

T.C.  
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

PİYASADA SATILAN  
KOLAJEN HİDROLİZATLARININ  
*İN VİTRO* ORTAMDA BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN  
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Handan DOĞAN

İstanbul  
Mart - 2023

**T.C.**  
**İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI**

**PİYASADA SATILAN KOLAJEN HİDROLİZATLARININ**  
**İN VİTRO ORTAMDA BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN**  
**İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Handan DOĞAN**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Bülent NAZLI**

**İkinci Tez Danışmanı**  
**Doç. Dr. Mustafa YAMAN**

**İstanbul**  
**Mart - 2023**

## TEZ ONAYI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Bülent NAZLI

Üye Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN

Üye Dr. Öğr. Üyesi Halime PEHLİVANOĞLU

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Erhan İÇENER  
Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “**Piyasada Satılan Kolajen Hidrolizatlarının *İn Vitro* Ortamda Biyoerişilebilirliğinin İncelenmesi**” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

Handan DOĞAN

## ÖN SÖZ

Araştırmamdaki her türlü konuda yardımlarını esirgemeyen, yanında çalışmaktan mutluluk duyduğum, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, değerli tez danışmanlarım Doç. Dr. Mustafa YAMAN' a, ve Prof. Dr. Bülent NAZLI' ya, laboratuvar çalışmalarında her zaman destek olan Sayın Ömer Faruk MIZRAK' a, tez çalışmamın her aşamasında manevi destek ve moral kaynağı olan Kevser KUMRU' ya ve Can İLANLI' ya ve tüm dostlarıma, büyük fedakârlıklarla beni yetiştirip bu günlere getiren maddi, manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme teşekkürlerimi sunarım.

**Handan DOĞAN**

**İstanbul-2023**

**ÖZET**

**PİYASADA SATILAN KOLAJEN HİDROLİZATLARININ**  
***IN VITRO* ORTAMDA BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN**  
**İNCELENMESİ**  
**Handan DOĞAN**

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bülent NAZLI

İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa YAMAN

Mart, 2023 - 94 Sayfa

Kolajen hidrolizatının antioksidan, anti-hipertansif, antiosteoporotik, anti-tümör, anti-inflamatuar gibi birçok kanıtlanmış sağlık etkisi bulunmaktadır. Gıda takviyesi olarak kullanımı her geçen gün artan kolajen hidrolizatının biyoerişebilirliği, sağlık etkilerine sağladığı fayda açısından önemlidir. Biyoerişebilirliği yüksek kolajen hidrolizatının, gastrointestinal sistemden geçişleri sırasında sindirim enzimlerinin etkisine direnmesi, sağlığı teşvik edici özelliklerini sergilemek için hedef organlara bozulmamış ve aktif bir biçimde ulaşmak için bağırsak epitel bariyerini geçmesi gerekir.

Bu çalışmada piyasada satılan sığır, balık, tavuk ve yumurta kabuğu zarı kaynaklı kolajen hidrolizatı içeren toz, tablet ve sıvı formda tüketime sunulan 16 adet kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyesinin amino asit kompozisyonu ve *in vitro* ortamda biyoerişebilirlikleri incelenmiştir. Biyoerişebilirlik, mide ortamında pepsin ve bağırsak yolu boyunca pankreatin ve safra karışımı kullanılarak simüle edilen bir gastrointestinal sindirim sistemi hazırlanarak mide ve ince bağırsak dahil olmak üzere *in vitro* ortamda incelenmiştir. Kolajen hidrolizatı gıda takviyelerinde, *in vitro* sindirim öncesi ve sonrasında bulunan hidroksiprolin miktarları üzerinden kolajen hidrolizatı biyoerişebilirlikleri belirlenmiştir. Etiket üzerinde yazan kolajen hidrolizatı miktarları ile çalışmada bulunan kolajen hidrolizatı miktarları yüzde sapmaları değerlendirildiğinde, değerlerinin % 1.8 ±0.5 ile % 59.18 ±0.5 arasında değiştiği görülmüştür. Çalışmada incelenen 16 örnekten, 12 tanesi beyan edilenden daha düşük kolajen hidrolizatı içeriyorken, 4 tanesi ise etiket değerinden daha fazla kolajen hidrolizatı içerdiği bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre toz ve sıvı formda tüketime sunulan kolajen hidrolizatlarındaki kolajen miktarının, tablet formuna göre

önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir. İncelenen kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinin biyoerişilebilirliği %  $50 \pm 0.1$  ile %  $98 \pm 0.5$  arasında değişmektedir. Toz formda, sadece saf halde sığır ve balık kaynaklı kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinin biyoerişilebilirliği kıyaslandığında, balık kolajen hidrolizatının daha yüksek biyoerişilebilirlik oranı sağladığı görülmüştür. Toz formda, sığır kaynaklı saf kolajen hidrolizatı ile sığır kaynaklı multivitamin, mineral ve biyoaktif bileşikler içeren kolajen hidrolizatlarının biyoerişilebilirliği kıyaslandığında, multivitamin, mineral vb. biyoaktif bileşikler içeren gıda takviyelerinin daha yüksek biyoerişilebilirlik sağladığı görülmüştür. Hem tüketici hem de üretici nezdinde önemli veriler ortaya koyulmuştur.



**Anahtar Kelimeler:** Kolajen Hidrolizatı, Kolajen Gıda Takviyeleri, *In Vitro* Sindirim, Biyoyararlılık, Biyoerişilebilirlik

## ABSTRACT

# INVESTIGATION OF *IN VITRO* BIOACCESSIBILITY OF COMMERCIALY AVAILABLE COLLAGEN HYDROLYSATES

**Handan DOĞAN**

Master, Food Engineering

Thesis Advisor: Prof. Dr. Bülent NAZLI,

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa YAMAN,

March, 2023 – 94 Pages

Collagen hydrolysate has many proven health effects such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-hypertensive, anti-osteoporotic, and anti-tumor. The bio accessibility of collagen hydrolysate, which is used as a food supplement and increasing day by day, is important in terms of how much it is beneficial to the health effects. Collagen hydrolysate has high bioaccessibility, resisting the action of digestive enzymes during its passage through the gastrointestinal tract, and must pass through the intestinal epithelial barrier to reach target organs intact and actively to exert its health effects.

In this study, the amino acid composition and in vitro bioaccessibility of 16 collagen hydrolysate food supplements containing collagen hydrolysate from beef, fish, chicken, and eggshell membrane sold in the market, which are offered for consumption in powder-sachet, tablet and liquid form, were examined. Bioaccessibility was studied in vitro, including the stomach and small intestine, by preparing a simulated gastrointestinal digestive tract using a mixture of pepsin in the stomach phase and pancreatin and bile salts along the intestinal tract. In collagen hydrolysate food supplements, their bioaccessibility has been determined based on the amounts of tryptophan found before and after in vitro digestion. When the collagen hydrolysate amounts written on the label and the percentage deviations of the amounts in the study were evaluated, it was seen that their values ranged from %  $1.8 \pm 0.5$  to %  $59.18 \pm 0.5$ . Of the food supplements examined in the study, 12 were found to contain lower collagen hydrolysate than declared, while 4 contained more collagen hydrolysate than the label value. The bio accessibility of collagen hydrolysate food supplements ranges from

% 50 ±0.1 to % 98 ±0.5.

Overall, the bioaccessibility of collagen hydrolysate in food supplements in powder and liquid form yielded better results compared to the bioaccessibility of collagen hydrolysate in tablet form. Comparing the bioaccessibility of food supplements containing collagen hydrolysate of beef and fish origin in powder form, only in its pure form, it was seen that fish collagen hydrolysate provided a higher bioaccessibility rate. When the bioaccessibility of pure collagen hydrolysate of beef origin in powder form and collagen hydrolysates containing beef-derived multivitamin, mineral and bioactive compounds were compared, it was seen that food supplements containing bioactive compounds such as multivitamins, minerals, etc. provided higher bioaccessibility. Important data have been revealed in terms of both consumers and producers.



**Keywords:** Collagen Hydrolyzate, Collagen Food Supplements, *In Vitro* Digestion, Bioaccessibility, Bioavailability

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ .....	ii
ÖN SÖZ.....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
SEMBOLLER .....	xiii
KISALTMALAR .....	xiv
BİRİNCİ BÖLÜM .....	1
GİRİŞ .....	1
İKİNCİ BÖLÜM.....	6
LİTERATÜR TARAMASI .....	6
2.1. Kolajen.....	6
2.1.1. Kolajenin Moleküler ve Kimyasal Yapısı.....	6
2.1.2. Kolajen Çeşitleri ve Yapısı .....	8
2.1.3. Kolajen Biyosentezi .....	10
2.2. Kolajen Kaynakları .....	12
2.2.1. Domuz.....	12
2.2.2. Büyükbaş Hayvanlar.....	13
2.2.3. Deniz Kaynakları .....	13

2.2.4. KÜMES HAYVANLARI .....	15
2.3. KOLAJEN EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ.....	15
2.3.1. Ön İşlemler.....	16
2.3.2. Asit Ekstraksiyonu .....	16
2.3.3. Enzimatik Ekstraksiyon .....	17
2.3.4. Tuzla Çöktürme .....	17
2.3.5. Derin Ötektik Solvent Ekstraksiyonu .....	18
2.3.6 Ultrason Destekli Ekstraksiyon.....	18
2.3.7. Süperkritik Sıvı Ekstraksiyonu .....	19
2.4. KOLAJEN HİDROLİZATI.....	20
2.5. KOLAJEN HİDROLİZATININ AMİNO ASİT KOMPOZİSYONU .....	21
2.6. KOLAJEN HİDROLİZATLARININ VÜCUTTAKİ ETKİ MEKANİZMASI VE İNSAN SAĞLIĞINA ETKİLERİ.....	23
2.7. KOLAJEN HİDROLİZATLARININ KULLANIM ALANLARI .....	25
2.7.1. Gıda Takviyeleri .....	25
2.7.2. Gıda Sektörü .....	27
2.7.3. Kozmetik Sektörü .....	28
2.7.4. Biyomateryal Sektörü .....	29
2.8. KOLAJEN HİDROLİZATLARI İLE İLGİLİ DAHA ÖNCE YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR.....	29
2.9. Biyoerişilebilirlik ve Biyoyararlılık.....	31
<b>ÜÇÜNCÜ BÖLÜM .....</b>	<b>38</b>
<b>MATERYAL METOT.....</b>	<b>38</b>
3.1. Örneklem.....	38
3.2. Materyaller.....	40
3.3. Çözeltilerin Hazırlanması .....	41

3.4.1. Amino Asit Kompozisyonun Tayini.....	43
3.4.2. Kolajen Hidrolizatlarının Biyoerişilebilirliğinin <i>İn Vitro</i> Sindirim Modeli Kullanılarak Tayini.....	44
3.5. HPLC Koşulları: .....	45
3.6. İstatistiksel Analiz ve Hesaplama .....	45
<b>DÖRDÜNCÜ BÖLÜM .....</b>	<b>46</b>
<b>BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>46</b>
4.1. Kolajen Hidrolizatı Gıda Takviye Ürünlerinin Amino Asit Kompozisyonu ve Kolajen İçerikleri.....	46
4.2. <i>İn Vitro</i> Ortamda Biyoerişilebilirlik Analizleri .....	52
<b>BEŞİNCİ BÖLÜM .....</b>	<b>59</b>
<b>SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>59</b>
<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>65</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>80</b>

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 2. 1:</b> Farklı Yapılardaki Kolajen Tipleri Ve Dağılımları.....	9
<b>Tablo 2.2:</b> Sığır , Balık Ve Domuz Kaynaklarının 100 Gramdaki Aminoasit Kompozisyonu.....	22
<b>Tablo 3.1:</b> Kolajen Hidrolizatı Gıda Takviye Ürünleri Etiket Bilgisi.....	39
<b>Tablo 3.2:</b> Sindirilebilirlik Analizinde Kullanılan Ekipmanlar ve Markaları.....	40
<b>Tablo 3.3:</b> Analizde Kullanılan Kimyasallar.....	40
<b>Tablo 4.1:</b> Kolajen Hidrolizatı Gıda Takviyelerinin İçerdiği Amino Asit Kompozisyonu / 100 g.....	47
<b>Tablo 4.2:</b> Kolajen Hidrolizatı Gıda Takviye Ürünlerinde Etikette Beyan Edilen ve Analiz Sonucunda Bulunan Kolajen Hidrolizatı Değerleri ve Etikete Göre Sapma Oranları.....	48
<b>Tablo 4.3:</b> Kolajen Gıda Takviyelerinde Bulunan Kolajen Hidrolizatlarının Sindirim Öncesi, Sindirim Sonrası Miktarları ve Biyoerişilebilirlik Oranları.....	53

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 2.1:</b> Cilt ve Kolajenin Moleküler Yapısı .....	8
<b>Şekil 2.2:</b> Farklı Kolajen Türlerinin Mikroskop Altındaki Görüntüsü.....	8
<b>Şekil 2.3:</b> Farklı Kolajen Kaynaklarının Hidrolizi.....	12
<b>Şekil 2.4:</b> Kolajen Hidrolizatlarının Endüstriyel Üretim Süreci.....	20
<b>Şekil 3.1:</b> HPLC Cihazının Şematik Gösterimi.....	38
<b>Şekil 3.2:</b> Tez Çalışma Planı.....	43
<b>Şekil 4.1:</b> Amino Asit Standardının HPLC kromatogramı.....	49
<b>Şekil 4.2:</b> Toz Formdaki Kolajen Hidrolizatı Gıda Takviyeleri Arasında En Yüksek Ve En Düşük Kolajen Hidrolizatına Sahip Ürünlerin Amino Asit Kompozisyonun HPLC Kromatogramı.....	50
<b>Şekil 4.3:</b> Tablet Formdaki Kolajen Hidrolizatı Gıda Takviyeleri Arasında En Yüksek ve En Düşük Kolajen Hidrolizatına Sahip Ürünlerin Amino Asit Kompozisyonun HPLC Kromatogramı.....	50
<b>Şekil 4.4:</b> Sıvı Formdaki Kolajen Hidrolizatı Gıda Takviyeleri Arasında En Yüksek Ve En Düşük Kolajen Hidrolizatına Sahip Ürünlerin Amino Asit Kompozisyonun HPLC Kromatogramı.....	51

## SEMBOLLER

<b>%</b>	:Yüzde
<b>°C</b>	:Santigrat derece
<b>µg</b>	:Mikrogram
<b>G</b>	:Gram
<b>Mg</b>	:Milligram
<b>L</b>	:Litre
<b>ml</b>	:Mililitre
<b>M</b>	:Molar
<b>N</b>	:Normal

## KISALTMALAR

<b>CYS</b>	:Sistein
<b>EDTA</b>	:Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>EFSA</b>	:Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)
<b>FACIT</b>	:Kesintili Üçlü Sarmallı Fibril İlişkili Kolajenler
<b>FDA</b>	:Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (U.S.A. Food and Drug Administration)
<b>GLY</b>	:Glisin
<b>GRAS</b>	:Generally Recognized As Safe
<b>HCl</b>	:Hidroklorik Asit
<b>HPLC</b>	:Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>HYP</b>	:Hidroksiprolin
<b>kDA</b>	:Kilodalton
<b>LMW</b>	:Düşük Moleküler Ağırlık
<b>LYS</b>	:Lisin
<b>PRO</b>	:Prolin
<b>SFE</b>	:Süperkritik Sıvı Ekstraksiyonu
<b>TGK</b>	:Türk Gıda Kodeksi (Turkish Food Codex)
<b>UV</b>	:Ultraviyole
<b>VD</b>	:Ve diğerleri
<b>WHO</b>	:Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

# BİRİNCİ BÖLÜM

## GİRİŞ

Son yıllarda tüketiciler, sağlık ve güzelliklerini korumak, sağlıklı bir yaşam tarzını desteklemek ve yaşlanmanın etkilerini bilim tarafından desteklenen şekillerde hafifletmeye yardımcı olmak için doğal gıdalara, fonksiyonel yiyecek ve içeceklere ve gıda takviyelerine yönelmektedir. Fonksiyonel gıdalar, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesine (FDA) göre; özel besin unsurlarını önemli oranda içeren, yapısı ve vücuttaki fonksiyonu bilinen, besin bileşenlerinin yanı sıra sağlık açısından da yararlı olduğu ispatlanan gıdalar veya gıda bileşenleri olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca fonksiyonel gıdaların, FDA (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından kabul gören hastalık ve beslenme ilişkisi konularında kanıtlamış bilimsel çalışmaları olmalıdır (Gülmez ve Güven, 2005).

Aktif ve sağlıklı bir yaşam tarzı için popüler bileşen haline gelen kolajen, ekstrasellüler matriksi oluşturan yapısal proteinlerden en önemlisidir. İnsan vücudu tarafından sentezlenen ve vücudumuzun pek çok organında bulunan, vücudun toplam protein kütesinin yaklaşık %30'unu, derimizin %75'lik kısmını oluşturan uzun ve lifli bir proteindir. Esas olarak deri, kemikler, kan damarları, tendonlar, kas, kornea, bağlar ve dentin gibi çeşitli fibröz dokularda bulunur (Sharma, Poddar ve Sen, 2008). Vücuttaki kolajenin %80-90'ı Tip I, Tip II ve Tip III'ten oluşur. Vücutta en çok bulunan kolajen türü olan Tip I kolajen, kemiklerde, deride, tendonlarda ve organlarda yer almaktadır. Tip II kolajen, genellikle kırık yapılarında ve Tip III kolajen retiküler liflerde, kanda ve deride bulunur. Tip III kolajen ciltte, damar duvarlarında ve akciğer, karaciğer ve dalaktaki retiküler liflerde bulunur (Jafari vd., 2020). Kolajen, dokular arası yapıştırıcı, dayanıklılık sağlayıcı olarak görev yapan, insan vücudunda en bol bulunan önemli bir proteindir (Oğuz, 2002).

Kolajen, genç yaşlarda vücut tarafından üretilirken, zaman geçtikçe vücuttaki kolajen üretimi azalır. Vücudumuzdaki kolajenin 20 yaşından sonra her yıl %1 oranında kayba uğradığı; eksikliğinde ciltte kırışıklıklar, yaşlanma, kemik ve eklem problemleri, kemik erimesi vb. ciddi sağlık sorunlarının görüldüğü bildirilmiştir. Klinik çalışmalar 20 yaş üzeri kişilerin günlük beslenmesinde 10 gr kolajen hidrolizatı tüketmesini tavsiye eder (Bruyère vd., 2012).

Kolajen hidrolizatı bir diğeri değiş ile hidrolize kolajen veya kolajen peptitleri, sığır, domuz, balık ve tavuk deri ve kemiklerinden elde edilen kolajenin genellikle enzimatik, asidik veya bazik hidroliz yolu ile parçalanması sonucu meydana gelen düşük moleköl ağırlıklı, suda çözünen bir protein hidrolizatıdır. Düşük moleköl ağırlıklı (LMW) peptidler, daha yüksek biyoerişilebilirlik göstermeleri sebebiyle tercih edilir. Ayrıca balık kaynaklı kolajen hidrolizatlarının biyoyararlılık değerinin sığır ve domuz kaynaklardan elde edilen kolajen hidrolizatına göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Hong vd., 2019; Yetim, 2011).

Kolajen hidrolizatı, globalde gıda güvenliği alanında yetkin otorite olarak kabul gören EFSA (European Food Safety Authority) ve FDA (U.S.A. Food and Drug Administration) tarafından, güvenli kabul edilmiş, GRAS (Generally Recognized As Safe) olarak tanımlanmıştır (European Food Safety Authority (EFSA), 2011). Alerjen riski taşımayan kolajen hidrolizatının, Türk Gıda Kodeksi (TGK) Takviye Edici Gıdalar Tebliğine göre gıdalarda kullanımı uygundur (Anonim, 2023).

Kolajen hidrolizatlarının, antioksidan, antiinflamatuvar, antihipertansif, antitümör, antiosteoporotik gibi sağlığa yararlı birçok etkisi bulunmaktadır (Song ve Li, 2017). Kolajen hidrolizatı çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanışlı ve uyumlu biyomateryallerden biri olarak görülmektedir (Lafarga ve Hayes, 2014). Yapılan klinik çalışmalara göre kolajen hidrolizatının, kemik yoğunluğunu önemli düzeyde arttırdığı, kemik ve eklemleri koruyup, güçlendirdiği ve cilt sağlığını iyileştirdiği gözlenmiştir (Bruyère vd., 2012).

Fonksiyonel bir bileşen olan kolajen hidrolizatı, son yıllarda özellikle gıda takviyesi olarak kullanılmaya ve gıdalara ve diğeri ürünlere fonksiyonel özellik kazandırmak amacıyla katılmaya başlanmıştır; gıda, kozmetik, biyomedikal, nutrasötik, farmasötikal alanlarında kullanılan popüler bir bileşen haline gelmiştir. Küresel kolajen pazarı, kolajen hidrolizatlarının sağlık yararına yönelik farkındalığın artmasıyla ilerlemiştir. Vucudumuzda, yaş alımı ile kolajen sentezinin azalması ve kalitesinin düşmesi sonucunda ortaya çıkan eksikliklerin ve olumsuzlukların giderilmesi amacıyla kanıtlanmış sağlık etkileri sebebiyle kolajen hidrolizatlarının kullanımı önem kazanmıştır.

Kolajen hidrolizatı yutulduktan sonra, gastrointestinal sistemden geçişi sırasında sindirim enzimlerinin etkisine direnmesi ve sağlığı teşvik edici özelliklerini sergilemek için hedef organlara bozulmamış ve aktif bir biçimde ulaşmak için bağırsak

epitel bariyerini geçmesi gerekir (Fitzgerald, Murray ve Walsh, 2004). Son çalışmalar ile gıdalarla alınan besin öğelerinin tamamının biyolojik olarak kullanılmadığı ortaya konmuştur. Bu nedenle günümüzde biyoerişilebilirlik ve biyoyararlılık kavramları, dünya genelinde önem teşkil eden bir konu haline gelmiştir.

Bir besin bileşeninin biyoyararlı olması için ilk şart biyoerişilebilir olmasıdır (Rodriguez-Roque vd., 2014). Bu çerçevede biyoerişilebilirlik, kolajen hidrolizatının ne kadar erişilebilir olduğunu, gıda matrisinden ne ölçüde serbest bırakıldığını, taşındığını ve kan dolaşımına emildiğini ifade eder. Diğer bir tanımla biyoerişilebilirlik, gıdanın sindirilmesi ile alınan bileşiğin, metabolik ve fizyolojik fonksiyonlar için kullanılan veya depolanan kısmı olarak tanımlanır. Kısaca biyoerişilebilirlik gıdada bulunan bileşiğin sindirim sisteminde emilen miktarıdır. Biyoyararlılık ise bir gıda ürünüde bulunan bileşenin vücudumuzda sindirildikten sonra fizyolojik fonksiyonlara katılması için kullanılan yada depolanan miktarın başlangıç değerine oranı şeklinde ifade edilebilir (Fairweather-Tait, 1995). Biyoerişilebilirlik hem beslenme modelinden hem de onunla ilişkili faktörlerden etkilenir. Biyoerişilebilirlik, gıdanın fiziksel özelliği, kimyasal bileşimi ve bireysel sindirim kapasitesi gibi birçok nedene bağlı olarak değişir (Sandström, 2001).

