



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**BAZI HAYVANSAL KAYNAKLARDAN
SÜLFATLANMIŞ GLİKOZAMİNOGLİKAN ELDESİ
VE İŞLEM PARAMETRELERİNİN
OPTİMİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Çise KARAMAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

İzmir

2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**BAZI HAYVANSAL KAYNAKLARDAN
SÜLFATLANMIŞ GLİKOZAMİNOGLİKAN ELDESİ
VE İŞLEM PARAMETRELERİNİN
OPTİMİZASYONU**

Çise KARAMAN

Danışman: Doç. Dr. Seher KUMCUOĞLU

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

İzmir

2022

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “BAZI HAYVANSAL KAYNAKLARDAN SÜLFATLANMIŞ GLİKOZAMİNOGLİKAN ELDESİ VE İŞLEM PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

23/02/2022

Çise KARAMAN

ÖZET**BAZI HAYVANSAL KAYNAKLARDAN SÜLFATLANMIŞ
GLİKOZAMİNOGLİKAN ELDESİ VE İŞLEM
PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU**

KARAMAN, Çise

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Seher KUMCUOĞLU

Ocak 2022, 85 sayfa

Glikozaminoglikan (GAG) dallanmamış bir tür heteropolisakkarittir. Bu doğal makromolekül hayvanların kıkırdağından ekstrakte edilebilmektedir. Kıkırdak dokusunun yüksek bir bölümünü oluşturan kondroitin-4-sülfat sülfatlanmış bir glikozaminoglikan olarak bilinmektedir. Genellikle artrit tedavisini önlemek ve desteklemek için fonksiyonel gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, tavuk sternumu ve dana tendonundan enzimatik hidroliz ile sülfatlanmış glikozaminoglikan elde etmek ve Yanıt Yüzey Yöntemi kullanarak istatistiksel deney tasarımı ile optimum hidroliz koşulunu belirlemektir.

Bu tez çalışmasında, enzim miktarı, pH değeri, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi olarak seçilen dört parametrenin GAG verimi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla Merkezi Kompozit Tasarım ile oluşturulan bir deneme tasarımı uygulanmıştır. En kısa sürede ve en az miktarda enzim kullanılarak en yüksek GAG verimine ulaşılması hedeflenmiştir. Tavuk sternumundan GAG ekstraksiyon işlemi için en optimum proses koşulları %0.6 enzim miktarı, 6.99 pH değeri, 62.96°C ekstraksiyon sıcaklığı ve 10.79 saat ekstraksiyon süresi olarak bulunmuştur. Bu koşullar altında, ekstraksiyon verim değerinin %26.07 olması öngörülmüştür. Dana tendonundan ekstraksiyon işlemi için ise optimum e koşullar %0.8 enzim miktarı, 7.02 pH değeri, 63.20°C ekstraksiyon sıcaklığı ve 10.89 saat ekstraksiyon süresi

olarak bulunmuştur. Bu koşullar altında ekstraksiyon verim değeri %1.72 olarak tahmin edilmiştir. Öngörülen ekstraksiyon verim değerleri deneysel olarak doğrulanmıştır.

Çalışmanın ikinci kısmında, optimum koşullarda üretilen sülfatlanmış GAG'ların bazı özelliklerinin karakterizasyonu amacıyla SEM analizi, FTIR analizi, toplam amino asit analizi, renk analizi, ısı analiz, molekül ağırlık tayini ve reolojik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Tavuk sternumu ve dana tendonundan elde edilen GAG örneklerinin FTIR spektrumunda yer alan karakteristik piklerin kondroitin-4-sülfat standardı spektrumu ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. SEM analizi sonucunda kondrositlerin ve kollajen fibrillerin GAG yapısına entegre olduğu görülmüştür. GAG örneklerinin renk değerlerinin kondroitin-4-sülfat standardı ile kıyaslanabilir düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Kondroitin-4-sülfatın molekül ağırlığı 2078 Da olarak belirlenirken tavuk sternumundan ve dana tendonundan elde edilen GAG örneğine ait polimerlerin ortalama molekül ağırlığı sırasıyla 2597 Da ve 5391,5 Da olarak bulunmuştur. GAG örnekleri kullanarak hazırlanan çözeltilerin akış davranışı Newton modeli ile açıklanmıştır. Tavuk sternumundan ve dana tendonundan elde edilen GAG örneklerinin ağırlıkça toplam aminoasit içeriği sırasıyla %23.90 ve %37.74 olarak elde edilmiştir.

Analiz sonuçları enzimatik ekstraksiyon yoluyla tavuk sternumu ve dana tendonundan sülfatlanmış GAG'ın başarılı bir şekilde elde edildiğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Tavuk sternumu, dana tendonu, glikozaminoglikan, enzimatik ekstraksiyon, optimizasyon

ABSTRACT**EXTRACTION OF SULPHATED GLYCOSAMINOGLYCAN FROM
ANIMAL SOURCES AND OPTIMIZATION OF THE PROCESS
PARAMETERS**

KARAMAN, Çise

MSc in Food Eng.

Supervisor: Assoc. Doç. Dr. Seher KUMCUOĞLU

January 2022, 85 pages

Glycosaminoglycan (GAG) is known one kind of unbranched heteropolysaccharide. The natural macromolecule can be extracted from the cartilage of animals. Chondroitin-4-sulfate is known as a sulfated glycosaminoglycan, which is the highest proportion of cartilage tissue. It is generally using as a supplement of functional food for preventing and supporting treatment of arthritis.

The aim of this study is to obtain sulfated glycosaminoglycan from chicken sternum and bovine tendon by enzymatic hydrolysis and optimize a suitable hydrolysis condition by statistical experimental design using Response Surface Method.

In this thesis, in order to determine the effects of the selected four parameters as enzyme amount, pH value, extraction temperature and time on GAG yield, a trial design created with Central Composite Design was applied. It was aimed to reach the highest GAG% efficiency in the shortest time and by using the least amount of enzyme. The most suitable process conditions for the GAG extraction process from chicken sternum were found to be 0.6% enzyme amount, 6.99 pH value, 62.96°C extraction temperature and 10.79 hours extraction time. Under these conditions, the extraction yield value was predicted to be 26.07%. The most suitable process conditions for the GAG extraction process from bovine tendon were found to be

0.8% enzyme amount, 7.02 pH value, 63.20°C extraction temperature and 10.89 hours extraction time. Under these conditions, the extraction yield value was predicted to be 1.72%. The predicted extraction yield values were confirmed experimentally.

In the second stage of the study, some properties of sulphated GAGs produced under optimized process conditions were determined by performing SEM analysis, FTIR analysis, total amino acid analysis, color analysis, thermal analysis molecular weight determination and rheological measurements on sulphated GAG to characterize. It was determined that the characteristic peaks in the FTIR spectrum of GAG samples obtained from chicken sternum and calf tendon were similar to the spectrum of the chondroitin-4-sulphate standard. As a result of SEM analysis, it was observed that chondrocytes and collagen fibrils were integrated into the GAG structure. It was determined that the color values of the GAG samples were comparable to the chondroitin-4-sulphate standard. While the molecular weight of chondroitin-4-sulfate was determined as 2078 Da, the average molecular weight of the polymers of the GAG sample obtained from chicken sternum and calf tendon were found to be 2597 Da and 5391.5 Da, respectively. The flow behavior of solutions prepared using GAG samples were explained with Newton model. Total amino acid content by weight of GAG samples obtained from chicken sternum and calf tendon was obtained as 23.90% and 37.74%, respectively.

The results of the analysis showed that sulfated glycosaminoglycan was successfully obtained from chicken sternum and bovine tendon by enzymatic extraction.

Keywords: Chicken sternum, bovine tendon, glycosaminoglycan, enzymatic extraction, optimization

ÖNSÖZ

“Bazı Hayvansal Kaynaklardan Sülfatlanmış Glikozaminoglikan Eldesi ve İşlem Parametrelerinin Optimizasyonu” isimli tez çalışması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında, farklı hayvansal kaynaklar kullanılarak enzimatik ekstraksiyon yöntemiyle GAG elde edilmiştir. Çalışma kapsamında tavuk sternumu ve dana tendonu materyal olarak kullanılmıştır. Her iki materyal için ekstraksiyon yönteminin uygulanabilirliği ve elde edilen son ürünlerdeki GAG verimi incelenmiştir. Ekstraksiyon işleminde uygun işlem koşulunun belirlenmesi için optimizasyon prosedürü uygulanmıştır. Optimizasyona ait bağımsız değişkenler pH, sıcaklık, enzim miktarı, süre olarak belirlenirken yanıt olarak ise GAG verimi seçilmiştir. Belirlenen matematiksel modele göre optimum işlem parametrelerinde beş adet deneme deneyi gerçekleştirilmiştir ve optimum işlem parametresinin deneysel olarak doğrulanması sağlanmıştır.

Optimum koşullarda üretilen GAG örneklerini karakterize etmek amacıyla birtakım analizler uygulanmıştır.

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde FYL-2020-22497 nolu projeye finansal desteklerinden dolayı Ege Üniversitesi BAP Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

İZMİR

23/02/2022

Çise KARAMAN



İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK	ii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
TABLolar DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Glikozaminoglikanların Yapısı.....	3
2.2. Glikozaminoglikanların Sınıflandırılması.....	5
2.3. Glikozaminoglikan Kaynakları.....	10
2.4. Glikozaminoglikan Ekstraksiyon Yöntemleri.....	12
2.4.1. Enzimatik ekstraksiyon yöntemi.....	13
2.4.2. Diğer yöntemler.....	18
2.5. Glikozaminoglikanların Fonksiyonları.....	19

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.6. Glikozaminoglikanların Sağlık Üzerindeki Etkileri	20
2.7. Yanıt Yüzey Yöntemi	21
2.7.1 Merkezi kompozit tasarım	22
2.7.2. Optimizasyon	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Gereç	24
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Glikozaminoglikan ekstraksiyonu	24
3.2.2. Design Expert programı ile ekstraksiyon işlem parametrelerinin belirlenmesi ve optimizasyonu	26
3.2.3. Hammadde bileşim analizleri	29
3.2.4. Glikozaminoglikan analizi	29
3.2.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektrometresi analizi	32
3.2.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	32
3.2.7. Renk analizi	32
3.2.8. Molekül Ağırlığı tayini	32
3.2.9. Akış özelliklerinin belirlenmesi	33

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.10. Aminoasit içeriği	33
3.2.11. Isıl özelliklerin belirlenmesi	34
3.2.12. İstatistiksel analiz.....	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1. Bileşim Analizleri	36
4.2. Tavuk Sternumundan GAG Eldesi İçin İşlem Koşullarının Optimizasyonu..	37
4.3. Dana Tendonundan GAG Eldesi İçin İşlem Koşullarının Optimizasyonu....	45
4.4. GAG Örneklerinin FTIR Spektrumları.....	52
4.5. GAG Örneklerinin SEM Analizi	55
4.6. GAG Örneklerinin Renk Özellikleri.....	60
4.7. GAG Örneklerinin Molekül Ağırlığının Tayini	61
4.8. GAG Örneklerinin Akış Özelliklerinin Belirlenmesi	63
4.9. GAG Örneklerinin Aminoasit İçeriği	66
4.10. GAG Örneklerinin Isıl Özelliklerinin Belirlenmesi	68
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	74

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	84
ÖZGEÇMİŞ	85
EKLER	



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Hiyalin eklem kıkırdağında proteoglikanlar, kolajen ve kondrositlerin şematik gösterimi	3
2.2 Eklem kıkırdağı proteoglikanı Agrekan-HA Kompleksine ait şematik gösterim	4
2.3 Glikozaminoglikanların sınıflandırılması.....	6
2.4 Sülfatlanmış glikozaminoglikanların kimyasal yapısı.....	7
2.5 Farklı birimlerden oluşan kondroitin sülfat yapıları.....	8
2.6 Tavuk kıkırdağından GAG ekstraksiyonu akım şeması	17
2.7 Kondroitin sülfatın terapötik rolleri.....	19
3.1 Materyalden glikozaminoglikanın ekstraksiyonuna ait akım şeması	25
3.2 Reaksiyon sonucu konsantrasyona bağlı olarak farklı renk veren kondroitin sülfat standart çözeltileri (0ug/mL-70 ug/mL)	30
3.3 Kondroitin-4-sülfat standart eğrisi.....	31
4.1 Tavuk sternumu (a) ve tavuk sternumundan üretilen GAG (b).....	37
4.2 %GAG verimi için modelden (Eş. 4.1) deneysel verilere karşı tahminlenen değerler grafiği.....	41
4.3 %GAG verimi üzerine enzim miktarı ve pH interaksiyon etkisini gösteren grafikler a) 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri izohips eğrileri; b) 2 boyutlu kontur grafikleri	42

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.4 %GAG verimi üzerine enzim miktarı ve sıcaklık interaksyon etkisini gösteren grafikler boyutlu yanıt yüzey grafikleri izohips eğrileri; b) 2 boyutlu kontur grafikleri	42
4.5 %GAG verimi üzerine enzim miktarı ve süre interaksyon etkisini gösteren grafikler a) 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri izohips eğrileri; b) 2 boyutlu kontur grafikleri	43
4.6 %GAG verimi üzerine pH ve sıcaklık interaksyon etkisini gösteren grafikler a) 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri izohips eğrileri; b) 2 boyutlu kontur grafikleri ..	43
4.7 %GAG verimi için modelden (Eş. 4.2) tahminlenen değerlere karşı içsel studentleştirilmiş kalıntılar grafiği.....	49
4.8 %GAG verimi üzerine enzim miktarı ve pH interaksyon etkisini gösteren grafikler a) 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri izohips eğrileri; b) 2 boyutlu kontur grafikleri	50
4.9 %GAG verimi üzerine enzim miktarı ve sıcaklık interaksyon etkisini gösteren grafikler boyutlu yanıt yüzey grafikleri izohips eğrileri; b) 2 boyutlu kontur grafikleri	50
4.10 %GAG verimi üzerine pH ve sıcaklık interaksyon etkisini gösteren grafikler a) 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri izohips eğrileri; b) 2 boyutlu kontur grafikleri	51
4.11 Kondroitin-4-sülfat standardı, tavuk sternumu ve dana tendonundan elde edilen GAG örneklerinin FTIR spektrumları	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.12 Sternumdan elde edilen glikozaminoglikan ekstraktına ait SEM görüntüleri	56
4.13 Tendondan elde edilen glikozaminoglikan ekstraktına ait SEM görüntüleri	58
4.14 GAG zincirlerine ait halka örgü modelinin şematik gösterimi.....	59
4.15 Tavuk sternumuna ait %1, %2 ve %3 konsantrasyonda hazırlanan sülfatlanmış glikozaminoglikan çözeltisinin kayma hızı-kayma gerilimi değişimi grafiği	64
4.16 Dana tendonuna ait %1, %2 ve %3 konsantrasyonda hazırlanan sülfatlanmış glikozaminoglikan çözeltisinin kayma hızı-kayma gerilimi değişimi grafiği	65
4.17 GAG örneklerinin DSC termogramı a) tavuk sternumundan GAG b) dana tendonundan GAG	69
4.18 Tavuk sternumundan elde edilen glikozaminoglikan örneğinin DSC termogramı.....	70



TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 GAG'ların temel disakkarit birimleri	5
3.1 Tavuk sternumdan GAG eldesi için belirlenen bağımsız değişkenler ve kodlanmış seviyeleri	27
3.2 Tavuk sternumundan GAG eldesi için oluşturulan deneme planı	27
3.3 Dana Tendonundan GAG eldesi için belirlenen bağımsız değişkenler ve kodlanmış seviyeleri	28
3.4 Dana tendonundan GAG eldesi için oluşturulan deneme planı.....	28
3.5 Gradient Tablosu Agilent Eclipse AAA (150 mm kolon için).....	34
4.1 Tavuk sternumu ve dana tendonunun bileşimi (%w/w)	36
4.2 Optimizasyon denemeleri için gerçekleştirilen ekstraksiyon koşullarında elde edilen %GAG verimi sonuçları	38
4.3 Tavuk sternumundan GAG ekstraksiyonunda işlem parametrelerinin etkisi ..	39
4.4 Modelin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler.....	40
4.5 Optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması.....	45
4.6 Optimizasyon denemeleri için gerçekleştirilen ekstraksiyon koşullarında elde edilen %GAG verimi sonuçları	46
4.7 Dana tendonundan GAG ekstraksiyonunda işlem parametrelerinin etkisi.....	47

TABLolar DİZİNİ (devam)

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4.8 Dana tendonundan elde edilen GAG' a ait modelin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler	47
4.9 Optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması.....	52
4.10 Tavuk sternumu ve dana tendonundan elde edilen glikozaminoglikan ekstraktına ve kondroitin-4-sülfat standardına ait elde edilen renk değerleri	60
4.11 Molekül ağırlıkları.....	61
4.12 Tavuk sternumu ve dana tendonunudan elde edilen GAG örneklerinin toplam amino asit içeriğinin karşılaştırılması.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
L*	Renk analizi sonrası elde edilen parlaklık değeri
a*	Renk analizi sonrası elde edilen kırmızılık değeri
b*	Renk analizi sonrası elde edilen sarılık değeri
R ²	Regresyon Katsayısı
R ² _{adj}	Düzeltilmiş regresyon katsayısı
A	Absorbans (nm)
T _g	Camsı geçiş sıcaklığı
Da	Dalton
µl	Mikrolitre
g	Gram
mg	Miligram
s	Saniye
mL	Mililitre
M	Molarite
°C	Santigrad
C.V.	Varyasyon Katsayısı

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AACC	American Association of Cereal Chemists
GAG	Glikozaminoglikan
KS	Kondroitin sülfat
DS	Dermatan Sülfat
HS	Heparan sülfat
HA	Hyalüronik asit
ESM	Ekstraselüler matriks
DMMB	Dimethylmethylen Blue
DSC	Differential Scanning Calorimetry
CIE	Commission Internationale de l'Eclairage, CIE
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Analizi
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
RSM	Response Surface Method
SD	Serbestlik derecesi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

1. GİRİŞ

Ekstrasellüler matriks, hücreler arası boşlukları dolduran ve hücreleri birbirine bağlayan, çoğu protein, hormon, proteoglikan ve büyüme faktörlerini içeren bir yapıdan oluşmaktadır (Uslu ve Eltas, 2015). Sıklıkla bağ doku olarak adlandırılan ekstrasellüler matriks, kıkırdak ve kemikte fazla miktarda bulunmaktadır. Tavuk sternumu ve dana tendonu ekstrasellüler matriks bileşenlerince zengin kaynaklardır (Coulson et al., 2015). Bu nedenle enzimatik ekstraksiyon için kullanılan hammadde sternum ve dana tendonu olarak belirlenmiştir.

2020 yılına ait Abalıoğlu Lezita Gıda San. A.Ş. alınan bilgiye göre tavuk işlendikten sonra yıllık ortalama 6.376.000 kg göğüs kafesi meydana gelmektedir. Bu miktarın %10'u sternumu oluşturmaktadır. Dana tendonu ise et işleme endüstrisi sonucu hayvansal bir yan ürün olarak ortaya çıkmaktadır. Ortaya çıkan atık ve yan ürünlerin etkili bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle hammaddeden ekstraksiyon yöntemi ile değerli bileşenin elde edilmesi ve oluşan bu atıkların değerli ürünlere dönüştürülmesi için yeni yöntemler geliştirilmesi gerekmektedir (Martone, Pérez ve Sánchez, 2005).

Ticari olarak GAG ekstraksiyonunda kullanılan yüksek hammadde maliyeti göz önünde bulundurulduğunda ise ticari olarak farklı GAG kaynaklarına ihtiyacın arttığı görülmektedir. Yapılan çalışmalar da tavuk ayağı kıkırdağının potansiyel bir GAG kaynağı olduğu belirtilmiştir (Widyaningsih et al., 2016).

Asit mukopolisakkarit olarak da bilinen GAG'lar, bir tür heteropolisakkarittir (Yunchang et al., 1995). Doğrusal bir polisakkarit olan GAG'lar disakkarit bileşimine ve sülfatlanma derecelerine göre adlandırılmaktadır (Terzioğlu, 2002). GAG'lar sülfatlanmış ve sülfatlanmamış olarak iki temel sınıfa ayrılmaktadır. Kondroitin sülfat, dermatan sülfat, keratan sülfat, heparin ve heparan sülfat sülfatlanmış glikozaminoglikanlar hyalüronik asit ise sülfatlanmamış glikozaminoglikan olarak bilinmektedir. Kondroitin sülfat kıkırdak, tendon ve aort damarı duvarında; dermatan sülfat kalp kapakçıklarında ve kan damarlarında; keratan sülfat kornea, kıkırdak, kemik, saç, tırnakta bulunmaktadır (Ötleş vd, 2015).

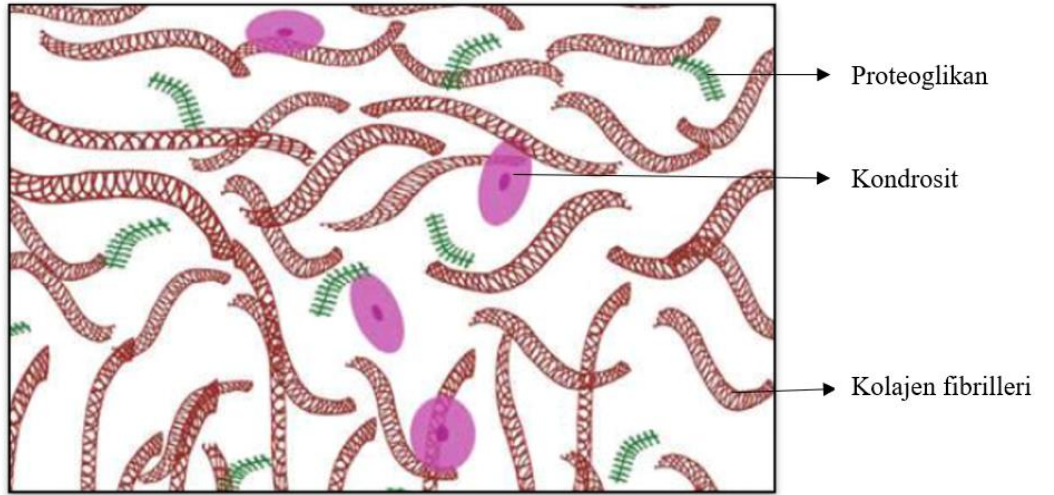
Alkali ortamda enzimatik hidroliz, kıkırdaktan ve bağ dokudan kondroitin sülfat eldesi için kullanılan en yaygın yöntem olarak kabul edilmektedir. Alkaliler, kondroitin sülfat ile çekirdek proteini arasındaki kovalent bağları parçalayabilmektedir. Papain, alkalaz, tripsin ve pepsin gibi enzimler ise genellikle kıkırdaktan kondroitin sülfat salınımında proteini hidrolize etmek için seçilmektedir (Wang et al., 2019). Glukozamin, eklemlerde oluşan hasarın etkisini azaltan bir amino monosakkarit olarak bilinirken; kondroitin sülfat artrit, arteriyoskleroz (damar sertleşmesi) ve kanser gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Nakano et al., 2001; Theocharis et al., 2006; Kozakçioğlu, 2009). Ayrıca GAG'lar antikoagülan, hipolipidemik, antitümör, antiviral gibi vücudun bağışıklığını destekleyici birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (Cui et al., 2012).

Bu tez çalışmasında tavuk sternumundan ve dana tendonundan enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile GAG elde edilmesi, ekstraksiyon parametrelerinin (pH, enzim miktarı, sıcaklık, süre) GAG verimi üzerine olan etkisinin ve optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Design Expert Paket Programı ile belirlenen deneme desenine göre farklı ekstraksiyon koşullarında GAG eldesi gerçekleştirilmiştir. Tavuk sternumu ve dana tendonundan optimum koşullarda elde edilen GAG örneklerine karakterizasyon analizleri yapılmıştır. Böylece tavuk kesim yan ürünü olan sternumun ve dana tendonunun alternatif GAG kaynağı olarak değerlendirilmesi ve katma değeri yüksek glikozaminoglikan eldesi sağlanmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glikozaminoglikanların Yapısı

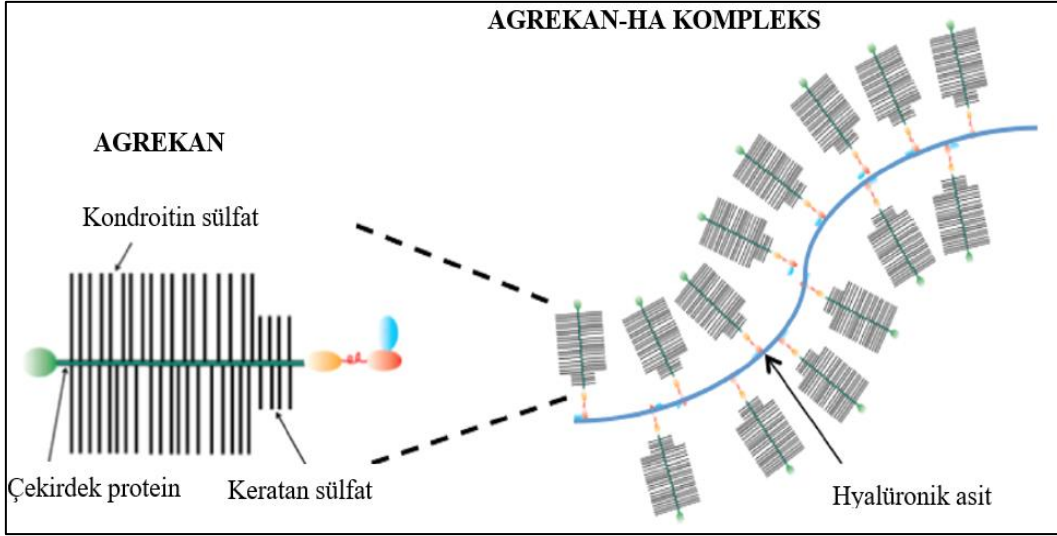
Çok hücreli canlılarda hayvan dokularında hücre dışında bulunan hücre dışı matriks, hücreye oksijen ve besin difüzyonu sağlanmasında gözenekli bir yol sağlamaktadır. Hücre dışı matriks, fibröz proteinler ve heteropolisakkaritlerin bir arada bulunduğu ağ şeklinde bir jel yapıdan oluşmaktadır (Şekil 2.1). Bu jel yüksek viskoziteye sahip, mukoz ve sünen bir ipliksi yapıdadır. Fibröz proteinler (kolajen, elastin, fibrinojen) kıkırdak, tendon, deri gibi bağ dokularının hücrelerarası boşluklarında glikozaminoglikanlardan oluşan jel yapısı içerisinde gömülü vaziyette bulunmaktadır (Ötleş vd, 2015).



Şekil 2.1. Hiyalin eklem kıkırdağında proteoglikanlar, kolajen ve kondrositlerin şematik gösterimi (Kotecha et al., 2013)

Glikozaminoglikanlar genellikle dallanmamış bir heteropolisakkarit olarak bilinmektedir. Çekirdek proteinine kovalent olarak bağlanan heteropolisakkarit zincirlerinden doğal olarak oluşan makromoleküllerdir. Dallanmış makromolekülün tamamı proteoglikan olarak adlandırılmaktadır. Bu yapı tüp fırçası (bottlebrush) benzeri bir konfigürasyona sahiptir. Başka bir deyişle proteoglikanı oluşturan bu polisakkarit zincirlerine GAG'da denmektedir. Bu yapının yaklaşık olarak molekül ağırlığı 10^3 kDa'dır (Alexander et al., 1996; Coulson et al., 2015).

Fırça benzeri bir konfigürasyona sahip olan Agrekan-Hyalüronik asit kompleksi eklem kıkırdağında mevcut olan proteoglikan yapısı olarak bilinmektedir. Bu yapıda glikozaminoglikan molekülleri bağlayıcı protein ile merkezi ana zinciri oluşturan hyalüronik asite bağlanmaktadır. Ayrıca, hyalüronik asit ana zincire bağlı çok sayıda uzantılar mevcuttur. Bu uzantıların merkezinde çekirdek proteini ve çekirdek proteinine bağlı keratan sülfat ve kondroitin sülfat glikozaminoglikanları bulunmaktadır. Şekil 2.2’de Agrekan-Hyalüronik asit kompleksine ait şematik gösterim görülmektedir.



Şekil 2.2. Eklem kıkırdağı proteoglikanı Agrekan-Hyalüronik asit kompleksine ait şematik gösterim (Horkay et al.,2021)

Glikozaminoglikanlar ilk tanımlandıklarında mukopolisakkarit olarak adlandırılmıştır. Proteoglikanlar, glikoproteinlerin aksine, %95’den fazla karbonhidrat ve %5 kadar protein içermektedir. Bu sebepten dolayı proteoglikan özelliklerinin, proteinlerden ziyade polisakkaritlere daha yakın olduğu bilinmektedir (Devlin, 1997). Glikozaminoglikan çözeltilerinin mukoz ve ipliksi bir yapıya sahip olmasından dolayı yüksek viskoziteye ve elastikiyete sahip olduğu bilinmektedir (Saldamlı,2017).

Glikozaminoglikanlar birbirini tekrarlayan disakkarit birimlerinin birbirine bağlanmasıyla oluşmaktadır. Disakkarit birimini oluşturan monosakkaritler, genellikle heksozamin (N-asetil-galaktozamin veya N-asetil-glukozamin) ve diğer monosakkarit türevi (üronik asit, D-glukuronik asit veya L-iduronik asit) gruplarını içermektedir. (Schaefer and Schaefer, 2010). Üronik asidin sülfat ve karboksilat

gruplarının bir arada bulunması glikozaminoglikanlara negatif yük kazandırmaktadır. Tablo 2.1’de GAG’ların temel disakkarit yapısını oluşturan monosakkaritler belirtilmiştir.

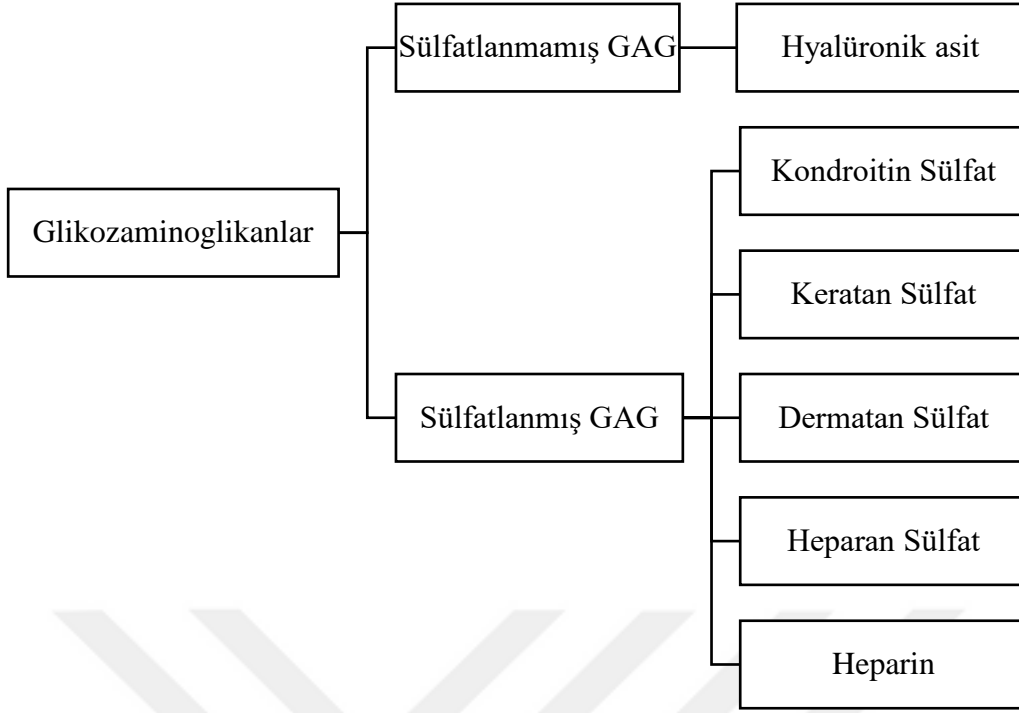
Tablo 2.1. GAG'ların temel disakkarit birimleri (Lee et al., 2016)

1.Şeker	2.Şeker	Glikozaminoglikan
N-asetil-D-glukozamin	D-glukuronik Asit	→ Hyalüronik asit
	D-galaktoz	→ Keratan sülfat
D-glukozamin	D-glukuronik Asit	→ Heparan sülfat
	L-iduronik asit	→ Heparin
N-asetil-D galaktozamin	D-glukuronik Asit	→ Kondroitin sülfat
	L-iduronik asit	→ Dermatan sülfat

Ekstrasellüler matriks hücrelerin birarada tutunmasını sağlayan, dokularda gerilme ve mekanik etkiye karşı direnç sağlayan, suda çözünebilen moleküllerin difüzyonuna yardımcı olan bir yapıdır (Seyfeli vd., 2001).

