağılımının daha düşük fraksiyonlara kayması ile ilişkilidir. Literatürde düşük molekül ağırlıklı peptitlerin daha düşük viskozite sergilediği ve hidroliz derecesinin artmasıyla viskozitenin sistematik olarak azaldığı rapor edilmiştir (Tang vd. 2022; Cui vd. 2024). Ayrıca, küçük molekül ağırlıklı peptitlerin artan çözünürlüğü, yüzey aktivitesi ve difüzyon kapasitesi, fonksiyonel özelliklerde gözlenen değişimlerin temel mekanizmasını oluşturduğu vurgulanmıştır (González-Serrano vd. 2022).

5.6. Hidrolizatların UV Görünür Bölge Spektrumları ve Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

UV–Vis absorpsiyon spektrumlarında gözlenen değişimler, hidroliz ve VEA uygulamalarının jelatin yapısında hem konformasyonel hem de moleküler düzeyde önemli değişikliklere yol açtığını göstermektedir (Hernández-Ruiz vd., 2023; Hou & Chen, 2023; Bi vd., 2025). Protein hidrolizatlarının 200 – 230 nm aralığında gösterdiği artan absorpsiyon, temel olarak peptit bağlarının $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronik geçişlerinden kaynaklanmakta olup, bu durum protein omurgasının parçalanması ve daha küçük peptit fraksiyonlarının oluşumu ile ilişkilidir (Hernández-Ruiz vd., 2023). Nitekim balık derisi ve kemik kökenli kolajenlerin yapısal olarak çözünmesiyle bu bölgede UV sinyalinin belirgin şekilde güçlendiği bildirilmiştir (Hou & Chen, 2023; Zhang vd., 2023; Bi vd., 2025).

260 – 280 nm bölgesinde gözlenen absorpsiyon artışı ise başlıca aromatik amino asitler olan tirozin, triptofan ve fenilalanin kalıntılarının açığa çıkması ve bu grupların çevresel maruziyetinin artması ile ilişkilendirilmektedir (Hernández-Ruiz vd., 2023). Bu bağlamda, Yuan vd. (2024) kolajen peptitlerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, yapı modifikasyonlarının aromatik amino asitlerin daha erişilebilir hale gelmesine yol açtığını ve bunun UV absorpsiyon profilinde belirgin değişimlere neden olduğunu ortaya koymuştur. Benzer şekilde, hidroliz derecesinin artmasıyla birlikte 280 nm civarında gözlenen maksimum absorpsiyonun, başlangıç yapısında gömülü bulunan aromatik amino asitlerin açığa çıkmasıyla açıklanabileceği bildirilmektedir (Bi vd., 2025).

FTIR spektrumları, jelatin ve kollajen hidrolizatlarının sekonder yapı değişimlerini,

üçlü heliksin korunma derecesini ve moleküler bağ düzenindeki farklılıkları ortaya koymada yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Zhang vd., 2025). Kolajenin farklı kaynaklardan (balık derisi, kemik vb.) elde edilmesi ve işleme koşulları, özellikle hidrojen bağlarının stabilitesi ve helikal yapı bütünlüğü üzerinde belirgin değişimlere neden olabilmektedir (Zhang vd., 2025).

Amide A bandında (3280–3307 cm⁻¹) gözlenen kaymalar, N – H gerilme titreşimleri ve hidrojen bağları arasındaki etkileşimlerin değiştiğini göstermektedir. Saf jelatin örneklerinde bu bandın daha düşük dalga sayılarında konumlanması, daha düzenli ve sıkı hidrojen bağlarına işaret ederken; VEA uygulaması sonrası gözlenen sınırlı kayma, elektrik alanın protein zincirleri üzerinde oluşturduğu fiziksel etkiyle bu bağların kısmen zayıfladığını ve yapının daha gevşek bir hale geldiğini göstermektedir. Benzer şekilde, elektrik alan uygulamalarının protein konformasyonunda açılma ve yeniden düzenlenmeye yol açtığı daha önce de rapor edilmiştir (Akaberi vd., 2019).