Biyoerişilebilirlik konusunda yapılan araştırmalarda, besin maddelerinin biyoerişilebilirliği ve dolayısıyla biyoyararlılığı belirlenirken genellikle *in vivo* veya *in vitro* yöntemler kullanılmaktadır (Schumann vd., 1997). *In vivo* olarak yapılan bu çalışmaların, etik olarak sorun yaşanması, zaman alan, yoğun, maliyetli, karmaşık ve çalışılan numune sayısının sınırlı olduğu çalışmalardır. *In vitro* yöntemler çok sayıda numunenin basit, hızlı, ekonomik ve tekrarlanabilir şekilde analiz edilebilmesini sağlar (Capanoğlu vd., 2008). Biyoyararlılık ile ilgili *in vitro* çalışmalarda kesin sonuç alınabilmesi için, *in vivo* deneylerle doğrulanması önerilir (Bouayed vd., 2011). Literatür çalışmalarında, *in vitro* sindirim ortamında yapılan biyoerişilebilirlik çalışmalarından elde edilen verilerin, *in vivo* çalışmalarla karşılaştırma yapıldığında aralarında bir korelasyon bulunduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle hızlı, kolay ve güvenli sayılan *in vitro* metotların kullanımını artmıştır (McDougall vd., 2005). *In vitro* sindirim yöntemlerinin sahip olduğu avantajlar nedeniyle tez çalışmasında *in vitro* sindirim yöntemi uygulanmıştır.

Kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinin biyoerişilebilirliği ne kadar fazlaysa, o kadar verimli bir şekilde emilir ve çeşitli sağlık faydalarını tetikler. Bu nedenle

biyoerişilebilirlik, hem üretici hemde tüketici için çok önemli bir özelliktir. Biyoerişilebilirliği zayıf bir kolajen hidrolizatı, tüketiciye yüksek maliyet ve düşük fayda sunar. Yüksek biyoaktivite sağlamak için, kolajen hidrolizatının hedef dokulara mümkün olunca verimli bir şekilde ulaşması, yüksek oranda biyoerişebilir olması esastır. Son zamanlarda yapılan biyoerişilebilirlik ve biyoyararlılık çalışmalarında, her bileşenin bulunduğu gıda matrisinin biyoerişilebilirliğin farklı olduğu görülmüştür. Ayrıca, kolajen hidrolizatının alım dozunun, cinsiyet farklılıklarının, beslenmenin, genetik özelliklerin ve tüketilen üründeki diğer bileşenlerin gastrointestinal sistemde emilimi ve biyoerişilebilirliği etkilediği ortaya koyulmuştur. Kolajenin elde edildiği kaynağa göre farklı amino asit kompozisyonu içermesi ve düşük molekül ağırlığı, kolajen hidrolizatına ilave edilen multivitamin/mineral ve biyoaktif bileşikler biyoerişilebilirliği etkilenen en önemli unsurların başında gelmektedir. Bu nedenle kolajen hidrolizatları saf içerikte satılmakla birlikte multivitamin, multimineral ve biyoaktif bileşikler eklenerek biyoyararlılığı ve fonksiyonel özellikleri artırılmaya çalışılmaktadır.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında, Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı ve Amerikan Gıda Veri Tabanı örneklem planı kuralları referans alınmıştır (Yaman vd., 2015). İstanbul'da farklı ilçelerdeki eczanelerde satışa sunulan, farklı kaynaklardan (sığır, balık, tavuk, yumurta kabuğu zarı) elde edilen kolajen hidrolizatlarını içeren 16 farklı gıda takviyesi temin edilmiştir. Bunlar, 7 adet toz formda, 4 adet tablet formda, 5 adet sıvı formda kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürünleridir. Öncelikle literatür araştırmaları yapılmış ve literatür çalışması sonucunda, kolajenin genel olarak kimyasal yapısı, çeşitleri, kaynakları, ekstraksiyon yöntemleri, kullanım alanları, sağlık üzerine etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmada incelenen gıda takviye ürünlerinin amino asit kompozisyonları ve içerdiği kolajen miktarını belirlemek amacıyla hidroksiprolin miktarları belirlenmiştir. Üründe bulunan kolajen miktarının, etikette belirtilen miktarlar ile uyumluluğu gözlemlenmiş, farklı kaynaklardan elde edilen ve farklı formlarda tüketime sunulan kolajen hidrolizatlarının biyoerişilebilirliği, gastrointestinal sistemde meydana gelen fizikokimyasal ve biyokimyasal değişiklikleri simüle eden *in vitro* gastrointestinal sindirim prosedürü ile değerlendirilmiş, analizler uygun HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) yöntemi ile analiz edilmiş, sonuçlar istatistiksel analiz ile ortaya konulmuştur.

Yapılacak olan bu çalışma ile piyasada satılan ve yaygın olarak tüketilen kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinin amino asit kompozisyonunun ve *in vitro* ortamda biyoerişilebilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Literatürde kolajen hidrolizatının biyoerişilebilirliğinin ve biyoyararlılığının *in vitro* koşullarda mide ve bağırsak sindirimi ile belirlenmesi ile ilgili çalışma sayısı sınırlıdır. Ülkemizde de kolajen hidrolizatlarının *in vitro* ortamda gastrointestinal sindirim modeli ile biyoerişilebilirliğinin belirlenmesi konulu herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ileride yapılacak diğer *in vitro* ve *in vivo* koşullarında kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinin biyoerişilebilirliğinin değerlendirilmesi ile ilgili pek çok çalışmaya da ışık tutacak, yeni araştırmaların yapılmasını teşvik edecektir.



# İKİNCİ BÖLÜM

## LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Kolajen

Kolajen, Yunanca yapıştırıcı anlamına gelen "colla" ve üretmek anlamına gelen "gen" kelimelerinden türetilmiştir. Yapışkandan üretilmiş anlamına gelmektedir. Tarihte ilk olarak bağ dokusunu tanımlamak için kullanılmıştır. Kolajen, tüm hayvanlarda yüksek miktarda bulunan yapısal bir proteindir (Sharma, Poddar ve Sen, 2008).

Kolajen, ekstrasellüler matriksi oluşturan en önemli yapısal proteindir. Vücudumuzdaki proteinlerin yaklaşık %25'ini ve derimizin %75'ini oluşturan kolajen, önemli bir proteindir. Kemik dokusu ağırlığının %70'ini mineral faz oluştururken, %30'unu organik matriks oluşturmaktadır. Kolajen, hücrelerin arasında bulunur, hücre aralarını doldurarak destek görevi gören kompleks bir yapıdır (Nomura vd., 2005).

#### 2.1.1. Kolajenin Moleküler ve Kimyasal Yapısı

Kolajen üçlü heliksi 1954 yılında Kartha ve Ramachandran fiber kırınım verilerine göre 'Madras Heliksi' olarak adlandırmıştır. 1955 yılında Crick, North, Rich ve arkadaşları tarafından bu yapı düzenlenmiştir, günümüzde kabul gören üçlü sarmal yapı ortaya koyulmuştur (Jain vd., 2014).

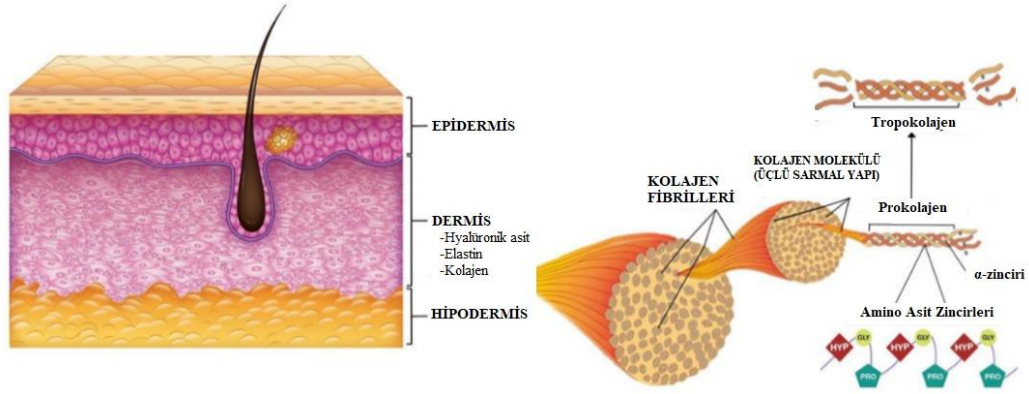
Önemli bir protein olan kolajen, özel bir amino asit bileşimine sahip olmasıyla diğer proteinlerden farklılaşır (Lodish vd., 2000). Kolajen molekülü, sarmal yapıdaki üç polipeptit zincirden meydana gelmiştir. Kolajen molekülünün üçlü sarmalını, polipeptit alt birimleri olan  $\alpha$ -zincirler oluşturur. 2 adet  $\alpha$  zinciri,  $\beta$ -peptit zinciri olan bir peptit zincir dimerine dönüşür ve 3 adet  $\alpha$  zinciri,  $\gamma$ -peptit zinciri (tropokolajen molekülü) olarak bilinen peptit zincir trimerine dönüşmektedir (Yang ve Shu, 2014). Yaklaşık 100 kDa'lık moleküler ağırlığa sahip her bir peptit zinciri, 1.5 nm çapında ve ortalama 300 nm uzunluğundadır. Kolajen molekülü karakteristik özellik olarak üçlü bir sarmal yapıda, birbirinin etrafında sarılmış 1050 aminoasit kalıntısı içermektedir (Lodish vd., 2000). Peptit zincirlerinde her üç aminoasitten bir tanesinin glisin (GLY) olması üçlü sarmal yapının oluşması açısından önem arz eder ve bu durum kolajen molekülünün karakteristik özelliği olmasını sağlar. Peptit zincirlerinin genel aminoasit dizilimi GLY-X-Y şeklindedir ve bu amino asit diziliminde X genellikle prolin (PRO)

ve Y genellikle PRO'in hidroksillenmiş hali olan hidroksiprolin (HYP) olmaktadır (Brinckmann, 2005). X ve Y pozisyonunda, triptofan (TRP) ve sistein (CYS) hariç DNA tarafından kodlanan diğer 16 aminoasitten herhangi biri bulunabilir. Kolajenin yapısında triptofan ve sistein bulunmamaktadır (Fratzl, 2008).

Kolajenin sarmal yapısını alanin, asparajin, histidin, glutamin, fenilalanin, lösin, metiyonin ve tirozinden oluşmaktadır. Yan zincirler büyük boyuta sahip olması sebebiyle izolösin ve valin  $\alpha$ -sarmalının kararlı yapısına katılamaz. Kolajen sarmalının düzenli yapısı prolin, hidroksiprolin, treonin, serin tarafından bozulmaktadır (Włodarczyk vd., 2017).

Kolajen yaklaşık %35 Glisin, %11 Alanin, %21 Prolin ve %12 Hidroksiprolin içerir. Kolajen, oransal olarak PRO ve HYP içeriği ile diğer proteinlerden ayrılmaktadır. Kolajenin toplam PRO ve HYP oranı kolajenin elde edildiği kaynağa göre değişkenlik gösterebilir. Hidroksiprolin, kolajenin amino asit karakteristiğini ve kolajenin termal stabilitesini belirler. Hidroksiprolin miktarı, kolajenin kantitatif tayininde kullanılarak kolajen miktarı hakkında bilgi verir (Berillis, 2015).

Hidrojen bağları kolajenin oluşmasında önemli rol oynar ve bir alfa zincirinde bulunan GLY'nin amino grubu ile komşu alfa zincirinde 'X' pozisyonunda bulunan aminoasidin karboksil grubu arasında yer almaktadır. Alfa zincirler arasındaki hidrojen bağlarının yanı sıra, su ile yapılan hidrojen bağları kolajenin yapısı açısından önemlidir. 'X' ve 'Y' pozisyonundaki aminoasitlerin yan zincirleri kolajen molekülünün merkezine göre dışa dönük haldedir. Yan zincirlerdeki bazik ve asidik gruplar ve aminoasitlerin yan zincirleri arasındaki iyonik etkileşimler kolajen fibrillerinin oluşmasında rol oynamaktadır (Brinckmann, 2005). Kolajen molekülü sarmalları arasında değişken miktarda kovalent çapraz bağlanma mevcuttur (Berillis, 2015). Cilt ve kolajenin molekül yapısına genel bakış Şekil 2.1'de gösterilmektedir (Tang, 2017;2021).

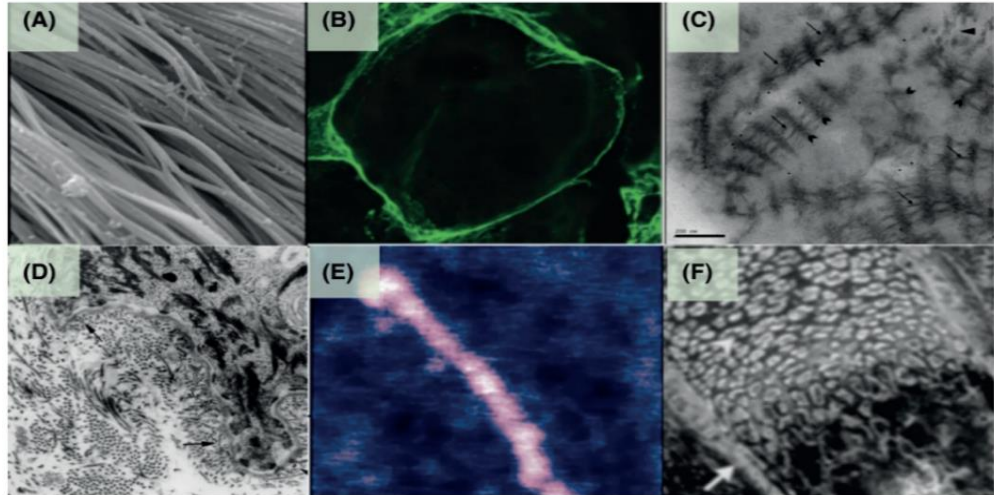


**Şekil 2.1: Cilt ve Kolajenin Moleküler Yapısı**

**Kaynak:** (Tang, 2017;2021)

### 2.1.2. Kolajen Çeşitleri ve Yapısı

Omurgalılarda en az 46 farklı polipeptit zincirinden oluşan, 28 farklı Tip kolajen tanımlanmaktadır (Sharma, Poddar ve Sen, 2008). Kolajenin üç boyutlu organizasyonu ve yapısı temel alınarak gerçekleştirilen sınıflandırmada kolajenler; ağ oluşturuç kolajenler, fibril oluşturan kolajenler, FACIT kolajenler, transmembran kolajenler, ankraj fibrilleri, bazal membran kolajenler, mütipleksin kolajenler ve mikrofibriler kolajenler olarak gruplandırılmıştır (Gelse, 2003). Şekil 2.2'de farklı kolajen yapılarına ait kolajen tiplerinin mikroskop altındaki görüntüleri görülmektedir.



**ŞEKİL2.2: Farklı Kolajen Türlerinin Mikroskop Altındaki Görüntüsü:**

A- Fibril Oluşturan Kolajenler(Tip I), B- Bazal Membran Kolajenler(Tip IV), C- Mikrofibriler Kolajenler(Tip VI), D- En yaygın bağlayıcı Fibriller Kolajenler(Tip VI), E- FACIT Kolajenler(Tip XIII), F- Transmembran Kolajen (Tip XIII)

**Kaynak:** (Musayeva, Özcan ve Kaynak, 2022)

Vücuttaki kolajenlerin %80-90'ı Tip I, Tip II ve Tip III kolajendir. Diğer kolajen tipleri ise özellikle kornea, akciğer, kalp kası, bazal membran, bağırsak mukozası vb. spesifik organlarda çok düşük miktarlarda bulunmaktadır (Schmidt vd., 2016). TIP I kolajen, en bol bulunan kolajen tipidir (Gelse vd., 2003). Bağ dokusunun temel hücreleri olan fibroblast hücrelerinde kolajen sentezi gerçekleşir (Wu vd., 2018). Tablo 2.1'de farklı sınıf ve yapıdaki kolajen tipleri ve dağılımları gösterilmektedir (Gelse vd., 2003).

**Tablo 2.1: Farklı yapılardaki kolajen tipleri ve dağılımları**

<b>Familya</b>	<b>Kolajen Tipi ve Bulunduğu Hücre</b>
<b>Fibril Oluşturan Kolajenler</b>	TIP I: deri, tendonlar, ligamentler, kemik yapısı
	TIP II: kıkırdak yapısı, nükleus pulposus, camsı cisim
	TIP III : deri, retiküler lif
	TIP V: saç, akciğer, kornea, plasenta,
	TIP XI: eklem kıkırdağı, camsı cisim
<b>Ağ Oluşturucu Kolajenler</b>	TIP VIII: endotel hücreleri
	TIP X: kıkırdak yapısı
<b>FACIT Kolajenler</b>	TIP IX: kornea, kıkırdak yapısı, camsı cisim
	TIP XII: tendonlar, perikondrium, ligamentler,
	TIP XIV: deri, tendonlar, plasenta, akciğer
	TIP XIX: rabdomiyosarkom hücresi
	TIP XX: embriyonik deri, sternal kıkırdak, tendonlar
<b>Transmembran Kolajenler</b>	TIP XXI: kan damarı duvarı
	TIP XIII: deri, saç, endomisyum
<b>Ankraj Fibriller</b>	TIP XVII: dermal - epidermal eklemler
	TIP VII: oral mukoza, deri
<b>Bazal Mebran Kolajenler</b>	TIP IV: bazal membran
<b>Mikrofibriler Kolajenler</b>	TIP VI: deri, omurlar arası disk, kıkırdak, plasenta
<b>Multipleksin Kolajenler</b>	TIP XV: böbrek, fibroblastlar, kas hücreleri
	TIP XVI: fibroblastlar, amniyon sıvısı, keratinositler
	TIP XVIII: akciğer, karaciğer

**Kaynak:** (Gelse vd., 2003)

Kolajen türleri karakteristik üçlü sarmala sahip olmakla birlikte, sarmal olmayan kısmın büyüklüğü, sarmalın uzunluğu ve yapısı türe göre değişmektedir (Miller, 1984). Kolajen tipleri arasında en yaygın 4 tanesi şunlardır:

**Tip I kolajen**, en dayanıklı ve insan vücudunda en çok bulunan kolajendir. İki eşdeğer  $\alpha 1$  ve bir  $\alpha 2$  zincirinden oluşmaktadır. Başlıca deri, kemik, ligamentlerde, tendon ve

bağ dokusunda bulunmaktadır (Krishnamoorthi, 2017). Vücuttaki kolajenin %90'ı TIP I kolajendir, bunu TIP II ve TIP III kolajen izlemektedir. TIPI kolajen, hemen hemen tüm bağ dokularında yaygın olarak bulunmaktadır (Cheah, 1985).

**Tip II kolajen**, kıkırdak dokusunda bulunan başlıca kolajendir. Üç  $\alpha 1(II)$  zincirinden oluşmaktadır. Kıkırdaktaki toplam proteinin %90-95'ini oluşturarak, etki mekanizması itibariyle romatoid artrit ve osteoartrit gibi eklem ve kemik hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Bruckner ve Van der Rest, 1994; Eyre, 2001; Gelse vd., 2003).

**Tip III kolajen**, ekstraselüler matrisin temel bileşenidir, ağ yapılı liflerden ve üç  $\alpha 1(III)$  zincirinden oluşmaktadır. Genellikle TIPI kolajen ile beraber bulunmaktadır. Cildin sıkılığını ve elastikiyetini sağlayarak, deri ve retiküler lifte bulunmaktadır (Liu vd., 2001).

**Tip V:** Saç, kornea, hücre yüzeyleri ve plasentanın yapısında bulunur (Gelse vd, 2003). Tip V kolajen çoğunlukla Tip I kolajen ile birlikte kemikte, akciğerde, korneada, fetal membranda bulunur (Birk vd., 1988; Chanut-Delalande vd., 2001).

### 2.1.3. Kolajen Biyosentezi

Kolajen biyosentezi, bir çok aşamadan oluşan, karmaşık ve birçok modifikasyonu içinde barındıran önemli bir süreç olarak görülmektedir (Prockop ve Kivirikko, 1995; Myllyharju ve Kivirikko, 2004). Kolajen molekülleri, fibroblast hücrelerinden salgılanarak; cilt, kemik, eklem ve tendonların işlevsel bütünlüğünü sağlayan karakteristik iplikçiklere dönüşür. Kolajen biyosentezi esnasında insan vücudunda ilk olarak, biyosentetik bir başlangıç maddesi olan prokolajen meydana gelmektedir. Prokolajen özel enzimler aracılığıyla yıkıma uğrar ve kolajeni meydana getirir (Budavari, O'Neil, Smith, Heckelman, 1989).

Kolajen biyosentezi;

1. Pro  $\alpha$ -zincirlerin oluşması (propeptid ve preprokolajen),
2. Hidroksilasyon ve Glikolizasyon aşaması,
3. Prokolajen oluşumu
4. Üçlü sarmal yapının oluşması,
5. Sekresyon (Hücre dışına salgılanma)

6. Tropokolajen oluşumu,

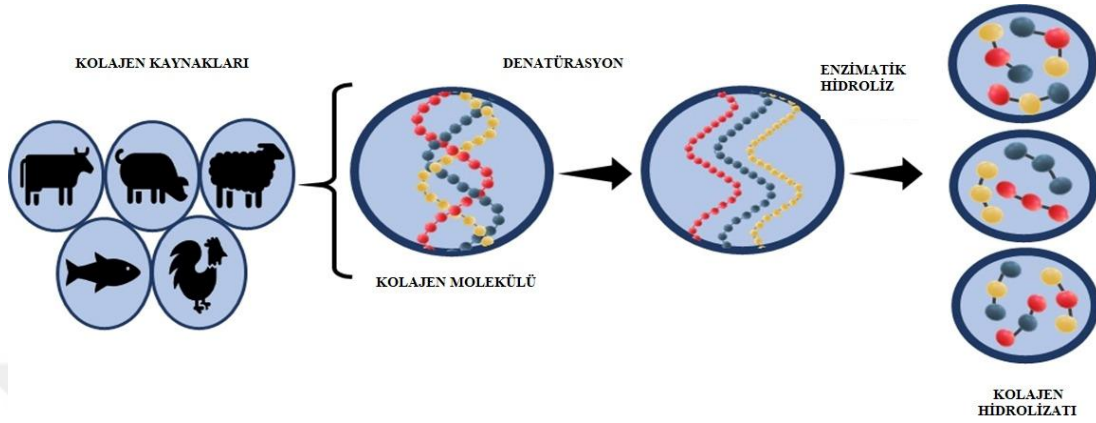
7. Kolajen fibrillerinin ve kolajen fiberlerinin oluşumu aşamalarından oluşur (Friess, 1998; Engel ve Bächinger, 2005; Eyre ve Wu, 2005)

Kolajen sentezinin düzenlenmesi ve arttırılması amacıyla cildin kendini yenileme ve cilt sorunlarının iyileştirilmesi sürecine yardımcı olan çeşitli etkin maddeler ve sistemler yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Bu madde ve sistemlerden en çok araştırılanlar, vitamin C, vitamin A, östrojen, retinoidler, asiatic,  $\beta$ -glukanlar, glikolik asitler, lipozomal sistemler ve MMP inhibitörleri olarak sıralanmaktadır. Fibroblast kültürlerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda kolajen sentezini uyaran diğer maddelerden bazıları, bleomisin, tripeptit bakır kompleksi, fenitoin, arekaidin, arekolin, dönüştürücü (transforming) büyüme faktörü  $\beta$ 22, ve forskolin olarak belirlenmiştir (Yener ve Sedef, 2015).

Kolajen sentezinde önem arz eden C vitamini (askorbik asit) eksikliğinde, ilk fazları hasarlı kolajen sentezine bağlı oluşan skorbit hastalığı meydana gelmektedir (Thomas, 1997). Kolajenin moleküler kararlılığı açısından hidroksiprolin ve hidroksilizin gereklidir. Bu aminoasitlerin, enzimler katalizörlüğünde gerçekleşen sentezler esnasında, demir iyonları, oksijen ve alfa ketoglutarat maddelerinin yamsıra, C vitamini varlığına da ihtiyaç duyulur. Hidroksiprolin içermeyen kolajen polipeptidlerin üretilmesi sonucu dayanıksız kolajen molekülleri oluşmaktadır (Lupo, 2001; Nicolaidou ve Katsambas, 2000; Nusgens vd., 2001). Bazal kolajen düzeyleri ve kolajen biyosentezi bireylerin yaşı ile ters orantılıdır. Ayrıca askorbik asitin kolajen sentezi üzerindeki olumlu etkisi yaştan bağımsız gelişmektedir (Phillips vd., 1994). Yapılan çalışmalar askorbik asidin kolajen sentezinde görev aldığını ortaya koymuştur. Kolajen molekülünün gerçek özelliğini gösterebilmesi için bileşimindeki lizin ve prolin aminoasitlerinin hidroksillenmesi gerekmektedir. (Baysal, 2017). Bu bağlamda C vitaminide fibroblastlarda, osteoblastlarda ve kondrositlerde prolin ve lizin hidroksilasyonunda kofaktör olarak görev alır (Ross, vd., 2012). C vitamini yetersizliğinde prolin ve lizin aminoasitlerinin hidroksilasyonu azalır, bunun sonucu olarakta kolajenin sentezi azalır (Türközü, 2014).

