T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

BALIK KEMİKLERİNDEN FARKLI YÖNTEMLERLE ÜRETİLEN BİYOKALSİYUM TOZUNUN KARAKTERİZASYONU VE GIDA TAKVİYESİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Afşın CEYLAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SU ÜRÜNLERİ AVLAMA VE İŞLEME TEKNOLOJİSİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2026

ANTALYA

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

BALIK KEMİKLERİNDEN FARKLI YÖNTEMLERLE ÜRETİLEN BİYOKALSİYUM TOZUNUN KARAKTERİZASYONU VE GIDA TAKVİYESİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Afşın CEYLAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SU ÜRÜNLERİ AVLAMA VE İŞLEME TEKNOLOJİSİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2026

ANTALYA

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BALIK KEMİKLERİNDEN FARKLI YÖNTEMLERLE ÜRETİLEN BİYOKALSİYUM TOZUNUN KARAKTERİZASYONU VE GIDA TAKVİYESİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Afşın CEYLAN

SU ÜRÜNLERİ AVLAMA VE İŞLEME TEKNOLOJİSİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından FDK-2025-6699 nolu proje ile desteklenmiştir.

OCAK 2026

Evrak Tarih ve Sayısı: 04.02.2026-879

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BALIK KEMİKLERİNDEN FARKLI YÖNTEMLERLE ÜRETİLEN BİYOKALSİYUM TOZUNUN KARAKTERİZASYONU VE GIDA TAKVİYESİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Afşın CEYLAN

SU ÜRÜNLERİ AVLAMA VE İŞLEME TEKNOLOJİSİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 04/02./2026.. tarihinde jüri tarafından Oybirliği / ~~Oyçokluğu ile~~ kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nalan GÖKOĞLU

Prof. Dr. Taçnur BAYGAR

Prof. Dr. Pınar Yerlikaya KEBAPÇIOĞLU

Prof. Dr. Nermin BERİK

Doç. Dr. Bahar GÜMÜŞ

Bu belge, güvenli elektronik İmza ile imzalanmıştır.
Evrak sorgulaması https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5543&eD=BSETL9YPLP&eS=879 adresinden yapılabilir. (PIN:09603)

ÖZET

BALIK KEMİKLERİNDEN FARKLI YÖNTEMLERLE ÜRETİLEN BİYOKALSİYUM TOZUNUN KARAKTERİZASYONU VE GIDA TAKVİYESİ OLARAK KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Afşın CEYLAN

Doktora Tezi, Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nalan GÖKOĞLU

Ocak 2026; 90 sayfa

Su ürünleri işleme süreçleri sonucunda ortaya çıkan yan ürünler, atık yönetimi açısından önem taşımakla birlikte biyoaktif bileşikler yönünden değerlendirilme potansiyeline sahiptir. Bu çalışmada, su ürünleri işleme yan ürünlerinden biri olan balık kemikleri kullanılarak biyokalsiyum tozu üretilmiş; üretilen biyokalsiyumun fizikokimyasal özellikleri incelenmiş ve gıda takviyesi olarak kullanım olanakları araştırılmıştır.

Araştırmada, balık kemikleri çeşitli ön işlemlerin ardından suda kaynatma ve sodyum hidroksit esaslı alkali ekstraksiyon yöntemleriyle işlenmiş, bazı uygulamalarda bu yöntemler sodyum hipoklorit ile birlikte kullanılmıştır. Yağ giderme işlemleri etanol ya da yüzey aktif madde kullanılarak, ağartma işlemleri ise hidrojen peroksit ya da sodyum hipoklorit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üretilen biyokalsiyum tozlarında verim; kimyasal kompozisyon (nem, protein, yağ ve kül); mineral madde içeriği (kalsiyum ve fosfor); serbest amino asit profili; uçucu aroma bileşenleri ve renk özellikleri (L*, a*, b* ve beyazlık indeksi) belirlenmiştir. Ayrıca biyokalsiyum ilavesiyle hazırlanan balık eti esaslı ürünlerde tekstür ve duyusal analizler gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma kapsamında elde edilen veriler, farklı üretim yaklaşımlarıyla elde edilen biyokalsiyum tozlarının özelliklerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesine olanak sağlamış; balık kemiklerinin gıda takviyesi üretimine yönelik potansiyelinin ortaya konulmasına katkıda bulunmuştur. Ayrıca balık kemiklerinden elde edilen biyokalsiyum tozunun balık köftesi içerisinde katkı maddesi olarak kullanımı yoluyla gıda takviyesi potansiyelinin değerlendirilmesi, su ürünleri işleme yan ürünlerinin katma değerli ürünlere dönüştürülmesine yönelik uygulamalı bir yaklaşım sunmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Balık kemikleri, Balık köftesi, Biyokalsiyum tozu, Kalite

JÜRİ: Prof. Dr. Nalan GÖKOĞLU

Prof. Dr. Taçnur BAYGAR

Prof. Dr. Pınar Yerlikaya KEBAPÇIOĞLU

Prof. Dr. Nermin BERİK

Doç. Dr. Bahar GÜMÜŞ

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF BIO-CALCIUM POWDER PRODUCED FROM FISH BONES BY DIFFERENT METHODS AND INVESTIGATION OF ITS USE AS A FOOD SUPPLEMENT

Afşın CEYLAN

PhD Thesis in Fisheries and Fish Processing Technology

Supervisor: Prof. Dr. Nalan GÖKOĞLU

January 2026; 90 pages

Seafood processing generates various byproducts that are of importance in terms of waste management, while also offering considerable potential due to their bioactive compound content. In this study, bio-calcium powder was produced from fish bones, one of the seafood processing byproducts, and its physicochemical characteristics were investigated to evaluate its potential use as a food supplement.

Fish bones were subjected to different pretreatments followed by boiling in water and sodium hydroxide based alkaline extraction, with certain processes carried out in combination with sodium hypochlorite. Defatting was carried out using either ethanol or a surfactant, while bleaching treatments were performed using either hydrogen peroxide or sodium hypochlorite. The produced bio-calcium powders were evaluated in terms of yield, chemical composition (moisture, protein, fat, and ash), mineral content (calcium and phosphorus), free amino acid profile, volatile aroma compounds, and color parameters (L*, a*, b*, and whiteness index). In addition, texture and sensory analyses were conducted on fish meat based products prepared with bio-calcium powder addition.

The data obtained within the scope of this study enabled a comparative evaluation of bio-calcium powders produced using different processing approaches and provided insight into the potential of fish bones for bio-calcium powder production intended for food supplement applications. Furthermore, the evaluation of the food supplement potential of bio-calcium powder through its use as an additive in fish meatballs offered an applied approach to the valorization of seafood processing byproducts into value added products.

KEYWORDS: Bio-calcium powder, Fish bones, Fish meatball, Quality

COMMITTEE: Prof. Dr. Nalan GÖKOĞLU

Prof. Dr. Taçnur BAYGAR

Prof. Dr. Pınar Yerlikaya KEBAPÇIOĞLU

Prof. Dr. Nermin BERİK

Assoc. Prof. Dr. Bahar GÜMÜŞ

ÖNSÖZ

Çok sayıda balık işleme atığı günümüzde hâlâ değerlendirilmeden çöpe gitmektedir. Bununla birlikte, günümüz koşullarında insanların yeterli ve dengeli beslenemediği, buna bağlı olarak çeşitli sağlık problemleriyle karşı karşıya kaldığı da bilinmektedir. Bu çalışma, bu sorunlara doğrudan ve kesin bir çözüm sunma iddiasında olmamakla birlikte, farklı disiplinlerde çalışan araştırmacılara bir fikir ya da ilham kaynağı olabilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların, insanlığa küçük de olsa bir katkı sağlaması temenni edilmektedir.

Bu süreçte bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren, bilimsel yaklaşımı ve katkılarıyla tez çalışmamın her aşamasında önemli destekler sağlayan danışmanım Prof. Dr. Nalan GÖKOĞLU'na, tezde kullanılan balık materyalinin teminindeki destekleri için Prof. Dr. Mehmet GÖKOĞLU'na, tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Pınar YERLİKAYA KEBAPÇIOĞLU ve Doç. Dr. Bahar GÜMÜŞ'e, bugünlere gelmemde büyük emeği bulunan ailem Hatice CEYLAN'a, Seyfettin CEYLAN'a ve kardeşim Altuğ CEYLAN'a, ayrıca balık tedariğindeki katkıları için Başoğlu Balık işletmesinin sahibi Erkan BAŞOĞLU'na teşekkür ederim.

Bu Tezi her koşulda yanımda olarak desteğini esirgemeyen eşim Kebriona Veliaj CEYLAN'a ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
ÖNSÖZ iii
AKADEMİK BEYAN vii
SİMGELER VE KISALTMALAR viii
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xiii
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK TARAMASI 3
3. MATERYAL VE METOT 15
3.1. Materyal 15
3.2. Biyokalsiyum tozu üretimi 15
3.3. Biyokalsiyum tozunun gıda katkısı olarak kullanılması 22
3.4. Analizler 22
3.4.1. Biyokalsiyum tozu verimi 22
3.4.2. Kimyasal kompozisyon (nem, protein, yağ, kül) analizleri 22
3.4.3. Mineral madde tayini 23
3.4.4. Serbest amino asit kompozisyonu analizi 24
3.4.5. Uçucu aroma bileşenleri analizi 24
3.4.6. Renk ölçümü 25
3.4.7. Tekstür ölçümü 25
3.4.8. Duyusal analiz 25
4. BULGULAR 27
4.1. Biyokalsiyum tozu verimi bulguları 27
4.2. Kimyasal kompozisyon analizleri bulguları 27
4.2.1. Nem tayini bulguları 27
4.2.2. Ham protein analiz bulguları 29
4.2.3. Ham yağ analiz bulguları 30
4.2.4. Ham kül analiz bulguları 31
4.3. Mineral madde (Ca ve P) analiz bulguları 33
4.3.1. Kalsiyum bulguları 33

4.3.2. Fosfor bulguları 34
4.4. Amino asit kompozisyonu analizi bulguları 36
4.5. Renk ölçüm sonuçları 37
4.5.1. L* değeri bulguları 37
4.5.2. a* değeri bulguları 44
4.5.3. b* değeri bulguları 45
4.5.4. Beyazlık (whiteness) indeksi bulguları 47
4.6. Uçucu aroma bileşenleri analizi bulguları 48
4.7. Biyokalsiyum tozları analizlerinin genel değerlendirmesi 48
4.8. Biyokalsiyum tozlarında kalitatif (var /yok) kalıntı testleri bulguları 49
4.9. Balık köftesi analiz bulguları 49
4.9.1. Köftenin tekstür analiz bulguları 49
4.9.2. Köftelerin renk ölçüm sonuçları 55
4.9.3. Köftelerin kalsiyum (Ca) ve (P) analiz bulguları 58
4.9.4. Köftelerin duyusal analiz bulguları 60
5. TARTIŞMA 62
5.1. Biyokalsiyum verimi 62
5.2. Kimyasal kompozisyon analizleri 63
5.2.1. Nem analiz sonuçları 63
5.2.2. Ham protein analiz sonuçları 63
5.2.3. Ham yağ analiz sonuçları 64
5.2.4. Ham kül analiz sonuçları 65
5.3. Mineral madde analiz sonuçları 66
5.3.1. Kalsiyum (Ca) ve Fosfor (P) 66
5.4. Amino asit kompozisyonu analizi sonuçları 69
5.5. Renk ölçüm sonuçları 70
5.5.1. L* değeri ölçüm sonuçları 70
5.5.2. a* değeri ölçüm sonuçları 70
5.5.3. b* değeri ölçüm sonuçları 71
5.5.4. Beyazlık (whiteness) indeksi sonuçları 71
5.6. Uçucu aroma bileşenleri 72
5.7. Köfte analiz sonuçları 73

5.7.1. Tekstür analiz sonuçları 73
5.7.2. Renk ölçüm sonuçları 76
5.7.4. Duyusal analiz sonuçları 77
6. SONUÇLAR 80
7. KAYNAKLAR 83
ÖZGEÇMİŞ

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum "**Balık kemiklerinden farklı yöntemlerle üretilen biyokalsiyum tozunun karakterizasyonu ve gıda takviyesi olarak kullanım olanaklarının araştırılması**" adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

……./……../20....

Öğrencinin Adı Soyadı

İmzası

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

% : Yüzde

± : Ortalama etrafındaki standart sapma

< : Küçüktür

$(NH_4)_2SO_4$: Amonyum sülfat

> : Büyüktür

°C : Santigrat derece

µg/L : Mikrogram/litre

µL : Mikrolitre

µm : Mikrometre

a* : Kırmızılık (+) / Yeşillik (−)

b* : Sarılık (+) / Mavilik (−)

C_2H_5OH : Etanol

Ca : Kalsiyum

$CaCO_3$: Kalsiyum karbonat

$Ca_3(PO_4)_2$: Kalsiyum fosfat

cm : Santimetre

g : Gram

h : Saat

g : gram

g/100g : 100 gram başına gram

H_2O_2 : Hidrojen peroksit

HNO_3 : Nitrik asit

K : Potasyum

L* : Aydınlık

mL : Mililitre

mm : Milimetre

mm/s : Milimetre/saniye

mg : Miligram

mg/g : Miligram/gram

MΩ : Megaohm

N : Normalite

Na : Sodyum

NaCl : Sodyum Klorür

NaOCl : Sodyum hipoklorit

NaOH : Sodyum hidroksit

P : Fosfor

P_i : İnorganik Fosfor

p : Anlamlılık düzeyi

pH : Hidrojen iyonu aktivitesinin negatif logaritması

s : Saniye

w/w : Ağırlık/ağırlık

v/v : Hacim/hacim

ΔE* : Toplam renk farkı

Kısaltmalar

AOAC : Association of Official Analytical Chemists

BK0 : Biyokalsiyum katkısız köfte (kontrol)

BK5 : %5 biyokalsiyum katkılı köfte

BK10 : %10 biyokalsiyum katkılı köfte

BKT : Biyokalsiyum tozu

Ca/P : Kalsiyum/Fosfor oranı

CR : Chromometer (renk ölçüm cihazı)

FPB : Fish bone powder (Balık kemiği tozu)

GC-MS : Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

HA : Hidroksiapatit

HK : Ham kemik

ICP-MS : İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi

ICP-OES : İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometresi

KO : Kareler ortalaması

PTFE : Politetrafloroetilen

RB : Ham kemik

rpm : Revolutions per minute (dakikada devir sayısı)

SD : Serbestlik derecesi

TBARS : Tiyobarbütirik Asit Reaktif Maddeleri

TBP : Trikalsiyum Fosfat (Tribasic Phosphate)

TPA : Tekstür Profil Analizi

UHPLC : Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

UPLC : Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi

UPLC-MS/MS : Ultra Performance Liquid Chromatohraphy – Tandem Mass Spectrometry

WI : Whiteness (Beyazlık)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Ham kemik örnekleri 20

Şekil 3.2. Alkali çözeltiye bırakılan (a) ve kaynatılan (b) balık kemikleri 21

Şekil 4.1. Biyokalsiyum tozlarının verim analiz bulguları 27

Şekil 4.2. Biyokalsiyum tozlarının nem içerikleri 28

Şekil 4.3. Biyokalsiyum tozlarının protein analiz sonuçları 30

Şekil 4.4. Biyokalsiyum tozlarının yağ analiz sonuçları 31

Şekil 4.5. Biyokalsiyum tozlarının kül analiz sonuçları 32

Şekil 4.6. Biyokalsiyum tozlarının kalsiyum analiz sonuçları 34

Şekil 4.7. Biyokalsiyum tozlarının fosfor analiz sonuçları 35

Şekil 4.8. Biyokalsiyum tozlarının Ca/P oranları 36

Şekil 4.9. Biyokalsiyum tozlarının esansiyel amino asit içerikleri 37

Şekil 4.10. Biyokalsiyum tozlarının L* değeri bulguları 38

Şekil 4.11. Biyokalsiyum tozunun NaOH ve Etanol kullanımı ile protein ve yağ giderme işlemi sonrası (A1) ve H_2O_2 (A1X) ve NaOCl (A1Y) ile ağartma sonrası görüntüleri 39

Şekil 4.12. Biyokalsiyum tozunun NaOH ve Polisorbat 80 kullanımı ile protein ve yağ giderme işlemi sonrası (A2) ve H_2O_2 (A2X) ve NaOCl (A2Y) ile ağartma sonrası görüntüleri 40

Şekil 4.13. Biyokalsiyum tozunun NaOH + NaOCl + Etanol kullanımı ile protein ve yağ giderme işlemi sonrası (B1) ve H_2O_2 (B1X) ve NaOCl (B1Y) ile ağartma sonrası görüntüleri 41

Şekil 4.14. Biyokalsiyum tozunun NaOH + NaOCl + Polisorbat 80 kullanımı ile protein ve yağ giderme işlemi sonrası (B2) ve H_2O_2 (B2X) ve NaOCl (B2Y) ile ağartma sonrası görüntüleri 42

Şekil 4.15. Üretimi tamamlanmış tüm biyokalsiyum tozlarının görünüşleri 43

Şekil 4.16. Biyokalsiyum tozlarının a* değeri bulguları 45

Şekil 4.17. Biyokalsiyum tozlarının b* değeri bulguları 46

Şekil 4.18. Biyokalsiyum tozunun beyazlık indeksinin en yüksek (A2Y) ve en düşük (A1X) olduğu gruplar 48

Şekil 4.19. Köfte örneklerinin sertlik (hardness) değerleri 50

Şekil 4.20. Köfte örneklerinin esneklik değerleri 51

Şekil 4.21. Köfte örneklerinin bağlılık değerleri 52

Şekil 4.22. Köfte örneklerinin sakızımsılık değerleri 53

Şekil 4.23. Köfte örneklerinin çiğnenebilirlik değerleri 54

Şekil 4.24. Köfte örneklerinin elastikiyet değerleri 55

Şekil 4.25. Köftelerin iç ve dış yüzeylerinin L* değerleri 57

Şekil 4.26. Köftelerin iç ve dış yüzeylerinin a* değerleri 58

Şekil 4.27. Köftelerin iç ve dış yüzeylerinin b* değerleri 58

Şekil 4.28. Köftelerin Ca ve P içerikleri 59

Şekil 4.29. Köftelerin duyusal analiz skorları 61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Biyokalsiyum üretiminde kullanılan kimyasalların kombinasyonları 16

Çizelge 3.2. Biyokalsiyum tozu üretiminde gruplar için kullanılan kodlar 16

Çizelge 3.3. Köfte formülasyonu 22

Çizelge 4.1. Biyokalsiyum tozlarının nem içerikleri[1] 28

Çizelge 4.2. Biyokalsiyum tozlarının nem analiz sonuçlarına ait varyans analizi sonuçları 28

Çizelge 4.3. Biyokalsiyum tozlarının protein analiz sonuçları[1] 29

Çizelge 4.4. Biyokalsiyum tozlarının protein içeriklerine ait varyans analizi sonuçları 29

Çizelge 4.5. Biyokalsiyum tozlarının ham yağ analiz sonuçları[1] 30

Çizelge 4.6. Biyokalsiyum tozlarının ham yağ içeriklerine ait varyans analizi sonuçları 31

Çizelge 4.7. Biyokalsiyum tozlarının ham kül analiz sonuçları[1] 32

Çizelge 4.8. Biyokalsiyum tozlarının kül içeriklerine ait varyans analiz sonuçları 32

Çizelge 4.9. Biyokalsiyum tozlarının kalsiyum analiz sonuçları[1] 33

Çizelge 4.10. Biyokalsiyum tozlarının kalsiyum analiz sonuçlarına ait varyans analizi sonuçları 33

Çizelge 4.11. Biyokalsiyum tozlarının fosfor analiz sonuçları[1] 34

Çizelge 4.12. Biyokalsiyum tozlarının fosfor analiz sonuçlarına ait varyans analizi sonuçları 35

Çizelge 4.13. Biyokalsiyum tozlarının Ca/P oranları[1] 35

Çizelge 4.14. Biyokalsiyum tozlarının amino asit kompozisyonu analiz sonuçları (mg/g) 36

Çizelge 4.15. Biyokalsiyum tozlarının esansiyel amino asit içerikleri 37

Çizelge 4.16. Biyokalsiyum tozlarının L* değerleri[1] 38

Çizelge 4.17. Biyokalsiyum tozlarının L* değerlerine ait varyans analizi sonuçları 38

Çizelge 4.18. Biyokalsiyum tozlarının a* değeri bulguları[1] 44

Çizelge 4.19. Biyokalsiyum tozlarının a* değerlerine ait varyans analizi sonuçları 44

Çizelge 4.20. Biyokalsiyum tozlarının b* değeri bulguları[1] 46

Çizelge 4.21. Biyokalsiyum tozlarının b* değerlerine ait varyans analizi sonuçları 46

Çizelge 4.22. Biyokalsiyum tozlarının beyazlık indeksi değerleri[1] 47

Çizelge 4.23. Biyokalsiyum tozlarının beyazlık indeksi değerlerine ait varyans analizi sonuçları 47

Çizelge 4.24. Köfte örneklerinin sertlik (hardness) değerleri[1] 49

Çizelge 4.25. Köfte örneklerinin sertlik değerlerine ait varyans analiz bulguları 50

Çizelge 4.26. Köfte örneklerinin Esneklik (Springiness) değerleri[1] 50

Çizelge 4.27. Köfte örneklerinin esneklik değerlerine ait varyans analiz bulguları 51

Çizelge 4.28. Köfte örneklerinin bağlılık (Cohesiveness) değerleri[1] 51

Çizelge 4.29. Köfte örneklerinin bağlılık değerlerine ait varyans analiz tablosu 52

Çizelge 4.30. Köfte örneklerinin sakızımsılık (gumminess) değerleri[1] 52

Çizelge 4.31. Köfte örneklerinin sakızımsılık değerlerine ait varyans analiz bulguları 53

Çizelge 4.32. Köfte örneklerinin çiğnenebilirlik (Chewiness) değerleri[1] 54

Çizelge 4.33. Köfte örneklerinin çiğnenebilirlik (Chewiness) değerlerine ait varyans analiz bulguları 54

Çizelge 4.34. Köfte örneklerinin elastikiyet (Resilience) değerleri[1] 55

Çizelge 4.35. Köfte örneklerinin elastikiyet (Resilience) değerlerine ait varyans analiz bulguları 55

Çizelge 4.36. Köftelerin iç ve dış yüzeylerinin renk (L*, a*, b*) değerleri[1] 56

Çizelge 4.37. Köftelerin iç yüzeylerinin L* değerlerine ait varyans analiz bulguları 56

Çizelge 4.38. Köftelerin dış yüzeylerinin L* değerlerine ait varyans analiz bulguları 56

Çizelge 4.39. Köftelerin iç yüzeylerinin a* değerlerine ait varyans analiz bulguları 56

Çizelge 4.40. Köftelerin dış yüzeylerinin a* değerlerine ait varyans analiz bulguları ...57

Çizelge 4.41. Köftelerin iç yüzeylerinin b* değerlerine ait varyans analiz bulguları.....57

Çizelge 4.42. Köftelerin dış yüzeylerinin b* değerlerine ait varyans analiz bulguları...57

Çizelge 4.43. Köftelerin kalsiyum ve fosfor içerikleri 59

Çizelge 4.44. Köftelerin kalsiyum içeriklerine ait varyans analiz tablosu 59

Çizelge 4.45. Köftelerin fosfor içeriklerine ait varyans analiz tablosu.....59

Çizelge 4.46. Biyokalsiyum ilaveli köftelerin duyusal analiz bulguları[1].....60

Çizelge 4.47. Köftelerin duyusal (görünüş) özelliklerine ait varyans analiz bulguları ..60

Çizelge 4.48. Köftelerin duyusal (koku) özelliklerine ait varyans analiz bulguları 60

Çizelge 4.49. Köftelerin duyusal (doku) özelliklerine ait varyans analiz bulguları 61

Çizelge 4.50. Köftelerin duyusal (tat) özelliklerine ait varyans analiz bulguları 61

Çizelge 4.51. Köftelerin duyusal (genel beğeni) özelliklerine ait varyans analiz bulguları 61

1. GİRİŞ

Su ürünlerinin işlenmesi sırasında önemli ölçüde atık ve yan ürün ortaya çıkmaktadır. Balıkların iç organları, kafaları, kesilmiş parçaları, kemikleri, derileri gibi kısımlarını oluşturan yaklaşık %45–50 civarında atık oluşmaktadır. Balık türüne, boyuna, cinsiyete, mevsime göre değişen ortalama atık kompozisyonu baş (balık ağırlığının %9–12'si), iç organlar (%12–18), deri (%1–3), kemikler (%9–15) ve pullardan (yaklaşık %5) oluşmaktadır (Shavandi vd. 2019). Bu atıklar önemli çevresel problemlere neden olmasının yanında önemli kayıplara da neden olmaktadır. Özellikle su ürünleri atıklarının karada ya da denizde bir yere boşaltılması suların ve havanın kirlenmesine neden olmaktadır. Birçok biyoaktif bileşik içeren bu atıkların değerlendirilmesi hem çevre sorunlarına çözüm olabilmekte hem de katma değerli ürünlere dönüştürülerek ekonomik faydalar sağlayabilmektedir. Atıkların değerlendirilerek ve dönüştürülerek oluşturulan katma değerli yeni ürünler gıda, kimya, eczacılık, tıp, kozmetik gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Balık kemikleri özellikle fileto çıkarma işlemi sonrasında ortaya çıkan ve toplam ağırlığın %30'unu bulan önemli bir atıktır. Balık kemikleri önemli bir mineral kaynağı olup mineral kütlesinin %60'ını kalsiyum oluşturmaktadır (Lu 2004). Balık kemikleri biyolojik olarak biyomineral olarak bilinen sert dokulardan oluşur. Son zamanlarda, biyokalsiyum üretimi için ilgi görmeye başlamıştır.

Kalsiyum (Ca) insan beslenmesinde çok önemli bir yere sahiptir. Çünkü kalsiyum dişlerin ve kemiklerin ana bileşeni olduğu gibi vücutta da kas kasılması, yara iyileşmesi, kan akışının kolaylaştırılması, kalp atış hızının düzenlenmesi ve sinir uyarılarının iletimi gibi fizyolojik işlevlere de sahiptir (Wijayanti vd. 2021a). Vücutta kalsiyum eksikliği bu işlevlerin yerine getirilmesini engelleyeceğinden sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Kemik yoğunluğundaki azalmalar ve kırılmalarla ile karakterize edilen raşitizm ve osteoporoz gibi hastalıklara neden olmaktadır. Bu hastalıkların tedavisi için Kanada, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda milyonlarca dolar harcama yapıldığı bildirilmiştir (Kemmak vd. 2020). Bu gibi durumları önlemek için gıdalara kalsiyum takviyesi yapılmaktadır. Bununla birlikte, çeşitli araştırmalar, saf kalsiyum tüketiminin kalsiyum içeren peptitlere kıyasla daha düşük emilime yol açtığını göstermektedir. Peptitler kalsiyum iyonlarını bağlayarak bunların fosfat tuzları olarak çökelmesini önler ve emilim için çözünür kalsiyumun bulunabilirliğini artırır (Petrat 2025).

Balık kemiklerinde ana elementler kalsiyum (Ca) ve fosfor (P)'dur. Kalsiyum, kemik dokusunda fosforla birlikte hidroksiapatit kristalleri formunda bulunmaktadır. Bu kristallerin çözünürlüğü oldukça düşüktür ve gıdaya ilave edilmeden önce işlem görmeleri gerekmektedir. Hidroksiapatitin çözünürlüğü kimyasal, enzimatik veya mekanik yöntemlerle artırılabilmektedir. Bu yöntemler aynı zamanda kemik tozundaki kalsiyum içeriğinin artmasını da sağlamaktadır. Hidroksiapatitin çözünürlüğünün ve kalsiyum içeriğinin artması, kemik matrisindeki kalsiyumun salınımını artırarak biyoyararlanımın yükselmesine katkıda bulunmaktadır.

Balık kemiklerinin içerdiği kalsiyumun insan vücudundakine benzer olduğu bu nedenle de kolay sindirildiği belirtilmektedir. Bu sebeple son yıllarda araştırmacılar "biyokalsiyum" olarak adlandırılan ve balık kemiklerinden elde edilen kalsiyum üzerine çalışmalarını yönlendirmişlerdir. Biyokalsiyum, kalsiyum mineralinin doğal biyomineral

kaynaklardan veya organik yapılardan elde edilmesiyle üretilebilen, yüksek çözünürlük ve emilim kapasitesi hedeflenerek formüle edilen bir besin takviyesi olarak tanımlanır. Biyokalsiyum genellikle hidroksiapatit formunda birleşmiş yüksek oranda kolajen, kalsiyum ve fosfor içermektedir. Kalsiyumun biyoyararlanımı, alınan kalsiyumun kimyasal formuna, sindirim sistemindeki koşullara ve eşlik eden mikrobesinlere bağlı olarak önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle son yıllarda kalsiyumun biyoyararlanımını artırmaya yönelik formülasyon çalışmaları artmış; bu bağlamda "biyokalsiyum" olarak adlandırılan, doğal veya biyolojik kaynaklardan elde edilen ve destekleyici bileşenlerle zenginleştirilmiş kalsiyum ürünleri dikkat çekmiştir.

Bu konuda yürütülmüş sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Mevcut çalışmalarda araştırmacılar farklı yöntemlerle biyokalsiyum tozu üretimini denemişlerdir. Balık kemiklerinden biyokalsiyum tozu üretiminde proteinlerin uzaklaştırılması, yağın uzaklaştırılması ve ağartma olmak üzere üç ana işlem basamağı yer almıştır. Bazı araştırmalarda bu basamaklardan biri ya da ikisi kullanılarak bazılarında ise hiçbiri kullanılmadan kemikleri direkt kurutma yöntemi ile biyokalsiyum tozu üretimi denenmiştir. Yine kullanılan yöntemlerde farklı kimyasallar ve bunların farklı oranları denenmiştir.

Bu tez çalışmasında balık kemiklerinden farklı yöntemlerle biyokalsiyum tozu üretiminin denenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla biyokalsiyum üretiminin protein giderme, yağ giderme ve ağartma aşamalarında kullanılan kimyasalların farklı kombinasyonlarının denemesi planlanmıştır. Farklı yöntemlerle elde edilen biyokalsiyum tozunun karakteristiklerinin belirlenmesi çalışmanın birinci amacını oluşturmuştur. Böylece, en iyi verime, besin değerine, fiziksel ve duyusal özelliklere sahip biyokalsiyum tozunu elde edebilecek yöntem araştırılmıştır. Çalışmanın diğer amacı da elde edilen biyokalsiyum tozunun gıda katkısı olarak kullanım olanaklarının araştırılması olmuştur. Bu amaçla alabalık etinden hazırlanan köfteye en iyi özellikler sahip biyokalsiyum tozunun iki farklı konsantrasyonda ilave edilmesi ve biyokalsiyum ilaveli köftelerin tekstür, renk ve duyusal özellikleri ile kalsiyum ve fosfor içeriklerinin analiz edilmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

Yaklaşık 170 milyon ton olan dünya su ürünleri üretiminin %88'inin insan tüketimine yönelik olduğu tahmin edilmektedir. Su ürünleri yetiştiriciliği, 2000 yılında %25.7'lik önemli bir artışla toplam balık üretiminin %46'sını oluşturmuştur. İşlenmiş balıklar, insanlar tarafından tüketilen tüm balıkların %56'sını oluşturmaktadır (FAO 2020). Balık yetiştiriciliği ve işleme teknolojisindeki gelişmeler atık ve yan ürünler problemini de beraberinde getirmiştir. Su ürünlerinin işlenmesinde yaklaşık %45'ini oluşturan atık ya da yan ürün ortaya çıkmaktadır. Balık kafaları, iç organları, pulları, derisi ve kemikleri işleme atıklarını oluşturmaktadır. Su ürünleri yan ürünlerinin tek bir tanımı yoktur. Genellikle iç organlar, kafalar, kesilmiş parçalar, kemik, deri ve zarar görmüş veya insan tüketimine uygun olmayan balıklardan ve hedef dışı av da bu tanıma girmektedir. Özellikle balıkların fileto edilmesinden sonra elde edilen balık kemiği, balığın toplam ağırlığının yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (Lu 2004). Bu atıklar büyük problemler yaratmaktadır. Atıklar eğer bekletilir ve biriktirilirse çok kısa sürede bozulur. Bu durum da ciddi sağlık ve çevre problemlerine neden olur. O nedenle atıklar ya yok edilerek zararsız hale getirilmeli ya da yararlı hale getirilmelidir. Geleneksel atık yönetiminde depolama alanlarına atık olarak imha edilmesi, su ürünleri yetiştiriciliği veya çiftlik hayvanları için yem olarak doğrudan kullanımı veya silaj veya gübrelerde kullanımı yer almaktadır. Bugün ise bunun yerini geri dönüştürme ve geri kazanma kavramları yer almıştır. Özellikle biyoaktif bileşiklerin geri kazanımının karlılığı artıracağı beklenmektedir. Balık işleme endüstrisi atıkların geri kazanımı ve kullanımı konularında etkili yöntemler geliştirme ihtiyacı ile karşı karşıyadır. Atıklar, proteinler, yağlar, yağ asitleri, fosfolipitler, yağda çözünen vitaminler, dahil olmak üzere birçok değerli bileşik içermektedir (Rustad vd. 2011; Kim ve Mendis 2006). Son yıllarda çeşitli organik hammaddelerden gıda ve biyomedikal amaçlar için biyoaktif bileşikler elde etmek için yeni yöntem ve teknolojiler konusunda yoğun bir araştırma yapılmaktadır. Balık kemiklerinin alternatif kalsiyum kaynağı olarak kullanılması konusunda ise sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Phiraphinyo vd. 2006; Toppe vd. 2006; Tongchan vd. 2009; Boutinguiza vd. 2012). Balık kemik dokusunun kuru maddesi, başta kalsiyum fosfat ve hidroksiapatit olmak üzere %60−70 mineral içeriğine sahiptir (Gildberg vd. 2002, Barakat vd. 2008), mineral kütlesindeki kalsiyum içeriği ise %60 düzeyindedir (Kim ve Jung 2007).

Balık kemiklerinin yaklaşık %30-45'i protein, %15-60'ı kül ve yağsız balıkta %2 ile yağlı balıkta neredeyse %32 arasında değişen değişken miktarda yağdan oluştuğu ve lipit içermeyen kuru maddenin %10'undan fazlasını kalsiyumun oluşturduğu bildirilmektedir (Munekata vd. 2020; Toppe vd. 2007).

Kalsiyum insan vücudunda en çok bulunan mineraldir ve vücut ağırlığının %1-2'sini oluşturur. Ortalama ağırlığa sahip yetişkinlerde 1150-1300 g kalsiyum bulunur. Kalsiyumun yaklaşık %99'u yapısal bir rol oynadığı kemiklerde ve dişlerde bulunur. Geriye kalan %1'lik kısım dolaşım sisteminde, hücre dışı sıvıda ve yumuşak dokularda

dağılır. Kalsiyum (Ca) en bol bulunan elementlerden biridir ve insan vücudu için önemli kabul edilir. Kalsiyum dişlerin ve kemiklerin ana bileşenidir. Kalsiyum ayrıca kas kasılması, yara iyileşmesi, kan akışının kolaylaştırılması, kalp atış hızının düzenlenmesi ve sinir uyarılarının iletimi gibi fizyolojik işlevlerde de rol oynamaktadır. Kalsiyum eksikliğinde osteoporoz ve kemik yoğunluğunda azalma görülebilmektedir. Gıdalardan yetersiz kalsiyum alımı, kısa vadede gözle görülür hiçbir semptomla sonuçlanmasa da uzun süreli kalsiyum eksikliği osteopeniye neden olur ve tedavi edilmezse osteoporoza ilerleyebilir (Trailokya vd. 2017). Özellikle yaşlılarda kemik kırılma riski artar. Raşitizm aynı zamanda kalsiyum eksikliğinden de kaynaklanabilir, ancak genellikle D vitamini eksikliğiyle ilişkilidir. Midede kalsiyum emilimini etkileyen bir dizi faktör vardır. Kalsiyum emilimi yaş, östrojen konsantrasyonu, asidik durum, D vitamini düzeyi ve diyet lifi alımından etkilenir. Yaşlanmayla birlikte kalsiyum emiliminde azalma rapor edilmiştir (Trailokya vd. 2017).

Kalsiyumun ana kaynağı süt ürünleridir. Bununla birlikte, laktoz intoleransının yüksek prevalansı, yeni beslenme kalıplarının ortaya çıkması, süt ürünü alımının insan sağlığı üzerindeki potansiyel olumsuz etkilerine ilişkin endişeler, düşük ve orta gelirli ülkelerdeki süt tüketiminin azalması dünya çapında kalsiyum eksikliğinin yaygınlaşmasına neden olmuştur (Perez vd. 2023).

Kalsiyum takviyesi kalsiyum eksikliği sorununa alternatif bir çözüm olmuştur. Ancak saf kalsiyumun emilimi, kalsiyumun fosfat tuzu formunda çökelmesi nedeniyle düşüktür. Yeni kalsiyum kaynakları bulmak vücudun ihtiyaç duyduğu kalsiyum miktarını artırmak için başka bir seçenektir. Kimyasal olarak kemiklerdeki kalsiyum, fosfor oluşturan hidroksiapatit kristalleri şeklinde düzenlenmiştir. Bu kristallerin çözünürlükleri çok düşüktür ve gıdaya eklenmeden önce işlemden geçirilmeleri gerekir. Hidroksiapatitin çözündürülmesi çeşitli yöntemlerle (kimyasal, enzimatik ve/veya mekanik) sağlanabilmektedir. Li vd. (2020) hidroksiapatitin nano öğütülmesinin parçacık boyutu azaldıkça kalsiyum çözünürlüğünü artırdığını gözlemlediler, ancak aynı zamanda kalsiyumun şelatlanması ve dolayısıyla çökelmesini önlemek için kolajen veya amino asitlerin gerekli olduğunu da gözlemlediler. Çözünürlüğü artırmaya ek olarak diğer işlemler de kalsiyum konsantrasyonunu artırabildiği belirtilmiştir. Nemati vd. (2017) alkali sindirim yöntemiyle üretilen ton balığı (*Thunnus albacares*) kemik tozunun %77.79 kül içerdiğini, kalsiyum içeriğinin ise %38.16 olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir sonuç, yayın balığı iskeletindeki kalsiyum içeriğinin yüksek basınçlı yıkama kullanılarak %6.33'ten %21.27'ye yükseldiğini gözlemleyen Bechtel vd. (2019) tarafından da rapor edilmiştir. Benzer sonuçlar, morina (*Gadus morhua*) kemik tozu ile ilgili olarak Jafarpour vd. (2020) tarafından da rapor edilmiştir.