2.2. Glikozaminoglikanların Sınıflandırılması

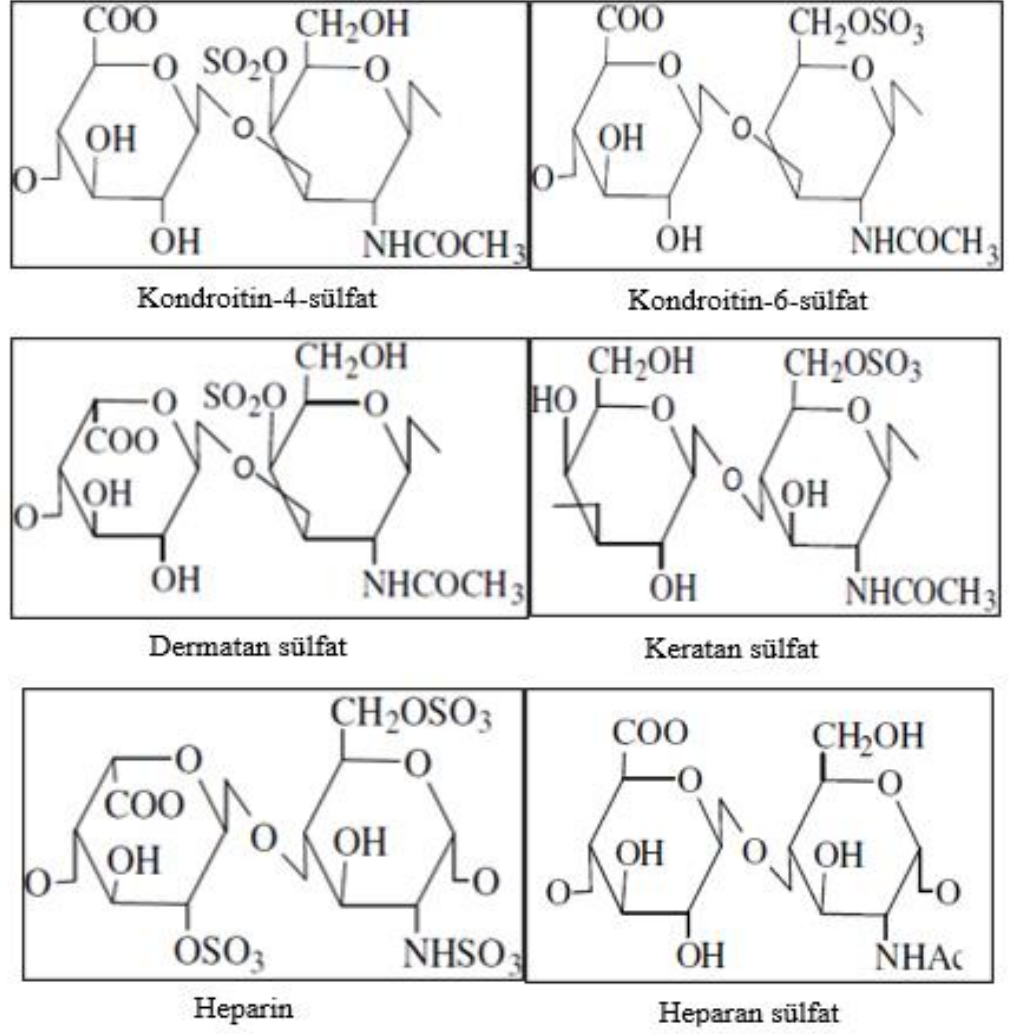
Doğrusal bir polisakkarit olan GAG disakkarit bileşimine ve sülfatlanma derecelerine göre adlandırılmaktadır (Terzioğlu, 2002). Glikozaminoglikanlar sülfatlanmış ve sülfatlanmamış olarak iki temel sınıfa ayrılmaktadır. Kondroitin sülfat, keratan sülfat, dermatan sülfat, heparan sülfat ve heparin sülfatlanmış glikozaminoglikanlar hyalüronik asit ise sülfatlanmamış glikozaminoglikan olarak bilinmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Glikozaminoglikanların sınıflandırılması

Hyalüronik asit dışındaki sülfatlanmış glikozaminoglikanlar proteoglikanlara kovalent bağ yapısıyla bağlanan daha küçük yapıdaki polimerlerden oluşmaktadır.

Şekil 2.4'de sülfatlanmış glikozaminoglikanların kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 2.4. Sülfatlanmış glikozaminoglikanların kimyasal yapısı (Üçgül vd., 2018)

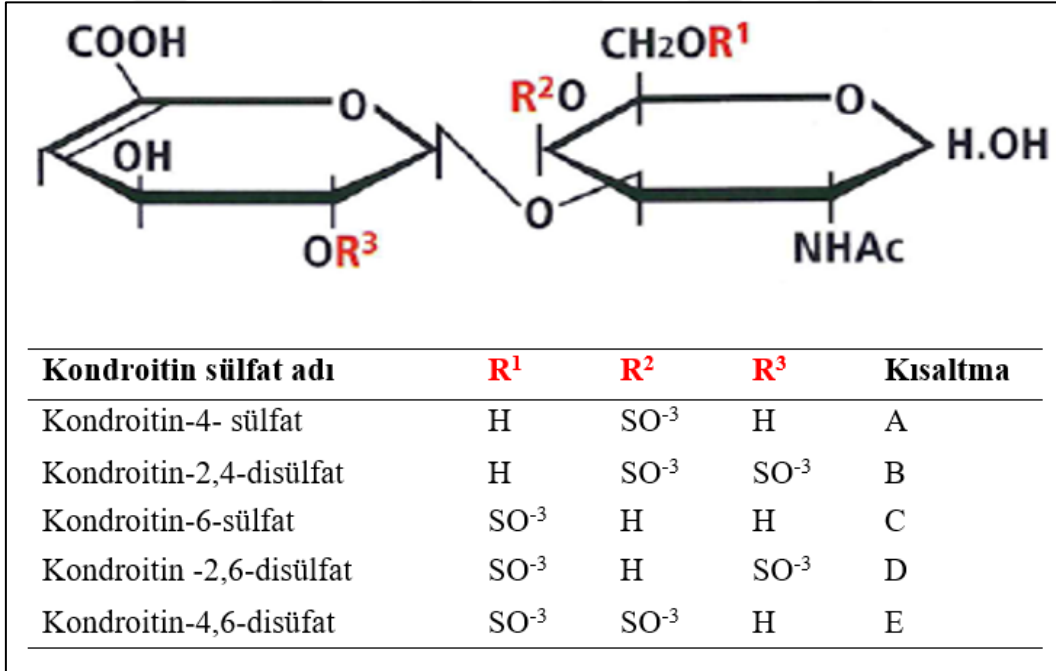
Kondroitin sülfat, art arda gelen N-asetil-D-galaktozamin (GalNAc) ve D-glukuronik asit (GlcUA) birimlerinden oluşmaktadır.

Kondroitin sülfat sülfatlanma konumuna bağlı olarak kondroitin-4-sülfat ve kondroitin-6-sülfat olarak ikiye ayrılmaktadır. Kondroitin-4-sülfat yapısında 4 nolu karbon atomu sülfat grubu taşırken, kondroitin-6-sülfat yapısında 6 nolu karbon atomu sülfat grubu taşımaktadır (Lohmander et al., 1980). Kondroitin sülfat molekülleri vücutta proteinlerle birleşerek proteoglikanları oluşturmaktadır. Çekirdek proteinine bağlı olarak bulunan kondroitin sülfat, eklem kıkırdağındaki proteoglikanlarda bulunmaktadır. Papain enzimi aktivitesi ile glikozaminoglikanlar

bağlı buldukları proteinden ayrılarak serbest kalabilmektedirler (Garnjanagoonchorn et al., 2007).

Kondroitin sülfat, 15.000-25.000 Da moleküler ağırlıklara denk gelen 30 ile 50 disakkarit birimi içermektedir. Proteoglikan yapısında bulunan protein çekirdeğine bağlı kondroitin sülfat yaklaşık 100 disakkarit biriminden oluşmakta ve bu, $1.5-2 \times 10^6$ Da molekül ağırlığına denk gelmektedir (Devlin, 1997).

4. pozisyonda ve 6.pozisyonda monosülfatlanmış N-asetil-D-galaktozamin en bilinen kondroitin sülfat yapısıdır. Bu duruma ek olarak farklı sayıda ve pozisyonda sülfat içeren kondroitin sülfat yapıları da mevcuttur (Volpi, 2007). Farklı birimlerden oluşan kondroitin sülfat yapıları Şekil 2.5’de verilmiştir.



Şekil 2.5. Farklı birimlerden oluşan kondroitin sülfat yapıları

Kondroitin sülfat; kollajen fibril bütünlüğü, hücre içi sinyal iletimi, hücre tanıma, akson oluşumu sırasında hücre yönlendirme, ekstraselüler matris bileşeninin glikoprotein yüzeyine bağlanması gibi birçok biyolojik fonksiyona sahiptir (Gilbert et al, 2004). Kıkırdakta kan dolaşımı olmadığı için dokunun ana bileşeni olan kondroitin sülfat suyun, besin öğelerinin ve diğer moleküllerin hareketinde rol almaktadır (Saldamlı,2017).

Kondroitin sülfat, tek başına, glikozamin veya diğer bileşenler ile kombinasyon halinde, Avrupa ve ABD’de bir nutrasötik olarak kullanılmaktadır (Volpi, 2009).

Kemik yapısının oluşumunda başlıca rol alan glikozaminoglikanların, kondroitin-4-sülfat, kondroitin-6-sülfat ve keratan sülfat olduğu bilinmektedir. Keratan sülfat, tekrarlayan N-asetilglikozamin-6-sülfat ve D-galaktoz birimlerinden oluşmaktadır Yapılarında sülfat grupları taşımaktadır. Keratan sülfatın özellikle dokularda kıkırdak, intervertebral diskler gibi yapılarda, kondroitin sülfatın ise oksijen açısından zengin, genç ve küçük dokularda yoğunlukta olduğu belirlenmiştir (Terzioğlu, 2002).

Dermatan sülfat, N-asetil-D-galaktozamin ve L-iduronik asit olan disakkarit biriminden oluşmaktadır. Kondroitinde bulunan glukuronat biriminin beşinci atomunda epimize olarak iduronata dönüşmesiyle oluşmaktadır. Glikozaminoglikan zinciri çekirdek proteininde sentezlenmektedir. Başlıca deride, tendonlarda, kan damarlarında ve kıkırdakta bulunmaktadır (Saldamlı, 2017; Üçgül vd., 2018).

Heparin, antikoagülan etkiye sahip, karaciğer ya da akciğerde sentezlenen çekirdek proteine kovalent olarak bağlanan hücre yüzeyinde ya da hücre dışı matriste bulunan bir glikozaminoglikandır (Wardrop and Keeling, 2008). Bu nedenle tıp alanında yaygın kullanım alanına sahip olduğu bilinmektedir. Heparin, D-glukozamin ve D-glukuronik birimlerinden oluşurken heparan sülfat, D-glukozamin ve L-iduronik asit birimlerinden oluşmaktadır (Shriver et al., 2012). Heparin memeli dokularında bulunmakta ve diğer glikozaminoglikanların aksine bağ dokusunun bir bileşeni değildir. Atardamar duvarındaki mast hücrelerinin granüllerinde bulunmaktadır (Saldamlı, 2017). Heparan sülfat reseptör görevinde, hücre büyümesinde ve hücrelerarası bağlantıda rol almaktadır. Hücre yüzeyinde ve bazal membranlarda bulunmaktadır (Gardiynoğlu, 1999). Heparan sülfat genellikle tüm hayvan dokularında bulunmaktadır. Heparinden farklı olarak antikoagülan özellik göstermemektedir (Garg et al., 2011).

Hyalüronik asit β -1,3 bağı D-glukuronik asit ve N-asetilglukozamin birimlerinden oluşmaktadır. Hyalüronik asit birbirini takip eden 30000 kadar disakkaritin β -1,4 bağı ile bağlanmasıyla oluşmuştur ve yaklaşık olarak 100 kDa'dan yüksek molekül ağırlığa sahiptir (Price, 2007; Ötleş vd, 2015). Hyalüronik asit, cildin bağı dokusunda, göbek kordonunda, gözdeki vitröz sıvıda ve eklemlerdeki sinoviyal sıvıda bulunmaktadır. Hyaluronik asit bazı bakteriler tarafından sentezlenebilmektedir (Papakonstantinou et al., 2012, Devlin., 1997). Hyalüronik asitdin yapısında bulunan disakkarit birimleri anyonik gruplara sahip olduğundan kationları ve su moleküllerini bağlamaktadır. Böylece hyalüronat çözelti içerisinde kuru hacmini yaklaşık 1000 kat arttırmaktadır. Hyalüronat çözeltisinin viskozitesinin kayma hızıyla değiştiği bilinmektedir. Düşük kayma hızında yüksek viskoziteye sahip hyalüronik asit çözeltisi düşük kesme hızında bir ağ yapısı oluşturmaktadır ve akışı engellemektedir. Kesme hızı yükseldikçe hyalüronat molekülleri akış yönünde dizilmekte ve akmaya karşı gösterdiği direnç azalmaktadır. Bu nedenle hyalüronat moleküllerinin absorbe edici ve kayganlaştırıcı madde olarak bilinmektedir (Saldamlı, 2017).

2.3. Glikozaminoglikan Kaynakları

Etlik piliçlerin yaklaşık %70-75'i yenilebilir kısımlardan oluşurken, %25-30'luk kısım doğrudan insan tüketimine uygun olmayan baş, ayak, bağırsak, tüy, kan ve iç organlar gibi kısımlardan oluşmaktadır. Kesim sonucu oluşan yan ürünlerden doğru bir şekilde faydalanmak ekonomi ve sürdürülebilir çevre adına önem teşkil etmektedir. Bu sebepten dolayı yan ürün ve kesim atıklarının etkin şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Mezbaha ve kümes hayvancılığı kesiminden kaynaklanan atıklar, kıkırdak kaynakları olarak hizmet edebilmektedir. Kıkırdak, ise esas olarak glikozaminoglikanlar ve kollajenlerden oluşmaktadır (Garnjanagoonchorn et al., 2007; Vázquez et al., 2013). Tavuk kesimhane atıklarından biri göğüs kafesi kemiği (sternum), ekstrasellüler matriks bileşenlerince zengin olan bir atıktır. Ekstrasellüler matriks, hücreler arası boşlukları dolduran ve hücreleri birbirine bağlayan, protein, hormon, proteoglikan içeren kompleks ve dinamik bir yapıdan oluşmaktadır (Uslu ve Eltas, 2015).

Kondroitin sülfat kıkırdak, tendon ve aort damarı duvarında; dermatan sülfat kalp kapakçıklarında ve kan damarlarında; keratan sülfat kornea, kıkırdak, kemik, saç, tırnakta bulunmaktadır (Ötleş vd, 2015).

Gıda endüstrisinde et sektöründe kesim sonrası ortaya çıkan atıklar, çevresel kirliliğe sebep olmakta ve oluşan bu atıkların değerli ürünlere dönüştürülmesi için yeni yöntemler geliştirilmesi gerekmektedir (Martone et al, 2005).

Köpek balığı, sığır eti, karides ve domuz önceden glikozaminoglikan kaynağı olarak kullanılmaktayken sonrasında bu hammaddelerin glikozaminoglikan kaynağı olarak kullanılmasında pahalı olması, alerji etkisinin olması ve tüketiminin yaygın tercih edilmemesi sorunları ortaya çıkmıştır. Bu sebeple kullanılacak olan diğer kaynaklardan birinin tavuk ayağının kıkırdağı olduğu belirtilmiştir (Widyaningsih et al., 2016).

Kondroitin sülfata olan talebin artmaya devam etmesi, ticari olarak farklı GAG kaynaklarına ihtiyaç duyulacağını göstermektedir. Sığırlarda görülen enfeksiyon gibi bazı durumların GAG eldesinde potansiyel bir risk olduğu düşünülmektedir. Köpekbalığı kıkırdağı kullanılarak gerçekleştirilen GAG eldesinde ise köpekbalığı kıkırdağı tedariğinin gelecekte sınırlı olabileceği düşünülmektedir. Belirtilen kısıtlar farklı GAG kaynakları arayışının olduğunun göstergesidir (Garnjanagoonchorn et al., 2007; Xiong et al., 2009; Luo et al., 2002). Nakano ve ark. (2012) yaptığı ekstraksiyon çalışmasında yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı alternatif kaynak olarak etlik piliçlerin omurga kıkırdağını kullanarak GAG ekstraksiyonu gerçekleştirmiştir (Nakano et al., 2012).

Sulityowati ve ark. (2015) köpekbalığı kıkırdağından glukozamin ve kondroitin sülfat ekstraksiyonu gerçekleştirmiştir. Kondroitin sülfat ticari olarak, sığır kıkırdağı, sığır nefes borusu ve köpekbalığı yüzgeci gibi kaynaklardan elde edilmektedir (Rani et al., 2017). Kondroitin sülfat ekstraksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda timsah kıkırdağı, vatoz kıkırdağı ve tavuk omurgası, köpekbalığı yüzgeci (Garnjanagoonchorn et al., 2007); tavuk ayağı kıkırdağı (Widyaningsih et al., 2016); geyik boynuzu (Gujral et al., 2014); ördek soluk borusu (Vittayanont and Jaroenviriyaapap, 2013); kemikli balıklar (Maccari, Galeotti, and Volpi, 2015);

deniz patlıcanı (hıyarı) (Zou et al., 2016); köpekbalığı kıkırdağı (Sulityowati et al., 2015) kaynak olarak kullanılmıştır. Maccari ve ark. (2015) fener balığı, mezgitgiller, dikenli köpek balığı, somon ve ton balığı kullanarak yaptığı çalışmada glikozaminoglikan polisakkaritinin alternatif kaynaklarını araştırmışlardır. He ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada patojenik olmayan E. coli suşundan metabolik yol ile kondroitin sülfat elde edilmiştir. Elde edilen kondroitin sülfatın yüksek maliyete sahip olması ve ticarileştirilebilir sülfasyon yönteminin uygulanamaması gibi bazı dezavantajları olduğu belirtilmiştir.

2.4. Glikozaminoglikan Ekstraksiyon Yöntemleri

Kondroitin sülfat genel olarak alkali yöntem, enzimatik yöntem ve ultrasonik yöntem olmak üzere üç farklı şekilde ekstrakte edilmektedir (He et al., 2014). Endüstriyel uygulamalarda sığır ve domuz soluk borusu, köpekbalığı yüzgeci, vb. gibi hammaddelerden kondroitin sülfat izolasyonu için gerçekleştirilen dört temel işlem basamağı aşağıdaki sıralanmaktadır (Shi et al., 2014; Vázquez et al., 2013)

- Hammaddenin kimyasal maddeler ile hidrolizi
- Proteoglikan çekirdeğinin parçalanması
- Proteinlerin seçici olarak ortadan kaldırılması ve kondroitin sülfat izolasyonu
- Kondroitin sülfatın saflaştırılması

Hayvansal dokudan GAG ekstraksiyonu genellikle hammaddenin kimyasal maddeler ile hidrolizi ile gerçekleştirilmektedir. Ekstraksiyon sonucunda GAG'ın farklı yollardan geri kazanımı ve saflaştırma aşamaları için alkaliler, sistein, guanidin hidroklorik asit ve setilpiridinyum klorür, trikloroasetik asit kullanılmaktadır (Michelacci and Horton, 1989; Souza et al., 2007).

Proteoliz, dokulardan glikozaminoglikan-peptit yapısının eldesi için kullanılan genel bir yöntemdir. Proteoliz için iki kez kristalize edilmiş papain, birçok araştırmacı tarafından kullanılan proteinazlardan birisidir. İki kez kristalize edilmiş proteinaz, daha ekonomik bir proteinaz ile değiştirilebilir. Kullanılacak olan

proteolitik enzim GAG zincirlerine bağlı peptitlerin boyutuna bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (Nakano et al., 2010).

Alkali ortamda enzimatik hidroliz, kondroitin sülfat eldesi için en yaygın yöntem olarak kabul edilmektedir. Alkaliler, kondroitin sülfat ile çekirdek proteini arasındaki kovalent bağların parçalanmasına olanak sağlamaktadır. Papain, alkalaz, tripsin ve pepsin gibi enzimler ise genellikle kıkırdaktan kondroitin sülfat salınımında proteini hidrolize etmek için seçilmektedir. Ayrıca, kondroitin sülfat üretimi sırasında proteoglikanların ayrışmasını desteklemek için, alkali konsantrasyonu artırılabilir. Kondroitin sülfatın saflaştırılması için, kromatografi ve membran ayırma teknolojileri yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang et al., 2019).

2.4.1. Enzimatik ekstraksiyon yöntemi

Olgunlaşmamış papaya meyvesinden elde edilen papain (EC 3.4.22.2), pH 3 ile 12 aralığında etkin bir proteazdır (Jin and Toda 1988). Papain proteinlere, peptidlere, amino asit esterlerine ve amid bağlarına karşı proteolitik aktivite göstermekte; genellikle gıda ve tıp alanlarında kullanılmaktadır (Uhlig, 1998).

Garnjanagoonchorn ve ark. (2007) timsah, köpekbalığı, vatoz ve tavuk omurgası kullanarak enzimatik yöntem ile kondroitin sülfat ekstraksiyonu gerçekleştirmiştir. 10 g kıkırdak örneğine 4 mg papain/g kıkırdak enzimi eklenerek 1: 10 oranında pH'ı 7.0 olan 0.1M sodyum fosfat tamponu içerisinde (0.005 M etilendiamintetra asetik asit, 0.005 M sistein hidroklorit ve %0.02 sodyum azid) 65°C'de 48 saat ekstrakte edilmiştir. Tavuk omurgası, timsah dil kemiği ve sternumu kıkırdağı potansiyel kondroitin sülfat kaynağı olarak kullanılmıştır. 100 g kurutulmuş kıkırdakta bulunan kondroitin-4-sülfat miktarının 11.55 ile 14.84 g aralığında değiştii belirlenmiştir.

Luo ve ark. (2002) yaptığı çalışmada hammadde olarak kullandığı tavuk omurga kıkırdağını (8g) 40 mL tamponlanmamış 3 M MgCl₂ içerisinde 24 saat ve 48 saat; oda sıcaklığı ve 4°C'de ekstrakte etmiştir. Aynı miktardaki örnekler ayrıca 40 mL 3M guanidin- HCl ve 50 mM sodyum asetat tamponu pH 5.8 (10 mM

disodium EDTA) ile aynı süre ve sıcaklıkta ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar diyaliz edildikten sonra liyofilize edilip proteinleri proteoglikan yapısından uzaklaştırmak için papain (40 mg/g kuru örnek) kullanılmıştır. 48 saat 3 M MgCl₂ ile ekstraksiyon işleminin veriminin (%88,4 ± 2.6) 3M guanidin-HCl ile ekstraksiyon işleminin verimine (%82,1 ± 1.5) kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ekstraksiyondan sonra gram tavuk omurga kıkırdağı başına ortalama 32,9 mg toz ürün elde edilmiştir. Üründeki ortalama kondroitin sülfat miktarı ise %75,5 olarak belirlenmiştir.

Khan ve ark. (2013) tavuk omurga kıkırdağını (10g) parçalayıp 50mL 3M MgCl₂.6H₂O (60.9g /100mL) ile 4°C'de 48 saat inkübasyona bırakmıştır. Ardından diyaliz edilip papain ile glikozaminoglikan ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Tavuk omurgası kıkırdağının sülfatlı GAG içeriğinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Ekstraksiyon sonucu elde edilen üründe %70,77 oranında GAG tespit edilmiştir.

Nakano ve ark. (2012) etlik piliç biyokütlesinden (ezilmiş kemik, kıkırdak, deri, kas) doku proteolizi ile kondroitin sülfat eldesi gerçekleştirmiştir. Tavuk kesim sonucu ortaya çıkan mekanik sıyırma artıklarından farklı proteolitik enzimler kullanarak (papain, pankreatin, kivi meyvesi homojenatı, flavourenzim) kondroitin sülfat elde edilmiştir. Yağı uzaklaştırılmış kuru doku örnekleri papain (4mg enzim/g doku) ve 1: 20 oranında pH 5.5 0.1 M sodyum asetat tamponu ile 65°C'de 1 gece; pankreatin ile 50°C'de 1 gece; flavourenzim ile 50°C'de 1 gece ve kivi meyvesi homojenatı ile 65°C'de 8 saat boyunca sindirime bırakılmıştır. Kullanılan proteolitik enzimlerin kondroitin sülfat-peptit yapısının üretimi için yeterli aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Çalışmada kloroform ve metanol ile yağ uzaklaştırma işlemi yerine santrifüj ve filtrasyon uygulanabileceği önerilmiştir. Gerçekleştirilen iyon değiştirme kromatografisi sonucuna göre kondroitin sülfatın geri kazanımının papain ve flavour enzimde daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Widyaningsih ve ark. (2016) tavuk ayağı kıkırdağından kondroitin sülfat ve glikozamin eldesi için farklı ekstraksiyon yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Örneklere su, asetik asit ve papain enzimi olmak üzere 3 farklı yöntem ekstraksiyon yöntemi uygulamışlardır. Uygulanan ekstraksiyon koşullarını 100°C'de 2 ve 2.5

saat kaynar su; 37°C'de 7 ve 17 saat boyunca asetik asit; 65°C'de 24 ve 48 saat papain olarak belirlemişlerdir. Elde edilen toz üründe en yüksek glikozamin seviyesine (%8.1) 2.5 saatlik kaynar su uygulaması ile ulaşılırken, en yüksek kondroitin sülfat seviyesine (%2.47) 48 saatlik enzim muamelesi ile ulaşılmıştır. 2.5 saatlik kaynar su uygulaması sonucunda %2.03 kondroitin sülfat seviyesine ulaşılmıştır böylece 2.5 saatlik kaynar su uygulamasının diğerlerine kıyasla en uygun ekstraksiyon yöntemi olduğuna karar verilmiştir.

Srichamroen ve ark. (2013) hammadde olarak etlik piliç kıkırdağı kullanarak doku otolizi ile kondroitin sülfat-peptit eldesi gerçekleştirmiştir. Kıkırdak doku örnekleri ait 1: 10 oranında 0.5 M pH 4.5 Sodyum asetat tamponu ile 37°C'de 17 saat ekstrakte edilmiştir. Kıkırdak doku örnekleri art arda 2 ve 3 kez tekrar ekstrakte edilmiş ardından kalıntı kıkırdak doku ekstraksiyonu için ise papain enzimi ilavesiyle ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda 100 g kuru kıkırdak dokudan 20 g kondroitin sülfat-peptit elde edilmiştir. İzole edilen kondroitin sülfat-peptit bileşimini ortalama olarak %82,5 ile kondroitin-4-sülfat oluşturmaktadır. İki kez ekstraksiyonun GAG eldesi için ekonomik açıdan yeterli olduğu belirlenmiştir.

Talmoudi ve ark. (2020) kıkırdaklı balıklar sınıfından olan kedibalığı (*Scyliorhinus canicula*) kullanarak glikozaminoglikan ekstraksiyonu üzerine yapılan bir çalışmada papain enzimi kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik ekstraksiyon sonrasında trikloroasetik asit ve alkali hidrolizi uygulamasının ekstraksiyon verimine etkisi araştırılmıştır. Enzimatik ekstraksiyon sonrasında trikloroasetik asit ile gerçekleştirilen deproteinizasyon işleminin GAG ekstraksiyonu için en uygun olduğu belirlenmiştir. Agaroz jel elektroforezi ve FTIR analizi sonuçları ekstrakte edilen GAG'ların bileşiminin %12.889 kondroitin sülfattan %87.111'inin ise dermatan sülfat olduğu belirlenmiştir. Ekstraksiyon akabinde saflaştırma basamağında gerçekleştirilen etanol uygulamasının ürün saflığının artırılması için gerekli bir işlem olduğu belirlenmiştir.

Tavuk omurga kıkırdağı kullanılarak yapılan bir kondroitin sülfat ekstraksiyonu çalışmasında 100 g kıkırdak, et ve bağ dokuların uzaklaştırılması amacıyla boyutu küçültülerek 15 dakika boyunca kaynatılmıştır. Et ve bağ dokularından uzaklaştırılan kıkırdak örnekleri saf su ile yıkanmıştır. Ekstraksiyon işlemi için

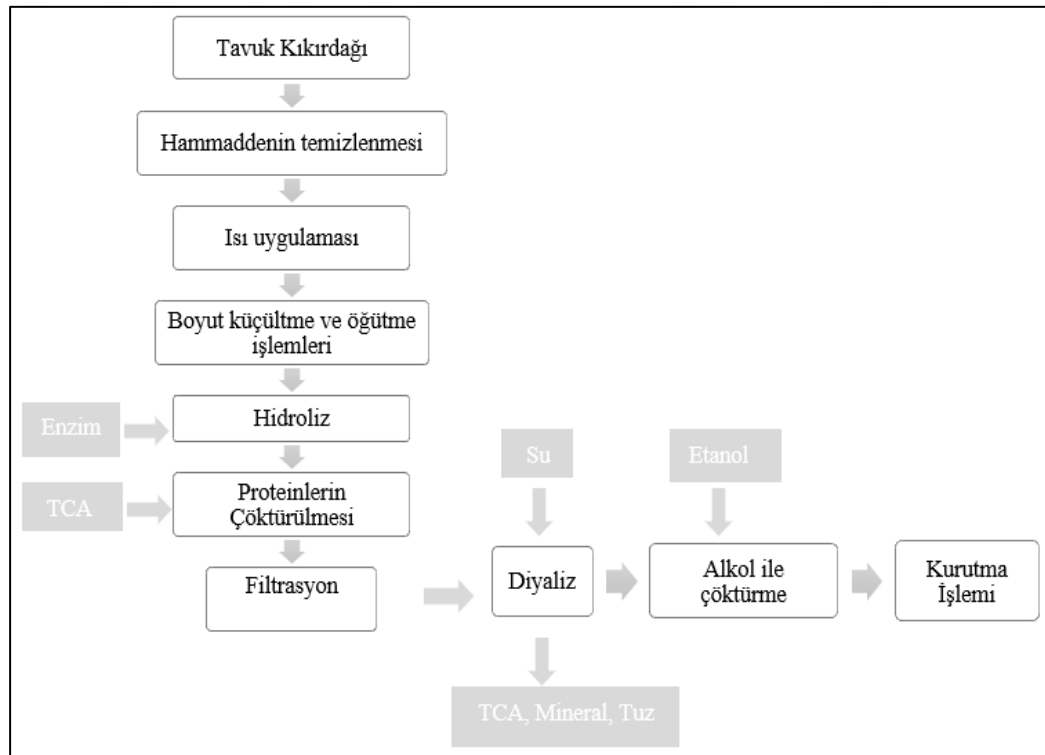
temizlenen kıkırdaklar, 0.1 M sodyum asetat tamponu, 2.4 mM EDTA ve 10 mM sistein HC1 içeren karışımda (pH 6.8) papain (1U / 100 mg doku) enzimi yardımıyla 65 °C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ekstraksiyondan sonra proteinlerin uzaklaştırılması için karışım 4 hacim etanol ilave edilerek çöktürülmüştür. Ardından çözelti, 4 °C'ye kadar soğutulup bir gece bekletilmiştir. Karışım 13,000 g ve 4 °C'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası çökelti ayrılmıştır ve 50 mM sodyum asetat tamponu (pH 6.8) içerisinde yeniden süspanse edilmiş ve 2 kat oranda etanol ile presipite edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında sürekli karıştırılarak damla damla 2 hacim etanol ilave edilerek çöktürülmüştür. Ardından çözelti kondroitin sülfatça zengin presipitat eldesi için 5 ml 50 mM sodyum asetat tamponu ile (pH 6.8) karıştırılmış ve tekrar 4 ° C'ye soğutularak 1 gece bekletilmiştir. Çöktürme işleminin ardından saf suya karşı 1 gece boyunca diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Diyaliz edilen kondroitin sülfat örnekleri liyofilize edilmiştir. Kondroitin sülfat ekstraksiyon verimi %15 olarak belirlenmiştir. FTIR analizi sonuçlarından, kondroitin sülfat omurgasının içerdiği kondroitin sülfat türünün kondroitin-4-sülfat olduğu belirlenmiştir (Rani et al., 2017).