Pepsin uygulaması, özellikle Amide I ve Amide II bantlarında belirgin değişimlere neden olmuş, bu durum peptit bağlarının enzimatik hidrolizi ile kolajen yapısının parçalandığını ve üçlü heliksin daha küçük peptit yapılarına dönüştüğünü göstermiştir. Farklı kaynaklardan elde edilen kolajen ve jelatin hidrolizatlarında da enzimatik hidrolizin molekül ağırlığını düşürdüğü, yapıyı daha heterojen ve düzensiz hale getirdiği bildirilmiştir (Schmidt vd., 2020; Hou ve Chen, 2023). Ayrıca balık derisi kaynaklı kolajen peptitlerinin ekstraksiyon sonrası daha düşük molekül ağırlıklı fraksiyonlara ayrıldığı ve bunun yapısal özellikleri etkilediği belirtilmiştir (Hou ve Chen, 2023; Huang vd., 2023).

VEA ve pepsin kombinasyonu ise hem fiziksel hem de enzimatik mekanizmaların birlikte etkili olduğu en güçlü yapısal değişimi ortaya koymuştur. Bu kombinasyon, Amide A, I ve II bantlarında daha belirgin kaymalar ve şiddet azalması oluşturarak protein zincirlerinin daha ileri düzeyde açıldığını ve parçalandığını göstermektedir. Elektrik alanın enzimatik hidrolizi kolaylaştırdığı ve protein substratına erişimi artırdığı, böylece hidroliz verimliliğini yükselttiği literatürde de belirtilmiştir (Akaberi vd., 2019). Ayrıca enzimatik, asidik ve alkali ekstraksiyon yöntemlerinin kollajen jelatin yapısında farklı derecelerde konformasyonel değişimlere yol açtığı ve bu değişimlerin FTIR spektrumlarına doğrudan

yansıdığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2025).

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada, farklı kaynaklardan elde edilen jelatinlerin vurgulu elektrik alan (VEA), pepsin ile enzimatik hidroliz ve bu iki işlemin ardışık uygulanması sonucunda oluşan hidrolizatlarının yapısal, fonksiyonel ve antioksidan özellikleri kapsamlı şekilde değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, VEA uygulamasının jelatin üzerinde yalnızca bir ön işlem olarak değil, aynı zamanda doğrudan ve kısmi hidrolitik etki oluşturarak protein yapısını modifiye edebildiğini ortaya koymuştur. VEA sonrası enzim kullanılmaksızın dahi hidroliz derecesinde gözlenen artış, bu uygulamanın jelatin zincirlerinde konformasyonel açılma ve peptit bağlarının erişilebilirliğinde artışa yol açtığını göstermektedir. VEA uygulamasını takiben pepsin ile gerçekleştirilen enzimatik hidroliz işlemi, hidroliz derecesini belirgin biçimde artırmış ve VEA'nın enzimatik hidroliz üzerinde sinerjik bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, hidroliz derecesindeki artışın her zaman antioksidan aktivite ve fonksiyonel özelliklerde iyileşme ile sonuçlanmadığı belirlenmiştir. Bu durum, jelatin hidrolizatlarının biyolojik ve teknolojik performansının yalnızca hidroliz derecesine değil, oluşan peptitlerin moleküler ağırlık dağılımı, amino asit dizilimi ve hidrofobik karakteri gibi yapısal özelliklerine de bağlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Antioksidan aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, belirli düzeyde hidrolizin radikal süpürme kapasitesini artırdığı; ancak aşırı hidrolizin bazı örneklerde bu etkiyi sınırlayabildiği görülmüştür. Bu bulgu, optimum hidroliz koşullarının belirlenmesinin biyolojik aktivite açısından kritik olduğunu göstermektedir. UV-Vis absorpsiyon spektrumlarında özellikle VEA uygulanan örneklerde gözlenen absorpsiyon artışları, jelatin yapısında meydana gelen konformasyonel değişimleri ve kısa zincirli peptitlerin oluşumunu destekler niteliktedir.