Kalsiyum içeriğini artırmanın yanı sıra, hidroksiapatit çözünmesi ve kemik matriksinden kalsiyum salınımını artıran diğer işlemler de biyoyararlanım açısından faydalı etkilere sahip olabilir. Nawaz vd. (2020) balık kemik tozunun 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda bekletilmesinin, kalsiyumun sindirilebilirliğini artırdığını gösterdi.

Busca vd. (2021) öğütme ve enzimatik hidroliz ile işlenmiş mezgit kemiği tozundan in vitro kalsiyum emiliminin %28.15'e ulaştığını gözlemledi.

Balık kemiğinde bulunan kalsiyum kristallerinin insan kemiklerinde bulunanla aynı formda olan hidroksiapatit kristalleri formunda olduğu bildirilmektedir (Surya vd. 2021). Yumurta kabuğu ve istiridye kabuğu ise kalsiyum karbonat formundadır (Owuamanam ve Cree 2020). Bu doğal kalsiyum, kalsiyum fosfat dahil kalsiyum şelat grubundan çok daha ucuzdur ve suda çözünürdür ve vücutta iyi emilir (Palacios vd. 2021; Surya vd. 2021).

Sağlık odaklı ürünlere olan talebin artmasıyla birlikte, bir dizi sağlığı geliştiren bileşenlerle zenginleştirilmiş gıda ürünleri üretilmeye başlanmıştır. Gıda işleme endüstrisinin sıklıkla israf edilen yan ürünlerinden piyasa değeri olan yeni ürünler geliştirilmiştir (Wijayanti vd. 2021a). Kalsiyumla zenginleştirilmiş ürünler, özellikle laktoz intoleransı nedeniyle süt ve süt ürünleri alımı yetersiz olan insan grupları için kalsiyum alım seviyelerinin artırılmasına yardımcı olmaktadır (Kim ve Mendis 2006; Luu ve Nguyen 2009). Gelişmekte olan ülkelerde kalsiyumla başarıyla zenginleştirilen yaygın gıda ürünleri arasında süt ve süt ürünleri, buğday unu, mısır unu, tuz, şeker, katı ve sıvı yağlar yer almaktadır (Singh vd. 2007). Bu ürünler, kalsiyum karbonat, kalsiyum sitrat ve trikalsiyum fosfat gibi ticari kalsiyum tuzları kullanılarak güçlendirilir (Sheik vd. 1987; Goldscher ve Edelstein 1996; Tateo vd. 1997; Singh vd. 2007). Balık kemiği gibi doğal kalsiyum kaynakları tüketiciler tarafından daha kabul edilebilir ve kalsiyumun varlığı açısından daha etkili olabilir. İnsan kemiği bileşenlerine benzeyen fosfat bileşiğidir (Phiraphinyo vd. 2006; Hemung 2013). Yapılan çeşitli çalışmalarda balık kemiklerinden elde edilen biyokalsiyum tozunun gıda zenginleştirme amaçlı olarak kraker, kurabiye, sosis, surimi jeli, mayonez vb. gibi gıdalarda kullanılmış ve duyusal özellikler üzerinde herhangi bir olumsuz etki yaratmadığı belirlenmiştir (Benjakul ve Karnjanapratum 2018; Hemung ve Sriuttha 2014; Idowu vd. 2019; Karnjanapratum ve Benjakul 2018; Wijayanti vd. 2021b).

Balık kemiği tozu basit yöntemlerle elde edilebilir. Balık kemiği tozu, balık iskeletinin su, alkali ve asitle veya bu işlemlerin kombinasyonuyla elde edilmektedir. Bu amaçla kullanılan alkali işlem daha yaygın bir yöntemdir (Kettawan vd. 2002). Bubel vd. (2015), alkali ortam gibi ekstraksiyon yöntemlerini kullanarak Baltık morinasından (*Gadus morhua callarias*) ve Atlantik somonundan (*Salmo salar*) fileto atığı balık iskeletinden elde edilen balık kemiği tozunun temel mineral içeriğini araştırmıştır.

Bubel vd. (2015) Baltık morinası ve Atlantik somonu kemiklerinden kalsiyum tozu hazırlanmıştır. Baş ve yüzgeçlerden arındırılmış, geriye kalan kas dokusuna sahip omurgalardan oluşan hammaddeler kesme, alkali ortamda NaOH ile ön işleme, %0.1 sitrik asitle işleme, aroma giderme ve hekzan kullanarak lipit uzaklaştırma ve hidrojen peroksit ile de ağartma, suyla durulama, kurutma ve öğütme aşamalarından oluşmuştur. Somon omurgalarında daha yüksek kuru madde, protein ve yağ, morina omurgalarında

daha yüksek miktarda kül belirlenmiştir. Elde edilen preparatlardaki yüksek kuru madde, kül ve kalsiyum içeriğinin yanı sıra düşük protein ve yağ içeriği nedeniyle morina ve somon omurgalarından kalsiyum preparatlarının üretimi için uygulanan yöntemin etkin olduğunu bildirilmiştir.

Benjakul vd. (2017a) yürütmüş oldukları bir çalışmada önceden pişirilmiş tongol ton balığı (*Thunnus tonggol*) ve sarıkanat orkinos (*Thunnus albacares*) kemiklerinden elde edilen biyokalsiyum tozunun özelliklerini kalsine edilmiş kemik tozuyla karşılaştırılarak incelemişlerdir. Dondurulmuş olarak alınan ton balıkları çözündürüldükten sonra otoklavda pişirilmiş, soğutulmuş ve elle etlerinden ayrılmıştır. Daha sonra, kesilen kemikler, kalan et veya diğer kalıntıları gidermek için 120 bar basınçta yüksek basınçlı su jeti temizleyici kullanılarak temizlenmiştir. Temizlenen kemikler 50 °C'de 30 dakika boyunca NaOH'ye daldırılmış ve karıştırılmış, ardından alkali ile muamele edilen kemikler nötr veya hafif alkali yıkama suyu pH'ı elde edilene kadar akan suyla yıkanmış ve 50 °C'de 2 saat boyunca kurutulmuş ve öğütülmüştür. Alkali işlemden elde edilen öğütülmüş numuneler, oda sıcaklığında hekzan içine daldırılmış ve 60 dakika boyunca sürekli karıştırılarak aynı işlem iki kez tekrar edilerek lipit uzaklaştırma gerçekleştirilmiş ve kurutulmuştur. Kurutulan örnekler sodyum hipokloritte 30 dakika boyunca sürekli karıştırılarak, akan su altında iyice yıkanarak ve %2.5 hidrojen peroksit ile ağartılıp kurutularak biyokalsiyum tozu elde edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre kalsine tongol tonbalığı ve sarıkanat orkinosun kalsiyum ve fosfor içeriklerinin bu balıkların kemiklerinden elde edilen biyokalsiyum tozlarından daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, tüm örneklerde benzer Ca/P oranı gözlenmiştir. Her iki biyokalsiyum tozunda da hidroksiprolin ve protein tespit edilmiş, ancak kalsine edilmiş kemik tozlarında tespit edilememiştir. Sarıkanat orkinosun biyokalsiyum tozunda tongol biyokalsiyumundan daha fazla uçucu bileşik saptanırken her iki kalsine edilmiş kemik tozunda da ihmal edilebilir düzeyde saptanmıştır. Biyokalsiyum tozlarında kalsine edilmiş kemik tozlarından daha yüksek çözünür kalsiyum belirlenmiştir. Genel olarak, kullanılan işlemlerin elde edilen kemik tozlarının özellikleri üzerinde dikkate değer bir etkiye sahip olduğu ve bu nedenle hem önceden pişirilmiş tongol hem de sarıkanat orkinos kemiğinin emilebilir formda umut verici bir kalsiyum kaynağı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Benjakul vd. (2017b) önceden pişirilmiş yazılı orkinos kemiklerinden biyokalsiyum tozu üretmişler ve kalsine kemik tozuyla karşılaştırmışlardır. Biyokalsiyum tozu ve kalsine kemik tozu üretiminde Benjakul vd. (2017a)'nin uyguladıkları yöntemi kullanılmışlardır. Kalsine kemik tozunda biyokalsiyum tozuna kıyasla daha yüksek kalsiyum ve fosfor içeriği belirlemişlerdir. Biyokalsiyum tozunun kalsine tozdan biraz daha düşük L* (açıklık) değerleriyle daha yüksek b* (sarılık) değeri gözlemişlerdir. Biyokalsiyum tozunda aldehitler, alkoller ve ketonlar dahil olmak üzere düşük miktarda uçucu bileşik saptarken kalsine tozunda ise ihmal edilebilir miktarda uçucu madde bulunmuştur.

Nemati vd. (2017) sarıkanat orkinos (*Thunnus albacares*) iskeletinden biyokalsiyum ürettikleri bir çalışmada etleri bıçak yardımıyla uzaklaştırılmış kemikler 2-3 dakika kaynar suda bekletilip sonra durulanmıştır. Alkali ekstraksiyon için farklı NaOH konsantrasyonları (%1, 1.5, 2, 2.5 ve 3) ve kaynama süreleri (10, 20, 30, 40 ve 50 dakika) test edilmiştir. NaoH çözeltisinde 30 dakika kaynatıldıktan sonra süzülüp yıkanmış ve ardından kurutulup öğütülmüştür. Ön çalışma sonuçlarına göre kaynama süreleri boyunca kemik tozundaki kül miktarının artmış, protein miktarı ise azalmıştır. Ayrıca, yüksek NaOH konsantrasyonları, kemik tozundaki kül miktarını olumlu, protein miktarını ise olumsuz etkilemiştir. Kemik tozunda ana kriter olan kül miktarının, %1.5'in üzerindeki NaOH konsantrasyonunda 20 dakikadan sonra arttığı gözlenmiştir. %2, %2.5 ve %3 NaOH konsantrasyonları ile 30, 40 ve 50 dakikanın üzerindeki NaOH konsantrasyonları arasında da önemli bir fark gözlenmemiştir. Bu nedenle, 30. dakikada %2 NaOH miktarı, kemik tozu ekstraksiyonu için uygun bir koşul olduğu sonucuna varılmıştır.

Benjakul vd. (2018) önceki çalışmalarında benzer yöntemle yazılı orkinos balığı kemiklerinden biyokalsiyum tozu ürettikleri bir çalışma daha yürütmüşlerdir. Kolajen olmayan proteinlerin temizlenmesi ve uzaklaştırılmasıyla, kalsiyum ve fosfor daha konsantre hale gelmiştir. Kolajen olmayan proteinlerin temizlenmesi ve uzaklaştırılmasıyla birlikte, hem su jeti ile yıkama hem de alkali uygulamanın Ca ve P içeriklerinin yanı sıra kesilmiş kemiklerin temizlenmesi sırasında lipitlerdeki artışlarla da gösterildiği gibi daha konsantre hale gelmiştir. Ancak, lipit uzaklaştırılmış ve ağartılmış biyokalsiyum arasında Ca ve P içeriklerinde hiçbir fark görülmemiştir. Bu nedenle, lipit giderimi için çözücü ve ağartıcı maddelerin kullanımının hem Ca hem de P içerikleri üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır. Kemiklerin Tiyobarbütirik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) yüksek basınçlı su jeti ve alkali işlem uygulandığında azalmış ancak, lipit uzaklaştırılmış ve ağartılmış Biyokalsiyum arasında TBARS'ta bir fark bulunmamıştır. Ayrıca, yağ giderme için hekzan kullanıldığında TBARS'ta keskin bir düşüş gözlenmiştir. NaOCl ve H_2O_2 ile daha fazla ağartma, kemiklerin TBARS değerlerini de düşürmüştür. En güçlü balık kokusu orijinal kemikte bulunmuştur. Biyokalsiyum tozlarında balık kokusu yoğunluğunda azalma bulunmuştur.

Talib vd. (2018) su ve asetik asit ile ekstraksiyonu ile sarıkanat orkinos (*Thunnus albacares*) kemiklerinden biyokalsiyum tozu elde etmişlerdir. Biyokalsiyum tozu üretiminde 30-35 cm uzunluğunda kesilmiş kemikler yıkandıktan sonra 3 kez tekrarlanan kaynatma işlemine tabi tutulmuştur. Her kaynatma aşamasından sonra kemikler tekrar akan su altında yıkanmış ve sonraki aşamada 30 dakika boyunca su ve asetik asit ile kaynatılmıştır. Kaynatma sonrası balık kılçıkları üç kez yıkanmış ve 121 °C'de 2 saat otoklavlanmış ve ardından 8 saat boyunca 60°C'lik fırında bekletilmiş ardından öğütülmüştür. Elde edilen kemik tozunda kül içeriği sırasıyla %56.65 ve %8.21 olarak belirlenmiş. Asit ekstraksiyonunda daha düşük Ca içeriği belirlenmiştir.

Amitha vd. (2019) nin yaptığı bir çalışmada üç farklı balık türünün (*Epinephelus diacanthus, Letrinus fraenatus* ve *Pristipomoides filamentosus*) fileto atıklarından su ve

%2 sodyum hidroksit çözeltisi (NaOH) ile olmak üzere iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile kemik tozu elde edilmiştir. Kemik tozu üretimi 80-90 ºC kaynama sıcaklığında yaklaşık 30 dakika kaynatılmasıyla gerçekleştirilmiş ve kemik tozlarının besin kompozisyonu incelenmiştir. Kaynatma ortamı olarak su kullanılarak elde edilen balık kılçığında yüksek ham protein ve yağ belirlenmiştir. Alkali çözeltiden elde edilen Kemik tozunun nem ve kül oranı yüksek bulunmuştur. Bu nedenle de bu yöntemin balık fileto atıklarından mineral ekstraksiyonu için kullanılabileceği bildirilmiştir. Sonuçlar, elde edilen kemik tozunun besleyici olduğunu ve insan sağlığı gereksinimlerine önemli ölçüde katkıda bulunabileceğini ve su ürünleri işleme atıklarının etkin bir şekilde değerlendirilmesine ve çevre kirliliğinin azaltılmasına yardımcı olacağı belirtilmiştir.

Wulandari ve Kusumasari (2019) farklı ekstraksiyon yöntemlerinin süt balığı (*Chanos chanos* forskal) kemiği tozunun besin özellikleri üzerindeki etkisini belirlemek üzerine bir araştırma yürütmüşleridir. Bu araştırmada alkali ve asidik olmak üzere iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak kemik tozu üretmişlerdir. Ayrıca suda kaynatma yöntemi işe karşılaştırılmıştır. Balık kemikleri 30 dakika boyunca suyla kaynatılmış, iskelette kalan etler uzaklaştırılmış, 2 saat boyunca suyla kaynatılmış, otoklavlanmış, 80-90 ºC'de 30 dakika boyunca su, sodyum hidroksit çözeltisi ve hidroklorik asit çözeltisi içinde kaynatılmış, suyla durulanmış, 24 saat boyunca 50°C'de fırında kurutulmuş ve öğütülmüştür. Kemik tozlarında verim, nem, protein, yağ, karbonhidrat ve kül içerikleri analiz edilmiştir. Kemik tozunda %27.88 protein, %7.85 lipit, %51.42 kül ve %7.36 karbonhidrat belirlenmiştir. Asidik ve alkali yöntemle ekstrakte edilen kemik tozunun verim, protein, yağ, karbonhidrat ve kül içeriği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdiği, alkali ve asit ekstraksiyon yöntemleri, suda ekstraksiyon yöntemine göre daha yüksek kül içeriği gösterdiği ve bu nedenle bu yöntemlerle balık kemiğinden mineral ekstraksiyonu için kullanılabileceği ve bu süt balığı kemiği tozundan elde edilen minerallerin çeşitli farmasötik ve gıda endüstrisi uygulamalarında potansiyel uygulama alanı bulabileceği bildirilmiştir.

Kurniasih vd. (2020) kemik mineral içeriğinin balık habitatının ekolojisinden etkilendiği hipotezi ile tilapya yetiştiriciliğinin yerinin (su koşullarının) Mozambik tilapya (*Oreochromis mossambicus*) kemiklerinden elde edilen biyokalsiyumun özellikleri üzerindeki etkisini belirlemeyi amaçladıkları bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu amaçla iki farklı gölde yetiştirilen tilapya kemiklerinden biyokalsiyum üretimi için kemikler yıkandıktan sonra 2 saat kaynatılmış, 80°C'de kurutulmuş, ardından 100°C'de NaOH ile üç kez ekstrakte edilmiş, nötralize edilmiş ve süzüldükten sonra kurutulmuş ve öğütülmüştür. Sonuçlar, çiftçilik yerlerindeki farklılıkların biyokalsiyumun verimi, kalsiyum içeriği ve beyazlığı üzerinde önemli bir farka sahip olduğunu göstermiştir.

Idowu vd. (2020) yaptıkları bir çalışmada somon (*Salmo salar*) kemiğinden biyokalsiyum ve hidroksiapatit ekstraksiyon sürecinde kullanılan alkali işlemin kimyasal bileşimler, Ca/P oranları ve faz morfolojisi de dahil olmak üzere özellikleri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Yaklaşık 30-35 cm uzunluğunda somon iskeleti, 4-5 cm

uzunluğunda kesilmiş hidrolize tabi tutulmuştur. Hidrolizden sonra yüksek basınçlı su jeti ile etlerinden temizlenmiştir. Hazırlanan kemiklerin ilk kısmı, 50°C'de 120 dakikaya kadar NaOH' e daldırılmış ve sürekli karıştırılmıştır. Farklı zamanlarda (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 ve 120 dakika), toplam çözünür protein içerikleri ile hidroksiprolin içerikleri analiz edilmiştir. En yüksek çözünür protein ve en düşük hidroksiprolin içeriğine sahip ürün alkali işlem için seçilmiştir. İkinci kısım alkali işleme tabi tutulmamıştır. Her iki kemik de kurutulup öğütülmüştür. Çalışma sonucunda alkali işlemin somon iskelet yan ürününün biyokalsiyum ve hidroksiapatit tozlarına dönüştürülme sürecini etkilediğini göstermiştir. Alkali işlem tüm örneklerin özellikleri üzerinde önemli bir rol oynamıştır. Yağ, protein ve kolajen gibi biyomoleküler bileşiklerin miktarı, alkali işlem uygulanan biyokalsiyum tozunda önemli ölçüde azalmıştır.

Wijayanti vd. (2021a) Asya levreği (*Lates calcarifer*) omurgasından elde edilen biyokalsiyum tozunun surimi jelinin özellikleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla Asya levreği omurgaları 100°C'de 30 dakika kaynatılmış kaynatılan kemiklerin etlerini uzaklaştırmak için musluk suyuyla yıkanmış, temizlenen kemikler 121 °C'de 90 dakika boyunca otoklavlanmış ve otoklavlanan kemikler, 50°C'de 24 saat kurutulmuş ve ardından öğütülmüştür. Öğütülen örnekler hekzan içinde oda sıcaklığında bekletilerek yağdan arındırılmış, ardından %2.50) hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılarak ağartılmış, yıkanmış, kurutulmuş ve öğütülerek biyokalsiyum tozu hazırlanmıştır. Biyokalsiyum tozu hazırlanmış olan surimi jele %0, %2, %4, %6, %8, ve %10 oranlarında ilave edilmiştir. Biyokalsiyum tozu ilavesi, surimi jelinin kopma kuvvetini ve deformasyonunu artırırken, nem içeriğini azaltmıştır. L*, a*, b* (sarılık) değerleri, biyokalsiyum tozu seviyelerinin artırılmasıyla artmış; ancak beyazlık, toz içeren surimi jelinde hafifçe azalmıştır. Toz ilave edilen surimi jeli tekstür profili analizi, surimi hamurunun daha yüksek depolama modülüne sahip olmasıyla birlikte doku özelliklerinin iyileştiğini göstermiştir. Biyokalsiyum tozunu %8 oranında içeren surimi jeli, kontrole kıyasla daha yoğun ve daha ince bir mikro yapıya ve daha yüksek kül, kalsiyum ve fosfor içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, %8'e kadar biyokalsiyum eklenmesi, sadece mineral içeriğini artırmakla kalmamış, aynı zamanda surimi jelinin dokusal, duyusal ve mikroyapısal özelliklerini de iyileştirmiştir.

Farklı sürelerde yüksek basınçlı ısıtmaya otoklavlanan Asya levreği (*Lates calcarifer*) omurgasının fiziksel ve kimyasal özelliklerinin incelendiği bir çalışmada ısıtma süresi arttıkça, sıvıdaki protein, a-amino grubu ve hidroksiprolin içeriğinde artışlar, sertlikte azalma saptanmıştır. Otoklavda 90 dakika boyunca 121 °C'de ısıtılan Asya levreği omurgası, daha kısa ısıtma süresine sahip olanlara kıyasla protein ve lipit içeriğinin daha düşük, kül içeriğinin ise daha yüksek olduğu, en yüksek kalsiyum, fosfor ve demir içeriğine sahip olduğunun görüldüğü ve bu nedenle, ön ısıtma işleminin organik bileşikleri ve kemik sertliğini azaltabileceği bildirilmiştir (Wijayanti vd. 2021b).

Wijayanti vd. (2021c) Asya levreği (*Lates calcarifer*) omurgasından biyokalsiyum üretmek için yüksek basınçlı ısıtma ve uygun ağartma maddelerinin

kombinasyonu ile elde edilen biyokalsiyumun moleküler özellikleri ve biyoyararlanımı üzerindeki etkisini açıklamayı amaçladıkları bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada uzunlamasına kesilen omurga kemikleri su kullanılarak iyice temizlenmiş ve ardından 100 °C'de 30 dakika kaynatılmıştır. Haşlanmış kemiğin bir kısmı, basınç altında 121 °C'de 90 dakika daha otoklavlanmış ve sonra, kurutulmuş ve öğütülmüştür. Lipit uzaklaştırma için hekzan ile muamele edildikten sonra ağartma işlemi uygulanmıştır. Otoklavlanmış olanlar biyokalsiyum tozlarında, haşlanmış olanlara göre daha yumuşak kemik dokusu gözlemlenmiştir. Farklı ön ısıtma işlemleri ve ağartma maddeleri, biyokalsiyumun kimyasal bileşimleri üzerinde belirgin bir etki göstermiştir. Otoklavlanmış kemikten hazırlanan biyokalsiyumlar, haşlanmış kemikten elde edilenlere kıyasla daha düşük nem içeriği göstermiştir.

Cahyani vd. (2022) basınç altında pişirilmiş Indo-Pasifik tarpon balığı (*Megalops cyprinoides*) kemiğinden elde edilen biyokalsiyum tozunun kimyasal bileşimini araştırdıkları çalışmalarında yıkanan kemikleri yıkayıp süzdükten sonra 800°C'lik başlangıç sıcaklığında 30 dakika kaynatmışlar ve bu işlemi 4 kez tekrar ettikten sonra basınç altında 0, 1 ve 2 saat pişirmişlerdir. Daha sonra NaOH kullanarak ve 600°C sıcaklıkta, 2 saat boyunca bir su banyosunda tutmuşlar, süzme ve yıkama işlemlerinden sonra kurutup öğütmüşlerdir. Pişirme süresinin (0, 1, 2 saat) basınç altında pişirilmiş *M. cyprinoides* kemiğinden elde edilen biyokalsiyum tozunun su, protein, yağ ve kül içeriği üzerinde etkisi olduğu gösterilmiş ve 2 saatlik pişirme süresinin en iyi seçenek olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar, basınçlı pişirme işleminin üretilen kalsiyum içeriğini etkilediğini, ancak pişirme süresinin 2 saate uzatılmasının önemsiz bir etkiye sahip olduğunu ve kül analizinin önceki sonuçlarıyla çeliştiğini göstermiştir. Fosfor için de benzer bir davranış gözlemlenmiş ve seviyeler 2 saatlik pişirme sonunda azalmıştır.

Sriket vd. (2023) hibrit yayın balığı (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*) kemiğinden elde edilen biyokalsiyumun özellikleri üzerinde çeşitli işlemlerin etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada balık kemikleri basınçlı su jeti ile temizlendikten sonra kolajen olmayan proteinlerin uzaklaştırılması için potasyum hidroksit (KOH) çözeltisinde 100 °C'de 30 dakika bekletmişler, süzmüşler, akan suyla iyice yıkadıktan sonra kurutup öğütmüşlerdir. Lipit uzaklaştırmak için protein uzaklaştırmada öğütülen kemik tozu etanolde bekletilip 60 dakika karıştırılmış, kullanılan etanol süzülmüş ve elde edilen kemik daha sonra 30 dakika boyunca iki hacim etanolde yıkanmıştır. Lipit uzaklaştırmadan gelen ürün hidrojen peroksit içinde karıştırılarak 30 dakika bekletilmiş ve iyice yıkandıktan sonra kurutulup öğütülerek biyokalsiyum tozu elde edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre protein içerikleri de biyokalsiyum üretim süreci boyunca azalmıştır. Temizleme işlemiyle protein ve lipit giderimi azalmış, ancak kül içeriği, protein giderimi, lipit giderimi ve son ürün aşamalarında daha yoğun hale gelmiştir. Biyokalsiyum tozunda Ca ve P içeriğinin yüksek olduğu bunun da yüksek basınçlı su jeti temizleyicisi kullanılarak yapılan temizleme ve alkali işlem gibi farklı işlemlerin etkisi olduğu bulunmuştur. Et, kan ve lipidin uzaklaştırılmasıyla yapılan ön

işlem süreçlerinden sonra, hazırlanan kemik tozunun hidroksiprolin içeriğindeki artışlar bildirilmiştir. Ayrıca, biyokalsiyumda yüksek oranda prolin, glisin, aspartik asit alanin ve glutamik asit bulunmuştur. Etanol daldırma, ağartma ve öğütme işlemleri, biyokalsiyumun etkinliğini etkili bir şekilde azaltmıştır.

Pudtikajorn vd. (2023) tarafından Orkinos (Katsuwonus pelamis) göz küresi skleral kıkırdağından elde edilen skleral kıkırdak biyokalsiyum tozu, yağ giderme için hekzan ve izopropanol kullanılarak üretilmiş ve ardından farklı konsantrasyonlarda (%1.5-4.5) alkalaz kullanılarak çeşitli sürelerde (0-180 dakika) protein giderimi sağlanmıştır. Diğer yandan kalsine edilmiş skleral kıkırdak hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Skleral kıkırdakta kalan en düşük yağ, 6 yağ giderme döngüsünden sonra elde edilmiştir. 90 dakika boyunca %1.5 alkalaz kullanımı, en yüksek çözünür protein giderimini sağlarken, en düşük hidroksiprolin kaybını göstermiştir. Kalsine kalsiyum tozunda, skleral kıkırdak tozuna kıyasla daha yüksek kalsiyum, fosfor ve L* değerleri tespit edilmiştir. Ancak, kalsine tozunun a*, b* ve ΔE* değerleri daha düşük bulunmuştur. Ayrıca, kalsine tozda daha az sayıda ve bol miktarda uçucu bileşik bulunmuştur. Çalışma sonucunda, ton balığı göz küresinin skleral kıkırdağının biyokalsiyum üretimi için alternatif bir kaynak olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Benjakul vd. (2024) balık kemiklerinden biyokalsiyum tozu üretiminde proteinleri uzaklaştırmak için bir NaCl çözeltisi kullanılabileceği ve yağ giderimi için yeşil bir işlemde çözücü yerine balık lipazının kullanılabileceği hipotezi ile kolajen olmayan proteinleri uzaklaştırmak için farklı konsantrasyonlarda ısıyla birlikte NaCl ön işleminin etkisini araştırmayı ve önceden pişirilmiş ton balığı kemiğinden biyokalsiyum üretimi için yağ giderimi amacıyla farklı seviyelerde balık lipazı işlemleri uygulamayı amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda optimum NaCl ön işleminin 80 °C'de %5'lik bir NaCl çözeltisi 150 dakika boyunca kullanıldığında elde edilmiştir. En düşük lipit içeriği, 2 saat boyunca 0.30 Ünite/g kemik tozu oranında ham lipaz özütü ile yağdan arındırılmış kemikte elde edilmiştir. Yağı uzaklaştırılmış kemikten elde edilen biyokalsiyum tozu, kontrol örneğinden daha fazla kül, kalsiyum ve fosfor içeriğine ve daha küçük partikül boyutlarına sahip olmuştur. Asya levreği karaciğerinden 0.30 Ünite/g kemik içeren ham lipaz özütü ile 2 saat boyunca yağdan arındırma işlemi, kemik tozundaki yağı azaltmada en yüksek verimliliği göstermiştir. Yağdan arındırma işlemi, biyokalsiyum tozlarının verimi ve özellikleri üzerinde etkili olmuştur. Yağı alınmış biyokalsiyum tozu, yağı alınmamış olandan daha yüksek kalsiyum ve fosfor içeriğinin yanı sıra daha ince partikül boyutlarına sahip olmuştur. Bu nedenle, Asya levreği karaciğerinden lipaz kullanılarak yağdan arındırma, biyokalsiyum üretimi için yeşil bir yöntem olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Bir başka çalışmada *Nemipterus* sp. kemiklerinden elde edilen biyokalsiyum fosfat tozunun özellikleri incelenmiş ve aynı kaynaktan üretilen kalsine balık kılçığı tozuyla karşılaştırılmıştır. Yüksek basınçlı jet ile etlerinden temizlenen kemikler NaOH çözeltisinde %95 etanolde 60 dakika tutularak lipit uzaklaştırma yapılan kemikler

hidrojen peroksit ile ağartma uygulandıktan sonra kurutulup öğütülerek biyokalsiyum tozu üretilmiştir. Ayrıca 900°C'de kalsine edilen kemik tozları üretilerek biyokalsiyum tozu ile karşılaştırılmıştır. Kalsine edilmiş balık kılçığı tozu, biyokalsiyum tozuna kıyasla daha yüksek kalsiyum ve fosfor içeriği göstermiştir. Biyokalsiyum tozunda, kalsine edilmiş balık kılçığı tozuna kıyasla daha yüksek a* ve b* değerleri ve biraz daha düşük açıklık L* değerleri belirlenmiştir. Biyokalsiyum tozunda düşük miktarda uçucu madde varlığı saptanırken, kalsine edilmiş balık kılçığı tozunda ihmal edilebilir miktarlarda saptanmıştır. Tüm bu sonuçlar ışığında çipura kemiklerinden elde edilen biyokalsiyum fosfat tozu, insan beslenmesi için olumlu özelliklere sahip bir kalsiyum takviyesi kaynağı olarak umut vaat ettiği bildirilmiştir (Petrat vd. 2025).

Biyokalsiyum tozunun karakterize edildiği bu çalışmaların dışında üretilen biyokalsiyum tozlarının çeşitli gıdalarda katkı maddesi olarak kullanıldığına dair çalışmalar da bulunmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Putra vd. (2015) yılanbaşı olarak anılan bir balık türü (*Channa striata*) kemiklerinden üretilen biyokalsiyum tozunun kraker üretiminde kullanımını araştırmışlardır. Bu çalışmada kraker üretiminde %0, %10, %20, %30 ve %40 oranlarında biyokalsiyum tozu formülasyona ilave edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre yılanbaşı balık kemiği biyokalsiyum tozu %5 seviyesinde uygulanan işlemin üretilen krakerlerin kül içeriği üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermiştir. Ca ve P içeriğindeki artış kül içeriğinde artışa neden olmuştur.

Nemati vd. (2016) sarıkanat orkinos (*Thunnus albacares*) kemiklerinden alkali yöntemle elde ettikleri biyokalsiyum tozunu unlu mamüllere (ekmek ve tereyağlı kurabiye) ilave ettikleri bir çalışma yürütmüşlerdir.

Luu ve Nguyen (2009) yaptıkları bir çalışmada yayın balığı, somon ve mercan kemiklerinden alkali yöntemle elde ettikleri biyokalsiyum tozlarını beyaz ekmeği zenginleştirmek için kullanmışlardır. Bu çalışmada ticari kalsiyum zenginleştiriciler β-Trikalsiyum fosfat $Ca_3(PO_4)_2$ kalsiyum sitrat $Ca_3(C_6H_5O_7)_2$ kullanarak biyokalsiyum tozları ile karşılaştırılmıştır. Un, tuz, şeker, süt tozu, tereyağı, ekmek geliştirici, katı yağ ve ılık su ve maya ile hazırlanan ekmek hamuruna üç balık türünden elde edilen biyokalsiyum tozları ve ticari kalsiyum zenginleştiriciler çeşitli oranlarda ilave edildikten sonra ekmekler fermentasyona bırakılmış ve ardından pişirilmiştir. Takviyesiz ekmekteki kalsiyum içeriği, kalsiyum takviyeli ekmekten daha düşük bulunmuştur. Ayrıca biyokalsiyum tozunun kullanım süresi boyunca, kalsiyum konsantresinin normal işleme, depolama, dağıtım ve kullanım koşulları altında beyaz ekmekte yeterince stabil olduğunu göstermiştir. Yapılan duyusal analizlere göre biyokalsiyum ilavesinin beyaz ekmeğin rengini, kokusunu, dokusunu veya tadını etkilediği biyokalsiyum tozuyla zenginleştirilmiş beyaz ekmek ile kontrol örnekleri arasında genel kabul puanlarında önemli bir fark olmadığı belirlemiştir. Böylece biyokalsiyum tozunun, kalsiyum eksikliği

riski taşıyan nüfus tarafından tüketilen erişte, karides cipsi, kurabiye ve diğer gıdalar gibi diğer ürünlerde de zenginleştirme amaçlı kullanılabileceği bildirilmiştir.

Karnjanapratum ve Benjakul (2018) Yazılı orkinos kemiğinden elde edilen biyokalsiyum tozu ile zenginleştirilmiş Hindistan cevizi yağı bazlı kurabiye geliştirmeyi amaçladıkları bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu amaçla kontrol kurabiyesinde sadece katı yağ kullanılırken deney kurabiyesinin bir grubunda katı yağ yerine %35 katı yağ ve %65 Hindistan cevizi yağı diğer grubunda ise %100 oranlarında Hindistan cevizi yağı kullanılmıştır. Biyokalsiyum tozu hamurlara %8.5, %12.0 ve %15.5 oranlarında ilave edilmiştir. Kurabiyelerin rengi, çapı, kalınlığı ve sertliği biyokalsiyum tozu ve hindistancevizi yağı seviyelerine göre değişmiş olup %12 oranında biyokalsiyum tozu, duyusal özellikler üzerinde olumsuz bir etki yaratmadan katı yağ yerine hindistancevizi yağı kullanılarak kurabiyelerin zenginleştirilebileceği belirlenmiştir. Biyokalsiyum tozunun eklenmesi ve katı yağ yerine hindistancevizi yağı kullanılması, kurabiyenin kalitesi ve duyusal özellikleri üzerinde etkili olmuştur. Kalsiyum ve fosfor açısından zengin kurabiye üretildiği ve bu nedenle, özellikle kalsiyum için mineral takviyesi olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Idowu vd. (2019) yürüttükleri bir çalışmalarında somon kemiklerinden ürettikleri biyokalsiyum tozunu tam buğday unundan ürettikleri krakerleri zenginleştirmek amacıyla kullanmışlardır. Biyokalsiyum tozunu ve bunun protein hidrolizatı ile farklı oranlardaki karışımlarını (3:1, 1:1, 1:3), hamur karışımına tam buğday unu içeriğine göre %16.67'lik bir ikame oranında zenginleştirmek için ilave ederek kraker üretmişlerdir. Üretilen krakerlerin fiziksel, dokusal, duyusal ve besinsel profillerini incelemiş ve zenginleştirilmemiş krakerlerle karşılaştırmışlardır. Krakerlerin ağırlığı, rengi, dokusal özellikleri ve kalınlığı, farklı oranlarda biyokalsiyum tozu ve protein hidrolizatı tozu eklenmesiyle değişmiştir. Bu şekilde üretilen krakerlerin takviyesiz kontrol krakerlerine kıyasla daha yüksek protein, yağ, kalsiyum, fosfor, sodyum ve kolesterol, ancak daha düşük karbonhidrat, şeker, lif ve enerji değerine sahip oldukları belirlenmiştir. Biyokalsiyum /hidrolizat oranı 3:1 olan krakerlerin kalsiyum ve fosfor içeriği ve yoğunluğu, kontrol krakerlerine kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Çalışma sonucunda biyokalsiyum ve protein hidrolizatı tozlarının eklenmesinin, krakerlerin besin değerlerini artırmada umut verici olduğu bildirilmiştir.

Pudtikajorn vd. (2022) emülsiyon tipi surimi bazlı bir ürün olan Tofu'nun zenginleştirilmesinde ton balığı göz küresi skleral kıkırdak biyokalsiyumun kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Bu amaçla çeşitli seviyelerdeki (%0, 2.5, 5.0, 7.5 ve 10.0) biyokalsiyum tozu buzlu suda homojenizasyon yoluyla soya yağı ile ön emülsifiye edilmiş ve bu ön emülsiyon daha sonra balık tofu ezmesine aktarılmış, karıştırılmış, biyokalsiyumla zenginleştirilmiş balık tofu jelini oluşturmak için surimi ezmesi bir kılıfa doldurulmuş ve buharda pişirildikten sonra soğutulmuş ve kızartıldıktan sonra analizler yürütülmüştür. Çalışma sonucunda balık tofusunda genel kabul edilebilirlik üzerinde olumsuz bir etki yaratmadan daha yüksek kalsiyum içerikli daha yoğun bir jel ağı

oluşturabileceği ve bu nedenle, %7.5 biyokalsiyum tozunun balık tofusundaki kalsiyum içeriğini ve dolayısıyla besin değerini artırabileceği belirtilmiştir.

Trisnawati vd. (2024) Asya levreği (*Oreochromis niloticus*) kemiğinden üretilen biyokalsiyum ilavesinin nil tilapyadan yapılan balık köftelerinin fiziksel, kimyasal ve duyusal özellikleri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Kıyma haline getirilen nil tilapya fileto etine tapioka unu, tuz, sarımsak, biber, aroma verici malzemeler ve ardından farklı konsantrasyonlarda biyokalsiyum tozu (%0, 3, 5, 7) ilave edildikten sonra homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır. Küçük toplar haline getirilen köfte hamuru 100°C'de 20 dakika kaynatılarak pişirildikten sonra paketlenmiştir. Araştırma sonuçları biyokalsiyum ilavesinin jel mukavemeti, kalsiyum, protein, su, yağ, kül içerikleri ve duyusal özellikler üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. %3 konsantrasyondaki FPB, jel mukavemeti, kalsiyum içeriği, protein içeriği, nem içeriği, yağ içeriği ve kül içeriğiyle hedonik değerin en iyi şekilde işlenmesini sağlamıştır. Uygun konsantrasyonda balık kemiği biyokalsiyumu ilavesi, nil tilapya balık köftelerinin dokusunu ve kalsiyum içeriğini duyusal özellikleri etkilemeksizin artırmıştır.