Balbinot Alfaro ve ark. (2022) hindi kesim sonrasında ortaya çıkan yüksek miktarda bağ dokusu içeren ve potansiyel bir GAG kaynağı olan hindi çenesinden sarkan ibiğe benzer etimsi yapıyı kullanarak elde edilen GAG'ın biyoaktif özelliklerini araştırmışlardır. Ekstraksiyon çalışmasının ilk basamağında hammaddeden yağ uzaklaştırma işlemi gerçekleştirilmiş ve ardından papain ile enzimatik ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda dokudan %2,7 verim oranıyla GAG ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Etanol ile çöktürme işleminin 48 saatten 72 saate arttırılması ile daha yüksek ekstraksiyon verimlerine ulaşacağı düşünülmektedir.

Wu ve ark. (2022) iskeleti kısmen kemikleşmiş olan hibrit mersin balığı kıkırdağı kullanarak enzimatik hidrolizasyonla düşük molekül ağırlıklı kondroitin sülfat ekstraksiyonu gerçekleştirmiştir. Ekstraksiyon çalışmasının ardından molekül ağırlığını göz önünde bulundurularak kondroitin sülfat düşük molekül ağırlıklı fraksiyonuna ayrılmıştır. Kondroitin sülfat yapısının glikozidik β -1,3 ve β -1,4 bağlarını içeren N-asetil-galaktozamin ve glukuronik asit birimlerinden oluştuğu tespit edilmiştir.

Le Vien ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada tavuk omurga kıkırdağından GAG ekstraksiyonu ve optimizasyonunun gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada 0.1 M fosfat tamponu ve papain enzimi kullanarak GAG ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyona ait bağımsız değişkenler pH (6.0-8.0), sıcaklık (55°C-75°C), papain miktarı (%0,2- %1), süre (60 dk-420 dk) olarak belirlenirken yanıt olarak ise glikozaminoglikan içeriği seçilmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonucunda proteinler %10 trikloroasetik asit ile uzaklaştırılmıştır. Ardından trikloroasetik asit ve küçük moleküllerin uzaklaştırılması için çözelti 14 kDa cut off'daki membran içinde saf suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminin ardından, diyaliz edilen çözelti GAG eldesi için etanol ile çöktürülmüştür. Optimum işlem koşulları olarak, enzim miktarı = %0.85, pH =5.81, ekstraksiyon sıcaklığı=53,34°C ve ekstraksiyon süresi=204 dakika olarak belirlenmiştir. Optimum koşullardaki GAG verimi %25.7 olarak tespit edilmiştir.

Şekil 2.6'da tavuk kıkırdağından GAG ekstraksiyonuna ait akım şeması verilmiştir.



Şekil 2.6. Tavuk kıkırdağından GAG ekstraksiyonu akım şeması (Le Vien et al, 2017)

2.4.2. Diğer yöntemler

Kim ve ark. (2014) geyik boynuzlarından kondroitin sülfat eldesini yüksek hidrostatik basınç ve enzimatik hidrolizin birlikte kullanımı ile gerçekleştirmişlerdir. 100 MPa'dan daha yüksek basınç, suyun proteinin iç kısmına penetrasyonunu arttırmakta ve hücre zarına zarar vermektedir. Yeni bir ekstraksiyon yaklaşımına sahip bu yöntem ile etkili bir şekilde kondroitin sülfat eldesi gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda 0.1 MPa ortam basıncında düşük verime (19 ± 1.1) 100 MPa ortam basıncında yüksek kondroitin sülfat verimine (95.1 ± 2.5) ulaşılmıştır. Yüksek hidrostatik basınç ve enzimatik hidroliz uygulamasının birlikte kullanılması etkili ve ekonomik bir kondroitin sülfat izolasyonu sağlamaktadır.

Jin ve ark. (2015) geyik boynuzundan glikozaminoglikan eldesinde sıcak su ekstraksiyonu ve ultra yüksek basınç ekstraksiyonu yöntemlerini kullanmışlardır. En yüksek miktarda GAG eldesi için optimum koşullar sıcak su ekstraksiyonu için 90C, 20 saat, 1: 29,34 katı-çözgen oranı; ultra yüksek basınç ekstraksiyonu için 200 MPa, 30 dakika ve 1: 30 katı-çözgen oranı olarak belirlenmiştir. Sıcak su ekstraksiyon veriminin yüksek basınç ekstraksiyon veriminden daha yüksek olduğu bulunmuştur.

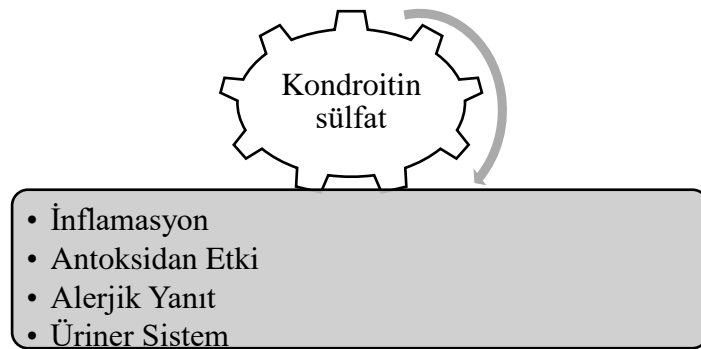
He ve ark. (2014) yüksek yoğunluklu vurgulu elektrik alan (PEF) kullanarak balık kılçıklarından kondroitin sülfat ekstraksiyonunu ve ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirmiştir. Ekstraksiyon denemeleri 1, 2, 3, 4, 5 ve %6 NaOH konsantrasyonunda, g hammadde başına 1: 5, 1:10, 1:15, 1:20 ve 1:25 g / mL olacak şekilde NaOH çözeltisi içerisinde; (5, 10, 15, 20 ve 25 kV/cm elektrik alan kuvvetinde ve 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 darbe sayısı koşullarında gerçekleştirilmiştir. 1:15 g/ mL malzeme-sıvı oranı, 16.88 kV/cm elektrik alan yoğunluğu, 9 darbe sayısı ve %3.24 NaOH konsantrasyonu koşulları altında maksimum kondroitin sülfat verimi 6,92 g/L olarak elde edilmiştir. Geleneksel yöntemlere kıyasla yüksek yoğunluklu vurgulu elektrik alan metodu ile daha hızlı ekstraksiyon sağlanmakta ve yüksek kondroitin sülfat içeriğine sahip GAG eldesi gerçekleştirilmektedir. Kondroitin sülfat içeriğinin darbe sayısı, elektrik alan kuvveti ve NaOH konsantrasyonunun artmasıyla arttığı tespit edilmiştir. PEF'in ısı olmayan bir

ekstraksiyon stili ile yüksek hızda ve çevreye salınan düşük kimyasal kirlilik ile kondroitin sülfat ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

2.5. Glikozaminoglikanların Fonksiyonları

Kondroitin sülfat hücre bölünmesi, merkezi sinir sisteminin gelişimi gibi temel biyolojik süreçlerde rol almaktadır. Kondroitin sülfatın temel işlevi, kıkırdak içindeki üstlendiği roldür. Kondroitin sülfat fazla miktarda su çekmesi nedeniyle bir ozmotik şişme basıncı oluşturmaktadır. Bu basınç, matriksin çeşitli sıkıştırma güçlerine karşı direnç göstermesini sağlamaktadır. Kondroitin sülfat, oral olarak kapsül ve tabletlerde, yiyecek ve içeceklerde, kremlerde, göz damlasında, kozmetikte ve tıp alanında kullanılmaktadır (Lauder, 2009).

Kondroitin sülfat yapısı sayesinde kıkırdakların su ve besin hareketinde rol alan bir moleküldür. Dejeneratif eklem rahatsızlığında kıkırdak aşınmasından kaynaklı kondroitin sülfat kaybı mevcuttur. Glukozamin ve kondroitin sülfatın farklı etki mekanizmaları sayesinde artrit semptomlarını azalttığı bilinmektedir. Örneğin, glukozamin eklemde oluşan ağrıyı azaltırken kondroitin sülfat ise eklem yıkımını engellemekte ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmaktadır. Glukozamin, glikozaminoglikan sentezinde kullanılırken kondroitin sülfat kıkırdak dokusunu bozan enzimleri inhibe etmektedir. Böylece bu iki molekül beraber etki göstererek artrit tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Banoğlu, 2004). Şekil 2.7'de kondroitin sülfatın terapötik rolleri gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Kondroitin sülfatın terapötik rolleri (Lauder, 2009)

Kısmen saflaştırılmış kondroitin sülfatın gıda koruyucu ve emülsifiye edici ajan olarak kullanıldığı bilinmektedir (Hamano et al., 1989; Vázquez et al., 2013). Kondroitin sülfatın, doku mühendisliği ve ilaç endüstrisinde de gelecekteki kullanımını düşünüldüğünde tavuk omurgası kırırdağının daha ucuz ve sürdürülebilir bir kaynak olduğu düşünülmektedir (Rani et al., 2017).

Jin ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada geyik boynuzundan glikozaminoglikan ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve geyik boynuzu özünün yaşlanma ve stres önleyici özelliklerinden dolayı son zamanlarda tüketicilerin dikkatini çektiği belirtilmiştir. Sağlık üzerinde oluşturduğu bu etkilerden dolayı tüketici talepleri göz önüne alındığında geyik boynuzu özleri ilaveli kahve ve içeceklerin üretimin gerçekleştirilmiştir (Jin et al., 2015).

Kozmetik alanda ve eczacılık sektöründe de kondroitin sülfat ve hyalüronik aside olan ilgi giderek artmaktadır (Vázquez et al., 2013).

2.6. Glikozaminoglikanların Sağlık Üzerindeki Etkileri

Glikozaminoglikanların antikoagülan, hipolipidemik, antitümör, antiviral, gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Cui et al., 2012).

Kondroitin sülfatın ekstraselüler matriksin anabolik/katabolik dengesini ayarlamak, inflamasyon ve katabolik sürece etki eden faktörleri azaltmak, osteoartritte yeni kırırdağ oluşumunda yer alan anabolik süreçleri uyarmak gibi etkileri de mevcuttur (Huskisson, 2008). Glukozamin, eklemlerde oluşan hasarın etkisini azaltan bir amino monosakkarittir. Kondroitin sülfat artrit, arteriyoskleroz (damar sertleşmesi) ve kanser gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (Nakano et al., 2001).

Düşük molekül ağırlıklı kondroitin sülfat, eklem hastalığı tedavisi için oral nutrasötik takviye olarak kullanılmaktadır (Raynauld et al., 2016). Kondroitin sülfat tek başına, hyalüronik asit veya kitosan ile birlikte, hasarlı dokuların yenilenmesine ve kemik onarımına katkı sağlamaktadır (Bianchera et al., 2014). Ayrıca, kondroitin sülfatın serbest radikal oluşumunda engelleyici bir rol üstlendiği; DNA

fragmentasyonunu önlediği, protein parçalanmasını ve hücre ölüm oranını da azalttığı bilinmektedir (Campo et al, 2006; Henrotin et al., 2010).

Eklem hastalığının en yaygın şekli olan osteoartrit, kıkırdak proteoglikanlarının katabolik kaybı sonucunda oluşmaktadır. Osteoartrit; eklem ağrısı, eklem hassasiyeti ve şişlik gibi semptomlarla ortaya çıkmaktadır (Gottlieb, 1997). Osteoartrit; genetik, metabolik ve biyokimyasal faktörlerin etkileşimiyle meydana gelen eklem kıkırdağında oluşan bir yetmezlik durumudur. Osteoartrit, 50 yıldır süregelen yaklaşık 40 milyon Avrupalının eklemlerinde mekanik fazla yüklenme ile gelişen, kıkırdak ve sinoviyal sıvıların kaybına neden olan, kemik bozulmasını, iltihaplanmayı, hareketliliğin azalmasını ve yaşam kalitesini etkileyen yaygın, ilerleyici, dejeneratif bir eklem ve kas-iskelet sistemi hastalığıdır. Kondroitin sülfat, günümüzde Avrupa Romatizma Birliği (EULAR) ve Avrupa Osteoporoz ve Osteoartrit Klinik ve Ekonomik Yönleri Derneği (ESCEO) tarafından diz, el tedavisinde yavaş etkili semptomatik moleküller olarak önerilmektedir (Restaino et al.,2019). Kondroitin sülfat kullanımda tavsiye edilen günlük tüketim miktarı 800-1200 mg'dır (Henrotin et al., 2010).

2.7. Yanıt Yüzey Yöntemi

Yanıt Yüzey Yöntemi, 1951 yılında ilk olarak Box ve Wilson tarafından ortaya atılmış ve geliştirmiştir (Mead and Pike, 1975). Yanıt Yüzey Yöntemi, deneysel tasarımları Taylor birinci ve ikinci dereceden denklemleri ile birleştiren optimum koşulları belirlemeye yönelik bilimsel bir yaklaşımdır. Ayrıca empirik model geliştirmeyi ve modeli değerlendirmeyi içeren iteratif bir prosestir. Yanıt Yüzey Yönteminin prensibini, istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birbiri ardına uygulanması ve her bir aşamada elde edilen verilerin bir sonraki aşamada kullanılması oluşturmaktadır. Yanıt Yüzey Yöntemi eleme denemeleri, bölge araştırması ve işlemin optimizasyonu olarak 3 ana aşamadan oluşmaktadır. Öncelikle sisteminin çıktılarının ya da yanıtların ve bu yanıtlar üzerinde etkili olabilecek bazı faktörlerin belirlenmesi gerekmektedir. Genellikle bu faktörler oldukça uzun bir liste oluşturmaktadır. Eleme denemeleri sayesinde işleme etki eden faktörler arasından önemli olanlar optimizasyon çalışmasına dahil olmaktadır. Yapılan bu eleme denemeleri istatistiksel önem açısından değerlendirilmektedir ve

böylece daha etkin bir deneme çalışmasının oluşturulması sağlanmaktadır. Ardından sistem faktörlerin, sistem yanıtında oluşturdukları değerlerin istenilen optimum işlem koşulları ile karşılaştırılması gerekmektedir. Yanıt Yüzey Yönteminin son aşamasında ise, işlem optimum noktaya yaklaştığında yanıt fonksiyonu optimum nokta etrafında belirgin bir eğrilik göstermektedir. Bu eğriliğin tahmin edilmesinde genellikle lineer olmayan genellikle ikinci dereceden polinomiyal eşitlikler kullanılmaktadır (Eren, 2004).

Yanıt Yüzey Yöntemi endüstriyel gıda sektöründe genellikle ürün formülasyonun sağlanması, ürünün geliştirilmesi ve tasarımına katkı sağlamaktadır. Bağımsız değişkenler yanıtta istenilen değişimi sağlamak amacıyla manipüle edilen değişkenlerdir (Myers and Montgomery, 1995).

Yanıt Yüzey Yöntemi uygulama tarafından belirlenen deneme deseninde daha az deney sayısı ile sistem hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlamakta, sisteme etki eden faktörlerin etkilerini yalnızca tek başına incelememekte, birbirleriyle interaksyonu göz önüne almaktadır. Bu durumların yanı sıra Yanıt Yüzey metodolojisi simetrik olmayan fonksiyonları modellemesinde yetersiz kalmaktadır (Myers and Montgomery, 1995).

Yanıt Yüzey Yönteminde genellikle tam faktöriyel tasarım, kısmi faktöriyel tasarım ve merkezi kompozit tasarımından oluşmaktadır.

2.7.1 Merkezi kompozit tasarım

Merkezi Kompozit Tasarımı aksenal ve merkez noktaları olarak bilinen iki faktöriyel noktadan oluşmaktadır. Merkezi Kompozit tasarımda yer alan faktörlerin seviyeleri, faktörün en yüksek ve en düşük düzeylerinden oluşmaktadır. Aksenal noktalar; k bağımsız değişken sayısına göre hesaplanmakta ($\alpha = 2k/4$) ve $+\alpha$ ve $-\alpha$ olarak tanımlanmaktadır. Merkez noktalar ise deneysel çalışmadan kaynaklı hatayı öngörmek için tekrar edilen noktalardan oluşmaktadır. Merkezi Kompozit Tasarımda belirlenen her bir faktöre beş düzeyden oluşmaktadır. Bu beş düzey; +1 ve -1 ile ifade edilen faktöriyel noktalar, $+\alpha$ ve $-\alpha$ ile ifade edilen aksenal noktalar, 0 olarak ifade edilen merkez noktalarıdır (Türk, 2016). Merkezi kompozit

tasarımında, sonuçlar Eşitlik 2.1'de belirtilen denklem kullanılarak değerlendirilmektedir.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i \leq j}^k \sum_j^k \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 \quad (2.1)$$

Belirtilen matematiksel modelde Y yanıt değişkenini, β_0 ve β_i sırasıyla sabit ve lineer katsayıyı temsil etmektedir. β_{ij} değişkenler arasındaki katsayıyı ve k faktör sayısını temsil etmektedir (Leong et al., 2013).

En küçük kareler yöntemi ile regresyon analizi ile de ikinci derece modeldeki katsayılar tahmin edilerek regresyon denklemi oluşturulmaktadır. Oluşturulan denklem yardımı ile de yanıtlar için tahmini sonuçları elde edilerek, tahminlerin doğruluğu, modelin yeterli olup olmadığı kontrol edilmektedir.

2.7.2. Optimizasyon

Yanıt Yüzey Yöntemi uygulaması bazı aşamalardan oluşmaktadır. İlk olarak gerçekleştirilmek istenilen optimizasyonda bağımsız değişkenler, yapılan ön çalışmalara bağlı olarak belirlenirken araştırmanın amacına göre, tarama çalışmalarıyla deneysel bölgenin sınırlandırılması gerçekleştirilmiş olmaktadır. Ardından deney tasarımının planının oluşturulması ve seçilen deneme desenine göre deneylerin gerçekleştirilmesi sağlanmalıdır. Deneme desenine göre denemeler gerçekleştirildikten sonra elde edilen verilerin matematiksel olarak analizi gerçekleştirilmeli ve uygun model seçimi sağlanmalıdır (Bezerra et al., 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Tez çalışması kapsamında tavuk sternumu Abalıoğlu Lezita Gıda San. A.Ş. tarafından dana tendonu Şanlı Et Pazarlama ve Gıda San. Ltd. Şti tarafından tedarik edilmiştir. GAG ekstraksiyonunda kullanılan papain (EC 3.4.22.2; 30000 units/mg) enzimi ve gerekli kimyasal maddeler Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

Tavuk sternumu ve dana tendonundan GAG ekstraktı eldesi için gerçekleştirilen çalışmanın ilk aşamasında tavuk sternumdan ve dana tendonundan farklı ekstraksiyon parametrelerinde (tampon çözeltisinin pH değeri, enzim miktarı, sıcaklık, süre) enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile GAG ekstraktı eldesi gerçekleştirilmiş ve Design Expert Paket Programı aracılığıyla optimum işlem koşulu belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında optimize edilen işlem parametrelerinde üretimler gerçekleştirilmiş ve elde edilen glikozaminoglikan örneklerine karakterizasyon analizleri uygulanmıştır.

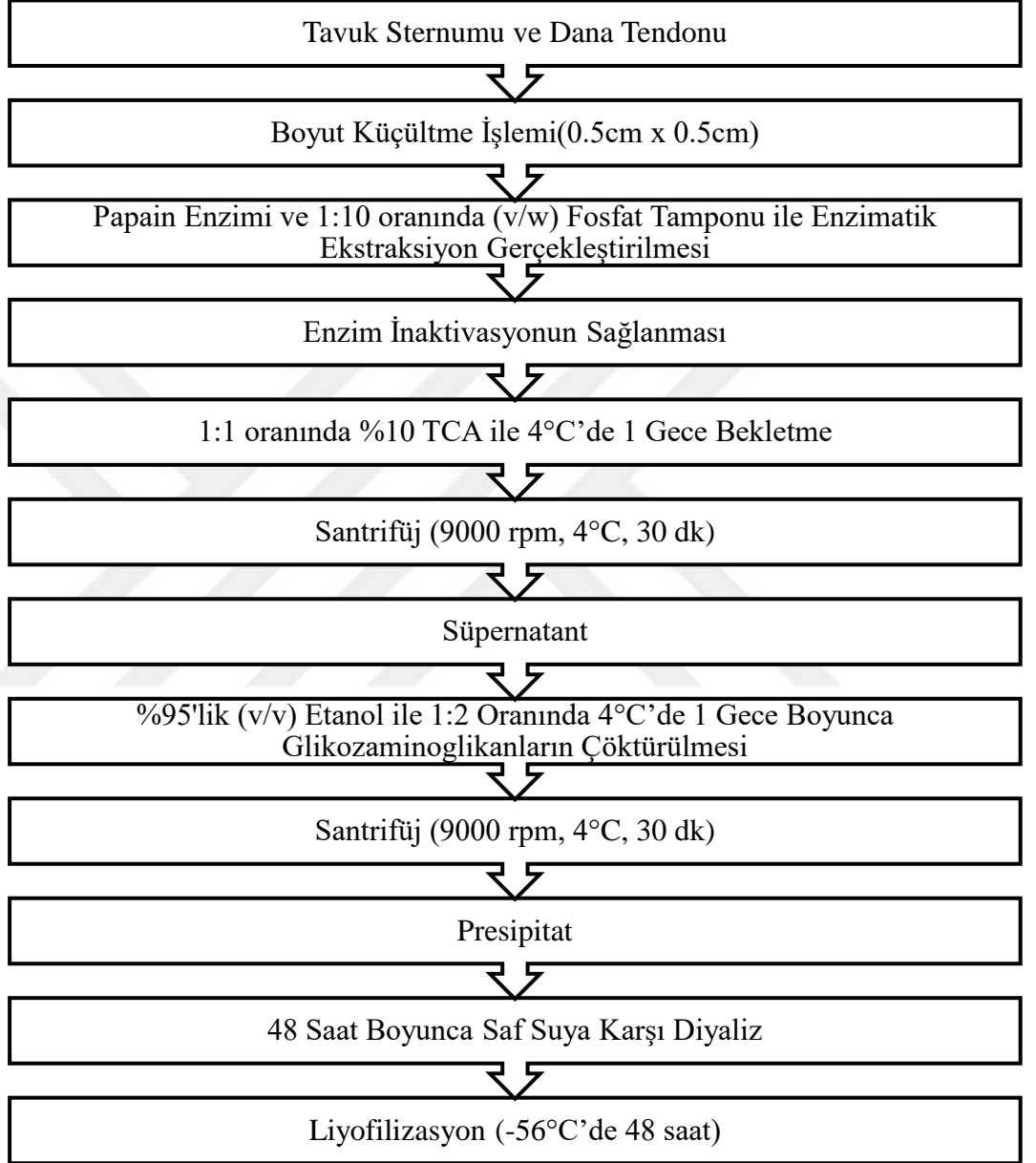
3.2.1. Glikozaminoglikan ekstraksiyonu

3.2.1.1. Uygulanan ön işlem

GAG ekstraksiyonu için kullanılan tavuk sternumu ve dana tendonu, kirletici maddelerin ve safsızlıkların temizlenmesi amacıyla su ile durulanmıştır. Boyutları 1 cm x 1 cm x 0,5 cm olacak şekilde küçültülen tavuk sternumu ve dana tendonu porsiyonlara ayrılmış ve ekstraksiyon uygulamasına kadar -18°C sıcaklıktaki soğuk depoda polietilen poşet içerisinde vakumlanarak muhafaza edilmiştir. Her üretim periyodunda aynı partiden hammadde kullanımı gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.2. Ekstraksiyon aşaması

Ön işlemleri tamamlanmış tavuk sternumu ve dana tendonundan GAG eldesi Şekil 3.1’de verilen akım şemasına göre gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Materyalden glikozaminoglikanın ekstraksiyonuna ait akım şeması

Ön işlemler sonrası tavuk sternumu ve dana tendonuna 1:10 (w/v) oranda farklı pH değerlerinde hazırlanan fosfat tamponu ve papain enzimi eklenmiş ardından karışım çalkalamalı su banyosu (WSB-30, Dahian, Kore) içinde belirli bir sıcaklıkta belirli bir süre ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon işleminin sonunda papain enziminin inaktivasyonu için örnek 100°C’deki kaynayan suda 10

dakika bekletilerek ısı işlem uygulanması sağlanmıştır. Enzim inaktivasyonunun ardından örnek karışımı soğutulmuş ve proteinlerin çöktürülmesi amacıyla, 4°C'de bir gece boyunca 1:10 oranında(v/v) %10'luk TCA ile karıştırılmıştır. İşlem sonunda santrifüj işlemiyle (9000 rpm, 4°C, 30 dakika) (Universal 320R Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Almanya) alt faz (presipitat) uzaklaştırılmış, üst faz ise 1:2 (v/v) oranında eklenen %95'lik (v/v) etanol ile 1 gece boyunca karıştırılarak çöktürülmüştür. Elde edilen presipitat 9000 rpm'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır.

3.2.1.3. Diyaliz ve liyofilizasyon

Santrifüj sonrasında toplanan alt fazlar saf suda 1:20 (w/v) oranda çözdürülerek 48 saat boyunca saf suya karşı 3.5 kDa'luk diyaliz membran (Thermo Fisher SnakeSkinTM, 3.5 K MWCO, 16 mm) içerisinde diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemi sonunda örnekler liyofilizatör (Martin Christ Alpha 1-2 LD plus, Osterode am Harz, Germany) kullanılarak -56°C'de 48 saat liyofilize edilmiştir. Liyofilize GAG örnekleri analiz edilinceye kadar -18°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Design Expert programı ile ekstraksiyon işlem parametrelerinin belirlenmesi ve optimizasyonu

Ekstraksiyon işlem koşullarının optimizasyonu için 4 faktör Merkezi Kompozit Tasarım (Central Composite Design) tasarımı kullanılmıştır. Bağımsız değişkenler tampon çözeltinin pH değeri, enzim miktarı, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi; yanıt değişkeni ise GAG verimi olarak seçilmiştir.

Tavuk sternumdan GAG eldesi için ekstraksiyon işlem koşullarının sınır değerleri Tablo 3.1'de; ekstraksiyon işlem parametrelerinin optimizasyonu aşamasında izlenecek olan deneme planı Tablo 3.2'de verilmiştir. Belirtilen deneme planında değişkenler sırasıyla A: enzim miktarı (% w/w_{protein}), B: tampon çözeltinin pH değeri, C: ekstraksiyon sıcaklığı (°C) D: ekstraksiyon süresi olarak kodlanmıştır.

Tablo 3.1. Tavuk sternumdan GAG eldesi için belirlenen bağımsız değişkenler ve kodlanmış seviyeleri

Bağımsız Değişkenler	Kodlanmış Sembol	Kodlanmış Seviyeler				
		-2	-1	0	1	2
Enzim Miktarı (%w/w _{protein})	A	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5
Tampon çözeltinin pH değeri	B	6.0	6.50	7.0	7.50	8.0
Ekstraksiyon Sıcaklığı (°C)	C	55	60	65	70	75
Ekstraksiyon Süresi (saat)	D	5	10	15	20	25

Tablo 3.2. Tavuk sternumundan GAG eldesi için oluşturulan deneme planı

Deneme No	A	B	C	D
1	1.20	7.50	70.00	20.00
2	0.90	7.00	65.00	15.00
3	0.90	7.00	65.00	15.00
4	1.20	6.50	60.00	20.00
5	1.20	7.50	70.00	10.00
6	1.20	7.50	60.00	20.00
7	0.60	6.50	60.00	10.00
8	1.20	6.50	70.00	10.00
9	0.90	8.00	65.00	15.00
10	0.60	7.50	70.00	20.00
11	0.60	7.50	60.00	10.00
12	0.60	6.50	70.00	10.00
13	0.90	7.00	65.00	5.00
14	0.90	7.00	55.00	15.00
15	0.60	7.50	70.00	10.00
16	0.60	7.50	60.00	20.00
17	0.90	7.00	65.00	15.00
18	1.20	7.50	60.00	10.00
19	0.60	6.50	70.00	20.00
20	0.90	7.00	65.00	15.00
21	1.20	6.50	60.00	10.00
22	0.90	7.00	65.00	15.00
23	0.90	6.00	65.00	15.00
24	1.20	6.50	70.00	20.00
25	0.60	6.50	60.00	20.00
26	0.90	7.00	65.00	25.00
27	1.50	7.00	65.00	15.00
28	0.90	7.00	75.00	15.00
29	0.30	7.00	65.00	15.00
30	0.90	7.00	65.00	15.00

Dana tendonundan GAG eldesi için ekstraksiyon işlem koşullarının sınır değerleri Tablo 3.3’de; ekstraksiyon işlem parametrelerinin optimizasyonu aşamasında izlenecek olan Deneme Dizaynı Tablo 3.4’de belirtilmiştir.

Tablo 3.3. Dana Tendonundan GAG eldesi için belirlenen bağımsız değişkenler ve kodlanmış seviyeleri

Bağımsız Değişkenler	Kodlanmış Sembol	Kodlanmış Seviyeler				
		-2	-1	0	1	2
Enzim Miktarı (% w/w protein)	A	0.5	0.8	1.1	1.4	1.7
Tampon çözeltinin pH değeri	B	6.0	6.50	7.0	7.50	8.0
Ekstraksiyon Sıcaklığı (°C)	C	55	60	65	70	75
Ekstraksiyon Süresi (saat)	D	5	10	15	20	25

Tablo 3.4. Dana tendonundan GAG eldesi için oluşturulan deneme planı

Deneme No	A	B	C	D
1	1.10	8.00	65.00	15.00
2	0.80	6.50	60.00	20.00
3	1.10	7.00	65.00	15.00
4	1.10	7.00	65.00	15.00
5	1.40	6.50	70.00	20.00
6	0.80	7.50	60.00	10.00
7	1.70	7.00	65.00	15.00
8	1.10	7.00	65.00	15.00
9	0.80	7.50	70.00	20.00
10	0.80	6.50	60.00	10.00
11	0.80	6.50	70.00	10.00
12	1.10	7.00	65.00	15.00
13	1.10	7.00	65.00	15.00
14	1.10	7.00	65.00	5.00
15	1.40	7.50	70.00	20.00
16	0.80	7.50	70.00	10.00
17	1.10	7.00	65.00	15.00
18	1.10	7.00	75.00	15.00
19	1.40	7.50	70.00	10.00
20	0.50	7.00	65.00	15.00
21	0.80	7.50	60.00	20.00
22	1.40	7.50	60.00	20.00
23	1.40	6.50	70.00	10.00
24	1.40	6.50	60.00	20.00
25	1.40	7.50	60.00	10.00
26	0.80	6.50	70.00	20.00
27	1.40	6.50	60.00	10.00
28	1.10	6.00	65.00	15.00
29	1.10	7.00	65.00	25.00
30	1.10	7.00	55.00	15.00

Merkezi Kompozit Tasarım deneme dizaynına göre her bir ürün için altısı merkez noktada olmak üzere toplam 30 deneme gerçekleştirilmiştir. Optimum işlem koşulları belirlenmesi için GAG veriminin maksimize edilmesi hedeflenmiştir.

İşlem değişkenleri ile yanıt olarak seçilen GAG verimi arasındaki ilişkiyi ifade eden kuadratik matematiksel model regresyon analizi sonucunda belirlenmiştir. Matematiksel modelde yer alan değişkenin lineer ve interaksiyon etki terimleri, etkilerin istatistiksel olarak matematiksel model açısından önemliliği F ve p-değerleri göz önüne alınarak incelenmiştir. Daha sonra kareler toplamındaki artış ve model uygunsuzluğu testi değerleri analiz edilmiştir. Matematiksel modelde yer alan yanıt terimlerinin önemi varyans analizi ile belirlenmiş ardından optimum noktanın belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Modele göre belirlenmiş optimum işlem koşullarında da beş deneme gerçekleştirilmiştir. Böylece optimum işlem koşullarının deneysel olarak doğrulanması sağlanmıştır.