Fonksiyonel özellikler açısından, hidroliz derecesinin artmasıyla birlikte su tutma kapasitesi ve viskozitede azalma meydana gelmiş; buna karşılık yağ bağlama kapasitesinde bazı hidrolizatlarda artış gözlenmiştir. Bu durum, jelatin zincirlerinin hidrolizle birlikte kısalması ve hidrofobik amino asitlerin açığa çıkmasıyla ilişkilendirilebilir. Elde edilen sonuçlar, jelatin hidrolizatlarının kullanım amacına bağlı olarak hidroliz koşullarının dikkatle optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Genel olarak bu çalışma, VEA destekli enzimatik hidrolizin jelatin hidrolizatlarının

üretiminde yenilikçi ve etkili bir yaklaşım olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak elde edilen biyolojik ve fonksiyonel özelliklerin maksimum düzeye çıkarılabilmesi için hidroliz derecesinin kontrollü şekilde ayarlanması büyük önem taşımaktadır.

7. ÖNERİLER

Gelecekte yapılacak çalışmalarda hidrolizatların moleküler ağırlık dağılımlarının SDS-PAGE ve GPC gibi tekniklerle detaylı olarak incelenmesi, amino asit dizilimlerinin LC-MS/MS analizleriyle belirlenmesi önerilmektedir. Ayrıca, farklı enzim sistemlerinin (alkalin proteazlar, papain, tripsin vb.) VEA ile kombinasyon halinde kullanılması, hidrolizatların biyolojik aktivitelerinin daha kapsamlı değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır. Bunun yanı sıra, elde edilen jelatin hidrolizatlarının gerçek gıda sistemlerinde antioksidan ve fonksiyonel bileşen olarak davranışlarının incelenmesi, endüstriyel uygulanabilirlik açısından önemli katkılar sunacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdalbasit Adam, M., & Fadol, A. H. (2013). Review: gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*, *12*, 135–147.
- Ahmed, M. A., Al-Kahtani, H. A., Jaswir, I., AbuTarboush, H., & Ismail, E. A. (2020). Extraction and characterization of gelatin from camel skin (potential halal gelatin) and production of gelatin nanoparticles. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(6), 1596–1601.
- Aisha, A. F. A., Majid, A. M. S. A. & Ismail, Z. (2014). Preparation and characterization of nano liposomes of Orthosiphon stamineus ethanolic extract in soybean phospholipids. *BMC biotechnology*, *14*(1), 23.
- Akaberi, S., Gusbeth, C., Silve, A., Senthilnathan, D. S., Navarro-López, E., Molina-Grima, E., Müller, G., & Frey, W. (2019). Effect of pulsed electric field treatment on enzymatic hydrolysis of proteins of *Scenedesmus almeriensis*. *Algal Research*, *43*, 101656.
- Al Hajj, W., Salla, M., Krayem, M., Khaled, S., Hassan, H. F., & Khatib, S. E. (2024). Hydrolyzed collagen: Exploring its applications in the food and beverage industries and assessing its impact on human health—A comprehensive review. *Heliyon*, *10*(16).
- 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 and Technology*, *46*(6), 1129–1136.
- Alipal, J., Lee, T. C., Sahari, N., Basri, H., Pu'Ad, N. A. S. M., Nayan, N. H. M., Idris, M. I., & Abdullah, H. Z. (2021). A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. *Materials Today: Proceedings*, *42*, 240–250.
- Amangeldinova, M., Ersatır, M., Necip, A., Yilmaz, M. A., Cimentepe, M., Kudrina, N., Terletskaya, N. V., Cimentepe, O. O., & Yildirim, M. (2024). Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals from *Rheum tataricum* L. roots: a comparative study of supercritical CO₂, subcritical ethanol, and ultrasound-assisted extraction for enhanced antioxidant, antibacterial activities, and molecular docking study. *Frontiers in Plant Science*, *15*, 1513875.
- Arslan, S., Bicen, Y., & Binarbasi, Ö. (2021). Numerical analysis and application of electric field grading device for metal-enclosed switchgear. *SN Applied Sciences*, *3*(2), 218.
- Asaduzzaman, A. K. M., Getachew, A. T., Cho, Y.-J., Park, J.-S., Haq, M. & Chun, B.-S. (2020). Characterization of pepsin-solubilised collagen recovered from mackerel (*Scomber japonicus*) bone and skin using subcritical water hydrolysis. *International journal of biological macromolecules*, *148*, 1290–1297.
- Atef, M., Chait, Y. A., Ojagh, S. M., Latifi, A. M., Esmaeili, M., Hammami, R., & Udenigwe, C. C. (2021). Anti-Salmonella activity and peptidomic profiling of peptide fractions produced from sturgeon fish skin collagen (*Huso huso*) using commercial enzymes. *Nutrients*, *13*(8), 2657.
- Barba, F. J., Parniakov, O., Pereira, S. A., Wiktor, A., Grimi, N., Boussetta, N., Saraiva, J. A.,