Gawborisut vd. (2024) Fermente balık ürünleri üretiminde fermente balık kemiği olarak adlandırılan önemli miktarda bir atık ortaya çıktığını ve bu atıktan biyokalsiyum tozu üretilerek değerlendirilebileceği hipotezi ile yürüttükleri bir çalışmada alkali yöntemle elde ettikleri biyokalsiyum tozunu emülsiyon tipi sosislere ilave etmişlerdir. Bunun için farklı miktarlarda biyokalsiyum tozunu (0, 12, 24, 36 g) sosis hamuruna ilave etmişlerdir. Fermente balık kemiğinden biyokalsiyum üretmek için en uygun alkali işlemin %3 NaOH ve 1 saat bekletme olduğu sonucuna varılmıştır. Emülsiyon tipi sosislerin biyokalsiyum ile güçlendirilmesi, kalsiyum ve fosfor içeriğini artırmış, ancak tekstür profilini biraz azaltmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak levrek balığı (*Dicentrarchus labrax*) kemikleri kullanılmıştır. Antalya'da faaliyet gösteren bir balıkçıdan taze olarak temin edilen balıklar satın alınır alınmaz laboratuvara soğuk taşıma çantası içerisinde getirilmiştir. Laboratuvarda etlerinden ayrılan (Şekil 3.1.) balık kemikleri uzunlamasına 8-10 cm uzunluğunda küçük parçalara kesilmiştir. Bu kemik parçaları daha sonra kan ve diğer kirleticilerden arındırmak için akan su altında iyice yıkanmış ve biyokalsiyum tozu üretimi başlayana kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2. Biyokalsiyum tozu üretimi

Biyokalsiyum tozu üretmek için, derin dondurucuda saklanan balık kılçıkları çözülmeleri için buzdolabına bekletilmiştir. Biyokalsiyum tozu üretilmeden önce ham balık kılçıkları analiz edilmiştir. Biyokalsiyum tozu çeşitli yöntemler kullanılarak üretilmiştir.

Biyokalsiyum üretimi protein uzaklaştırma, yağ uzaklaştırma ve ağartma olmak üzere üç ana aşamadan oluşmuştur. Protein uzaklaştırma için sodyum hidroksit (NaOH) (2M), sodyum hipoklorit (NaOCl) (%2.5), yağ uzaklaştırma için etanol (C_2H_5OH) (%10) ve yüzey aktif madde Polisorbat 80 (%1), ağartma işlemi için ise hidrojen peroksit (H_2O_2) (%2.5) ve sodyum hipoklorit (NaOCl) (%2.5) kullanılmıştır. Biyokalsiyum üretimi öncesi bu kimyasalların çözeltileri hazırlanmıştır. Biyokalsiyum üretiminde protein uzaklaştırma, yağ uzaklaştırma ve ağartma işlemlerinde kullanılan kimyasalların kombinasyonlarından oluşan on farklı grup oluşturulmuştur. Bu kombinasyon grupları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Biyokalsiyum üretimi bu gruplar için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Böylece en uygun özelliklere sahip biyokalsiyum tozu üretimi hedeflenmiştir. Tezin ikinci aşamasında en uygun biyokalsiyum tozu balık köftesine ilave edilmiştir.

Çizelge 3.1. Biyokalsiyum üretiminde kullanılan kimyasalların kombinasyonları

Grup kodu	Protein uzaklaştırma	Yağ uzaklaştırma	Ağartma
A1X	NaOH	Etanol	H_2O_2
A2X	NaOH	Polisorbat 80	H_2O_2
A1Y	NaOH	Etanol	NaOCl
A2Y	NaOH	Polisorbat 80	NaOCl
B1X	NaOH + NaOCl	Etanol	H_2O_2
B2X	NaOH + NaOCl	Polisorbat 80	H_2O_2
B1Y	NaOH + NaOCl	Etanol	NaOCl
B2Y	NaOH + NaOCl	Polisorbat 80	NaOCl
S	Kaynatılmış su	-	-
HK	Kurutulmuş ham kemik	-	-

3.2.1. Biyokalsiyum üretim yöntemleri

Biyokalsiyum üretimi Çizelge 3.3'teki kodlara göre aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2. Biyokalsiyum tozu üretiminde gruplar için kullanılan kodlar

Kod	Kimyasal
A	NaOH
B	NaOH + NaOCl
1	Etanol
2	Polisorbat 80
X	H_2O_2
Y	NaOCl

A1X

A- 500 mL "**NaOH çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca 80 ºC sıcaklıkta karıştırılarak protein giderilmesi yapıldı. Proteini giderilen kemikler saf su ile pH 7 olana kadar durulandı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı. Tartım yapılan kemiklerin parçacık boyutu düşürülmek için parçalandı ve toz haline getirildi.

1- Kemik Tozları 500 mL "**Etanol çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak yağ giderilme işlemi gerçekleştirildi. Yağı giderilen toz, saf su ile durulanarak etanolden arındırıldı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.

X- Kemik Tozları 500 mL "**H_2O_2 çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak ağartma işlemi yapıldı. Ağartılan toz, pH 7 olana kadar saf su ile durulandı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.

A2X

A- 500 mL "**NaOH çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca 80 ºC sıcaklıkta karıştırılarak protein giderilmesi yapıldı. Proteini giderilen kemikler saf su ile pH 7 olana kadar durulandı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı. Tartım yapılan kemiklerin parçacık boyutu düşürülmek için parçalandı ve toz haline getirildi.
2- Kemik Tozları 500 mL "**Polisorbat 80 çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak yağ giderilme işlemi gerçekleştirildi. Yağı giderilen toz, saf su ile durulanarak yüzey aktif maddeden arındırıldı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.
X- Kemik Tozları 500 mL "**H_2O_2 çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak ağartma işlemi yapıldı. Ağartılan toz, pH 7 olana kadar durulandı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.

A1Y

A- 500 mL "**NaOH çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca 80 ºC sıcaklıkta karıştırılarak protein giderilmesi yapıldı. Proteini giderilen kemikler saf su ile pH 7 olana kadar durulandı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı. Tartım yapılan kemiklerin parçacık boyutu düşürülmek için parçalandı ve toz haline getirildi.
1- Kemik Tozları 500 mL "**Etanol çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak yağ giderilme işlemi gerçekleştirildi. Yağı giderilen toz, saf su ile durulanarak etanolden arındırıldı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.
Y- Kemik Tozları 500 mL "**NaOCl çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak ağartma işlemi yapıldı. Ağartılan toz, pH 7 olana kadar durulandı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.

A2Y

A- 500 mL "**NaOH çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca 80 ºC sıcaklıkta karıştırılarak protein giderilmesi yapıldı. Proteini giderilen kemikler saf su ile pH 7 olana kadar durulandı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı. Tartım yapılan kemiklerin parçacık boyutu düşürülmek için parçalandı ve toz haline getirildi.
2- Kemik Tozları 500 mL "**Polisorbat 80 çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak yağ giderilme işlemi gerçekleştirildi. Yağı giderilen toz, saf su ile durulanarak yüzey aktif maddeden arındırıldı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.
Y- Kemik Tozları 500 mL "**NaOCl çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak ağartma işlemi yapıldı. Ağartılan toz, pH 7 olana kadar durulandı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.

B1X

B- 500 mL "**NaOH + NaOCl çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca 80 ºC sıcaklıkta karıştırılarak protein giderilmesi yapıldı. Proteini giderilen kemikler saf su ile pH 7 olana kadar durulandı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve

tartıldı. Tartım yapılan kemiklerin parçacık boyutu düşürülmek için parçalandı ve toz haline getirildi.

1- Kemik Tozları 500 mL "**Etanol çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak yağ giderilme işlemi gerçekleştirildi. Yağı giderilen toz, saf su ile durulanarak etanolden arındırıldı. 60 ^{o}C sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.

X- Kemik Tozları 500 mL "**H_2O_2 çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak ağartma işlemi yapıldı. Ağartılan toz, pH 7 olana kadar durulandı. 60 ^{o}C sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.

B2X

B- 500 mL "**NaOH + NaOCl çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca 80 ^{o}C sıcaklıkta karıştırılarak protein giderilmesi yapıldı. Proteini giderilen kemikler saf su ile pH 7 olana kadar durulandı. 60 ^{o}C sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı. Tartım yapılan kemiklerin parçacık boyutu düşürülmek için parçalandı ve toz haline getirildi.

2- Kemik Tozları 500 mL "**Polisorbat 80 çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak yağ giderilme işlemi gerçekleştirildi. Yağı giderilen toz, saf su ile durulanarak yüzey aktif maddeden arındırıldı. 60 ^{o}C sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.

X- Kemik Tozları 500 mL "**H_2O_2 çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak ağartma işlemi yapıldı. Ağartılan toz, pH 7 olana kadar durulandı. 60 ^{o}C sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.

B1Y

B- 500 mL "**NaOH + NaOCl çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca 80 ^{o}C sıcaklıkta karıştırılarak protein giderilmesi yapıldı. Proteini giderilen kemikler saf su ile pH 7 olana kadar durulandı. 60 ^{o}C sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı. Tartım yapılan kemiklerin parçacık boyutu düşürülmek için parçalandı ve toz haline getirildi.

1- Kemik Tozları 500 mL "**Etanol çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak yağ giderilme işlemi gerçekleştirildi. Yağı giderilen toz, saf su ile durulanarak etanolden arındırıldı. 60 ^{o}C sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.

Y- Kemik Tozları 500 mL "**NaOCl çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak ağartma işlemi yapıldı. Ağartılan toz, pH 7 olana kadar durulandı. 60 ^{o}C sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.

B2Y

B- 500 mL "**NaOH + NaOCl çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca 80 ^{o}C sıcaklıkta karıştırılarak protein giderilmesi yapıldı. Proteini giderilen kemikler saf su ile pH 7 olana kadar durulandı. 60 ^{o}C sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı. Tartım yapılan kemiklerin parçacık boyutu düşürülmek için parçalandı ve toz haline getirildi.

2- Kemik Tozları 500 mL "**Polisorbat 80 çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak yağ giderilme işlemi gerçekleştirildi. Yağı giderilen toz, saf

su ile durulanarak yüzey aktif maddeden arındırıldı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.

Y- Kemik Tozları 500 mL "**NaOCl çözeltisi**" içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak ağartma işlemi yapıldı. Ağartılan toz, pH 7 olana kadar durulandı. 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.

S: Suda Kaynatma:

Taze tartımı yapılan kılçıklar, saf suda kaynatılıp durulanan parçalar saf su ile durulanıp 60 ºC sıcaklıktaki etüvde 8 saat kurutma işlemi yapıldı ve tartıldı.

HK (ham kemik)

Taze (0) numunesi

Taze tartımı yapılan kılçıklar, 0 numunesi olarak vakum paketlenerek saklandı.



Şekil 3.1. Ham kemik örnekleri



(a)



(b)

Şekil 3.2. Alkali çözeltiye bırakılan (a) ve kaynatılan (b) balık kemikleri

3.3. Biyokalsiyum tozunun gıda katkısı olarak kullanılması

Tezin bu aşamasında alabalık fileto etinden balık köftesi üretilmiştir. Köfte üretimi için balıkların başları kesilmiş, iç organları çıkarılmış, filetoları çıkarılmış ve sonra yıkanmıştır. Ön işlemlerin ardından balıklar kaynar suda 2-3 dakika haşlanmış ve kıyma haline getirilmiştir. Köfte formülasyonuna (Çizelge 3.3) balık eti, buğday unu, ekmek kırıntısı, tuz, soğan ve baharat karışımı ve %5 ve %10 oranlarında biyokalsiyum tozu ilave edilmiştir. Biyokalsiyum tozu ilave edilmemiş köfte kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Malzemeler iyice karıştırılıp yoğurulduktan sonra elle şekillendirilmiş ve köfteler 180°C'deki ayçiçek yağında kızartılmıştır.

Çizelge 3.3. Köfte formülasyonu

İçerik	Miktar		
Biyokalsiyum	0	5	10
Balık eti	75	70	65
Un	10	10	10
Ekmek kırıntısı	10	10	10
Tuz	2	2	2
Soğan	1	1	1
Baharat	2	2	2

3.4. Analizler

3.4.1. Biyokalsiyum tozu verimi

Biyokalsiyum tozunun verimi biyokalsiyum tozu ağırlığının ham kemik ağırlığına oranlanmasıyla belirlenmiştir.

%Verim (g/100g) = (Biyokalsiyum ağırlığı / Ham kemik ağırlığı) X 100

3.4.2. Kimyasal kompozisyon (nem, protein, yağ, kül) analizleri

Kimyasal kompozisyon analizleri ham kemik ve biyokalsiyum tozlarında AOAC (1990)'a göre yapılmıştır.

3.4.2.1. Nem tayini

Örneklerin nem miktarı 105°C'de sabit ağırlığa gelinceye kadar etüvde kurutularak belirlenmiştir (AOAC 1990). Sabit tartıma getirilmiş kurutma kaplarına homojenize edilmiş örnekten 0.1 mg hassasiyetle 1 gram tartılmış, 105±2 °C'deki etüvde sabit ağırlık elde edilinceye kadar kurutulmuştur. Desikatörde soğutulup tartılan örneklerin ağırlık farklarından yararlanılarak % nem miktarı belirlenmiştir.

3.4.2.2. Ham protein tayini

Örneklerin ham protein miktarı Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir. Homojenize edilmiş örnek bir katalizör yardımıyla derişik sülfürik asit ile parçalanmış, açığa çıkan azot ise amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) olarak bağlanmıştır. Daha sonra ortama kuvvetli bir alkali (NaOH) ilave edilerek meydana gelen amonyak distile edilip, 0.1 N sülfirik asit çözeltisinde tutulmuş ve 0.1 N NaOH çözeltisi ile geri titre edilmek suretiyle örnekteki toplam azot miktarı kör numuneye karşı belirlenmiştir. Bulunan azot değeri 6.25 faktörü (N × 6.25) ile çarpılarak % ham protein miktarı hesaplanmıştır.

3.4.2.3. Ham yağ tayini

Örneklerin ham yağ miktarı soxhlet yöntemi ile belirlenmiştir. Beş gram örnek 250 mL'lik erlene aktarılmış üzerine 50 mL 4 N HCl ilave edilmiş ve hafif ısıda bunzen bekinde kaynatılarak karıştırılmıştır. Süzgeç kağıdı ıslak huniye yerleştirilmiş, erlendeki karışım sıcak olarak süzülmüş ve sıcak su ile yıkanmıştır (süzüntü reaksiyon vermeyinceye kadar). Süzgeç kağıtları petri kutusu içerisinde 100°C'de etüvde kurutulmuş ve rulo yapılarak Soxhlet ekstraksiyon kartuşlarına konulmuş ve 4 saat petrol eteri ile sifon yapılarak darası alınmış balonlara ekstakte edilmiştir. Yağ ile karışık olan petrol eteri vakum altında döner buharlaştırıcıda ayrıldıktan sonra balonlar etüvde kurutulmuş ve ham yağ yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.4.2.4. Ham kül tayini

Sabit tartıma getirilmiş krozeler içerisine tartılan örnekler 550±5' °C'deki kül fırınında beyaz kül haline gelinceye kadar bekletilmiştir. Kül fırınından çıkarılan krozeler desikatörde soğutulduktan sonra tartımları yapılmış ve sonuçlar % kül miktarı olarak belirlenmiştir

3.4.3. Mineral madde tayini

Biyokalsiyum tozlarında ve köfte örneklerinde kalsiyum (Ca), fosfor (P), sodyum (Na) ve potasyum (K) analiz edilmiştir. Örneklerde eş zamanlı çoklu element tayini için Thermo Scientific iCAP PRO ICP-OES sistemi kullanılmıştır. Teledyne CETAC ASX-280 otomatik örnekleyici ve Scott Spray Chamber kullanılmıştır. Gaz akış hızları (L min-1) ayarlanmıştır; Nebülizör gaz akışı: 0.91, Yardımcı gaz akışı:1.19, Plazma gaz akışı:18. Tüm kalibrasyon standart çözeltileri, 10 μg mL^{-1} çoklu element standart çözeltisinden (VHG Lab., Manchester, NH, ABD) %1 HNO_3 ile seyreltilmesi vasıtasıyla hazırlanmıştır. Tüm standartlar saflık sertifikası ile birlikte temin edilmiştir. Nitrik asit (HNO_3, Suprapure® sınıfı, %65) ve hidrojen peroksit (H_2O_2, %30) Merck'ten (Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır. Ultra saf su, Millipore ultra-pure su (25 °C'de 18.2 MΩ cm) saflaştırma sistemi (Bedford, ABD) ile üretilmiştir.

Eşzamanlı çoklu element tespiti için Scott Spray Chamber (Norwalk, CT, ABD) ile donatılmış ICP-MS sistemi kullanılmıştır. Enstrümantal analizden önce, cihaz 10 µg/L'lik çoklu element standart çözeltisi ile ayarlanmıştır. Örnekten 0.1 g tartılmış ve bir mikrodalga parçalama sisteminin (Milestone ETHOS EASY Microwave Digestion System, Bologna, İtalya) PTFE teflon kabına aktarılmıştır. Kaplara 4 mL konsantre HNO3 ve 1 mL H_2O_2 eklenmiş, daha sonra sıkıca kapatılmış ve mikrodalga sistemine yerleştirilmiştir. Mikrodalga fırın ısıtma programı üç ardışık adımda gerçekleştirilmiştir. İlk adımda, sıcaklık 5 dakika içinde doğrusal olarak 25 °C'den 170 °C'ye yükseltilmiştir. İkinci adımda, sıcaklık 15 dakika içinde doğrusal olarak 190 °C'ye yükseltildi ve son adımda sıcaklık 21 dakika içinde 50 °C'ye düşürüldü. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, elementlerine parçalanmış numuneler ultra saf su ile 25 mL nihai hacme seyreltilmiştir. Reaktif boşlukları her numune setinde olası girişimler için test edilmiştir ve analizler ICP-OES sistemi ile analiz edilmiştir.

3.4.4. Serbest amino asit kompozisyonu analizi

Serbest amino asit kompozisyonu biyokalsiyum tozlarında yapılmıştır. Numunelerde serbest amino asit (lisin, histidin, arginin, sistein, serin, glutamik asit, treonin, aspartik asit, prolin, valin, metiyonin, tirozin, izolösin, lösin, fenilalanin) miktarları analizi Kıvrak vd. (2017)'in belirttiği yönteme göre UPLC-MS/MS cihazı kullanılarak yapılmıştır. Bu yönteme göre, homojenize edilmiş 0.5 g numune, içerisinde %0.1 (v/v) formik asit bulunan 10 mL su:metanol (80:20) (v/v) çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Karışım 5 dakika vorteks ile karıştırıldıktan sonra 4 ºC'de 4000 rpm hızda 15 dakika santrifüj edilmiş, santrifüj işlemi sonrası elde edilen üst faz 0.2 µm PTFE membran filtreden geçirildikten sonra UHPLC-MS/MS cihazına enjekte edilmiştir. Analiz süresi toplam 7 dakikadır.

Serbest amino asit profil analizi ve tespiti Thermo Scientific Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific- TSQ Fortis (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA) sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırım için analitik kolon olarak Hypersil Gold RP C18 (1.9µm), 50x2.1 mm, (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA) UHPLC kolonu kullanılmıştır. Kolon: Hypersil GOLD RP C18 (1.9µm), 50x2.1 mm, Kolon fırın sıcaklığı: 40ºC, enjeksiyon hacmi: 10 µL, kapiler sıcaklığı: 270 ºC, buharlaştırma sıcaklığı 50 ºC.

3.4.5. Uçucu aroma bileşenleri analizi

Örneklerin aroma ve uçucu bileşenlerin miktar analizi GC-MS cihazı kullanılarak yapılmıştır. Kıvrak vd. yöntemine göre, homojenize edilen 0.5 g numune 10 mL aseton çözgeni ile ekstrakte edilmiş ve karışım 15 dakika Ultra-Turrax ile homojenize edildikten sonra 4000 rpm hızda 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen üst faz 0.22 µm PTFE membran filtreden geçirilmiş ve sonra aseton ile 2 mL hacimli viale 1/5 seyreltme yapılarak GC-MS cihazına enjekte edilmiştir. Analizler Thermo Scientific

Trace 1300 GC, Thermo Scientific- ISQ7000 single Quadrupole Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kromatografik değerlendirmeler Xcalibur yazılımı ile yapılmıştır. Kromatografik ayırım için analitik kolon olarak TraceGOLD TG-624SilMS GC (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA) UHPLC kolonu kullanılmıştır.

3.4.6. Renk ölçümü

Biyokalsiyum tozları ve köfte örneklerinde renk ölçümleri CR-400 Minolta Chroma Meter renk ölçüm cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin renk ölçümleri 5 tekrar yapılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama değerler şeklinde verilmiştir. Örneklerde L*: Aydınlık, parlaklık; a*; kırmızılık/yeşillik; b*: sarılık/mavilik değerlerini ifade etmektedir.

Beyazlık (whiteness) indeksi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Wijayanti vd. 2021a).

WI: Beyazlık (Whiteness) = $100 - ((100-L)^2 + a^2 + b^2)^{0.5}$

3.4.7. Tekstür ölçümü

Tekstür ölçümü köfte örneklerinde gerçekleştirilmiştir. Tekstür ölçümü TA.XT2 tekstür analiz cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tekstür profil analizi için 5kg'lık yük hücresine ve 5 mm çapındaki silindirik proba sahip TA.XT2 cihazı ürüne temas ettiği andan itibaren 5 mm/s hız ile %40 derinliğe daldırılarak iki ardışık sıkıştırma işlemi uygulanmıştır. Elde edilen verilerden örneklerin sertlik (hardness), esneklik (springiness), bağlılık (cohesiveness), sakızımsılık (gumminess), çiğnenebilirlik (chewiness) özellikleri değerlendirilmiştir. Tüm örneklerin tekstür ölçümleri 5 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.8. Duyusal analiz

Duyusal analiz için 10 kişilik bir panelist grubundan oluşan panel gerçekleştirilmiştir. Panelistler su ürünleri tüketim alışkanlığı olan kişiler arasından seçilmiştir. Panelistler örnekleri görünüş, koku, tekstür ve lezzet özellikleri yönünden değerlendirmişlerdir. Güvenlik endişesi nedeniyle lezzet özelliği ilk pişirildiği gün analiz edilmiştir. Tüm özellikler için elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır. Değerlendirmede 1-9 arası hedonik skala kullanılmıştır. Bu skalada 7-9 "çok iyi", 6.9-4 "iyi", 3.9-1.0 "kötü" olarak değerlendirilmiştir.

Kalitatif kalıntı analizleri

NaOH kalıntısı testi

NaOH kalıntısı varlığını test etmek için iki yöntem kullanıldı. Birincisinde fenolftaleyn testi uygulanmıştır. Suyla süspanse edilen örnek üzerine 1-2 damla fenolftaleyn

damlatılmıştır. Pembe renk oluşumu NaOH kalıntısı varlığını, renksizlik ise kalıntının olmadığını göstermektedir. Diğer testte ise süspanse örneğin pH derecesi bir pH-metre yardımı ile ölçülmüştür. pH 8-9 aralığı kalıntı varlığını göstermektedir (APHA 2017).

Klorür (Cl^-) kalıntısı testi

Klorür kalıntısı için gümüş nitrat ($AgNO_3$) testi uygulanmıştır. 1 g biyokalsiyum tozu üzerine 5-10 mL distile su eklenmiş homojen bir süspansiyon elde edilene kadar karıştırılmıştır. Hazırlanan süspansiyona 1-2 damla %1'lik gümüş nitrat çözeltisi ilave edilmiş ve hafifçe çalkalanmıştır. Pıhtıya benzer bir çökelek oluşursa kalıntı var, renk değişimi veya çözelti oluşmazsa kalıntı yok olarak değerlendirilmiştir (Harris 2010).

Ayrıca Klorür var/yok testi için bir diğer standart yöntem olan iyodometrik titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Reaksiyon, bir sodyum tiyosülfat çözeltisiyle etkileşime dayanmaktadır. Bu etkileşimde klor, potasyum iyodür ile reaksiyona girer ve bir nişasta indikatörü eklenerek bir nişasta-iyodür kompleksi oluşturulur. Bu kompleks, mavi renkli nişasta-iyodür kompleksinin kaybolduğu son noktaya kadar titre edilir (Harp 1995).

Etanol kalıntısı testi

Biyokalsiyum tozu süspansiyonuna 1-2 damla kromik asit çözeltisi ilave edilmiş renk değişmezse etanol kalıntısı yok, yeşilimsi kahverengine dönerse kalıntı var olarak değerlendirilmiştir (Vogel 1989).

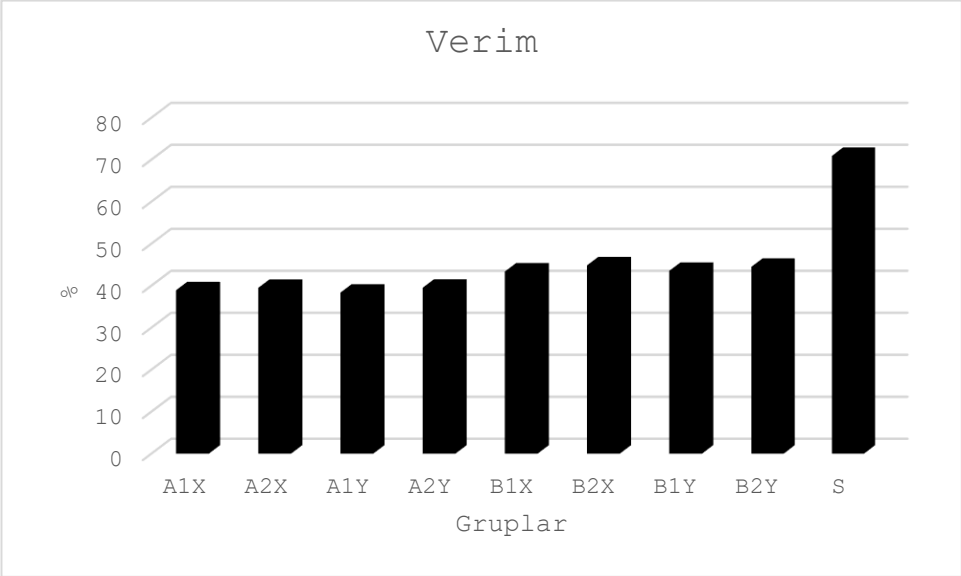
İstatistik Analiz

Denemeler iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Belirlenen deneme planından elde edilen sonuçlara varyans analizi uygulanmış, farklı çıkan uygulamalar Duncan çoklu karşılaştırma testlerine tabi tutulup, sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler için SAS yazılımı (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA) kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Biyokalsiyum tozu verimi bulguları

Farklı yöntemlerle üretilen biyokalsiyum tozlarının verim değerlendirme bulguları ve Şekil 4.1'de verilmiştir. Araştırmamızda en yüksek verim B2Y (%44.8) grubunda elde edilmiştir. Bu grup protein uzaklaştırmada NaOH + NaOCl, yağ uzaklaştırmada yüzey aktif madde ve ağartmada da NaOCl kullanıldığı gruptur. En düşük verim, A1Y (%38.3) grubunda gözlenmiştir. Su ile ekstraksiyon yapılan grup (S) ise alkali ekstraksiyonlu gruplardan önemli derecede yüksek verim elde edilmiştir. Bu da bize su ile ekstraksiyonda organik maddelerin (protein ve yağ) bu yöntemle yeterince uzaklaştırılmadığını göstermiştir. Protein uzaklaştırmada NaOH + NaOCl kullanılan B gruplarında yalnızca NaOH kullanılan A gruplarına göre daha yüksek verim elde edilmiştir. Bu durum protein uzaklaştırmada NaOH + NaOCl kullanımının daha etkili olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.1. Biyokalsiyum tozlarının verim analiz bulguları

4.2. Kimyasal kompozisyon analizleri bulguları

Biyokalsiyum tozlarının nem, ham protein, ham yağ ve ham kül analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. Nem tayini bulguları

Farklı yöntemlerle üretilen biyokalsiyum tozlarının nem analiz bulguları Çizelge 4.1. ve Şekil 4.2'de, varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.2'de verilmiştir. Veriler incelendiğinde biyokalsiyum tozlarının nem içeriğinin oldukça düşük olduğu görülmüştür. Biyokalsiyum üretim yöntemi nem içeriğini önemli derecede ($p<0.05$) etkilemiştir. Biyokalsiyum grupları ile karşılaştırıldığında ham kemiklerin nem içeriğinin biyokalsiyum tozlarından daha yüksek ($p<0.05$) olduğu saptanmıştır. Biyokalsiyum grupları arasında en yüksek ($p<0.05$) nem içeriği suda ekstraksiyonla elde edilen grupta

belirlenmiştir. Alkali ekstraksiyon yapılan gruplar arasında ise en yüksek ($p<0.05$) nem içeriği B2X grubunda, en düşük nem içeriği ise B1X grubunda bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Biyokalsiyum tozlarının nem içerikleri[1]

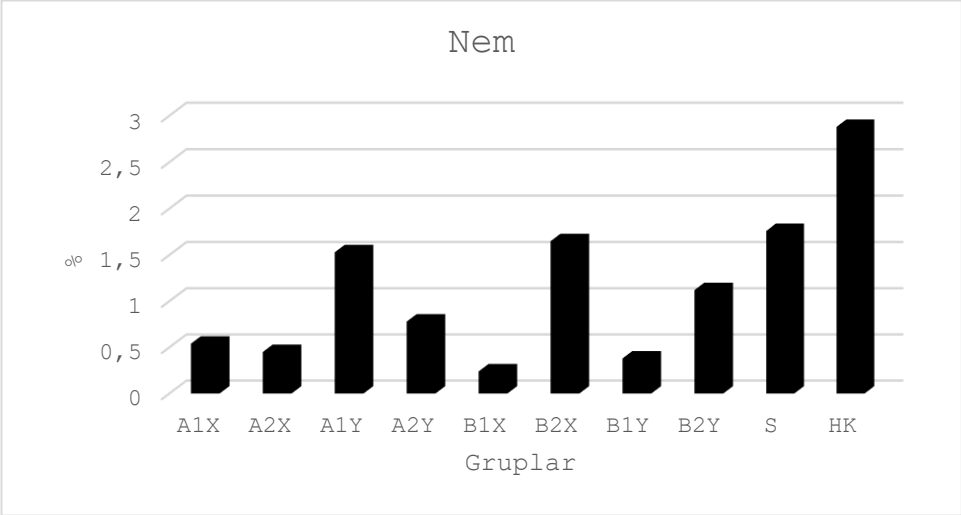
Gruplar[2]	Nem (%)
A1X	0.54 ± 0.06c
A2X	0.45 ± 0.13c
A1Y	1.53 ± 0.67b
A2Y	0.78 ± 0.15bc
B1X	0.24 ± 0.07c
B2X	1.65 ± 0.007b
B1Y	0.38 ± 0.26c
B2Y	1.12 ± 0.01bc
S	1.76 ± 0.07b
HK	2.88 ± 0.27a

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2]A1X=NaOH-Etanol-H_2O_2, A2X=NaOH-yüzey aktif-H_2O_2, [2]A1Y=NaOH-Etanol-NaOCl, A2Y=NaOH-Yüzey aktif -NaOCl, B1X=NaOH + NaOCl-Etanol-H_2O_2, B2X=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-H_2O_2, B1Y=NaOH + NaOCl-Etanol-NaOCl, B2Y=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-NaOCl, S=Suda kaynatma, RB=Ham kemik

Çizelge 4.2. Biyokalsiyum tozlarının nem analiz sonuçlarına ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	9	1.37094134	8.08	0.0015
Gruplar içi	10	0.16971545		
Toplam	19			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.2. Biyokalsiyum tozlarının nem içerikleri

4.2.2. Ham protein analiz bulguları

Farklı yöntemlerle üretilen biyokalsiyum tozlarının ham protein analiz bulguları Çizelge 4.3. ve Şekil 4.3'te, varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.4'te verilmiştir. Çalışmamızda ham kılçığın protein içeriği %27.56 bulunurken, biyokalsiyum üretiminden sonra protein içeriğinde önemli ($p<0.05$) azalma gözlenmiştir. En yüksek protein içeriği (%11.03) suda kaynatma yöntemi ile elde edilen biyokalsiyum tozunda belirlenmiştir. Alkali yöntem kullanıldığında protein içeriğinde önemli bir azalma gözlenmiştir. Alkali ekstraksiyon uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte nispi olarak en düşük protein içeriği B1X'te (%0.26) en yüksek ise B2Y'de (1.49) bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Biyokalsiyum tozlarının protein analiz sonuçları[1]

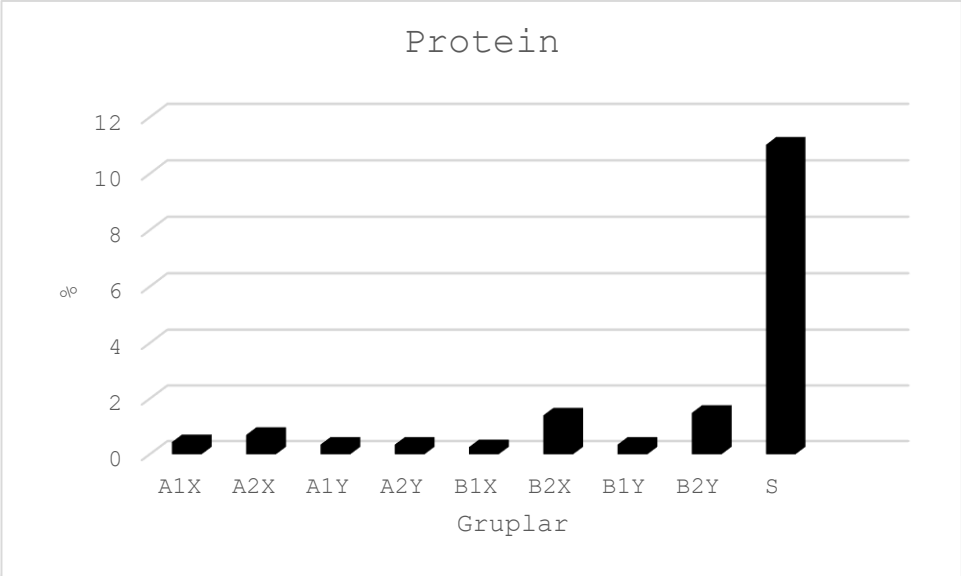
Gruplar[2]	Protein (%)
A1X	0.44 ± 0.14c
A2X	0.35 ± 0.19c
A1Y	0.71 ± 0.11c
A2Y	0.35± 0.12c
B1X	0.26 ± 0.14c
B2X	0.35 ± 0.12c
B1Y	1.42 ± 0.12c
B2Y	1.49 ± 0.14c
S	11.03 ± 2.74b
HK	27.56 ± 3.29a

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2]A1X=NaOH-Etanol-H_2O_2, A2X=NaOH-yüzey aktif-H_2O_2, [2]A1Y=NaOH-Etanol-NaOCl, A2Y=NaOH-Yüzey aktif -NaOCl, B1X=NaOH + NaOCl-Etanol-H_2O_2, B2X=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-H_2O_2, B1Y=NaOH + NaOCl-Etanol-NaOCl, B2Y=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-NaOCl, S=Suda kaynatma, RB=Ham kemik

Çizelge 4.4. Biyokalsiyum tozlarının protein içeriklerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	9	154.147767	83.12	<.0001
Gruplar içi	10	1.854490		
Toplam	19			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.3. Biyokalsiyum tozlarının protein analiz sonuçları

4.2.3. Ham yağ analiz bulguları

Farklı yöntemlerle üretilen biyokalsiyum tozlarının ham yağ analiz bulguları Çizelge 4.5. ve Şekil 4.4'te, varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.6'da verilmiştir. Tüm gruplarda önemsenmeyecek düzeyde (%0.26-0.44) yağ içeriği tespit edilmiştir. Ham kemik yağ oranı da %1.09 olarak saptanmıştır. En yüksek yağ içeriği suda ekstrakte edilen biyokalsiyum tozunda saptanmıştır. Alkali yöntemle elde edilen biyokalsiyum tozlarının yağ içerikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte nispi olarak en düşük yağ içeriği B1Y grubunda en yüksek yağ içeriği B2Y grubunda bulunmuştur.