## 2.2. Kolajen Kaynakları

Ticari kolajen ekstraksiyonunda en sık kullanılan hammaddelerin başında, sığır, domuz, balık, tavuk ve bunların; deri, kıkırdak, kemik ve tendonları gelmektedir. Şekil 2.3' de farklı kolajen kaynaklarının hidrolizi gösterilmektedir.



**Şekil 2.3: Farklı kolajen kaynaklarının hidrolizi**

**Kaynak:** (Leon-López, vd., 2019)

İnsanlar için tehdit oluşturan şap hastalığı (FMD), bulaşıcı süngerimsi ensefalopati (TSE) başta olmak üzere deli dana hastalığı (BSE) gibi hastalıkların ortaya çıkması ve dini kısıtlamalar nedeniyle araştırmacılar daha güvenilir alternatif kolajen kaynakları arayışı içindedirler.

### 2.2.1. Domuz

Domuzun kemikleri ve derisi de kolajen kaynağı olarak kullanılır. Bu kaynaklar büyük ölçüde endüstriyel amaçlar için kullanılmaktadır. Bu kaynaklardan elde edilen kolajen, insanlardan elde edilen kolajene benzerdir, bu nedenle herhangi bir alerjik tepkiye neden olmadığı için güvenli kabul edilir. Yetişkin domuz dermisi ve ince bağırsak mukozası tendon güçlendirme, plastik ve rekonstrüktif cerrahi, cilt ve yara iyileşmesi amacıyla kullanılmaktadır (Yazaki, 2017). Hayvansal hastalık bulaşma riski taşıması ve domuz ürünlerinin Müslüman ve Yahudi toplulukları tarafından yasaklanmış olması nedeniyle domuzdan elde edilen kolajen hidrolizatlarının tüketimi kısıtlanmıştır.

### **2.2.2. Büyükbaş Hayvanlar**

İnek, öküz, manda ve sığır gibi büyükbaş hayvanların kemikleri ve derileri endüstriyel kolajenin ana kaynaklarıdır. Ticari kolajenin büyük bir kısmı sığır derisinden üretilmektedir, ülkemizde de sadece sığır kaynaklı kolajen peptitlerin üretimi yapılmaktadır. Son zamanlarda, manda derisinden ekstrakte edilen kolajen; ilaç, yara pansuman sistemi ve doku mühendisliği gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır.

Farklı dokulardan elde edilen hidrolize sığır kolajeni, antimikrobiyal, antioksidan ve antihipertansif aktiviteler gösterir. Sığır akciğerinden hidrolize kolajen ayrıca antiinflamatuvar ve antioksidan aktiviteler göstermiştir (Ahmed vd., 2020).

Büyükbaş kaynaklarının yan ürünlerinden elde edilen kolajen hidrolizatlarının, şap hastalığı (FMD), bulaşıcı süngerimsi ensefalopati (TSE) ve sığır süngerimsi ensefalopati (BSE) gibi çeşitli hastalıkları taşıma ihtimali, helal kesim olmama ve inanca dayalı kısıtlamalar gibi problemler nedeniyle kullanımı kısıtlanmaktadır. Sığır kolajeni kullanılmalarının bir diğer nedeni de popülasyonun yaklaşık %3'ünün buna alerjisinin olmasıdır. Sığır kolajenine bağlı alerjik reaksiyonlar, aşırı duyarlılık, konjonktival ödem, periküler anjiyoödem ve boğaz anjiyoödemdir. Tüm bunlar, soldukları, yutuldukları veya topikal olarak uygulandıkları kolajen havasına karşı Ig-E aracılı inflamatuvar reaksiyonlardır. Bu sorunların üstesinden gelmek için daha güvenli kolajen kaynaklarına ihtiyaç vardır (Ahmed vd., 2020).

### **2.2.3. Deniz Kaynakları**

Son yıllarda yapılan araştırmalarda balık atıkları kolajen hidrolizatı eldesi için alternatif ve güvenenilir bir kaynak olarak görülmüştür. Hayvansal kaynaklardan kolajen ekstraksiyonu zor, zaman alan ve pahalı bir prosestir. Olumsuz enflamatuvar ve immünolojik yanıt ve kara hayvanlarında sağlık komplikasyonlarına neden olan çeşitli hastalıkların yaygın olması konusundaki endişeler, araştırmacıları deniz kaynaklarına yönlendirmiştir (Dun vd., 2008).

Her geçen gün deniz balıkçılığının ve yetiştirme balıkçılığın sayısı artış göstermektedir. Dünya genelinde su ürünlerinin işlenmesiyle yaklaşık olarak yıllık 200 milyon ton atık ortaya çıkmaktadır ve bu atıkların uygun şekilde değerlendirilmesi sağlanamamaktadır (Pal ve Suresh, 2016). Tüketilen su ürünlerinin %20-50'si yenilebilir kısım, kalan kısımlar ise atıktır. Balık atıkları (balık pulu, derisi vb.) yüksek

protein içermesine rağmen atık olarak çevreyi kirletmekte veya balık yemi, balık unu vb. katma değeri düşük ürünlerde değerlendirilmektedir.

Balık atıklarında önemli miktarda protein bulunduğu bildirilmektedir. Balıktaki deri, pullar ve balık kemiği çok iyi bir kolajen kaynağıdır. Bu atıkların değerlendirilmesi ile ucuz kolajen hidrolizati sağlanabilir (Srikanya vd., 2017).

Dünyada deniz kaynaklarından kolajen elde edilmesi yaygın bir durumdur, ülkemizde henüz balık kolajen hidrolizati üretimi yapılmamaktadır. Bu kadar değerli bir proteinin katma değeri yüksek ürünlerde kullanılması ülke ekonomisi açısından da önemlidir. Balık yan ürünleri, vücudumuzda en bol bulunan protein olan Tip I kolajen kaynağıdır. Balık yan ürünlerinden kolajen hidrolizati elde etme oranı uygulanan üretim metoduna, mevsime, balık türüne göre farklılık gösterir. Balık kaynaklı kolajen hidrolizati, sığır kaynaklı kolajen hidrolizatına alternatif bir hammadde olarak kullanılabilir. Böylelikle biyoatık olarak değerlendirilemeyen, büyük ölçüde çevre kirleticisi olarak karşımıza çıkan atık ürünlerin değerlendirilmesi sağlanacak, bu sayede çevre kirliliği azalacaktır (Arvanitoyannis ve Kassaveti, 2008).

Deniz kaynakları; başta balıklar olmak üzere, süngerler, ahtapot, kalamar, deniz kestanesi, mürekkep balığı, deniz anemonu, karides, deniz anası gibi deniz canlılarını içerir; deniz kaynaklarından elde edilen kolajen 'marine kolajen' olarak adlandırılmaktadır (Strawich ve Nimni 1971; Song vd. 2006; Sugiura vd. 2009). Deniz kaynakları; BSE, TSE ve FMD gibi zoonoz içermez, biyolojik kirleticiler ve toksinler çok düşük düzeydedir ve yüksek kolajen içeriğine sahiptir. Balık kaynaklı kolajen hidrolizati düşük molekül ağırlığına sahip, biyoyararlılık oranı domuz ve sığır kaynaklarından elde edilen kolajen hidrolizatına göre daha yüksektir bu nedenle daha yüksek emilim sağlamaktadır. Ayrıca denizel kaynaklar, hayvansal kaynaklardan daha düşük vücut sıcaklığına sahiptir ve sığır, domuz vb. kaynaklara göre daha az dini ve etik kısıtlamaları vardır. Metabolik olarak uyumlu olmaları, düşük inflamatuvar cevap ve daha az immünojenik etki göstermeleri kara hayvanı kaynaklarına göre önemli avantajlarındandır (Liang vd., 2014; Ninan vd., 2014; Sun vd., 2017).

#### **2.2.4. KÜMES HAYVANLARI**

Tavuk, sıçan kuyruğu tendonu, kanguru kuyruğu, ördek ayağı ve derisi, kuş ayağı kolajen kaynaklarından bazılarıdır. Tavuk ayağı bol miktarda kolajen kaynağıdır. KÜMES hayvanlarının yan ürünlerinden kolajen ekstraksiyonuyla ilgili çalışmalar da literatürde mevcuttur. Tip IX ayrıca tavuk embriyosunun göğüs kıkırdağında, Tip I ve Tip III derisinde, Tip IV ise kas dokularında bulunmaktadır (Hutmacher, 2000; Quereshi, 2010; Mayne vd, 1980).

Önemli miktarda kolajen içeren yumurta kabuğu zarı, yeterince kullanılmayan atık ürünlerden birisidir, yüksek potansiyele sahiptir (Mohammadi vd., 2016). King (2011)'e göre yumurta kabuğu zarları % 69.2 protein içeriğine sahiptir ve bu içeriğin % 10'unu kolajen Tip I, Tip V ve Tip X oluşturmaktadır (Phil ve Zhilhong, 2009; King'ori, 2011).

#### **2.3. Kolajen Ekstraksiyon Yöntemleri**

Kolajen kaynaklarına bağlı olarak farklı ekstraksiyon yöntemleri gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte, kolajen izolasyonunun genel prosedürü ön işlem, ekstraksiyon ve geri kazanımı içerir.

Kolajen özellikleri hammaddeye, ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak değişmektedir. Literatürde bildirilen, sıklıkla kullanılan yöntemler asit ile ekstraksiyon (ASC), enzimatik ekstraksiyon, tuzla çöktürmedir. Geleneksel metotlara alternatif olarak geliştirilen, çevre dostu yöntemler olarak adlandırılan, ultrason destekli ekstraksiyonlar (UAC), derin ötektik solvent (DES) ve süperkritik sıvı (SF) ekstraksiyonları kolajen izolasyonu için son yıllarda geliştirilen ekstraksiyon yöntemleridir.

Asit ekstraksiyon yöntemleri, kolajen izolasyonu için ana yaklaşım olmasına rağmen, asit ekstraksiyon yöntemlerinde yüksek asitlik, uzun işlem süresi ve yüksek sıcaklık, çözünebilir kolajen zincirlerinin yüksek oranda bozulmasını olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle, hedef peptitlerin daha iyi korunmasını sağlayan, verimli yeni işleme teknolojilerinin araştırılması gerekmektedir.

### 2.3.1. Ön İşlemler

Kolajen ekstraksiyonunda hammaddeye göre farklılık gösteren ön işlemler gerçekleştirilir. Ön işlemler hammadde yıkama, temizleme, ayırma ve boyut küçültülmesiyle başlar. Hayvanların bağ dokusundaki çapraz bağlı kolajeni parçalamak, ekstraksiyonun etkinliğini artırmak ve kolajen olmayan maddeleri uzaklaştırmak için bir asidik veya bazik çözelti kullanılarak farklı ön işlem uygulamaları gerçekleştirilmektedir. Ön işlemler esas olarak, kolajen olmayan maddeleri ve yağı uzaklaştırmak, yüksek verime ulaşmak amacıyla uygulanmaktadır. Bazik işlem, genellikle deri ve kemik vb. kararlı ve çapraz bağlanmış kaynaklar için kullanılmaktadır (See vd., 2015).

Bazik işlemde hammaddeye, sodyum hidroksit (NaOH) veya kalsiyum hidroksit ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) gibi bazik bir çözelti ile muamele edilmektedir. Bununla birlikte, doku matrisindeki kütlenin transfer oranını artırarak kolajenin ekstraksiyonunu kolaylaştırmaya yol açan daha yüksek şişme kabiliyeti nedeniyle sodyum hidroksit kullanılması daha uygundur (Liu vd., 2015a).

Ayrıca, ekstraksiyon aşamasından önce, vücudun kemik, kıkırdak ve pullar gibi yüksek miktarda mineral içeren kısmından kolajen ekstraksiyon etkinliğini artırmak için hammaddelerin demineralizasyonu gerekir. Genellikle demineralizasyon, EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) veya HCl (Hidroklorik Asit) kullanılarak yapılabilir (Kittiphattanabawon vd., 2010).

### 2.3.2. Asit Ekstraksiyonu

Kolajen proteinleri liflidir ve asidik ortama kıyasla sulu ortamda daha az çözünür. Asit hidrolizi, asetik asit, sitrik asit, hidroklorik asit vb. organik veya inorganik asitler kullanılarak gerçekleştirilir. Asidik çözeltiler kolajen zincirlerinin arasında bulunan çapraz bağların bir kısmını kırar, ekstraksiyon esnasında kolajenin çözünmesini sağlayarak ekstraksiyon etkinliğini artırır (Liu vd., 2015a).

Kolajen ekstraksiyonunda en yaygın kullanılan organik çözücü asetik asittir. Asidik işlemde sonra elde edilen kolajen, asitte çözünen kolajenler olarak adlandırılır. Asidik çözelti, kolajen moleküllerinin çözünmesine neden olabilecek tropokolajen molekülleri arasındaki itmeyi artırır. Asit ekstraksiyon solüsyonu için konsantrasyon aralığı, kolajen zincirlerinin yapısını etkilemeden molekül içi ve moleküller arası

çapraz bağların parçalanmasına izin veren 0,5 M ile 1 M arasındadır. Asit ekstraksiyonu yönteminde işlem parametreleri; konsantrasyon, sıcaklık, işlem süresi, pH değeri vb. parametreler ekstraksiyon verimliliğini etkilemektedir. Ayrıca asit ve enzim ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemleri birlikte uygulandığında daha yüksek verimlilik elde edildiği görülmektedir (Chuaychan vd., 2015; Ali vd., 2017; Mahboob, 2015).

### **2.3.3. Enzimatik Ekstraksiyon**

Enzimatik ekstraksiyon veya hidroliz, kompleks moleküllerin monomerlerine ayrıştırılmasında enzimlerin kullanıldığı işlem türüdür. Kolajen ekstraksiyonunda kullanılan enzimatik hidroliz, proteinlerin fiziksel, kimyasal ve fonksiyonel özelliklerini geliştirmek için uygulanan önemli bir biyoprosesdir (Sarbon vd., 2018).

Proteaz enzimleri, proteinlerde bulunan peptit bağlarını hidrolize ederek, gıda endüstrisinde yaygın şekilde kullanılmasına sebep olurlar (Temiz, 2014). Proteaz enzimlerinden; pepsin, tripsin, papain, alkalaz kolajen ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılan enzimlerdir. Enzimler, telopeptitleri parçalayarak kolajen ekstraksiyonunu kolaylaştırır ve kolajenin üçlü sarmal yapısını korumaktadır (Chuaychan vd. 2015; Gao vd., 2017). Pepsin, tek başına veya farklı asetik asit konsantrasyonları ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Pepsin kullanılarak elde edilen kolajenlere pepsin çözünür kolajenler denir. Çeşitli araştırmalarda, sınırlı konsantrasyonda enzimlerin asitlerle birlikte kullanılmasının kolajen verimini artırdığını tespit edilmiştir (Jeevithan vd., 2014).

Enzimatik hidroliz kimyasal hidroliz ile karıştırıldığında; özgüllük, hidroliz derecesinin kontrolü ve son hidrolizattaki düşük tuz içeriği gibi bazı avantajlar sunar (Zavareze, vd., 2009). Ayrıca enzimler genellikle çok düşük konsantrasyonlarda kullanılabilir ve bunların ortamdan uzaklaştırmasına gerek yoktur. Enzimatik ekstraksiyon veya hidroliz, yüksek maliyetine rağmen, daha düşük atık seviyeleri, sürecin daha iyi kontrolü ve daha yüksek verim ile sonuçlanması, enzimlerin kullanımını avantajlı kılar. Tüm bu sebeplerden dolayı gıda ve ilaç sektöründe enzim ekstrakte kolajen uygulamaları artmaktadır (Duan, 2009).

### **2.3.4. Tuzla Çöktürme**

Kolajen ekstraksiyonunda tuzla çöktürme yöntemi ile çözünür kolajen dokulardan ekstrakte edilmektedir. Tuz ile ekstraksiyon işleminin diğer yöntemlere göre kullanımı daha azdır. Nötr tuz çözeltileri kolajenin çözülmesinde etkilidir ve genellikle ekstraksiyonda kullanılır. Çöktürme işlemi genellikle sitratlar, sodyum

klorür, fosfat vb. nötr tuz çözeltileri ile gerçekleştirilir (Yang ve Shu, 2014).

Farklı tuz konsantrasyonları kolajen ekstraksiyonunu etkileyeceği için tuz konsantrasyonunun oranı önem arz eder. Tuz çözeltileri, çapraz bağlı moleküller gibi güçlü bağlı molekülleri parçalamak için yeterli değildir. Kolajen moleküllerinin çoğu çapraz bağlı olduğu için düşük verimle sonuçlanmaktadır, bu nedenle yöntemin kullanımı sınırlıdır (Yang vd., 2004).

### **2.3.5. Derin Ötektik Solvent Ekstraksiyonu**

Her geçen gün çevre bilincinin biraz daha artmasıyla, son yıllarda ortaya koyulan yeşil teknoloji kavramı daha da önem kazanmıştır.

Yeşil teknolojiler, tehlikeli maddelerin üretimini ve tüketimini azaltmayı, yenilenebilir kaynakların kullanımını arttırmayı, tehlikeli kimyasal üretiminde harcanan enerji miktarını indirgemeyi hedeflemektedir. Bu yöntemde, tehlikeli maddelerin üretimi ve tüketimi azaltılarak, harcanan enerji miktarının indirgenmesi sağlanır ve yenilenebilir kaynakların kullanımının artışı sağlanmasında hedeflenmektedir. Yeşil teknolojilerde, yaygın olarak kullanılan geleneksel çözücüler yerine, sağlığa zararı olmayan ve yüksek ekstraksiyon verimliliğine sahip yeşil çözücülerin kullanılması önerilmiştir. Genel olarak yeşil çözücüler, toksik olmayan veya az olan, geri dönüşümü mümkün olabilen ve sentezi için yüksek maliyet gerektirmeyen çözücüler olarak tanımlanmaktadır (Kutlu vd., 2017).

Derin Ötektik Solvent yöntemi çoğunlukla düşük toksik ve biyolojik olarak parçalanabilir doğal bileşenlere (kolin klorür, okzalik asit, üre, etilen glikol) dayanır, çevre dostudur. Bu nedenle Derin Ötektik Solvent yöntemi değerli kaynakların ekstraksiyonu için avantajlıdır (Altunay, Elik ve Gürkan, 2019).

### **2.3.6 Ultrason Destekli Ekstraksiyon**

Ultrason, 20 kHz'in üstünde bir frekansa sahip herhangi bir sese karşılık gelerek; düşük ve yüksek şiddetli ultrason olarak sınıflandırılmaktadır. Genellikle emülsifikasyon, enzimatik inaktivasyon ve kimyasal reaksiyonları vb. işlemleri desteklemek amacıyla kullanılmaktadır (Song vd., 2018).

Kolajen ekstraksiyonu sırasında ultrason uygulaması ( $\geq 20$  kHz frekans) verimi artırır ve ekstraksiyon için gereken süreyi azaltır (Kim vd., 2012). Ultrason, bir sıvıda yoğun

türbülans oluşturarak kütle transferinin ve kimyasal reaksiyon hızlarının artmasına neden olur. Uzun süreli ultrason uygulamasının dezavantajı, ortamda kavitasyona yol açarak basıncın ve sıcaklığın artışına sebep olmasıdır (Tavman vd., 2009). Spesifik kolajen kaynağı için muamelenin optimizasyonu (ultrason genliği, süresi, enzim veya diğer kimyasalların konsantrasyonu, sıcaklık) ile hasar en aza indirilebilir (Li, 2009).

Ultrasonikasyon, prosesin işlem süresini kısaltarak, ürün kalitesini artıran ve hızla gelişen teknolojilerden birisidir. Özellikle son yıllarda homojenizasyon, karıştırma, kurutma ve ekstraksiyon işlemlerindeki kütle transferini hızlandırmak hedefiyle yüksek yoğunluklu ultrason kullanımı yaygınlaşmıştır (Majid vd., 2015).

Ekstraksiyon proseslerinde ultrason kullanımı ile ilgili araştırmalar son yıllarda artmaya başlamıştır. Ultrason teknolojisi sürdürülebilir yöntemler ve yeşil teknoloji alanında önemli bir rol oynamaktadır (Chemat vd., 2017). Ultrason diğer yöntemler ile kıyaslandığında; güvenilir, tekrarlanabilir, düşük maliyetli ve çevre dostu olması gibi pek çok avantaja sahiptir (Song vd., 2018).

### **2.3.7. Süperkritik Sıvı Ekstraksiyonu**

Süperkritik sıvı ekstraksiyonu, kimyasal bileşikleri çıkarmak için en popüler yeşil ekstraksiyon tekniklerinden biri haline gelmiştir. Gelişmiş seçicilik, daha yüksek ekstraksiyon verimleri, daha iyi fraksiyonlama yetenekleri ve daha düşük çevresel etki gibi geleneksel veya klasik ekstraksiyon işlemleriyle karşılaştırıldığında süperkritik sıvı ekstraksiyonu için önemli avantajlar sağlamaktadır.

Süperkritik sıvı ekstraksiyonu, bir çözücü olarak yeteneklerini değiştirecek önemli fiziksel değişiklikler elde etmek için sıvının kritik noktanın ötesindeki basınçlarda ve sıcaklıklarda kullanılmasına dayanır. Karbondioksit (CO<sub>2</sub>) düşük toksisite, maliyet etkinliği, yüksek kullanılabilirlik, stabilite, yanıcılık ve çevre kabul edilebilirliği nedeniyle Süperkritik Sıvı Ekstraksiyon yöntemi için en yaygın kullanılan moleküldür. Ayrıca sulu ortamdan ekstraksiyondan sonra karbondioksit (CO<sub>2</sub>) salınabilir ve bu nedenle saflaştırılmış bir bileşik elde edilir (Sousa, vd., 2020).

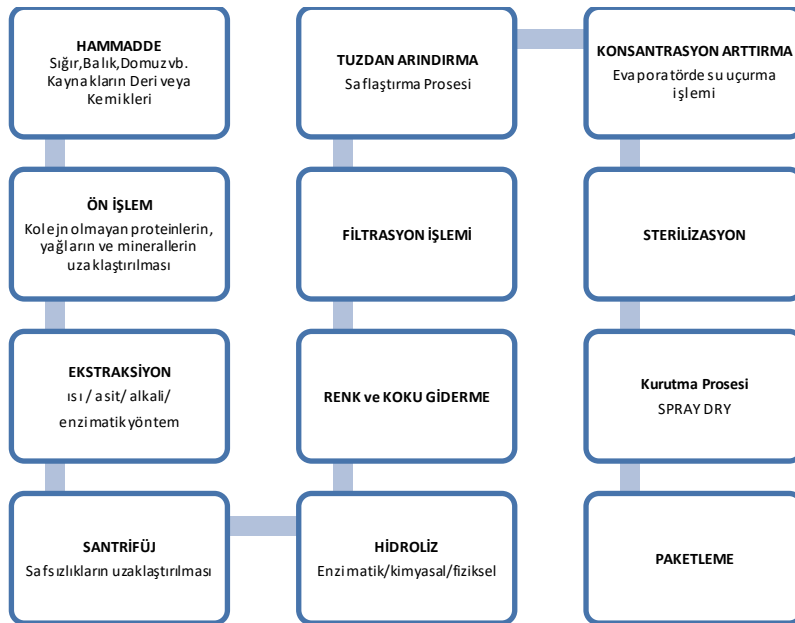
Son zamanlarda, süperkritik sıvı ekstraksiyon, geleneksel asit bazlı ekstraksiyon yerine deniz atıklarından kolajen ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Morina balığı derisinden süperkritik sıvı ekstraksiyon, asit ve pepsin destekli asetik asit ekstraksiyon prosedürleriyle kolajen ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş, kolajen verimliliklerinin

sırasıyla %13.8, %5.72 ve %11.14 olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, deniz süngerlerinden kolajen ve jelatini izole etmek için süperkritik sıvı ekstraksiyonu kullanılmıştır, kolajen verimi yaklaşık %10 bulunmuştur (Silva, vd., 2016).