- Raso, J., Martin-Belloso, O., & Witrowa-Rajchert, D. (2015). Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food research international*, 77, 773–798.
- Bashir, K. M. I., An, H.-R., Mansoor, S., Shin, H., Luzi, G., Sohn, J. H., & Choi, J.-S. (2026). Innovative Applications of Pulsed Electric Field Technology in Marine Biomass Processing. *Food and Bioprocess Technology*, 19(1), 19.
- Bhat, Z. F., Morton, J. D., Mason, S. L., & Bekhit, A. E.-D. A., (2019). Pulsed electric field operates enzymatically by causing early activation of calpains in beef during ageing. *Meat Science*, 153, 144–151.
- Bi, Y., Zhang, M., Liu, K., Lv, X., Li, X., Gao, X., Cui, F., Zhang, D., & Li, J. (2025). Optimization of enzymatic hydrolysis of collagen and screening and application of hypolipidemic peptide. *Food Bioscience*, 66, 106268.
- Cansu, Ü. (2024). Optimization of Collagen Isolation from Carp (*Carasobarbus luteus*) Scales using Response Surface Methodology. *Acta Aquatica Turcica*, 20(2), 140-150.
- Cansu, Ü., & Boran, G. (2015). Optimization of a multi-step procedure for isolation of chicken bone collagen. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(4), 431.
- Cansu, Ü., & Boran, G. (2022). Kinetic evaluation of gelatin extraction from chicken skin and the effect of some extraction parameters. *Journal of Food Process Engineering*, 45(4), e13995.
- Chatzimitakos, T., Athanasiadis, V., Kalompatsios, D., Mantiniotou, M., Bozinou, E., & Lalas, S. I. (2023). Pulsed electric field applications for the extraction of bioactive compounds from food waste and by-products: a critical review. *Biomass*, 3(4), 367–401.
- Cho, S. M., Kwak, K. S., Park, D. C., Gu, Y. S., Ji, C. I., Jang, D. H., Lee, Y. B., & Kim, S. B. (2004). Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) 281.
- Cui, P., Shao, T., Liu, W., Li, M., Yu, M., Zhao, W., Song, Y., Ding, Y. & Liu, J. (2024). Advanced review on type II collagen and peptide: preparation, functional activities and food industry application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(30), 11302–11319.
- Fawale, O. S., Mudgil, P., Abdelrahman, R., Baba, W. N., Nirmal, N. P., & Maqsood, S. (2023). Anti-hypercholesterolaemic and antioxidative activities of camel skin gelatin hydrolysate: effect of enzyme type, enzyme: substrate ratio and time of hydrolysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 58(4), 2151–2160.
- Feng, Y., Shi, Q., Xie, H., Ouyang, K., Xiong, H., & Zhao, Q. (2024). Combined effects of gelatin extraction methods and hydrolysis protease types on the functional properties of tilapia scale gelatin hydrolysates. *International Journal of Food Science and Technology*, 59(9), 6194–6206.