Çizelge 4.5. Biyokalsiyum tozlarının ham yağ analiz sonuçları[1]

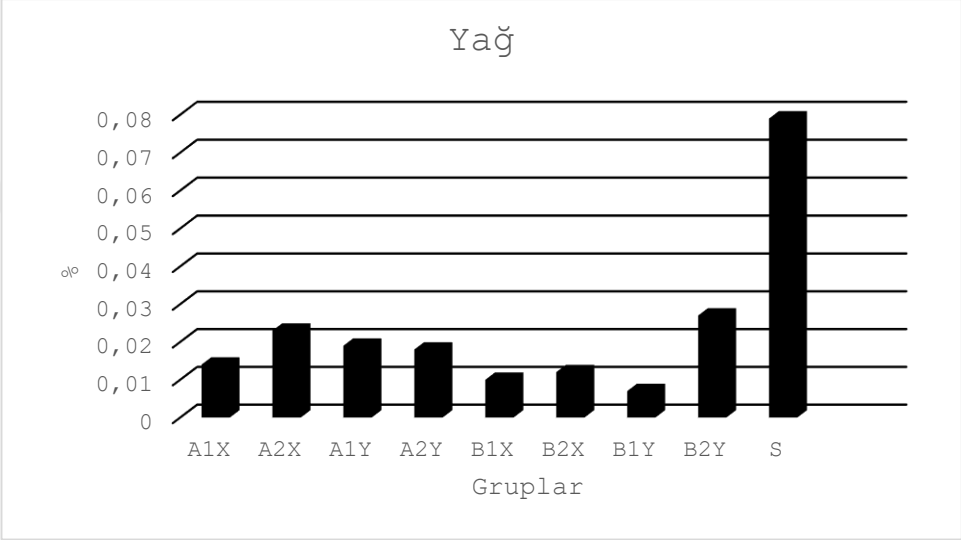
Gruplar[2]	Yağ (%)
A1X	0.01 ± 0.014c
A2X	0.023 ± 0.009c
A1Y	0.019 ± 0.004c
A2Y	0.018± 0.008c
B1X	0.01 ± 0.001c
B2X	0.012 ± 0.002c
B1Y	0.007 ± 0.0007c
B2Y	0.027 ± 0.009c
S	0.079 ± 0.001b
HK	1.09 ± 0.05a

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2]A1X=NaOH-Etanol-H_2O_2, A2X=NaOH-yüzey aktif-H_2O_2, [2]A1Y=NaOH-Etanol-NaOCl, A2Y=NaOH-Yüzey aktif -NaOCl, B1X=NaOH + NaOCl-Etanol-H_2O_2, B2X=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-H_2O_2, B1Y=NaOH + NaOCl-Etanol-NaOCl, B2Y=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-NaOCl, S=Suda kaynatma, RB=Ham kemik

Çizelge 4.6. Biyokalsiyum tozlarının ham yağ içeriklerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	9	0.22845176	635.65	<.0001
Gruplar içi	10	0.00035940		
Toplam	19			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.4. Biyokalsiyum tozlarının yağ analiz sonuçları

4.2.4. Ham kül analiz bulguları

Farklı yöntemlerle üretilen biyokalsiyum tozlarının ham kül analiz bulguları Çizelge 4.7. ve Şekil 4.5'te, varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.8'de verilmiştir. Çalışmamızda ham balık kemiğinde kül miktarı %34.26 olarak belirlenirken, suda ekstrakte edilmiş biyokalsiyum tozunda %78.99, alkali ekstraksiyon ile elde edilmiş tozların kül içerikleri %86.98 ile %88.46 arasında değişmiştir. Alkali ekstraksiyon ile elde edilen biyokalsiyum tozlarının kül içerikleri arasında anlamlı bir fark ($p>0.05$) bulunmamıştır. Ancak alkali ekstraksiyon ürünlerin kül içerikleri suda ekstrakte edilenlerden yüksek ($p<0.05$) bulunmuştur. Bu bulgular ham kemiğin biyokalsiyuma dönüşmesinin mineral içeriğinde önemli artışa neden olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.7. Biyokalsiyum tozlarının ham kül analiz sonuçları[1]

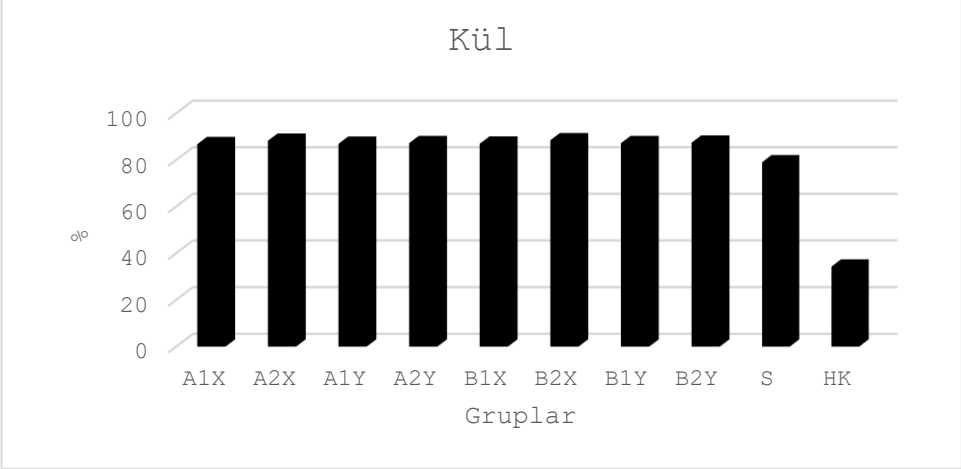
Gruplar[2]	Kül (%)
A1X	86.78 ± 0.87c
A2X	86.95 ± 0.32c
A1Y	86.95 ± 0.32c
A2Y	87.23± 0.23c
B1X	86.98 ± 0.38c
B2X	88.45 ± 0.23c
B1Y	87.21 ± 0.39c
B2Y	87.42 ± 1.31c
S	78.99 ± 0.72a
HK	34.26 ± 0.81b

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2]A1X=NaOH-Etanol-H_2O_2, A2X=NaOH-yüzey aktif-H_2O_2, [2]A1Y=NaOH-Etanol-NaOCl, A2Y=NaOH-Yüzey aktif -NaOCl, B1X=NaOH + NaOCl-Etanol-H_2O_2, B2X=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-H_2O_2, B1Y=NaOH + NaOCl-Etanol-NaOCl, B2Y=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-NaOCl, S=Suda kaynatma, RB=Ham kemik

Çizelge 4.8. Biyokalsiyum tozlarının kül içeriklerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	9	559.727072	1125.19	<.0001
Gruplar içi	10	0.497452		
Toplam	19			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.5. Biyokalsiyum tozlarının kül analiz sonuçları

4.3. Mineral madde (Ca ve P) analiz bulguları

4.3.1. Kalsiyum bulguları

Farklı yöntemlerle üretilen biyokalsiyum tozlarının kalsiyum analiz bulguları Çizelge 4.9. ve Şekil 4.6'da varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.10'da verilmiştir. Ham kemikteki Ca içeriği %35.61 olarak belirlenmiştir. Biyokalsiyum üretim yöntemi kalsiyum içeriklerini önemli ölçüde ($p<0.05$) etkilemiştir. Biyokalsiyum tozlarının kalsiyum içerikleri ise %36.28-%38.78 arasında değişmiştir. Suda ekstrakte edilen biyokalsiyum tozunun Ca içeriği (%35.95) alkali ekstraksiyonla elde edilenlerden düşük ($p<0.05$) bulunmuştur. En yüksek Ca içeriği B1Y (%38.78) grubunda en düşük Ca içeriği ise A2Y (%36.28) grubunda saptanmıştır.

Çizelge 4.9. Biyokalsiyum tozlarının kalsiyum analiz sonuçları[1]

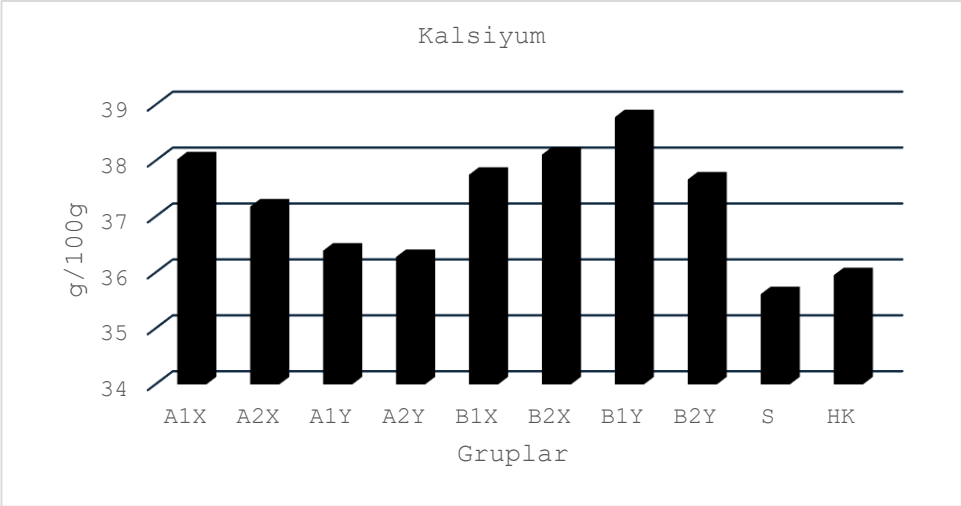
Gruplar[2]	Kalsiyum (a) (g/100g)
A1X	38.02 ± 0.01b
A2X	37.18 ± 0.30c
A1Y	36.39 ± 0.25d
A2Y	36.28± 0.02d
B1X	37.75 ± 0.09bc
B2X	38.11 ± 0.04b
B1Y	38.78 ± 0.14a
B2Y	37.67 ± 0.09bc
S	35.61 ± 0.08f
HK	35.95 ± 0.09de

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2]A1X=NaOH-Etanol-H_2O_2, A2X=NaOH-yüzey aktif-H_2O_2, [2]A1Y=NaOH-Etanol-NaOCl, A2Y=NaOH-Yüzey aktif -NaOCl, B1X=NaOH + NaOCl-Etanol-H_2O_2, B2X=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-H_2O_2, B1Y=NaOH + NaOCl-Etanol-NaOCl, B2Y=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-NaOCl, S=Suda kaynatma, RB=Ham kemik

Çizelge 4.10. Biyokalsiyum tozlarının kalsiyum analiz sonuçlarına ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr> F
Gruplar arası	9	2.43228667	32.24	<.0001
Gruplar içi	10	0.07544000		
Toplam	19			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.6. Biyokalsiyum tozlarının kalsiyum analiz sonuçları

4.3.2. Fosfor bulguları

Farklı yöntemlerle üretilen biyokalsiyum tozlarının fosfor analiz bulguları Çizelge 4.11 ve Şekil 4.7'de varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.12'de verilmiştir. Çalışmamızda ham kemikteki P oranı 25.73 g/100g olarak belirlenen fosfor içerikleri biyokalsiyum tozlarında 26.95-28.36 g/100g arasında belirlenmiştir. Ham kemik biyokalsiyuma dönüşünce fosfor oranı artmıştır. Su ile ekstrakte edilen S grubunun P içeriği alkali ekstraksiyonla elde edilen biyokalsiyum tozlarından düşük bulunmuştur. Alkali ekstraksiyonla elde edilen biyokalsiyum tozları arasında en yüksek P içeren grup A2Y olurken en düşük P içeren grup B1Y olmuştur. Biyokalsiyum tozlarının Ca/P oranları ise 1.22-1.40 arasında bulunmuştur (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.8). En yüksek Ca / P oranı B1Y grubunda, en düşük ise B2Y grubunda saptanmıştır.

Çizelge 4.11. Biyokalsiyum tozlarının fosfor analiz sonuçları[1]

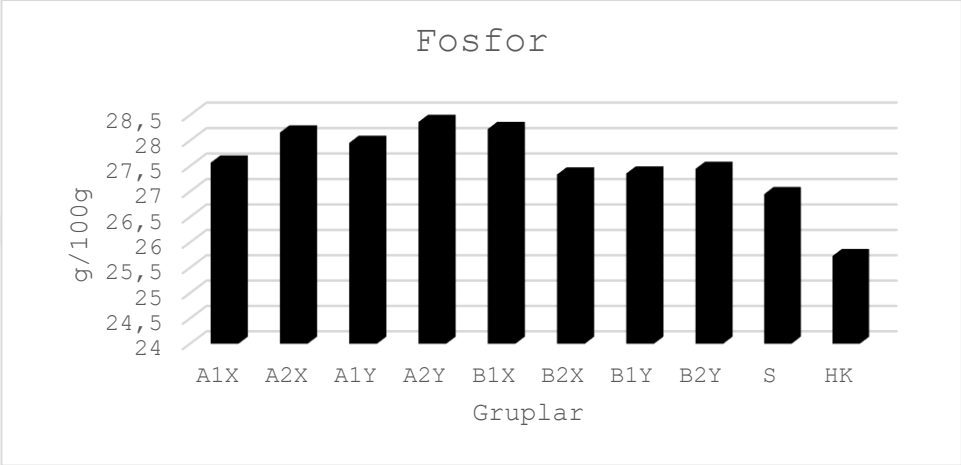
Gruplar[2]	Fosfor (P) (g/100g)
A1X	27.57 ± 0.07bc
A2X	28.16 ± 0.01a
A1Y	27.95 ± 0.02ab
A2Y	28.36 ± 0.24a
B1X	28.23 ± 0.04a
B2X	27.35 ± 0.08cd
B1Y	27.34 ± 0.14cd
B2Y	27.45 ± 0.14c
S	26.95 ± 0.12d
HK	25.73 ± 0.03e

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2]A1X=NaOH-Etanol-H_2O_2, A2X=NaOH-yüzey aktif-H_2O_2, [2]A1Y=NaOH-Etanol-NaOCl, A2Y=NaOH-Yüzey aktif -NaOCl, B1X=NaOH + NaOCl-Etanol-H_2O_2, B2X=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-H_2O_2, B1Y=NaOH + NaOCl-Etanol-NaOCl, B2Y=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-NaOCl, S=Suda kaynatma, RB=Ham kemik

Çizelge 4.12. Biyokalsiyum tozlarının fosfor analiz sonuçlarına ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	9	1.20015333	39.38	<.0001
Gruplar içi	10	0.03048000		
Toplam	19			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

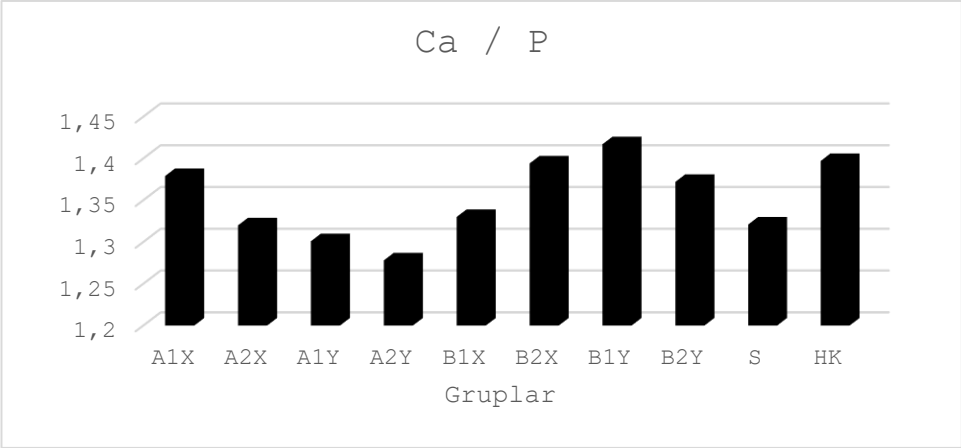


Şekil 4.7. Biyokalsiyum tozlarının fosfor analiz sonuçları

Çizelge 4.13. Biyokalsiyum tozlarının Ca/P oranları[1]

Gruplar[2]	Ca / P
A1X	1.38
A2X	1.32
A1Y	1.30
A2Y	1.28
B1X	1.33
B2X	1.39
B1Y	1.41
B2Y	1.37
S	1.32
HK	1.39

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2]A1X=NaOH-Etanol-H_2O_2, A2X=NaOH-yüzey aktif-H_2O_2, [2]A1Y=NaOH-Etanol-NaOCl, A2Y=NaOH-Yüzey aktif -NaOCl, B1X=NaOH + NaOCl-Etanol-H_2O_2, B2X=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-H_2O_2, B1Y=NaOH + NaOCl-Etanol-NaOCl, B2Y=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-NaOCl, S=Suda kaynatma, RB=Ham kemik



Şekil 4.8. Biyokalsiyum tozlarının Ca/P oranları

4.4. Amino asit kompozisyonu analizi bulguları

Biyokalsiyum tozlarının amino asit kompozisyonu analiz bulguları Çizelge 4.14'te ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Biyokalsiyum tozlarının amino asit kompozisyonu incelendiğinde toplam 17 amino asidin belirlendiği görülmektedir. Bunlar alanin, glisin, treonin, lisin, arginin, histidin, aspartik asit, glutamik asit, serin, prolin, hidroksiprolin, valin, metiyonin, tirozin, lösin, izolösin ve fenilalanin amino asitleridir. Alkali ekstraksiyonla elde edilen örneklerin amino asit içerikleri ham kemiktekinden yüksek bulunmuştur. Örneklerin hepsinde başlıca amino asit glisin olarak belirlenmiştir. Tirozin, aspartik asit, histidin ve izolösin en düşük oranda bulunan amino asitler olmuştur. Sistin ise hiçbir örnekte saptanmamıştır. Glisinden sonra en fazla bulunan amino asitler alanin, glutamik asit, prolin ve hidroksiprolin olmuştur. Hidroksiprolin en yüksek B1X ve B2X gruplarında belirlenmiş olup en düşük A2Y grubunda belirlenmiştir. Ham kemik örneğinde ise hidroksiprolin içeriği diğer gruplardan düşük bulunmuştur. Toplam esansiyel amino asit içeriği bakımından en yüksek olan grup A2Y ve B1Y olmuştur.

Çizelge 4.14. Biyokalsiyum tozlarının amino asit kompozisyonu analiz sonuçları (mg/g)

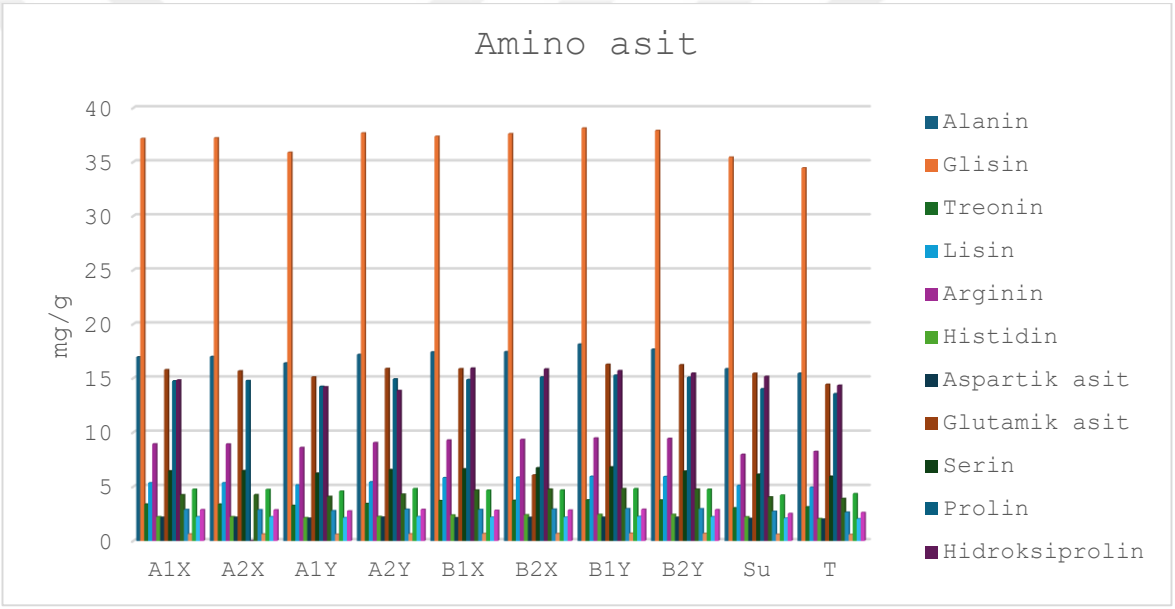
	A1X	A2X	A1Y	A2Y	B1X	B2X	B1Y	B2Y	S	HK
Alanin	16.95	16.99	16.39	17.18	17.41	17.43	18.13	17.66	15.86	15.43
Glisin	37.16	37.22	35.88	37.67	37.36	37.60	38.12	37.90	3.54	33.44
Treonin	3.37	3.37	3.25	3.42	3.69	3.71	3.77	3.74	3.03	3.12
Lisin	5.34	5.34	5.14	5.42	5.81	5.85	5.93	5.91	5.09	4.93
Arginin	8.92	8.91	8.58	9.04	9.27	9.33	9.46	9.42	7.95	8.22
Histidin	2.21	2.21	2.13	2.23	2.36	2.39	2.42	2.42	2.10	2.03
Aspartik asit	2.16	2.15	2.07	2.17	2.11	2.14	2.16	2.16	2.03	1.98
Glutamik asit	15.75	15.65	15.09	15.88	15.86	16.06	16.22	16.22	15.44	14.41
Serin	6.43	6.45	6.22	6.55	6.62	6.72	6.71	6.71	6.12	5.93
Prolin	14.73	14.76	14.22	14.93	14.86	15.09	15.07	15.07	14.00	1.55
Hidroksiprolin	14.81	14.49	14.18	13.84	15.91	15.83	15.67	15.44	15.04	14.32
Valin	4.23	4.24	4.08	4.29	4.66	4.75	4.80	4.74	4.02	3.89
Metiyonin	2.87	2.85	2.75	2.89	2.87	2.91	2.94	2.93	2.71	2.63
Tirozin	0.62	0.63	0.60	0.63	0.66	0.66	0.68	0.67	0.59	0.57
Lösin	4.74	4.72	4.56	4.80	4.65	4.66	4.79	4.74	4.20	4.33
İzolösin	2.21	2.21	2.12	2.23	2.17	2.17	2.24	2.21	2.08	2.02
Fenilalanin	2.86	2.85	2.74	2.88	2.80	2.82	2.89	2.86	2.51	2.60

A1X=NaOH-Etanol-H_2O_2, A2X=NaOH-yüzey aktif-H_2O_2, A1Y=NaOH-Etanol-NaOCl, A2Y=NaOH-Yüzey aktif -NaOCl, B1X=NaOH + NaOCl-Etanol-H_2O_2, B2X=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-H_2O_2, B1Y=NaOH + NaOCl-Etanol-NaOCl, B2Y=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-NaOCl, S=Suda kaynatma, RB=Ham kemik

Çizelge 4.15. Biyokalsiyum tozlarının esansiyel amino asit içerikleri

	A1X	A2X	A1Y	A2Y	B1X	B2X	B1Y	B2Y	S	HK
Treonin	3.37	3.37	3.25	3.42	3.69	3.71	3.77	3.74	3.03	3.12
Lisin	5.34	5.34	5.14	5.42	5.81	5.85	5.93	5.91	5.09	4.93
Histidin	2.21	2.21	2.13	2.23	2.36	2.39	2.42	2.42	2.10	2.03
Valin	4.23	4.24	4.08	4.29	4.66	4.75	4.80	4.74	4.02	3.89
Metiyonin	2.87	2.85	2.75	2.89	2.87	2.91	2.94	2.93	2.71	2.63
Tirozin	0.62	0.63	0.60	0.63	0.66	0.66	0.68	0.67	0.59	0.57
Lösin	4.74	4.72	4.56	4.80	4.65	4.66	4.79	4.74	4.20	4.33
İzolösin	2.21	2.21	2.12	2.23	2.17	2.17	2.24	2.21	2.08	2.02
Fenilalanin	2.86	2.85	2.74	2.88	2.80	2.82	2.89	2.86	2.51	2.60
Toplam	**28.45**	**28.42**	**27.37**	**30.79**	**29.67**	**29.92**	**30.46**	**30.22**	**26.33**	**26.12**

A1X=NaOH-Etanol-H_2O_2, A2X=NaOH-yüzey aktif-H_2O_2, A1Y=NaOH-Etanol-NaOCl, A2Y=NaOH-Yüzey aktif -NaOCl, B1X=NaOH + NaOCl-Etanol-H_2O_2, B2X=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-H_2O_2, B1Y=NaOH + NaOCl-Etanol-NaOCl, B2Y=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-NaOCl, S=Suda kaynatma, RB=Ham kemik



Şekil 4.9. Biyokalsiyum tozlarının esansiyel amino asit içerikleri

4.5. Renk ölçüm sonuçları

4.5.1. L* değeri bulguları

Farklı yöntemlerle üretilen biyokalsiyum tozlarının L* değeri bulguları Çizelge 4.16 ve Şekil 4.10'da varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.17'de verilmiştir. Biyokalsiyum tozu örneklerinin L* değerleri incelendiğinde tüm örneklerin L* değerlerinin 85–96 aralığında yer aldığı ve ürünlerin genel olarak yüksek parlaklığa ve açık renge sahip olduğu görülmektedir. En yüksek L* değerine sahip olan örnek suda ekstrakte edilen grup olmuştur. Bu grup istatistiksel olarak diğer örneklerden anlamlı şekilde ayrılmış olup, biyokalsiyum tozu içerisinde en açık renkli ve en yüksek beyazlık düzeyine sahip örnek olarak dikkat çekmiştir. Bunu A2Y takip etmiş, bu örnek de yüksek L* değeriyle nispeten daha parlak ve açık tonlu yapısını ortaya koymuştur (Şekil 4.11.).

Çizelge 4.16. Biyokalsiyum tozlarının L* değerleri[1]

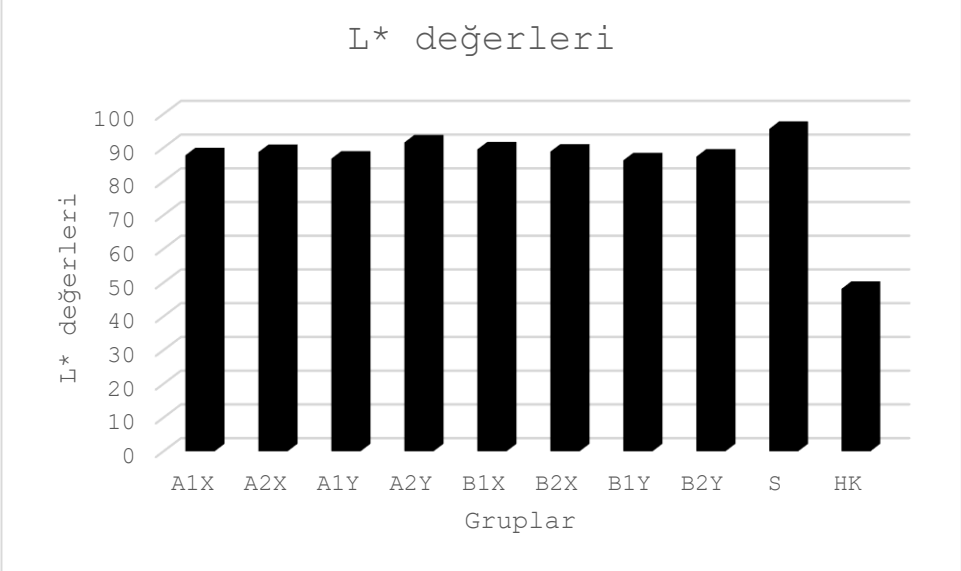
Gruplar[2]	L* değeri
A1X	87.75 ± 0.29cd
A2X	88.70 ± 0.14cd
A1Y	86.77 ± 1.07cd
A2Y	91.55 ± 1.21b
B1X	89.49 ± 0.29bc
B2X	88.83 ± 2.07cd
B1Y	86.25 ± 1.95d
B2Y	87.36 ± 0.80cd
S	95.58 ± 2.59a

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2]A1X=NaOH-Etanol-H_2O_2, A2X=NaOH-yüzey aktif-H_2O_2, [2]A1Y=NaOH-Etanol-NaOCl, A2Y=NaOH-Yüzey aktif -NaOCl, B1X=NaOH + NaOCl-Etanol-H_2O_2, B2X=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-H_2O_2, B1Y=NaOH + NaOCl-Etanol-NaOCl, B2Y=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-NaOCl, S=Suda kaynatma, RB=Ham kemik

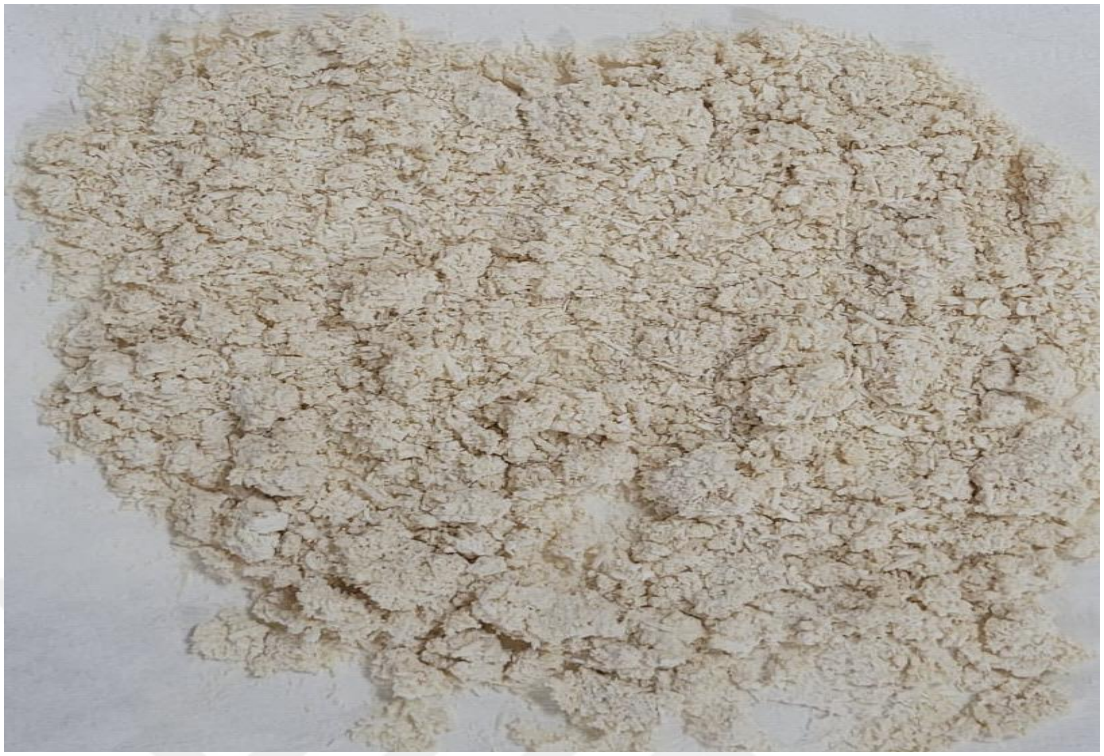
Çizelge 4.17. Biyokalsiyum tozlarının L* değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	9	25.0157593	12.30	<.0001
Gruplar içi	10	2.0335889		
Toplam	19			

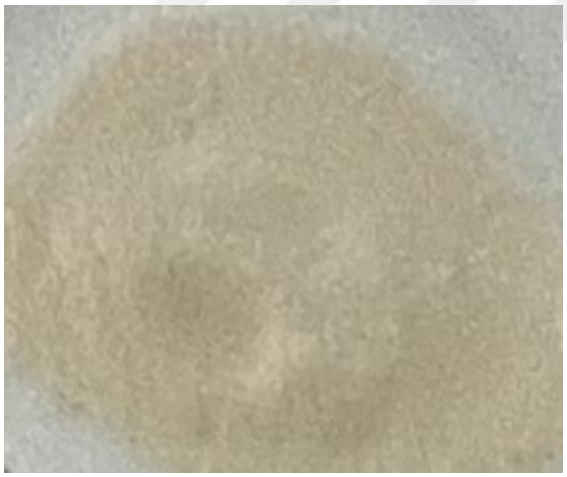
SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



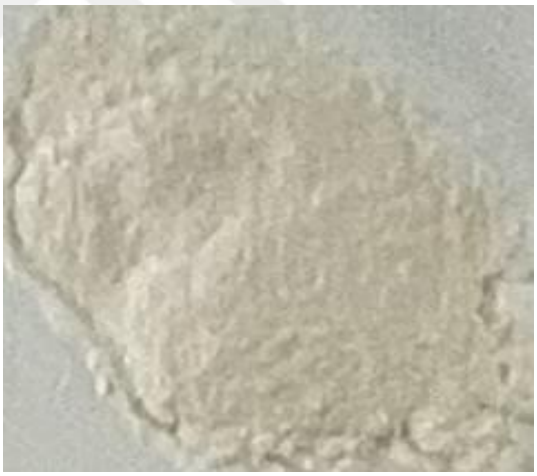
Şekil 4.10. Biyokalsiyum tozlarının L* değeri bulguları



A1



A1X

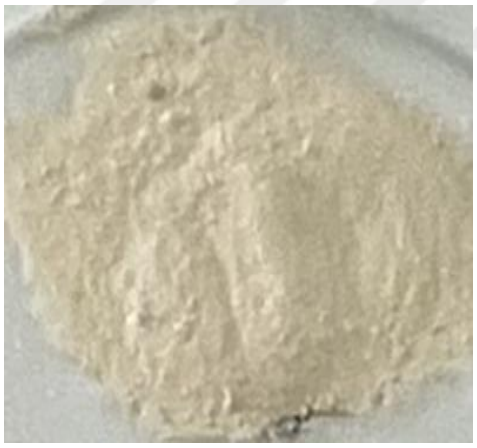


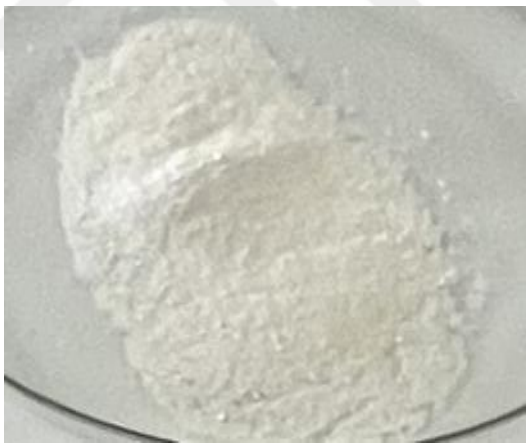
A1Y

Şekil 4.11. Biyokalsiyum tozunun NaOH ve Etanol kullanımı ile protein ve yağ giderme işlemi sonrası (A1) ve H_2O_2 (A1X) ve NaOCl (A1Y) ile ağartma sonrası görüntüleri



A2



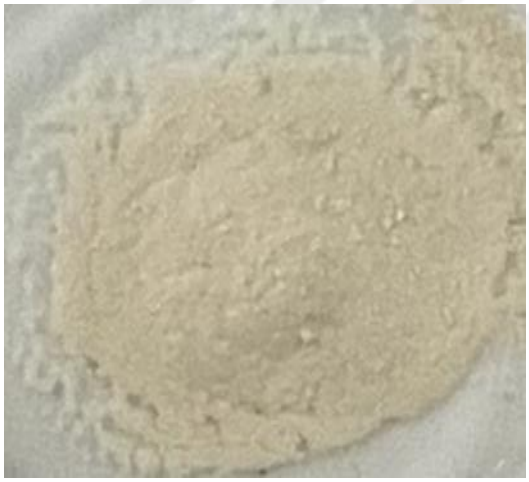


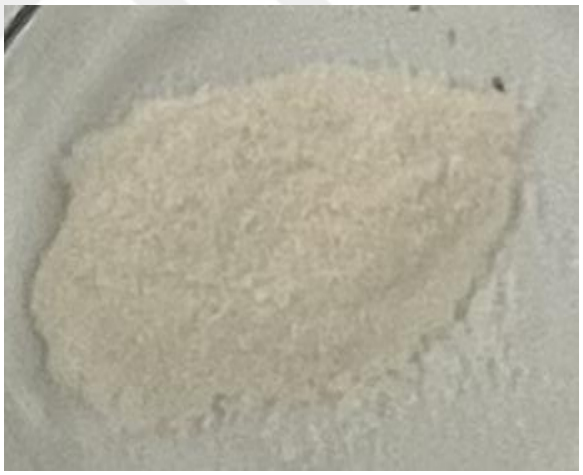
(A2X) (A2Y)

Şekil 4.12. Biyokalsiyum tozunun NaOH ve Polisorbat 80 kullanımı ile protein ve yağ giderme işlemi sonrası (A2) ve H_2O_2 (A2X) ve NaOCl (A2Y) ile ağartma sonrası görüntüleri



(B1)





(B1X) (B1Y)

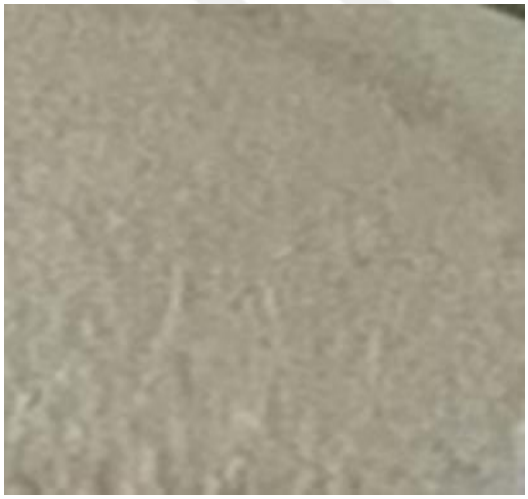
Şekil 4.13. Biyokalsiyum tozunun NaOH + NaOCl + Etanol kullanımı ile protein ve yağ giderme işlemi sonrası (B1) ve H_2O_2 (B1X) ve NaOCl (B1Y) ile ağartma sonrası görüntüleri



(B2)



(B2X)



(B2Y)

Şekil 4.14. Biyokalsiyum tozunun NaOH + NaOCl + Polisorbat 80 kullanımı ile protein ve yağ giderme işlemi sonrası (B2) ve H_2O_2 (B2X) ve NaOCl (B2Y) ile ağartma sonrası görüntüleri



Şekil 4.15. Üretimi tamamlanmış tüm biyokalsiyum tozlarının görünüşleri

4.5.2. a* değeri bulguları

Farklı yöntemlerle üretilen biyokalsiyum tozlarının a* değeri bulguları Çizelge 4.18 ve Şekil 4.12'de, varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.19'da verilmiştir. Bu çalışmada incelenen örneklere ait a* değerleri -1.41 ile 0.09 arasında değişmiş ve örnekler arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunduğu belirlenmiştir. Pozitif a* değerleri kırmızı tonlarını, negatif a* değerleri ise yeşil tonlarını ifade ettiğinden, elde edilen sonuçlar renk yapısının örnekler arasında önemli ölçüde değiştiğini göstermektedir.

En yüksek a* değerleri B2Y ve A1X gruplarında belirlenmiş olup bu gruptaki örnekler istatistiksel olarak benzer özellik göstermiştir. Bu iki örneğin pozitif a* değerleri, diğer gruplara kıyasla daha kırmızımsı bir renk tonuna sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Buna karşılık, en düşük a* değeri olan A2Y grubu, tüm örneklerden istatistiksel olarak ayrılmış olup belirgin şekilde daha yeşilimsi bir ton göstermiştir. Orta seviyelerde yer alan B2X, B1X, A2X, A1Y grupları hafif derecede yeşilimsi tonlar göstermiştir. Bu gruplar kendi içlerinde bazı benzerlikler taşısa da hem yüksek a* değerlerine sahip kırmızı tonlu gruplardan hem de en düşük a* değerine sahip örnekten istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Bu durum, renk parametresinin her bir örnekte farklı şekilde etkilendiğini ve pigment yapısının homojen olmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.18. Biyokalsiyum tozlarının a* değeri bulguları[1]

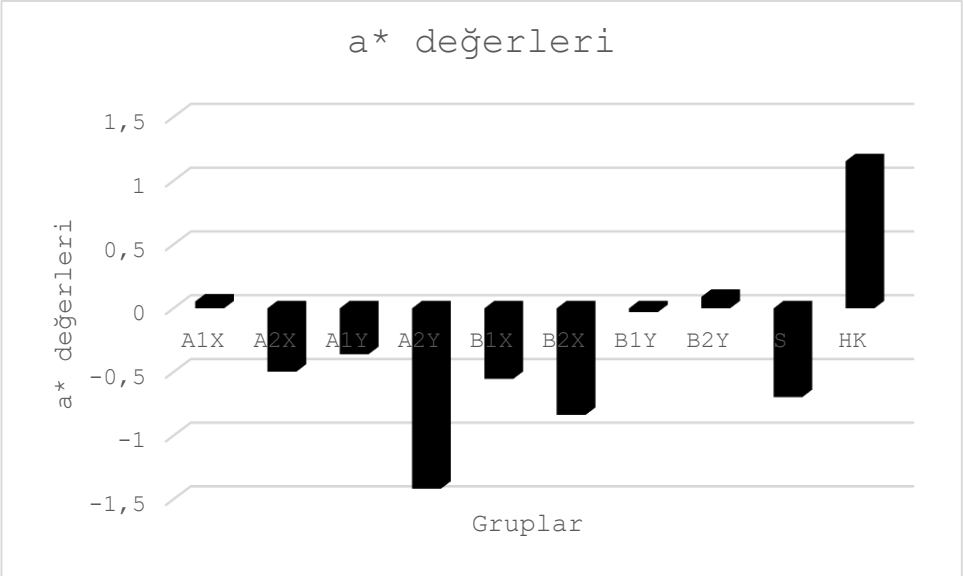
Gruplar[2]	a* değeri
A1X	0.053 ± 0.14a
A2X	-0.49 ± 0.30bc
A1Y	-0.36 ± 0.13b
A2Y	-1.41 ± 0.06e
B1X	-0.55 ± 0.06bc
B2X	-0.83 ± 2.07d
B1Y	-0.03 ± 0.06a
B2Y	0.09 ± 0.01a
S	-0.69 ± 0.09cd

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2]A1X=NaOH-Etanol-H_2O_2, A2X=NaOH-yüzey aktif-H_2O_2, [2]A1Y=NaOH-Etanol-NaOCl, A2Y=NaOH-Yüzey aktif -NaOCl, B1X=NaOH + NaOCl-Etanol-H_2O_2, B2X=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-H_2O_2, B1Y=NaOH + NaOCl-Etanol-NaOCl, B2Y=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-NaOCl, S=Suda kaynatma, RB=Ham kemik

Çizelge 4.19. Biyokalsiyum tozlarının a* değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynakları	**SD**	**KO**	**F değeri**	**Pr > F**
Gruplar arası	9	0.70439815	34.36	<.0001
Gruplar içi	10	0.02050000		
Toplam	19			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.16. Biyokalsiyum tozlarının a* değeri bulguları

4.5.3. b* değeri bulguları

Farklı yöntemlerle üretilen biyokalsiyum tozlarının b* değeri bulguları Çizelge 4.20 ve Şekil 4.13'te, varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.21'de verilmiştir. En düşük b* değeri suda ekstrakte edilen grupta belirlenmiştir.