## 2.4. Kolajen Hidrolizatı

Hayvanın kemik ve deri gibi yan ürünlerinden elde edilen büyük molekül ağırlıklı kolajenin, genellikle enzimatik veya asidik ekstraksiyonu ile parçalanmasıyla meydana gelen daha düşük molekül ağırlığına sahip, suda çözünen yapıya kolajen hidrolizatı veya kolajen peptitleri denir (Hunter, 2011). Balık, domuz ve sığır kaynaklarının deri, tendon vb. yan ürünlerinden yüksek oranda Tip I kolajen elde edilir. Hidrolizden elde edilen kolajen peptitlerin moleküler ağırlığı, doğal kolajen (285–300 KDa) ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Hidroliz yöntemi ile üretilen kolajen hidrolizatının ortalama molekül ağırlığı 2000 ile 5000 Dalton arasındadır, biyoyararlılığı ve sindirimi de yüksektir (Asghar ve Henrickson, 1982). Enzimatik hidroliz sadece peptitlerin büyüklüğünü değil aynı zamanda fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri de etkiler (Zhang vd., 2017).

Düşük molekül ağırlığı, antioksidan kapasitesini, antimikrobiyal aktivitesini ve daha yüksek biyoyararlanım gibi fonksiyonel özelliklerini artıran faktördür. Genel olarak hayvansal kaynaklardan kolajen hidrolizatı üretimi ile ilgili endüstriyel üretim akış şeması Şekil 2.4' de gösterilmiştir (Hong vd., 2019).



Şekil 2.4: Kolajen hidrolizatlarının endüstriyel üretim süreci

**Kaynak:** (Hong vd., 2019)

Hidrolize kolajen endüstride, sığır, balık ve domuz kaynaklarının deri, kemik, tendon vb. yan ürünlerinden elde edilmektedir. Balık kaynaklı hidrolize kolajen sahip olduğu avantajlar nedeniyle domuz ve sığır kaynaklı hidrolize kolajene kıyasla daha yaygındır. Balık kaynaklı kolajen hidrolizatının biyoyararlılığı, sığır ve domuz kaynaklı hidrolize kolajenden daha yüksek olması nedenle fonksiyonel içeceklerde balık kolajen hidrolizatının kullanımı daha çok tercih edilmektedir (Yetim, 2011).

Hidrolize kolajen, doğal kolajene kıyasla çeşitli avantajlara sahiptir. Düşük molekül ağırlığı sebebiyle, insan vücudunda kolayca emilip yüksek biyoyararlılık sağlar (Ramadass vd., 2014). Ayrıca kolajen hidrolizatı sulu çözeltide daha düşük viskozite, şeffaflık, emülsifikasyon ve stabilizasyon, köpük oluşturma, film oluşturma, suda çözünürlük gibi avantajlara sahiptir. Hidrolize kolajen, insan sağlığına faydalı etkileri sebebiyle gıda sektöründe yiyecek ve içecekler fonksiyonel özellik kazandırmak amacıyla, gıda takviyesi ve kozmetik uygulamalarında kullanımı yaygınlaşmıştır.

## **2.5. Kolajen Hidrolizatının Amino Asit Kompozisyonu**

Kolajen yapısında 19 farklı aminoasit içermektedir; 9 zorunlu amino asidin, 8 tanesini (izolösin, histidin, , lösin, metiyonin, lizin, fenilalanin, valin ve treonin) yapısında bulundurmaktadır. Diğer proteinler ile kıyaslandığında prolin ve glisin gibi önemli amino asitler kolajen hidrolizatında yüksek miktarda bulunur. Balık, sığır ve domuz kaynaklı kolajen hidrolizatının 100 gr da bulunan aminoasit kompozisyonu Tablo 2.2'de sunulmuştur (Rousselot, 2022).

**Tablo 2.2: Balık, sığır ve domuz kaynaklarından elde edilen kolajen hidrolizatının 100 gramdaki amino asit kompozisyonu**

Amino asitler (g/100 g protein)	Balık Kolajen Hidrolizatı	Sığır Kolajen Hidrolizatı	Domuz Kolajen Hidrolizatı
<b>Hidroksiprolin</b>	10.1	11.4	11.4
<b>Glisin</b>	21.2	20.6	20.6
<b>Prolin</b>	10.7	11.5	11.2
<b>Alanin</b>	9.5	8.1	7.8
<b>Aspartik asit</b>	6	6.6	6.5
<b>Arginin</b>	8.9	8.4	8.2
<b>Glutamik asit</b>	11.5	12.4	12.6
<b>Histidin</b>	1.1	0.8	1.1
<b>Hidroksilisın</b>	1	1.2	1.2
<b>Lösin</b>	2.7	2.9	2.9
<b>İzolösin</b>	1.1	1.5	1.2
<b>Metiyonin</b>	1.4	0.6	0.8
<b>Lizin</b>	3.4	3.4	3.7
<b>Serin</b>	3.7	3.4	3.6
<b>Fenilalanin</b>	2	2.1	2
<b>Tirozin</b>	0.3	0.5	0.6
<b>Treonin</b>	2.9	1.9	1.9
<b>Valin</b>	2.2	2.4	2.5

**Kaynak :** (Rousselot, 2022)

Prolin ve hidroksiprolin kolajen molekülüne sertlik ve sağlamlık kazandırmaktadır. Hidroksiprolin kolajenin amino asit karakteristiğidir ve kolajenin termal stabilitesini belirlemektedir (Liu ve Huang, 2016). Hidroksiprolinin glisin sentezi başta olmak üzere, bağ dokunun onarımı ve hücrel faaliyetlerin düzenlenmesi gibi birçok fonksiyona sahiptir (Li ve Wu, 2018).

Prolin, hidroksiprolin ve glisin kolajendeki toplam amino asitin %57'sini oluşturur. Hidroksiprolin kolajen kaynağına göre değişiklik göstermekle birlikte, kolajendeki toplam amino asitlerin %10-%12'sini oluşturur, kolajenin kantitatif analizinde kullanılarak kolajen miktarının belirlenmesini sağlar (Bhagwat ve Dandge, 2018). Üçlü sarmal yapının her üç konumunda da glisin kalıntılarının sık olması, kolajen molekülünün ayırt edici özelliklerinden biridir. Kolajenin glisin, prolin ve hidroksiprolini yüksek oranda içermesi kolajen sentezinin gerçekleşmesi ve onarımı açısından önem arz eder (Li ve Wu, 2018).

## **2.6. Kolajen Hidrolizatlarının Vücuttaki Etki Mekanizması ve İnsan Sağlığına Etkileri**

Vücutta kolajen kaybı 18-29 yaşlarında başlar ve 40 yaşından sonra insan vücudu yılda yaklaşık %1 kolajen kaybedebilir. Yaklaşık 80 yaşındaki vücutta kolajen üretimi genel olarak genç yetişkinlere kıyasla %75 oranında azalmış olabilir. Doğal yaşlanmaya katkıda bulunan organizmadaki serbest radikaller, sigara, alkol, yetersiz beslenme ve hastalık gibi başka faktörler de vardır. Yaşlanma insan vücudundaki değişiklikleri içeren doğal bir süreç olması sebebiyle cilt zamanla morfolojik, yapısal ve fonksiyonel bozulmaya maruz kalır; kolajen azalır ve elastin lifleri çizgilerin ve kırışıklıkların oluşumunu destekler (Varani vd., 2006).

Kolajenin vücuttaki rolü, organların gelişimine yardımcı olduğu için çok önemlidir; yara ve doku iyileşmesinde görev alır. Kolajen kemik ve kan damarı onarımında yardımcı olur. Kolajen, korneada doku mekanik ve optik özellikler sağlar. Hücrenin çoğalma, hayatta kalma ve farklılaşması gibi biyolojik işlevlerinde bulunur; bu nedenle kolajen insan vücudunda kemiklerde, tendonlarda, bağlarda, saçlarda, deride ve kaslarda bulunur (Gelse vd., 2003).

Cilt yaşlanmasının kontrolü kozmetik endüstrisinde temel sorunlardan birisidir. Kolajen hidrolizatlarının yaş almanın etkilerini yavaşlatmada alternatif bir çözüm olduğu kanıtlanmıştır. Kolajen, yara iyileşme sürecinin çok önemli bir bileşenidir; yeni doku büyümesi için doğal bir yapısal iskele veya substrat görevi görür ve hemostaz, enflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme dahil olmak üzere yara iyileşmesinin tüm aşamalarında önemli bir rol oynar. Anti-aging, yaşlanmanın ilerlemesini sınırlayan veya engelleyen unsurlardır. Kolajen, yaşlanma sürecini sınırlayan tüm çok hücreli organizmaların kemiklerinde, derisinde, dişlerinde, kıkırdaklarında ve tendonlarında bulunan lifli bir proteindir. Kolajen hidrolizatlarının antiaging aktivitesi, antioksidan aktivitesi ile ilişkili olabilmektedir (Wang vd., 2018).

Gıdalarda kullanılması önerilen kolajen hidrolizatı 5000 dalton ve aşağısıdır, tercihen 2000 Dalton molekül ağırlığındaki kolajen hidrolizatı önerilmektedir. Genel olarak düşük molekül ağırlığının tercih edilmesinin sebebi partikül boyutunun daha küçük olması nedeniyle emilim ve biyoyararlılığının 5000 Dalton ve daha büyük molekül ağırlığına göre daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır (Bruyère vd., 2012).

Yapılan klinik araştırmalara göre, kolajen hidrolizatın faydalı etkilerinden yararlanmak için düzenli Şekilde ve günlük önerilen kullanım dozu miktarında (g/gün) tüketilmesi önerilmektedir. Moskowitz tarafından önerilen, kolajen hidrolizati günlük alım dozu 10 gramdır (Moskowitz, 2000). Belirtilen bu miktarda kolajen hidrolizati tüketiminin cilt, eklem ve kemik sağlığı üzerinde yararlı etkileri olduğu belirtilmiştir. Kolajen hidrolizati vücuda alındıktan sonra, kanda hidroksiprolin konsantrasyonunun arttırarak kolajen sentezini de artmasını sağladığı deneysel çalışmalar ile tespit edilmiştir (Bruyre vd., 2012).

Bilimsel araştırmalara göre kolajen hidrolizati tüketildikten sonra kolejenaz enzimi tarafından sindirilmektedir (Postlethwaite vd, 1978). Kolajen hidrolizati emilimi sonrası vurgulanan ilk etkisi antioksidan etkisi, ikinci etkisinin ise biyolojik aktiviteleri olduğu grlmştir (Tanaka vd, 2009). Kolajen hidrolizatlarının biyoaktivitesi, biyoerişilebilirlik olarak adlandırılan, oral alımdan sonra genel dolaşıma bozulmadan ulaşma yeteneklerine bağlıdır. Klinik araştırmalar gösteriyor ki, oral olarak alınan kolajen hidrolizatlarının %90'dan fazlası sindirilmekte, kolay bir Şekilde absorbe olarak idrarla atılmakta olduğu görülmektedir (Iwai vd., 2005). Yapılan klinik çalışmalar neticesinde kolajen hidrolizatının insan sağlığını olumlu yönde etkilediği ve sindiriminin güvenli olduğu kanıtlanmıştır (Skov vd., 2019).

Yetişkin cildinin, kolajen oranının % 80'nini kolajen Tip I oluştırmaktadır; kolajen Tip III % 15 oranında, Tip IV ve Tip V % 5 oranında bulunur. Kolajen Tip III özellikle gençlerin cildinde daha fazla miktarda yer almaktadır ve yara iyileşmesi sürecinde yeniden yapılandırma kolajeni olarak tanımlanır (Chaudhuri vd., 2000). Hidrolize kolajen dermiste iki farklı Şekilde hareket eder; ilk eylemde, serbest amino asitler kolajen ve elastin liflerinin oluşumu için yapı taşları sağlar. İkinci eylemde, kolajen oligopeptitler, fibroblastların zarı üzerindeki reseptörlere bağlanarak ve yeni kolajen, elastin ve hyaluronik asit üretimini uyararak ligandlar gibi hareket eder (Sibilla vd., 2015). Kolajen hidrolizati derinin nem içeriğinin koruması ve gelişimi, derinin kırışmasını ve yaşlanmasını önleyici, eklem, kemik ve bağ dokuları yenileyici etkisi olan biyoaktif bileşenleri bütünüyle karakterize eder (Asghar ve Henrickson, 1982). Kolajen hidrolizati, epiderminin nem içeriğinde ve cilt kusurlarında iyileşme, anti-aging özellik ile cildin yaşlanmasını nleme, fibroblast hücrelerinin gelişimini hızlandırma, eklem ve bağ dokuları yenileme etkisine sahip biyoaktif bir bileşendir. Antioksidan, anti-hipersensitif, immünomodülatör, antimikrobiyal, nöroaktif,

hormonal ve mineral düzenleyici özellikler vb. gibi bir dizi biyolojik aktiviteye sahiptir. Ayrıca kolajen hidrolizatının zengin amino asit içeriği, kıkırdak matriks sentezinde ve osteoartrit ile mücadelesinde etkin rol oynar (Gelse vd., 2003).

## **2.7. Kolajen Hidrolizatlarının Kullanım Alanları**

Grand View Research 2022 verilerine göre, küresel kolajen pazar büyüklüğünün 2020'de 8,36 milyar ABD doları değerinde ve 2020'den 2028'e kadar %9 bileşik yıllık büyüme oranı (CAGR) ile 16,7 milyar ABD doları olması beklenmektedir. Gıda, içecek ve kozmetik endüstrisinden gelen talebin artmasıyla birlikte pazar büyümesini hızlandırması beklenmektedir. Kolajen hidrolizatı, insan vücudu için gerekli bir protein hidrolizatıdır ve beslenme, cilt ve sağlık açısından birçok faydası vardır. Ancak bazı hammadde kaynaklarından hastalıkların bulaşmasına ilişkin endişeler pazarın büyümesini engellemiştir (Grand View Research, 2022).

Kolajen hidrolizatları, klinik araştırmalar sonucunda kanıtlanmış insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri, artan harcanabilir gelir ve sağlık ve kişisel bakım konularında artan farkındalık nedeniyle; gıda takviyeleri, yiyecek ve içecek, kozmetik ve sağlık sektöründe popüler bir ürün haline gelerek geniş kullanım alanı bulmuştur. Artan talep nedeniyle tahmin dönemi boyunca en yüksek büyümeyi kaydetmesi ve ürünün kırışıklık gibi yaşlanma etkilerini önleyen kozmetik bir bileşen olarak artan popülaritesinin 2028 yılına kadar yeni pazar alanları açması beklenmektedir (Grand View Research, 2022).

### **2.7.1. Gıda Takviyeleri**

Takviye edici gıdalar, normal beslenmeyi takviye etmek amacı ile günlük alım dozu belirlenmiş ürünlerdir. Takviye edici gıdalar; vitamin, mineral, protein, yağ asidi, karbonhidrat, amino asit vb. besin öğelerinin veya besleyici ve fizyolojik etkileri bulunan maddeler ve biyoaktif maddeler vb. maddelerin konsantre halinin veya ekstraktlarının tek başına veya karışım halinin kapsül, tablet, sıvı veya toz şeklinde hazırlanan ürünlerdir (Türk Gıda Kodeksi, 2013).

Kolajen hidrolizatı toz formda üretilir, sıvı formunun istenmesi durumunda daha sonra sıvı ürünlere ilave edilebilir veya kapsül, saşe, tablet formda tüketime sunulmaktadır (Anonim, 2020b). Sıvı formdaki kolajen hidrolizatları toz form ile benzer özellikler göstermektedir. Tablet ve kapsül formdaki kolajen hidrolizatları toz ve sıvı formda

olan ürünlere göre daha az miktarda kolajen hidrolizatları içermektedir. Ayrıca kapsül formdaki kolajen hidrolizatının parçalanması ve vücuttaki emilimi diğer kolajen hidrolizatı formlarına kıyasla daha uzun sürmektedir (Avcı, 2022).

Kolajen hidrolizatı, gıda güvenliği ile ilgili yetkin olan EFSA ve FDA tarafından güvenilir olarak kabul edilmiştir. Ayrıca GRAS (Generally Recognized As Safe) olarak ilan edilen ve alerjen riski taşımayan fonksiyonel bir üründür. Kolajen hidrolizatının gıdalarda kullanımı Türk Gıda Kodeksi Takviye Edici Gıdalar Yönetmeliğine göre uygun bulunmuştur (Türk Gıda Kodeksi, 2013).

**Toz formda olan kolajen takviyeleri,** Düşük moleküler ağırlığına sahip kolajen hidrolizatı, vücudumuz tarafından hızla sindirilir ve kan dolaşımımıza girer. Yapılan araştırmalara göre kolajen hidrolizatları için en uygun kolajen türü, vücudumuz tarafından kolaylıkla emilip kullanılabilen toz veya sıvı formdaki kolajen hidrolizatıdır. Bu formdaki kolajen hidrolizatı tüketildiğinde çok kısa sürede vücut tarafından kullanılacak olan kan dolaşımına ulaşır. Biyoyararlanımı yüksektir ve bu nedenle çok tercih edilen kolajen formudur. Toz halindeki kolajen takviyelerinin kullanımını daha kolaydır, kahveye, suya veya tüketeceğiniz sıvıya eklenerek rahatlıkla içilebilir (Musayeva, Özcan ve Kaynak, 2022). Bir araştırma, oral kolajen takviyeleri kullanmanın cilt elastikiyetini, hidrasyonunu ve kolajen yoğunluğunu iyileştirdiğini ortaya koymuştur (Choi vd., 2019).

**Sıvı formda olan kolajen takviyeleri,** toz kolajen formlarına benzer özelliklere sahiptir. Sıvı hidrolize kolajen takviyesi olduğu için emilimi daha hızlı ve kolaydır. Kolajen takviyelerinin çoğu toz veya sıvı formda bulunur. Sıvı haldeki kolajen hidrolizatları genellikle aroma ve tatlandırıcı maddeler içermektedir (Choi vd., 2019).

**Tablet veya kapsül formda olan kolajen takviyeleri,** boyutu itibarıyla sıvı ve toz formlara göre daha az kolajen hidrolizatı içermektedir. Ayrıca parçalanması ve emilmesi için diğer formlara göre daha fazla süreye ihtiyaç duyulur. Kolajen tablet veya kapsüllerinin kullanımı kolay gibi görünse de aslında yanıltıcı olabilir. Günlük tavsiye edilen kolajen hidrolizatı miktarını tüketmek için bu tablet veya kapsüllerden yüksek adetlerde yutmanız gerekebilir (Musayeva, Özcan ve Kaynak, 2022). Kolajenin yanı sıra bu tablet veya kapsüllerin üretiminde kullanılan koyulaştırıcı ve emülgatör gibi maddeleri de vücudumuza alırız (Moskowitz, 2000).

Kolajen takviyesi, yağsız kas kazanımını artırabilir, iyileşme süresini azaltabilir,

hasarlı eklem yapısını yeniden inşa edebilir ve kardiyovasküler performansı artırabilir. Antrenmanlardan sonra yeni kas büyümesinde gerekli bir amino asit olan doğal kreatinin kolajen tarafından teşvik edilmesi, sporcu destek gıdası olarak da kullanılmasına imkan vermektedir (Yuswan, vd., 2020).

### **2.7.2. Gıda Sektörü**

Gıda sektöründe yaygın kullanım alanına sahip olan kolajen hidrolizati, emülgatör, mikroenkapsülasyon ajanı, stabilizatör, köpürme ajanı, ve biyobozunur film oluşturu malzeme olarak kullanılmaktadır (Gómez-Guillén vd., 2011). Son yıllarda fonksiyonel gıda ve içeceklerin hazırlanması, gıda takviyeleri, et işleme ve gıda biyofilmlerinin üretimine odaklanmıştır. Kolajenler, sosislerin ve sosislerin reolojik özelliklerini artıran ve aynı zamanda yeterli miktarda hayvansal besin lifi sağlayan gıda katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır. Doğal bağırsak kaynaklı sosis kılıflarının maliyetlerinin artması, biyopolimer esaslı doğal kaplama olarak kullanılan kolajen hidrolizatlarını alternatif hale getirmiştir (Dhakal vd., 2018). Kolajen hidrolizatları kaplamalar, filmler, ürünlerin raf ömrünü arttırmaya yardımcı olarak aktif maddelerin taşınmasında işlev görmektedir (Bhagwat ve Dandge, 2018).

Gıda bilimde kolajen hidrolizati, dondurucuda saklama sırasında hücre ve dokulardaki hasarı en aza indirmeye veya önlemeye yardımcı olur, bu nedenle, düşük sıcaklıkta saklama gerektiren gıdalarda kullanmak için bir seçenektir (Wang vd., 2018)

Kolajen hidrolizatları yüksek sıcaklığa dayanıklı ve suda yüksek çözünürlüğe sahiptir. Bu nedenle kolajen hidrolizatları ile zenginleştirme yapılan gıda ürünleri pastörize edilebilmektedir. Kolajen hidrolizatlarının C vitamini ile gıdalarda kullanımını olumlu etki sağlar. Fakat antosiyanin içeriği yüksek ürünlerin geliştirilmesinde teknolojik sorunlara sebep olabilmektedir. Kolajen hidrolizatları vişne suyu gibi antosiyanince zengin meyve sularına ilave edildiğinde çökelti oluşumuna sebep olabilmektedir (Rousselot, 2011).

Kolajen hidrolizatları, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösterir, bu nedenle gıda takviyelerinde de fonksiyonel bir bileşen olarak kullanılabilir. Kolajen hidrolizatları, kalsiyum iyonlarını bağlayarak kalsiyumun biyoyararlanımını artırabilir, bu nedenle, mineral eksikliklerinin yönetiminde fonksiyonel gıda bileşenlerinde kullanılabilir (Gómez-Guillén vd., 2011) Ayrıca düşük sıcaklıklardan

kaynaklanan hücre ve doku hasarını azaltmaya yardımcı olduğu için antikoagülan görevi görür, bu nedenle soğuk veya dondurucu sıcaklıklarda saklanması gereken gıdalarda faydalı olabilir. Et ürünleri, içecekler, çorbalar ve diğerleri gibi farklı ürünlerin hazırlanmasında kolajen hidrolizati kullanılmıştır. Duyusal, kimyasal ve fiziksel özelliklerinin artmasına ve korunmasına yardımcı olur (Wang vd., 2015).

Balıktan elde edilen kolajen hidrolizati, portakal suyu (%2.5) gibi içeceklere eklenerek daha yüksek protein içeriği, biyoyararlanım ve düşük viskozitenin yanı sıra suda yüksek çözünürlük ile beslenme ve fonksiyonel özelliklerde bir gelişme göstermiştir (Bilek ve Bayram, 2015). Kolajen hidrolizati açai küspesi ve peynir kullanılan sütlü içecekler, 28 günlük depolamanın ardından viskoziteyi olumlu yönde etkileyen ve yeterli fizikokimyasal ve mikrobiyolojik parametreler sunan daha yüksek duyuşal kabul edilebilirlik göstermiştir (Da Mata Rigoto vd., 2019).