3.2.3. Hammadde bileşim analizleri

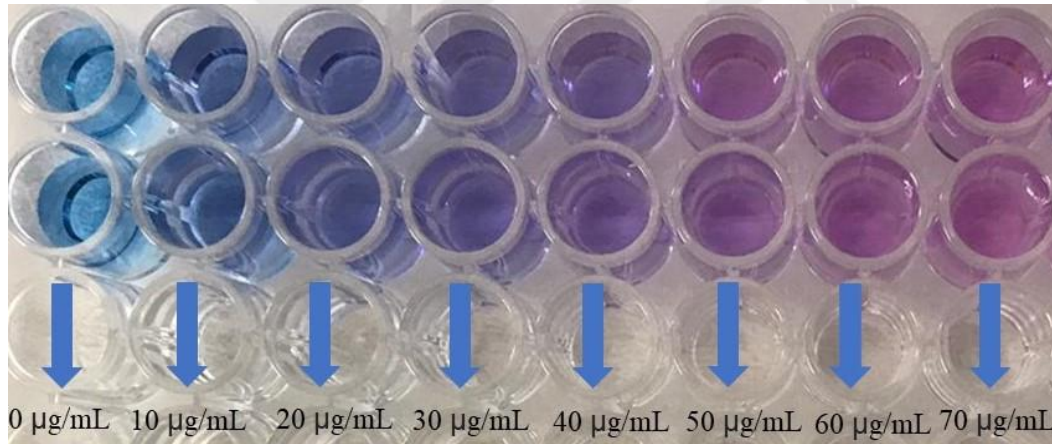
Tez kapsamında hammadde olarak kullanılan tavuk sternumunun ve dana tendonunun kimyasal kompozisyonunu belirlemek amacıyla nem, kül, yağ ve protein analizleri gerçekleştirilmiştir. Örneklerin nem içeriği gravimetrik yöntem AOAC (950.46 B), kül miktarı gravimetrik yöntem AOAC (920.153), yağ miktarı Soxhlet yöntem AOAC (960.39), protein içeriği AACC (2000) metot 46-30'da verilen yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Toplam karbonhidrat içeriği, toplam ağırlıktan (100g) protein, yağ ve kül miktarı ile nem içeriği arasındaki farkın hesaplanmasıyla tespit edilmiştir (Vázquez vd., 2016).

3.2.4. Glikozaminoglikan analizi

Liyofilize GAG örneklerinin kondroitin sülfat içeriğinin belirlenmesinde dimetilmetlen mavisi (DMMB) yöntemi kullanılmıştır (Farndale et al., 1986). İlk olarak, Whattman® 3MM filtre kâğıdı kullanarak DMMB reaktifi hazırlanmıştır (pH=3.0). 1 Litre boya çözeltisi hazırlamak için 3.04 g glisin, 1.6 g NaCl ve 95 ml 0.1 M asetik asit içeren 1 litre su içinde 16 mg DMMB çözülmüştür. Standart çözelti

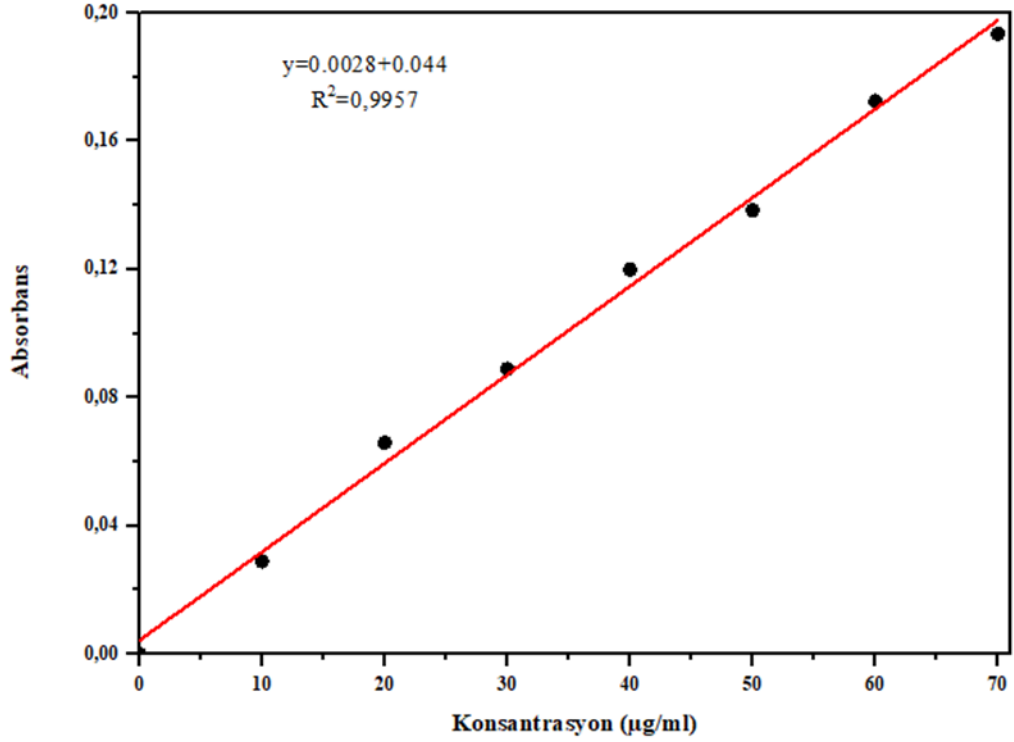
kondroitin-4-sülfat kullanılarak 500 µg/ ml su olacak şekilde hazırlanmıştır. Standart çözelti su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Pipet ile 96 kuyulu mikroparka içine her numuneden 20 µl çekilmiştir. Ardından 200 µl DMMB eklenerek 5 saniye çalkalanmıştır. Daha sonra 525 nm dalga boyunda plaka okuyucu (UV/VIS Multi well Spektrofotometre/ Thermo Scientific Multiskan GO) kullanarak absorpsiyon değeri ölçülmüştür (Ferndale et al., 1986).

Standart eğrinin çizilmesi için 1 mg kondroitin sülfat standardı (Sigma C9819) 5 mL saf suda çözündürülmüştür. Hazırlanan bu stok çözümden 0-70 ppm konsantrasyon aralığında kondroitin sülfat çözeltileri hazırlanmıştır. Şekil 3.2'de reaksiyon sonucu konsantrasyona bağlı olarak farklı renk veren kondroitin sülfat standart çözeltileri görülmektedir. Şekil 3.2'den anlaşılacağı üzere kondroitin sülfat standardı konsantrasyonu arttıkça renk maviden pembeye doğru değişim göstermektedir.



Şekil 3. 2. Reaksiyon sonucu konsantrasyona bağlı olarak farklı renk veren kondroitin sülfat standart çözeltileri (0ug/mL-70 ug/mL)

Şekil 3.3'de kondroitin-4-sülfat standart eğrisinin grafiği verilmiştir.



Şekil 3. 3. Kondroitin-4-sülfat standart eğrisi

Örneklerin analizinde ise; liyofilize GAG örnekleri saf suda 5mg/50mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Analiz işlemi için 20 µL örnek alınarak 200 µl DMMB boyası ilave edilmiştir. Oluşan çözeltinin absorbans değeri 525 nm dalga boyunda ölçülmüştür. GAG verimi Eşitlik 3.1 kullanılarak elde edilmiştir.

$$\text{GAG verimi (\%)} = \frac{\text{liyofilize ürünün g GAG içeriği}}{\text{hammadenin kuru temelde g ağırlığı}} \times 100 \quad (3.1)$$

Örneklerin kondroitin sülfat miktarı Şekil 3.3 'de belirtilen denkleme ($R^2= 0.99$) göre hesaplanmıştır.

3.2.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektrometresi analizi

Glikozaminoglikan örneklerinin Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi hizmet alımı yoluyla Ege Üniversitesi-Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (MATAL) Spectrum Two™ FTIR spektrometre (Perkin Elmer Inc., Norwalk, CT, USA) cihazı kullanılarak 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında oda koşullarında gerçekleştirilmiştir (Zhou et al., 2016).

3.2.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Glikozaminoglikan ekstraktı örneklerin morfolojik özellikleri mikro yapısı taramalı elektron mikroskobu (ThermoFisher, QUANTA FEG 250, ABD) kullanılarak Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde belirlenmiştir. Örnekler, görüntülemeye önce iletken altın-paladyum tabakası ile kaplanmıştır (Zhou et al., 2016).

3.2.7. Renk analizi

Örneklerin renk değerleri Minolta Colour Reader (CR-400 Japan) kullanılarak belirlenmiştir. Hesaplamalarda CIE Lab (L^* , a^* ve b^*) renk skalası kullanılmıştır. Tüm ölçümler 3 tekerrür yaparak ve her tekerrürde en az 3 ölçüm yaparak gerçekleştirilmiştir. Cihaz, beyaz standart levhası ile kalibre edildikten sonra örneklerin renk özellikleri L^* , a^* ve b^* değerleri cinsinden ölçülmüştür (Bougatef et al., 2018).

3.2.8. Molekül ağırlığı tayini

Elde edilen GAG örneklerinin moleküler ağırlık dağılımı ve indeksi analizi hizmet alımı yoluyla TÜBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. GAG örneklerine Jel Geçirgenlik Kromatografisi ile polimerde molekül ağırlığı tayini gerçekleştirilmiştir. Analiz için GAG örneği PBS (fosfat tamponlu salin) tamponu içeren ultra saf su içinde çözülüp daha sonra 0.45 μm gözenek çaplı naylon filtreden geçirilerek hazırlanmıştır. Örneğin molekül ağırlığı refraktif indeks

detektörü ve PL-aquagel-OH 8 µm kolonundan oluşan bir Agilent 1260 jel geçirgenlik kromatografi sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Mobil faz olarak ultra saf su (tampon olarak PBS ilave edilmiştir) kullanılmıştır. Mobil faz için akış hızı 1.0 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Kalibrasyon lineer polietileneokside standartları kullanarak, kalibrasyon aralığı $M_p:109-1.522.000$ g/mol olarak belirlenerek analiz gerçekleştirilmiştir. Molekül ağırlık ölçümleri iki tekerrür olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.9. Akış özelliklerinin belirlenmesi

GAG çözeltilerinin viskozite ölçümleri 25°C sıcaklıkta, Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde bulunan gerilim kontrollü DHR-3 reometre (TA Instruments, ABD) ile eş merkezli silindir prob (prob çapı: 27.99 mm, uzunluğu: 42.07 mm, ölçüm kabı çapı: 30 mm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı üç konsantrasyonda (%1, %2 ve %3) hazırlanan GAG çözeltilerinin akış davranışının belirlenmesi hedeflenmiştir. Analiz için örnek hacmi yaklaşık 23 ml ve ölçüm açıklığı 5917.1 µm olarak verilmiştir (Li vd., 2017).

Örneklerin akış davranışlarını incelemek amacıyla, kayma hızı $0.01-100$ s⁻¹ aralığında lineer olarak arttırılmıştır. Gerçekleştirilen analiz sonucunda kayma geriliminin ve görünür viskozitenin kayma hızı ile değişimi belirlenmiştir. Örnekler ölçüm öncesi manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözündürülerek ölçüm sırasında heterojen yapı nedeniyle oluşabilecek hatalar minimize edilmiştir. Viskozite ölçümleri iki paralel olarak ve her denemede yeni örnek kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.10. Aminoasit içeriği

GAG örneklerinin toplam aminoasit içeriği HPLC-DAD yöntemi ile Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde hizmet alımı ile belirlenmiştir. 0.1 g numune üzerine 2.5 ml 6 N HCl eklenmiştir. Oksidasyonu önlemek için 125 µL 2 mM fenol ve sistin eklenmiştir. Methionin ve tyrosinin geri kazanımını optimize etmek için 1 ml %2 DTDPDA çözeltisi eklenmiştir. Ardından örnekler 110 °C etüvde 24 saat bekletilmiş ve numune pH değeri nötre yakın (6.7-7.3) olacak şekilde ayarlanmıştır. Son hacim

değeri 50 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanarak 4000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. 1 ml örnek vialer aktarılıp HPLC (HPLC Agilent 1260 Infinity II) cihazına verilmiştir. Solvent A, 7.8 pH'da 40 mM borat tamponu; Solvent B, asetonitril: metanol: su (45:45:10, v/v/v) karışımından oluşmaktadır. Analiz 40°C fırın sıcaklığında 338 nm dalga boyunda 2 mL/dk akış hızında 20 µL enjeksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. Toplam analiz süresi 26 dk olarak belirlenmiştir. Analiz iki tekrür olarak gerçekleştirilmiştir. Zamana bağlı olarak değişen gradient akış Tablo 3.5'de cihazda kullanılan zamana bağlı olarak değişen gradient akış yüzdeleri verilmiştir.

Tablo 3. 5. Gradient Tablosu Agilent Eclipse AAA (150 mm kolon için)

Zaman (dk)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	100	0
1.9	100	0
18	43	57
18.6	0	100
22.3	0	100
23.2	100	0
26	100	0

3.2.11. Isıl özelliklerin belirlenmesi

GAG örneklerin ısıl özelliklerinin belirlenmesi için DSC cihazı (TA Q2000 DSC, New Castle, USA) kullanılmıştır (Cavalcanti vd., 2005). Vasconcelos Oliveira ve ark. (2017)'de verilen yöntem kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Örnekler 3.0-3,5 mg ağırlığında tartıldıktan sonra hermetik alüminyum örnek kaplarına yerleştirilmiş ve 20°C'den 400°C'ye 10°C/dk sıcaklık artışı ile ısıtılmıştır.

3.2.12. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 ve Design Expert 7.0 paket programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tahminlenen değerler ile deneysel veriler arasında fark olup olmadığı tek örnek t-testi kullanılarak, uygulanan regresyon analizi, istatistiksel analizler, izohips grafikleri, yanıt yüzey grafikleri ve optimizasyon

işlemleri Design Expert 7.0 (Stat-Ease Inc., ABD) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bileşim Analizleri

Tavuk sternumu ve dana tendonun kimyasal bileşimi Tablo 4.1'de verilmiştir. Tavuk sternumu (yaş temelde) %81,01 nem, %12,64 protein, %4,18 karbonhidrat, %1,75 kül ve %0,42 yağ içermektedir. Dana tendonu ise %63 nem, %27 protein, %8,7 yağ, %0,48 kül ve %0,33 karbonhidrat içermektedir.

Tablo 4.1. Tavuk sternumu ve dana tendonunun bileşimi (%w/w)

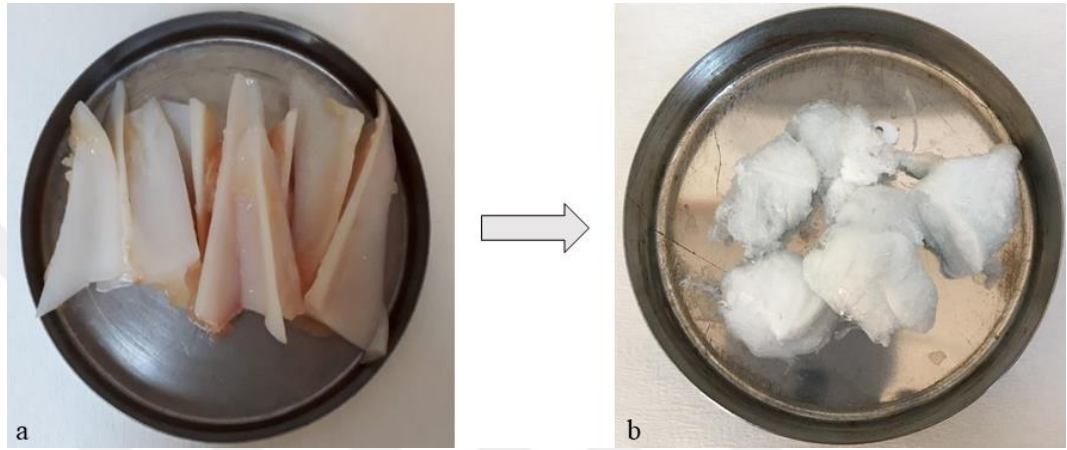
Kimyasal Bileşim	Tavuk Sternumu	Dana Tendonu
Nem	81,01±0,43	63,00±0,61
Protein	12,64±0,36	27,49±0,43
Yağ	0,42±0,05	8,70±0,27
Karbonhidrat ^a	4,18±0,52	0,33±0,07
Kül	1,75±0,01	0,48±0,00

a; 100 g'daki hammaddede yaş temelde ortalama nem, protein, kül ve yağ değerlerinin çıkartılarak hesaplanmasıyla bulunmuştur.

Dana tendonu kimyasal yapısı itibari ile daha fazla miktarda protein içermektedir. Dana tendonunun yapısında belirlenen %8,7 miktarındaki yağın, kesim sırasında mekanik olarak yağ dokusunun uzaklaştırılmamasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada kıkırdak matriksinin genel olarak %10-25 kolajen, %5-15 proteoglikan %70-80 sudan oluştuğu belirtilmiştir (Horkay, 2012). Akram ve Zhang (2020), tavuk sternal kıkırdağından kolajen ekstraksiyonu üzerine yaptığı çalışmada kıkırdak dokusunun bileşiminde %74,32 nem, %0,17 yağ, %2,30 kül, %12,7 protein ve %10,51 karbonhidrat bulunduğunu tespit etmişlerdir. Tavuk sternumunun kimyasal bileşimi literatürde yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında sonuçların benzer olduğu tespit edilmiştir.

4.2. Tavuk Sternumundan GAG Eldesi İçin İşlem Koşullarının Optimizasyonu

Tez çalışması kapsamında tavuk sternumundan Şekil 3.4’de belirtilen akım şemasına göre ekstrakte edilen glikozaminoglikan ekstraktına ait görüntü Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Tavuk sternumu(a) ve tavuk sternumundan üretilen GAG(b)

Tavuk sternumundan GAG ekstraksiyonuna ait olan deneme planı ve bu plana göre gerçekleştirilen denemelere ait sonuçlar Tablo 4.2 ’de belirtilmiştir. Belirtilen deneme planında sırasıyla A: enzim miktarı (%w/w protein), B: pH, C: ekstraksiyon sıcaklığı (°C) D: ekstraksiyon süresi değişkenler olarak; GAG verimi yanıt olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.2. Optimizasyon denemeleri için gerçekleştirilen ekstraksiyon koşullarında elde edilen GAG verimi sonuçları

Deneme No	A	B	C	D	GAG verimi (%)
1	1.20	7.50	70.00	20.00	15.862
2	0.90	7.00	65.00	15.00	26.586
3	0.90	7.00	65.00	15.00	28.504
4	1.20	6.50	60.00	20.00	12.18
5	1.20	7.50	70.00	10.00	20.048
6	1.20	7.50	60.00	20.00	14.546
7	0.60	6.50	60.00	10.00	22.19
8	1.20	6.50	70.00	10.00	11.004
9	0.90	8.00	65.00	15.00	16.632
10	0.60	7.50	70.00	20.00	13.384
11	0.60	7.50	60.00	10.00	20.72
12	0.60	6.50	70.00	10.00	12.824
13	0.90	7.00	65.00	5.00	12.39
14	0.90	7.00	55.00	15.00	17.934
15	0.60	7.50	70.00	10.00	17.01
16	0.60	7.50	60.00	20.00	13.664
17	0.90	7.00	65.00	15.00	28.154
18	1.20	7.50	60.00	10.00	11.046
19	0.60	6.50	70.00	20.00	11.55
20	0.90	7.00	65.00	15.00	28.658
21	1.20	6.50	60.00	10.00	10.416
22	0.90	7.00	65.00	15.00	27.832
23	0.90	6.00	65.00	15.00	11.76
24	1.20	6.50	70.00	20.00	10.766
25	0.60	6.50	60.00	20.00	18.032
26	0.90	7.00	65.00	25.00	11.004
27	1.50	7.00	65.00	15.00	13.538
28	0.90	7.00	75.00	15.00	13.202
29	0.30	7.00	65.00	15.00	21.616
30	0.90	7.00	65.00	15.00	27.258

Tavuk sternumundan glikozaminoglikan eldesine ait olan optimizasyon çalışmasında bağımsız değişkenler ile yanıt arasındaki ilişkiyi açıklayan quadratik matematiksel model, regresyon analizi yapılarak tespit edilmiştir. Optimizasyon sonucunda elde edilen matematiksel model denkleminde her bir değişkenin öncelikle lineer etki terimleri, daha sonra quadratik ve interaksiyon etki terimleri sırasıyla matematiksel denkleme eklenmiştir.

Her bir faktörün yanıt üzerindeki lineer, interaksiyon ve quadratik etkilerinin istatistiksel olarak önemliliği Tablo 4.3 'de belirtilmiştir. Etkilerin istatistiksel açıdan önemliliği F ve p-değerleri değerlendirilerek belirlenmiştir. GAG verimi

tahminlenmesi için en uygun ikinci dereceden (kuadratik) polinomiyal model ile açıklanmıştır.

Tablo 4.3. Tavuk sternumundan GAG ekstraksiyonunda işlem parametrelerinin etkisi

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	GAG verimi (%)	
		Hata Kareler Toplamı	p-değeri
Model	14	1114.55	< 0.0001
A-Enzim Miktarı	1	65.54	< 0.0001
B-pH	1	30.51	0.0012
C-Sıcaklık	1	16.35	0.0109
D-Süre	1	13.57	0.0183
AB	1	17.96	0.0082
AC	1	53.77	< 0.0001
AD	1	17.96	0.0082
BC	1	33.07	0.0009
BD	1	3.48	0.2000
CD	1	0.71	0.5535
A ²	1	181.62	< 0.0001
B ²	1	320.53	< 0.0001
C ²	1	259.44	< 0.0001
D ²	1	448.39	< 0.0001
Kalıntı	15	29.05	
Uyum Eksikliği	10	25.93	0.0647
Saf Hata	5	3.12	
Toplam	29	1143.60	

Oluşturan modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hataya uyum eksikliği (lack of fit) denmektedir. İdeal olarak modelin, matematiksel formunun uyum eksikliği değerinin önemsiz olması gerekmektedir (Myers and Montgomery, 1995). GAG verim yanıtı için kuadratik model, %95 güven seviyesinde önemli ve model uygunsuzluğu %95 güven seviyesinde önemsizdir. Modellerin deneysel veriyi ne ölçüde karşıladığı regresyon katsayısı, R^2 ve düzeltilmiş regresyon katsayısı, R_{adj}^2 , varyasyon katsayısı (C.V.) incelenerek belirlenmektedir. Regresyon katsayısı R^2 , deneysel verideki model tarafından açıklanabilen varyasyonun toplam varyasyona oranı olarak tanımlanmaktadır (Myers and Montgomery, 1995; Khuri and Cornell, 1996). Elde edilen modelde varyasyonun büyük bir kısmı ($R^2 > 0.9746$) model tarafından açıklanabilmektedir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Modelin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler

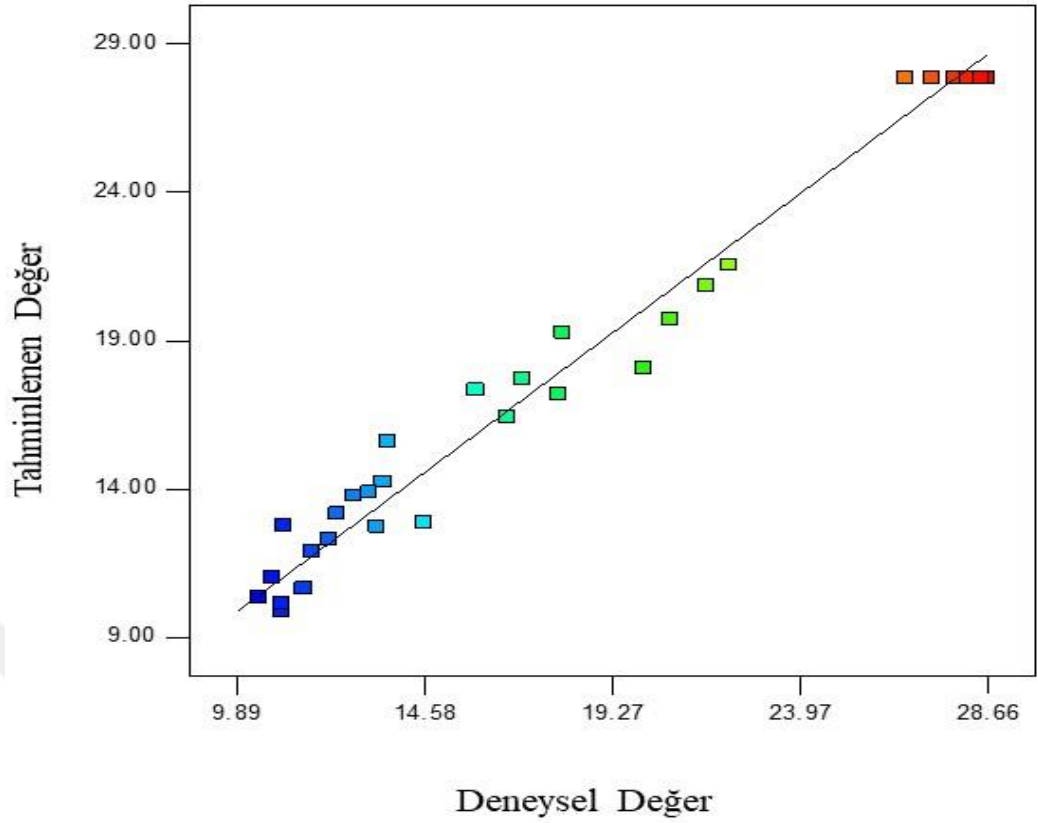
İstatistikler	GAG verimi (%)
R^2	0.97
R^2_{adj}	0.95
R^2_{pre}	0.87
C.V. %	8.02
PRESS	153.83
Yeterli Tahminleme	18.24

R^2 ve R^2_{adj} değerlerinin birbirlerine yakın olması modellerin istatistiksel olarak önemsiz terimleri içermediğini göstermektedir (Myers and Montgomery, 1995). Bir regresyon modelinin daha sonra yapılacak gözlemler için bir tahminleme modeli olarak kullanılabilmesi için ise yeterli tahminleme ve PRESS istatistiği önem taşımaktadır. Yeterli tahminleme değerinin 4'ten büyük olması gerekmektedir (Myers and Montgomery, 1995). Optimizasyon sonucu elde edilen yeterli tahminleme değeri 18.236; PRESS değeri 153,83 olarak belirlenmiştir. Varyasyon katsayısı (C.V. %) deneysel verilerdeki kalıntı varyasyonun ortalamaya bağlı bir ölçüsüdür. Varyasyon katsayısı 8,02 olarak belirlenmiştir. Büyük varyasyon katsayısı değerleri, verilerin ortalamadan çok fazla saptıklarını, küçük varyasyon katsayısı değerleri ise verilerin hemen hemen ortalamayla aynı değere sahip olduğunu göstermektedir (Lazić, 2004).

GAG verimi için regresyon analizi sonucunda elde edilen quadratik model, kodlanmış değişkenler cinsinden aşağıda Eşitlik 4.1'de belirtilmiştir. GAG verimi için R^2 katsayısı 0.97 olarak belirlenmiştir. Bu durum GAG verimi değişkenliğinin %97,46'sının model tarafından açıklandığını göstermektedir.

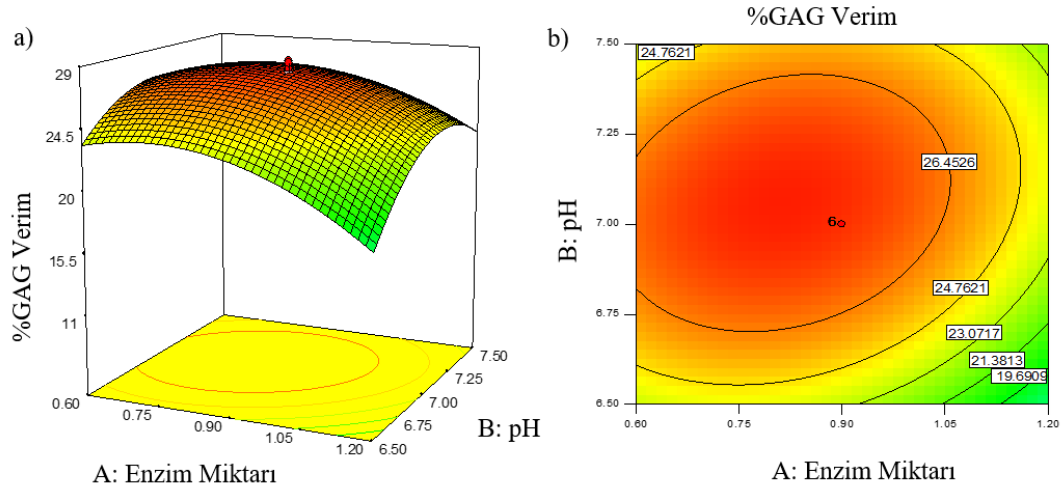
$$\begin{aligned} \text{GAG verimi (\%)} = & 27.83 - 1.65*A + 1.13*B - 0.83*C - 0.75*D + 1.06*A*B + 1.83*A*C \\ & + 1.06*A*D + 1.44*B*C - 0.47*B*D - 0.21*C*D - 2.57*A^2 - 3.42* \\ & B^2 - 3.08*C^2 - 4.04*D^2 \end{aligned} \quad (4.1)$$

Tahminlenen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Şekil 4.2'de görüldüğü üzere tahminlenen ve deneysel verim değerleri lineer doğru etrafında dağılmaktadır. Şekil incelendiğinde sternumdan elde edilen %GAG verimi için model tahmin değerleri deneysel değerlerle karşılaştırıldığında sapma miktarının yüksek olmadığı belirlenmiştir. Tahminlenen değerler ($R^2_{pre} = \%86,55$) ile deneysel değerler arasındaki uyum mevcuttur.



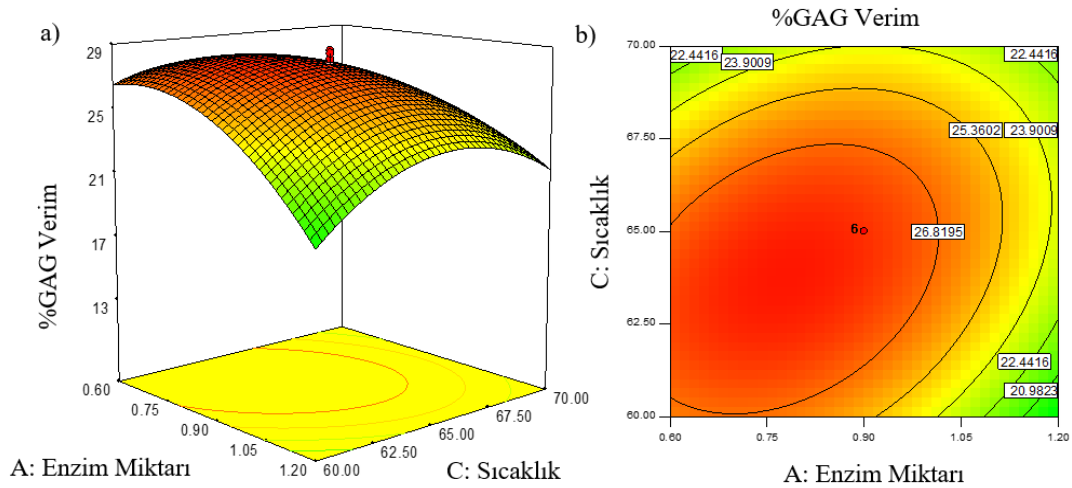
Şekil 4.2. %GAG verimi için modelden (Eş. 4.1) deneysel verilere karşı tahminlenen değerler grafiği

Elde edilen kuadratik model kullanılarak işlem değişkenlerinin GAG verimi üzerindeki etkilerinin görsel olarak incelenmesi için oluşturulan yanıt yüzey grafikleri ve izohips eğrileri Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 'da verilmiştir. Sternumdan elde edilen glikozaminoglikan ekstraktına ait verim değerlerinin %10.42 ile %28.66 arasında değiştiği belirlenmiştir. ANOVA tablosu (Tablo 4.3), enzim miktarı, pH, sıcaklık ve süre değişkenlerinin GAG verimine etkisinin anlamlı olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$). ANOVA tablosunda görüldüğü üzere enzim miktarının GAG verimine olan etkisi yüksektir ($p < 0.0001$). Enzim miktarının belli bir seviyeye kadar artırılması verim değerini optimum noktaya ulaştırırken enzim miktarında artışın devam etmesi ile verim değerinde azalma gözlemlenmiştir.