Bu çalışmada incelenen örneklerin b* değerleri 8.77 ile 27.08 arasında değişmiş olup, tüm örnekler arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunduğu belirlenmiştir. b* parametresi sarı (+) ve mavi (-) ekseni temsil ettiğinden, tüm örneklerin pozitif b* değerine sahip olması, ürünlerin genel olarak sarı ton baskınlığına sahip olduğunu göstermektedir. Ancak bu sarı tonunun şiddeti örnekler arasında önemli ölçüde değişmektedir. En yüksek b* değeri A1X grubu olarak belirlenmiş ve bu örnek diğer tüm örneklerden anlamlı şekilde ($p<0.05$) farklı bulunmuştur. Bu sonuç, söz konusu örneğin en yoğun sarı renk tonuna sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bunu takiben A1Y ve B1X değerine sahip örnekler orta düzeyde sarı tonunu temsil etmektedir. Bu örnekler istatistiki olarak birbirinden farklı olup sarı renk yoğunluğunun gruplar arasında kademeli olarak azaldığını göstermektedir. Daha düşük b* değerlerine sahip olan A2X, B2X ve B1Y grupları sarı tonunun belirgin şekilde azaldığını göstermiştir. En düşük b* değerlerine sahip olan A2Y, B2Y ve S örnekleri sarı tonunun en zayıf görüldüğü grupları oluşturmaktadır. Özellikle suda ekstrakte edilen biyokalsiyum tozunun tüm örneklerden istatistiksel olarak farklı ($p<0.05$) olup sarılık düzeyinin en düşük olduğu ve rengin daha nötr/beyaza yakın bir tona kaydığı örnek olmuştur.

Çizelge 4.20. Biyokalsiyum tozlarının b* değeri bulguları[1]

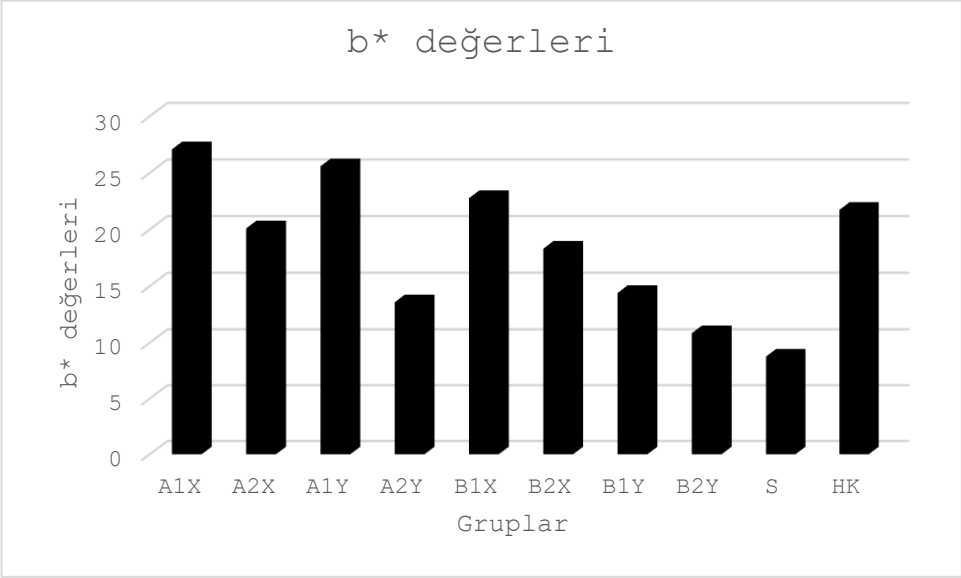
Gruplar[2]	b* değeri
A1X	27.08 ± 0.35a
A2X	20.11 ± 0.43d
A1Y	25.59 ± 0.50b
A2Y	13.58 ± 0.91f
B1X	22.78 ± 0.09c
B2X	18.31 ± 0.79e
B1Y	14.40 ± 0.48f
B2Y	10.85 ± 0.41g
S	8.77 ± 0.32h

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2]A1X=NaOH-Etanol-H_2O_2, A2X=NaOH-yüzey aktif-H_2O_2, [2]A1Y=NaOH-Etanol-NaOCl, A2Y=NaOH-Yüzey aktif -NaOCl, B1X=NaOH + NaOCl-Etanol-H_2O_2, B2X=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-H_2O_2, B1Y=NaOH + NaOCl-Etanol-NaOCl, B2Y=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-NaOCl, S=Suda kaynatma, RB=Ham kemik

Çizelge 4.21. Biyokalsiyum tozlarının b* değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	9	126.092862	441.60	<.0001
Gruplar içi	10	0.285537		
Toplam	19	126.092862		

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.17. Biyokalsiyum tozlarının b* değeri bulguları

4.5.4. Beyazlık (whiteness) indeksi bulguları

Beyazlık ölçüm bulguları Çizelge 4.22'de ve Şekil 4.14'te verilmiştir. Varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.23'te verilmiştir. Tüm gruplar içinde en yüksek beyazlık indeksine sahip grup suda ekstrakte edilen biyokalsiyum tozu olmuştur. Alkali ekstraksiyonlu gruplar arasında en yüksek beyazlık indeksi A2Y ve B2Y gruplarında saptanmıştır. Alkali ekstraksiyonlu gruplar arasında en yüksek beyazlık değeri A2Y grubunda en düşük değer A1X grubunda saptanmıştır (Şekil 4.15). Nitekim A2Y gruplar içinde en yüksek b* değerine sahip olup en düşük değer de B1X grubunda belirlenmiştir. Bu bulgular beyazlık bulgularını doğrulamaktadır.

Çizelge 4.22. Biyokalsiyum tozlarının beyazlık indeksi değerleri[1]

Gruplar[2]	**Beyazlık indeksi**
A1X	70.89 ± 1.91g
A2X	75.99 ± 0.63e
A1Y	71.77 ± 0.44g
A2Y	83.11 ± 0.75b
B1X	74.93 ± 0.13f
B2X	78.08 ± 0.99d
B1Y	79.16 ± 0.44c
B2Y	83.47 ± 0.39b
S	88.77 ± 0.42a

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2]A1X=NaOH-Etanol-H_2O_2, A2X=NaOH-yüzey aktif-H_2O_2, [2]A1Y=NaOH-Etanol-NaOCl, A2Y=NaOH-Yüzey aktif -NaOCl, B1X=NaOH + NaOCl-Etanol-H_2O_2, B2X=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-H_2O_2, B1Y=NaOH + NaOCl-Etanol-NaOCl, B2Y=NaOH + NaOCl-Yüzey aktif-NaOCl, S=Suda kaynatma, RB=Ham kemik

Çizelge 4.23. Biyokalsiyum tozlarının beyazlık indeksi değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynakları	**SD**	**KO**	**F değeri**	**Pr > F**
Gruplar arası	8	102.7500009	364.53	<.0001
Gruplar içi	18	0.2818667		
Toplam	26	102.7500009		

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



A2Y A1X

Şekil 4.18. Biyokalsiyum tozunun beyazlık indeksinin en yüksek (A2Y) ve en düşük (A1X) olduğu gruplar

4.6. Uçucu aroma bileşenleri analizi bulguları

Çalışmamızda elde edilen biyokalsiyum tozlarının uçucu aroma bileşenlerinin varlığı ve düzeyleri hakkında bilgi edinmek için gaz kromatografisi kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Örneklerde aldehitler, alkoller, ketonlar, esterler, fenoller ve hidrokarbonlar aranmıştır. Ancak alkali yöntemle elde edilen biyokalsiyum tozlarının hiçbirinde uçucu aroma bileşeni saptanmamıştır.

4.7. Biyokalsiyum tozları analizlerinin genel değerlendirmesi

Genel olarak biyokalsiyum üretiminde protein uzaklaştırmada NaOH + NaOCl kullanımının istenen özellikte ürün elde edilmesi için uygun olduğu belirlenmiştir. Literatürde bildirilen çalışmalarda protein uzaklaştırmada NaOH kullanılmaktadır. Bu çalışmamızda NaOH ile NaOCl birlikte kullanımı başarılı olmuştur. Biyokalsiyum tozlarında çok düşük oranda yağ belirlemiş olmamız etanol ve yüzey aktif maddenin yağ uzaklaştırmada çok etkili olduklarını göstermiştir. Literatürde çoğunlukla etanol, hekzan, aseton gibi yağ çözücüler kullanılmış olup yüzey aktif madde kullanımına rastlanmamıştır. Çalışmamızda yüzey aktif maddenin de kullanılabilecek bir alternatif olduğu belirlenmiştir. NaOCl'nin ağartma işlemi için H_2O_2'den daha etkili olduğu da ortaya konulmuştur.

Farklı yöntemlerle elde edilen 9 farklı biyokalsiyum tozunun analiz sonuçları değerlendirildiğinde B1Y grubunun düşük nem, en düşük yağ, en yüksek kalsiyum, en düşük fosfor, en yüksek Ca/P oranı ve yüksek esansiyel amino asit içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle B1Y grubunun gıda katkısı olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Alabalık kullanılarak yapılan balık köftesi içerisine %5 ve %10 oranlarında B1Y grubu biyokalsiyum tozu ilave edilmiş ve köftelerin tekstür, renk, kalsiyum fosfor ve duyusal analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.8. Biyokalsiyum tozlarında kalitatif (var /yok) kalıntı testleri bulguları

Köfteye katkı olarak ilave edilecek olan B1Y biyokalsiyum tozunun üretiminde NaOH, NaOCl ve etanol kullanılmıştır. Kullanılan bu kimyasalların üründe kalıntı bırakıp bırakmadığını belirlemek için kalitatif olarak sodyum hidroksit (NaOH), klor (Cl), ve alkol (etanol) için var/yok testleri yürütülmüştür.

NaOH kalıntısı varlığını test etmek için iki yöntem kullanıldı. Birincisinde fenolftaleyn testi uygulanmıştır. Suyla süspanse edilen örnek üzerine 1-2 damla fenolftaleyn damlatılmıştır. Ortamda herhangi bir renk değişimi gözlenmemiştir. Bu durum biyokalsiyum tozunda NaOH bulunmadığını göstermiştir. NaOH varlığı /yokluğu testi için ayrıca Biyokalsiyum tozu süspansiyonunda pH ölçümü yapılmış ve nötr pH saptanmıştır. Alkali pH olmaması da bize NaOH kalıntısı olmadığını göstermiştir.

Klor kalıntı testi için gümüş nitrat ($AgNO_3$) kullanılmıştır. Biyokalsiyum tozu süspansiyonuna %1'lik $AgNO_3$ ilavesi sonrası herhangi bir renk değişimi ve çökelti oluşumu gözlenmemiştir. Klor testi için ikinci bir yöntem iyodometrik titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde titrasyon sonucu mavi renk kaybolup renksizlik olduğu için klor kalıntısı olmadığı bu yöntemle de teyit edilmiş oldu. Alkol (etanol) var/yok testi ise kromik asit ile test edilmiş ve yine renksizlik ile etanol olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tüm bu testler sonucunda köfteye ilave edilen biyokalsiyum tozunun (B1Y) güvenle kullanılabileceği belirlenmiştir.

4.9. Balık köftesi analiz bulguları

4.9.1. Köftenin tekstür analiz bulguları

Sertlik (Hardness)

Köfte örneklerinin sertlik (hardness) analiz bulguları Çizelge 4.24'te ve Şekil 4.16'da verilmiştir. Varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.25'te verilmiştir. En düşük sertlik değerleri biyokalsiyum tozu ilave edilmemiş kontrol örneğinde belirlenmiştir. Biyokalsiyum tozu ilavesi köftelerin sertliği artırmıştır ($p<0.05$). Köftelere ilave edilen biyokalsiyum tozunun konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p>0.05$) olmasa da konsantrasyon arttıkça oransal bir artış gözlenmiştir.

Çizelge 4.24. Köfte örneklerinin sertlik (hardness) değerleri[1]

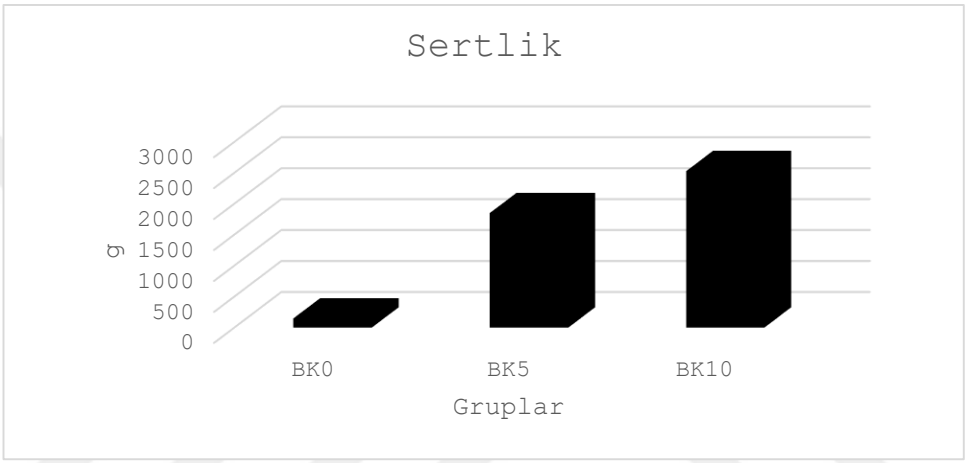
Gruplar[2]	**Sertlik (hardness) (g)**
BK0	146.58 ± 35.72a
BK5	1848.54 ± 429.16b
BK10	2528.22 ± 59.76b

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2] BK0= Biyokalsiyum katkısız köfte (kontrol), BK5= %5 biyokalsiyum katkılı köfte, BK10= %10 biyokalsiyum katkılı köfte

Çizelge 4.25. Köfte örneklerinin sertlik değerlerine ait varyans analiz bulguları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	3095760.918	33.27	0.0032
Gruplar içi	4	93062.321		
Toplam	6			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.19. Köfte örneklerinin sertlik (hardness) değerleri

Esneklik (Springiness)

Köfte örneklerinin esneklik (Springiness) analiz bulguları Çizelge 4.26'da ve Şekil 4.17'de verilmiştir. Varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.27'de verilmiştir. Biyokalsiyum ilaveli gruplar ile ilavesiz kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p>0.05$) bulunmamıştır. Köftelere ilave edilen biyokalsiyum tozunun esnekliklerini önemli derecede etkilemediği ($p>0.05$) gözlenmiştir.

Çizelge 4.26. Köfte örneklerinin Esneklik (Springiness) değerleri[1]

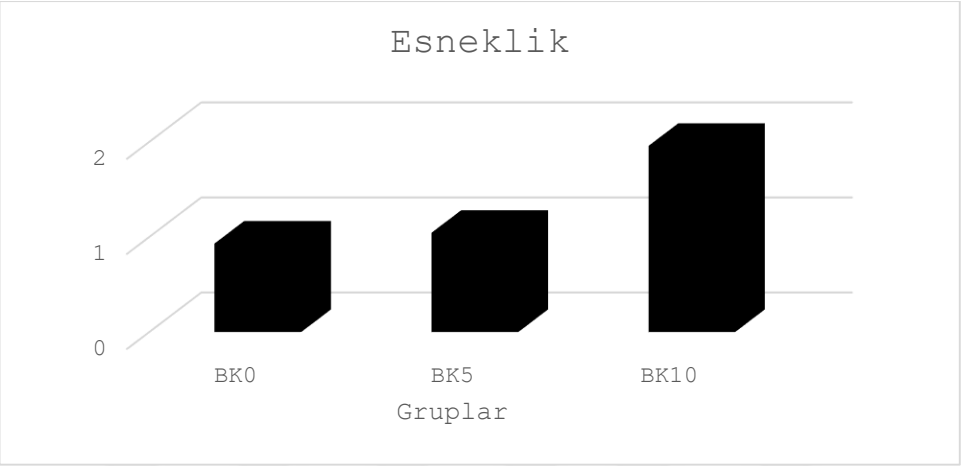
Gruplar[2]	**Esneklik (Springiness)**
BK0	0.93 ± 0.48a
BK5	1.044 ± 0.029a
BK10	1.958 ± 1.348a

[1]Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2] BK0= Biyokalsiyum katkısız köfte (kontrol), BK5= %5 biyokalsiyum katkılı köfte, BK10= %10 biyokalsiyum katkılı köfte

Çizelge 4.27. Köfte örneklerinin esneklik değerlerine ait varyans analiz bulguları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	0.66507810	1.45	0.3359
Gruplar içi	4	0.45836317		
Toplam	6			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.20. Köfte örneklerinin esneklik değerleri

Bağlılık (Cohesiveness)

Köfte örneklerinin bağlılık (cohesiveness) analiz bulguları Çizelge 4.28'de ve Şekil 4.18'de verilmiştir. Varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.29'da verilmiştir. En düşük ($p<0.05$) sertlik değerleri biyokalsiyum tozu ilave edilmemiş kontrol örneğinde belirlenmiştir. Biyokalsiyum tozu ilavesi köftelerin sertliği artırmıştır. Köftelere ilave edilen biyokalsiyum tozunun konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p>0.05$) olmasa da konsantrasyon arttıkça oransal bir artış gözlenmiştir.

Çizelge 4.28. Köfte örneklerinin bağlılık (Cohesiveness) değerleri[1]

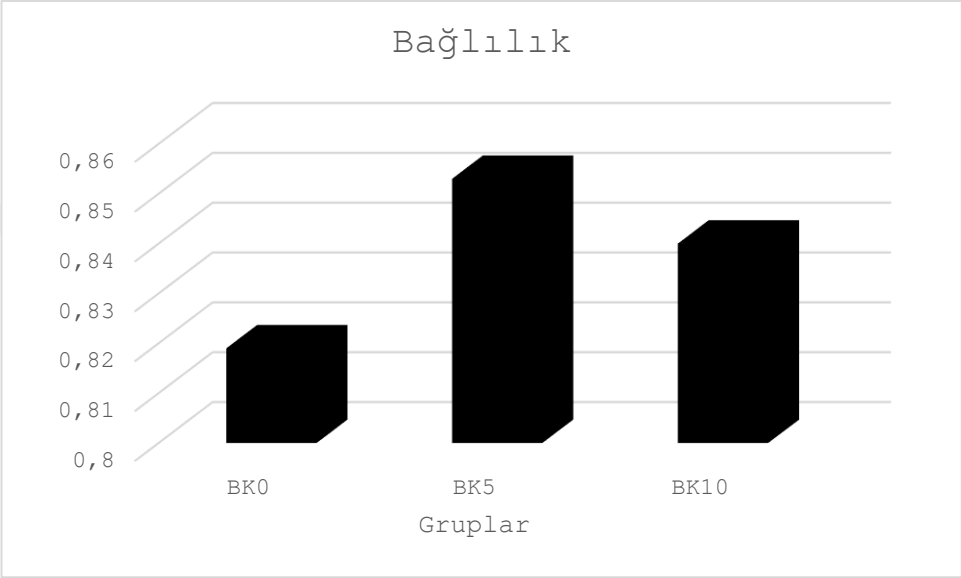
Gruplar[2]	**Bağlılık (Cohesiveness)**
BK0	0.819 ± 0.036a
BK5	0.853 ± 0.033a
BK10	0.840 ± 0.045a

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2] BK0= Biyokalsiyum katkısız köfte (kontrol), BK5= %5 biyokalsiyum katkılı köfte, BK10= %10 biyokalsiyum katkılı köfte

Çizelge 4.29. Köfte örneklerinin bağlılık değerlerine ait varyans analiz tablosu

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	0.00067336	0.49	0.6430
Gruplar içi	4	0.00136275		
Toplam	6			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.21. Köfte örneklerinin bağlılık değerleri

Sakızımsılık (Gumminess)

Köfte örneklerinin sakızımsılık (gumminess) analiz bulguları Çizelge 4.30'da ve Şekil 4.19'da verilmiştir. Varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.31'de verilmiştir. En düşük ($p<0.05$) sakızımsılık değerleri biyokalsiyum tozu ilave edilmemiş kontrol örneğinde belirlenmiştir. Biyokalsiyum tozu ilavesi köftelerin sakızımsılık değerlerini artırmıştır. Köftelere ilave edilen biyokalsiyum tozunun konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p>0.05$) olmasa da konsantrasyon arttıkça oransal bir artış gözlenmiştir.

Çizelge 4.30. Köfte örneklerinin sakızımsılık (gumminess) değerleri[1]

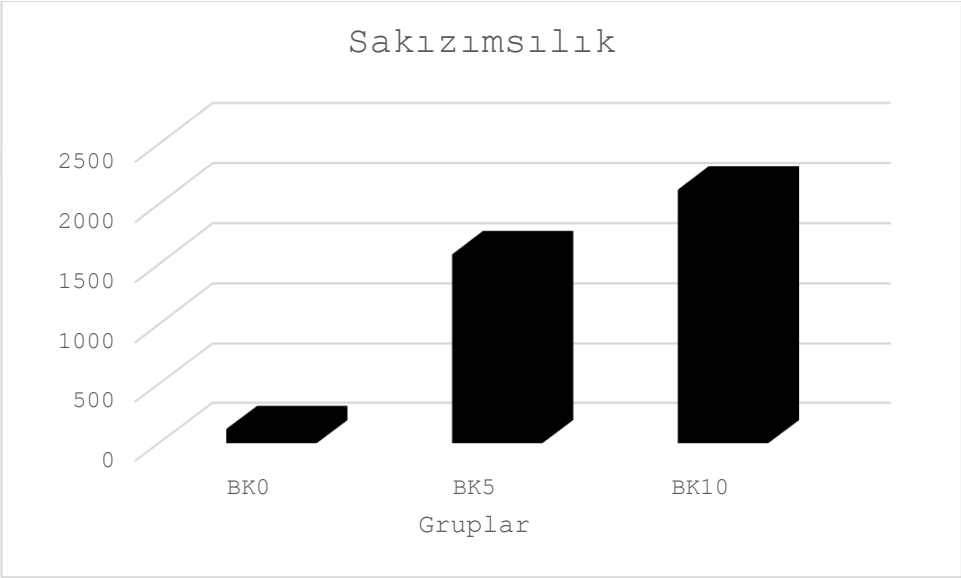
Gruplar[2]	Sakızımsılık (Gumminess) (g)
BK0	120.74 ± 34.58a
BK5	1582.99 ± 409.676b
BK10	2121.28 ± 62.524b

[1]Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2] BK0= Biyokalsiyum katkısız köfte (kontrol), BK5= %5 biyokalsiyum katkılı köfte, BK10= %10 biyokalsiyum katkılı köfte

Çizelge 4.31. Köfte örneklerinin sakızımsılık değerlerine ait varyans analiz bulguları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	2184018.692	25.64	0.0052
Gruplar içi	4	85193.521		
Toplam	6			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.22. Köfte örneklerinin sakızımsılık değerleri

Çiğnenebilirlik (Chewiness)

Köfte örneklerinin çiğnenebilirlik (chewiness) analiz bulguları Çizelge 4.32'de ve Şekil 4.20'de verilmiştir. Varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.33'te verilmiştir. En düşük çiğnenebilirlik değerleri ($p<0.05$) biyokalsiyum tozu ilave edilmemiş kontrol örneğinde belirlenmiştir. Biyokalsiyum tozu ilavesi köftelerin çiğnenebilirlik değerlerini artırmıştır. Köftelere ilave edilen biyokalsiyum tozunun konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p>0.05$) olmasa da konsantrasyon arttıkça oransal bir artış gözlenmiştir.

Çizelge 4.32. Köfte örneklerinin çiğnenebilirlik (Chewiness) değerleri[1]

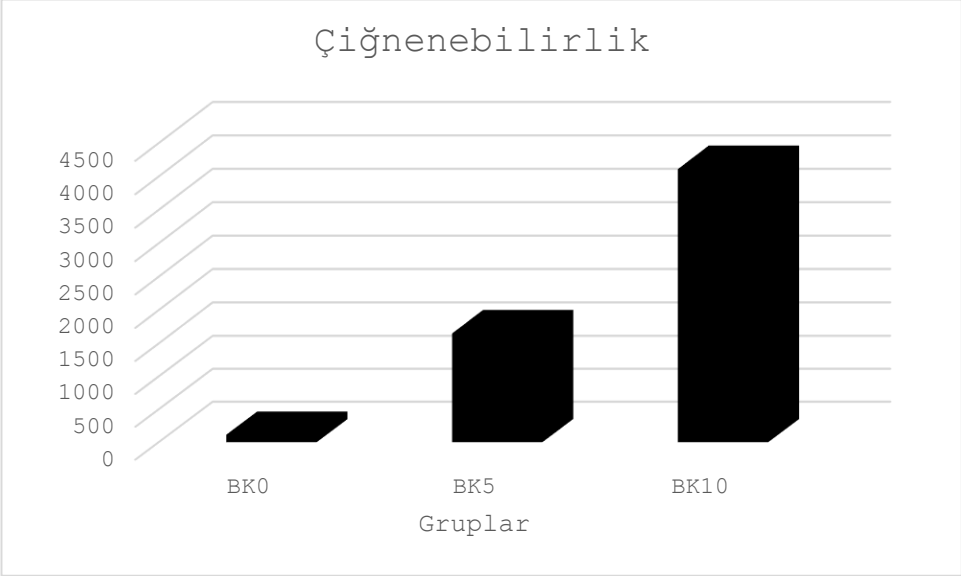
Gruplar[2]	**Çiğnenebilirlik (Chewiness) (g)**
BK0	114.146 ± 45.168a
BK5	1651.20 ± 412.202a
BK10	4111.27 ± 2738.029a

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2] BK0= Biyokalsiyum katkısız köfte (kontrol), BK5= %5 biyokalsiyum katkılı köfte, BK10= %10 biyokalsiyum katkılı köfte

Çizelge 4.33. Köfte örneklerinin çiğnenebilirlik (Chewiness) değerlerine ait varyans analiz bulguları

Varyasyon kaynakları	**SD**	**KO**	**F değeri**	**Pr > F**
Gruplar arası	2	8171066.68	4.17	0.1051
Gruplar içi	4	1959735.18		
Toplam	6			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.23. Köfte örneklerinin çiğnenebilirlik değerleri

Elastikiyet (Resilience)

Köfte örneklerinin elastikiyet (resilience) analiz bulguları Çizelge 4.34'te ve Şekil 4.21'de verilmiştir. Varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.35'te verilmiştir. Biyokalsiyum ilaveli gruplar ile ilavesiz kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p>0.05$) bulunmamıştır. Köftelere ilave edilen biyokalsiyum tozunun elastikiyet önemli derecede etkilemediği gözlenmiştir.

Çizelge 4.34. Köfte örneklerinin elastikiyet (Resilience) değerleri[1]

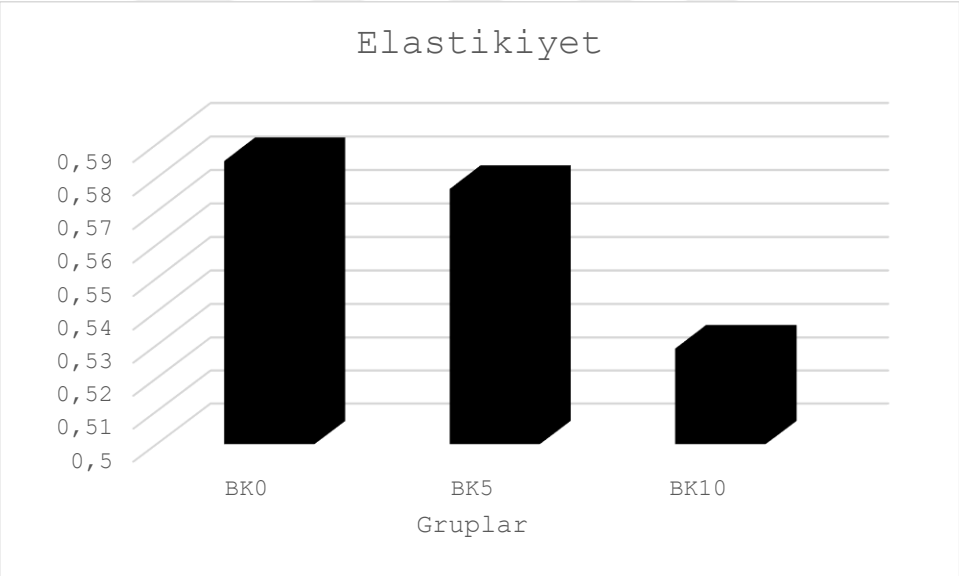
Gruplar[2]	**Elastikiyet (Resilience)**
BK0	0.585 ± 0.057a
BK5	0.576 ± 0.038a
BK10	0.529 ± 0.051a

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2] BK0= Biyokalsiyum katkısız köfte (kontrol), BK5= %5 biyokalsiyum katkılı köfte, BK10= %10 biyokalsiyum katkılı köfte

Çizelge 4.35. Köfte örneklerinin elastikiyet (Resilience) değerlerine ait varyans analiz bulguları

Varyasyon kaynakları	**SD**	**KO**	**F değeri**	**Pr > F**
Gruplar arası	2	0.00189952	0.86	0.4881
Gruplar içi	4	0.00220217		
Toplam	6			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.24. Köfte örneklerinin elastikiyet değerleri

4.9.2. Köftelerin renk ölçüm sonuçları

Köfte örneklerinin enstrümantal renk ölçüm bulguları Çizelge 4.36'da ve Şekil 4.22, 4.23 ve 4.24'te verilmiştir. Varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.37, 4.38, 4.39, 4.40, 4.41 ve 4.42'de verilmiştir. Biyokalsiyum ilavesi köftelerin iç yüzey renk parametrelerini anlamlı olarak ($p<0.05$) etkilemiş, özellikle yüksek seviyede ilave edilen BK10 grubunda daha açık, daha kırmızı ve daha sarı renk özellikleri gözlenmiştir. Buna

karşın dış yüzeyde L*, a* ve b* değerlerinin gruplar arasında değişmemesi (p>0.05), ısıl işlem sırasında oluşan yüzey renk reaksiyonlarının biyokalsiyumdan sınırlı düzeyde etkilendiğini göstermektedir.

Çizelge 4.36. Köftelerin iç ve dış yüzeylerinin renk (L*, a*, b*) değerleri[1]

Gruplar[2]		BK0	BK5	BK10
L* değeri	**İç yüzey**	55.47 ± 5.23ab	50.91 ± 1.33b	60.34 ± 4.61a
	Dış yüzey	35.13 ± 2.63a	32.31 ± 1.88a	35.06 ± 3.70a
a* değeri	**İç yüzey**	56.3 ± 5.31ab	51.57 ± 1.70b	61.32 ± 4.62a
	Dış yüzey	33.33 ± 2.94a	30.55 ± 2.07a	33.35 ± 3.46a
b* değeri	**İç yüzey**	51.09 ± 3.90a	44.82 ± 3.16b	54.45 ± 4.28a
	Dış yüzey	13.86 ± 3.55a	12.34 ± 1.82a	13.83 ± 2.62a

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı sütundaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2] BK0= Biyokalsiyum katkısız köfte (kontrol), BK5= %5 biyokalsiyum katkılı köfte, BK10= %10 biyokalsiyum katkılı köfte

Çizelge 4.37. Köftelerin iç yüzeylerinin L* değerlerine ait varyans analiz bulguları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	89.0025583	5.29	0.0302
Gruplar içi	9	16.8206056		
Toplam	11			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Çizelge 4.38. Köftelerin dış yüzeylerinin L* değerlerine ait varyans analiz bulguları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	20.7324292	2.96	0.0740
Gruplar içi	21	16.8206056		
Toplam	23			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Çizelge 4.39. Köftelerin iç yüzeylerinin a* değerlerine ait varyans analiz bulguları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	95.0905333	5.43	0.0294
Gruplar içi	9	17.5168889		
Toplam	11			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Çizelge 4.40. Köftelerin dış yüzeylerinin a* değerlerine ait varyans analiz bulguları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	20.9067792	2.53	0.1038
Gruplar içi	21	8.2687351		
Toplam	23			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Çizelge 4.41. Köftelerin iç yüzeylerinin b* değerlerine ait varyans analiz bulguları

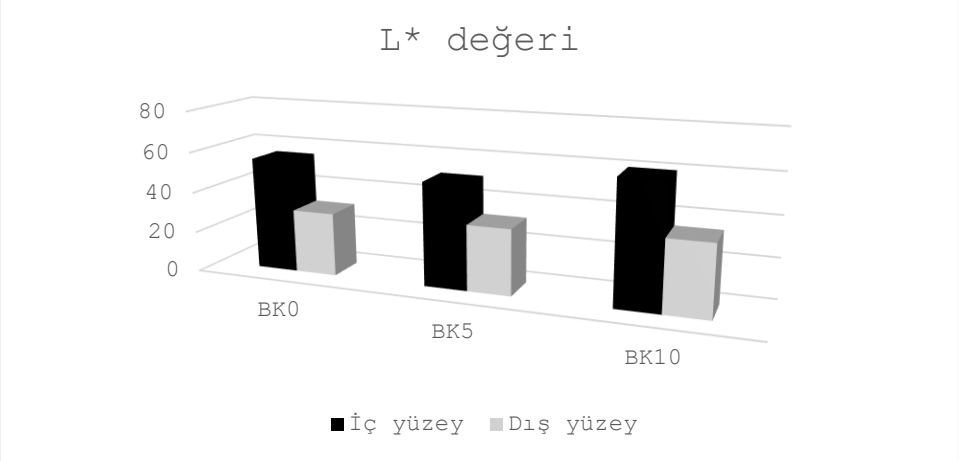
Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	95.4969250	6.57	0.0174
Gruplar içi	9	14.5369389		
Toplam	11			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

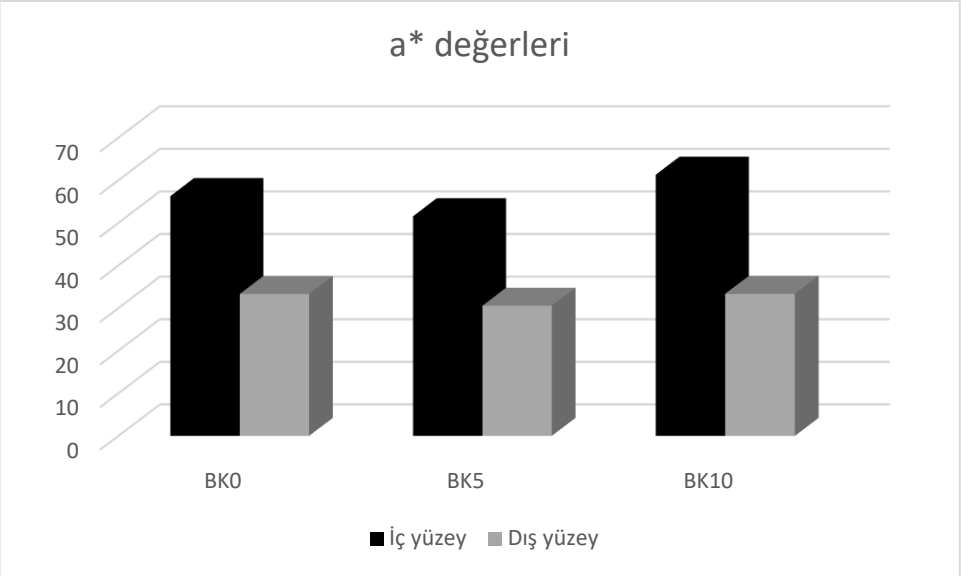
Çizelge 4.42. Köftelerin dış yüzeylerinin b* değerlerine ait varyans analiz bulguları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	6.0467375	0.79	0.4657
Gruplar içi	21	7.6280345		
Toplam	23			

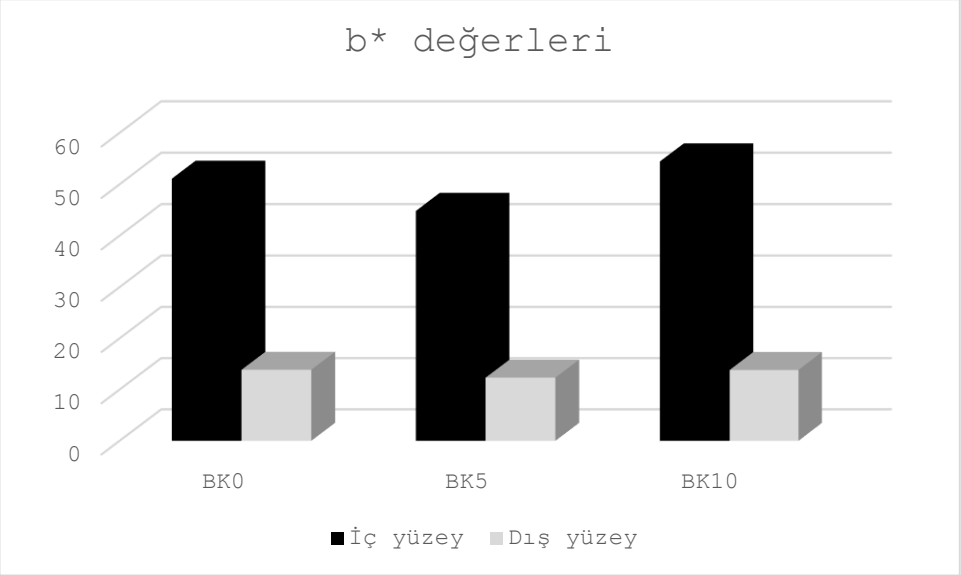
SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.25. Köftelerin iç ve dış yüzeylerinin L* değerleri



Şekil 4.26. Köftelerin iç ve dış yüzeylerinin a* değerleri



Şekil 4.27. Köftelerin iç ve dış yüzeylerinin b* değerleri

4.9.3. Köftelerin kalsiyum (Ca) ve (P) analiz bulguları

Köfte örneklerinin kalsiyum ve fosfor analiz bulguları Çizelge 4.43'te ve Şekil 4.25'te verilmiştir. Varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.44 ve 4.45'te verilmiştir. Bulgular incelendiğinde köftelere biyokalsiyum tozu ilavesinin kalsiyum ve fosfor içeriklerini önemli ($p<0.05$) ölçüde etkilediği görülmektedir. Biyokalsiyum ilavesi köftelerin Ca ve P içeriklerini artırmıştır. Biyokalsiyum konsantrasyonundaki artışla birlikte köftenin de Ca ve P içerikleri artmıştır. En yüksek Ca ve P %10 ilaveli grupta saptanmıştır.