- Fu, Y., Therkildsen, M., Aluko, R. E., & Lametsch, R. (2019). Exploration of collagen recovered from animal by-products as a precursor of bioactive peptides: Successes and challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(13), 2011–2027.
- Gelatin Manufacturers Institute of America. (2019). *GMIA Standard Methods for the Testing of Edible Gelatin*.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E. a., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food hydrocolloids*, 25(8), 1813–1827.
- González-Serrano, D. J., Hadidi, M., Varcheh, M., Jelyani, A. Z., Moreno, A., & Lorenzo, J. M. (2022). Bioactive peptide fractions from collagen hydrolysate of common carp fish byproduct: Antioxidant and functional properties. *Antioxidants*, 11(3), 509.
- Han, Z., Cai, M.-j., Cheng, J.-H., & Sun, D.-W. (2018). Effects of electric fields and electromagnetic wave on food protein structure and functionality: A review. *Trends in food science & technology*, 75, 1–9.
- Harris, M., Potgieter, J., Ishfaq, K., & Shahzad, M. (2021). Developments for collagen hydrolysate in biological, biochemical, and biomedical domains: A comprehensive review. *Materials*, 14(11), 2806.
- Hernandez-Ruiz, K. L., Lopez-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D. I., Campas-Baypoli, O. N., Quintero-Guerrero, A. A., Grijalva-Delgado, M. d. L., & Chavez-Almanza, A. F. (2023). Collagen peptide fractions from tilapia (*Oreochromis aureus* Steindachner, 1864) scales: Chemical characterization and biological activity. *Food Bioscience*, 53, 102658.
- Herrera-Lavados, C., Tabilo-Munizaga, G., Carvajal-Mena, N., Jara-Quijada, E., Martínez-Oyanedel, J., & Pérez-Won, M. (2025). Obtaining bioactive peptides by enhancing enzymatic hydrolysis of salmon by-product proteins through pulsed electric fields (PEF). *Food Research International*, 208, 116103.
- Hong, H., Fan, H., Chalamaiah, M., & Wu, J. (2019). Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives. *Food chemistry*, 301, 125222.
- Hou, N.-T., & Chen, B.-H. (2023). Extraction, purification and characterization of collagen peptide prepared from skin hydrolysate of sturgeon fish. *Food Quality and Safety*, 7, fyad033.
- Hu, G., Li, X., Su, R., Corazzin, M., Liu, X., Dou, L., Sun, L., Zhao, L., Su, L., & Tian, J. (2023). Effects of ultrasound on the structural and functional properties of sheep bone collagen. *Ultrasonics Sonochemistry*, 95, 106366.
- Huang, J.-j., Li, H.-l., Xiong, G.-q., Cai, J., Liao, T., & Zu, X.-y. (2023). Extraction, identification and anti-photoaging activity evaluation of collagen peptides from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin. *Lwt*, 173, 114384.
- Ilie, D., Iosageanu, A., Craciunescu, O., Seciu-Grama, A.-M., Sanda, C., & Oancea, F. (2022).

- Free radical scavenging, redox balance and wound healing activity of bioactive peptides derived from proteinase K-assisted hydrolysis of Hypophthalmichthys molitrix skin collagen. *Food Technology and Biotechnology*, 60(3), 281–292.
- Karaaslan, M., Şengün, F., Cansu, Ü., Başıyigit, B., Sağlam, H., & Karaaslan, A. (2021). Gum arabic/maltodextrin microencapsulation confers peroxidation stability and antimicrobial ability to pepper seed oil. *Food chemistry*, 337, 127748.
- Lee, J. E., Noh, S.-K., & Kim, M. J. (2022). Effects of enzymatic-and ultrasound-assisted extraction on physicochemical and antioxidant properties of collagen hydrolysate fractions from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Antioxidants*, 11(11), 2112.
- Lima, C. A., Campos, J. F., Filho, J. L. L., Converti, A., Cunha, M. G. C. d., & Porto, A. L. F. (2015). Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. *Journal of Food Science and Technology*, 52(7), 4459–4466.
- Lin, S., Hu, X., Li, L., Yang, X., Chen, S., Wu, Y., & Yang, S. (2021). Preparation, purification and identification of iron-chelating peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin collagen and characterization of the peptide-iron complexes. *Lwt*, 149, 111796.
- Liu, C., Xia, Y., Hua, M., Li, Z., Zhang, L., Li, S., Gong, R., Liu, S., Wang, Z., & Sun, Y. (2020). Functional properties and antioxidant activity of gelatine and hydrolysate from deer antler base. *Food science & nutrition*, 8(7), 3402–3412.
- Lv, L.-C., Huang, Q.-Y., Ding, W., Xiao, X.-H., Zhang, H.-Y., & Xiong, L.-X. (2019). Fish gelatin: The novel potential applications. *Journal of Functional Foods*, 63, 103581.
- Malik, M. A., Sheikh, M. A., & Mir, N. A. (2024). A review on pulsed electric field modification of proteins: Effect on the functional and structural properties. *Food Bioscience*, 61, 104636.
- Marín-Sánchez, J., Berzosa, A., Álvarez, I., Sánchez-Gimeno, C., & Raso, J. (2024). Pulsed electric fields effects on proteins: Extraction, structural modification, and enhancing enzymatic activity. *Bioelectricity*, 6(3), 154–166.
- Mohammad, A. W., Kumar, A. G., & Basha, R. K. (2015). Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis* Spp.) scale gelatine. *International Aquatic Research*, 7(1), 27–39.
- Nikoo, M., Regenstein, J. M., & Yasemi, M. (2023). Protein hydrolysates from fishery processing by-products: Production, characteristics, food applications, and challenges. *Foods*, 12(24), 4470.
- 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.
- Özkaya, M., & Tekniği, Y. G. (1996). Cilt 1. *Birsen Yayınevi, İstanbul*.