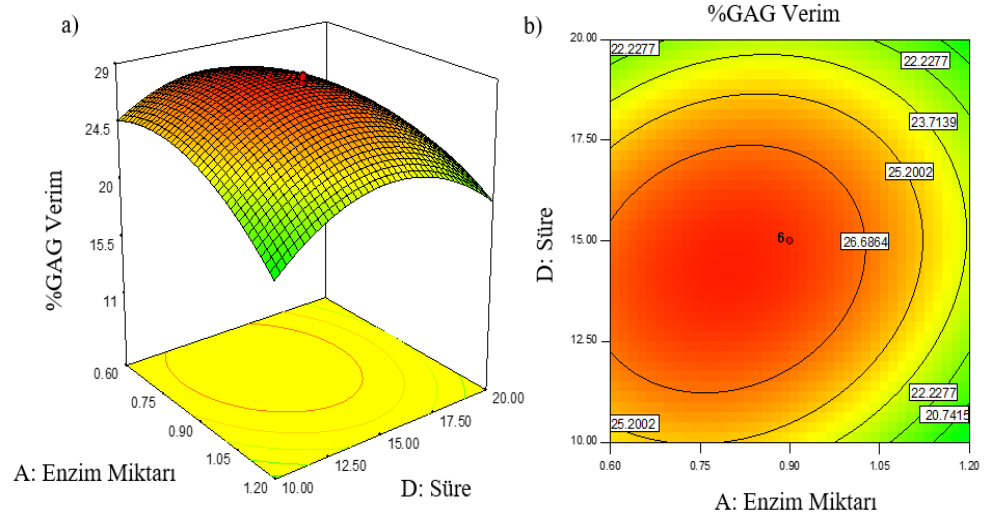
Şekil 4.3. %GAG verimi üzerine enzim miktarı ve pH etkisini gösteren grafikler a) 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri izohips eğrileri; b) 2 boyutlu kontur grafikleri

Şekil 4.3 incelendiğinde enzim miktarının ve pH değerinin belli bir seviyeye kadar artırılması verim değerini yüksek verim değerine ulaştırırken enzim miktarında artışın devam etmesi ile verim değerinde azalma gözlemlenmiştir. Enzim miktarı ve pH değeri sabit tutulup sıcaklık arttırıldığında ise GAG veriminin azaldığı anlaşılmaktadır.

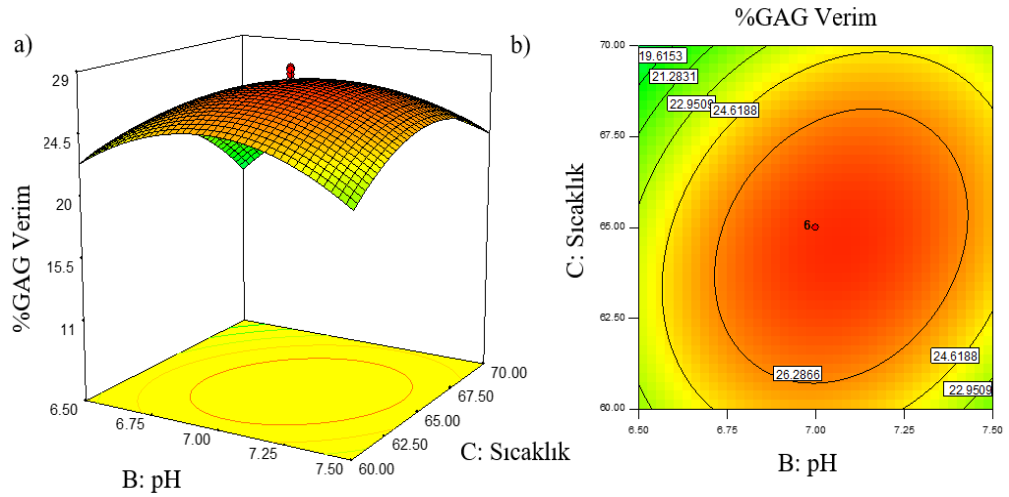


Şekil 4.4. %GAG verimi üzerine enzim miktarı ve sıcaklık etkisini gösteren grafikler a) 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri izohips eğrileri; b) 2 boyutlu kontur grafikleri

Şekil 4.4 incelendiğinde enzim miktarının ve sıcaklık değerinin yüksek seviyelere kadar artırılması GAG verimini düşürmektedir. Bu durum enzimin çalıştığı optimum sıcaklık koşulunun 65°C civarında olduğu ile ilişkilendirilmektedir.



Şekil 4.5. %GAG verimi üzerine enzim miktarı ve süre etkisini gösteren grafikler a) 3 boyutlu yüzey grafikleri izohips eğrileri; b) 2 boyutlu kontur grafikleri



Şekil 4.6. %GAG verimi üzerine pH ve sıcaklık etkisini gösteren grafikler a) 3 boyutlu yüzey grafikleri izohips eğrileri; b) 2 boyutlu kontur grafikleri

Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 incelendiğinde enzim miktarı ve sürenin belli bir seviyeye kadar artırılması GAG verim değerini optimum seviyeye ulaştırmıştır. Ekstraksiyon için optimum pH değerinin 7 civarında olduğu kontur grafiğinden

anlaşılmaktadır. GAG verimi üzerinde pH-süre ve sıcaklık-süre ikili etkisi incelendiğinde etkinin diğer etkilere kıyasla önemli derecede GAG verimini etkilemediği belirlenmiştir ($p>0.05$). Model bütünlüğünün bozulmaması adına verilen matematiksel modelden bu terimler çıkarılmamıştır.

Elde edilen matematiksel modeller kullanılarak çalışılan deneysel bölge içerisinde enzim miktarı ve ekstraksiyon süresi minimize edilmesi, pH ile ekstraksiyon sıcaklığı değerlerinin kodlanmış seviyeler aralığında bırakılması, GAG verimi değerinin ise maksimize edilmesi kriteri belirlenerek optimum işlem koşullarını elde edilmiştir. Optimum işlem koşulları olarak, enzim miktarı = %0,6, pH = 6.99, ekstraksiyon sıcaklığı=62,96°C ve ekstraksiyon süresi=10.79 saat olarak yanıt olan GAG verimi ise 0.912 istenilirlik değeriyle %26.07 olarak program tarafından belirlenmiştir.

Garnjanagoonchorn ve ark. (2007) timsah, köpekbalığı, vatoz ve tavuk omurgası kullanarak enzimatik metot ile kondroitin sülfat ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. 100 g kurutulmuş örnekte kondroitin-4-sülfat miktarının 11.55 ile 14.84 g aralığında değiştiğini belirlemişlerdir. Luo ve ark. (2002) tavuk omurga kıkırdağı kullanarak yaptıkları çalışmada yaklaşık %30,8 verim ile kondroitin sülfat eldesi gerçekleştirmişlerdir. Srichamroen ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada etlik piliç kıkırdağından doku otolizi ile kondroitin sülfat-peptit eldesi gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda 100 g kuru kıkırdak dokudan >20 g kondroitin sülfat-peptit elde edilmiştir. İzole edilen kondroitin sülfat-peptitin %82,5'inin kondroitin-4-sülfat olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda tavuk sternumundan elde edilen GAG ekstraktının verim değerlerinin literatürle kıyaslanabilir nitelikte olduğu belirlenmiştir.

Matematiksel modelden tahminlenen yanıt ile optimum noktanın validasyonu sağlanmıştır. Doğrulama denemeleri ile modelden tahminlenen yanıt arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark olup olmadığı tek örnek t testi ile belirlenmiştir. Ekstraksiyon işlem parametrelerinin etkisi ikinci dereceden polinomiyal model ile açıklanmıştır. Yanıt için tek örnek t-testi sonuçları Tablo 4.5'de görülmektedir. Doğrulama denemeleri sonucunda, deneysel GAG veriminin minimum %95 güven

aralığı (%23.69) ile maksimum %95 güven aralığı (%26.64) sınırları dahilinde olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.5. Optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması

Yanıt	Tahminlenen Değer (%)	Deneysel Değer (%) ^a	SH ^b	Fark	%Hata ^c	p-değeri
GAG verimi	26.07	25.58±0.46	0.207	0,48	1,92	0.078

^a Deneysel sonuçlar standart sapma ile birlikte verilmiştir.

^b Ortalama standart hata

^c % Hata = $(|y_{den} - y_{tah}|/y_{den}) \times 100$

Doğrulama denemeleri sonucunda sternumdan elde edilen GAG verimi modelden tahminlenen değerlere oldukça yakın olmakla beraber, istatistiksel olarak da aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).

4.3. Dana Tendonundan GAG Eldesi İçin İşlem Koşullarının Optimizasyonu

Dana tendonundan glikozaminoglikan ekstraksiyonuna ait olan deneme planı ve bu plana göre gerçekleştirilen denemelere ait sonuçlar Tablo 4.6 'da belirtilmiştir. Belirtilen deneme planında sırasıyla A: enzim miktarı (%w/w protein), B: pH, C: ekstraksiyon sıcaklığı (°C) D: ekstraksiyon süresi değişkenler olarak; GAG verimi yanıt olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.6. Optimizasyon denemeleri için gerçekleştirilen ekstraksiyon koşullarında elde edilen %GAG verimi sonuçları

Deneme No	A	B	C	D	GAG verimi (%)
1	1.10	8.00	65.00	15.00	1.111
2	0.80	6.50	60.00	20.00	1.205
3	1.10	7.00	65.00	15.00	1.914
4	1.10	7.00	65.00	15.00	1.97
5	1.40	6.50	70.00	20.00	0.720
6	0.80	7.50	60.00	10.00	1.384
7	1.70	7.00	65.00	15.00	0.904
8	1.10	7.00	65.00	15.00	1.776
9	0.80	7.50	70.00	20.00	0.894
10	0.80	6.50	60.00	10.00	1.382
11	0.80	6.50	70.00	10.00	0.857
12	1.10	7.00	65.00	15.00	1.77
13	1.10	7.00	65.00	15.00	1.860
14	1.10	7.00	65.00	5.00	0.828
15	1.40	7.50	70.00	20.00	1.060
16	0.80	7.50	70.00	10.00	1.136
17	1.10	7.00	65.00	15.00	1.821
18	1.10	7.00	75.00	15.00	0.882
19	1.40	7.50	70.00	10.00	1.340
20	0.50	7.00	65.00	15.00	1.444
21	0.80	7.50	60.00	20.00	0.913
22	1.40	7.50	60.00	20.00	0.972
23	1.40	6.50	70.00	10.00	0.735
24	1.40	6.50	60.00	20.00	0.814
25	1.40	7.50	60.00	10.00	0.738
26	0.80	6.50	70.00	20.00	0.772
27	1.40	6.50	60.00	10.00	0.696
28	1.10	6.00	65.00	15.00	0.786
29	1.10	7.00	65.00	25.00	0.735
30	1.10	7.00	55.00	15.00	1.198

Dana tendonundan GAG eldesine ait olan optimizasyon çalışmasında bağımsız değişkenler ile yanıt arasındaki ilişki regresyon analizi yapılarak tespit edilmiştir. Optimizasyon sonucunda elde edilen matematiksel model denkleminde her bir değişkenin öncelikle lineer etki terimleri, daha sonra kuadratik ve interaksiyon etki terimleri sırasıyla eklenmiştir.

Her bir faktörün yanıt üzerindeki lineer, interaksiyon ve kuadratik etkilerinin istatistiksel olarak önemliliği Tablo 4.7’de belirtilmiştir. Etkilerin istatistiksel açıdan önemliliği F ve p-değerleri değerlendirilerek belirlenmiştir. GAG verimi

tahminlenmesi ikinci dereceden polinomial model ile açıklanmıştır. Program tarafından herhangi bir transformasyon önerilmemiştir.

Tablo 4.7. Dana tendonundan GAG ekstraksiyonunda işlem parametrelerinin etkisi

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	GAG verimi (%)	
		Hata Kareler Toplamı	p-değeri
Model	14	4.86	< 0.0001
A-Enzim Miktarı	1	0.27	< 0.0001
B-pH	1	0.15	0.0012
C-Sıcaklık	1	0.062	0.0217
D-Süre	1	0.051	0.0352
AB	1	0.067	0.0182
AC	1	0.22	0.0002
AD	1	0.067	0.0182
BC	1	0.13	0.0022
BD	1	0.022	0.1456
CD	1	6.617E-003	0.4170
A ²	1	0.80	< 0.0001
B ²	1	1.42	< 0.0001
C ²	1	1.15	< 0.0001
D ²	1	1.99	< 0.0001
Kalıntı	15	0.14	
Uyum Eksikliği	10	0.11	0.2739
Saf Hata	5	0.031	
Toplam	29	5	

Elde edilen modelde varyasyonun büyük bir kısmı ($R^2 > 0.9715$) model tarafından açıklanabilmektedir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Dana tendonundan elde edilen GAG' a ait modelin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler

İstatistikler	GAG verimi (%)
R^2	0.97
R^2_{adj}	0.94
R^2_{pre}	0.86
C.V. %	8.45
PRESS	0.69
Yeterli Tahminleme	17.16

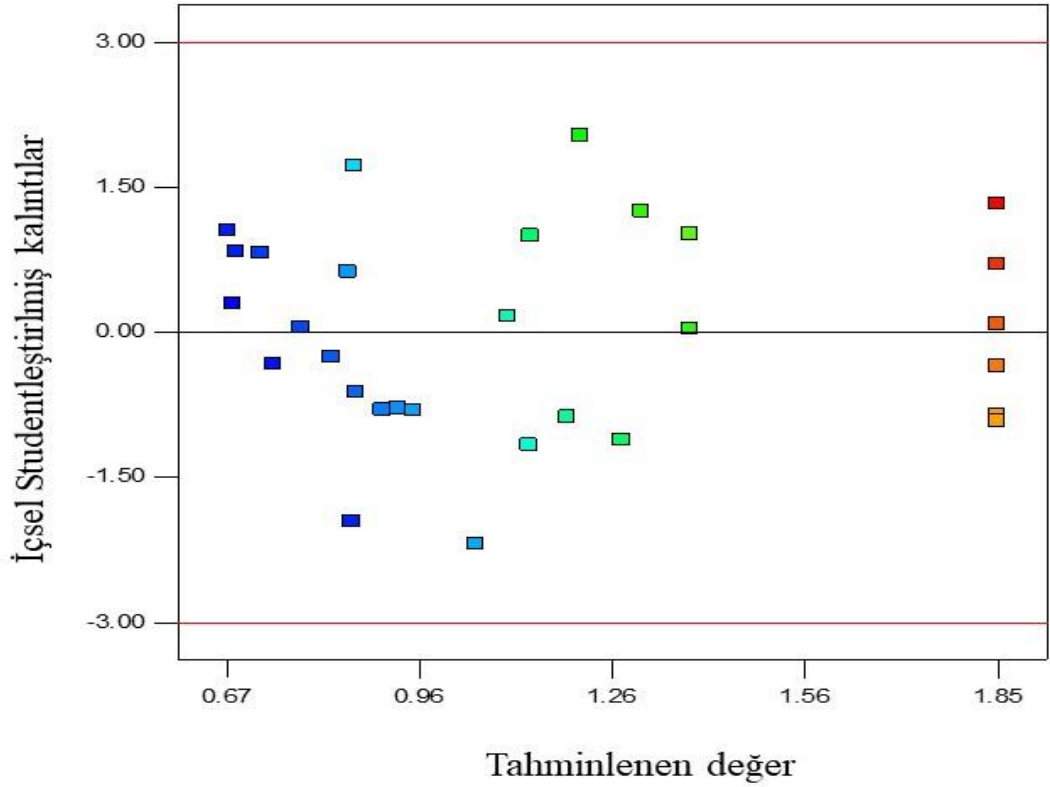
Varyasyon katsayısı 8,45 olarak belirlenmiştir. Büyük varyasyon katsayısı değerleri, verilerin ortalamadan çok fazla saptıklarını, küçük varyasyon katsayısı

değerleri ise verilerin hemen hemen ortalamayla aynı değere sahip olduğunu göstermektedir (Lazić, 2004).

GAG verimi için regresyon analizi sonucunda elde edilen kuadratik model, kodlanmış değişkenler cinsinden aşağıda Eşitliklik 4.2'de belirtilmiştir. GAG verimi için R^2 katsayısı 0,97 olarak belirlenmiştir. Bu durum GAG verimi değişkenliğinin %97,15'inin model tarafından açıklandığını göstermektedir.

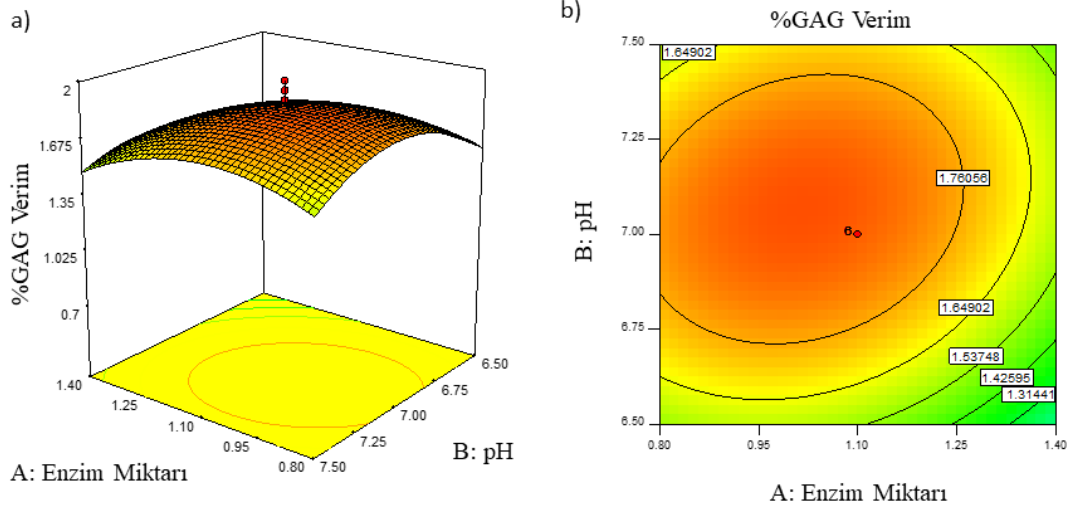
$$\begin{aligned} \text{GAG verimi (\%)} = & 1.85 - 0.11*A + 0.079*B - 0.051*C - 0.046*D + 0.065*A*B + 0.12*A \\ & *C + 0.065*A*D + 0.090*B*C - 0.037*B*D - 0.020*C*D - 0.17*A^2 - \\ & 0.23*B^2 - 0.20*C^2 - 0.27*D^2 \end{aligned} \quad (4.2)$$

Şekil 4.7'de tahminlenen değere karşı standartlaştırılmış kalıntı grafiği görülmektedir. Deneysel veriler ile modelden tahminlenen veriler arasındaki oluşan fark kalıntı değeri ve sifıra yakın olması beklenmektedir. Kalıntı değerlerinin düşük ve modeldeki bütün verilerin limit (± 3) içinde olması geliştirilen modelin uygunluğunu doğrulamaktadır.



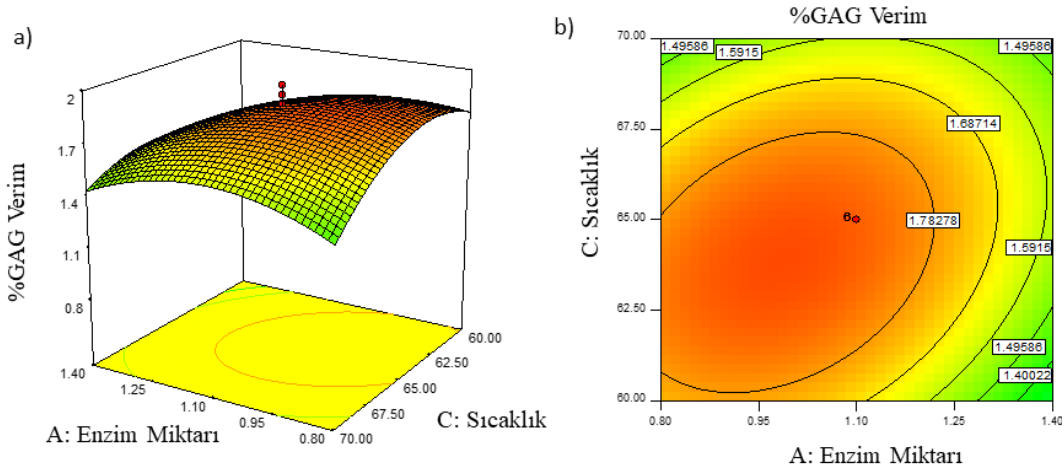
Şekil 4.7. %GAG verimi için modelden (Eş. 4.2) tahminlenen değerlere karşı içsel studentleştirilmiş kalıntılar grafiği

Elde edilen kuadratik model kullanılarak işlem değişkenlerinin GAG verimi üzerindeki etkilerinin görsel olarak incelenmesi için oluşturulan yanıt yüzey grafikleri ve izohips eğrileri Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 'da verilmiştir. Dana tendonundan elde edilen glikozaminoglikan ekstraktına ait verim değerlerinin %0,70 ile %1,97 arasında değiştiği belirlenmiştir. ANOVA tablosu (Tablo 4.7), enzim miktarı, pH, sıcaklık ve süre değişkenlerinin GAG verimine etkisinin anlamlı olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$). ANOVA tablosunda görüldüğü üzere enzim miktarının GAG verimine olan etkisi yüksektir ($p < 0.0001$). Enzim miktarının belli bir seviyeye kadar artırılması verim değerini optimum noktaya ulaştırırken enzim miktarında artışın devam etmesi ile verim değerinde azalma gözlemlenmiştir.



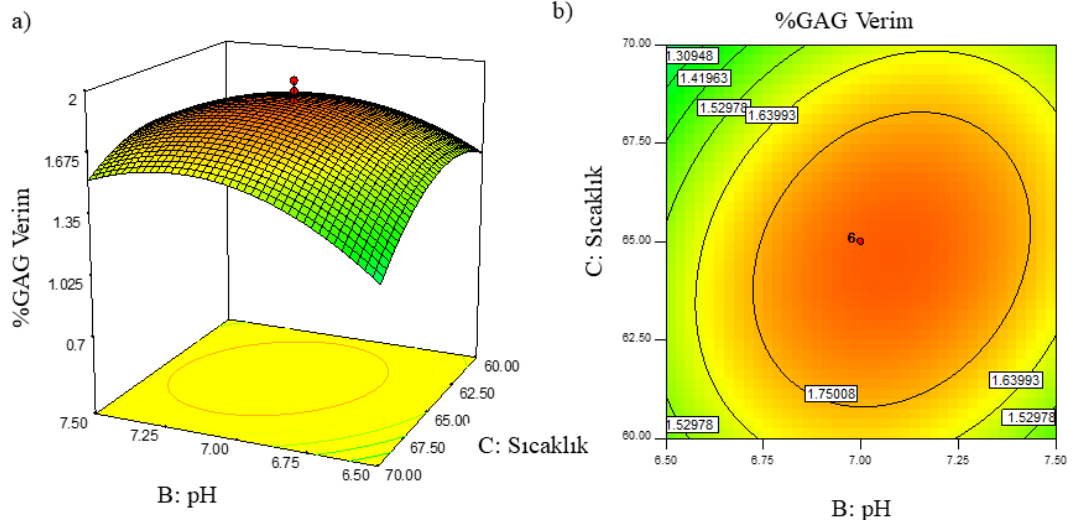
Şekil 4.8. %GAG verimi üzerine enzim miktarı ve pH etkisini gösteren grafikler a) 3 boyutlu yanıt yüzey grafiği; b) 2 boyutlu kontur grafiği

Şekil 4.8 incelendiğinde enzim miktarının ve pH değerinin belli bir seviyeye kadar artırılması verim değerini yüksek verim değerine ulaştırırken enzim miktarında artışın devam etmesi ile verim değerinde azalma gözlemlenmiştir. Enzim miktarı ve pH değeri sabit tutulup sıcaklık artırıldığında ise GAG veriminin azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.9. %GAG verimi üzerine enzim miktarı ve sıcaklık etkisini gösteren grafikler a) 3 boyutlu yanıt yüzey grafiği; b) 2 boyutlu kontur grafiği

Şekil 4.9 incelendiğinde enzim miktarının ve sıcaklık değerinin optimizasyon aralığının üst seviyesine kadar artırılması GAG verimini düşürmektedir.



Şekil 4.10. %GAG verimi üzerine pH ve sıcaklık interaksiyon etkisini gösteren grafikler a) 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri izohips eğrileri; b) 2 boyutlu kontur grafikleri

Şekil 4.10 incelendiğinde ekstraksiyon için optimum pH değerinin 7 civarında olduğu kontur grafiğinden anlaşılmaktadır. GAG verimi üzerinde pH-süre ve sıcaklık-süre ikili etkisi incelendiğinde etkinin diğer etkilere kıyasla önemli derecede verimi etkilemediği belirlenmiştir ($p > 0.05$).

Elde edilen matematiksel modeller kullanılarak çalışılan deneysel bölge içerisinde enzim miktarı ve ekstraksiyon süresi minimize edilmesi, pH ile ekstraksiyon sıcaklığı değerlerinin kodlanmış seviyeler aralığında bırakılması, GAG verimi değerinin ise maksimize edilmesi kriteri belirlenerek optimum işlem koşullarını elde edilmiştir. Optimum işlem koşulları olarak, enzim miktarı = %0,8, pH = 7,02, ekstraksiyon sıcaklığı=63,20°C ve ekstraksiyon süresi=10,89 saat olarak yanıt olan GAG verimi 0.884 istenilirlik değeriyle % 1.72 olarak program tarafından belirlenmiştir.

Matematiksel modelden tahminlenen yanıt ile optimum noktanın validasyonu sağlanmıştır. Doğrulama denemeleri ile modelden tahminlenen yanıt arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark olup olmadığı tek örnek t testi ile belirlenmiştir. Yanıt için tek örnek t-testi sonuçları Tablo 4.9'de görülmektedir. Sonuçlar, deneysel olarak ölçülen GAG veriminin minimum %95 güven aralığı (%1.55) ile maksimum %95 güven aralığı (%1.76) sınırları dahilinde olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.9. Optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması

Yanıt	Tahminlenen Değer (%)	Deneysel Değer (%) ^a	SH ^b	Fark	%Hata ^c	p-değeri
GAG verimi	1,72	1,68±0,08	0,04	0,045	2,38	0,263

^a Deneysel sonuçlar standart sapma ile birlikte verilmiştir.

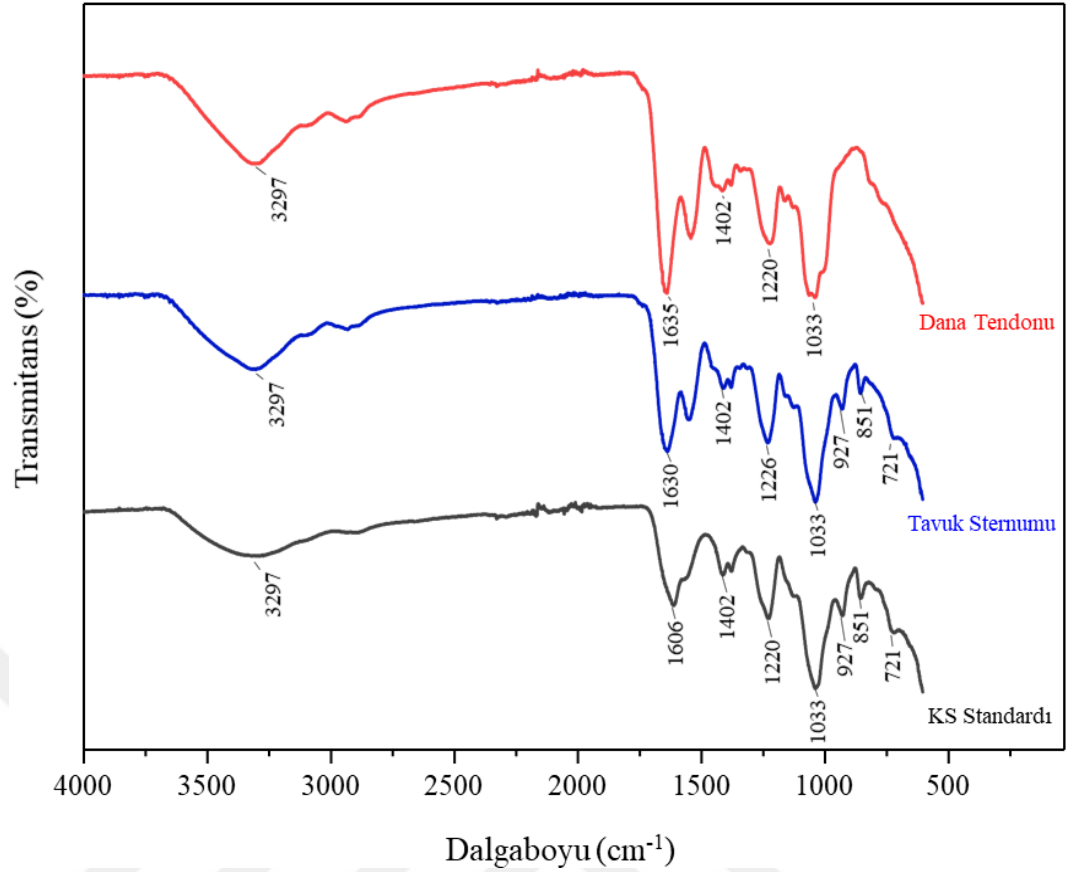
^b Ortalama standart hata

^c % Hata = $(|y_{den} - y_{tah}|/y_{den}) \times 100$

Doğrulama denemeleri sonucunda dana tendonundan, elde edilen GAG verimi modelden tahminlenen değerlere oldukça yakın olmakla beraber, istatistiksel olarak da aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).

4.4. GAG rneklerinin FTIR Spektrumları

Tavuk sternumundan ve dana tendonundan optimum koşullarda üretimi gerçekleştirilen GAG rneklerinin ve kondroitin sülfat standardının karşılaştırılmalı FTIR analizi sonucu Şekil 4.11’de görülmektedir. Tavuk sternumundan ve dana tendonundan edilen GAG’a ait FTIR spektrumu Ek 1 ve Ek 2’de verilmiştir.



Şekil 4.11. Kondroitin-4-sülfat standardı, tavuk sternumu ve dana tendonundan elde edilen GAG örneklerinin FTIR spektrumları

FTIR spektrumları incelendiğinde tavuk sternumundan elde edilen glikozaminoglikan ekstraktına ait karakteristik piklerinin 851 cm^{-1} , 1033 cm^{-1} , 1226 cm^{-1} , 1402 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} bantlarında olduğu görülmektedir. Dana tendonundan elde edilen glikozaminoglikan ekstraktına ait karakteristik piklerinin ise 1033 cm^{-1} , 1220 cm^{-1} , 1402 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} bantlarında olduğu görülmektedir.

Yaklaşık $1240\text{--}925\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığındaki bantların, sakkarit halkası ve sülfat gruplarına ait karakteristik bantlar olabileceği belirtilmiştir (Zhao et al., 2013). Amit grubuna ait -CONH titreşiminde karakteristik piklerin varlığı, C-O germe titreşimi, S=O germe titreşimleri ve C-O-S moleküllerinin FTIR spektrumunda oluşturduğu pikler glikozaminoglikan yapısının etkili bir şekilde ekstrakte edildiğini göstermektedir (Sundaresan et al., 2018).

1633 cm^{-1} – 1639 cm^{-1} dalga boyu aralığı karbonil grubunun ($\text{CH}_3\text{-CONH}$); 1228 cm^{-1} – 1238 cm^{-1} dalga sayısı aralığı sülfat grubunu (O=S=O) göstermektedir

(Ramdhani, 2017). Khan ve ark. (2013) tarafından tavuk omurga kıkırdağından kondroitin sülfat ekstraksiyonu gerçekleştirilen çalışmada, ekstrakte edilen kondroitin sülfat örneklerinde -CONH grubunun varlığını gösteren C=O germe titreşimini 1640 cm^{-1} dalga boyunda; S=O germe titreşimlerini 1240,42 cm^{-1} dalga boyunda gözlemlemiştir.