Çizelge 4.43. Köftelerin kalsiyum ve fosfor içerikleri

	BK0	BK5	BK10
Ca	54.54 ± 0.60c	73.85 ± 0.63b	93.17 ± 0.46a
P	35.57 ± 0.31c	47.18 ± 0.61b	61.97 ± 0.51a

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı satırdaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2] BK0= Biyokalsiyum katkısız köfte (kontrol), BK5= %5 biyokalsiyum katkılı köfte, BK10= %10 biyokalsiyum katkılı köfte

Çizelge 4.44. Köftelerin kalsiyum içeriklerine ait varyans analiz tablosu

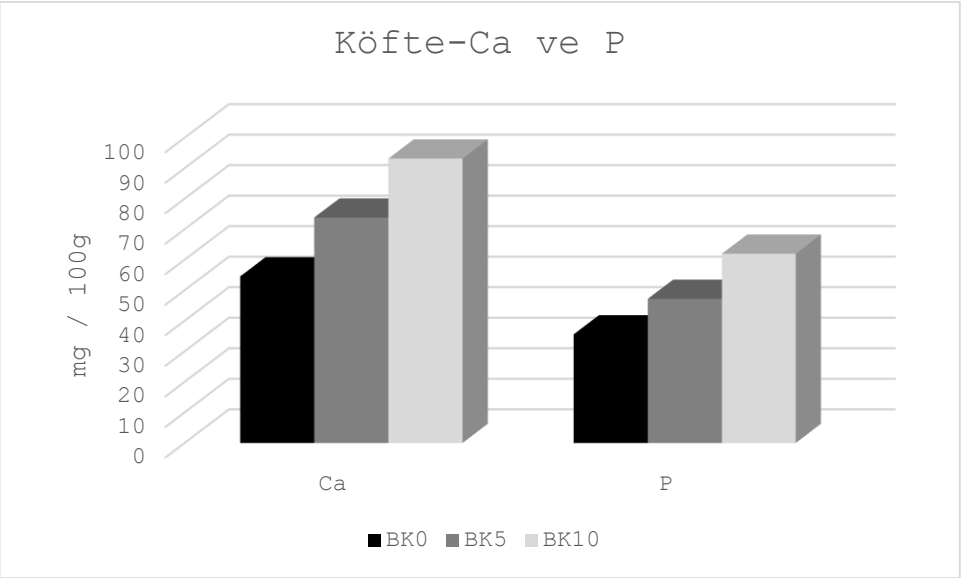
Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	746.301800	3778.11	<.0001
Gruplar içi	3	0.197533		
Toplam	5			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Çizelge 4.45. Köftelerin fosfor içeriklerine ait varyans analiz tablosu

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	350.1654000	1447.36	<.0001
Gruplar içi	3	0.2419333		
Toplam	5			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması



Şekil 4.28. Köftelerin Ca ve P içerikleri

4.9.4. Köftelerin duyusal analiz bulguları

Köfte örneklerinin duyusal analiz bulguları Çizelge 4.46'da ve Şekil 4.26'da verilmiştir. Varyans analiz sonuçları da Çizelge 4.47, 4.48, 4.49, 4.50 ve 4.51'de verilmiştir. Köftelerin duyusal analizinde görünüş, koku, doku ve tat özellikleri incelenmiştir. Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre %5 ve %10 biyokalsiyum ilaveli köftelerin görünüş, koku, doku ve lezzet özelliklerinin biyokalsiyum ilavesiz kontrol örneklerinden anlamlı derecede farklı ($p>0.05$) olmadığı görülmüştür. Biyokalsiyum ilavesi köftelerin duyusal özellikleri üzerinde negatif bir etki oluşturmamıştır.

Çizelge 4.46. Biyokalsiyum ilaveli köftelerin duyusal analiz bulguları[1]

Gruplar[2]	BK0	BK5	BK10
Görünüş	8.2 ± 0.4a	7.8 ± 0.5a	7.0 ± 0.6a
Koku	8.05 ± 0.3a	7.6 ± 0.4a	6.8 ± 0.5a
Doku	8.3 ± 0.4a	7.9 ± 0.4a	7.2 ± 0.5a
Tat	8.1 ± 0.5a	7.5 ± 0.6a	6.5 ± 0.5a
Genel beğeni	8.2 ± 0.4a	7.7 ± 0.5a	6.9 ± 0.5a

[1] Sonuçlar ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Aynı satırdaki farklı küçük harfler (a,b,c) önemli derecede farklılığı ifade etmektedir. [2] BK0= Biyokalsiyum katkısız köfte (kontrol), BK5= %5 biyokalsiyum katkılı köfte, BK10= %10 biyokalsiyum katkılı köfte

Çizelge 4.47. Köftelerin duyusal (görünüş) özelliklerine ait varyans analiz bulguları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	0.74666667	3.85	0.1485
Gruplar içi	3	0.30166667		
Toplam	5			

Çizelge 4.48. Köftelerin duyusal (koku) özelliklerine ait varyans analiz bulguları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	0.80166667	3.85	0.1485
Gruplar içi	3	0.20833333		
Toplam	5			

Çizelge 4.49. Köftelerin duyusal (doku) özelliklerine ait varyans analiz bulguları

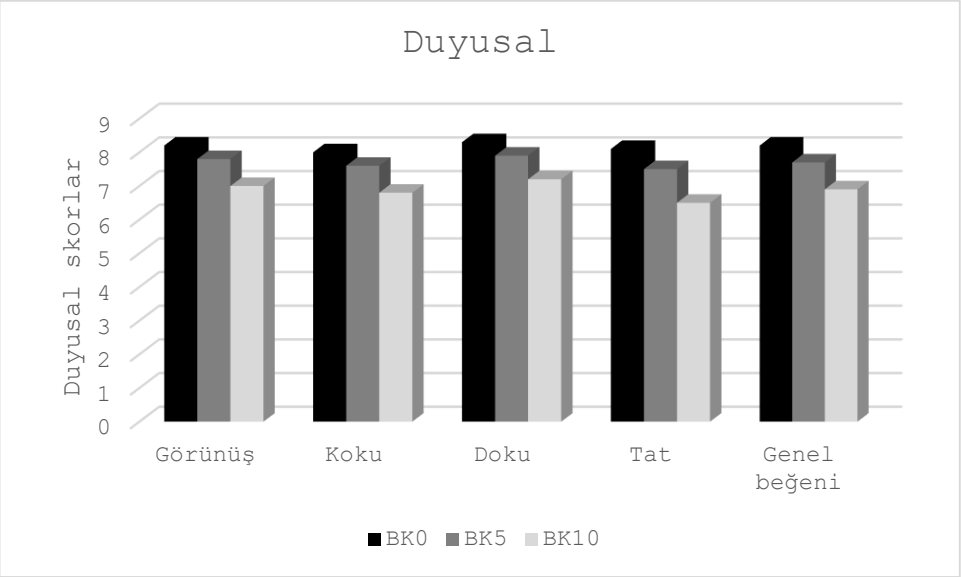
Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	0.62000000	2.74	0.2108
Gruplar içi	3	0.22666667		
Toplam	5			

Çizelge 4.50. Köftelerin duyusal (tat) özelliklerine ait varyans analiz bulguları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	1.30666667	4.38	0.1288
Gruplar içi	3	0.29833333		
Toplam	5			

Çizelge 4.51. Köftelerin duyusal (genel beğeni) özelliklerine ait varyans analiz bulguları

Varyasyon kaynakları	SD	KO	F değeri	Pr > F
Gruplar arası	2	0.86000000	3.85	0.1484
Gruplar içi	3	0.22333333		
Toplam	5			



Şekil 4.29. Köftelerin duyusal analiz skorları

5. TARTIŞMA

5.1. Biyokalsiyum verimi

Verim, biyokalsiyum tozunun ağırlığının başlangıç ağırlığıyla karşılaştırılmasıyla hesaplanır. Verimin bilinmesi, bir ürünün uygun kullanımını ve ekonomik değerini belirlemek için çok önemlidir. Verim ne kadar yüksekse, ürünün ekonomik değeri ve etkinliğinin de o kadar yüksek olduğu bildirilmektedir (Febriani vd. 2021). Ancak biyokalsiyum tozunda verimin düşüklüğü ürünün saflığının, daha fazla kalsiyum içerdiğinin ve biyoyararlanımının daha yüksek olduğunun göstergesidir.

Araştırmamızda en yüksek verim B2Y (%44.8) grubunda elde edilmiştir. Bu grupta protein ve yağ da en yüksek düzeyde belirlenmiştir. NaOH'in tek başına kullanıldığı ekstraksiyonla NaOH + NaOCl kombinasyonundan daha düşük verimle sonuçlanmıştır. En düşük verim, A1Y (%38.3) grubunda gözlenmiştir. Daha düşük biyokalsiyum verimi bu grubun kemiğinin düşük oranda protein ve lipit içermesi nedeniyle elde edilmiştir. Yani protein ve lipit uzaklaştırma bu grupta daha etkili olmuştur.

Biyokalsiyum üretimindeki protein uzaklaştırma kalsiyumun çözünür ve biyoyararlanımı yüksek forma dönüşmesini kolaylaştırır. Su ile yapılan ekstraksiyonda ise oldukça yüksek (%70.9) verim elde edilmiştir. Bu da bize su ile yapılan ekstraksiyonda protein ve yağ uzaklaştırmanın yeterli olmadığını bunun için kimyasal kullanımının gerektiğini göstermiştir. Su, alkali ve asidik ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak milkfish (*Chanos chanos*) balığından kemik tozu üretilen bir çalışmada, en yüksek verim çalışmamızdakine benzer şekilde su ekstraksiyon yöntemiyle (%65.57) elde edilmiş, bunu asit (%50.87) ve alkali (%39.67) ekstraksiyon izlemiştir. (Wulandari ve Kusumasari 2019). Bildirilen çalışmada en düşük verim çalışmamızdakine benzer şekilde alkali ekstraksiyon elde edilmiştir. Yine aynı çalışmada en düşük protein ve yağ içeriği alkali ekstraksiyonla elde edilen kalsiyum tozunda belirlenmiştir. Protein uzaklaştırma için alkali yöntemin, yağ uzaklaştırma için etanolün kullanıldığı hibrit yayın balığı (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*) kemiklerinden elde edilen biyokalsiyum tozu için %14.6 verim belirlemişlerdir (Sriket vd. 2023). Farklı kimyasal yöntemlerle çipura balığı (*Sparus aurata*) kemiklerinden elde edilen kemik tozunda en yüksek verim 59.39 ile su ile yapılan ekstraksiyonla elde edilmiş bunu %21.46 ile NaOH ile muamele edilen grup takip etmiştir. Sodyum hidroksitin sitrik asit, etanol, sodyum hipoklorit ve hidroklorik asit ile kombinasyonu ile üretilen diğer gruplarda %10.17-12.15 arasında verim elde edildiği ve kimyasalların NaOH ile kombinasyon halinde kullanılması, ekonomik olarak tercih edilmeyen düşük verimle sonuçlanmıştır (Savlak vd. 2020). Benjakul vd. (2017a) tropikal hint ve pasifik sularında yaşayan bir orkinos türü tongol orkinos (*Thunnus tonggol*) ve sarıkanat orkinos (*Thunnus albacares*) kemiklerinden alkali yöntemle elde ettikleri biyokalsiyum tozu için %93-95 verim bildirmişlerdir. Yazılı orkinos (*Katsuwonus pelamis*) kemiklerinden yağ uzaklaştırma yapılıp yapılmayan iki grup biyokalsiyum tozunun verimleri sırasıyla %86.56 ve %73.01 olarak belirlenmiş ve bu durumu yağ giderme işlemi ve yıkama sırasında muhtemelen daha yüksek lipit kaybı ile ilişkilendirilmiştir (Benjakul vd. 2024). Farklı çalışmalardaki farklı verim sonuçları balık türü, ekstraksiyon yöntemi ve kullanılan kimyasalların farklılığından kaynaklanmaktadır.

5.2. Kimyasal kompozisyon analizleri

5.2.1. Nem analiz sonuçları

Nem içeriğinin toz ürünlerin stabilitesini ve raf ömrünü korumada önemli bir rol oynadığı ve tozun raf ömrünü uzatmak için gereken nem içeriğinin maksimum %10 olduğu bildirilmiştir (Ojo vd. 2017). Çalışmamızda ham kemiklerin nem içeriğinin (%2.88) biyokalsiyum tozlarından daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Üretim sırasında ısıtma serbest suyu uzaklaştırmıştır. Biyokalsiyum tozlarının nem içeriğinin oldukça düşük (%0.24-1.76) olduğu bulunmuştur. En yüksek nem içeriği (%1.76) suda ekstraksiyonla elde edilmiştir. Diğer gruplar arasında en yüksek nem içeriği B2X grubunda, en düşük nem içeriği ise B1X grubunda bulunmuştur. Önceki çalışmalarda kemik tozları için farklı nem içerikleri bildirilmiştir. Hibrit yayın balığı (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*) kemiklerinden elde edilen biyokalsiyum tozunun nem içeriği %1.42 (Sriket vd. 2023), Asya levreği kemiklerinden elde edilende %3.89 (Wijayanti vd. 2022), yıldızlı tetik balığı denilen bir balık türünden elde edilende %3.79-4.15 (Husna vd. 2020), Yayın balığında elde edilende %5.19-5.49 (Wulandari ve Kusumasari 2019), Hint-Pasifik tarponu olarak bilinen balıktan elde edilende %3.13-3.35 (Cahyani vd. 2022), yazılı orkinos için %7.35 (Benjakul vd. 2017b), yazılı orkinos gözünün dış beyaz tabakasındaki kıkırdak yapısından elde edilen biyokalsiyum tozunda %7.43 (Pudtikajorn vd. 2023), sarıkanat orkinos için %0.27 (Nemati vd. 2017), yayın balığı, somon ve kırmızı mercan balığından elde edilenlerde sırasıyla %0.69, %0.65 ve %0.62 (Luu ve Nguyen 2009), çipura kemiklerinden elde edilende %3.56-6.11 (Savlak 2020) nem içeriği bildirilmiştir. Çalışmamızdaki nem içerikleri Nemati vd. (2017), Luu ve Nguyen (2009) ve Sriket vd. (2023)'nin nem değerlerine yakın olmakla birlikte birçok araştırmacınınkinden düşük bulunmuştur. Nem içeriğinin düşük olması biyokalsiyum tozunun stabilitesi ve raf ömrü açısından iyi bir sonuçtur. Önceki çalışmalardaki nem analiz bulgularındaki farklılıklar farklı kurutma yöntemlerinden kaynaklanmış olabilir.

5.2.2. Ham protein analiz sonuçları

Kemik gibi doğal kaynaklardan kalsiyum elde edilirken ham materyal önemli miktarda kolajen ve diğer proteinleri içerir. Bu proteinler uzaklaştırıldığında daha yüksek saflıkta kalsiyum elde edilir. Kalsiyumun biyoyararlanımı artar çünkü proteinler kalsiyumla bağlanarak emilimini engelleyebilir. Bu nedenle biyokalsiyum üretiminin bir aşaması protein uzaklaştırmaktır. Bunun için çoğunlukla alkali yöntem kullanılır. Alkaliler kemik gibi biyolojik materyallerdeki proteinleri parçalayarak, çözerek veya hidrolize ederek uzaklaştırmayı sağlamaktır. Yağ ve protein gibi organik maddeleri uzaklaştırmanın yüksek saflıkta TBP elde etmenin etkili bir yolu olduğu bildirilmektedir (Hemung 2013).

Bu çalışmada uygulanan yöntemlerin proteinlerin uzaklaştırmadaki etkinliğini belirlemek için biyokalsiyum tozlarının protein içerikleri analiz edilmiştir. Çalışmamızda balık kılçığındaki ham protein içeriği %27.56 bulunurken, biyokalsiyum üretiminden sonra protein önemli ölçüde azaldı. En yüksek protein içeriği (%11.03) suda kaynatma yöntemi ile elde edilen biyokalsiyum tozunda belirlenmiştir. Bu durum, suda kaynatma yönteminin biyokalsiyum tozundaki proteini yeterince uzaklaştıramadığı sonucunu doğurmuştur. Ancak, alkali yöntem kullanıldığında protein içeriğinde önemli bir azalma gözlenmiştir. En düşük protein içeriği değerleri B1X'te (%0.26) en yüksek ise B2Y'de

(1.49) bulunmuştur. Alkali işlemin, kemik matriksinden proteinli maddeleri uzaklaştırmanın etkili yollarından biri olduğu bildirilmiştir (Idowu vd. 2020). Alkali (NaOH) ile çalışmış olmamız ve 80°C çalışma sıcaklığında sürekli karıştırma ile proteinlerin denatürasyona uğraması veya üç boyutlu yapısının açılmasına neden olmuştur. Bu, kütle difüzyonunda bir artışa neden olarak kemik matrisinden denatüre proteinlerin kütle transferini ve çözünmesini hızlandırdı. Nemati vd. (2007) NaOH kullanımının protein ve yağ içeriğinde azalmaya neden olduğunu Kumoro vd. (2010) de yüksek sıcaklığın balık kemiği atıklarından alkali protein ekstraksiyonu üzerindeki olumlu etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Liu vd. (2015) kolajenlerin alkali çözeltilerde neredeyse çözünmediğini ve yaptıkları bir çalışmada kolajen olmayan proteinlerin maksimum düzeyde uzaklaştırılması ve kolajen kaybının minimum düzeyde olması için NaOH kullanıldıklarını bildirmişlerdir. Önceki çalışmalarda hibrit yayın balığı kemiklerinden elde edilen biyokalsiyum tozunda %2.86 protein saptamıştır (Sriket vd. 2023). Belirtilen çalışmada ham kemik protein içeriği %13.01 olarak bildirilmiş ve protein uzaklaştırmada potasyum hidroksit (KOH) kullanılmıştır. Cahyani vd. (2022) basınçlı pişirme yöntemiyle pişirilmiş *M. cyprinoides* kemiğinden elde edilen biyokalsiyum tozlarının protein içeriğini %11.39-14.57 olarak bulmuşlar. Benjakul vd. (2017) yazılı orkinos kemik tozunda proteini %22.47 bulmuşlardır. Wulandari ve Kusumasari (2019) milkfish (*Chanos chanos*) kemiklerinden suda ve alkalide ekstrakte ettikleri biyokalsiyumlarda protein içeriğini sırasıyla %27.88 ve %1.74 olarak belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde sudaki ekstraksiyonda daha yüksek protein içeriği belirlenmiştir. Sarıkanat orkinosun ham kemiklerinde protein oranı %33.40 bulunurken alkali ekstraksiyon sonucu elde dilen kemik tozunda %16.10 bulunmuştur (Nemati vd. 2017). Su ve alkali ortamda işlenen üç balık kılçığı tozunun ham protein oranının alkali ekstraksiyonla elde edilen balık kılçığı tozunda, su çıkarma yöntemlerine kıyasla çok düşük ham protein bulunmuştur. Protein içerikleri alkali yöntemle Lagos (*Epinephelus diacanthus*), İmparator (*Letrinus fraenatus*) ve Beyaz mercan (*Pristipomoides filamentosus*) için sırasıyla %3.28, %8.75 ve %6.57, sudaki ekstraksiyonla %25.16, %19.69 ve %16.49 bulunmuştur (Amitha vd. 2019). Baltık morinası (*Gadus morhua callarias*) ve Atlantik somonu (*Salmo salar*)'nun ham kemiklerinde sırasıyla %15.27 ve %18.02 olarak belirlenirken alkali ekstraksiyonla elde edilen kalsiyum tozlarında ise %14.20 ve %10.78 protein saptanmıştır. Tropikal hint ve pasifik sularında yaşayan bir orkinos türü tongol tuna (*Thunnus tonggol*) ve sarıkanat orkinos (*Thunnus albacares*) kemiklerinden alkali yöntemle elde ettikleri biyokalsiyum tozlarında protein sırasıyla %27.93 ve %26.29 bulunmuştur (Benjakul vd. 2017a). Çalışmamızda alkali ekstraksiyonla elde edilen biyokalsiyum tozlarının protein içerikleri diğer çalışmalarda bildirilenlerden oldukça düşük bulunmuştur. Sudaki ekstraksiyon hariç alkali yöntemle elde edilenlerin hepsinde düşük protein konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu durum protein uzaklaştırmada başarılı sonuç elde ettiğimizi göstermektedir.

5.2.3. Ham yağ analiz sonuçları

Ham biyolojik materyaller önemli miktarda yağ içerirler. Biyokalsiyum üretiminde yağlar uzaklaştırılmadan kalsiyumun saflaştırılması zorlaşır ve elde edilen kalsiyum tozunun rengi, kokusu ve tadı bozulabilir. Yağlar zamanla okside olarak acılaşma yapar, bu da ürün kalitesini düşürür. Yağ uzaklaştırma, biyokalsiyumun saf, kokusuz, daha stabil, daha uzun ömürlü ve daha yüksek verimle elde edilmesi için temel

bir adımdır. Bu nedenle farklı yöntemlerle ürettiğimiz biyokalsiyum tozlarında ham yağ analizleri yürütülmüştür. Tüm gruplarda önemsenmeyecek düzeyde (%0.26-0.44) yağ içeriği tespit edilmiştir. Ham kemik yağ oranı da %1.09 olarak saptanmıştır. Balık kılçıklarındaki yağ, ısıtma işlemi sırasında kaybolmuştur. Bu kayıp, tozun raf ömrünü uzatabilecektir. En düşük yağ içeriği B1Y grubunda belirlenmiştir. Bu grupta yağ giderme işlemi etanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Etanol, iyi çözücü özellikleri sayesinde balık kemiği yüzeyinde ve gözenekli yapısında bulunan lipit bileşenlerini çözerek sıvı faza taşımıştır. Ayrıca etanolün düşük yüzey gerilimi, çözücünün kemik yapısının gözeneklerine daha kolay nüfuz etmesini sağlamış ve bu durum kemik matriksi içerisinde hapsolmuş yağların uzaklaştırılmasına katkıda bulunmuştur. Polisorbat 80 kullanılan örneklerde ise, düşük kullanım oranına rağmen benzer şekilde düşük yağ içerikleri elde edilmiştir. Polisorbat 80, noniyonik yapısı ve yüksek hidrofilik karakteri sayesinde yağ fazının sulu ortamda dağılmasını kolaylaştırmış, oluşan yağ damlacıklarının yeniden birleşmesini engelleyerek sıvı fazda stabil olarak tutulmasını sağlamıştır. Elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde, etanol ile uygulanan çözücü bazlı yağ giderme yaklaşımı ile Polisorbat 80 kullanılarak gerçekleştirilen emülsifikasyon temelli yağ giderme yaklaşımının, farklı mekanizmalar üzerinden ilerlemesine rağmen benzer düzeyde etkinlik gösterebildiği anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar, balık kemiklerinden biyokalsiyum üretiminde Polisorbat 80 gibi noniyonik emülsifiye edicilerin, özellikle uçucu organik çözücü kullanımının tercih edilmediği veya sınırlandırıldığı uygulamalarda alternatif bir yağ giderme yöntemi olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır.

Protein içerikleri alkali yöntemle Lagos (*Epinephelus diacanthus*), İmparator (*Letrinus fraenatus*) ve Beyaz mercan (*Pristipomoides filamentosus*) kemiklerinde alkali ve suda ekstraksiyon yöntemiyle biyokalsiyum tozu elde edilmiştir. İki işlem arasında balık kılçığı tozunun toplam yağ içeriğinde önemli bir fark bulunmuştur. İmparator balık kılçığı tozu, kaynama ortamı olarak su kullanıldığında %10.70 toplam yağ içeriği gösterirken, alkali ekstraksiyon yönteminde %0.56 yağ bulunmuştur. Su ekstraksiyon yönteminde, Lagos ve Beyaz mercan balık kılçığı tozunun toplam yağ oranları sırasıyla yaklaşık %9.94 ve %7.26 olarak bulunmuştur. Ayrıca alkali ekstraksiyon işleminde, Lagos ve Beyaz mercan balık kılçığı tozunun toplam yağ oranları sırasıyla %3.28 ve %6.57 olarak bulunmuştur. Üç balık kılçığı tozunun yağ içeriğinin alkali bir işlem yönteminde, su işlemine göre çok düşük olduğu bulunmuştur (Amitha vd. 2019). İşleme hammaddesini oluşturan morina ve somon omurgaları sırasıyla %0.76 ve %12.30 oranında yağ içerirken bu balık kemiklerinden biyokalsiyum üretimi sonrası 0.12% ve 0.25% yağ oranları belirlenmiştir (Bubel vd. 2015). Somon kemiklerinden alkali yöntemle elde edilen biyokalsiyum tozunda yağ oranı %0.33 olarak belirlenmiştir (Idowu vd. 2020). Tongol orkinos (*Thunnus tonggol*) ve sarıkanat orkinos (*Thunnus albacares*) kemik tozlarının yağ içerikleri sırasıyla %0.26 ve %0.19 bildirilmiştir (Benjakul vd. 2017a). Çalışmamız sonuçları diğer çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

5.2.4. Ham kül analiz sonuçları

Biyokalsiyum tozunda kül, ürünün yanmayan mineral maddelerinin toplamını ifade eder. Başka bir deyişle, biyokalsiyum tozu yüksek sıcaklıkta (genellikle 500–600 °C) yakıldığında geride kalan inorganik mineral kalıntısı kül olarak adlandırılır. Biyokalsiyum çoğunlukla kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) veya kalsiyum fosfat ($Ca_3(PO_4)_2$) içerir. Bu maddeler organik kısımlar yandıktan sonra kül olarak geride kalır. Kül miktarı

ne kadar yüksekse, mineral (kalsiyum) içeriği o kadar yüksektir. Yüksek kül değeri genellikle organik artıkların az olduğunu, yağ ve protein gibi yanıcı maddelerin uzaklaştırıldığını, ürünün daha saf bir mineral yapı içerdiğini gösterir. Bu çalışmada ham kül analizi yağı uzaklaştırma işleminin başarısını, protein gibi organik artıkların ne kadar temizlendiğinin ve kalsiyum ekstraksiyonunun veriminin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bunların ortaya konulması üretim sürecinin ne kadar iyi uygulandığını anlamaya yardımcı olacaktır. Çalışmamızda ham balık kemiğinde kül miktarı %34.26 olarak belirlenirken, suda ekstrakte edilmiş biyokalsiyum tozunda %78.99, alkali ekstraksiyon ile elde edilmiş tozların kül içerikleri %86.98 ile %88.46 arasında değişmiştir. Sudaki ekstraksiyonla daha düşük kül içeriği protein ve yağ uzaklaştırmanın diğer gruplara göre yetersiz olduğunu göstermektedir. Bu grubun diğer gruplardan daha yüksek protein ve yağ içeriğine sahip olması bunu doğrulamaktadır. Alkali ekstraksiyonlu diğer grupların kül içerikleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Benzer şekilde milkfish kemiklerinden (Wulandari ve Kusumasari 2019) ve üç balık kemiği *Epinephelus diacanthus, Letrinus fraenatus* ve *Pristipomoides filamentosus*) tozunun kül içeriği, suda ekstrakte elde edilen tozundan önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur (Amitha vd. 2019). Yazılı orkinos gözünün dış beyaz tabakasındaki) kıkırdak yapısından elde edilen biyokalsiyum tozunda kül miktarı %60.51 olarak belirlenmiştir (Pudtikajorn vd. 2023). Sarıkanat orkinos ham kemiğinde kül %53.43 iken biyokalsiyum tozuna dönüştüğünde %77.97 olarak belirlenmiştir (Nemati vd. 2017). Atlantik somonu ve baltık morinasında ham kemik kül içerikleri %4.09 ve 5.91 iken biyokalsiyum tozlarında kül içerikleri %70.15 ve %73.28 olarak belirlenmiştir (Bubel vd. 2015). Somon kemiklerinden alkali yöntemle elde edilen biyokalsiyum tozunda kül oranı %82.78 olarak belirlenmiştir (Idowu vd. 2020). Biyokalsiyum tozunu %8 oranında içeren surimi jeli, kontrole kıyasla daha yoğun ve daha ince bir mikro yapıya ve daha yüksek kül, içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir (Wijayanti vd. 2021a).

Kül/protein oranı, kemiğin sertliğiyle ilişkili kemik mineralizasyonunu gösteren önemli bir kriter olduğu ve kül/protein oranının yüksekliğinin kemik tozunun saflığını gösterdiği bildirilmektedir (Wulandari ve Kusumasari 2019). Kül/protein oranı değeri kemik tozunun saflığını göstermek için kullanılabilir. Eğer Kül/Protein oranı yüksekse biyokalsiyum tozu daha mineral ağırlıklı bir yapıdadır, organik artıklar daha azdır, üretim sırasında protein ve yağ uzaklaştırma işlemleri daha iyi yapılmış denilebilir. Kül/protein oranının yüksek olması ürünün daha saf mineral ve daha düşük organik kalıntı içerdiğini doğrular. Çalışmamızda kül protein oranları oldukça yüksek bulunmuştur. En düşük oran suda ekstrakte edilen örnekte saptanmıştır. Alkali ekstraksiyonlu örneklerde oran yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar oldukça saf biyokalsiyum üretildiğini ortaya koymaktadır.

5.3. Mineral madde analiz sonuçları

5.3.1. Kalsiyum (Ca) ve Fosfor (P)

Bu çalışmada biyoyararlanımı yüksek biyokalsiyum üretimi amaçlanmıştır. Yani biyolojik olarak daha kolay emilen veya doğal kaynaklardan elde edilen kalsiyum üretimi hedeflenmiştir. Bu amaçla çeşitli yöntemlerle biyokalsiyum üretimi denenmiştir. Elde ettiğimiz ürünlerde kalsiyum ve fosfor düzeylerini belirlemek için de kalsiyum analizi yapılmıştır.

Hidroksiapatit (HA), insan kemiği ve dişlerine benzer bir yapıya sahip, toksik olmayan ve biyoaktif bir seramik malzemedir. Biyoaktif ve toksik olmayan özellikleri nedeniyle hidroksiapatit (HA), kimyasal canlı dokularla kimyasal bağlar kurabilir. HA kararlılık ve mukavemet sağlamak üzere kristal yapılı kalsiyum fosfattan oluşur. HA'da bulunan kalsiyum fosfat, osteoblastların kemik hücrelerine farklılaşmasını başlatmadaki etkili yeteneği nedeniyle onu önemli bir malzeme haline getirmiştir (Redhwi vd. 2024).

Kalsiyum, insan sağlığıyla ilgili en çok incelenen minerallerden biridir ve aynı zamanda insan vücudunda en bol bulunan mineraldir. Kemik sertliğiyle ilişkili hidroksiapatit kristallerinin ana bileşenidir. Bir bireyin vücudundaki toplam kalsiyum içeriği doğumda ~25-30 g'dan iyi beslenmiş bir yetişkinde ~1000-1500 g'a çıkar. Kalsiyum, insan vücudu tarafından sentezlenmeyen temel bir besindir ve büyüme için gerekli olan tüm kalsiyumun yanı sıra günlük kayıpları telafi etmek için de çoğunlukla gıda yoluyla olmak üzere dış kaynaklardan sağlanması gerekir. İnsan vücudundaki kalsiyumun %99'undan fazlası kemik dokusunda ve dişlerde, iskelet sistemine sertlik sağlayarak önemli bir yapısal işlev gören hidroksiapatit formunda depolanır. Kalan (%1'den az) vücut kalsiyumu yumuşak dokularda ve vücut sıvılarında, yani kan ve hücre dışı sıvılarda bulunur (Shkembi ve Huppertz 2022). Yapısal işlevine ek olarak, kalsiyum, döllenme, kan pıhtılaşması, kas kasılması, sinir uyarılarının iletimi, salgı aktivitesi, hücre ölümü, bağışıklık tepkisi, hücre farklılaşması ve enzim aktivasyonu dahil olmak üzere çok sayıda hayati işlevde rol oynar (Theobald 2005). Gerekli miktarda kalsiyuma ulaşmak ve bunu korumak, çocuklarda kemiklerin gelişimi, gücü ve yoğunluğu ile yaşlılarda kemik kaybı ve osteoporotik kırıkların önlenmesi için esastır (Zhu vd. 2012). Yeterli kalsiyum alımı ayrıca hipertansiyon, hiperkolesterolemi, kolon kanseri, böbrek taşları ve abdominal obezite gibi farklı kronik hastalık riskini azaltmaya da katkıda bulunur (Torres vd. 2010; Torres ve Sanjuliani 2012). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), genç yetişkinler için günlük 1000 mg kalsiyum alımını, 65 yaş üstü erkekler, menopoz sonrası kadınlar ve 9-18 yaş arası çocuklar için ise günlük 1300 mg'lık daha yüksek bir alım önermektedir (FAO/WHO 2004). Kalsiyumun başlıca besin kaynakları arasında süt, süt ürünleri, baklagiller ve yapraklı sebzelerdir. Bazı bölgelerde yaygın süt tüketimine rağmen, düşük ve orta gelirli ülkelerde kalsiyum alımı düşük kalmaktadır (Shkembi ve Huppertz 2021). Bu nedenle, doğal olarak zengin gıdalar, zenginleştirilmiş ürünler veya takviyeler yoluyla kalsiyum alımını artırmak etkili bir stratejidir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz biyokalsiyum tozlarının kalsiyum içerikleri %36.28-%38.78 arasında değişmiştir. Ham kemikteki Ca içeriği %35.61 olarak belirlenmiştir. Suda ekstrakte edilen biyokalsiyum tozunun Ca içeriği (%35.95) alkali ekstraksiyonla elde edilenlerden düşük bulunmuştur. Kolajen olmayan proteinlerin uzaklaştırılmasıyla, biyokalsiyum tozundaki Ca daha yoğun hale gelmiştir. En yüksek Ca içeriği B1Y (%38.78) grubunda bulunmuştur. Bu grup aynı zamanda gruplar arasında en düşük yağ ve protein içeriğine sahip olduğu tespit edildi. Bu durum, mineral içeriğini artıran daha düşük organik madde miktarından kaynaklanıyor olabilir. En düşük Ca içeriği ise A2Y (%36.28) grubundaydı. 100°C'de kaynatılan ve sonrasında otoklavlanan Asya levreği kemiğinden elde edilen biyokalsiyum tozunun kalsiyum içeriği %26.13 olarak bildirilmiştir (Wijayanti vd. 2022). İnce yüzgeçli bir deniz balığı (*Nemipterus* sp.) kemik tozunda %25.8 olarak belirlenmiştir (Petrat vd. 2025).

Fosfor (P), insan vücudunda en bol bulunan minerallerden biridir. 70 kg ağırlığındaki bir erkekteki toplam fosfor içeriği yaklaşık 700 gramdır; bunun %85'i

kemik dokusunda ve dişlerde çoğunlukla hidroksiapatit olarak, %14'ü yumuşak dokularda ve %1'i hücre dışı boşlukta bulunur. İnorganik fosfor (P_i), hücresel metabolizma, hücre sinyalizasyonu, koenzimler, nükleotid metabolizması, enerji metabolizması, membran fonksiyonu ve kemik mineralizasyonu gibi biyolojik süreçlerde çok sayıda role sahiptir. Et, süt ürünleri ve tahıl ürünleri fosfor bakımından zengindir ve ortalama bir diyette toplam fosfor alımına en büyük katkıyı sağlarlar. P'nin biyoyararlanımı gıda kaynakları arasında farklılık gösterir. Gıdalardaki çeşitli fosfor formlarının biyolojik bulunabilirliği, diyetin fosfor içeriğini değerlendirirken dikkate alınmalıdır (Lamberg-Allardt vd. 2010). Kalsiyum ve fosfor, insan vücudunda en bol bulunan iki mineral olup, kemik ve diş dokusunun temel yapısında yer alırlar. Bu iki mineralin doğru oranlarda alınması, özellikle çocukluk, ergenlik, gebelik ve yaşlılık dönemlerinde büyük önem taşır. Son yıllarda biyokalsiyum tozu, doğal kaynaklı ve yüksek emilim oranlı bir mineral takviyesi olarak öne çıkmaktadır. Fosfor, biyokalsiyum tozundaki en önemli eş minerallerden biridir. Fosfor oranı özellikle hidroksiapatit içeren biyokalsiyumlarda yüksektir. Biyokalsiyum tozunun öne çıkan özelliği, kalsiyum ve fosforun doğal mineral matriksi içinde birlikte bulunmasıdır. Bu yapı, vücutta daha dengeli bir emilim sağlar. Araştırmalar, kalsiyumun fosforla doğal bir kompleks halinde sunulmasının kemik yoğunluğunu artırdığını, emilim toleransını yükselttiğini ve sindirim sisteminde daha az irritasyona yol açtığını göstermektedir. Ca/P oranı, hem insan hem hayvan sağlığında kemik mineralizasyonunu belirleyen en önemli biyokimyasal parametrelerden biridir. Kemik fizyolojisine en yakın Ca/P oranı 1.6–1.7 civarındadır çünkü doğal kemik mineralizasyonuna en yakın oran budur. Bu oranı korumak kalsiyum ve fosforun birlikte ve dengeli emilimini sağlar, kemik yapısının sağlamlığını artırır ve mineral dengesizliklerinin oluşmasını engeller.