- Panjaitan, F. C. A., Shie, S.-T., Park, S. H., Sevi, T., Ko, W.-L., Aluko, R. E. & Chang, Y.-W. (2024). Bioactive properties of enzymatic gelatin hydrolysates based on in silico, in vitro, and in vivo studies. *Molecules*, *29*(18), 4402.
- Qian, J., Okada, Y., Ogura, T., Tanaka, K., Hattori, S., Ito, S., Satoh, J., Takita, T., & Yasukawa, K. (2016). Kinetic analysis of the digestion of bovine type I collagen telopeptides with porcine pepsin. *Journal of food science*, *81*(1), C27–C34.
- Ruan, Q., Chen, W., Lv, M., Zhang, R., Luo, X., Yu, E., Pan, C., & Ma, H. (2023). Influences of trypsin pretreatment on the structures, composition, and functional characteristics of skin gelatin of tilapia, grass carp, and sea perch. *Marine Drugs*, *21*(8), 423.
- Safari, R., & Yaghoobzadeh, Z. (2020). Antioxidant activity of bioactive peptides extracted from sea cucumber (*Holothuria leucospilata*). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *26*(4), 2393–2398.
- Sampaio, I. C. F., Moura, I. V. L. d., Santos, J. N. d., Matos, J. B. T. L., Jones, C. M., & Almeida, P. F. d. (2022). Pulsed electric field and ultrasound applied to proteins, enzymes and peptides. İçinde *Research Topics in Bioactivity, Environment and Energy: Experimental and Theoretical Tools* (ss. 501–517). Springer.
- Sarboon, N. M., Badii, F., & Howell, N. K. (2013). Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. *Food hydrocolloids*, *30*(1), 143–151.
- Shaik, M. I., Rahman, S. H. A., Yusri, A. S., Ismail-Fitry, M. R., Kumar, N. S. S., & Sarboon, N. M., (2024). A review on the processing technique, physicochemical, and bioactive properties of marine collagen. *Journal of Food Science*, *89*(9), 5205–5229.
- Sharifi, E., Undeland, I., & Abdollahi, M. (2025). Unveiling the efficiency of pulsed electric field and ultrasonication in enhancing collagen susceptibility to enzymatic hydrolysis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 107633.
- Sila, A., & Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of functional foods*, *21*, 10–26.
- Silva, A. C. S. & Silveira, J. N. (2013). Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates: effect of the enzyme type and reaction time. *American Journal of Food Technology*, *8*(1), 1–16.
- Silver, F. H., Jaffe, M., & Shah, R. G. (2018). Structure and behavior of collagen fibers. İçinde *Handbook of properties of textile and technical fibres* (ss. 345–365). Elsevier.
- Sultana, S., Ali, M. E., & Ahamad, M. N. U. (2018). Gelatine, collagen, and single cell proteins as a natural and newly emerging food ingredients. İçinde *Preparation and processing of religious and cultural foods* (ss. 215–239). Elsevier.
- Sun, W., Shahrajabian, M. H., Ma, K., & Wang, S. (2025). Advances in molecular function and recombinant expression of human collagen. *Pharmaceuticals*, *18*(3), 430.
- Tabarestani, H. S., Shahram, H., Mahoonak, A. S., Moayedi, A., & Kaveh, S. (2024).