Tavuk sternumu ve dana tendonuna ait glikozaminoglikan ekstraktlarının spektrum sonuçları incelendiğinde elde edilen sonuçların literatürde verilen sonuçlarla benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Sulityowati ve ark. (2015) yaptığı bir çalışmada, ekstrakte edilen kondroitin sülfatın; karboksil gruplarının, amin ve sülfatın varlığına işaret eden 1637.63 cm^{-1} ve 1420.03 cm^{-1} dalga boyunda güçlü bir soğurma zirvesine sahip olduğunu bildirmiştir.

845 cm^{-1} dalga boyu civarında oluşan pikin kondroitin-4-sülfatı; 820 cm^{-1} dalga boyu civarında oluşan pik ise kondroitin-6-sülfatı tanımlamakta olduğu düşünülmektedir (Brezinski, 1980). Sundaresan ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada kondroitin-4-sülfat standardı ve GAG ekstraktı için karakteristik C-O-S piklerinin 854 cm^{-1} 'de; -CONH karakteristik piklerinin ise 1640 cm^{-1} 'de olduğu görülmüştür.

Khan ve ark. (2013) yaptığı bir çalışmada 1411,2 cm^{-1} dalga sayısındaki piki C=O germe titreşimi ile; 1257,9 cm^{-1} ve 1057,4 cm^{-1} dalga sayısındaki pikleri sırasıyla S=O ve C-O-S germe titreşimi ile ilişkilendirilmiştir.

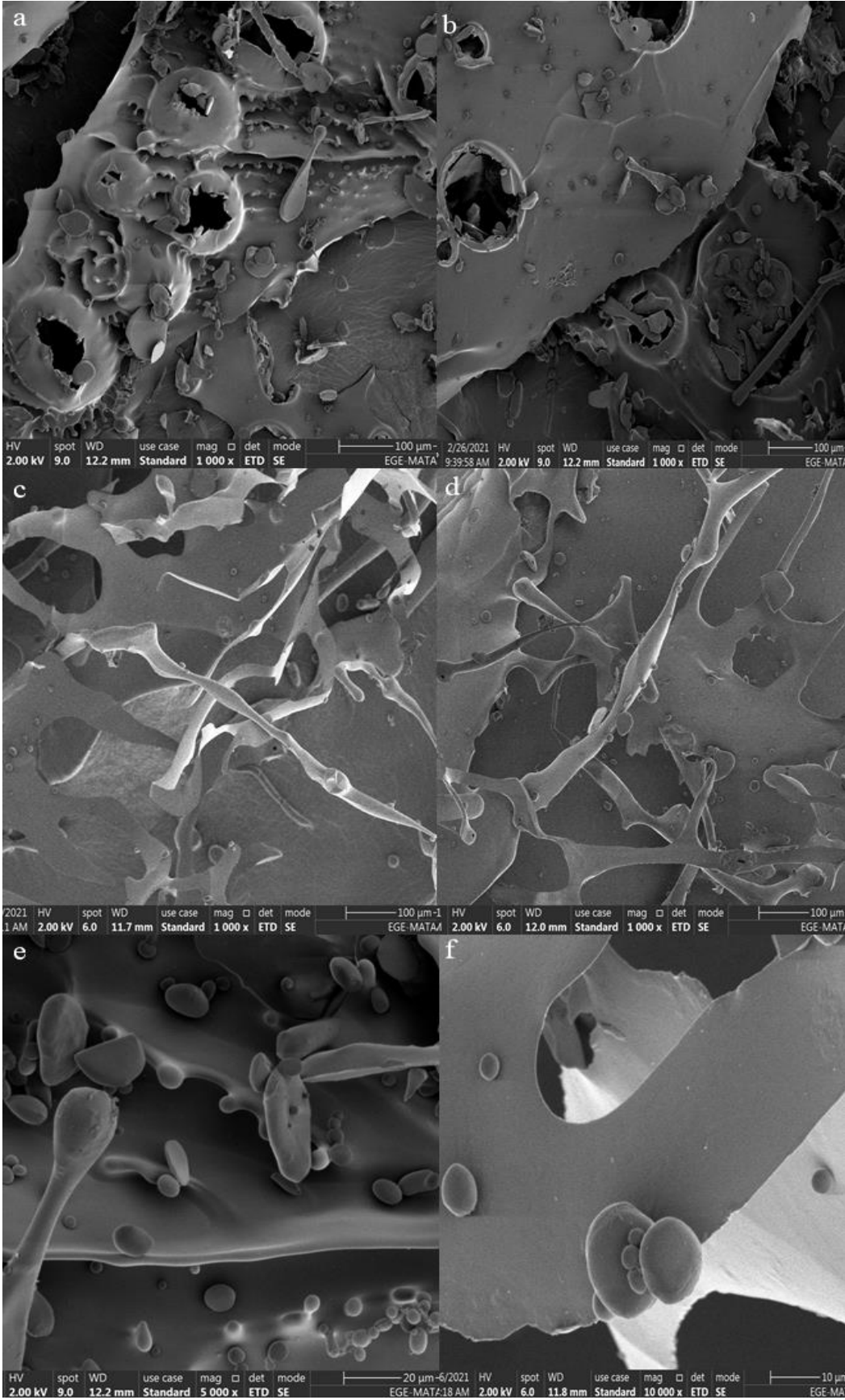
3272 cm^{-1} dalga boyu civarında oluşan pik serbest hidroksil gruplarına ait (-OH) gruplarının varlığını; 2928 cm^{-1} - 2852 cm^{-1} aralığında gözlenen pikin varlığı ise CH_2 grubunun varlığını göstermektedir (Oliveira, 2017).

FTIR analizi sonucunda farklı kaynaklardan elde edilen glikozaminoglikan ile kondroitin sülfat standardı spektrumlarının benzerlik gösterdiği görülmüştür.

4.5. GAG Örneklerinin SEM Analizi

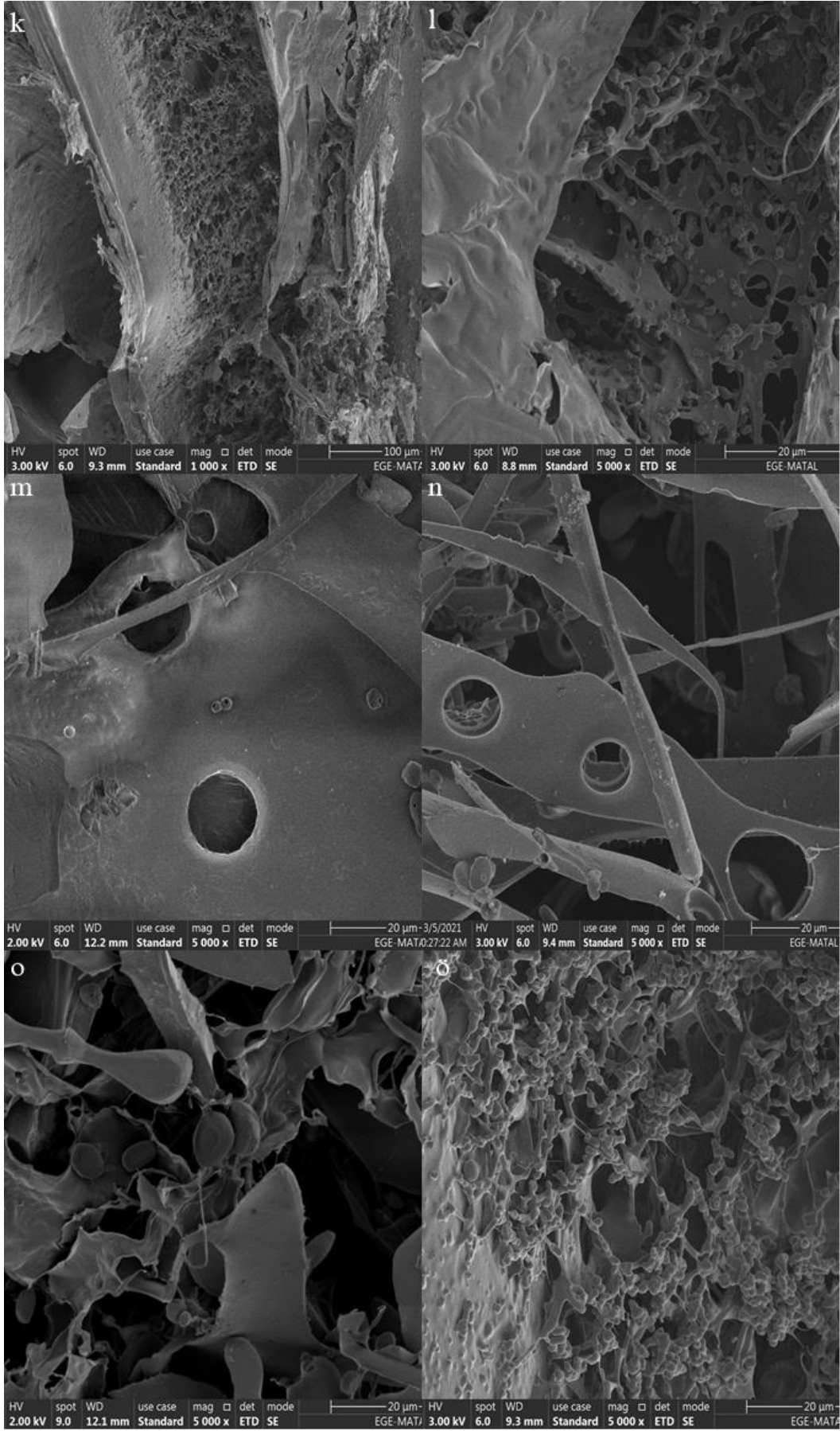
Çalışma kapsamında elde edilen glikozaminoglikan ekstraktının yüzey özellikleri SEM analizi yapılarak incelenmiştir. Sternumdan elde edilen glikozaminoglikan ekstraktına ait SEM görüntüleri Şekil 4.12’de; tendondan elde edilen glikozaminoglikan ekstraktına ait SEM görüntüleri ise Şekil 4.13’de verilmiştir.





Şekil 4.12. Sternumdan elde edilen glikozaminoglikan ekstraktına ait SEM görüntüleri

Proteoglikanlar, agrekan, kondrosit hücreleri tarafından üretilen biyosentetik ürünler olarak bilinmektedir (Iozzo, 2000). Kıkırdak matriksinin kondrositler tarafından sentezlendiği yapılan başka bir çalışmada da belirtilmiştir (Horkay., 2012). Proteoglikanlar, glikozaminoglikanlardan ve çekirdek proteinlerinden oluşmaktadır. Geri kalan kısım ise temel olarak tip II kolajen ve agrekan, kondroitin ve keratan sülfattan oluşmaktadır. Agrekan, hyalüronik asit ile kovalent olmayan bir şekilde etkileşime girme eğilimiyle, kolajen ağında hapsolmuş büyük agregatlar oluşturmaktadır (Chadha, 2009). Bu bilgiler doğrultusunda tavuk sternumuna ait SEM görüntüleri incelendiğinde a ve b kodlu görüntülerde gözenekli yapı, c ve d kodlu görüntülerde lifli yapı, e ve f kodlu görüntülerde ise kondrositler açıkça görülmektedir. Dana tendonuna ait SEM görüntülerinde ise gözenekli yapı SEM görüntülerinde açıkça görülmektedir. Tavuk sternumu ve dana tendonuna ait glikozaminoglikanların yüzey yapısında oluşan gözenekli yapının kondroitin sülfat miktarına bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Tendondan elde edilen glikozaminoglikan ekstraktına ait SEM görüntüleri

4.6. GAG Örneklerinin Renk Özellikleri

Tavuk sternumu ve dana tendonundan elde edilen GAG örneklerine ve kondroitin-4-sülfat standardına ait elde edilen renk değerleri Tablo 4.10'da verilmiştir

Tablo 4.10. Tavuk sternumu ve dana tendonundan elde edilen GAG ekstraktına ve kondroitin-4-sülfat standardına ait elde edilen renk değerleri

Örnek	L*	a*	b*
GAG ekstraktı (tavuk sternumundan)	93,92±0,60 ^b	-1,04±0,12 ^{ab}	1,85±0,09 ^a
GAG ekstraktı (dana tendonundan)	91,47±0,83 ^a	-1,14±0,13 ^b	2,04±0,12 ^a
Kondroitin-4-sülfat standardı	96,89±0,37 ^c	-1,04±0,11 ^a	10,14±0,37 ^b

^{a-b-c} Aynı sütunda farklı harflerle işaretlenen gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir (p< 0,05).

Renk değerleri incelendiğinde tavuk sternumundan elde edilen GAG ekstraktının L* değeri 93,92, a* değeri -1,04, b* değeri 1,85; dana tendonundan elde edilen GAG ekstraktının L* değeri 91,47, a* değeri -1,14, b* değeri 1,04; kondroitin-4-sülfat standardına ait L* değeri 96,89, a* değeri -1,04, b* değeri 10,14 olarak bulunmuştur. L* renk değerleri göz önünde bulundurulduğunda kondroitin-4-sülfat standardının diğerlerine kıyasla en yüksek aydınlık değerine sahip olduğu; tavuk sternumu ve dana tendonundan elde edilen GAG ekstraktıyla istatistiksel açıdan aralarında anlamlı fark bulunduğu tespit edilmiştir (p<0.05). Bu durumun ekstraksiyon için kullanılan hammaddenin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kondroitin-4-sülfat standardı ile tavuk sternumu ve dana tendonundan elde edilen GAG ekstraktının a* renk değeri arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır (p> 0,05).

Sayari ve ark. (2018) karides yan ürünleri kullanarak sülfatlı GAG ekstraksiyonu gerçekleştirdiği çalışmada, L* değerini 80,75±0,05, a* değerini 3,62±0,01, b* değerini 12,49±0,04 olarak tespit etmişlerdir. Bougatef ve ark. (2018), eşkina balığından elde ettikleri kondroitin sülfatın L* değerini 53,38, a* değerini 3,825±0,07, b* değerini 2,29±0,07 olarak ölçmüşlerdir. Yapılan çalışmalar

göz önünde bulundurulduğunda tez kapsamında ekstrakte edilen GAG örneklerinin renk değerlerinin literatürde verilen değerlerle benzerlik gösterdiği görülmektedir.

4.7. GAG Örneklerinin Molekül Ağırlığının Tayini

Glikozaminoglikan örneklerine ait molekül ağırlık değerleri Tablo 4.11'de görülmektedir. Deneyle ilgili detaylı analiz raporu Ek 4, Ek 5, Ek 6 ve Ek 7'de belirtilmiştir.

Tablo 4.11. Molekül ağırlıkları

Molekül Ağırlığı	Kondroitin sülfat standardı	Tavuk sternumundan elde edilen GAG	Dana tendonundan elde edilen GAG
M_n	2011 Da	2468,5 Da	4186,5 Da
M_w	2078 Da	2597 Da	5391,5 Da
PDI	1.033	1.052	1.288

Elde edilen analiz sonuçlarına göre polimerlerin düşük molekül ağırlığına sahip oldukları gözlenmiştir. GPC analiz sonuçlarında standarda ait elde edilen pikin ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (M_w) 2078 g/mol, sayıca ortalama molekül ağırlığı (M_n) 2011 g/mol, polidispersite indeksi (PDI) ise 1.033 bulunmuştur.

Ek 4 ve Ek 5 incelendiğinde tavuk sternumundan elde edilen glikozaminoglikan ekstraktına ait iki adet dağılım piki gözlenmiştir. Düşük molekül ağırlıklı olan ikinci pike ait polimerlerin ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı 2597 g/mol, sayıca ortalama molekül ağırlığı 2468,5 g/mol, polidispersite indeksi ise 1.052 bulunmuştur. Birinci pike kıyasla daha yüksek molekül ağırlıklı polimerin ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı 7380,5 g/mol, sayıca ortalama molekül ağırlığı (M_n) 6649,5 g/mol, polidispersite indeksi ise 1.1 bulunmuştur.

Ek 6 ve Ek 7 incelendiğinde dana tendonundan elde edilen glikozaminoglikan ekstraktına ait düşük molekül ağırlıklı olan pike ait polimerlerin ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı 5391,5 g/mol, sayıca ortalama molekül ağırlığı 4186,5 g/mol, polidispersite indeksi ise 1.288 bulunmuştur.

Sülfatlanmamış GAG olan hyalüronik asidin molekül ağırlığı 50–500 kDa aralığında değişmekte iken, sülfatlanmış glikozaminoglikanların molekül ağırlıkları ise 5–60 kDa aralığında değiştiği bilinmektedir (Ratner et al., 1996). Agrekan yapısı, yaklaşık olarak 200 kDa molekül ağırlığına sahip bir protein çekirdeğine sahiptir ve yaklaşık olarak molekül ağırlığı 10-25 kDa arasında değişen 100 adet kondroitin sülfat zinciri ve molekül ağırlığı 3-15 kDa arasında değişen 30-60 keratin sülfat zinciri içermektedir (Hardingham et al.,1992).

Luo ve ark. (2002) tavuk omurga kıkırdağı kullanarak kondroitin sülfat ekstraksiyonu gerçekleştirmiştir. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen ürünün ortalama molekül ağırlığının 48 kDa olarak belirlemişlerdir. Sundaresan ve ark. (2018)'nin bufalo eklem kıkırdağı kullanarak enzimatik yöntemle kondroitin sülfat ekstraksiyonu gerçekleştirdiği çalışmada elektroforetik desende kondroitin sülfat, 5 ile 10 kDa molekül ağırlığı arasında kalın bir bant sergilemiştir.

Kondroitin sülfat/Dermatan sülfat yapısının moleküler ağırlığının 2 ile 50 kDa arasında olduğu bilinmektedir. Sülfat grubunun moleküldeki konumuna ve her bir kondroitin sülfatın içerdiği üronik asit türüne göre kondroitin sülfat; A, B (DS olarak bilinmektedir), C, D, E ve K olarak adlandırılmaktadır (Sugahara, 2003).

Kondroitin sülfatlar, değişen molekül ağırlıklarına ve sülfatlaşma modeline sahip heterojen bileşikler olarak bilinmektedir (Volpi, 2007). Sığır, domuz, tavuk ve balık kıkırdağından kondroitin sülfat ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği çalışmada sığır, domuz ve tavuktan elde edilen kondroitin sülfatın 14-26 kDa molekül ağırlığında olduğu belirlenmiştir. Balık kıkırdağından elde edilen kondroitin sülfatın molekül ağırlığının ise standarda (21.4 kDa) kıyasla daha yüksek (50-70 kDa) olduğu belirlenmiştir (Volpi, 2007).

Hayvansal kaynaklardan ekstrakte edilen kondroitin sülfat örneklerinin farklı molekül ağırlıklarına ve kondroitin-4-sülfat/kondroitin-6-sülfat oranına sahip olduğu bilinmektedir (Volpi, 2004). Örneğin, domuz soluk borusundan ekstrakte edilen kondroitin sülfat örneklerinin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 18 kDa ve kondroitin-4-sülfat/ kondroitin-6-sülfat oranı 2,4 olarak belirlenirken köpekbalığı kıkırdağından elde edilen kondroitin sülfat örneğinin 50 kDa'dan daha yüksek

molekül ağırlığına ve daha düşük kondroitin-4-sülfat/kondroitin-6-sülfat oranına sahip olduğu tespit edilmiştir (Surapaneni, 2017).

Molekül ağırlık analiz sonuçları incelendiğinde tavuk sternumundan elde edilen GAG ekstraktının standarda yakın molekül ağırlığına sahip olduğu, dana tendonunun elde edilen ekstraktın molekül ağırlığının ise daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumun kullanılan hammadde ve elde edilen kondroitin sülfatın niteliği ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada GAG'lara ait yan zincirin molekül ağırlığı ve bağlayıcı proteinin molekül büyüklüğü göz önünde bulundurulduğunda tendon yapısında bulunan proteoglikanların, kıkırdak proteoglikanlarına benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Heinegard et al.,1981).

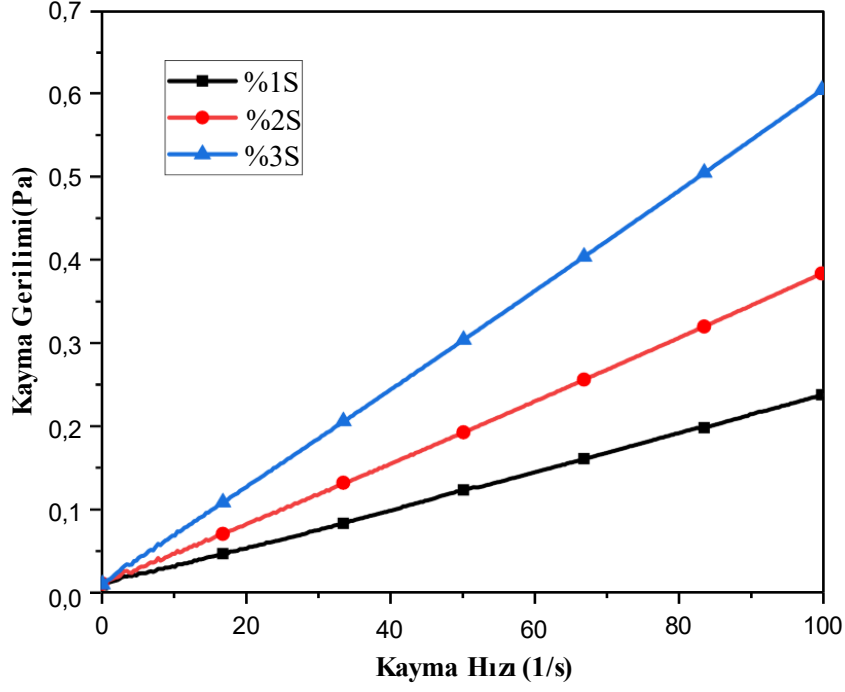
4.8. GAG Örneklerinin Akış Özelliklerinin Belirlenmesi

Tavuk sternumu ve dana tendonu örneklerinden %1, %2 ve %3 konsantrasyonda hazırlanan sülfatlanmış GAG içeren ekstraktın çözeltilerinin akış davranışları 25 °C'de belirlenmiştir. Sternum örneklerinin konsantrasyonları %1S, %2S, %3S tendon örneklerinin konsantrasyonları ise %1T, %2T, %3T olarak kodlanmış ve grafik üzerinde gösterilmiştir.

Analiz verileri, IBM SPSS İstatistik 25 programı kullanılarak non-lineer regresyon analiz türünde Newtonian, Power Law, Herschel-Bulkley, Bingham ve Casson modelleri seçilerek incelenmiştir. Deneysel kayma gerilimi değerlerinin farklı reolojik modeller ile uyumluluğu araştırılmıştır.

Kayma hızına (1/s) karşılık kayma gerilimi (Pa) verileri grafiksel olarak gösterilmiştir ve elde edilen verilere 5 farklı matematiksel denklik uygulandığında (Newtonian, Bingham, Casson, Power Law, Herschel-Bulkley) örneklerin akış davranışına en uygun modelin bulunduğu Newton modeli olduğu belirlenmiştir.

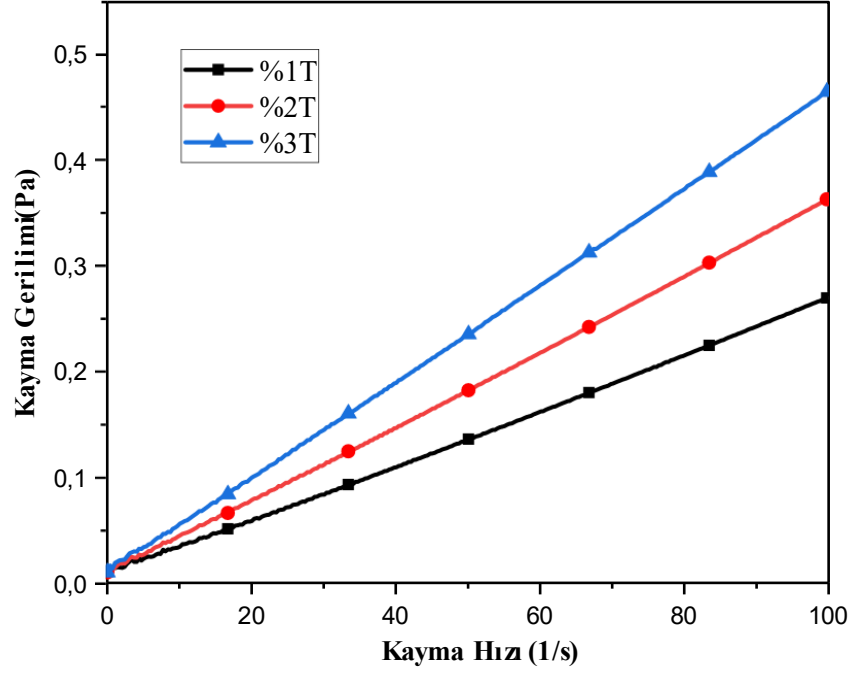
Tavuk sternumuna ait glikozaminoglikan ekstraktına uygulanan kayma hızı ile kayma gerilimi grafiği Şekil 4.15’de verilmiştir.



Şekil 4.15. Tavuk sternumuna ait %1, %2 ve %3 konsantrasyonda hazırlanan sülfatlanmış glikozaminoglikan çözeltisinin kayma hızı-kayma gerilimi değişimi grafiği

Tavuk sternumu kullanarak hazırlanan %1 konsantrasyondaki çözeltinin viskozite değeri $0,0023 \pm 0.0002$ Pa.s, %2 konsantrasyonda hazırlanan çözeltinin viskozite değeri $0,0037 \pm 0.0003$ Pa.s, %3 konsantrasyonda hazırlanan çözeltinin viskozite değeri $0,0059 \pm 0.001$ Pa.s olarak belirlenmiştir. Konsantrasyon arttıkça viskozite değerinin arttığı tespit edilmiştir.

Dana tendonuna ait glikozaminoglikan örneğine uygulanan kayma hızı ile kayma gerilimi grafiği Şekil 4.16’de verilmiştir.



Şekil 4.16. Dana tendonuna ait %1, %2 ve %3 konsantrasyonda hazırlanan sülfatlanmış glikozaminoglikan çözeltisinin kayma hızı-kayma gerilimi değişimi grafiği

Dana tendonu kullanarak hazırlanan %1 konsantrasyondaki çözeltinin viskozite değeri $0,0026 \pm 0.0001$ Pa.s, %2 konsantrasyonda hazırlanan çözeltinin viskozite değeri $0,0035 \pm 0.0001$ Pa.s, %3 konsantrasyonda hazırlanan çözeltinin viskozite değeri $0,0045 \pm 0.0002$ Pa.s olarak belirlenmiştir. Konsantrasyon arttıkça viskozite değerinin arttığı belirlenmiştir. Sternum ve dana tendonu örnekleri genel olarak değerlendirildiğinde ise sternumdan elde edilen glikozaminoglikanın viskozite değerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Genel olarak, akış davranışı indeks değeri n , 0 ile 1 arasında değişmektedir. Akış davranış indeksi n 'in 1 olması sıvının ideal bir akış davranışı gösterdiği anlamına gelmektedir (Chevalley, 1975).

Kondroitin sülfat, hyalüronik asit, agrekan ve agrekan-hyalüronik asit kompleksi yapısının reolojik özelliklerinin incelenmesi için yapılan bir çalışmada kondroitin sülfat çözeltisinin viskoz sıvı özellikte olduğu, hyalüronik asit çözeltisinin ise

viskoelastik özellikte kayma hızı ile incelen bir yapıda olduğu belirlenmiştir. %5, %10, %20, %30 konsantrasyonundaki kondroitin sülfat çözeltilerinin belirlenen frekans aralığı için viskoz modülüs değerinin elastik modülüs değerinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çözeltinin %30 konsantrasyonda dahi viskoz sıvı olarak davrandığı belirlenmiştir. Tüm konsantrasyonlara ait akış davranışının Newtonian modele uygun olduğunu belirlemişlerdir. Hyalüronik asit çözeltisinin yüksek frekans değerlerinde depolama modülüs değerinin (G' -elastik modülüs), kayıp modülüs (G'' -viskoz modülüs, G) değerinden yüksek olduğu belirlenmiştir (Horkay et al., 2021). GAG içeren çözeltilerin viskoz sıvı özellikte olduğu ve akış özelliklerinin literatür ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

4.9. GAG Örneklerinin Aminoasit İçeriği

Tavuk sternumundan ve dana tendonundan elde edilen GAG örneğinin aminoasit içeriği Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.12. Tavuk sternumu ve dana tendonundan elde edilen GAG örneklerinin toplam amino asit içeriğinin karşılaştırılması

Aminoasit	Tavuk sternumundan elde edilen GAG (g/100g)	Dana tendonundan elde edilen GAG (g/100g)
Aspartik asit	1,1355	2,4355
Glutamik asit	2,3875	4,1995
Serin	0,6215	1,1245
Histidin	0,174	0,3155
Glisin	4,8865	9,197
Treonin	0,785	1,1615
Arjinin	0,8435	1,185
Alanin	1,562	3,198
Tirozin	0,1115	0,4615
Sistin	0,224	0,435
Valin	0,5125	0,9555
Metiyonin	0,153	0,2685
Norvalin	0,8365	0,4545
Triptofan	0,8095	0,7425
Fenilalanin	0,305	0,614
İzolösin	0,324	0,664
Lösin	0,5885	1,2965
Lizin	0,8705	1,195
Hidroksiprolin	1,0715	1,44
Sarkozin	0,6585	0,8685
Prolin	5,0345	5,523

Tavuk sternumu ve dana tendonundan elde edilen GAG yüksek saflık düzeyinde olmadığından ekstrakt bileşiminde amino asitlerde yer almaktadır. Tavuk sternumundan elde edilen liyofilize GAG ekstraktının ağırlıkça toplam %23,90; dana tendonundan elde edilen liyofilize GAG ekstraktının ağırlıkça toplam %37,74 aminoasit içerdiği belirlenmiştir. Her iki hammaddeden elde edilen GAG içeriğinde yirmi bir farklı amino asit bulundurmaktadır ve zorunlu amino asitlerden izolösin, lösin, lizin, fenilalanin, metiyonin, treonin, triptofan ve valini içermektedir (Li and Wu, 2018). Miktarı en yüksek olarak bulunan aminoasitler prolin, glisin, glutamik asit, alanin, aspartik asit ve hidroksiprolin olarak Tablo 4.14'te görülmektedir. Dumas yöntemiyle liyofilize üründe protein içeriği bileşim analizi sonucuna göre tavuk sternumundan elde edilen GAG örneğinin protein içeriği %26; dana tendonundan elde edilen GAG örneğinin protein içeriği %36 olarak

belirlenmiştir. Dumas yöntemi ile liyofilize üründe protein içeriği ile elde edilen aminoasit miktarı sonuçları birbirlerini destekler niteliktedir.

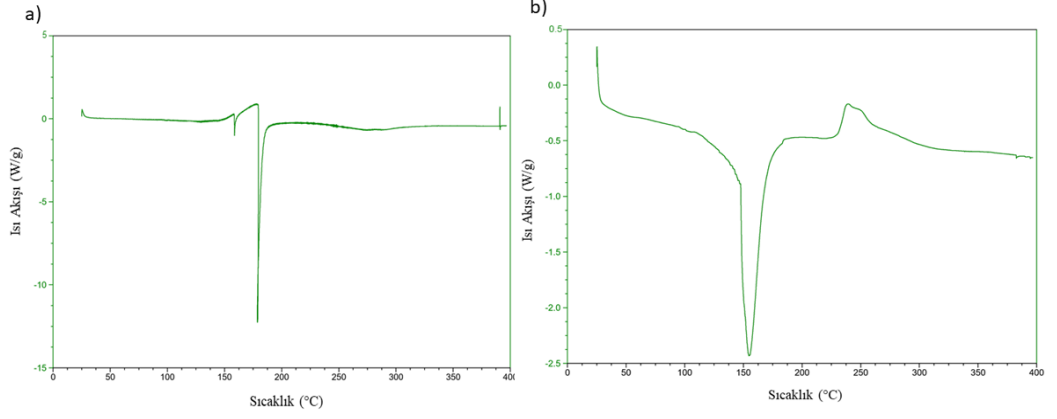
Oligosakkaritlerin çekirdek proteinine asparijinin amid azotundan N-glikozit bağ ile bağlandığı bilinmektedir. Keratan ve kondroitin sülfat zincirleri ise proteine serin ya da treonin yan zincirindeki oksijen atomuna glikozidik bağ yaparak bağlanmaktadır (Saldamlı, 2017).