Çalışmamızda ham kemikteki P oranı 25.73 g/100g olarak belirlenen fosfor içerikleri biyokalsiyum tozlarında 26.95-28.36 g/100g arasında belirlenmiştir. Kemik biyokalsiyuma dönüşünce fosfor oranı artmıştır. Ca/P oranı ise 1.22-1.40 arasında bulunmuştur. Asya levreğinden yağ uzaklaştırma yapılan ve yapılmayan biyokalsiyum üretiminde örneklerde sırasıyla fosfor oranı 14.07 ve 14.51 g/100 g, Ca/P oranı ise 1.30 ve 1.39 olarak belirlenmiştir (Benjakul vd. 2024). Tongol ve sarıkanat orkinos kemiklerinden üretilen biyokalsiyum tozlarında fosfor 12.70 ve 12.74 g/100g, Ca/P oranı ise 1.63 ve 1.62 olarak bildirilmiştir (Benjakul vd. 2017a). Yazılı orkinos kemiklerinden alkali ekstraksiyonla elde edilen biyokalsiyum tozunda fosfor oranı 10.14 g/100g (Benjakul vd. 2018), somon kemiklerinden alkali ekstraksiyonla elde edilen biyokalsiyum tozunda fosfor 14.40 g/100g, alkali olmayanda ise 1.322 g/100g (Idowu vd. 2020), yazılı orkinos gözünün dış beyaz tabakasındaki kıkırdak yapısından elde edilen biyokalsiyum tozunda 10.99 g/100g (Pudtikajorn vd. 2023), atlantik somonu ve baltık morinası biyokalsiyumlarında fosfor 12.50 ve 13.40 g/100g, Ca/P oranları ise 1.99/2.07 (Bubel vd. 2015), yazılı orkinos kemikleri biyokalsiyumunda fosfor oranı 12.63 g/100g Ca/P oranı ise 1.65 (Benjakul vd. 2017b), sarıkanat orkinos kemikleri biyokalsiyumunda 14.58 g/100g, çipura kemiklerinden farklı yöntemlerle elde edilen biyokalsiyum tozlarında 11.16-16.66 g/100g arasında fosfor içerikleri bildirilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları incelendiğinde önceki çalışma sonuçlarının araştırmamız örneklerininkinden düşük olduğu görülmektedir. Diğer çalışmalardakinden daha yüksek fosfor içerikleri nedeniyle Ca/P oranları düşük bulunmuştur. Ancak bu oran biyolojik olarak hâlâ uygun ve dengeli bir mineral profiline işaret etmektedir. Her iki mineralin de emilimini destekleyen dengeli bir oran olarak kabul edilebilir. Bu oran özellikle fonksiyonel gıdalar,

kalsiyum takviyeli ürünler, bebek ve yaşlı beslenme formülasyonları ve sporcu ürünleri için stabil ve formülasyona uygun bir mineral kompozisyonu sunmaktadır.

5.4. Amino asit kompozisyonu analizi sonuçları

Çalışmamızda biyokalsiyum örneklerinde toplam 17 amino asit belirlenmiştir. Bunlar, alanin (15.86-18.12 mg/g), glisin (35.43-38.12 mg/g), treonin (3.01-3.76 mg/g), lisin (5.08-5.98 mg/g), arginin (7.95-9.46 mg/g), histidin (2.10-2.42 mg/g), aspartik asit (2.03-2.17 mg/g), glutamik asit (15.43-16.26 mg/g), serin (6.12- 6.80 mg/g), prolin (14.0-15.26 mg/g), hidroksiprolin (13.83-15.82 mg/g), valin (4.02- 4.80 mg/g), metiyonin (2.71-2.93 mg/g), tirozin (0.59-0.68 mg/g), lösin (4.20-4.80 mg/g), izolösin (2.02-2.24 mg/g) ve fenilalanin (2.51-2.89 mg/g) amino asitleridir. İnsan vücudunda sentezlenemeyen ve besinlerle alınması gereken esansiyel amino asitler (lisin, valin, lösin, izolösin, metiyonin, treonin, histidin, fenilalanin ve triptofan) biyokalsiyum örneklerinde saptanmıştır. Alkali ekstraksiyonla elde edilen örneklerin amino asit içerikleri ham kemiktekinden yüksek bulunmuştur. Örneklerin hepsinde başlıca amino asit glisin olarak belirlenmiştir. Tirozin, aspartik asit, histidin ve izolösin en düşük oranda bulunan amino asitler olmuştur. Sistin ise hiçbir örnekte saptanmamıştır. Glisin kolajenin ana bileşenidir, kolajenin yaklaşık %30'u glisinden oluşur. Glisin, kemik sertliğini ve esnekliğini sağlayan temel yapı taşlarından biridir. Glisin hem kalsiyum emilimine hem de kemik matriksinin biyokimyasal yapısına katkıda bulunan çok yönlü bir amino asittir. Örneklerimizde glisinin yüksek çıkması ürünlerimizin kolajen, kemik ve emilim destekli güçlü bir formül olduğunu göstermektedir.

Glisinden sonra en fazla bulunan amino asitler alanin, glutamik asit, prolin ve hidroksiprolin olmuştur. Kolajendeki amino asitlerin %57'sini oluşturan glisin, prolin ve hidroksiprolin, kolajenin yapısı ve stabilitesi için gereklidir. Glisin sıkı üçlü sarmalın içine yerleşirken, prolin yapısal sağlamlık kazandırırken, hidroksiprolin molekül içi hidrojen bağı yoluyla termal stabiliteyi artırır. Hidroksiprolin, protein sentezinden sonra prolil hidroksilaz tarafından katalize edilen prolinin metabolik bir türevidir. Sadece kolajenin yapısal bir bileşeni olarak değil, aynı zamanda glisin sentezinde bir substrat olarak da görev yapar ve prolinin bozunmasını azaltarak prolini potansiyel olarak korur (Zhang vd. 2025). Alkali işlemden sonra, kolajen proteinler hafifçe yoğunlaşmış ve diğer proteinler de aynı anda uzaklaşmış olabilir. Biyokalsiyum, kolajen, kondroitin, peptitler ve amino asitleri içeren organik bir kalsiyum kompleksini temsil eder ve geleneksel inorganik kalsiyum kaynaklarına kıyasla üstün biyoyararlanım gösterir. Bu gelişmiş biyoyararlanım, fosfat tuzu çökelmesini önleyen ve böylece emilim verimliliğini artıran peptit-kalsiyum bağlama mekanizmalarından kaynaklanır (Mungmueang vd. 2025). Biyokalsiyumun gastrointestinal sindirimi sırasında mevcut olan kolajen peptitler kalsiyum taşıyıcıları olarak işlev görebilir ve böylece kalsiyum çözünürlüğünü artırabilir. Bu peptitler ayrıca ince bağırsaktaki hücreler arasında kalsiyumun paraselüler taşınmasını da indükleyerek biyokalsiyumun yüksek biyoyararlanımına yol açabilir (Idowu vd. 2019). Biyokalsiyum tozu hidroksiapatitin ana kristal formudur. Bununla birlikte, hidroksiapatit bileşikleri yüksek kristallikleri ve özgül kimyasal yapıları nedeniyle düşük suda çözünürlüğe sahiptir. Bu durum, çözünme, çökelme ve faz dönüşümü gibi işlemler için iyi çözünürlüğün önemli bir parametre olduğu gıda ürünlerindeki uygulamasını sınırlayabileceği ve böylece insan vücudundaki emilimini engelleyebileceği bildirilmiştir (Phengleng vd. 2025). İstavritteki kolajenle ilişkili amino asit miktarının diğer amino asitlere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Toppe vd. 2007). Glisin kolajende

bulunan benzersiz bir amino asittir. Hidroksiprolin içeriğinin varlığı, toz numunede kolajenöz madde varlığını gösterir (Benjakul vd. 2017a). Hidroksiprolin en yüksek B1X (15.91 mg/g) ve B2X (15.82 mg/g) gruplarında belirlenmiş olup en düşük A2Y (13.84 mg/g) grubunda belirlenmiştir. Ham kemik örneğinde ise hidroksiprolin içeriği diğer gruplardan düşük bulunmuştur. Ham kemik örneğindeki düşük hidroksiprolin içeriği, et, kan, lipit vb. içeriği nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Diğer biyokalsiyum gruplarının üretim işlemleri sırasında protein ve yağ uzaklaştırma işlemleri hidroksiprolinin konsantre olmasına neden olmuştur. Ham kemikteki düşük hidroksiprolin içeriği yayın balığı kemiği biyokalsiyum tozu için de bildirilmiştir (Sriket vd. 2023). Kolajende bulunan prolin ve hidroksiprolin gibi bazı amino asitlerin, hayvanlarda bağırsaklar yoluyla kalsiyum emilimini uyarabileceği bildirilmiştir (Rezvani Ghomi vd. 2021). Idowu vd. (2020) somon kemiğinden alkali yöntemle elde edilen biyokalsiyumda 5.07 mg/g, alkali olmayan yöntemle daha yüksek (14.79 mg/g) hidroksiprolin içeriği bildirmiştir. Tongol ton balığı ve sarıkanat orkinos kemiğinden biyokalsiyum tozunda hidroksiprolin miktarı sırasıyla 17.888 mg/g ve 15.80 mg/g bulunmuştur (Benjakul vd. 2017a). Asya levreğinden yağ uzaklaştırma yapılan ve yapılmayan biyokalsiyum üretiminde örneklerde hidroksiprolin içeriği sırasıyla 12.86 ve 15.21 mg/g olarak belirlenmiştir (Benjakul vd. 2024). İnce yüzgeçli bir deniz balığı (*Nemipterus* sp.) kemik tozunda 8.6 mg/g olarak belirlenmiştir (Petrat vd. 2025). Asya levreğinin solungaçlarından elde edilen ve ağartma uygulanmamış ve uygulanmış biyokalsiyum tozlarında hidroksiprolin içeriği sırasıyla 39.40 ve 36.80 mg/g bulunmuştur (Patil vd. 2025). Wijayanti vd. (2021b) tarafından farklı sürelerde yüksek basınçlı ısıtmayla otoklavlanan Asya levreği (*Lates calcarifer*) omurgasının fiziksel ve kimyasal özelliklerinin incelendiği bir çalışmada ısıtma süresi arttıkça hidroksiprolin içeriğinin arttığı bildirilmiştir.

5.5. Renk ölçüm sonuçları

5.5.1. L* değeri ölçüm sonuçları

Çalışmamızda en yüksek L* değeri suda ekstrakte edilen örnekte bulunmuştur, istatistiksel olarak diğer örneklerden anlamlı şekilde ayrılmış olup, biyokalsiyum tozu içerisinde en açık renkli ve en yüksek beyazlık düzeyine sahip örnek olarak dikkat çekmektedir. Bunu A2Y ve B1X örnekleri takip etmiş, bu örnekler yüksek L* değerleriyle nispeten daha parlak ve açık tonlu yapılarını korumuştur. Biyokalsiyum tozu üretiminde renk parametreleri değerlendirildiğinde hidrojen peroksitin, sodyum hipoklorite göre daha homojen, daha doğal ve daha açık bir renk oluşturduğu; bu nedenle renk üzerinde daha olumlu etki yaratan ağartıcı ajan olduğu görülmüştür. En düşük L* değeri B1Y örneğinde gözlenmiş olup, bu değer bu örneğin diğerlerine kıyasla bir miktar daha koyu bir tona sahip olduğunu göstermektedir. L* değerlerindeki bu farklılıkların, biyokalsiyum tozunun partikül büyüklüğü, mineralizasyon derecesi, organik madde miktarı ve ısıl işlem şiddeti gibi üretim parametrelerinden etkilendiği değerlendirilmektedir. Ayrıca L* değerinin artması, örneklerde daha ileri işlem görme veya beyazlatıcı etkiye sahip mineral yapının baskınlığı ile ilişkilendirilebilir.

5.5.2. a* değeri ölçüm sonuçları

Biyokalsiyum tozlarına ait a* değerleri incelendiğinde örneklerin çoğunun negatif a* değerine sahip olduğu görülmektedir. Bu durum, kemik tozunun genel olarak kırmızı

ekseninden yeşil eksenine doğru kaydığını ve rengin daha soğuk tonlarda olduğunu göstermektedir. B2Y grubu hafif pozitif a* değerleri ile nötre yakın, çok düşük düzeyde kırmızımsı ton sergilemiş; bu durum bu örneğin diğerlerine kıyasla daha yüksek organik madde içerdiğini düşündürmektedir. Nitekim protein ve yağ analiz sonuçları incelendiğinde en yüksek protein ve yağ bu grupta saptanmıştır. Buna karşın A2X, A1Y, B1X, B2X hafif-orta düzeyde negatif değerlerle yeşilimsi renk göstermiştir. A2Y örneği (-1.41) tüm gruplar içinde en yüksek negatif a* değerine sahip olup, en belirgin yeşil tonu göstermiştir. Bu sonuç, A2Y grubunun mineralizasyon düzeyinin en yüksek örnek olduğunu düşündürmektedir. Nitekim gruplar içinde fosfor oranı en yüksek grup A2Y olmuştur. Kül içerikleri bakımında gruplar arasında istatistiksel bir fark olmamakla birlikte oransal olarak B2Y daha yüksek kül içeriğine sahiptir. Genel olarak a* değerlerindeki bu farklılıklar, kemik tozunda uygulanan işlem derecesi ve organik–inorganik bileşen oranlarındaki değişimlerin renk üzerine etkisini açıkça ortaya koymaktadır.

5.5.3. b* değeri ölçüm sonuçları

Alkali ekstraksiyonla elde edilen biyokalsiyum tozlarında daha yüksek b* değerleri elde edilmiştir. Bu değerler alkali ekstraksiyonla elde edilen tozların renkleri sudakinden daha fazla sarı anlamına gelmektedir. Alkali ekstraksiyon grupları arasında en yüksek b* değeri A1X grubunda en düşük değer ise B2Y grubunda saptanmıştır. Grupların b* değerleri incelendiğinde NaOCl ile ağartma işleminin daha başarılı olduğu görülmektedir. Bu grupta hem protein uzaklaştırmada hem de ağartma işleminde NaOCl kullanılmış olması renk üzerindeki etkisini artırmıştır.

5.5.4. Beyazlık (whiteness) indeksi sonuçları

Beyazlık indeksi, bir maddenin görsel olarak ne kadar beyaz göründüğünü sayısal olarak ifade eden bir parametredir. Bu formül maddeyi “ideal beyaz” (L*=100, a*=0, b*=0) noktasına göre değerlendirir. Yüksek indeks daha beyaz, düşük indeks sarı ve renkli görünüm anlamına gelir. L* ne kadar yüksekse (100’e yakın), toz o kadar beyaz görünür. Çalışma örneklerimizde en yüksek beyazlık suda ekstrakte edilen örneklerde belirlenmiştir. Bunu B2Y ve B1Y izlemiştir.

Biyokalsiyum tozunun beyazlığı, müşteri memnuniyetiyle ilişkilidir. Sodyum hipoklorit (NaOCl) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılarak yapılan ağartma, tek başına veya birlikte kullanıldığında biyokalsiyumun beyazlığını artırabilir. Önceden pişirilmiş tongol ve sarıkanat orkinos kemiklerinden elde edilen biyokalsiyum tozlarının L* değeri, %2.5 (w/w) NaOCl ile 30 dakika ve ardından %2.5 (w/w) H_2O_2 ile 60 dakika ağartıldığında sırasıyla 93.92 ve 92.52 olmuştur (Benjakul vd. 2017a). Ayrıca, en yüksek L* değeri (92.26), Asya levreği (*Lates calcarifer*) omurga biyokalsiyumu üretiminde ağartma maddesi olarak yalnızca H_2O_2 kullanıldığında gözlenmiştir (Wijayanti vd. 2021c).

Çalışmamızda genel olarak alkali ekstraksiyonla elde edilen biyokalsiyum tozları daha kremsi renk sergilemiştir. Petrat vd. (2025) ince yüzgeçli bir deniz balığı (*Nemipterus* sp.) kemiğinden biyokalsiyum tozunda kalsine kemik tozundan daha düşük L* ve daha yüksek a* ve b* değerleri ile kremsi beyaz renk gözlendiğini ve bu sarımsı rengin biyokalsiyum tozundaki amino asit ve lipitlerin varlığı ve oksidasyonundan

kaynaklanmış olabileceğini, lipit oksidasyonu sırasında, karbonil bileşikleri amino asitler, peptitler veya proteinlerdeki serbest amino gruplarıyla etkileşime girebileceği ve özellikle de kurutma sırasında olabilecek Maillard reaksiyonlarının neden olabileceğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Benjakul vd. (2017b) önceden pişirilmiş orkinos kemiklerinden elde edilen biyokalsiyum tozunun, kalsine edilmiş kemik tozuyla karşılaştırıldığında, kremsi beyazımsı bir renk, daha yüksek b* değeri ve daha düşük L* değeri bildirmişlerdir.

5.6. Uçucu aroma bileşenleri

Bu çalışmada biyokalsiyum tozunda uçucu aroma bileşenlerinin varlığı GC-MS yöntemi ile araştırılmış ve yapılan analizlerde herhangi bir uçucu bileşiğin tespit edilememiş olması önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Uçucu bileşiklerin tamamen yokluğu, ürünün üretim süreci boyunca uygulanan işlemlerin organik bileşenleri büyük ölçüde elimine edecek nitelikte olduğunu göstermektedir. Özellikle biyokalsiyum üretiminde yaygın olarak kullanılan çok aşamalı yıkama, yağ giderme, yüksek sıcaklıkta pişirme veya kurutma, enzimatik hidroliz sonrası saflaştırma gibi işlemler; lipit, protein ve diğer organik fraksiyonların uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Bunun sonucunda, uçucu bileşik oluşumuna neden olan lipit oksidasyonu, protein deaminasyonu, mikrobiyal metabolit üretimi, Maillard reaksiyonları veya fermentatif yan ürünler gibi mekanizmaların tamamı sınırlandırılmış ya da tamamen engellenmiş olabilir.

Biyokalsiyum hammaddesinin büyük ölçüde mineral ağırlıklı yapıya dönüşmesi, özellikle kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat gibi yapısal bileşenlerin baskın olması, ürünün uçucu bileşik üretme kapasitesini doğal olarak azaltmaktadır. Ayrıca üretim sürecinin yüksek sıcaklık içermesi, uçucu bileşiklerin termal olarak parçalanmasına veya buharlaşarak sistemden uzaklaşmasına neden olmuş olabilir. Bu durum özellikle düşük kaynama noktasına sahip aldehit, keton, ester ve amin gibi aroma bileşenlerini tamamen ortadan kaldırabilmektedir.

Uçucu bileşik tespit edilmemesinin bir diğer olası nedeni, mevcut bileşiklerin GC-MS cihazının tespit limit değerlerinin altında kalmasıdır. Bu durumda eser seviyelerde uçucu bileşikler ürün içinde bulunuyor olsa bile analitik olarak belirlenemeyebilir. Ancak yapılan çoklu analizlerde hiçbir bileşiğin saptanmamış olması, miktarların muhtemelen pratik olarak ihmal edilebilir seviyede olduğunu göstermektedir.

Elde edilen bu sonuçlar, incelenen biyokalsiyum tozunun yüksek saflıkta, kokudan arındırılmış, aroma açısından nötr, gıda uygulamalarında kullanılmaya uygun bir mineral materyal olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle fonksiyonel gıdalar, takviye edici gıdalar veya farmasötik formülasyonlarda koku ve tat sorunlarına yol açabilecek uçucu bileşiklerin bulunmaması, ürünün teknolojik ve duyusal açıdan avantajlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu durum, biyokalsiyum üretim sürecinin etkinliğini ve süreç boyunca uygulanan saflaştırma aşamalarının başarıyla optimize edildiğini kanıtlamaktadır.

Sonuç olarak, uçucu aroma bileşiklerinin tespit edilmemiş olması, hammadde özellikleri ve uygulanan işlemler dikkate alındığında beklenen bir bulgu olup, geliştirilen biyokalsiyum tozunun yüksek kalite standartlarına ve hedeflenen fonksiyonel özelliklere uygun olarak üretildiğini göstermektedir.

5.7. Köfte analiz sonuçları

5.7.1. Tekstür analiz sonuçları

Sertlik (hardness)

Köfte formülasyonlarına farklı oranlarda biyokalsiyum tozu ilavesinin sertlik (hardness) değerleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla tekstür profil analizi (TPA) yürütülmüştür. Elde edilen bulgular, biyokalsiyum seviyesindeki artışın köftelerin sertlik özelliklerini güçlü biçimde etkilediğini göstermiştir. Bulgular incelendiğinde biyokalsiyum tozu ilave edilmemiş kontrol grubunun (BK0) sertlik değerinin oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu değer, BKT içeren grupların sertlik ortalamalarıyla karşılaştırıldığında çok daha düşük olup, biyokalsiyumun köfte tekstürü üzerinde son derece belirgin bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Biyokalsiyum tozunun %5 oranında ilave edildiği BK5 grubunda sertlik değeri yaklaşık 12 kat artarak 1848.54 g'a yükselmiştir. Bu dramatik artış, biyokalsiyum tozunun protein yapısı ile etkileşerek ısıl işlem sırasında daha yoğun, kompakt ve daha sert bir matriks oluşturduğunu düşündürmüştür. Biyokalsiyum tozu oranının %10'a yükseltildiği BK10 grubunda sertlik değeri 2528.22 g'a çıkarak BK5'ten anlamlı şekilde daha yüksek bir seviyeye ulaşmıştır. Bu durum, biyokalsiyum tozu konsantrasyonunun artmasının köfte yapısında daha güçlü bir protein-mineral bağlanmasına, ağ yapısının daha yoğunlaşmasına ve dolayısıyla tekstürel sertliğin daha da artmasına neden olduğunu göstermiştir.

Biyokalsiyumun yüksek oranda kalsiyum içermesi, proteinlerin çapraz bağlanmasını güçlendirmekte, bu da jel yapının sıkılığını artırmaktadır. Bu mekanizma doğrultusunda biyokalsiyum ilave edilen köftelerde su tutma kapasitesi azalabilir veya değişebilir, protein matriksinin kompaktlığı artabilir ve çiğneme direnci belirgin şekilde yükselir.

Esneklik (springiness)

Esneklik (springiness), esas olarak ısıl işlem sırasında oluşan protein jel yapısının esnekliğine bağlıdır. Kalsiyum gibi çok değerli mineraller, miyofibriler proteinlerle etkileşerek proteinler arası bağlanmayı artırır, jel yapıyı sıkılaştırır, su migrasyonunu değiştirir. Bu mekanizmalar springiness değerinin artmasına veya azalmasına neden olabilir. Kalsiyum iyonlarının jel kompaktlığını artırdığı, bunun bazı durumlarda esneklik davranışını sınırlayabildiği belirtilmiştir. Kalsiyum kaynaklı konformasyonel modifikasyonların, kompakt ve homojen üç boyutlu bir jel ağının oluşumundan ve dolayısıyla termal jelleşme özelliklerinin iyileştirilmesinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Xiao vd. 2021).

Çalışmamızda biyokalsiyum sertliği dramatik biçimde artırmasına rağmen esneklik üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemiştir. Ancak ortalama değerlerde BKT arttıkça esnekliğin yükseldiği bir eğilim gözlenmiştir. Biyokalsiyum tozu ilavesi köftelerin springiness değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim oluşturmamıştır ($p>0.05$). Bununla birlikte ortalama değerler incelendiğinde BKT düzeyinin artışıyla birlikte springiness değerlerinde yükselme eğilimi dikkat çekmektedir. Bu durum, kalsiyumun miyofibriler proteinler arasındaki iyonik etkileşimleri artırarak daha kompakt ve aynı zamanda elastik bir jel yapısının oluşmasına katkı sağladığı

şeklinde değerlendirilebilir. Özellikle BK10 grubunda sertlikteki artışa rağmen elastikiyetin düşmemesi, biyokalsiyumun ürün yapısında kırılganlık oluşturmadan jel matriksini güçlendirdiğini düşündürmektedir. Buna ek olarak BK10 grubunda varyasyonun yüksek olması, yüksek düzey biyokalsiyum ilavesinin jel yapıda heterojenliğe neden olabileceğini göstermiştir.

Bağlılık (cohesiveness)

Cohesiveness, köftenin veya et ürünlerinin tek parça halinde kalma yeteneği, yani ilk ısırmadan sonra parçalanmadan tekrar bir araya gelme kapasitesidir. Tekstür profil analizi (TPA) testinde ikinci ısırma kuvvetinin birinci ısırma kuvvetine oranı ile hesaplanır. Miyofibriler protein ağının yoğunluğu ve proteinler arası bağlanma, cohesiveness'i belirler. Biyokalsiyum tozu köfteye eklendiğinde, içerdiği kalsiyum sayesinde miyofibriler proteinler arasında iyonik köprüler oluşturarak protein ağının yoğunluğunu artırır. Bu durum, köftenin cohesiveness değerlerini yükseltir, yani ürünün parçalanmadan bir bütün hâlinde kalma yeteneğini güçlendirir. Ancak biyokalsiyum oranı çok yüksek olursa aşırı sertleşme nedeniyle üründe küçük kırılmalar oluşabilir ve bu durum cohesiveness üzerinde hafif azalmaya yol açabilir. Genel olarak orta düzey biyokalsiyum ilavesi köfte tekstüründe hem sertlik hem de cohesiveness açısından olumlu etki sağlar.

Çalışmamızda Biyokalsiyum tozu (BKT) ilavesi, köfte ürünlerinin cohesiveness değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmamıştır ($p>0.05$). Bununla birlikte ortalama değerlere bakıldığında, %5 biyokalsiyum tozu ilavesiyle cohesiveness değerlerinde hafif bir artış gözlenmiş, %10 biyokalsiyum tozu ilavesinde ise hafif bir düşüş görülmüştür. Bu bulgular literatürde bildirilen mekanizmalarla uyumludur. Kalsiyum iyonları miyofibriler proteinler arasında iyonik köprüler oluşturarak jel yapıyı güçlendirir ve protein ağının bütünlüğünü artırır. Bu sayede cohesiveness, yani ürünün parçalanmadan bir arada kalma kapasitesi yükselir. Ancak biyokalsiyumun yüksek düzeyde eklenmesi, protein ağını aşırı sıkılaştırarak bazı bölgelerde kırılganlığa yol açabilir ve bu da cohesiveness üzerinde hafif bir düşüşe neden olabilir. Sonuç olarak, köftelerde biyokalsiyum ilavesi cohesiveness üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmamış olsa da ortalama değerlerdeki eğilim, orta düzey BKT ilavesinin protein ağının bütünlüğünü artırarak ürünün yapısal stabilitesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Yani biyokalsiyum, hem sertliği artırırken hem de cohesiveness'i büyük ölçüde koruyabilen bir fonksiyonel katkı olarak değerlendirilebilir.

Sakızımsılık (gumminess)

Sakızımsılık, genellikle yarı katı gıdaların sertlik (hardness) ve cohesiveness'in çarpımı ile hesaplanan bir TPA parametresidir:

$$\text{Gumminess} = \text{Hardness} \times \text{Cohesiveness}$$

Yani, gıda hem sert hem de bütünlüğünü koruyorsa, sakızımsılık yüksek olur. Sakızımsılık, ürünün ağızda çiğnenirken verdiği yoğunluk ve dayanıklılık hissi ile ilgilidir. Biyokalsiyum tozu ilavesi köfte ürünlerinin sakızımsılık (gumminess) değerlerini artırabilir. Sakızımsılık, sertlik ve cohesiveness'in çarpımı ile hesaplandığı

için, BKT'nin sertlik üzerinde dramatik etkisi gumminess değerinin artmasına yol açmaktadır. Cohesiveness değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiş olsa da ortalama değerlerdeki hafif artış, sakızımsılığın yükselmesine katkıda bulunabilir. Bu bulgular, kalsiyumun protein matriksini güçlendirerek hem ürün sertliğini hem de ağızda çiğneme sırasında hissedilen dayanıklılığı artırdığını göstermektedir.

Çalışmamızda biyokalsiyum tozu ilavesi köfte örneklerinin sakızımsılık (gumminess) değerlerini önemli ölçüde artırmıştır. Kontrol grubunda 120.74 g olan gumminess, %5 BKT içeren BK5 grubunda 1582.99 g'a ve %10 biyokalsiyum içeren BK10 grubunda 2121.28 g'a yükselmiştir. Bu artış istatistiksel olarak BK0 ile BKT içeren gruplar arasında anlamlıdır ($p<0.05$), ancak BK5 ve BK10 arasında fark anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuç, biyokalsiyum tozunun sertliği dramatik biçimde artırması ve protein ağını güçlendirmesi ile uyumludur; çünkü sakızımsılık, sertlik ile cohesiveness'in çarpımı ile hesaplanmaktadır. Kalsiyum iyonlarının miyofibriler proteinlerle oluşturduğu iyonik köprüler, jel yapıyı daha sıkı ve dayanıklı hale getirerek ağızda çiğneme sırasında yoğun ve bütünleşik bir his sağlamaktadır.

Çiğnenebilirlik (chewiness)

Çiğnenebilirlik, katı veya yarı katı gıdaların ağızda çiğneme sırasında enerji gerektiren dayanıklılığıdır. Yani, çiğnenebilirlik, sertlik, cohesiveness ve elastikiyetin birleşik etkisi ile ortaya çıkar. Et ürünlerinde yüksek chewiness, ürünün yoğun, elastik ve ağızda doyurucu bir his verdiğini gösterir (Bourne 2002).

Chewiness= Gumminess X Springiness

Biyokalsiyum tozu ilavesi, köfte örneklerinin çiğnenebilirlik (chewiness) değerlerini önemli ölçüde artırmıştır. Kontrol grubunda 114.15 g olan chewiness, %5 BKT içeren BK5 grubunda 1651.20 g'a ve %10 biyokalsiyum içeren BK10 grubunda 4111.27 g'a yükselmiştir. İstatistiksel analiz, BK0 ve BK10 grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir ($p<0.05$), BK5 ise geçiş grubu olarak istatistiksel olarak her iki gruptan farklı bulunmamıştır. Bu artış, biyokalsiyumun sertlik ve elastikiyet üzerinde oluşturduğu etkilerle uyumludur; sertlik dramatik biçimde yükselmiş, springiness ise artış eğilimi göstermiştir. Kalsiyum iyonlarının protein matriksini güçlendirmesi, köftenin ağızda hem dayanıklı hem elastik olarak çiğnenmesini sağlayarak chewiness'in yükselmesine neden olmuştur. BK10 grubunda gözlenen yüksek varyans, yüksek biyokalsiyum konsantrasyonunun jel yapıda heterojenlik yaratabileceğini göstermektedir.

Elastikiyet (Resilience)

Resilience, bir gıdanın ilk ısırma/deformasyon sonrası hızla orijinal şekline geri dönme yeteneğidir. TPA'da genellikle ilk deformasyonun yük alanının elastik geri dönüş oranı olarak hesaplanır. Yüksek resilience ürün elastik ve hızlı geri dönen yapıda, düşük resilience ise ürün daha yumuşak veya plastik davranış gösterir anlamına gelmektedir. Biyokalsiyum tozu ilavesi, köfte örneklerinin resilience değerlerini artırabilir. Resilience, ilk deformasyon sonrası ürünün orijinal şekline geri dönme yeteneğini gösterir ve protein matriksinin elastikiyetine bağlıdır. BKT'deki kalsiyum iyonları, miyofibrilar proteinler arasında iyonik köprüler oluşturarak hem sert hem elastik bir yapı meydana getirir.

Çalışmamızda biyokalsiyum tozu ilavesi, köfte örneklerinin resilience değerlerinde hafif bir azalmaya yol açmıştır. Kontrol grubunda 0.585 olan resilience, BK5 ve BK10 gruplarında sırasıyla 0.576 ve 0.529'a düşmüştür. Bu düşüş, yüksek biyokalsiyum konsantrasyonunun protein ağını aşırı sıkılaştırarak elastik geri kazanım kapasitesini sınırlamasından kaynaklanabilir. Cohesiveness değerleri sabit kalmasına rağmen, springiness artış eğilimi bazı elastikiyeti korusa da sertlikteki dramatik artış resilience'in azalmasına neden olmuştur.

Sonuç olarak tüm TPA parametrelerini değerlendirecek olursak, biyokalsiyum tozu ilavesi köftenin tekstürel özelliklerini çok yönlü biçimde modifiye etmiştir. Sertlik, sakızımsılık ve çiğnenebilirlik parametrelerinde gözlenen belirgin artışlar, biyokalsiyumun protein matriksini güçlendirerek et ürünlerinde mekanik dayanıklılığı artırdığını göstermektedir. Bu artışlar, köftenin ağızda daha yoğun, doyurucu ve dayanıklı bir dokuya sahip olmasını sağlar; özellikle çiğnenebilirlik ve sakızımsılıkta görülen yükselişler, tüketicinin ağızda algıladığı elastikiyet ve çiğneme deneyimini doğrudan olumlu yönde etkiler. Springiness ve cohesiveness değerlerinin korunması, BKT ilavesinin sadece sertliği artırmakla kalmayıp, ürünün iç bütünlüğünü ve elastik davranışını büyük ölçüde koruduğunu ortaya koymaktadır. Bu, köftenin hem dayanıklı hem de ağızda doğal bir esnekliğe sahip olmasını sağlayarak tekstürel kaliteyi destekler. Öte yandan, resilience değerlerinde gözlenen hafif azalma, yüksek biyokalsiyum konsantrasyonunun protein ağını aşırı sıkılaştırarak elastik geri kazanım kapasitesini kısmen sınırladığını göstermektedir. Bu durum, özellikle BK10 grubu gibi yüksek mineral içerikli örneklerde, jel yapıda heterojenliğe bağlı olarak bazı bölgelerde elastik geri dönüşün daha sınırlı olabileceğini düşündürmektedir. Tüm bu bulgular bir araya getirildiğinde biyokalsiyum tozunun köfte gibi et ürünlerinde fonksiyonel bir katkı maddesi olarak hem mekanik dayanıklılığı hem de ağızda doyurucu çiğneme deneyimini artırdığı söylenebilir. BKT ilavesinin optimal düzeyleri, ürünün sertliğini artırırken, elastikiyet ve bütünlüğü koruyacak şekilde ayarlanabilir; böylece tüketici beklentilerine uygun, yüksek kaliteli tekstürel özellikler sunulabilir. Bu açıdan, biyokalsiyum tozu hem ürün stabilitesi hem de tüketici deneyimi açısından köfte üretiminde değerli bir katkı maddesi olarak öne çıkmaktadır.

5.7.2. Renk ölçüm sonuçları

Renk değerleri üzerindeki biyokalsiyum ilavesinin etkisi incelendiğinde, özellikle iç yüzey ölçümlerinde anlamlı farklılıklar olduğu, dış yüzeyde ise değerlerin daha stabil kaldığı belirlenmiştir. İç yüzey L* değerleri BK0, BK5 ve BK10 gruplarında sırasıyla 55.47 ± 5.23, 50.91 ± 1.33 ve 60.34 ± 4.61 olarak ölçülmüştür. BK5 grubunun kontrol grubuna göre daha düşük L* değerine sahip olduğu, buna karşın BK10 grubunda açıklığın belirgin biçimde arttığı görülmektedir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre BK10 grubunun en yüksek L* değerine sahip olması ($p<0.05$), yüksek biyokalsiyum düzeyinin ürünün iç yapısını daha açık renkli hale getirdiğini göstermektedir. Bu durum biyokalsiyumun ışık yansıtma kapasitesini artırmasıyla ilişkilendirilebilir. Dış yüzey L* değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Isıl işlem sırasında yüzeyde gelişen kızarmanın tüm gruplarda benzer seviyede gerçekleştiği düşünülmektedir.

a Değeri*

İç yüzey a* değerleri BK0, BK5 ve BK10 gruplarında sırasıyla 56.3 ± 5.31, 51.57 ± 1.70 ve 61.32 ± 4.62 olarak belirlenmiştir. BK5 grubunda kırmızılık değerinin azaldığı, BK10 grubunda ise anlamlı biçimde arttığı görülmektedir ($p<0.05$). Bu artış, yüksek seviyede biyokalsiyum ilavesinin et proteini yapısında renk pigmentlerinin daha belirgin hale gelmesini desteklemiş olabileceğini düşündürmektedir. Dış yüzey a* değerleri gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir ($p>0.05$). Bu durum, dış yüzeydeki Maillard reaksiyonlarının biyokalsiyum düzeyinden bağımsız olarak benzer şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

b Değeri*

İç yüzey b* değerleri BK0, BK5 ve BK10 için sırasıyla 51.09 ± 3.90, 44.82 ± 3.16 ve 54.45 ± 4.28 olarak ölçülmüştür. BK5 grubundaki b* değerinin anlamlı şekilde düşük olması ($p<0.05$), biyokalsiyumun düşük seviyedeki ilavesinin sarılık tonunu azalttığını göstermektedir. Buna karşılık BK10 grubunda sarılık değerinin yeniden arttığı ve kontrol grubuna benzer seviyeye geldiği görülmektedir. Bu sonuç, biyokalsiyum miktarının renk pigmentleriyle doğrusal olmayan bir etkileşim gösterdiğini işaret etmektedir. Dış yüzey b* değerleri arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Yüzeydeki kahverengileşme reaksiyonlarının gruplar arasında benzer şekilde geliştiği söylenebilir.

Elde edilen bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, biyokalsiyum ilavesinin köftelerin renk özellikleri üzerinde özellikle iç yüzeyde belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı etkiler oluşturduğu, buna karşın dış yüzey renk parametrelerinde sınırlı bir değişim meydana getirdiği görülmektedir. Bu durum, biyokalsiyumun ürünün iç yapısında ışık yansıtma ve pigment etkileşimlerini değiştirecek biçimde rol oynadığını, ancak dış yüzeyde ısıl işlemle baskın hale gelen Maillard reaksiyonları ve yüzey kızarmasının bu etkinin görünürlüğünü azalttığını düşündürmektedir. Sonuç olarak, biyokalsiyum ilavesi köftelerin iç yapısındaki renk özelliklerini anlamlı düzeyde modüle etmiş, özellikle yüksek seviyede kullanımının renk parlaklığını ve pigment görünürlüğünü artırdığı belirlenmiştir. Ürünün dış yüzey renk parametrelerinin büyük oranda sabit kalması ise üretim sürecinde biyokalsiyumun dış görünüş üzerinde olumsuz bir etki oluşturmadan kullanılabileceğini göstermektedir. Bu bulgular biyokalsiyumun hem fonksiyonel hem de görsel kalite özellikleri açısından uygun bir katkı maddesi olabileceğine işaret etmektedir.