### **2.7.3. Kozmetik Sektörü**

Kolajen takviyesi, yaşlanma karşıtı fonksiyonel bir ürün olarak popüler hale gelmiş, kullanımını artmıştır. Kolajen hidrolizati gıda takviyesinin cildin daha derin katmanlarına ulaşması ve cilt fizyolojisini ve görünümünü iyileştirerek hidrasyonu, elastikiyeti, sıklığı, kırışıklığı azaltması en belirgin özelliklerindedir. Kolajen mükemmel su tutma özelliği, düşük alerjik reaksiyon gösterme ve hasarlı cildi onarma özelliğe nedeniyle kozmetik sanayide yaygın olarak kullanılmaktadır (Chen vd., 2018).

Kolajen hidrolizatları, güzellik ürünlerinde, vücut korumasına ve/veya kozmetik düzeltmelere odaklanan, nemlendirici, kırışık önleyici, yaşlanma karşıtı maddeler ve ayrıca ultraviyole (UV) ışın engelleyiciler olarak işlev gören, cilt yumuşaklığını ve parlaklığını artıran ve saç ürünlerinde de kullanılan, saç teli direncini artıran, saç büyümesine ve gücüne katkıda bulunan cilt hücre dışı matrisini desteklemektedir. Faydalı etkileri sebebiyle, kozmetik sektöründe bir çok ürün grubunda kolajen ilavesiyle fonksiyonel ürünler geliştirilmektedir. Deniz kaynaklardan elde edilen kolajen, şampuan, güneş koruyucu losyon, saç ve cilt serumları ve kremlerde, tırnak ve saç besleyici ve güçlendirici vb. etkileri nedeniyle kozmetik ürünlerde de sıklıkla kullanılmaktadır (Wang vd., 2018).

#### 2.7.4. Biyomateryal Sektörü

Kolajen, iyi bir biyoyuyluluk ve biyobozunurluk sunar, dolayısıyla bir biyomateryal olarak güvenli ve etkilidir, son yıllarda doku mühendisliği ve klinik uygulamalarda güvenli ve etkili bir biyomateryal olarak kullanılmıştır. Doku mühendisliğinde kullanımı yaygın olan biyo malzemeler esas olarak tip I, II, III, V, XI kolajenden üretilmektedir. Kolajen Tip I, yüksek biyoyuyluluğa sahip olması nedeniyle bu sektörde altın standart olarak kabul edilmektedir (Ramadass vd., 2014).

#### 2.8. Kolajen Hidrolizatları İle İlgili Daha Önce Yapılmış Çalışmalar

Yapılan klinik çalışmalar sonucunda, kolajen hidrolizatının insan sağlığına olumlu etkileri ve güvenilir olduğu kanıtlanmıştır. Kolajen hidrolizatının cilt kusurları ile kemik ve eklem rahatsızlıkları üzerindeki etkileri ile ilgili gerçekleştirilen araştırmalar özetle anlatılmıştır;

Yapılan bir klinik çalışmada; 12 hafta boyunca kolajen hidrolizatı takviyesi alan 40 ila 60 yaşları arasındaki kadınlarda *in vivo* çalışmalar, cilt kırışması, cilt hidrasyonu ve elastikiyetinde önemli bir iyileşme gösterdiği tespit edilmiştir (Kim vd., 2018).

2009'da gerçekleştirilen bir çalışmada günlük oral yolla alınan kolajen hidrolizatının sindirim sonrasında UV-B ışınlarından zarar gören deri üzerindeki etkisi incelenerek, su tutma kapasitesi belirleme metotları ve *in vivo* analizleri uygulanmıştır. Sonuç olarak kolajen hidrolizatı gıda takviyesinin beslenme açısından faydalı, fotoyaşlanmaya ve UVB hasarına bağlı olarak oluşan cilt sorunlarında iyileşme sağlayarak, derinin su tutma kapasitesini arttığı görülmüştür (Tanaka, Koyama ve Nomura, 2009).

2019'da yapılan bir çalışmada, A, C, E vitaminleri ve çinko karışımı ile kolajen hidrolizatından 'den oluşan gıda takviyesi, yaşları 40 ila 50 arasında olan altmış sağlıklı kadın denek üzerinde 28 gün süren bir çalışma yapmıştır. Çalışma sonucunda cilt elastikiyetini etkilediğini ve dermis ekojenitesi üzerinde daha belirgin bir etki gösterdiğini, cilt gözeneklerini azalttığını, hidrasyonu, dokuyu, elastikiyeti ve cildin sıklığı iyileştirdiği görülmüştür (Maia Campos vd., 2019). Başka bir çalışmada, meyve özü, vitamin C, vitamin E, çinko, biotin, elastin içeren kolajen hidrolizatı sıvı ampülleri 35 yaş ve üstü, 36 sağlıklı kadına 12 hafta süreyle verilmiştir, çalışma sonucunda ciltlerin daha yüksek nem kapasitesine ulaştığı, elastikiyet, pürüzsüzlük ve

yoğunluk artışı olduğu görülmüştür (Bolke vd., 2019).

Moskowitz tarafından 2000 yılında kemik metabolizmaları üzerine yapılan bir çalışmada PCR metodu ile kolajen hidrolizatının osteoporoz ve osteoartrit üzerine etkisini araştırılmıştır. 60 gün süren çalışmada, günde 10 gr kolajen hidrolizat tüketimi sonucunda osteoartrit ve osteoporoz tedavisinde fayda sağlandığı görülmüştür. Kolajen hidrolizatının kıkırdak dokusu üzerindeki protein sentezini arttırdığı, dokuların gelişimini uyarıcı etkiye neden olduğu, sporcularda eklem yapısını ve bütünlüğünü güçlendirmesi ve ekrem ağrılarını azaltmaya yardımcı olduğuna dair güçlü gerekçeler olduğu belirtilmiştir (Moskowitz, 2000).

Walrand ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, 100 ml süte ve 100 ml suya ayrı ayrı 10 gr domuz kaynaklı kolajen hidrolizatı ilave edilmiştir. Kolajen hidrolizatının içeriğinde yüksek oranda bulunan glisin, hidroksiprolin, prolin, ve hidroksilizin kan plazmasında bulunan konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Aminoasit analizi sonuçlarına göre kolajen hidrolizatı eklenmiş süt ürünündeki aminoasit konsantrasyonunun suya eklenmiş olandan daha yüksek olduğu görülmüştür (Walran, vd., 2008).

2011 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada 62 kadının balık kolajen hidrolizatı tüketimi sonrasında fibroblast hücrelerinin gelişimi *in vitro* metodu ile incelenmiştir. Kolajen hidrolizat tüketimi sonucunda fibroblast hücrelerindeki aktivite artmış, aynı zamanda vücudun doğal kolajen sentezinin de arttığı görülmüştür (Chai vd., 2011).

2020 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada domuz, sığır ve balık kaynaklı 4 kolajen hidrolizatının biyoyararlılıkları *in vitro* ve *in vivo* ortamda; TIM (TNO Gastro-Intestinal Model) sindirim modeli ve insan serum analizleri ile biyoyararlılıkları incelenmiş, LC-MC ile analizler gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda 4 ürünün de yüksek biyoyararlığına sahip olduğu ve hidroksiprolin taşıyan dipeptit düzeylerinde önemli artış görülmüştür (Kleinnijenhuis vd., 2020).

Wauquier ve arkadaşlarının 2019' da yaptığı çalışmada, kolajen hidrolizatı alımından sonraki 24 saat boyunca farklı zaman noktalarında kanda serbest ve peptit bağlı hidroksiprolinin miktarı ölçülmüştür. Ürünün yutulmasından 0.5 ila 1 saat sonra yüksek absorpsiyon zirvesi gözlenerek hızlı emilim sağlandığı, yüksek biyoyararlılığa sahip olduğu belirtilmiştir (Wauquier vd., 2019).

Kolajen peptitleri/hidrolizatları, kemiklerin ve eklem bozukluklarının tedavisinde ve osteoporozun tedavisinde faydalıdır. Japonya ve Almanya gibi bazı gelişmiş ülkelerde kolajen ve peptitleri, kemik ve eklem problemlerinin bakımı ve tedavisi için fonksiyonel bileşenler olarak satılmaktadır (Guillerminet vd., 2010).

Luo ve arkadaşları tarafından 2020' de yapılan bir çalışmada, balık kolajeninden elde edilen mineral şelatlama etkisine sahip peptitlerin biyoyararlılıkları; *in vivo* yöntem ile sıçanlar üzerinde ve *in vitro* ortamda incelenmiş, yüksek biyoyararlılık sağladığı görülmüş ve *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerinin benzer sonuçlar elde ettiği gözlemlenmiştir (Luo vd., 2020).

2015' de, yaşları 45 ile 65 arasında değişen 106 kadının katıldığı klinik çalışmada 12 hafta boyunca günlük 10 g kolajen hidrolizatı kullanımı sonrasında kolajen dokusundaki ağ parçalanmalarının %31 oranında azaldığı, kolajen yoğunluğunun %9 oranında arttığı gözlemlenmiştir (Asserin vd., 2015).

Yapılan klinik çalışmalara göre kolajen hidrolizatının kemik ve eklemleri hasarlardan koruyarak, eklemleri ve kemikleri güçlendirdiği, osteoarthritis gibi önemli sağlık problemlerinde oluşan ağrıları azalttığı ve kemik yoğunluğunu önemli düzeyde arttırdığı kanıtlanmıştır. Aynı şekilde cilt kusurlarında iyileşme sağlayarak, derinin su tutma kapasitesini artırdığını, fibroblast hücrelerinin gelişimini hızlandırarak olumlu etkilere neden olduğu görülmüştür.

## **2.9. Biyoerişilebilirlik ve Biyoyararlılık**

Biyoerişilebilirlik kavramı, besinlerin sindirimi sonrasında çözünerek bağırsak emilimi için erişilebilir hale gelmesi olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak gıda matrisinden salınımı olmayan ve intestinal bariyerden geçme özelliği göstermeyen besin bileşenleri biyoerişilebilir değildir (Hedren, Diaz ve Svanberg, 2002).

Biyoyararlanım, gerçekte emilerek, dokulara dağıtılan ve metabolize edilerek vücut tarafından atılan besin veya bileşenlerin miktarını tanımlanmaktadır (Holst ve Williamson, 2008). Benito ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir tanım ise; gıdada bulunan bileşeni vücudun aldığı miktarda kullanma oranıdır. Ayrıca biyoyararlılık; emilim ve metabolik faaliyetlere katılma oranı, dokulara dağılım miktarı şeklinde de ifade edilmektedir (Schumann vd., 1997). Beslenme konusunda biyoyararlılık ise; gıda ürününde bulunan bir bileşenin vücudumuzdaki sindiriminden

sonra fizyolojik fonksiyonlara katılması için kullanılan yada depolanan miktarın, başlangıç miktarına oranı şeklinde ifade edilmektedir (Fairweather-Tait, 1993).

Ayrıca biyoyararlanım besinlerin gastrointestinal enzimlerle sindirimini, ince bağırsakta absorpsiyonunu, dokulara dağılmasını ve biyoaktiviteyi içermektedir (Yaman vd., 2021). Bir besin bileşeninin biyoyararlı olarak tanımlanması için ilk şart biyoerişilebilir olmasıdır (Rodriguez-Roque vd., 2014). Biyoyararlılık ve biyoerişilebilirlik konusunda yapılan çalışmalarda, besin maddelerinin biyoerişilebilirliği ve dolayısıyla biyoyararlılığı belirlenirken genellikle *in vivo* veya *in vitro* yöntemler kullanılmaktadır. *İn vivo* olarak yapılan bu çalışmaların, etik olarak sorun yaşanması, zaman alan, yoğun, maliyetli, karmaşık ve çalışılan numune sayısının sınırlı olduğu çalışmalardır. *İn vitro* yöntemler ise çok sayıda numunenin basit, ekonomik, hızlı ve tekrarlanabilir şekilde analiz edilmesini sağlar (Capanoğlu vd., 2008).

*İn vivo* yöntemlere alternatif olarak geliştirilen *in vitro* yöntemler, besin biyoerişilebilirliğini belirlemek için sıklıkla kullanılır (Yaman vd., 2021). Kapsamlı uygulama prosesleri ve potansiyellerine rağmen, *in vitro* yöntemler, *in vivo* çalışmaların tüm sürecini tam anlamıyla taklit edemeyebilirler. Biyoyararlılık ile ilgili *in vitro* çalışmalarda kesin sonuç alınabilmesi için, *in vivo* deneylerle doğrulanması önerilmiştir (Bouayed ve ark., 2011). Buna rağmen, *in vitro* gastrointestinal sindirim analizleri, insanların ortalama gereksinimini tahmin etmek için gerekli verileri sağlar (Uğur vd., 2020). Literatür çalışmalarında, *in vitro* sindirim ortamında yapılan biyoerişilebilirlik çalışmalarından elde edilen verilerin, *in vivo* çalışmalarla karşılaştırıldığında aralarında bir korelasyon varlığı tespit edilmiş, bu durum kolay, hızlı ve güvenli sayılan *in vitro* çalışmalarının kullanımını arttırmaktadır (McDougall vd., 2005). Gıdaların biyoerişilebilirlik analizleri, hücre kültürü laboratuvarlarında Caco-2 hücreleri kullanılarak ve ağız-mide-ince bağırsak koşullarının simüle edildiği *in vitro* sindirim metotları ile belirlenmektedir (Courraud vd., 2013).

*In vitro* yöntemlerde, ağız fazında  $\alpha$ -amilaz, mide fazında pepsin ve bağırsak yolu boyunca pankreatin ve safra tuzlarının bir karışımı kullanılarak simüle edilmiş bir gastrointestinal sindirim sistemi hazırlanmaktadır (Kulkarni vd., 2007). Ağızda gerçekleştirilen sindirim deneye ve gıdaya göre değişmektedir. Protein, amino asit veya peptitlerin sindirim prosedüründe ağız ortamı genellikle değerlendirilmemektedir. Bu nedenle sindirim prosedürü süreci mide ve ince bağırsak

ortamının simüle edilmesiyle gerçekleştirilir (Larder, 2022). Kolajen, doğal bir protein formunda tüketildiğinde, küçük peptitler veya serbest amino asitler haline gelmek için mide ve ince bağırsak sindirim sisteminde enzimlerin de etkisiyle daha küçük molekül ağırlığındaki peptitlere dönüşür. Daha sonra peptitler, serbest amino asitler ve di- veya tripeptidler formunda bağırsak tarafından emilirler. Kolajen hidrolizatı ile kolajen molekülü kıyaslandığında kolajen hidrolizatının enzimatik üretim prosesinde düşük molekül ağırlığına indirilmesi sebebiyle kolajen molekülüne kıyasla vücut tarafından kolayca sindirilir ve yüksek emilime sahiptir (López, 2020).

Deniz kaynaklı kolajen hidrolizatının tüketildikten 4 saat sonra bağ dokusunda biyolojik olarak bulunduğunu ve % 90'ının sindirildiğini ortaya koymuştur (Peptan, 2022). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kolajen hidrolizatların %90'ından fazlasının sindirildiği ve ağızdan alımdan sonra hızla emildiği bilinmektedir. Biyoyararlılık çalışmalarında *in vitro bulguların in vivo* bulgular teyit edilmesi önemlidir (Asghar ve Henrickson, 1982; Oesser, vd., 1999 ).

2015'de yapılan bir çalışmada kolajen hidrolizatının oral alımından sonra kan plazmasındaki artan amino asit miktarının ( $\mu\text{g/mL}$ ) kolajen içeriğine (%) karşı korelasyon eğrisinde hidroksiprolin amino asidinin en yakın değerinde olduğu görülmektedir. Bu nedenle hidroksiprolin amino asidinin kolajen hidrolizatının biyoerişebilirliğinin değerlendirilmesinde uygun bulunmaktadır (Wang vd., 2015).

*In vitro* ortamda sindirim modeli ile yapılan çalışmada, peynir altı suyu içeceklerine 5 farklı oranda (% 0, % 0.3, % 0.5, % 0.7, % 1) düşük molekül ağırlığına ( $5.79 \pm 0.30$  kDa) sahip kolajen hidrolizatı ilavesi gerçekleştirilerek kolajen hidrolizatını ilavesinin biyoyararlılığa etkisi incelenmiştir. % 0.3 kolajen hidrolizatı ilaveli içecekler, %  $1.22 \pm 0.15$  ile en düşük biyoyararlılık oranını göstermiştir. Kolajen hidrolizatı oranı arttırıldığında biyoyararlılık oranının arttığı ve %1.0 oranında ilave edilen kolajen hidrolizatının %  $58.95 \pm 2.72$  biyoyararlılık sağladığı görülmüştür. Kolajen hidrolizatları antimikrobiyal ve antioksidan vb. fonksiyonel özellikleri arttırmak için peynir altı suyu içeceğine fonksiyonel bir içerik maddesi olarak eklenmiştir. Hidroksiprolin konsantrasyonuna bağlı olarak biyoyararlılığın oranının arttığı görülmüştür (López, 2020).

2007 yılında beş sağlıklı erkek gönüllü üzerinde yapılan klinik bir çalışmada, 12 saatlik açlıktan sonra balık pulu, balık derisi veya domuz derisinden elde edilen Tip I jelatin hidrolizatlarının oral tüketimi sonrasında insan kanındaki miktarı ve yapıları incelenmiştir. 24 saatlik bir süre boyunca hidrokspirolin içeren peptit miktarları, tespit edilen tüm Hidrokspirolin miktarının yaklaşık %30' unu oluşturduğu görülmektedir. Yapılan çalışmada jelatin hidrolizatlarının ağızdan uygulanmasından sonra insan kanındaki Hidrokspirolin içeren peptitlerin miktarının ve yapısının jelatin kaynağına bağlı değiştiği ve kaynağın biyoyararlılığı etkilediği sonucuna varmışlardır. Hidrokspirolin içeren peptitlerin miktarı jelatin kaynağına göre değişkenlik gösterdiği ve Prolin-Hidrokspirolinin kolajen hidrolizatının oral alımından sonra insan kan plazmasındaki ana peptit olduğu görülmüştür (Ohara, vd., 2007).

Chen ve ark. (2020), tilapia balığı derisinden elde edilen kolajen hidrolizatına ilave edilen çinko mineralinin etkisini belirlemek için simüle edilmiş bir *in vitro* sindirim modeli kullanmıştır. Mide ve bağırsak sindirim aşamalarını simüle etmek için pepsin ve pankreatin enzimleri kullanılmıştır. Çinko mineralinin düşük molekül ağırlığına sahip kolajen peptitlerinin mide ve bağırsak geçişlerinde stabilizeyi koruyarak biyoerişilebilirliğinin iyileştirildiği görülmüştür.

Kolajenin elde edildiği kaynağa göre farklı amino asit kompozisyonu içermesi, kolajen hidrolizatının üretim metodu ve düşük molekül ağırlığı, kolajen hidrolizatına ilave edilen multivitamin&mineral ve biyoaktif bileşikler biyoyararlılığı etkilenen en önemli faktörlerin başında gelmektedir. Düşük molekül ağırlığına sahip kolajen hidrolizatlarının daha yüksek biyoyararlılık gösterdiği kanıtlanmıştır. Besinlerin metabolizmada kullanımı ve gösterdikleri biyoyararlılık, *in vitro* analizleri, her bireyin mide ve bağırsak koşulları, gastrointestinal durumları, farklı olduğundan bireyler arasında farklılık gösterebilir (Thakur vd., 2020).

2018'de yapılan çalışmada belirlenen konantrasyonlarda, Peptan markalı kolajen hidrolizatı (0.3–8 kDa) ve bunlara ilave edilen biyoaktif bileşikleri içeren ACTIVE GOLD COLLAGEN (ACTIVE) (Kolajen hidrolizatı, Hyalorunik asit, Glikozamin hidroklorid, L-karnitin, Maca kökü ekstresi, Piperine) ve GOLD COLLAGEN FORTE (FORTE) (Kolajen hidrolizatı, Karnosin, Koenzim Q10, Resveratrol, Hodan Tohumu yağı/ Çuha çiçeği yağı, Hyalorunik asit, Glikozamin hidroklorid, L-karnitin, Maca kökü ekstresi, Hyalorunik asit, Piperine, Likopen, Acai

berry özü, Nar suyu) gıda takviye ürünlerinin kolajen hidrolizatına her birinin ve kombinasyon halinde eklenmelerinin *in vitro* ortamda dermal fibroblast hücreleri (NHDF) üzerindeki etkileri ve kolajen-elastin üzerine etkileri karşılaştırılarak incelenmiştir. Tek başına kolajen hidrolizatlarının hücrelerdeki elastin miktarında önemli ölçüde artışa sebep olduğu, FORTE isimli gıda takviye ürünüdeki 9 biyoaktif bileşimin ilavesi ile hücrelerdeki elastin miktarının daha da arttığı görülmüş, hücrelerdeki kolajen miktarında değişiklik gözlenmemiştir. AKTİVE isimli gıda takviye ürünüde kolajen hidrolizatına kombinasyon halinde ilave edilen biyoaktif bileşenlerin hücrelerdeki kolajeni önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür. Biyoaktif bileşenlerin bireysel kombinasyonları göz önüne alındığında kolajen peptitleri+ hyaluronik asit+ glukozamin içeren kombinasyonunun kolajen peptitleri+ hyaluronik asit içeren kombinasyona kıyasla hücrelerdeki kolajeni önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür. Yapılan çalışmada kolajen hidrolizatına ilave edilen biyoaktif bileşiklerin hücrelerdeki kolajen ve elastini önemli ölçüde artırdığı olumlu etki gösterdiği görülmüştür (Edgar vd., 2018).

2015' de yapılan bir çalışmada 4 farklı içeriğe sahip (%100 portakal, turuncu-beyaz üzüm, elma ve elma-beyaz üzüm) meyve sularından hazırlanan içeceklere 5 farklı oranda kolajen hidrolizatı (%1, 1.5, 2, 2.5 ve %3) ilave edilmiştir. Kolajen hidrolizatı olarak balıktan enzimatik olarak türetilen kolajen hidrolizatı (2000 Da, Rousselot/Peptan) kullanılmıştır. Her bir ürünün duyusal analiz sonuçları dikkate alındığında %2,5 konsantrasyonda hidrolize kolajen tercih edilmiştir. Yapılan çalışmada, hidrolize kolajenin *in vitro* ortamda gastrointestinal sindirim modeli üzerinden incelenen biyoyararlanımının çok yüksek olduğunu göstermektedir. *In vitro* ortamda gastrointestinal sindirim prosedürü sonrasında değerlendirilen biyoyararlılık sonuçlarına göre; % 2.5 konsantrasyonda hidrolize kolajen ilave edilen içeceklerden, portakal (%95.37) ve elma suyu (%90.71) içeceklerinin biyoyararlılıkları daha yüksek bulunmuş, üzüm suyu ilavesi bu değeri portakal-üzüm suyu ve elma-üzüm suyu karışımları için sırasıyla% 83.38 ve %86.34'e düşürmüştür. Biyoyararlanımdaki azalma, beyaz üzüm suyundaki fenolik bileşiklerin özellikle proteinlerin sindirilebilirliğini doğrudan ya da dolaylı olarak azaltma kabiliyetine sahip olmaları ile ilişkilendirilmektedir (Bilek ve Bayram, 2015).

Biyoyararlılığını ve biyoyararlılığını etkileyen faktörlerin başında; kişiye bağlı faktörler (yaş, cinsiyet, gastrointestinal sistem stabilitesi, bağırsak mikrobiyotası, HCl ve enzim salgılaması, bağırsaktaki enzim aktivitesi, genetik ve hormonal faktörler vb.), gıda takviyelerinin içerdiği kolajen hidrolizatlarının elde edildiği kaynak, üretim metodu ve son ürüne gelinceye kadar maruz kaldığı prosesler, amino asit kompozisyonu, düşük molekül ağırlığı, kolajen hidrolizatlarına ilave edilen multivitamin, mineral, folifenol, probiyotik vb. biyoaktif bileşiklerin sinejik etki yaratması vb. faktörler gelmektedir (Ercan ve El, 2010; Wang, vd., 2019; Porrini ve Riso, 2008). Ayrıca kolajen hidrolizatının üretim prosesinde veya son ürün eldesine kadar maruz kaldığı işleme teknolojileri (yüksek sıcaklık vb.) esnasında da amino asitlerin yapısı ve stabilitesi etkilenebilir, biyoyararlılığı düşebilir (Udenigwe, vd., 2021).