Srichamroen ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada tavuk omurgası kıkırdağı ve sternum kıkırdağı kullanılarak doku otolizi ile kondroitin sülfat-peptit eldesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kondroitin sülfat-peptit içeriğinin on beş farklı aminoasit içerdiği tespit edilmiştir. Elde edilen aminoasit profilinde serin, glutamik asit, glisin, treonin, alanin, prolin, valin, izolösin, lösin ve fenilalanin baskın olarak belirlenen aminoasitler arasında yer almaktadır. Kondroitin sülfat ya da keratan sülfat zincirinin çekirdek proteini ile arasında oluşan bağlanma bölgesi, ksiloz rezidüyle konjuge bir serin-glisin dizisi içermektedir (Silbert and Sugumaran, 2002). Bu nedenle elde edilen yapıda serin diğer aminoasitlere kıyasla toplam amino asidin bileşiminin yaklaşık üçte birini oluşturmaktadır.

Tez kapsamında uygulanan diyaliz işlemi ile belirli bir noktaya kadar saflaştırma işlemi sağlanmıştır. Sonuç olarak elde edilen ekstraktın içerisindeki yer alan aminoasitlerin uzaklaştırılması için bir saflaştırma prosesi gerekmektedir. Bu nedenle bu çalışmanın kromatografik yöntemler kullanılması ile desteklenmesi ile amino asit içeriğinin azalacağı düşünülmektedir.

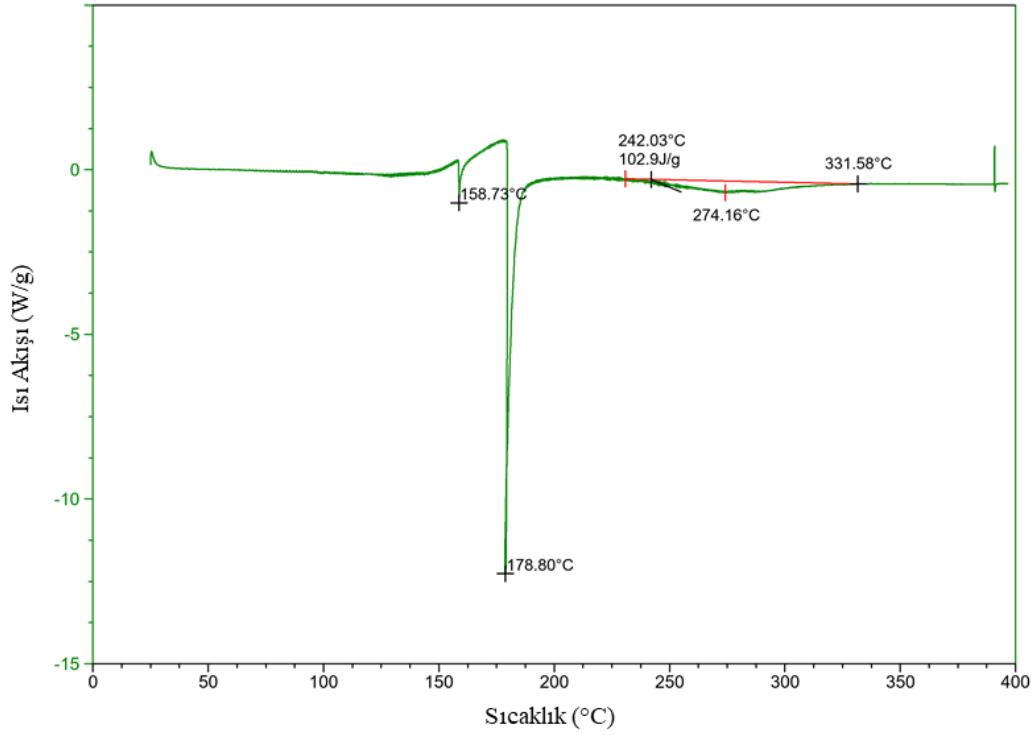
4.10. GAG Örneklerinin Isıl Özelliklerinin Belirlenmesi

Optimum işlem koşulları altında dana tendonundan ve tavuk sternumundan ekstrakte edilen GAG örneklerine ait termogramlar Şekil 4.17’de verilmiştir.



Şekil 4.17. GAG örneklerinin DSC termogramı a) tavuk sternumundan GAG b) dana tendonundan GAG

Tavuk sternumundan elde edilen GAG örneklerinin DSC termogramında 1.bölgede 150-160°C aralığında endotermik bir pik görülmektedir. Bu durum ısıtma işlemiyle birlikte numunenin içerisinde bulunan su kaybının olduğunu göstergesidir. Şekil 4.18’de tavuk sternumundan elde edilen GAG örneğine ait DSC termogramı detaylı şekilde verilmiştir. Tavuk sternumundan elde edilen GAG camsı geçiş sıcaklığı 158°C olarak belirlenmiştir. Ayrıca 2.bölgede 170-180°C aralığında keskin bir endotermik pik gözlenmektedir. Bu endotermik pik GAG moleküllerinin stabilizasyonunun azalması ve molekülün termal yıkımının başlamasıyla ilişkilendirilmektedir. Son olarak 270-280°C aralığında gözlenen üçüncü endotermik pik ise yüksek sıcaklığın etkisiyle örneğin içerisindeki glikozaminoglikanın yapısının bozulmasından kaynaklanmaktadır. Polisakkarit degradasyonunun 331°C’de tamamlanmasıyla birlikte termogramda sabit bir çizgi devam etmektedir.



Şekil 4.18. Tavuk sternumundan elde edilen glikozaminoglikan örneğinin DSC termogramı

Dana tendonundan elde edilen GAG örneğinin DSC termogramında 1.bölgede 150-165°C aralığında endotermik bir pik görülmektedir. Isıtma işlemi sonucu numune içerisinde su kaybı gerçekleşmektedir. Zamanla GAG stabilizasyonunun azalmakta ve molekülün termal yıkımı gerçekleşmektedir. Son olarak 240°C aralığında gözlenen ekzotermik pik ise yüksek sıcaklığın etkisiyle örneğin içerisindeki glikozaminoglikanın bozulmasıyla ilişkilendirilebilir. Polisakkarit degradasyonunun 330°C’de tamamlanmasıyla birlikte termogramda sabit bir çizgi devam etmektedir.

Örnekler arasında endotermik ve ekzotermik pik sıcaklık değerlerinin değişiklik göstermesinin ekstraksiyon işlemi için kullanılan hammaddenin farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Vasconcelos Oliveira ve ark. (2017)’nin Tilapia balığından kondroitin sülfat ekstrakte ettiği çalışmada ekstrakte edilen kondroitin sülfata TGA ve DSC analizleri uygulanmıştır. Elde edilen termogramlardan 20-126,5°C sıcaklık aralığında ilk endotermik geçişin bulunduğu; 126.5- 203°C aralığında ikinci endotermik pikin bulunduğu ve son olarak 233°C’de ekzotermik bir pikin olduğu

görülmüştür. Camsı geçiş sıcaklığı 128°C olarak belirlenmiştir. İkinci endotermik pikin varlığı kondroitin sülfatın stabilitesinin bozulması ve degradasyonun başlaması olarak; ekzotermik pikin varlığı ise kondroitin sülfatın degrade olması ile ilişkilendirilmiştir.

Fajardo ve ark. (2012) saf kondroitin sülfata ait ekzotermik pik sıcaklığını 245°C olarak belirlemişlerdir. Bu sıcaklık kondroitin sülfatın degradasyona başlama sıcaklığı olarak açıklanmıştır. Fajardo ve ark. (2012) yaptığı çalışmada belirlenen kondroitin sülfatın degradasyona başladığı pik sıcaklığı, bu çalışmada tavuk sternumu ve dana tendonundan elde edilen GAG örnekleri için belirlenen degradasyona başlama sıcaklıkları ile benzerlik göstermektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Endüstride ortaya çıkan havvansal kaynaklı atık ve yan ürünlerin etkili bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle tez kapsamında enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile değerli bileşenin elde edilmesi hedeflenmiştir. Ticari olarak GAG üretiminde kullanılan hammaddenin yüksek maliyeti göz önünde bulundurulduğunda ticari olarak farklı GAG kaynaklarına ihtiyacın arttığı görülmektedir.

Tavuk işlendikten sonra ortaya çıkan göğüs kafesinin içerisinde bulunan tavuk sternumunun ve et işleme endüstrisinde hayvansal bir yan ürün olarak ortaya çıkan dana tendonunun bileşiminde bulunan değerli bir bileşen olan GAG enzimatik ekstraksiyon ile eldesi gerçekleştirilmiştir.

Yanıt Yüzey Yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında deneme desenleri oluşturulmuş ve GAG ekstraksiyonu için işlem koşulları optimize edilmiştir. Tavuk sternumundan elde edilen GAG ekstraksiyonunda optimum işlem koşulu: enzim miktarı %0.6, pH değeri 6.99, ekstraksiyon sıcaklığı 62.96°C ve ekstraksiyon süresi 10.79 saat olarak belirlenmiştir. Bu işlem koşullarında üretilen liyofilize üründeki GAG verimi %26.07 olarak belirlenmiştir. Dana tendonundan elde edilen GAG ekstraksiyonunda optimum işlem koşulu: enzim miktarı %0.8, pH değeri 7.02, ekstraksiyon sıcaklığı 63.20°C ve ekstraksiyon süresi 10.89 saat olarak belirlenmiştir. Bu işlem koşullarında üretilen liyofilize üründeki GAG verimi %1.72 olarak belirlenmiştir. Tavuk sternumunun son üründeki GAG içeriği göz önünde bulundurulduğunda tavuk sternumunun GAG eldesinde potansiyel bir hammadde olabileceği düşünülmektedir.

Optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen GAG ekstraktlarında bazı karakterizasyon analizleri yapılmıştır. FTIR analizi sonucunda tavuk sternumu ve dana tendonundan elde edilen GAG örneklerinin spektrumunda yer alan karakteristik piklerin kondroitin-4-sülfat standardı spektrumu ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Tavuk sternumu ve dana tendonu kullanarak ekstrakte edilen GAG örneklerine ait SEM görüntülerinde kolajen fibrillerine de

rastlanmıştır. GAG zincirlerinin kolajen fibrilleri ile çevrili olduğu gözlenmiştir. GAG ekstraktlarının renk değerlerinin literatür ile kıyaslanabilir düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Kondroitin-4-sülfatın molekül ağırlığı 2078 Da olarak belirlenirken tavuk sternumundan elde edilen GAG örneklerine ait polimerlerin ortalama molekül ağırlığı 2597 Da, dana tendonundan elde edilen glikozaminoglikan ekstraktına ait polimerlerin ortalama molekül ağırlığı 5391,5 Da bulunmuştur. Tavuk sternumundan elde edilen GAG'ın standarda yakın molekül ağırlığına sahip olduğu gözlemlenmiştir. GAG örnekleri kullanarak %1, %2 ve %3 konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin akış davranışının Newton modeli ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Çözeltilerin konsantrasyon değeri arttıkça viskozite değerinin de arttığı belirlenmiştir. Tavuk sternumundan elde edilen liyofilize glikozaminoglikanın ağırlıkça toplam %23.90; dana tendonundan elde edilen liyofilize glikozaminoglikanın ağırlıkça toplam %37.74 aminoasit içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Osteoartrit eklem hastalığının en yaygın bilinen hali olup kıkırdak proteoglikanlarının katabolik olarak kaybı sonucu eklem ağrısı, eklem hassasiyeti ve şişlik gibi semptomlarla rahatsızlık ortaya çıkmaktadır. Günümüzde kondroitin sülfat yaygın olarak artrit tedavisinde kullanılmaktadır. Sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin yanı sıra kozmetik ve eczacılık sektöründe biyo ve nanoteknolojik süreçlerdeki uygulamalarında kondroitin sülfat ve hyalüronik asite olan ilginin giderek arttığı bilinmektedir. Bu nedenle ekstrakte edilen GAG'ın gıda ürüne entegre edilmesi ile GAG' içeren fonksiyonel ürünlerin elde edilmesi mümkündür. GAG'ın gıda matrisinde sergilediği davranış ve dahil edileceği ürünlerdeki miktarı son ürünün kalitesini belirlemede rol oynayan iki temel unsurdur.

Gelecek yıllarda GAG üzerinde daha spesifik çalışmaların yapılacağı ve çalışma sonucunda elde edilen verilerin yeni çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agustin, T. I., Sulistyowati, W., Arbai, A., Yatmasari, E.**, 2015, Glucosamine and chondroitin sulphate content of shark cartilage (*Prionace glauca*) and its potential as anti-aging supplements, *Int.J. ChemTech Res.*,8(10), 163-168pp.
- Akram, A. N., Zhang, C.**, 2020, Extraction of collagen-II with pepsin and ultrasound treatment from chicken sternal cartilage; physicochemical and functional properties. *Ultrasonics sonochemistry*, 64(105053), 1-10pp.
- Alexander, H., Brunski, J. B., Cooper, S. L., Hench, L. L., Hergenrother, R. W., Hoffman, A. S., Yannas, I. V.**, 1996, Classes of materials used in medicine. In *Biomaterials Science*, Academic Press, 37-130pp.
- Balbinot-Alfaro, E., Novello, C. R., Düsman, E., Alfaro, A. T., Barddal, H. P., Almeida, I. V., Martins, V. G.**, 2022, Bioactive properties of glycosaminoglycans extracted from Turkey (*Meleagris gallopavo*) by-products. *Food Bioscience*, 46(101545).
- Banoğlu, E.**, “Artrit ve Tedavisi”, http://e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/eczaciodasiyayinlari/eczaci_agus_04/4.pdf (Erişim Tarihi: 22 Haziran 2021)
- Bianchera, A., Salomi, E., Pezzanera, M., Ruwet, E., Bettini, R., Elviri, L.**, 2014, Chitosan hydrogels for chondroitin sulphate controlled release: an analytical characterization. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2014(808703).
- Bougatef, H., Krichen, F., Capitani, F., Amor, I. B., Maccari, F., Mantovani, V., Sila, A.**, 2018, Chondroitin sulfate/dermatan sulfate from corb (*Sciaena umbra*) skin: Purification, structural analysis and anticoagulant effect. *Carbohydrate polymers*, 196, 272-278pp.
- Brezinski, D. R.**, 1980, *An Infrared spectroscopy atlas for the coatings industry*. Federation of Societies for Coatings Technology, Philadelphia, 73-110pp.
- Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., Ferlazzo, A. M., Calatroni, A.**, 2006, Chondroitin sulphate: antioxidant properties and beneficial effects. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 6(12), 1311-1320pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chadha, N.** “Articular Cartilage Scaffold Imaging”, <http://www2.optics.rochester.edu/workgroups/cml/opt307/spr09/nipun/cartilage%20scaffold.htm>” (Erişim tarihi: 18 Mayıs 2021)
- Couchman, J. R., Pataki, C. A.**, 2012, An introduction to proteoglycans and their localization. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 60(12), 885-897pp.
- Coulson-Thomas, Y. M., Coulson-Thomas, V. J., Norton, A. L., Gesteira, T. F., Cavalheiro, R. P., Meneghetti, M. C. Z. and Nader, H. B.**, 2015, The identification of proteoglycans and glycosaminoglycans in archaeological human bones and teeth, *PloS One*, 10(6), e0131105.
- Cui, Q., Li, G. and Yuan, C.**, 2012, Optimization of glycosaminoglycan extraction on *Patinopecten yessoensis* waste, *Procedia Environmental Sciences*, 16, 131-137 pp.
- Fajardo, A. R., Silva, M. B., Lopes, L. C., Piai, J. F., Rubira, A. F., Muniz, E. C.**, 2012, Hydrogel based on an alginate–Ca²⁺/chondroitin sulfate matrix as a potential colon-specific drug delivery system. *Rsc Advances*, 2(29), 11095-11103pp.
- Farndale, R. W., Buttle, D. J., Barrett, A. J.**, 1986, Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 883(2), 173-177pp.
- Gardiyanoglu, R.**, 1999, 118 Mukoosakkaridoz vakasının klinik ve laboratuvar özelliklerinin retrospektif olarak değerlendirilmesi: Ankara: Hacettepe Üniversitesi.
- Garg, H. G., Linhardt, R. J., Hales, C. A. (Eds.)**, 2011, *Chemistry and biology of heparin and heparan sulfate*. Elsevier.
- Garnjanagoonchorn, W., Wongekalak, L. and Engkagul, A.**, 2007, Determination chondroitin sulfate from different sources of cartilage. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5): 465-471pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gilbert, M. E., Kirker, K. R., Gray, S. D., Ward, P. D., Szakacs, J. G., Prestwich, G. D., Orlandi, R. R.**, 2004, Chondroitin sulfate hydrogel and wound healing in rabbit maxillary sinus mucosa. *The Laryngoscope*, 114(8), 1406-1409pp.
- Gujral, N., Ganguly, A., Sunwoo, H. H., Kim, C. T., Suh, J. W.**, 2014, Chondroitin sulphate extracted from antler cartilage using high hydrostatic pressure and enzymatic hydrolysis, *Biotechnology Reports*, 4: 14-20pp.
- Hamano, T., Mitsuhashi, Y., Acki, N., Yamamoto, S., Tsuji, S., Ito, Y., Oji, Y.**, 1989, High-performance liquid chromatographic assay of chondroitin sulphate in food products. *Analyst*, 114(8), 891-893pp.
- Hao SX, Li LH, Yang XQ, Wei Y, Huang H, Lin WL, Deng JC, Cen JW, Qi B, Wu YY, Shi H and Diao SQ**, 2013, Method for preparing chondroitin sulfate from sturgeon cartilage. CN Patent 102924624 A.
- Hardingham, T. E., Fosang, A. J.**, 1992, Proteoglycans: many forms and many functions. *The FASEB journal*, 6(3), 861-870pp.
- He, G., Yin, Y., Yan, X., Yu, Q.**, 2014, Optimisation extraction of chondroitin sulfate from fish bone by high intensity pulsed electric fields. *Food Chemistry*, 164, 205-210pp.
- Henrotin, Y., Mathy, M., Sanchez, C., Lambert, C.**, 2010, Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 2(6), 335-348pp.
- Horkay, F.**, 2012, Interactions of cartilage extracellular matrix macromolecules. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 50(24), 1699-1705pp.
- Horkay, F., Douglas, J. F., Raghavan, S. R.**, 2021, Rheological Properties of Cartilage Glycosaminoglycans and Proteoglycans. *Macromolecules*.
- Huskisson, E. C.**, 2008, Glucosamine and chondroitin for osteoarthritis. *Journal of International Medical Research*, 36(6), 1161-1179pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Iozzo, R. V. (Ed.)**, 2000, *Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions*. CRC Press, 12p.
- Jin, F., Toda, K.**, 1988, Preparation of immobilized papain covalently bound on natural cellulose for treatment of beer. *Biotechnology letters*, 10(3), 221-223pp.
- Jin, J. H., Chun, E. H., Hyun, J. H., Choi, S. W., Su, S. T., Kim, W., Baik, M. Y.**, 2015, Optimization of hot water extraction and ultra high pressure extraction for deer antler. *Food Science and Biotechnology*, 24(2), 507-512pp.
- Kang, C. W., Shin, S. C., You, S. J. and An, B. K.**, 2006, Study on Extraction of Mucopolysaccharide-protein Containing Chondroitin Sulfate from Chicken Keel Cartilage Electrophoresis, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(4): 601-604pp.
- Khan, H. M., Ashraf, M., Hashmi, A. S., Ahmad, M. U. D., Anjum, A. A.**, 2013, Extraction and biochemical characterization of sulphated glycosaminoglycans from chicken keel cartilage. *Pak Vet J*, 33, 471-475pp.
- Khor, C. Y., nAbdullah, M. Z.**, 2012, Optimization of IC encapsulation considering fluid/structure interaction using response surface methodology. *Simulation Modelling Practice and Theory*, 29, 109-122pp.
- Khuri, A.I. and Cornell, J.A.**, 1996, *Response Surfaces: Designs and Analyses*, Marcel Dekker Inc, New York.
- Kim, C. T., Gujral, N., Ganguly, A., Suh, J. W., Sunwoo, H. H.**, 2014, Chondroitin sulphate extracted from antler cartilage using high hydrostatic pressure and enzymatic hydrolysis. *Biotechnology Reports*, 4, 14-20pp.
- Kotecha, M., Klatt, D., Magin, R. L.**, 2013, Monitoring cartilage tissue engineering using magnetic resonance spectroscopy, imaging, and elastography. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(6), 470-484pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- L.S. Lohmander, S. De Luca, B. Nilsson, V.C. Hascall, C.B. Caputo, J.H. Kimura, D. Heinegard**, 1980, Oligosaccharides on proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma, *J. Biol. Chem.*, 255 (13), 6084–609pp.
- Lauder, R. M.**, 2009, Chondroitin sulphate: a complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems. *Complementary therapies in medicine*, 17(1), 56-62pp.
- Lazic, Z.R.**, 2004, Design of Experiment in Chemical Engineering. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 1-152pp.
- Le Vien, N. T., Nguyen, P. B., Cuong, L. D., An, T. T. T., Dao, D. T. A.**, 2017, Optimization of papain hydrolysis conditions for release of glycosaminoglycans from the chicken keel cartilage. In *AIP Conference Proceedings*, AIP Publishing LLC, 1878(1), 020009p
- Lee, D. H., Oh, J. H., Chung, J. H.**, 2016, Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. *Journal of dermatological science*, 83(3), 174-181pp.
- Leong, W. C., Abdullah, M. Z., Khor, C. Y.**, 2013, Optimization of flexible printed circuit board electronics in the flow environment using response surface methodology. *Microelectronics Reliability*, 53(12), 1996-2004pp.
- Li, P. and Wu, G.**, 2018, Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth, *Amino Acids*, 50(1): 29-38pp.
- Luo, X. M., Fosmire, G. J., Leach Jr, R. M.**, 2002, Chicken keel cartilage as a source of chondroitin sulfate. *Poultry Science*, 81(7), 1086-1089pp.
- M Devlin, T.**, 1997, *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. 4 ed. USA: John Wiley&Sons, 351-352pp.
- Maccari, F., Galeotti, F., Volpi, N.**, 2015, Isolation and structural characterization of chondroitin sulfate from bony fishes. *Carbohydrate Polymers*, 129, 143–147pp.
- Martone, C. B., Borla, O. P., Sánchez, J. J.**, 2005, Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Bioresource technology*, 96(3), 383-387pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Myers, R. H., and Montgomery, D. C.**, 1995, Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments, *John Wiley and Sons*, New York, 4, 156-179pp.
- Nakano T, Betti M, Pietrasik Z.**, 2010, Extraction, isolation and analysis of chondroitinsulfate glycosaminoglycans. *Recent Pat Food Nutr Agric*, 2:61–74pp.
- Nakano, T., Ikawa, N. and Ozimek, L.**, 2001, Extraction of Glycosaminoglycans from Chicken Eggshell, *Poultry Science*, 80(5): 681-684pp.
- Nakano, T., Pietrasik, Z., Ozimek, L., Betti, M.**, 2012, Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate from broiler chicken biomass, *Process biochemistry*, 47(12): 1909-1918pp.
- Oliveira, A. P. V., de Abreu Feitosa, V., de Oliveira, J. M., Coelho, A. L., Lídia de Araújo, P. V., da Silva, F. D. A. R., de Souza, B. W.** (2017). Characteristics of chondroitin sulfate extracted of tilapia (*Oreochromis niloticus*) processing. *Procedia engineering*, 200, 193-199pp.
- Ötles, S., Özdestan Ocak, Ö., Nakilcioğlu Taş, E., Kartal, C., Özyurt, H.**, 2015, *Gıda Kimyası*, Ege Üniversitesi Yayınları 62, 115-116s.
- Papakonstantinou, E., Roth, M. and Karakiulakis, G.**, 2012, Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging, *Dermato-Endocrinology*, 4(3): 253-258pp.
- Price, R. D., Berry, M. G., Navsaria, H. A.**, 2007, Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 60(10), 1110-1119pp.
- Rani, A., Baruah, R. and Goyal, A.**, 2017, Physicochemical, antioxidant and biocompatible properties of chondroitin sulphate isolated from chicken keel bone for potential biomedical applications, *Carbohydrate polymers*, 159: 11-19pp.
- Ratner B.D., Hoffman, A. S., Schoen F.J., Lemons J.E.**, 1996, An introduction to materials in medicine. *Biomaterials science*, Academic Press. 92.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Raynauld, J. P., Pelletier, J. P., Abram, F., Dodin, P., Delorme, P., Martel-Pelletier, J.**, 2016, Long-Term Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on the Progression of Structural Changes in Knee Osteoarthritis: Six-Year Followup Data From the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis care & research*, 68(10), 1560-1566pp.
- Restaino, O. F., Finamore, R., Stellavato, A., Diana, P., Bedini, E., Trifuoggi, M., Schiraldi, C.**, 2019, European chondroitin sulfate and glucosamine food supplements: a systematic quality and quantity assessment compared to pharmaceuticals. *Carbohydrate polymers*, 222, 114984.
- Saldamlı, İ.**, 2017, *Gıda kimyası*. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 124-127s.
- Sayari, N., Martinez-Alvarez, O., Ben Mansour, M., Sila, A., Mokni, A., Besbes, S., Balti, R.**, 2018, Structural characteristics and biological activities of sulfated glycosaminoglycans extracted from shrimp by-products. *Journal of Food Biochemistry*, 42(6), e12647.
- Schaefer, L. and Schaefer, R. M.**, 2010, Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules, *Cell and Tissue Research*, 339(1), 237-246pp.
- Seyfeli, S., Üstünel, İ., Değer, N., Demir, R.**, 2001, Ekstrasellüler Matriks ve Bazı Kardiovasküler Hastalıklarla İlişkisi. *Türkiye Klinikleri Kardiyoloji Dergisi*, 14(6), 359- 369s.
- Shi, Y. G., Meng, Y. C., Li, J. R., Chen, J., Liu, Y. H., Bai, X.**, 2014, Chondroitin sulfate: Extraction, purification, microbial and chemical synthesis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(10), 1445-1465pp.
- Shriver, Z., Capila, I., Venkataraman, G. and Sasisekharan, R.**, 2012, Heparin and Heparan Sulfate: Analyzing Structure and Microheterogeneity, *Handb Exp Pharmacol*, 207: 159-176pp.
- Silbert, J. E., Sugumaran, G.**, 2002, Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. *IUBMB life*, 54(4), 177-186pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Srichamroen, A., Nakano, T., Pietrasik, Z., Ozimek, L., Betti, M.,** 2013, Chondroitin sulfate extraction from broiler chicken cartilage by tissue autolysis. *LWT- Food Sci. Technol.* 50, 607–612pp.
- Steffe, J.F.,** 1996, *Rheological Methods in Food Process Engineering.* Freeman press, 25-26pp.
- Sugahara K, Mikami T, Uyama T, Mizuguchi S, Nomura K, Kitagawa H.,** 2003, Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol*, 13:612–20.
- Sundaresan, G., Abraham, R. J., Rao, V. A., Babu, R. N., Govind, V., Meti, M. F.,** 2018, Established method of chondroitin sulphate extraction from buffalo (*Bubalus bubalis*) cartilages and its identification by FTIR. *Journal of food science and technology*, 55(9), 3439-3445pp.
- Surapaneni, L., Huang, G., Bodine, A. B., Brooks, J., Podila, R., Haley-Zitlin, V.,** 2014, Correlations between Chondroitin Sulfate Physicochemical Properties and its in-vitro Absorption and Anti-inflammatory Activity. *arXiv preprint arXiv:1412.5562.*
- Talmoudi, N., Ghariani, N., Sadok, S.,** 2020, Glycosaminoglycans from Co-Products of «*Scyliorhinus canicula*»: Extraction and Purification in Reference to the European Pharmacopoeia Requirement. *Biological Procedures Online*, 22(1), 1-16.
- Terzioğlu, M.,** 2002, Mukopolisakkaridoz Tip IV A Mutasyonlarının Moleküler Genetik Analizi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Theocharis, A. D., Tsolakis, I., Tzanakakis, G. N., Karamanos, N. K.,** 2006, Chondroitin sulfate as a key molecule in the development of atherosclerosis and cancer progression. *Advances in pharmacology*, 53, 281-295pp.
- Tomiosso TC, Gomes L, de Campos Vidal B, Pimentel ER,** 2005, Extracellular matrix of ostrich articular cartilage. *Biocell*, 29(1):47–54pp.
- Türk, T.,** 2016, Merkezi Kompozit Tasarımı Kullanılarak Bakır Cürufundan Arsenik İçinin İncelenmesi, *Yerbilimleri Dergisi*, 37(3), 193-202s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Uhlig, H. (Ed.)**, 1998, *Industrial enzymes and their applications*. John Wiley & Sons.
- Uslu, M. Ö. ve Eltas, Ş. D.**, 2015, Peridontal Hastalıklarda MMP-8 'in Rolü, *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, Ek 12: 80-85s.
- Üçgül, İ., Sultan, A. R. A. S., Elibüyük, U.**, 2018, Ekstraselüler Matris Yapısı ve Görevleri. *Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering*, 23(1), 295-310s.
- Vázquez, J. A., Blanco, M., Fraguas, J., Pastrana, L. and Pérez-Martín, R.**, 2016, Optimisation of the extraction and purification of chondroitin sulphate from head by-products of *Prionace glauca* by environmental friendly processes. *Food Chemistry*, 198, 28-35pp.
- Vázquez, J. A., Rodríguez-Amado, I., Montemayor, M. I., Fraguas, J., González, M. D. P., Murado, M. A.**, 2013, Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: Characteristics, applications and eco-friendly processes: A review. *Marine drugs*, 11(3), 747-774pp.
- Vittayanont, M., Jaroenviriyapap, T.**, 2013, Production of crude chondroitin sulfate from duck trachea. *International Food Research Journal*, 21(2), 791–797pp.
- Volpi, N.**, 2009, Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 61(10), 1271-1280pp.
- Volpi, N.**, 2007, Analytical aspects of pharmaceutical grade chondroitin sulfates. *J. Pharm. Sci.*, 96, 3168–3180pp.
- Wang, X., Shen, Q., Zhang, C., Jia, W., Han, L., Yu, Q.**, 2019, Chicken leg bone as a source of chondroitin sulfate. *Carbohydrate polymers*, 207, 191-199pp.
- Wardrop, D., Keeling, D.**, 2008, The story of the discovery of heparin and warfarin. *British journal of haematology*, 141(6), 757-763pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Watanabe, T., Kametani, K., Koyama, Y. I., Suzuki, D., Imamura, Y., Takehana, K., Hiramatsu, K.,** 2016, Ring-mesh model of proteoglycan glycosaminoglycan chains in tendon based on three-dimensional reconstruction by focused ion beam scanning electron microscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 291(45), 23704-23708pp.
- Widyaningsih, T. D., Rukmi, W. D., Sofia, E., Wijayanti, S. D., Wijayanti, N., Ersalia, R., Rochmawati, N., Nangin, D.,** 2016, Extraction of Glycosaminoglycans Containing Glucosamine and Chondroitin Sulfate from Chicken Claw Cartilage, *Research Journal of Life Science*, 3(3): 181-189pp.
- Wu, R., Li, P., Wang, Y., Su, N., Xiao, M., Li, X., Shang, N.,** 2022, Structural analysis and anti-cancer activity of low-molecular-weight chondroitin sulfate from hybrid sturgeon cartilage. *Carbohydrate Polymers*, 275, 118700.
- Xiong S, Li A, Wu Z, Wei M.,** 2009, Extraction, separation and purification of chon-droitin sulfate from chicken keel cartilage (in Chinese). *Trans Chin Soc AgricEng*, 25:271–5.
- Yunchang, W., Hua, S. and Li, B.,** 1995, Status and prospects of glycosaminoglycan, *Progress of Bioengineering*, 6, 2-10p.
- Zhao, T., Zhou, Y., Mao, G., Zou, Y., Zhao, J., Bai, S., Wu, X.** 2013, Extraction, purification and characterisation of chondroitin sulfate in Chinese sturgeon cartilage, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7): 1633-1640pp.
- Zhou, C., Li, Y., Yu, X., Yang, H., Ma, H., Yagoub, A. E. A., Otu, P. N. Y.,** 2016, Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. *LWT*, 74, 145-153pp.
- Zou, S., Pan, R., Dong, X., He, M., Wang, C.,** 2016, Physicochemical properties and antioxidant activities of two fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber *Acaudina molpadioidea* and *Holothuria nobilis*. *Process Biochemistry*, 51(5), 650–658pp.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana çalışmalarında yol gösteren, sürekli teşvik edip cesaretlendiren, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, engin tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım sevgili danışman hocam Sayın Doç. Dr. Seher KUMCUOĞLU'na, değerli bilgi, fikir, tecrübe ve desteklerini benimle paylaşan sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Şebnem TAVMAN'a, çok kıymetli bilgilerini benimle paylaşan ve ilgisini esirgemeyen sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Murat ELİBOL'a, bu çalışmada emeği geçen ve yardımcı olan tüm Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Akademik ve Teknik personeline sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen, her zaman beni motive eden değerli çalışma arkadaşlarım Selen ERKOÇ, İpek ÖZCAN, Ebru ORMANLI, Zülal GÜNAY, Burcu Havva TIĞA, Özge ATA, Buket AMCA, Bahar BAKAR, Yaren SARIDUMAN, Neslihan BOZDOĞAN'a göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde FYL-2020-22497 nolu projeye finansal desteklerinden dolayı Ege Üniversitesi BAP Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Ege Üniversitesi BAP Koordinatörlüğüne ve Abalıoğlu Lezita Gıda Sanayi A.Ş' ye bursiyer olarak çalıştığım FBG-2020-21468 nolu güdümlü projeye destek verdikleri için teşekkür ederim.