- Enzymatic hydrolysis of white-cheek shark skin gelatin: Optimization, structural transformations, functional characteristics, and antioxidant potential. *LWT*, *213*, 117060.
- Tang, C., Zhou, K., Zhu, Y., Zhang, W., Xie, Y., Wang, Z., Zhou, H., Yang, T., & Xu, B. (2022). Collagen and its derivatives: From structure and properties to their applications in food industry. *Food Hydrocolloids*, *131*, 107748.
- Tkaczewska, J., Borawska-Dziadkiewicz, J., Kulawik, P., Duda, I., Morawska, M., & Mickowska, B. (2020). The effects of hydrolysis condition on the antioxidant activity of protein hydrolysate from *Cyprinus carpio* skin gelatin. *Lwt*, *117*, 108616.
- Tawalbeh, D., Kha'sim, M. I., Mhd Sarbon, N., & Sarbon, N. M. (2025). Techno-functional and bioactivity properties of collagen hydrolysate and peptide: a review. *Food Reviews International*, *41*(5), 1509–1537.
- Ucak, I., Afreen, M., Montesano, D., Carrillo, C., Tomasevic, I., Simal-Gandara, J., & Barba, F. J. (2021). Functional and bioactive properties of peptides derived from marine side streams. *Marine Drugs*, *19*(2), 71.
- Vidal, A. R., Cechin, C. d. F., Cansian, R. L., Mello, R. d. O., Schmidt, M. M., Demiate, I. M., Kempka, A. P., & Dornelles, R. C. P. (2018). Enzymatic hydrolysis (pepsin) assisted by ultrasound in the functional Properties of hydrolyzates from different collagens. *Ciência Rural*, *48*, e20170649.
- Vidal, A. R., Mello, R. d. O., Schmidt, M. M., Demiate, I. M., Dornelles, R. C. P., FONTOURA, A. M. d., Kubota, E. H., Cansian, R. L., & OLIVEIRA, C. S. d. (2020). Characterization of hydrolysates of collagen from mechanically separated chicken meat residue. *Food Science and Technology*, *40*, 355–362.
- Wang, H., Tu, Z., & Wang, H. (2023). Preparation of high content collagen peptides and study of their biological activities. *Food research international*, *174*, 113561.
- Xie, Z., Wang, X., Yu, S., He, M., Yu, S., Xiao, H., & Song, Y. (2021). Antioxidant and functional properties of cowhide collagen peptides. *Journal of food science*, *86*(5), 1802–1818.
- Xu, C., Cai, C., Liu, T., Kang, J., Li, S., Zhang, J., Wei, B., & Wang, H. (2024). Enhancing the antioxidant activity of fish scale collagen hydrolysates through plastein reaction. *Food and Bioprocess Technology*, *17*(11), 3693–3703.
- Yang, H., Zhang, L., Xue, Y., Liu, J., Song, S., Song, Q., Tian, L., He, X., He, S., & Zhu, H. (2019). Hydrolysis process optimization and functional characterization of yak skin gelatin hydrolysates. *Journal of Chemistry*, *2019*(1), 9105605.
- Yuan, F., Fu, Y., Ma, L., Zhu, H., Yu, Y., Feng, X., Sun, Y., Dai, H., Liu, X., & Liu, Z. (2024). Calcium-chelating peptides from rabbit bone collagen: characterization, identification and mechanism elucidation. *Food Science and Human Wellness*, *13*(3), 1485–1493.
- Zhang, Q., Zhang, X., Wang, J., Fan, Y., Zhang, H., Ahmad, K., & Hou, H. (2023). Distribution, typical structure and self-assembly properties of collagen from fish

- skin and bone. *Molecules*, 28(18), 6529.
- Zhang, S., Zhao, D., Yin, L., Wang, R., Jin, Z., Xu, H., & Xia, G. (2025). Physicochemical and functional properties of yanbian cattle bone gelatin extracted using acid, alkaline, and enzymatic hydrolysis methods. *Gels*, 11(3), 186.
- Zhang, Y., Tu, D., Shen, Q., & Dai, Z. (2019). Fish scale valorization by hydrothermal pretreatment followed by enzymatic hydrolysis for gelatin hydrolysate production. *Molecules*, 24(16), 2998.
- Zhu, S., Gong, Y., Bao, C., Yang, F., Zhu, H., Liu, S., Ding, Y., & Zhou, X. (2025). Effects of pulsed electric field (PEF) on the gel and protein structural properties of surimi and the underlying mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 312, 144176.