Ferguson'un (2001) belirttiği gibi, polifenoller, proteinlerin sindirilebilirliğini azaltma ve ardından fekal nitrojen atılımını artırma yetenekleri nedeniyle geleneksel olarak "antibesinler" olarak kabul edilmiştir. En az üç flavonol birimi içeren oligomerler, proteini etkili bir şekilde çökeltebilmektedir. Polifenollerin gösterdiği karşı etkiler, belirli polifenollerin proteinleri doğrudan bağlama ve çökeltilme yeteneğinin bir sonucu olabilirken, sindirim enzimlerinin aktivitesinin allosterik inhibisyonundan da kaynaklanabilmektedir. Ayrıca bazı polifenoller metal katyonlarla kompleksler oluşturarak demir ve bakır gibi minerallerin bağırsak emilimine müdahale edebilmektedir.

Polifenoller gastrointestinal sindirim sırasında diğer gıda bileşenleri ile etkileşime girebilmekte (örn; iyonların şelatlanması), daha fazla parçalanabilmekte (ince bağırsakta antosiyaninler), ya da metabolize olabilmektedirler (esterazlar ile yarıma yoluyla hidroliz gibi). Bu yapısal değişiklikler hem daha fazla alımlarını hem de biyoaktivitelerini etkilemektedir (Bouayed ve diğ., 2011). Aynı zamanda, polifenollerin biyoyararlanımı, gıdaların kimyasal bileşimi, gıda matrislerinden salınımı, diğer gıda bileşenleri ile etkileşimleri ve destekleyici maddelerin veya kofaktörlerin varlığından etkilenmektedir (Parada & Aguilera, 2007). Ayrıca, ekstrakte edilemeyen gıda polifenollerinin, ince bağırsakta sindirim enzimlerinin etkisi ile veya kalın bağırsakta bakteriyel bozulma ile besin matrisinden salınabileceği ve insan bağırsağında biyoaktif hale gelebileceği ifade edilmiştir (Jenner ve diğ., 2005).

Kolajen hidrolizatlarını mide-bağırsak sindirim koşullarından korumak, bozulmamış formda bağırsak emilimini iyileştirmek ve biyoerişilebilirliklerini arttırmak amacıyla nano kapsülleme, lipozomal sistemler, enterik kapsülleme vb. sistemler önerilmektedir (Udenigwe, vd., 2021).

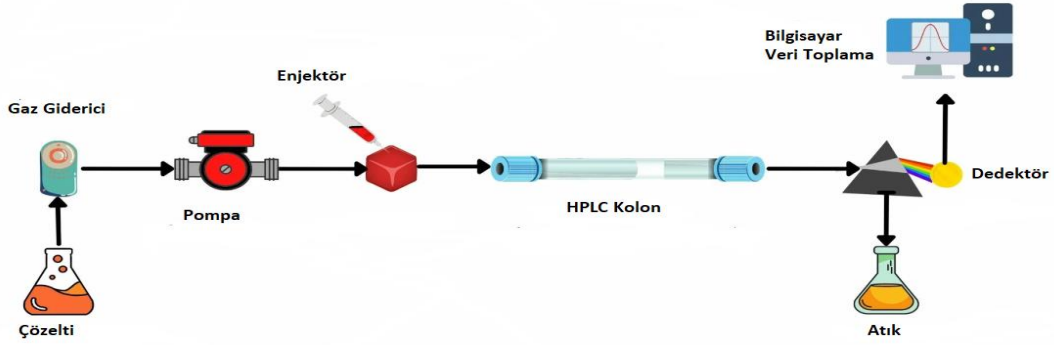


## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM MATERYAL METOT

### 3.1. Örneklem

Bu çalışma Kasım 2022’de İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Gıda Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı ve Amerikan Gıda Veri Tabanı örneklem planı kuralları referans alınarak örneklem planı oluşturulmuştur (Yaman vd., 2015). İstanbul’da farklı ilçelerdeki eczanelerde satışı sunulan, kolajen hidrolizatu içeren 16 farklı gıda takviyesi temin edilmiştir. 16 adet kolajen hidrolizatu içeren gıda takviyesinin; 7 adeti toz formda, 4 adeti tablet formda, 5 adeti sıvı formda kolajen hidrolizatu içeren gıda takviye ürünüdür, etiket bilgileri Tablo 3.1’ de görülmektedir.

Bu gıda takviye ürünlerinin amino asit kompozisyonu ve *in vitro* gastrointestinal sindirim modeli ile biyoerişilebilirliği HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) yöntemi ile analiz edilmiştir. HPLC cihazı Şekil 3.1’ de görülmektedir.



Şekil 3.1: HPLC Cihazının Şematik Gösterimi

**Tablo 3.1: Kolajen Hidrolizatı İçeren Gıda Takviye Ürünlerinin Etiket Bilgileri**

Numuneler	Etiket Bilgisi
0	Referans Kolajen TIPI (Sığır /2000 Dalton)
1	Hidrolize Kolajen TIPI&TIPIII (Sığır/2000 Dalton)
2	Hidrolize Kolajen TIPI&TIPIII (Sığır/2000 Dalton), Vitaminler, Biyoaktif Bileşikler
3	Hidrolize Kolajen TIPI (Marine Kolajen), Vitamin, Biyoaktif Bileşik
4	Hidrolize Kolajen TIPI&TIPIII (Sığır), Vitaminler, Tat verici, Aroma verici, Asit Düzenleyici, Topaklanma Önleyici
5	Hidrolize Kolajen TIPI&TIPIII (Sığır/2000 Dalton)
6	Hidrolize Kolajen TIPI (Balık)
7	Hidrolize Kolajen TIPI&TIPIII (Sığır/2000 Dalton), Vitaminler, Biyoaktif Bileşikler, Tat verici, Aroma verici, Asit Düzenleyici, Topaklanma Önleyici
8	Hidrolize Kolajen TIPI&TIPIII (Sığır), Hidrolize Kolajen TIPI (Balık), Kolajen Hidrolizatı (Yumurta Kabuğu Zarı), Vitamin, Biyoaktif Bileşikler, Parlaticı, Topaklanmayı Önleyici, Stabilizatör
9	Hidrolize Kolajen TIPI&TIPIII (Sığır /2000 Dalton), Vitamin ve Mineral, Topaklanmayı Önleyici, Hacim Arttırıcı
10	Hidrolize Kolajen TIPII, Mineral, Biyoaktif bileşikler , Hacim Arttırıcı, Kıvam Arttırıcı, Topaklanma Önleyici
11	Hidrolize Kolajen TIPII (Tavuk), Vitaminler, Mineral, Biyoaktif bileşikler, Parlaticı, Hacim Arttırıcı, Topaklanma Önleyici
12	Kolajen Hidrolizatı (Balık/ 2000 dalton), Vitaminler, Biyoaktif bileşikler, Deiyonize Su, Sitrik Asit, Koruyucu, Aroma maddesi
13	Hidrolize Kolajen TIPI&TIPII&TIPIII (Sığır/2000 dalton), Vitaminler, Mineral, Biyoaktif bileşikler , Deiyonize Su,Tat verici, Aroma verici, Asit Düzenleyici
14	Hidrolize Kolajen (Sığır/2000 dalton), Vitaminler, Mineral, Biyoaktif bileşikler , Deiyonize Su, Tat verici, Aroma verici, Asit Düzenleyici
15	Hidrolize Kolajen TIPI&TIPII&TIPIII (Sığır), Vitaminler, Mineral, Biyoaktif bileşikler, Deiyonize Su, Tat verici, Aroma verici, Asit Düzenleyici, Renklendirici, Tatlandırıcı
16	Hidrolize Kolajen TIPI&TIPIII (Sığır), Vitaminler, Mineral, Biyoaktif bileşikler, Deiyonize Su, Tat verici, Aroma verici, Asit Düzenleyici

### 3.2. Materyaller

Çalışmada, piyasada satılan 16 adet kolajen hidrolizatı gıda takviyesi ve bir adet referans kolajen Tip I (%99 saflık) ile analitik dereceye sahip Merck (Almanya) ürünleri materyal olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan ekipmanlar ve kimyasallar İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Gıda Laboratuvarından temin edilmiştir. Analiz için kullanılan tüm kimyasallar ve reaktifler analitik veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) derecesine sahiptir. Çalışmada kullanılan ekipmanlar Tablo 3.2’ de kullanılan kimyasallar ise Tablo 3.3’de gösterilmiştir.

**Tablo 3.2: Analizde Kullanılan Ekipmanlar ve Markaları**

Kullanılan Ekipmanlar ve Markaları	
HPLC	Shimadzu
Analitik ters fazlı kolon (ACE C18, 5 µm 4,6x250 mm)	Lichospher 60 RP-select B (5 µm) LiChroCART 250-4 HPLC cartridge
Su destilasyon cihazı	Direct-Q 3 UV ultrapure (type I)
0,22 µm ve 0,45 µm CA filtre	Chromafil CA-45/25
Analitik terazi (±0,0001 g hassasiyette)	Radwag – AS 220.R2
Manyetik karıştırıcı	Isolab Labor geröte GmbH
Otoklav	Selecta Presoclave – II
pH metre	HANNA HI/2211PH/ORP Meter
Otomatik pipet (100/1000µl-5/50µl/200µl)	Axypet- autoclavable
Ultrasonik su banyosu	Selecta ultrasons H-D
Azot gazı (%99,999 saflıkta)	
Analiz şişeleri (50 ml’lik ağzı kapaklı) ve cam tüpler	

**Tablo 3.3: Analizde Kullanılan Kimyasallar**

Açık Adı, Kısaltması Kapalı Formülü	Açık Adı, Kısaltması Kapalı Formülü	Açık Adı, Kısaltması Kapalı Formülü
Hidroksiprolin, HYP	Glisin, Gly C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	L-Alanin, Ala C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>
Fenilzotiyosiyanat, PITS C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NCS	L-Histidin His C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	L-Arjinin, Arg C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
Amonyum asetat CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	L-İsolöysin İle C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	L-Aspartik Asit, Asp C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub>
Metanol, MeOH CH <sub>3</sub> OH	L-Lösin, Leu C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	Hidroksiprolin, Hyp C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>
Hidroklorik asit HCl	L-Lisin, Lys C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	L-Glutamik Asit, Glu C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>

**Tablo 3.2: Analizde Kullanılan Kimyasallar (Devamı)**

Açık Adı, Kısaltması Kapalı Formülü	Açık Adı, Kısaltması Kapalı Formülü	Açık Adı, Kısaltması Kapalı Formülü
Asetonitril, ACN CH <sub>3</sub> CN	L-Metiyonin, Met C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	L-Treonin, Thr C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>
Trietilamin, TEA (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> N	L-Prolin, Pro C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	L-Tirozin, Tyr C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>
Sodyum dihidrojenfosfat dihidrat NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	L-Fenilalanin, Phe C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	L-Valin, Val C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>
Disodyum hidrojenfosfat dihidrat Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	L-Serin, Ser C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	Glisin, Gly C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>
L-Histidin C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Amonyum asetat CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	Meta fosforik asit (HPO <sub>3</sub> )
Potasyum dihidrojen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Orto fosforik asit (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ),	DL-Ditiotreitol (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )

### 3.3. Çözeltilerin Hazırlanması

Çözeltiler çalışmanın yapılacağı zaman hazırlanmıştır. Mobil faz, süzme cihazından süzülerek ve ultrasonik su banyosunda gazı alınarak kullanılmaktadır.

#### **Amino Asit Kompozisyonu için Çözelti Hazırlama;**

**Hidroklorik Asit Çözeltisi (0,1 N HCl):** 1 L'lik balon jöjeye 8,28 ml HCl konularak, deiyonize su ile hacimine tamamlanır.

**Hidroklorik Asit Çözeltisi (6 N HCl):** 1 L'lik balon jöje 496,8 ml HCl konularak, deiyonize su ile hacimine tamamlanır.

**Asetonitril:Metanol:Trietilamin (ACN:MeOH:TEA) Karışımı:** 200 ml'lik balon jöjeye 100 ml asetonitril, 20 ml trietilamin , 50 ml metanol konur ve karıştırılır.

**Amonyum Asetat Çözeltisi (0,02 M):** 200 ml'lik balon jöjeye 0,31 g amonyum asetat tartılır ve hacimine deiyonize suyla tamamlanır.

**Türevlendirme Çözeltisi:** 100 ml'lik balon jöjeye 1,2 ml fenilizotiyosiyanat ve 100 ml asetonitril eklenir ve karıştırılır.

#### **İn Vitro Sistemde Mide ve İnce Bağırsak Ortamı Hazırlama;**

**Yetişkin mide ortamı:** 18 ml CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (22 g/L), 6.5 ml HCl (37 g/L), 1 g sığır serumu albümini, 3 g musin, 2.5 g pepsin ve 500 ml'lik bir erlen içerisinde deiyonize su ile çözündürülerek, hacim deiyonize su ile tamamlanmış ve pH 1.5'a getirilmiştir.

**İnce bağırsak ortamı:** 9 ml CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (22.2 g/L), 6.3 ml KCl (89.6 g/L), 1 g

pankreatin, 2 g sığır serum albümini ve 1.5 g lipaz, deiyonize su ile 500 ml'lik bir erlen içerisinde çözündürülmüştür. Hacim deiyonize su ile tamamlanarak ve pH 8.0' e ayarlanmıştır.

**Safra solüsyonu:** 10 ml CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (22.2 g/L), 68.3 ml NaHCO<sub>3</sub> (84.7 g/L), 30 g safra, 1.8 g sığır serum albümini 500 ml'lik bir erlende deiyonize su ile çözdürülmüştür. Daha sonra hacim, deiyonize su ile tamamlanara ve pH 7.0'ye ayarlanmıştır.

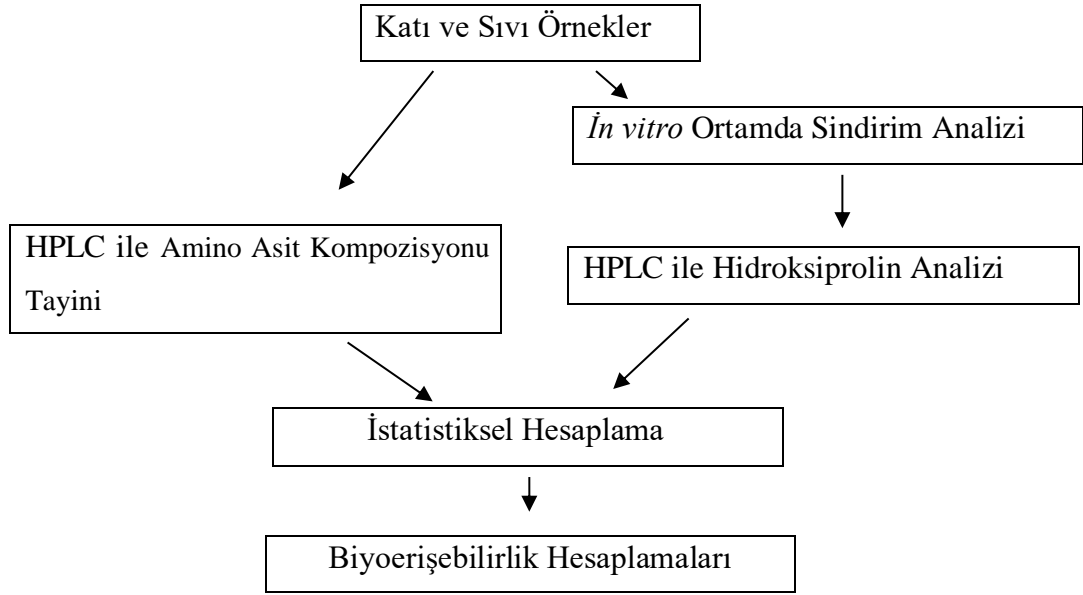
### **Standart Çözeltilerin Hazırlanması:**

**Amino Asit Standardı (karışım) (100 µg/ml):** 100 ml'lik balon jøjeye her bir amino asit standardından 10 mg tartılarak 0,1 N hidroklorik asit ile çözülür ve hacimine tamamlanır. Stok standart çözeltisinden gereken seyreltmeler yapılarak çalışma standartları hazırlanmaktadır.

**Hidroksiprolin Standardı (100 µg/ml):** 100 ml'lik balon jøjeye hidroksiprolin standardından 10 mg tartılarak 0,1 N hidroklorik asit ile çözülür ve hacimine tamamlanır. Stok standart çözeltisinden gereken seyreltmeler yapılarak çalışma standartları hazırlanmaktadır.

### **3.4. Metot**

Piyasada satılan kolajen hidrolitazı içeren 16 adet gıda takviyesine; Amino Asit Kompozisyonu Tayini gerçekleştirmiş ve *in vitro* ortamda sindirim prosedürü uygulanmıştır. *İn vitro* sindirim öncesi ve sonrasındaki, kolajen miktarının tespitinde kullanılan, hidroksiprolin miktarları üzerinden biyoerişebilirlik hesaplamaları yapılmıştır. Bu çalışmada yapılacak analizler 2 tekrarlı ve 2 paralel şeklinde gerçekleştirilmiştir. Örneklerin amino asit kompozisyonu tayini ve *in vitro* ortamda gastrointestinal sindirimi sonrasında yapılan hidroksiprolin tayini sonuçları uygun HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Tez çalışma planı Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.2: Tez çalışma planı**

#### 3.4.1. Amino Asit Kompozisyonun Tayini

Amino asit kompozisyonu tayini Bidlingmeyer ve ark. (1984) uyguladığı yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Yüksek Hızlı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Shimadzu cihazı kullanılmıştır. Amino asit kompozisyonu 17 amino asidi (hidroksiprolin, alanin, aspartik asit, serin, glutamik asit, glisin, histidin, arjinin, treonin, prolin, lizin, lösin, tirozin, izolösin, valin, fenilalanin, metiyonin) kapsar.

Amino asit kompozisyonu analiz yöntemin prensibi, örnekteki proteinlerin amino asit bileşenlerine parçalanması için uygulanan asidik hidroliz sonrasında, fenil izotiyosiyanat ve asetonitril:metanol:triethylamin çözeltisiyle türevlendirilerek HPLC cihazında okunması esasına dayanmaktadır. Sindirim öncesi ve sonrasındaki hidroksiprolin miktarları üzerinden biyoeişebilirlik değerleri hesaplanmıştır.

Amino asit kompozisyonu için örneğin hazırlanması; 0,2 g toz ve 5 ml sıvı homojenize edilmiş örnek 50 ml'lik ağzı kapalı shot şişe içerisine alınır. 20 ml, 6 N HCl çözeltisinden ilave edilir ve ağzı sıkıca kapatılır. 24 saat boyunca, 110°C' de etüvde hidroliz edilir. Örnek, oda sıcaklığına getirilir ve süzülür. Süzüntüden 0,2 ml deney tüpüne alınır, azot gazı altında 50°C'de uçurularak, üzerine 0,5 ml asetonitril koyularak uçurma işlemi tekrarlanır. Tüp içerisindeki kalıntıya 0,5 ml asetonitril:metanol:triethylamin karışımı ve 0,1 ml türevlendirme çözeltisinden ilave edilerek 30 dakika süre ile 40°C etüvde türevlendirilir. Azot gazı altında 40°C'de

uçurulur ve üzerine 0,2 ml asetonitril ilave edilerek azot gazı altında tekrar uçurulur. zerine 5 ml 0,02 M amonyum asetat zeltisi eklenir, vortekslenir ve 0,2 µm filtreden süzme işlemi gerçekleştirilerek HPLC cihazına enjekte edilir.

Kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürünlerindeki kolajen miktarı AOAC'de (2006) aşağıda belirtilen formülüne göre hesaplanmıştır.

Kolajen miktarı (g/100 g veya ml)= % Hidroksiprolin miktarı x 8\*

\* Hidroksiprolinin kolajene dnm faktörü

### **3.4.2. Kolajen Hidrolizatlarının Biyoeriilebilirliğinin *İn Vitro* Sindirim Modeli Kullanılarak Tayini**

Kolajen hidrolizatlarının biyoeriilebilirliğinin belirlenmesinde kullanılan in vitro gastrointestinal sindirim modeli Lee, Lee, Chung ve Hur'un (2016)'den modifiye edilmiştir. Model mide ve bağırsak ortamından oluşmaktadır. 100 ml'lik falkon tüplere kuru örneklerden 0,2 gr gram, sıvı örneklerden 1 ml tartıldı ve sıra ile mide ve ince bağırsak ortamı solüsyonları ilave edilerek in vitro ortamda sindirim prosedürü gerçekleştirilmiştir.

Mide ortamında; mideye gelen karışıma 12 ml mide solüsyonu ilave edilerek, bu karışım 30 saniye boyunca vorteks ile karıtırılmıtır. 37 ° C'de 1 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir.

İnce bağırsak ortamında; mide ortamı sonrasında elde edilen karışıma 10 ml ince bağırsak solüsyonu ve 5 ml safra solüsyonu eklenerek, karışım 37°C'de 2 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Sindirim işlemi sonrasında son hacim, 50 ml deiyonize su ile tamamlanarak seyreltilmiştir. Numuneler 8000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen karışım 0.22 mikron CA filtreden süzülür. İnce bağırsak ortamı sindirimi sonrası, elde edilen szntden 1 ml alınır ve sindirim sonrası örneklerle hidroksiprolin tayini gerçekleştirilir.

Biyoeriilebilirlik, aşağıdaki formülde belirtildiği şekilde, sindirim sonrasında bulunan hidroksiprolin miktarının, örnekte bulunan hidroksiprolin miktarına bölünmesi ile hesaplanmıştır (Wang vd., 2015).

$$\% \text{ Biyoerişebilirlik} = \frac{\text{Sindirim Sonrası Hidroksiprolin Miktarı}}{\text{Sindirim Öncesi Hidroksiprolin Miktarı}} \times 100$$

### 3.5. HPLC Koşulları:

**Mobil Faz A:** 1 L'lik balon jöjeye 0,88 g disodyum hidrojen fosfat dihidrat ve 0,78 g sodyum dihidrojen fosfat dihidrat tartılır. Deiyonize su ile hacimine tamamlanır. Tampon çözeltisinin pH değeri 6,8-6,9 arasında olacak şekilde ayarlanarak ve süzme işlemi gerçekleştirilir.

**Mobil Faz B:** Asetonitril

**Dedektör:** UV

**Kolon Sıcaklığı:** 40°C

**Dalga Boyu:** 254 nm

**Akış Hızı:** 1 ml/dakika

**Enjeksiyon Hacmi:** 10 µl

### 3.6. İstatistiksel Analiz ve Hesaplama

Tüm analizler iki kez ve iki paraleli yapıldı ve elde edilen sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Uygulamalar arasındaki önemli farklılıklar tek yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (ANOVA p <0.05, Turkey testi).

Lineer aralık hesaplanırken konsantrasyonlar arasındaki  $R^2=0,99$ ' dir. Örneğin konsantrasyonu oluşturulan kalibrasyon doğrusundan belirlenmiştir. Hesaplama konsantrasyonuna veya pik alanına göre standardın örnekle karşılaştırmasıyla ve tartılan örnek ile seyreltme miktarları dikkate alınarak hesaplama gerçekleştirilmiştir.

## **DÖRDÜNCÜ BÖLÜM**

### **BULGULAR ve TARTIŞMA**

#### **4.1. Kolajen Hidrolizatı Gıda Takviye Ürünlerinin Amino Asit Kompozisyonu ve Kolajen İçerikleri**

Amino asit kompozisyonu tayininde 17 amino asidin (hidroksiprolin, alanin, aspartik asit, serin, glutamik asit, glisin, histidin, arjinin, treonin, prolin, lizin, lösin, tirozin, izölösin, valin, fenilalanin, metiyonin) amino asit kompozisyonu HPLC (Yüksek Hızlı Sıvı Kromatografisi) cihazı kullanılarak incelenmiştir. Kolajen hidrolizatı içeren 16 farklı gıda takviyesinin ve kontrol örneğinin amino asit kompozisyonu Tablo 4.1' de verilmiştir.

Kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürünlerinin amino asit kompozisyonu incelendiğinde, sığır, balık ve tavuk kaynaklı kolajen hidrolizatlarının amino asit kompozisyonlarının farklılıklar içerdiği görülmüştür. Kolajenin ayırt edici özelliklerinden birisi prolin, glisin ve hidroksiprolini yüksek düzeyde içermesidir (Stuart ve ark., 2008). Aynı zamanda hidroksiprolin toplam aminoasitlerin yaklaşık %10'unu oluşturmakla birlikte kolajenin kantitatif tayininde kullanılmaktadır (Bhagwat ve Dandge, 2018).

Örnekler hidroksiprolin miktarlarına göre kıyaslandığında; sığır kaynaklarının hidroksiprolin miktarının balık ve tavuk kaynaklı kolajen hidrolizatlarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. AOAC'e (2006) göre hidroksiprolin miktarının kolajen miktarına dönüşüm faktörü 8'dir. Kolajen kaynaklarının farklı amino asit kompozisyonuna sahip olması sebebiyle sığır kaynağına göre daha düşük hidroksiprolin miktarına sahip olan balık ve tavuk kaynaklı kolajen hidrolizatlarının hesaplanmasında, standart kabul edilen dönüşüm faktörüyle hesaplanması sığır kaynağına kıyasla balık ve tavuk kaynaklı kolajen hidrolizatı miktarının düşük miktarda gözükmesine yol açıyor olabilir. Kolajen kaynağına göre hidroksiprolinin kolajene dönüşüm faktörüyle ilgili kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Tablo 4.1: Kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürünlerinin amino asit kompozisyonu (g/ 100 gr veya ml)**

	0*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<b>Hidroksiprolin</b>	12.176±1.2	11.32±1.9	11.13±1.42	8.9±1.9	8.505±1.5	10.125±1.9	7.969±1.42	12,06±1.9	7.027±1.7	0.334±0.07	0.43±0.06	0.285±0.07	2.92±0.36	2.9±0.7	1.9±0.5	2.112±0.3	3.42±0.7
<b>Aspartik Asit</b>	4.497±1	3.232±1.5	3.13±1.3	4.18±1.5	3.593±1.1	4.488±1.5	3.603±1.7	3.492±1.5	0.431±0.1	0.042±0.03	0.152±0.07	0.051±0.02	0.52±0.1	0.114±0.2	0.579±0.2	0.272±0.1	0.162±0.04
<b>Glutamik Asit</b>	7.194±1.73	5.32±1.2	6.024±1.8	7.5±1.6	6.030±1.52	7.180±1.8	6.574±1.5	6.372±1.2	1.714±0.5	0.085±0.02	0.210±0.1	0.042±0.02	0.737±0.21	0.5±0.2	1.001±0.2	0.792±0.2	0.453±0.12
<b>Serin</b>	3.716±0.5	3.76±0.5	3.84±0.9	3.12±1.5	2.390±0.3	3.676±1.4	3.559±0.9	3.196±0.5	2.028±0.4	0.034±0.01	1.380±0.1	0.18±0.03	0.552±0.14	0.524±0.2	0.654±0.1	0.544±0.2	0.481±0.1
<b>Glisin</b>	20.917±3.5	17.95±2.5	18.9±3.4	19.37±2.4	16.359±2.5	20.637±2.4	18.658±2.8	17.794±2.5	10.059±3.1	0.345±0.2	0.608±0.4	0.213±0.1	3.885±0.12	4.326±1.1	3.877±0.6	3.593±0.5	4.310±0.9
<b>Histidin</b>	0.499±0.5	0.523±0.2	0.687±0.4	0.53±0.05	0.547±0.2	0.484±0.3	0.837±0.1	0.573±0.2	0.286±0.03	0.07±0.01	0.012±0.1	0.05±0.01	0.028±0.01	0.032±2	0.063±1.5	0.063±1	0.024±1.9
<b>Arjinin</b>	0.268±0.06	0.08±0.001	0.17±0.5	0.35±0.06	0.203±0.05	0.291±0.07	0.071±1.5	0.004±0.001	0.034±0.01	0.088±0.02	0.161±1.4	0.18±0.03	0.016±0.01	0.012±0.1	0.012±0.1	0.032±0.1	0.028±0.02
<b>Treonin</b>	28.550±4.5	19.26±4.6	26.152±3.8	28.053±4.5	17.309±3.5	28.583±5.5	26.466±4.9	20.126±4.6	9.706±2.5	TE	0.036±0.8	0.45±0.2	0.961±0.2	0.930±0.6	1.805±0.5	1.194±0.2	0.662±0.4
<b>Alanin</b>	7.587±1.4	6.78±1.5	7.89±2.7	7.604±1.6	5.574±1.91	7.604±1.6	7.689±2.1	6.528±1.53	4.071±1.8	0.134±0.06	0.191±0.09	0.21±0.07	1.253±0.3	0.536±0.5	1.265±0.8	0.855±0.3	0.772±0.5
<b>Prolin</b>	15.993±3.9	14.894±1.8	13.115±4.2	12.073±3.7	12.335±4.5	15.976±3.7	13.625±4.6	13.894±2.8	8.684±1.5	0.366±0.1	0.362±0.2	0.32±0.05	3.747±1.1	3.940±1.7	3.704±1.5	3.081±1	4.921±1.6
<b>Trozin</b>	0.321±0.07	0.35±0.01	0.38±0.07	0.41±0.05	0.151±0.3	0.328±0.04	0.325±0.02	0.290±0.01	0.259±0.03	0.01±0.007	0.015±0.13	0.014±0.01	0.019±0.01	0.043±1	0.020±1.5	0.043±1.4	0.139±0.08
<b>Valin</b>	1.711±0.5	1.881±0.6	1.89±0.5	1.93±0.6	1.204±0.3	1.811±0.8	1.792±0.7	1.481±0.5	1.110±0.42	0.134±0.07	0.176±0.1	0.139±0.02	0.388±0.1	0.376±0.2	0.272±0.1	0.232±0.2	0.364±0.2
<b>Metionin</b>	0.194±0.09	0.55±0.2	0.91±0.5	0.177±0.03	0.160±0.08	0.066±0.03	0.926±0.5	0.655±0.2	0.429±0.16	0.039±0.02	0.068±0.08	0.038±0.01	0.063±0.01	0.067±0.05	0.102±0.09	0.155±0.1	0.143±0.1
<b>Izölösün</b>	1.1±0.3	0.96±0.1	0.945±0.2	1.09±0.6	0.666±0.2	1.052±0.7	0.909±0.2	0.910±0.2	0.657±0.3	0.022±0.01	0.037±0.03	0.026±0.01	0.158±0.08	0.158±1.92	0.158±0.12	0.13±3.2	0.269±1.6
<b>Lösün</b>	2.215±0.6	2.24±0.3	2.07±0.8	2.701±0.5	1.593±0.5	2.280±0.5	2.094±0.9	2.064±0.7	1.451±0.5	0.048±0.01	0.073±0.07	0.145±0.02	0.39±0.1	0.307±0.02	0.386±0.1	0.307±0.1	0.362±0.09
<b>Fenilalanin</b>	1.680±0.5	1.532±0.5	1.967±0.9	1.62±0.9	1.349±0.6	1.653±0.9	1.527±0.7	1.453±0.3	1.025±0.4	0.049±0.02	0.083±0.03	0.054±0.01	0.217±0.07	0.268±0.03	0.288±0.1	0.232±0.1	0.323±0.06
<b>Lizin</b>	4.415±1.2	4.267±1.1	4.61±1.8	4.18±1.5	3.228±1.7	4.458±1.3	4.570±1.9	4.290±1.1	1.907±0.4	0.066±0.03	0.147±0.11	0.122±0.03	0.146±0.03	0.142±0.05	0.303±0.2	0.217±0.1	0.159±0.05

0\* :Kontrol Örneği-Referans Kolajen Tip I (Sığır)

Kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürünlerinin etikette yazan kolajen miktarları (g), çalışma sonucunda bulunan kolajen miktarları (g) ve etikete göre sapma oranları hesaplanmış, Tablo 4.2' de verilmiştir.

**Tablo 4.2: Kolajen Hidrolizatı Gıda Takviye Ürünlerinde Etiketle Belirtilen ve Analiz Sonucunda Bulunan Kolajen Hidrolizatı Değerleri ve Etikete Göre Sapma Oranları**

Kolajen Hidrolizatı Gıda Takviyeleri	Kolajen Hidrolizatı Formu	Kolajen Hidrolizatı Kaynağı	Etiketle yazan Kolajen Hidrolizatı g/100 g veya ml	Bulunan Kolajen Hidrolizatı g/100 g	Etikete Göre Sapma (%)
0*	Toz	Sığır	99.8	97.4 ±1.2	2.6 ±2
1	Toz	Sığır	100	90.6±1.9	10.4±2
2	Toz	Sığır	100	89.1±1.4	10.9±2
3	Toz	Marine Kolajen	100	71.2±1.9	4.8±2
4	Toz	Sığır	80	68.04 ±1.5	14.95 ±2
5	Toz	Sığır	100	81 ±1.9	19 ±2
6	Toz	Balık	100	63.75 ±1.4	36.25 ±2
7	Toz	Sığır	100	96.49 ±1.9	3.51 ±2
8	Tablet	Sığır, Balık, Tavuk, Yumurta Kabuğu Zarı	60	56.22 ±1.7	6.7 ±2
9	Tablet	Sığır	6.54	2.67 ±0.1	59.18 ±0.5
10	Tablet	Tavuk	5.294	3.45 ±0.1	34.83 ±0.5
11	Tablet	Tavuk	2.666	2.28 ±0.1	14.47 ±0.5
12	Sıvı	Balık	20	23.36 ±0.3	16.8 ±0.5
13	Sıvı	Sığır	25	23.2 ±0.7	7.2 ±2
14	Sıvı	Sığır	13.75	15.2 ±0.5	10.54 ±1
15	Sıvı	Sığır	16.6	16.9 ±0.3	1.8 ±0.5
16	Sıvı	Sığır	25	27.36 ±0.7	9.44±1

0\*: Kontrol Örneği-Referans Kolajen TIPI (Sığır)

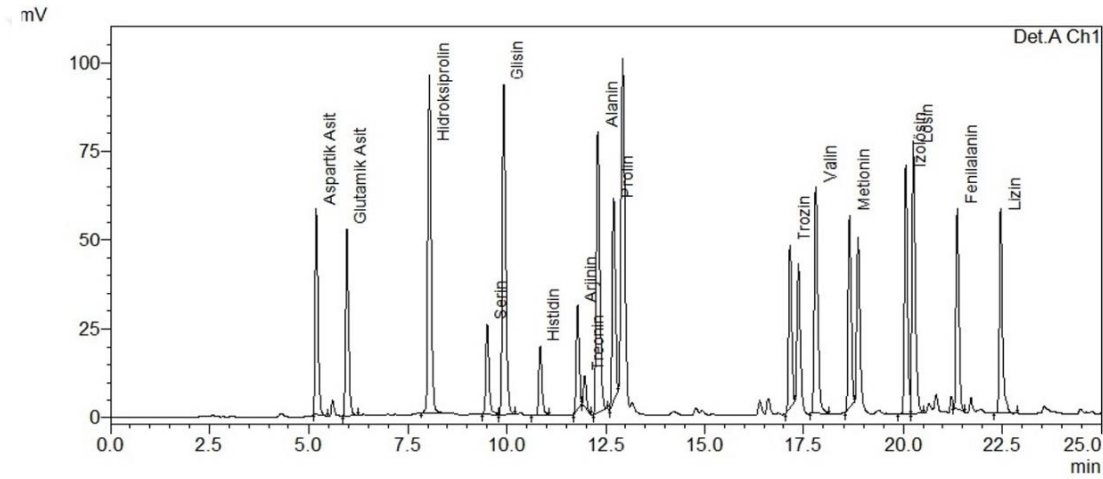
Kontrol örneğindeki kolajen hidrolizatının etiket üzerinde yazan kolajen hidrolizatı miktarı 99.8 g/100 g'dır, analiz sonucu bulunan değer 97.4 ±1.2 g/100 g'dır. Etikete göre sapma oranı % 2.6 ±1'dir.

Tabloda görüldüğü gibi etiket üzerinde yazan 100 g kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyesi ürünlerindeki kolajen hidrolizatı değerleri 2.666 g ile 100 g arasında

değişmektedir. Çalışma sonucunda bulunan 100 g gıda takviye ürünlerindeki kolajen hidrolizatı miktarı ise 2.28 ± 0.1 g ile 96.49 ± 1.9 g arasında değişmektedir.

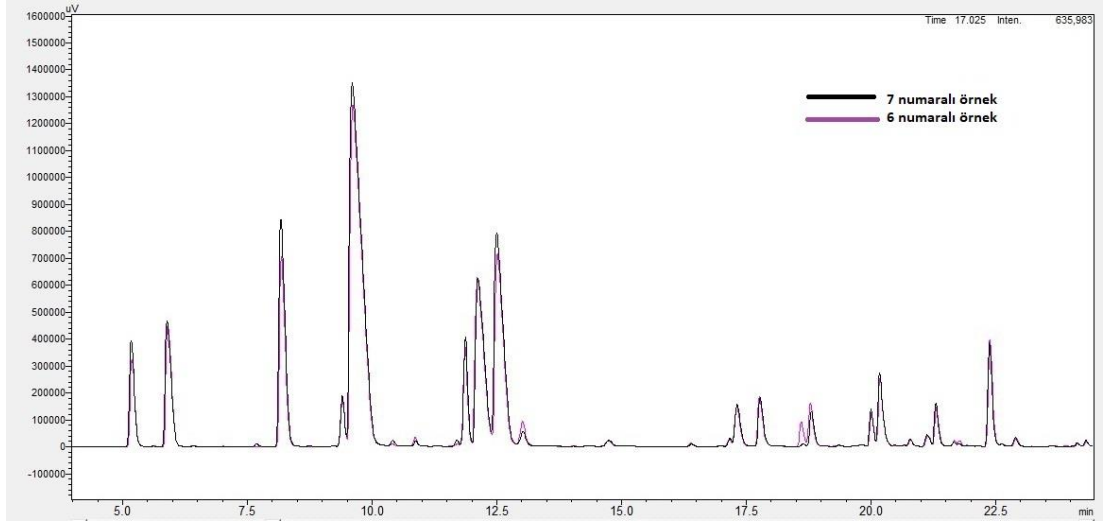
Etiket üzerinde yazan kolajen hidrolizatı miktarları ile çalışmada bulunan kolajen hidrolizatı miktarları yüzde sapmaları değerlendirildiğinde, değerlerinin % 1.8 ± 0.5 ile % 59.18 ± 0.5 arasında değiştiği görülmüştür.

Çalışmada incelenen 16 adet kolajen hidrolizatı gıda takviyesinin; 12 tanesi beyan edilenden daha düşük kolajen hidrolizatı içeriyorken, 4 tanesi ise etiket değerinden daha fazla kolajen hidrolizatı içerdiği bulunmuştur. Amino asit standartının HPLC kromatogramı Şekil 4.1’ de verilmiştir.



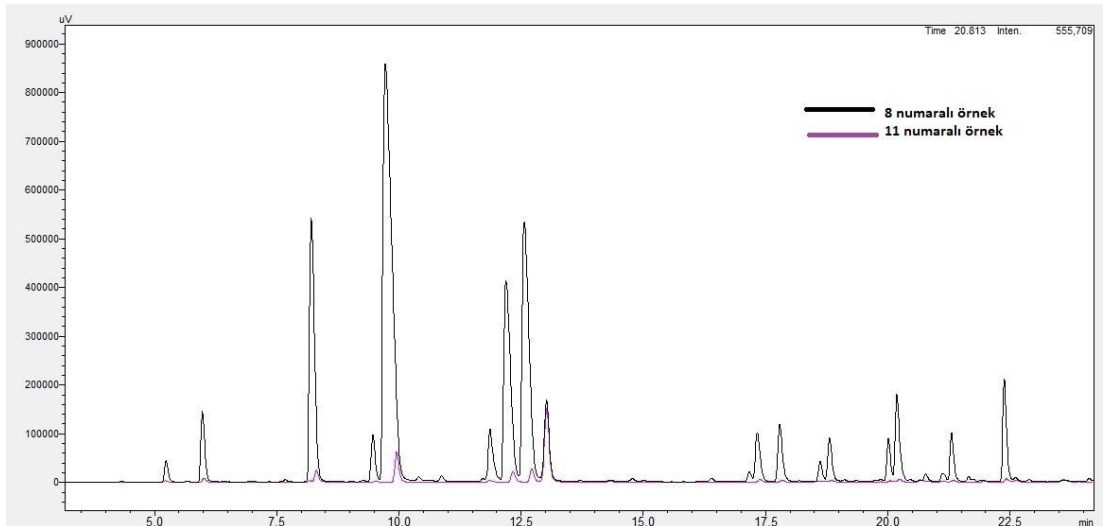
**Şekil 4.1: Amino Asit Standartının HPLC kromatogramı**

Şekil 4.1 de amino asit standartının HPLC kromatogramı verilmiştir. (aspartik asit(1), glutamik asit(2), hidroksiprolin(3), serin(4), glisin(5), histidin(6), arginin(7), treonin(8), alanin(9), prolin(10), trozin(11), valin(12), metionin(13), izolösin(14), lösin(15), fenilalanin(16), lizin(17)) (Shimadzu, 2007; Anonim, 2002)



**Şekil 4.2: Toz Formdaki Kolajen Hidrolizatı Gıda Takviyeleri Arasında En Yüksek ve En Düşük Kolajen Hidrolizatına Sahip Ürünlerin Amino Asit Kompozisyonunun HPLC Kromotogramı**

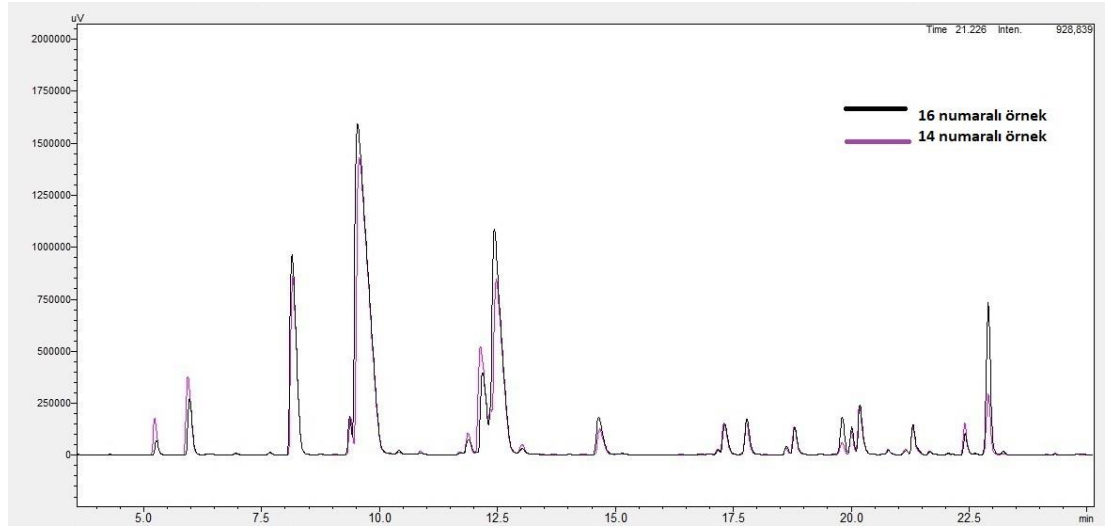
Toz formda bulunan kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürünleri arasında en yüksek kolajen hidrolizatı içeriğine sahip olan 7 numaralı ürün  $96.49 \pm 1.9$  g/100 gr'dır. En düşük kolajen hidrolizatı içeriğine sahip ürün ise  $63.75 \pm 1.4$  g/100 g ile 6 numaralı üründür. Etiket üzerinde yazan kolajen hidrolizatı miktarları ile çalışmada bulunan kolajen hidrolizatı miktarları yüzde sapmaları değerlendirildiğinde, %  $3.51 \pm 2$  ile en düşük sapma oranı 7 numaralı örnekte, %  $36.25 \pm 2$  en yüksek sapma oranının 6 numaralı örnekte olduğu görülmüştür.



**Şekil 4.3: Tablet Formdaki Kolajen Hidrolizatı Gıda Takviyeleri Arasında En Yüksek ve En Düşük Kolajen Hidrolizatına Sahip Ürünlerin Amino Asit Kompozisyonunun HPLC Kromotogramı**

Tablet formda bulunan kolajen hidrolizatı gıda takviye ürünleri arasında en yüksek kolajen hidrolizatı içeriğine sahip olan 8 numaralı ürün  $56.22 \pm 1.7$  g/100 g'dir. En düşük kolajen hidrolizatı içeriğine sahip ürün 11 numaralı ürün  $2.28 \pm 0.1$  g/100 g'dir. Tablet formda bulunan gıda takviyelerinin, etiket üzerinde yazan miktardan düşük miktarda kolajen hidrolizatı içerdiği görülmüştür, yüzde sapma oranları değerlendirildiğinde, %  $6.7 \pm 2$  ile en düşük sapma oranı 8 numaralı örnekte, %  $59.18 \pm 0.5$  en yüksek sapma oranının 9 numaralı örnekte olduğu görülmüştür.

Litaratür çalışmalarında tablet ve kapsül formda olan kolajen hidrolizat ürünlerinin kolajen içeriğinin toz veya sıvı formlara göre daha düşük olduğu belirtilmiştir (Musayeva, Özcan ve Kaynak, 2022). Kolajen tablet kullanımı kolay gibi görünse de aslında yanıltıcı olabilir. Günlük tavsiye edilen kolajen hidrolizatı miktarını tüketmek için bu tablet veya kapsüllerden yüksek adetlerde yutmanız gerekebilir (Musayeva, Özcan ve Kaynak, 2022). Elde edilen veriler litaratür çalışmaları ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Ayrıca tavuk kaynaklı Tip II kolajen hidrolizatı miktarının gıda takviyelerinde çok düşük dozda bulunması sebebiyle kemik ve eklem sağlığı için hedeflenen sağlık etkilerini istenilen düzeyde gösteremeyebilir.



**Şekil 4.4: Sıvı Formdaki Kolajen Hidrolizatı Gıda Takviyeleri Arasında En Yüksek Ve En Düşük Kolajen Hidrolizatına Sahip Ürünlerin Amino Asit Kompozisyonunun HPLC Kromatogramı**

Sıvı formda bulunan kolajen hidrolizatı gıda takviye ürünleri arasında en yüksek

kolajen hidrolizati içeriğine sahip olan 16 numaralı ürün  $27.36 \pm 0.7$  g/100 ml'dır. En düşük kolajen hidrolizati içeriğine sahip ürün 14 numaralı ürün  $15.2 \pm 0.5$  g/100 ml'dır. Sıvı formda bulunan gıda takviyelerinin yüzde sapma oranları değerlendirildiğinde; %  $1.8 \pm 0.5$  ile en düşük sapma oranı 15 numaralı örnekte, %  $16.8 \pm 8$  ile en yüksek sapma oranının 12 numaralı örnekte olduğu görülmüştür.

Gıda takviye ürünlerinin etiket üzerinde beyan edilen kolajen hidrolizati ile çalışmada bulunan kolajen hidrolizati değerleri arasında en büyük sapma oranı 9 numaralı tablet formundaki örnekte, en düşük fark ise 15 numaralı sıvı formundaki örnekte olduğu görülmüştür.

#### **4.2. *In Vitro* Ortamda Biyoerişilebilirlik Analizleri**

Toz, sıvı ve tablet formunda bulunan, farklı kaynaklardan elde edilen kolajen hidrolizatlarını içerisinde bulunduran gıda takviyelerinin biyoerişilebilirliği mide ve ince bağırsak dahil olmak üzere *in vitro* ortamda incelenmiş, kolajen oranının kantitatif tayininde kullanılan hidroksiprolin miktarı üzerinden hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Gıda takviyelerinin *in vitro* sindirim öncesi ve sonrasında bulunan hidroksiprolin miktarları ve biyoerişilebilirlik oranı Tablo 4.3.'de özetlenmiştir.