Bütün eğitim hayatım boyunca sonsuz bir anlayış ve sabırla beni motive eden, her türlü destek ve emeğiyle sürekli arkamda duran, hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim sevgili aileme ve Ezgican'a çok teşekkür ederim.

Çise KARAMAN

ÖZGEÇMİŞ

Çise Karaman ilköğretim, ortaöğretim ve lise eğitimini Eskişehir’de tamamlamıştır. 2013 yılında Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans eğitime başlamış ve 2018 yılında lisans eğitimini tamamlamıştır. Meslek stajını Atatürk Orman Çiftliği’nde yapmıştır. 2019 yılında Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde yüksek lisans eğitime başlamıştır. 2021 yılında Pak İhracat A.Ş.’de Amerika Bölgesi için İhracat Alan Sorumlusu olarak çalışmaya başlamıştır.



EKLER

Ek 1 Tavuk sternumundan elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu

Ek 2 Dana tendonundan elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu

Ek 3 Kondroitin sülfat standardına ait moleküler ağırlık grafiği

Ek 4 Sternumdan elde edilen GAG örneğine ait moleküler ağırlık grafiği

Ek 5 Sternumdan elde edilen GAG örneğine ait moleküler ağırlık grafiği

Ek 6 Tendondan elde edilen GAG örneğine ait moleküler ağırlık grafiği

Ek 7 Tendondan elde edilen GAG örneğine ait moleküler ağırlık grafiği

Ek 8 Sternumdan elde edilen GAG örneğine ait aminoasit profili

Ek 9 Sternumdan elde edilen GAG örneğine ait aminoasit profili

Ek 10 Tendondan elde edilen GAG örneğine ait aminoasit profili

Ek 11 Tendondan elde edilen GAG örneğine ait aminoasit profili

Ek 12 GAG ekstraktlarının renk değerlerinin incelenmesine ait istatistiksel değerlendirme

Ek 13 GAG ekstraktlarının L* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

Ek 14 GAG ekstraktlarının a* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

Ek 15 GAG ekstraktlarının b* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

Ek 16 Tavuk sternumundan GAG ekstraksiyonuna ait optimizasyon için belirlenen ardışık kareler toplamı

Ek 17 Tavuk sternumundan GAG ekstraksiyonuna ait yapılan optimizasyonun verim üzerindeki etkisini belirten istatistik sonuçları

Ek 18 Tavuk sternumundan elde edilen GAG ekstraktlarına ait optimizasyon için belirlenen kriterler

Ek 19 Tavuk sternumundan elde edilen GAG ekstraktlarına ait optimizasyon çözümler

Ek 20 Tavuk sternumundan GAG ekstraksiyonuna ait optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması

EK 21 Dana tendonundan GAG ekstraksiyonuna ait optimizasyon için belirlenen ardışık kareler toplamı

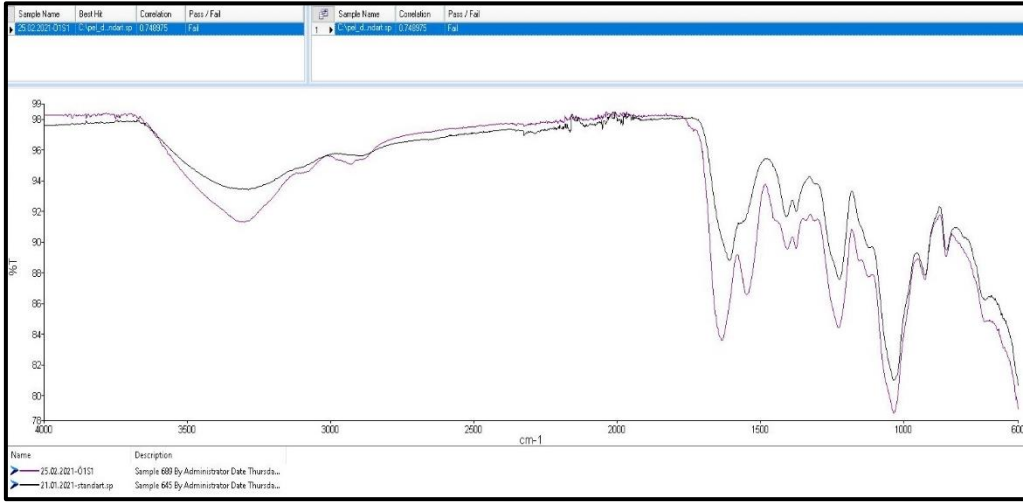
Ek 22 Dana tendonundan GAG ekstraksiyonuna ait yapılan optimizasyonun verim üzerindeki etkisini belirten istatistik sonuçları

Ek 23 Dana tendonundan elde edilen GAG ekstraktlarına ait optimizasyon için belirlenen kriterler

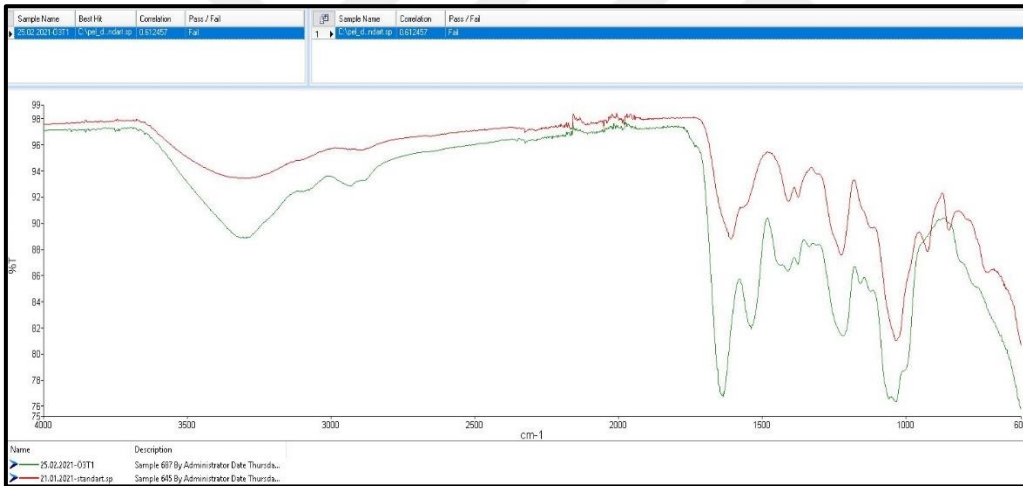
Ek 24 Dana tendonundan elde edilen GAG ekstraktlarına ait optimizasyon çözümler

Ek 25 Dana tendonundan GAG ekstraksiyonuna ait optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması

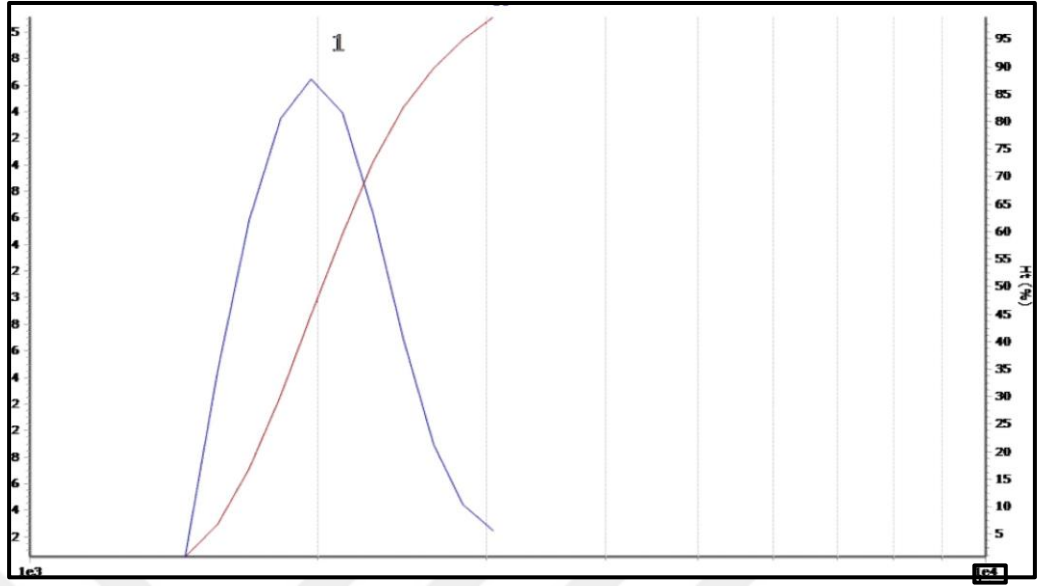
Ek 1 Tavuk sternumundan elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu



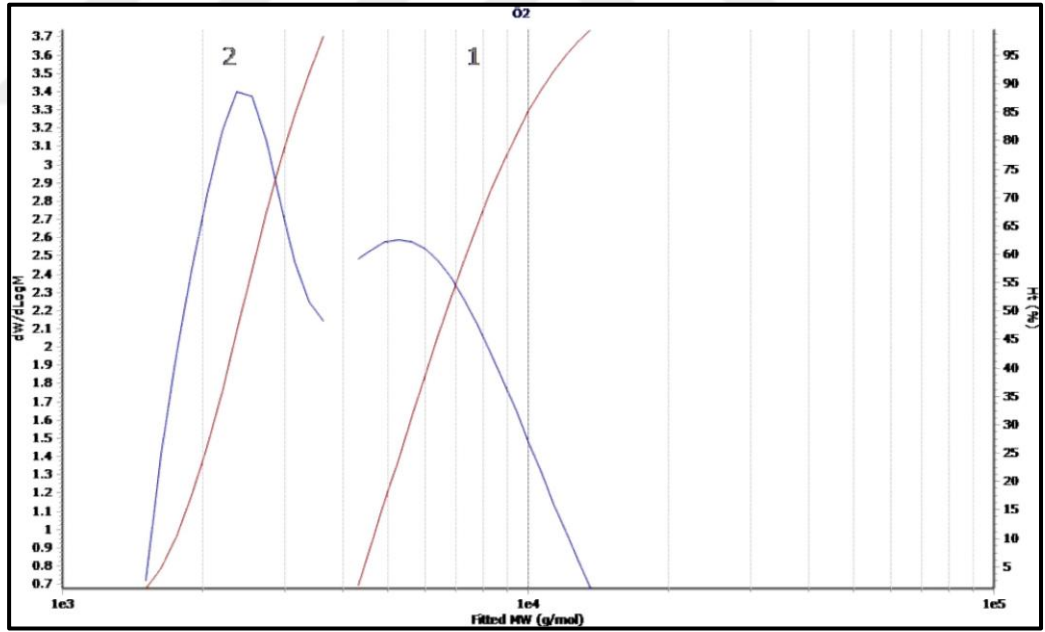
Ek 2 Dana tendonundan elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu



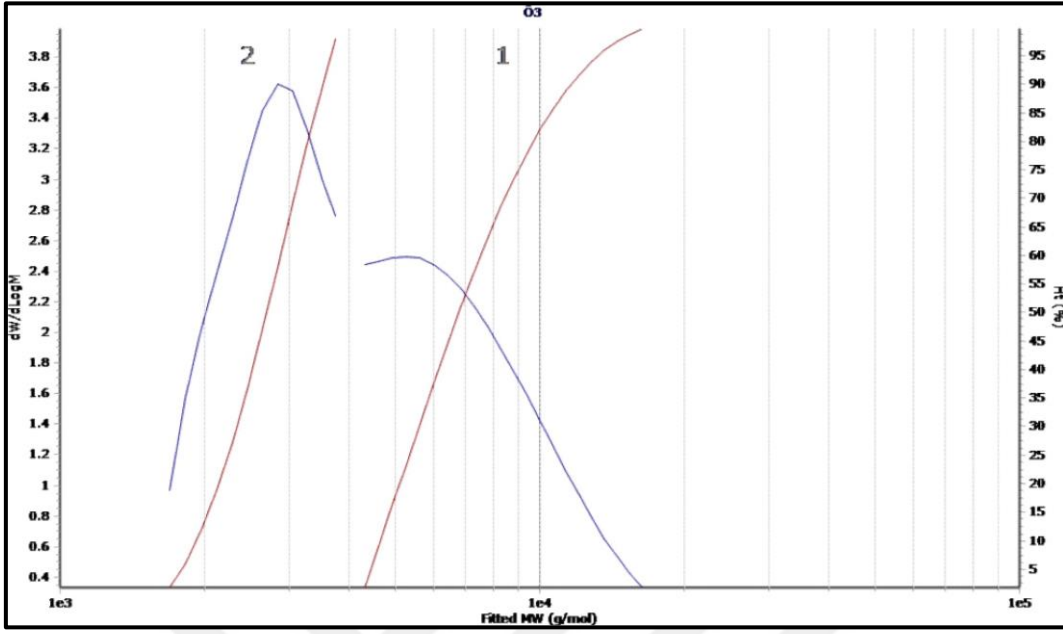
Ek 3 Kondroitin sülfat standardına ait moleküler ağırlık grafiği



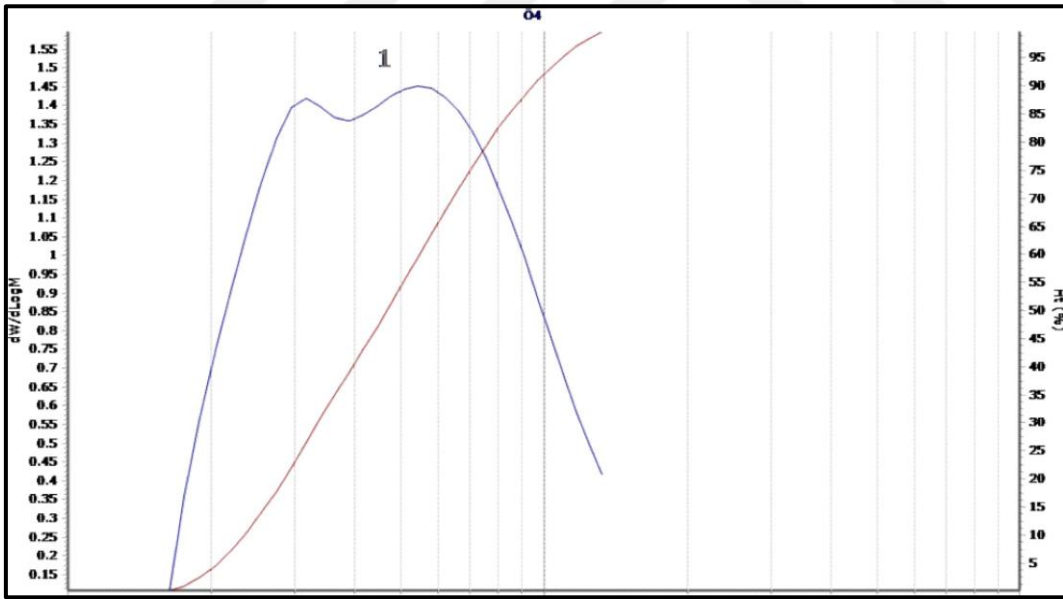
Ek 4 Sternumdan elde edilen GAG örneğine ait moleküler ağırlık grafiği



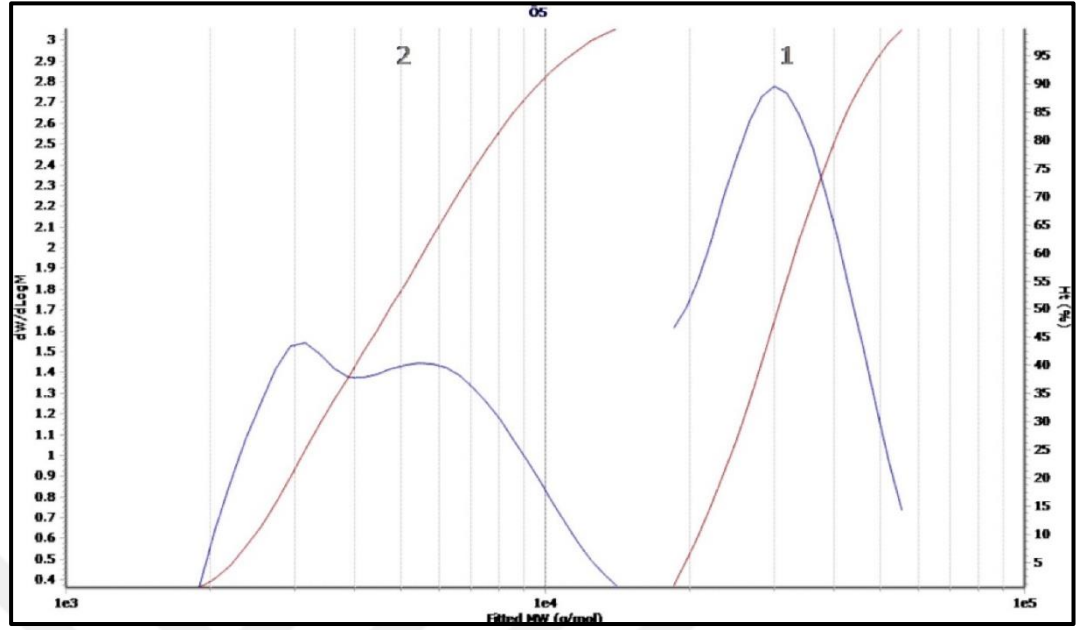
Ek 5 Sternumdan elde edilen GAG örneğine ait moleküler ağırlık grafiği



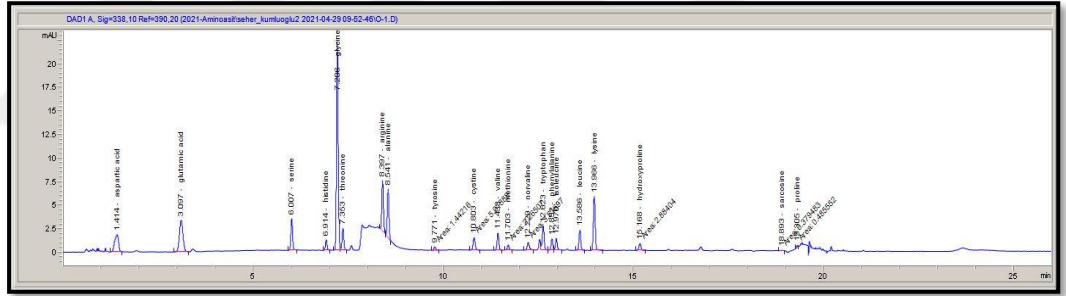
Ek 6 Tendondan elde edilen GAG örneğine ait moleküler ağırlık grafiği



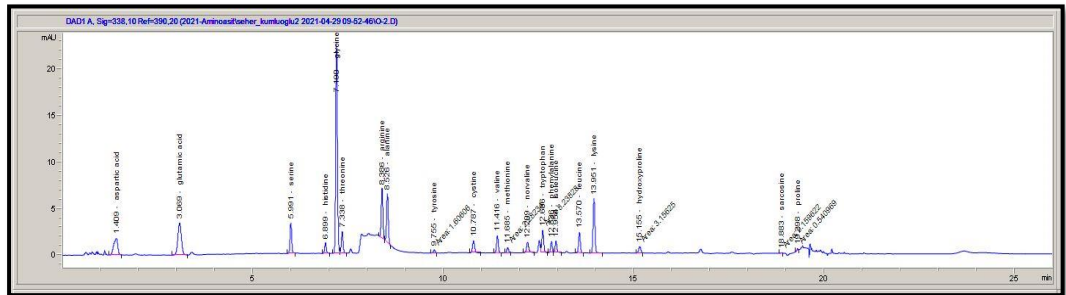
Ek 7 Tendondan elde edilen GAG örneğine ait moleküler ağırlık grafiği



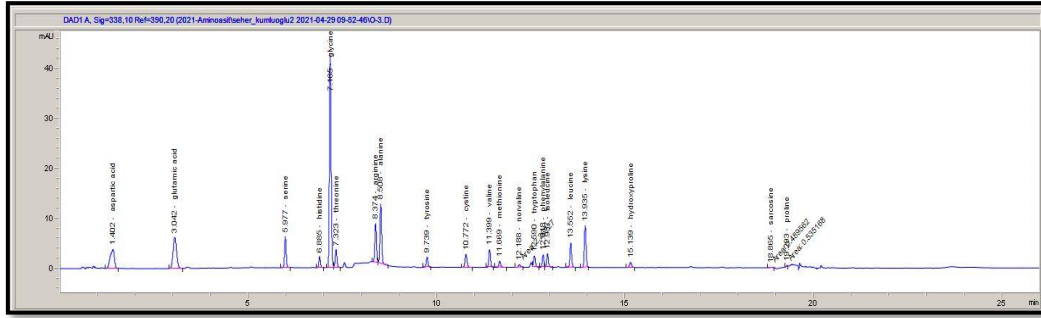
Ek 8 Sternumdan elde edilen GAG örneğine ait aminoasit profili



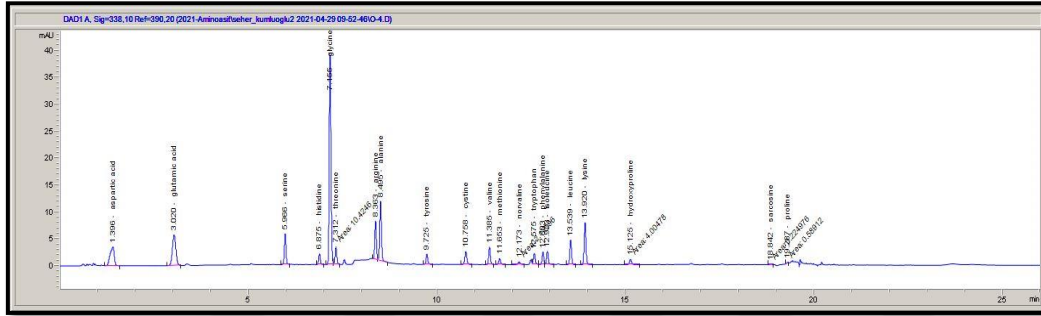
Ek 9 Sternumdan elde edilen GAG örneğine ait aminoasit profili



Ek 10 Tendondan elde edilen GAG örneğine ait aminoasit profili



Ek 11 Tendondan elde edilen GAG örneğine ait aminoasit profili



Ek 12 GAG ekstraktlarının renk değerlerinin incelenmesine ait istatistiksel değerlendirme

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
L	Between Groups	132,281	2	66,141	168,633	,000
	Within Groups	9,413	24	,392		
	Total	141,695	26			
a	Between Groups	,115	2	,058	4,097	,029
	Within Groups	,338	24	,014		
	Total	,453	26			
b	Between Groups	403,261	2	201,631	3806,216	,000
	Within Groups	1,271	24	,053		
	Total	404,533	26			

Ek 13 GAG ekstraktlarının L* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

L*

Tukey HSD^a

örnek	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
dana tendonu	9	91,4722		
tavuk sternumu	9		93,9167	
Kondroitin-4-sülfat standart	9			96,8856
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

Ek 14 GAG ekstraktlarının a* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

a*

Tukey HSD^a

örnek	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
dana tendonu	9	-1,1422	
Kondroitin-4-sülfat standart	9	-1,0356	-1,0356
tavuk sternumu	9		-,9856
Sig.		,158	,649

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

Ek 15 GAG ekstraktlarının b* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

b*

Tukey HSD^a

örnek	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
tavuk sternumu	9	1,8544	
dana tendonu	9	2,0367	
Kondroitin-4-sülfat standart	9		10,1422
Sig.		,233	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

Ek 16 Tavuk sternumundan GAG ekstraksiyonuna ait optimizasyon için belirlenen ardışık kareler toplamı

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	9024.08	1	9024.08			
Linear vs Mean	125.98	4	31.50	0.77	0.5526	
2FI vs Linear	126.96	6	21.16	0.45	0.8351	
<u>Quadratic vs 2FI</u>	<u>861.62</u>	<u>4</u>	<u>215.40</u>	<u>111.24</u>	<u>< 0.0001</u>	<u>Suggested</u>
Cubic vs Quadratic	23.48	8	2.94	3.69	0.0510	Aliased
Residual	5.56	7	0.79			
Total	10167.68	30	338.92			

Ek 17 Tavuk sternumundan GAG ekstraksiyonuna ait yapılan optimizasyonun verim üzerindeki etkisini belirten istatistik sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	%GAG Verim			
		Hata Kareler Toplamı	Mean Square	F Value	p-değeri
Model	14	1114.55	79.61	41.11	< 0.0001
A-Enzim Miktarı	1	65.54	65.54	33.85	< 0.0001
B-pH	1	30.51	30.51	15.76	0.0012
C-Sıcaklık	1	16.35	16.35	8.44	0.0109
D-Süre	1	13.57	13.57	7.01	0.0183
AB	1	17.96	17.96	9.28	0.0082
AC	1	53.77	53.77	27.77	< 0.0001
AD	1	17.96	17.96	9.28	0.0082
BC	1	33.07	33.07	17.08	0.0009
BD	1	3.48	3.48	1.80	0.2000
CD	1	0.71	0.71	0.37	0.5535
A ²	1	181.62	181.62	93.79	< 0.0001
B ²	1	320.53	320.53	165.53	< 0.0001
C ²	1	259.44	259.44	133.98	< 0.0001
D ²	1	448.39	448.39	231.56	< 0.0001
Kalıntı	15	29.05	1.94		
Uyum Eksikliği	10	25.93	2.59	4.16	0.0647
Saf Hata	5	3.12	0.62		
Toplam	29	1143.60			

Ek 18 Tavuk sternumundan elde edilen GAG ekstraktlarına ait optimizasyon için belirlenen kriterler

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower weight	Upper weight	Importance
Enzim Miktarı	minimize	0.6	1.2	1	1	3
pH	in range	6.5	7.5	1	1	3
Sıcaklık	in range	60	70	1	1	3
Süre	minimize	10	20	1	1	3
%GAG miktarı	maximize	10.416	28.658	1	1	5

Ek 19 Tavuk sternumundan elde edilen GAG ekstraktlarına ait optimizasyon çözümler

No	Enzim Miktarı	pH	Sıcaklık	Süre	%GAG	Desirability	
1	0.60	6.99	62.96	10.79	26.0666	0.912	Selected
2	0.60	6.99	62.94	10.78	26.0616	0.912	
3	0.60	6.98	62.92	10.78	26.0604	0.912	
4	0.60	6.99	62.84	10.82	26.0982	0.912	
5	0.60	6.99	63.10	10.74	26.022	0.912	
6	0.60	7.00	63.08	10.78	26.0597	0.912	
7	0.60	7.00	62.83	10.74	26.0216	0.912	
8	0.60	6.98	62.87	10.66	25.9319	0.912	
9	0.60	7.00	63.41	10.66	25.9162	0.911	
10	0.60	6.95	62.56	10.76	26.0085	0.911	
11	0.60	7.00	62.97	10.02	25.1971	0.908	
12	0.60	6.96	64.27	10.83	25.8577	0.905	
13	0.60	7.06	63.88	11.81	26.7936	0.902	
14	0.60	6.99	61.95	11.96	26.9222	0.900	

Ek 20 Tavuk sternumundan GAG ekstraksiyonuna ait optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması

One-Sample Statistics				
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
deneyselsternum	5	25,5792	,46302	,20707

One-Sample Test						
	Test Value = 26.066					
					95% Confidence Interval of the Difference	
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Lower	Upper
deneyselsternum	-2,351	4	,078	-,48680	-1,0617	,0881

EK 21 Dana tendonundan GAG ekstraksiyonuna ait optimizasyon için belirlenen ardışık kareler toplamı

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob> F	
Mean vs Total	39.93	1	39.93			
Linear vs Mean	0.54	4	0.13	0.75	0.5676	
2FI vs Linear	0.51	6	0.085	0.41	0.8661	
<u>Quadratic vs 2FI</u>	<u>3.82</u>	<u>4</u>	<u>0.95</u>	<u>100.47</u>	<u>< 0.0001</u>	<u>Suggested</u>
Cubic vs Quadratic	0.094	8	0.012	1.69	0.2508	Aliased
Residual	0.049	7	6.933E-003			
Total	44.94	30	1.50			

Ek 22 Dana tendonundan GAG ekstraksiyonuna ait yapılan optimizasyonun verim üzerindeki etkisini belirten istatistik sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	%GAG Verim			
		Hata Kareler Toplamı	Mean Square	F Value	p-değeri
Model	14	4.86	0.35	36.55	< 0.0001
A-Enzim Miktarı	1	0.27	0.27	28.51	< 0.0001
B-pH	1	0.15	0.15	15.97	0.0012
C-Sıcaklık	1	0.062	0.062	6.56	0.0217
D-Süre	1	0.051	0.051	5.36	0.0352
AB	1	0.067	0.067	7.02	0.0182
AC	1	0.22	0.22	22.75	0.0002
AD	1	0.067	0.067	7.02	0.0182
BC	1	0.13	0.13	13.58	0.0022
BD	1	0.022	0.022	2.36	0.1456
CD	1	6.617E-003	6.617E-003	0.70	0.4170
A ²	1	0.80	0.80	84.51	< 0.0001
B ²	1	1.42	1.42	149.50	< 0.0001
C ²	1	1.15	1.15	120.91	< 0.0001
D ²	1	1.99	1.99	209.38	< 0.0001
Kalıntı	15	0.14	9.498E-003		

Uyum Eksikliği	10	0.11	0.011	1.77	0.2739
Saf Hata	5	0.031	6.268E-003		
Toplam	29	5.00			

Ek 23 Dana tendonundan elde edilen GAG ekstraktlarına ait optimizasyon için belirlenen kriterler

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower weight	Upper weight	Importance
Enzim Miktarı	minimize	0.8	1.4	1	1	3
pH	in range	6.5	7.5	1	1	3
Sıcaklık	in range	60	70	1	1	3
Süre	minimize	10	20	1	1	3
%GAG miktarı	maximize	0.6957	1.97	1	1	5

Ek 24 Dana tendonundan elde edilen GAG ekstraktlarına ait optimizasyon çözümler

No	Enzim Miktarı	pH	Sıcaklık	Süre	%GAG	Desirability	
1	0.80	7.02	63.20	10.89	1.72368	0.884	Selected
2	0.80	7.01	63.22	10.93	1.72632	0.884	
3	0.80	7.02	63.14	10.89	1.72332	0.884	
4	0.80	7.03	63.22	10.77	1.71553	0.884	
5	0.80	7.01	63.07	10.73	1.71226	0.884	
6	0.80	7.02	63.48	10.86	1.72077	0.884	
7	0.80	7.01	62.95	10.72	1.71112	0.884	
8	0.80	7.03	63.19	11.15	1.74017	0.884	
9	0.80	7.05	63.45	10.88	1.72135	0.884	
10	0.80	7.05	63.41	10.90	1.72435	0.883	
11	0.80	7.04	62.92	11.23	1.74427	0.883	
12	0.80	6.88	62.31	10.70	1.69011	0.876	
13	0.80	6.90	60.21	10.56	1.62643	0.853	

Ek 25 Dana tendonundan GAG ekstraksiyonuna ait optimum noktada ortalama deneysel değerlerin modelden tahminlenen değerler ile karşılaştırılması

One-Sample Statistics				
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
deneysetendon	5	1,6780	,07855	,03513

One-Sample Test

	Test Value = 1.7237					
	t	df	Sig.(2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
deneyse tendon	-1,301	4	,263	-,04570	-,1432	,0518