5.7.4. Duyusal analiz sonuçları

Biyokalsiyum ilavesinin köftelerin duyusal özellikleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bu çalışmada duyusal parametreler (görünüş, koku, doku, tat ve genel beğeni) değerlendirildiğinde, A grubunun (kontrol veya düşük biyokalsiyum ilaveli) panelistler tarafından en yüksek puanlanan grup olduğu, bunu sırasıyla B ve C gruplarının izlediği görülmektedir. Tüm parametrelerde gruplar arasında istatistiksel olarak benzer harflerin bulunması, farkların istatistiksel açıdan önemli olmadığını göstermektedir ($p>0.05$).

Görünüş açısından A ve B grupları benzer bulunmuş olup, C grubunun puanı nispeten daha düşük olsa da bu farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Biyokalsiyum ilavesinin artmasıyla ürün renginde veya yüzey yapısında sınırlı düzeyde değişim

oluştuğu, ancak bunun panelistler tarafından olumsuz bir farklılık olarak algılanmadığı söylenebilir.

Koku değerlendirmelerinde A grubu en yüksek ortalamaya sahip olup, biyokalsiyum düzeyi arttıkça koku puanlarının azaldığı görülmektedir. Bununla birlikte, gruplar arasındaki istatistiksel benzerlik, biyokalsiyumun aromaya olumsuz bir etki yapmadığını göstermektedir.

Doku açısından A ve B grupları benzer şekilde yüksek puanlanmış, C grubunda hafif bir düşüş gözlenmiştir. Biyokalsiyumun artışına bağlı olarak ürün sertliğinin veya ağızda dağılma özelliğinin değişmesi nedeniyle panelistlerin doku algısının bir miktar etkilenmiş olabileceği düşünülmektedir.

Tat parametresinde A grubunun en yüksek değere sahip olduğu, C grubunda ise belirgin bir düşüş olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmaması, biyokalsiyumun lezzet üzerinde belirgin bir olumsuz etki oluşturmadığını göstermektedir. Farkların sayısal düzeyde olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsız olması, panelist varyasyonları ve ürünün genel kabul edilebilirliğinin yüksek olmasıyla ilişkilendirilebilir.

Genel beğeni değerlendirmesinde A grubu yine en yüksek puanı almış olup, B ve C gruplarında kademeli bir azalma gözlenmektedir. Bu durum, biyokalsiyum miktarı arttıkça duyusal kalite algısında hafif bir düşüş olabileceğini düşündürmektedir. Ancak ortak harflerin bulunması bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermektedir ($p>0.05$).

Genel olarak, biyokalsiyum ilavesinin köftelerin duyusal özelliklerini olumsuz yönde etkilediği yönünde bir bulguya rastlanmamıştır. Panelistler tarafından tüm gruplar kabul edilebilir düzeyde değerlendirilmiş olup, duyusal açıdan biyokalsiyumun ürüne entegrasyonunun uygun olduğu sonucuna varılabilir. Bu durum, biyokalsiyumun fonksiyonel bir bileşen olarak et ürünlerine eklenebilirliğini desteklemektedir.

Ton balığı kemiği Biyokalsiyum tozu farklı seviyelerinde (%20, 30, 40 ve 50) tam buğday unundan üretilen krakere ilave edilmiş ve kontrol grubu ile %20 ve %30 biyokalsiyum tozu eklenmiş gruplar arasında görünüş, renk, koku, doku, aroma, tat ve genel beğeni bakımından fark görülmedi, %40 ilaveli grupta bu özelliklerin azaldığı, %50 ilaveli grubun ise koku, tat ve genel beğeni açısından örnekler arasında en düşük puanı aldığı bildirilmiştir. %50 ilaveli örneğin daha soluk bir renk ve sert ve sıkı bir dokuya sahip olması nedeniyle en düşük beğeniyi aldığının düşünüldüğü ifade edilmiştir (Benjakul ve Karnjanapratum 2018).

Tam buğday unlu krakerin somon balığı kemik biyokalsiyumu ile zenginleştirildiği başka bir çalışmada ise biyokalsiyum ilaveli örneklerin tat, görünüm, renk, koku ve genel beğeni açısından kontrol grubundan farklı olmadığı ve biyokalsiyum tozu ilavesinin duyusal özellikleri değiştirmediği belirtilmiştir (Idowu vd. 2019).

Ekmeğin mineral bakımından zenginleştirilmesi üzerine yürütülmüş bir çalışmada alabalık, levrek ve çipura kemiklerinden elde edilen biyokalsiyum tozları beyaz ekmek

ile tam buğday ekmeğine ilave edilmiştir. Her üç biyokalsiyum tozunun ilave edildiği bu iki çeşit ekmeğin duyusal özelliklerini değiştirmediği belirlenmiştir (Savlak 2019).

Ton balığı kemiği biyokalsiyumu ile zenginleştirilmiş hindistan cevizi yağı bazlı (CO) bir kurabiyenin geliştirildiği bir çalışmada kontrol örneği ile CO kurabiyeleri arasında görünüm, lezzet, doku ve ağız hissi benzerlik puanında hiçbir fark görülmediği ve en düşük puanı %15.5 biyokalsiyum tozu eklenen CO kurabiyelerinin aldığı bildirilmiştir. Elde edilen kurabiyelerin duyusal özellikleri üzerinde olumsuz bir etki göstermeyen biyokalsiyum tozunun maksimum seviyesinin CO kurabiyeleri için %12 olduğu kaydedilmiştir (Karnjanapratum ve Benjakul 2018).

Asya levreği (*Lates calcarifer*) biyokalsiyumunun farklı düzeylerde (%0, %2, %4, %6, %8 ve %10) (a/a) iplik yüzgeçli bir balık (Nemipterus sp.) surimi jeline ilave edildiği bir çalışmada, biyokalsiyum tozu içeren surimi jelinde, kontrole kıyasla daha yüksek benzerlik puanları gözlemlenmiş, ancak, %10 biyokalsiyum içeren surimi jelinde benzerlik puanında hafif bir düşüş gözlemlenmiştir (Wijayanti vd. 2021a).

Vanilyalı, portakallı ve limonlu bisküvilere farklı oranlarda (%3, 6 ve 9) balık kemiği tozu ilave edildiğinde bisküvilerin duyusal özelliklerinde farklılık olmadığı kontrol grubu ile benzerlik gösterdikleri saptanmıştır (Shanshan vd. 2016).

6. SONUÇLAR

Su ürünlerinin işlenmesi sırasında önemli miktarda atık çıkmaktadır. Bunlar kırpıntı etler, baş, iç organ, deri, pul, kılçık vb.dir. Her yıl besin değeri yüksek binlerce ton yan ürün işleme tesislerinden atılmaktadır. Bu atıklar büyük problemler yaratmakta, özellikle de çevre ve sağlık sorunlarına neden olmaktadırlar. Balık işleme atıklarını imha etmek yerine katma değerli ürünlere dönüştürerek ekonomiye katkı sağlanabilmektedir. Aynı zamanda çevre ve sağlık sorunlarının önüne geçilebilmektedir. Balık işleme atıkları çok çeşitli biyoaktif maddeler içermektedirler. Bu atıklardan yeni katma değerli ürünler üretilerek bu biyoaktif bileşiklerin etkilerinden faydalanılmaktadır. Yeni ürünler gıda sanayi, eczacılık, kozmetik sanayi, tıp gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bu araştırmada balık işlemede önemli bir atık olan balık kemiklerinden biyokalsiyum üretimi amaçlanmıştır. Hem balık kemiklerinin değerlendirilmesi hem de çeşitli alanlarda kullanılabilecek bir ürün elde edilmesi amaçlanmıştır.

Kalsiyum, % 99'u kemiklerde bulunan bir mineraldir. Bu bakımdan balık kemikleri önemli bir kalsiyum kaynağıdır. Biyokalsiyum, vücut tarafından yüksek biyoyararlanımla emilen doğal veya biyolojik kökenli bir kalsiyum formudur. Çeşitli yöntemlerle kemiklerden elde edildikten sonra kurutulup toz haline getirilmektedir.

Çalışmamızda biyokalsiyum tozu üretiminde farklı yöntemler denenmiştir. Literatürde çoğunlukla kullanılan bazı kimyasalların farklı kombinasyonları denenerek 9 farklı biyokalsiyum tozu üretilmiştir. Ayrıca hiçbir kimyasal kullanılmadan suda kaynatma yöntemiyle de bir biyokalsiyum tozu daha üretilmiştir. Biyokalsiyum üretim protein uzaklaştırma, yağ uzaklaştırma ve ağartma olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Her bir aşamada farklı kimyasal kombinasyonları kullanılmıştır. Elde edilen bu biyokalsiyum tozlarının, fiziksel ve kimyasal çeşitli analizlerle karakterizasyonu çalışılmıştır.

Çalışmada nem analiz sonuçlarına göre tüm gruplarda çok düşük nem içerikleri saptanmıştır. Toz ürünlerde nem düzeyini düşük olması istenmektedir. İstendiği şekilde bu üründe de çok düşük nem içerikli biyokalsiyum tozu elde edilerek başarılı bir sonuca ulaşılmıştır. En düşük nem içeriği B1X grubunda bulunmuştur.

Biyokalsiyum tozu üretiminde ham madde olan kemik ve kemikten tam olarak uzaklaştırılamayan ette kolajen ve diğer proteinler bulunmaktadır. Saf bir biyokalsiyum tozu elde etmek için kolajen olmayan proteinlerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunu ne ölçüde gerçekleştirdiğimizi test etmek için biyokalsiyum tozlarında protein analizleri yürütülmüştür. Bu analizlerin sonuçlarına göre ham kemikte %27.66 olan protein içeriği alkali yöntemle üretilen biyokalsiyum örneklerinde %0.26-1.49 arasında bulunmuştur. Bu durum biyokalsiyum tozu üretiminde uygulanan protein uzaklaştırma işlemlerinin başarıyla gerçekleştirildiğini göstermiştir. Ancak suda kaynatma yöntemi ile üretilen biyokalsiyum tozunda ham kemikten önemli ölçüde düşük oranda protein (%11.03) belirlenmiş olmakla birlikte diğer gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu da bize suda kaynatma yöntemi ile protein uzaklaştırmanın başarıyla gerçekleştirilemeyeceğini göstermiştir.

Biyokalsiyum tozu üretiminde yağın varlığı tozun rengi, kokusu ve tadını bozabileceğinden ve saf biyokalsiyum tozu elde edilmesini zorlaştıracağından üretim esnasında yağın uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu sebeple yürütülen yağ analiz sonuçlarına göre biyokalsiyum tozlarında oldukça düşük oranlarda (%0.007-0.079) yağ tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak en yüksek oran suda kaynatma yöntemi ile elde edilen üründe belirlenirken, alkali yöntemle üretilen gruplar arasında önemli bir farklılık saptanmamıştır. Nispi olarak en düşük yağ içeriği B1Y grubunda belirlenmiştir. Bu grupta yağ giderme işlemi etanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu sonuç, etanolün yağ giderme açısından etkili olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, bu çalışmada diğer gruplarda kullanılan noniyonik bir yüzey aktif madde olan Polisorbat 80'in, kemiğin mineral yapısını bozmadığı, aşındırıcı özellik göstermediği ve balık kemiğinde bulunan yağları etkili bir şekilde emülsifiye edebildiği belirlenmiştir. Ayrıca Polisorbat 80'in ucuz, kolay temin edilebilir ve yaygın olarak kullanılan bir madde olması nedeniyle biyokalsiyum üretiminde yağ giderme amacıyla etanole alternatif bir ajan olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Biyokalsiyum tozlarında kül içeriğinin yüksek olması istenir. Çünkü yüksek olması genellikle yağ ve protein gibi organik maddelerin uzaklaştırıldığını, ürünün daha saf bir mineral yapı içerdiğini gösterir. Çalışma örneklerimizin kül içerikleri ham kemik örneğinden oldukça düşük oranda saptanmıştır. Suda kaynatma yöntemi ile üretilen üründe (S) diğer gruplardan daha düşük kül içeriği belirlenmiştir. Ancak alkali yöntemli gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Kalsiyum (Ca) ve fosfor (P) analiz sonuçlarına göre suda kaynatma grubunun (S) kalsiyum içeriği (%35.61) ham kemik içeriğine (%35.95) çok yakın bulunmuştur. Diğer grupların kalsiyum içerikleri ise %36.28 ila %38.78 arasında saptanmıştır. En yüksek kalsiyum içeriği B1Y grubunda belirlenmiştir. Fosfor içerikleri bakımından da S grubu en düşük fosfor içeriği gösterirken alkali ekstraksiyonla elde edilen biyokalsiyum tozları arasında en yüksek fosfor içeren grup A2Y en düşük B1Y olmuştur.

Amino asit analiz sonuçlarına göre biyokalsiyum tozlarında alanin, glisin, treonin, lisin, arginin, histidin, aspartik asit, glutamik asit, serin, prolin, hidroksiprolin, valin, metiyonin, tirozin, lösin, izolösin ve fenilalanin amino asitleri saptanmıştır. Biyokalsiyum gruplarının hepsinde en yüksek oranda bulunan glisin, prolin ve hidroksiprolin amino asitleri olmuştur. Tirozin, aspartik asit, histidin ve izolösin en düşük oranda bulunan amino asitler olmuştur. Alkali ekstraksiyonla elde edilen örneklerin amino asit içerikleri ham kemiktekinden yüksek bulunmuştur. Kolajen amino asitleri olan glisin, prolin ve hidroksiprolinin yüksek bulunması biyokalsiyum tozlarında kolajen olmayan proteinlerin uzaklaştırılmış olup kolajenin kaldığını göstermiştir. Kolajen kalsiyumun emilimini artırdığı için biyoyararlanımı yüksek biyokalsiyum tozu üretimi başarılmıştır. Böylece sadece kalsiyumca zengin olmayan aynı zamanda kolajen içeren biyokalsiyum üretimi gerçekleşmiştir.

Renk ölçüm sonuçlarına göre en yüksek L* değeri suda ekstrakte edilen örnekte bulunmuştur. Bu sonuç en açık renkli ve en yüksek beyazlık düzeyine sahip örnek olduğunu göstermiştir. Bunu A2Y ve B1X örnekleri takip etmiş, bu örnekler yüksek L* değerleriyle nispeten daha parlak ve açık tonlu örnekler olarak dikkati çekmişlerdir. Biyokalsiyum tozlarının negatif a* değerine sahip olduğu genel olarak kırmızı ekseninden yeşil eksenine doğru kaydığı gözlenmiştir. Biyokalsiyum tozlarının negatif a* değerleri

yani yeşilimsi değerler göstermesi mineral madde içeriğinin yüksek olması nedeniyle olmuştur. İnorganik madde oranı arttıkça a* değeri azalmaktadır. Renk sonuçları da bize Ca ve P içeriği yüksek biyokalsiyum tozunun başarıyla üretildiğini kanıtlamıştır.

Uçucu aroma bileşenleri analizi yürütülmüş olmasına rağmen biyokalsiyum tozlarının hiçbirinde uçucu bileşenler saptanmamıştır. Bu durum biyokalsiyum tozunun yüksek kalite standartlarına ve hedeflenen fonksiyonel özelliklere uygun olarak üretildiğini göstermiştir.

Biyokalsiyum tozları fiziksel ve kimyasal analiz ile karakterize edildikten sonra nem, yağ, kalsiyum, fosfor, Ca/P oranı ve esansiyel amino asit içeriği dikkate alınarak B1Y grubu çalışmamızın ikinci aşamasında gıda katkısı olarak kullanılacak grup olarak seçilmiştir.

Çalışmamızın ikinci aşamasında alabalık eti kullanılarak köfte hazırlanmış ve köfteye %5 ve %10 olmak üzere iki farklı konsantrasyonda B1Y grubu biyokalsiyum tozu ilave edilmiştir. Köftelerin tekstür, renk, kalsiyum ve fosfor ile duyusal analizleri gerçekleştirilmiştir. Köftelerde yürütülen tekstür profil analiz sonuçlarına göre biyokalsiyum ilavesi köftelerin sertlik, sakızımsılık ve çiğnenebilirlik değerleri artış göstermiştir. Bu artışlar konsantrasyonla birlikte artmıştır. Elastikiyet, bağlılık ve esneklik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Biyokalsiyum ilavesi köftelerin iç yapısındaki renk özelliklerini anlamlı düzeyde modüle etmiş, özellikle yüksek seviyede kullanımının renk parlaklığını ve pigment görünürlüğünü artırdığı belirlenmiştir. Ürünün dış yüzey renk parametrelerinin büyük oranda sabit kalması ise üretim sürecinde biyokalsiyumun dış görünüş üzerinde olumsuz bir etki oluşturmadan kullanılabileceğini göstermektedir. Bu durum biyokalsiyumun hem fonksiyonel hem de görsel kalite özellikleri açısından uygun bir katkı maddesi olabileceğini göstermiştir

Duyusal analiz sonuçlarına göre köftelere ilave edilen biyokalsiyum tozunun köftenin duyusal özelliklerini etkilemediğini göstermiştir. Bu durum, biyokalsiyumun fonksiyonel bir bileşen olarak gıdalara eklenebileceğini ortaya koymuştur.

Çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde nem, yağ ve protein içerikleri düşük, kalsiyum açısından zengin uygun Ca/P oranına sahip, kolajence zengin biyokalsiyum üretimi başarılmış ve bu biyokalsiyum tozunun gıda katkısı olarak kullanılabildiği ortaya konulmuştur.

7. KAYNAKLAR

Amitha, Raju, C.V., Lakshmisha, I.P., Arun Kumar, P., Sarojini, A., Gajendra, Pal, J. 2019. Nutritional composition of fish bone powder extracted from three different fish filleting waste boiling with water and an alkaline media. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(2): 2942-2948.

AOAC. 1990. Official methods of analyses of association of analytical chemist. 15th ed. Washington, DC: Association of Offical Analytical Chemists, Inc.

APHA. 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington DC, 1504 s.

Barakat, N.A.M., Khalil, K.A., Sheikh, F.A., Omran, A.M., Gaihre, B., Khil, M.S., Yong, K.H. 2008. Physiochemical characterizations of hydroxyapatite extracted from bovine bones by three different methods: extraction of biologically desirable Hap. *Material Science and Engineering C- Mater*ial, 28(8): 1381–1387.

Benjakul, S., Mad-Ali, S., Sookchoo, P. 2017a. Characteristics of biocalcium powders from pre-cooked tongol (*Thunnus tonggol*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) bones. *Food Biophysics*, 12: 412–421.

Benjakul, S., Mad-Ali, S., Senphan, T., Sookchoo, P. 2017b. Biocalcium powder from precooked skipjack tuna bone: Production and its characteristics. *Journal of Food Biochemistry*, 41: e12412.

Benjakul, S., Karnjanapratum, S. 2018. Characteristics and nutritional value of whole wheat cracker fortified with tuna bone bio-calcium powder. *Food Chemistry*, 259, 181–187.

Benjakul, S., Pomtong, S., Chedosama, A., Saetang, J., Sookchoo, P., Nilsuwan, K. 2024. Chemical compositions and characteristics of biocalcium from pre-cooked tuna bone as influenced by sodium chloride pretreatment and defatting by Asian seabass lipase. Foods, 13: 1261.

Bourne, M.C. 2002. Food Texture and viscosity, concept and measurement, Academic Press.,2nd edition, New York, 326p.

Boutinguiza, M., Pou, J., Comesaña, R., Lusquiños, F., de Carlos, A., León, B. 2012. Biological hydroxyapatite obtained from fish bones, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 32 (3): 478-486.

Bubel, F., Dobrzański, Z., Bykowski, P.J., Chojnacka, K., Opalinski, S., Trziszka, T. 2015. Production of calcium preparations by technology of saltwater fish by product processing. *Open Chemistry*, 13: 1333–1340.

Busca, K., Wu, S., Miao, S., Govindan, A., Strain, C., O'Donnell, S., Whooley, J., Gite, S., Paul Ross, R., Stanton, C. 2021. An in vitro study to assess bioaccesibility and bioavailability of calcium from blue whiting (*Micromesistius Poutassou*) fish bone powder. *Ir. J. Agric. Food Res*., 61(2), 229-240.

Cahyani, R.T., Serliana, Hutapea, P.H., Alawiyah, T., Laga, Y.A., Hildayani, S.Z. 2022. Chemical composition of bio calcium powders from pressure-cooked Indo-Pacific tarpon (*Megalops cyprinoides*) bone from Tarakan, North Kalimantan, Indonesia. *AACL Bioflux*,15 (3): 1461-1469.

Febriani, H., Rochima, E., Rostini, L., Pratama, R.I. 2021. Pangasius Bone Powder (Definition, Production, Analysis physicochemical Characteristics and Potency): A Review. *Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research*, 13(6): 1-9.

FAO/WHO. 2004. Vitamin and mineral requirements in human nutrition (2nd edition). Geneva, Switzerland /Rome, Italy: World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization (FAO).

FAO (The State of World Fisheries and Aquaculture) 2020. Sustainability in Action. Rome, 2020. DOI:10.4060/ ca9229en

Gawborisut, S., Ketkaew, C. & Buasook, T. 2024. Production of biocalcium from fermented fish bone residue for fish emulsion sausage fortification. *Foods*, 13(6): 882.

Gildberg, A., Arnsen, J.A., Carlehög, M. 2002. Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. *Process Biochemistry*, 38(4): 475-480.

Goldscher, R.L., Edelstein, S. 1996. Calcium citrate: A revised look at calcium fortification. *Food Technology*, 50: 96–98.

Harp, D.L. 1995. Current technology of chlorine analysis for water and wastewater. Hach Company, Technical Information Series, Booklet No. 17.

Harris, D.C. 2010. Quantitative chemical analysis. W.H. Freeman and Company, New York, 828 s.

Hemung, B.O. 2013. Properties of tilapia bone powder and its calcium bioavailability based on transglutaminase assay. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(4): 306-309.

Hemung, B.O., Sriuttha, M. 2014. Effects of tilapia bone calcium on qualities of tilapia 595 sausage. *Kasetsart Journal, Natural Science*, 48: 790–798.

Husna A., Handayani L., Syahputra F., 2020 [Utilization of starry triggerfish bone (*Abalistes stellaris*) as a calcium source in fishbone flavor product]. *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal,* 7(1):13-20.

Idowu, A.T., Benjakul, S., Sinthusamran, S., Pongsetkul, J., Sae-leaw, T., Sookchoo, P. 2019. Whole wheat cracker fortified with biocalcium and protein hydrolysate powders from salmon frame: characteristics and nutritional value. *Food Quality and Safety*, 3: 191–199.

Idowu, A.T., Benjakul, S., Sinthusamran, S., Sae-leaw, T., Suzuki, N., Kitani, Y., Sookchoo, P. 2020. Effect of alkaline treatment on characteristics of bio-calcium and hydroxyapatite powders derived from salmon bone. *Applied Science*, 10: 4141.

Karnjanapratum , S., Benjakul, S. 2018. Coconut oil based cookies fortified with bio-calcium: characteristics and nutritional compositions. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 10 (4): 79-89.

Kemmak, R.A., Rezapour, A., Jahangiri, R., Nikjoo, S., Farabi, H. Soleimanpour, S. 2020. Economic Burden of Osteoporosis in the World: A Systematic Review. *Med. J. Islam. Repub. Iran*. *34:* 154.

Kettawan, A., Sungpuag, P., Chavasit, V. and Sirichakwal, P.P. 2002. Chicken bone calcium extraction and its application as a food fortificant. *Journal of the National Research Council of Thailand*, 34: 163-180.

Kıvrak, Ş., Göktürk, T., Kıvrak, I. 2017. Assessment of volatile oil composition, phenolics and antioxidant activity of bay (Laurus nobilis) leaf and usage in cosmetic applications. *International Journal of Secondary Metabolite*, 4 (2): 148-161.

Kim, S.-K. & Jung, W.-K. 2007. Fish and bone as a calcium source. In: F. Shahidi (Ed.). Pp. 328–339. Maximising the Value of Marine By-Products, Cambridge, Woodhead publishing Limited.

Kim, S.K., Mendis, E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts. A review. *Food Research International*, 39: 383-393.

Kumoro, A.C., Sofiah, S., Aini, N. Retnowati, D.S., Budiyati, C.S. 2010. Effect of temperature and particle size on the alkaline extraction of protein from chicken bonewaste. *Reaktor*, 13, 124.

Kurniasih, R.A., Darmanto, Y.S., Herawati, V.E., Anggo, A.D., Riyadi, P.H. (2020). Effects of different farming locations on biocalcium characteristics of Mozambique tilapia (Oreochromis mossambicus) bones. AACL Bioflux, 13 (6): 3583-3592.

Lamberg-Allardt, C., Karp, H., Kemi, V. 2010. Phosphorus and Bone. In: P., Dawson-Hughes, B, Weaver, C: Eds), Nutritional Influences on Bone Health, Burckhardt, Springer, Dordrecht Heidelberg, London, New York., pp. 87-97.

Li, J., Yin, T., Xiong, S., Huang, Q., You, J., Hu, Y., Liu, R., Li, Y. 2020. Mechanism on releasing and solubilizing of fish bone calcium during nano-milling. *Journal of Food Processing Engineering*, 43(4): e13354.

Liu, D.; Wei, G.; Li, T.; Hu, J.; Lu, N.; Regenstein, J.M.; Zhou, P. 2015. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, 172, 836–843.

Lu, H.M. 2004. Continuous lactic acid fermentation of Haddock hydrolysate. *J. Wuxi University of Light Industry*, 23(6):103-106.

Luu, P.H., Nguyen, M.H. 2009. Recovery and utilization of calcium from fish bones by-products as a rich calcium source. *Tap Chí Khoa Hoc Và Công Nghe*, 47: 91-103.

Munekata, P.E.S., Pateiro, M., Domínguez, R., Zhou, J., Barba, F.J., Lorenzo, J.M. 2020. Nutritional characterization of sea bass processing by-products. *Biomolecules*, 10(2): 232.

Mungmueang, N., Panyarobru, C., Chaibun, T., Senphan, T. 2025. Formulation and characterization of bio-calcium capsules from skipjack tuna bones: Impact of vitamin and collagen fortification on stability and antioxidant activity. Proceedings of the 17th International Conference on Science, Technology and Innovation ID13-ABE for Sustainable Well-Being (STISWB2025), Taoyuan and Taipei, Taiwan, July 20–23, 2025.

Nawaz, A., Li, E., Irshad, S., Hhm, H., Liu, J., Shahbaz, H.M., Ahmed, W., Regenstein, J.M. (2020). Improved effect of autoclave processing on size reduction, chemical structure, nutritional, mechanical and in vitro digestibility properties of fish bone powder. *Advenced Powder Technology*, 31(6): 2513–2520.

Nemati, M., Huda, N., Ariffin, F. 2017. Development of calcium supplement from fish bones wastes of yellowfin tuna (Thunnus albacares) and characterization of nutritional quality. *International Food Research Journal*, 24(6): 2419–2426.

Nemati, M., Kamilah, H., Huda, N. and Ariffin, F. 2016. In vitro calcium availability in bakery products fortified with tuna bone powder as a natural calcium source. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67: 535–540.

Ojo O.G., Akintayo R.O., Faleye A., Shittu T.A., Adeola A.A., 2017. Moisture-based shelf life estimation of ambient-stored grain flours. *FUTA Journal of Research in Sciences*, 13(3): 473-482.

Owuamanam, S., Cree, D. 2020. Progress of bio-calcium carbonate waste eggshell and seashell fillers in polymer composites: A review. *Journal of Composites Science*, 4: 1–22.

Palacios, C., Cormick, G., Hofmeyr, G.J., Garcia-Casal, M.N., Pena-Rosas, J.P., Betran, A.P. 2021. Calcium-fortified foods in ´ public health programs: considerations for implementation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1485: 3–21.

Patil, U., Saetang, J., Zhang, B., Kim, J.T., Benjakul, S. 2025. Physicochemical properties, in vitro digestion and absorption of bio-calcium powders derived from Asian seabass gills as affected by bleaching treatment. *Food Chemistry*, 497: 147080.

Perez, A., Ruz, M., Garcia, P., Jiménez, P., Valencia, P., Ramírez, C., Pinto, M., Nunez, S.M., Park, J.W., Almonacid, S. 2023. Nutritional Properties of Fish Bones: Potential Applications in the Food Industry, *Food Reviews International*, 40 (1): 79-91.

Petrat, P., Klomklao, S., Visessanguan, W., Benjakul, S., Kishimura, H. 2025. Biocalcium phosphate powders prepared from threadfin bream (*Nemipterus hexodon*) bone: Properties and comparison with calcined fish bone powder. *Journal of Agriculture and Food Research*¸ 22: 102041

Phengleng, S., Sirison, J., Sangadkit, W., Wattanachaisaereekul, S., Ruangsomboon, S. 2025. Characterization and physicochemical properties of a novel microencapsulated bio-calcium from Asian sea bass bones. *Food Hydrocolloids for Health*, https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2025.100247 (in press).

Phiraphinyo, P., Taepakpurenat, S., Lakkanatinaporn, P., Suntornsuk, W., Suntornsuk, L. 2006. Physical and chemical properties of fish and chicken bones as calcium source for mineral supplements. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 28(2): 327-335.

Pudtikajorn, K., Sae-leaw, T., Yesilsu, A.F., Sookchoo, P.S. 2023. Process development and characteristics of biocalcium from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) Eyeball Scleral Cartilage. *Waste and Biomass Valorization*, 14, 2909–2922.

Pudtikajorn, K., Sae-leaw, T., Buamard, N., Zhou, A., Ma, L., Benjakul, S. (2022). Characterisation of fish tofu fortified with skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) eyeball scleral cartilage biocalcium. *International Journal of Food Science and Technology*, 57: 6711–6721.

Putra, M.R.A., Nopianti, R., Herpandi (2015). The Fortification of Snakehead (Channa striata) Fish Bone Meals as a Source of Calcium on Crackers. FishtecH ± Jurnal Teknologi Hasil Perikanan, 4 (2): 128-139.

Redhwi I., Fallatah, A., Alshabona, F. (2024).Hydroxyapatite: A Comprehensive Review of its properties, applications, and future trends. *International Journal of Biomedical Materials Research*, 12 (1): 1-6.

Rezvani Ghomi, E., Nourbakhsh, N., Akbari Kenari, M., Zare, M., Ramakrishna, S. 2021. Collagen-based biomaterials for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 109: 1986-1999.

Rustad, T., Storro, I., Slizyte, R. (2011). Possibilities for the utilisation of marine by-products, *International Journal of Food Science and Technology, 46(10),* 2001-2014.

Savlak, N. 2019. Alabalık, çipura ve levrek kılçıklarının Ca, P, kolajen kaynağı olarak yerli gıda takviyesi üretiminde ve ekmeğin mineral madde bakımından zenginleştirilmesinde kullanımı. TÜBİTAK 1005 Ulusal Yeni Fikirler Ve Ürünler Araştırma Destek Programı 217 O 062 proje numaralı proje raporu.

Savlak, N., Çağındı, Ö., Erk, G., Öktem, B.,Köse, E. 2020. Treatment method affects color, chemical, and mineral composition of seabream (*Sparus aurata*) fish bone powder from by-products of fish fillet. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 29:6, 592-602.

Shanshan, N.M. 2016. The possibility for using fish bone powder to supplement some kinds of biscuits. *Journal of Food and Dairy Science Mansoura University*, 7 (1): 27 – 32.

Shavandi, A., Hou, Y., Carne, A., McConnell, M., Bekhit, A.E.A. 2019. Marine Waste Utilization as a Source of Functional and Health Compounds. *Advances in Food Nutrition Research*. *87:* 187–254.

Sheikh, M.S., Santa Ana, C.A., Nicar, M.J., Schiller, L.R., Fordtran, J.S. 1987. Gastrointestinal absorption of calcium from milk and calcium salts. *New England Journal of Medicine*, 317: 532–536.

Shkembi, B.; Huppertz, T. 2022. Calcium absorption from Food Products: Food Matrix Effects. Nutrients, 14 (1), 180.

Singh, G., Arora, S., Sharma, G.S., Sindhu, J.S., Kansal, V.K. and Sangwan, R.B. 2007. Heat stability and calcium bioavailability of calcium-fortified milk. *LWT-Food Science and Technology*, 40(4): 625-631.

Sriket, C., Niwet, J., Phing Pui, L., Yarnpakdee, S., Senphan, T. 2023. Effects of different processes on characteristics and properties of bio-calcium from hybrid catfish (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*). *International Journal of Food Science and Technology*, 58(4): 2161-2169.

Surya, P., Nithin, A., Sundaramanickam, A.,Sathish, M. 2021. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite from Sardinella longiceps fish bone and its effects on human osteoblast bone cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 119: 104501.

Talib A, Suprayitno E., Hardoko, A. 2014. Physico-chemical properties of madidihang (Thunnus albacares Bonnaterre) fish bone flour in ternate, North moluccas. *International Journal of Biosciences*, (10):22–30.

Tateo, F., Bononi, M., Testolin, G., Ybarra, L.,Fumagalli, M. 1997. Experiments in the use of calcium and magnesium lactates in milk enrichment. *Industrie Alimentari*, 36(359): 614–617.

Theobald, H. 2005. Dietary Calcium and health. *Nutrition Bulletin*, 30: 237–277.

Tongchan, P., Prutipanlai, S., Niyomwas, S., Thongraung, C. 2009. Effect of calcium compound obtained from fish byproduct on calcium metabolism in rats. *Journal of Food and Agriculture Industy*, 2(04): 669-676.

Toppe, J., Aksnes, A., Hope, B., Albrektsen, S. 2006. Inclusion of fish bone and crab by-products in diets for Atlantic cod, Gadus morhua, Aquaculture, 253(1-4), 636-645.

Toppe, J., Lbrektsen, S., Hope, B. and Aksnes, A. 2007. Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, 146: 395–401.

Torres, M., Francischetti, E.A., Genelhu, V., Sanjuliani, A.F. 2010.Effect of a high-calcium energy-reduced diet on abdominal obesity and cardiometabolic risk factors in obese Brazilian subjects. *International Journal of Clinical Practice*, 64: 1076–1083.

Torres, M.R.S.G.; Sanjuliani, A.F. 2012. Does calcium intake affect cardiovascular risk factors and/or events? Clinics, 67 (7): 839–844.

Trailokya, A., Srivastava, A., Bhole, M., Zalte, N. 2017. Calcium and calcium salts. *Journal of the Association of Physicians of India*, 65: 100–103.

Trisnawati, M.R., Wijayanti, I. and Riyadi, P.H. 2024. Characteristics of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) fish balls with the addition of Asian sea bass (Lates calcarifer) bones bio-calcium. *Journal of Zoology and Systematics*, 2(2): 11–22.

Vogel, A.I. 1989. Vogel's textbook of practical organic chemistry. Longman Scientific & Technical, London, 1514 s.

Wijayanti, I., Singh, A., Benjakul, S., Sookchoo, P. 2021a. Textural, sensory, and chemical characteristic of threadfin bream (*Nemipterus* sp.) surimi gel fortified with bio-calcium from bone of Asian sea bass (Lates calcarifer). *Foods*, 10: 976.

Wijayanti, I., Benjakul, S., Sookchoo, P. 2021b. Effect of high pressure heating on physical and chemical characteristics of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) backbone. *Journal of Food Science and Technology*, *58*(8): 3120–3129.

Wijayanti, I., Benjakul, S., Sookchoo, P. 2021c. Preheat-treatment and bleaching agents affect characteristics of bio-calcium from Asian sea bass (*Lates calcarifer*) backbone. *Waste and Biomass Valorization*, 12: 3371-3382.

Wijayanti, I., Benjakul, S., Chantakun, K., Prodpran, T., Sookchoo, P. 2022. Effect of Asian sea bass bio-calcium on textural, rheological, sensorial properties and nutritive value of Indian mackerel fish spread at different levels of potato starch. *International Journal of Food Science and Technology*, 57(5): 3191-3195.

Wulandari, P., Kusumasari, S. 2019. Effect of extraction methods on the nutritional characteristics of milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) bone powder. The 1st International Conference on Agriculture and Rural Development. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 383 (2019) 012035, 1-6.

Xiao, Y., Kang, S., Liu, Y., Guo, X., Li, M. 2021. Effect and mechanism of calcium ions on the gelation properties of cellulose nanocrystals-whey protein isolate composite gels. *Food Hydrocolloids*, 111: 106401.

Zhang, R., Li, H., Wang, X., Liu, L., Zhu, H. 2025. Potential benefits of glycine, proline and hydroxyproline on growth and flesh quality of mirror carp (*Cyprinus carpio* var. specularis). *International Journal of Molecular Sciences*, 26(18): 9011.

Zhu,K., Prince, R.L. 2012. Calcium and bone. *Clinical Biochemistry*, 45: 936–942.

ÖZGEÇMİŞ

AFŞIN CEYLAN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2020-2025	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans 2017– 2020	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2004-2015	İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Metalürji Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul
Lise 2001-2004	Antalya Kültür ve Eğitim Vakfı Lisesi, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

İhracat Müdürü 2025	Doğasa, Antalya
Üretim Müdürü 2023	Sevay Kimya, Antalya
Fabrika Müdürü 2021	Rozafa, Arnavutluk
Kalite Kontrol Sorumlusu 2020	Sevay Kimya, Antalya
Tanıtım Dalışı Uzmanı 2019	Barracudas Dalış Merkezi, Antalya
Yat Kaptanlığı 2018	Octopus Dalış Merkezi, Kemer
Yat Kaptanlığı 2017	Pasifik Dalış Merkezi, Antalya
Mühendislik Danışmanı 2014	Tulip Eğitim ve Danışmanlık, İstanbul

BİLİMSEL FAALİYETLER

Projeler	
Antimelanotik ajanlar ilave edilerek üretilen buz ile muhafazanın karideslerde enzimatik kararma (melanosis) ve kalite üzerine etkileri	Araştırmacı
Sous-vide pişirme tekniğinin su ürünlerine uygulanması ve pişirme parametrelerinin ürünlerin mikrobiyal, fiziksel, kimyasal, duyusal ve besinsel kalitesi üzerine etkilerinin incelenmesi	Araştırmacı
Tüketime hazır bir su ürünü olan şuşi'nin dondurarak muhafaza olanaklarının araştırılması	Araştırmacı

Yayınlar	
Storage in ice incorporated antimelanotic agent and its effects on melanosis and quality of giant red shrimp (Aristaeomorpha foliacea)	2022
Improving the Physicochemical and Textural Properties of Squid (Loligo vulgaris) Muscle by Sous-Vide Cooking in Different Time-Temperature Combinations	2022
Effects of different sous-vide cooking conditions on the chemical, physical, microbiological, and sensory quality of fish and shrimp during storage at 3° C	2024
Determination of Proximate, Amino Acid, and Vitamin Compositions of Sous-Vide Cooked Meagre (Argyrosomus regius) and Shrimp (Penaeus japonicus)	2024