**Tablo 4.3: Kolajen Gıda Takviyelerinde Bulunan Hidroksiprolinin Sindirim Öncesi, Sindirim Sonrası Miktarları ve Biyoerişilebilirlik Oranları**

Kolajen Hidrolizatı Gıda Takviyesi	Kolajen Hidrolizatı Formu	Sindirim Öncesi g/100 g	Sindirim Sonrası g/100 g	Biyoerişilebilirlik (%)
0*	Toz	12.17 ±1.2	11.89 ±0.4	98 ±0.5
1	Toz	11.32±1.9	10.15±0.3	89 ±0.9
2	Toz	11.13±1.42	10.3±0.2	92 ±0.7
3	Toz	8.9±1.9	8.5±0.5	95 ±0.9
4	Toz	8.505 ±1.5	7.35 ±0.3	86 ±0.8
5	Toz	10.125 ±1.9	6.8 ±0.18	67 ±0.8
6	Toz	7.969±1.42	7.62 ±0.2	96 ±0.9
7	Toz	12.06 ±1.9	8.92 ±0.2	74 ±0.8
8	Tablet	7.027±1.7	6.39 ±0.1	91 ±0.7
9	Tablet	0.334 ±0.07	0.21 ±0.02	63 ±0.1
10	Tablet	0.43 ±0.06	0.27 ±0.02	63 ±0.1
11	Tablet	0.285 ±0.07	0.273 ±0.04	96 ±0.2
12	Sıvı	2.92 ±0.36	1.52 ±0.16	52 ±0.3
13	Sıvı	2.9 ±0.7	1.45 ±0.07	50 ±0.1
14	Sıvı	1.9 ±0.5	1.86 ±0.352	98 ±0.5
15	Sıvı	2.112 ±0.3	1.31 ±0.26	62 ±0.3
16	Sıvı	3.42 ±0.7	2.87 ±0.18	84 ±0.2

0\*- Kontrol Örneği-Referans Kolajen TIP I (sığır kaynaklı)

Tablo 4.3'te görüldüğü gibi kontrol örneğinin, *in vitro* sindirim öncesi hidroksiprolin miktarı 12.17 ±1.2 g/100 g, *in vitro* sindirim sonrası hidroksiprolin miktarı 11.89 ±0.4 g/ 100 g ve biyoerişilebilirlik oranı % 98 ±0.5'dir.

Tablo 4.3'te görüldüğü gibi gıda takviyelerinde *in vitro* sindirim öncesi en düşük hidroksiprolin miktarı 11 numaralı tablet örnekte 0,285±0.07 g/100 ml, en yüksek hidroksiprolin miktarı 7 numaralı toz örnekte 12.06±0.9 g/100 gr'dır. *İn vitro* sindirim sonrası en düşük hidroksiprolin miktarı 9 numaralı tablet örnekte 0.21 ±0.02 g/100 gr, en yüksek hidroksiprolin miktarı 2 numaralı toz örnekte 10.3 ±0.2 g/100 gr'dır. Sindirim öncesi en düşük hidroksiprolin miktarına sahip olan 11 numaralı örneğin biyoerişilebilirliği % 96 ±0.2, sindirim öncesi en yüksek hidroksiprolin miktarına sahip olan 7 numaralı örneğin biyoerişilebilirliği % 74 ±0.8 bulunmuştur. Hidroksiprolin konsantrasyonuna bağlı olarak biyoyararlılık oranının arttığı bilinmektedir (López, 2020). Fakat kolajen hidrolizatı dozunun her zaman

biyoerişebilirlik ile doğru orantılı olmadığı, gastrointestinal koşullar altında stabilitesi bozulmadan ilerleyen kolajen hidrolizatının yüksek biyoerişebilirlik gösterdiği görülmüştür. Bu durumunun netliğe kavuşması için, aynı kolajen hidrolizatının farklı oranlarının ve kolajen hidrolizatına ilave edilen vitamin, mineral vb. biyoaktif bileşiklerin her birinin veya kombinasyonlarının biyoerişebilirliğe etkisinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile aydınlatılması gerekmektedir.

Tablo 4.3.'de görüldüğü gibi, kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinde kolajen hidrolizatı biyoerişilebilirliği % 50 ±0.1 ile % 98 ±0.5 arasında değişmektedir. Kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinde kolajen hidrolizatı biyoerişilebilirliği en fazla olan % 98 ±0.5 ile 14 numaralı kolajen hidrolizatı içeren sıvı formdaki gıda takviyesi, en düşük kolajen hidrolizatı biyoerişilebilirliği % 50 ±0.12 ile 13 numaralı kolajen hidrolizatı içeren sıvı formdaki gıda takviyesidir.

Kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinin biyoerişilebilirliğini etkileyen faktörlerin başında; kolajen hidrolizatlarının elde edildiği kaynak, üretim metodu ve son ürüne gelinceye kadar maruz kaldığı prosesler ve son ürün formu, amino asit kompozisyonu, düşük molekül ağırlığı, kolajen hidrolizatlarına ilave edilen multivitamin, mineral, polifenol, probiyotik vb. biyoaktif bileşiklerin sinejik veya antagonistik etki yaratması vb. faktörler gelmektedir (Ercan ve El, 2010; Wang, vd., 2019; Porrini ve Riso, 2008). Ayrıca kolajen hidrolizatının üretim prosesinde veya son ürün eldesine kadar maruz kaldığı işleme teknolojileri (yüksek basınç, yüksek sıcaklık vb.) esnasında da amino asitlerin yapısı ve stabilitesi etkilenebilir, biyoyararlılığı düşebilir (Udenigwe, vd., 2021).

Toz formda bulunan kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürünleri arasında en yüksek biyoerişebilirlik oranına sahip olan % 96 ±0.9 ile 6 numaralı balık kaynaklı kolajen hidrolizatı içeren örnektir. En düşük biyoerişebilirlik oranına sahip ürün % 67 ±0.8 ile 5 numaralı sığır kaynaklı kolajen hidrolizatı içeren örnektir.

Tablet formda bulunan kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürünleri arasında % 96±0.2 ile en yüksek biyoerişebilirlik oranına sahip olan 11 numaralı balık, sığır, tavuk ve yumurta kabuğu zarı kaynaklı kolajen hidrolizatı içeren üründür. En düşük biyoerişebilirlik oranına sahip ürünler; % 63±0.1 ile 9 numaralı sığır kaynaklı kolajen hidrolizatı içeriğine sahip ürün ve % 63±0.1 ile 7 numaralı tavuk kaynaklı kolajen hidrolizatı içeren üründür.

Tablet formundaki kolajen hidrolizatı gıda takviyeleri incelendiğinde; hepsinde parlaticı, emülgatör, topaklanma önleyici, hacim arttırıcı, stabilizatör vb. maddelerin bulunduğu ve farklı oranlarda genellikle ortak şekilde bulunan, Tip II kolajen hidrolizatı varlığı görülmüştür, multivitamin, mineral ve biyoaktif bileşikler ilave edilerek fonksiyonel özellikleri arttırılmaya çalışılmıştır. Tablet formundaki kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinin biyoerişebilirlik oranları incelendiğinde 8 ve 11 numaralı örneklerin yüksek biyoerişebilirlik oranına sahip olduğu görülmüştür. % 96 ±0.2 ile en yüksek biyoerişebilirlik oranına sahip olan 11 numaralı tavuk kaynaklı kolajen hidrolizatının, multivitamin & mineral ve biyoaktif bileşenleri içerdiği; % 91 ±0.7 ile yüksek biyoerişebilirliğe sahip olan 8 numaralı örneğin, kolajen peptit Tip I & Tip III (sığır kaynaklı), kolajen peptit Tip I (balık kaynaklı), kolajen peptit (yumurta kabuğu zarı kaynaklı), kolajen Tip II (sığır ve tavuk kaynaklı) ve vitamin & biyoaktif bileşik içeriğine sahip olduğu görülmüştür.

Tablet formun oluşması amacıyla içine koyulan parlaticı, emülgatör, topaklanma önleyici, hacim arttırıcı, stabilizatör vb. maddeler sebebiyle kolajen hidrolizatının parçalanması ve vücuttaki emilimi diğer kolajen hidrolizatı formlarına kıyasla daha uzun sürmektedir (Avcı, 2022). Tablet formdaki kolajen hidrolizatlarının biyoerişebilirliğini etkileyen faktörlerin daha ayrıntılı çalışmalar ile ortaya koyulması gerekmektedir. Aynı kolajen hidrolizatına ilave edilen vitamin, mineral vb. biyoaktif bileşiklerin ve tablet formunun oluşturulması için ilave edilen parlaticı, emülgatör, topaklanma önleyici, hacim arttırıcı, stabilizatör vb. maddelerin her birinin veya kombinasyonlarının biyoerişebilirliğe etkisinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile aydınlatılması gerekmektedir.

Sıvı formda bulunan kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürünleri incelendiğinde hepsinde deiyonize su, vitamin, mineral ve biyoaktif bileşiklere ek olarak; koruyucu, aroma verici, tatlandırıcı, asit düzenleyici, renklendirici vb. maddelerin olduğu görülmektedir. Sıvı formda bulunan kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürünleri arasında, % 98 ±0.5 ile en yüksek biyoerişebilirlik oranına sahip olan 14 numaralı sıvı formda bulunan sığır kaynaklı kolajen hidrolizatı içeren üründür. En düşük biyoerişebilirlik oranına sahip ürünler, % 50 ±0.1 ile 10 numaralı sığır kaynaklı kolajen hidrolizatı ve % 52 ±0.3 biyoyararlılık oranı ile 12 numaralı balık kaynaklı kolajen hidrolizatı içeren örnektir.

2015' de yapılan bir çalışmada 4 farklı içeriğe sahip (%100 portakal, turuncu-beyaz üzüm, elma ve elma-beyaz üzüm) meyve sularından hazırlanan içeceklere 5 farklı oranda kolajen hidrolizati (%1, 1.5, 2, 2.5 ve %3) ilave edilmiştir. Kolajen hidrolizati olarak balıktan enzimatik olarak türetilen kolajen hidrolizati (2000 Da, Rousselot/Peptan) kullanılmıştır. Her bir ürünün duyusal analiz sonuçları dikkate alındığında %2,5 konsantrasyonda hidrolize kolajen tercih edilmiştir. Yapılan çalışmada, hidrolize kolajenin *in vitro* ortamda gastrointestinal sindirim modeli üzerinden incelenen biyoyararlanımının çok yüksek olduğunu göstermektedir. *In vitro* ortamda gastrointestinal sindirim prosedürü sonrasında değerlendirilen biyoyararlılık sonuçlarına göre; % 2.5 konsantrasyonda hidrolize kolajen ilave edilen içeceklerden, portakal (%95.37) ve elma suyu (%90.71) içeceklerinin biyoyararlılıkları daha yüksek bulunmuş, üzüm suyu ilavesi bu değeri portakal-üzüm suyu ve elma-üzüm suyu karışımları için sırasıyla% 83.38 ve %86.34'e düşürmüştür. Biyoyararlanımdaki azalma, beyaz üzüm suyundaki fenolik bileşiklerin özellikle proteinlerin sindirilebilirliğini doğrudan ya da dolaylı olarak azaltma kabiliyetine sahip olmaları ile ilişkilendirilmektedir (Bilek ve Bayram, 2015).

Ferguson (2001), polifenoller, proteinlerin sindirilebilirliğini azaltma ve ardından fekal nitrojen atılımını artırma yetenekleri nedeniyle geleneksel olarak "antibesinler" olarak kabul gördüğünü belirtmiştir. Ferguson (2001) polifenollerin gösterdiği karşı etkiler, belirli polifenollerin proteinleri doğrudan bağlama ve çöktürme yeteneğinin bir sonucu olabilirken, sindirim enzimlerinin aktivitesinin allosterik inhibisyonundan da kaynaklandığını, ayrıca bazı polifenoller metal katyonlarla kompleksler oluşturarak demir ve bakır gibi minerallerin bağırsak emilimine müdahale edebildiğini ifade etmiştir.

Sıvı formdaki kolajen hidrolizatlarının biyoerişebilirliğini etkileyen faktörlerin daha ayrıntılı çalışmalar ile ortaya koyulması gerekmektedir. Aynı kolajen hidrolizatına ilave edilen vitamin, mineral vb. biyoaktif bileşiklerin ve sıvı formunun oluşturulması, raf ömrü ve duyusal özelliklerin iyileştirilmesi amacıyla ilave edilen; deiyonize su, aroma verici, tatlandırıcı, asitlik düzenleyici, renklendirici, koruyucu vb. maddelerin her birinin, kombinasyonlarının, son ürünün biyoerişebilirliğe etkisinin ve üretim prosesinde (yüksek basınç, homojenizasyon vb.) uygulanan işlemler esnasında uygulanan işlemlerin son ürün biyoerişebilirliğe olan etkisinin *in*

*vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile aydınlatılması gerekmektedir.

Multivitamin- mineral veya biyoaktif bileşik içermeden saf halde ve toz formunda olan sığır ve balık kaynaklı kolajen hidrolizatı gıda takviye ürünlerinin biyoerişebilirlik oranları kıyaslandığında; 5 ve 1 numaralı sığır kaynaklı kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürününün biyoerişebilirlik oranı sırayla %  $67\pm 0.8$  ve %  $89\pm 0.9$ 'dur, 6 numaralı balık kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürününün biyoerişebilirlik oranı sırayla %  $96\pm 0.9$ 'dır. Elde edilen verilere göre balık kaynaklı kolajen hidrolizatının biyoerişebilirlik oranının sığır kaynağından elde edilen kolajen hidrolizatlarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Litaratür çalışmalarında da balık kaynaklı kolajen hidrolizatlarının biyoyararlılık değerinin sığır ve domuz kaynaklardan elde edilen kolajen hidrolizatına göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Hong vd., 2019; Yetim, 2011). Deniz kaynaklı kolajen hidrolizatının tüketildikten 4 saat sonra bağ dokusunda biyolojik olarak bulunduğunu ve % 90'ının sindirildiğini ortaya koymuştur (Peptan, 2022). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kolajen hidrolizatların %90'ından fazlasının sindirildiği ve ağızdan alımdan sonra hızla emildiği bilinmektedir. Biyoyararlılık çalışmalarında *in vitro* bulguların *in vivo* bulgular teyit edilmesi önemlidir (Asghar ve Henrickson, 1982; Oesser, vd., 1999 ).

Toz formunda sadece Tip I & Tip III kolajen hidrolizatı (sığır kaynaklı) içeren gıda takviyesinin biyoerişebilirlik oranı %  $67 \pm 0.8$  ve %  $89 \pm 0.9$ ' dir. Multivitamin & mineral ve biyoaktif bileşenler ile zenginleştirilen toz formundaki Tip I & Tip III kolajen hidrolizatı (sığır kaynaklı) biyoerişebilirlik oranı %  $86 \pm 0.26$  ve %  $92 \pm 0.5$ 'dır. Elde edilen verilere göre multivitamin & mineral ve biyoaktif bileşenler ile zenginleştirilen kolajen hidrolizatının (sığır kaynaklı) biyoerişebilirlik oranlarının saf kolajen hidrolizatına kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür.

Chen ve ark. (2020), tilapia balığı derisinden elde edilen kolajen hidrolizatına ilave edilen çinko mineralinin etkisini belirlemek için simüle edilmiş bir *in vitro* sindirim modeli kullanmıştır. Mide ve bağırsak sindirim aşamalarını simüle etmek için pepsin ve pankreatin enzimleri kullanılmıştır. Çinko mineralinin düşük molekül ağırlığına

sahip kolajen peptitlerinin mide ve bağırsak geçişlerinde stabiliteyi koruyarak biyoerişilebilirliğinin iyileştirildiğini ifade etmiştir.



## BEŞİNCİ BÖLÜM

### SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, piyasada satılan balık, sığır, tavuk ve yumurta kabuğu zarı kaynaklarından elde edilen ve toz, sıvı ve tablet formlarda kolajen hidrolizatı içeren 16 adet gıda takviye ürününün amino asit kompozisyonu ve etikette beyan edilen kolajen hidrolizatı değerleri ile çalışma sonucunda bulunan değerler arasındaki sapma miktarları belirlenmiş, piyasada satılan kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinin biyoerişilebilirliği *in vitro* ortamda gastrointestinal sistemde ilk kez araştırılarak gıda bilim ve teknolojisine sunulmuştur. Hem tüketici hemde üretici nezdinde önemli veriler ortaya koyulmuştur.

Kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinde amino asit kompozisyonu tayini HPLC yöntemi ile analiz edilmiş, hidroksiprolin miktarları üzerinden hesaplamalar yapılarak etikette beyan edilen kolajen hidrolizatı değerleri ile çalışma sonucunda bulunan değerler arasındaki sapma miktarları belirlenmiştir. Kolajen hidrolizatlarının biyoerişilebilirliği mide ve ince bağırsak dahil olmak üzere *in vitro* ortamda incelenmiştir. Kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinde, *in vitro* sindirim öncesi ve sonrasında bulunan hidroksiprolin miktarları üzerinden biyoerişilebilirlikleri belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir;

-Kontrol örneğindeki kolajen hidrolizatının etiket üzerinde yazan kolajen hidrolizatı miktarı 99.8 g/100 g'dır, analiz sonucu bulunan değer  $97.4 \pm 1.2$  g/100 g'dır. Etikete göre sapma oranı  $\% 2.6 \pm 1$ 'dir.

-Etiket üzerinde yazan 100 g kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyesi ürünlerindeki kolajen hidrolizatı değerleri 2.666 g ile 100 g arasında değişmektedir. Çalışma sonucunda bulunan 100 g gıda takviye ürünlerindeki kolajen hidrolizatı miktarı ise  $2.28 \pm 0.1$  g ile  $96.49 \pm 1.9$  g arasında değişmektedir.

-Etiket üzerinde yazan kolajen hidrolizatı miktarları ile çalışmada bulunan kolajen hidrolizatı miktarları yüzde sapmaları değerlendirildiğinde, değerlerinin  $\% 1.8 \pm 0.5$  ile  $\% 59.18 \pm 0.5$  arasında değiştiği görülmüştür.

-Çalışmada incelenen 16 adet kolajen hidrolizatı gıda takviyesinin; 12 tanesi beyan edilenden daha düşük kolajen hidrolizatı içeriyorken, 4 tanesi ise etiket değerinden

daha fazla kolajen hidrolizatı içerdiği bulunmuştur.

-Toz formda bulunan kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürünleri arasında en yüksek kolajen hidrolizatı içeriğine sahip olan 7 numaralı ürün  $96.49 \pm 1.9$  g/100 gr'dır. En düşük kolajen hidrolizatı içeriğine sahip ürün ise  $63.75 \pm 1.4$  g/100 g ile 6 numaralı üründür. Etiket üzerinde yazan kolajen hidrolizatı miktarları ile çalışmada bulunan kolajen hidrolizatı miktarları yüzde sapmaları değerlendirildiğinde, %  $3.51 \pm 2$  ile en düşük sapma oranı 7 numaralı örnekte, %  $36.25 \pm 2$  en yüksek sapma oranının 6 numaralı örnekte olduğu görülmüştür.

-Tablet formda bulunan kolajen hidrolizatı gıda takviye ürünleri arasında en yüksek kolajen hidrolizatı içeriğine sahip olan 8 numaralı ürün  $56.22 \pm 1.7$  g/100 g'dır. En düşük kolajen hidrolizatı içeriğine sahip ürün 11 numaralı ürün  $2.28 \pm 0.1$  g/100 g'dır. Tablet formda bulunan gıda takviyelerinin, etiket üzerinde yazan miktardan düşük miktarda kolajen hidrolizatı içerdiği görülmüştür, yüzde sapma oranları değerlendirildiğinde, %  $6.7 \pm 2$  ile en düşük sapma oranı 8 numaralı örnekte, %  $59.18 \pm 0.5$  en yüksek sapma oranının 9 numaralı örnekte olduğu görülmüştür.

-Litaratür çalışmalarında tablet ve kapsül formda olan kolajen hidrolizat ürünlerinin kolajen içeriğinin toz veya sıvı formlara göre daha düşük olduğu belirtilmiştir Elde edilen veriler litaratür çalışmaları ile uyumlu sonuçlar vermiştir.

-Sıvı formda bulunan kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürünleri incelendiğinde hepsinde deiyonize su, vitamin, mineral ve biyoaktif bileşiklere ek olarak; koruyucu, aroma verici, tatlandırıcı, asit düzenleyici, renklendirici vb. maddelerin olduğu görülmektedir. Sıvı formda bulunan kolajen hidrolizatı gıda takviye ürünleri arasında en yüksek kolajen hidrolizatı içeriğine sahip olan 16 numaralı ürün  $27.36 \pm 0.7$  g/100 ml'dir. En düşük kolajen hidrolizatı içeriğine sahip ürün 14 numaralı ürün  $15.2 \pm 0.5$  g/100 ml'dir. Sıvı formda bulunan gıda takviyelerinin yüzde sapma oranları değerlendirildiğinde; %  $1.8 \pm 0.5$  ile en düşük sapma oranı 15 numaralı örnekte, %  $16.8 \pm 8$  ile en yüksek sapma oranının 12 numaralı örnekte olduğu görülmüştür.

-Gıda takviye ürünlerinin etiket üzerinde beyan edilen kolajen hidrolizatı ile çalışmada bulunan kolajen hidrolizatı değerleri arasında en büyük sapma oranı 9 numaralı tablet formundaki örnekte, en düşük fark ise 15 numaralı sıvı formundaki örnekte olduğu görülmüştür.

-Kontrol örneğinin, *in vitro* sindirim öncesi hidroksiprolin miktarı  $12.17 \pm 1.2$  g/100 g, *in vitro* sindirim sonrası hidroksiprolin miktarı  $11.89 \pm 0.4$  g/ 100 g ve biyoerişebilirlik oranı  $\% 98 \pm 0.5$ 'dir.

- İncelenen gıda takviyelerinde *in vitro* sindirim öncesi en düşük hidroksiprolin miktarı 11 numaralı tablet örnekte  $0,285 \pm 0.07$  g/100 ml, en yüksek hidroksiprolin miktarı 7 numaralı toz örnekte  $12.06 \pm 0.9$  g/100 gr'dır. *In vitro* sindirim sonrası en düşük hidroksiprolin miktarı 9 numaralı tablet örnekte  $0.21 \pm 0.02$  g/100 gr, en yüksek hidroksiprolin miktarı 2 numaralı toz örnekte  $10.3 \pm 0.2$  g/100 gr'dır. Sindirim öncesi en düşük hidroksiprolin miktarına sahip olan 11 numaralı örneğin biyoerişebilirliği  $\% 96 \pm 0.2$ , sindirim öncesi en yüksek hidroksiprolin miktarına sahip olan 7 numaralı örneğin biyoerişebilirliği  $\% 74 \pm 0.8$  bulunmuştur. Hidroksiprolin konsantrasyonuna bağlı olarak biyoyararlılık oranının arttığı bilinmektedir (López, 2020). Fakat kolajen hidrolizati dozunun her zaman biyoerişebilirlik ile doğru orantılı olmadığı, gastrointestinal koşullar altında stabilitesi bozulmadan ilerleyen kolajen hidrolizatının yüksek biyoerişebilirlik gösterdiği görülmüştür. Bu durumunun netliğe kavuşması için, aynı kolajen hidrolizatının farklı oranlarının ve kolajen hidrolizatına ilave edilen vitamin, mineral vb. biyoaktif bileşiklerin her birinin veya kombinasyonlarının biyoerişebilirliğe etkisinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile aydınlatılması gerekmektedir.

-Kolajen hidrolizati içeren gıda takviyelerinde kolajen hidrolizati biyoerişilebilirliği  $\% 50 \pm 0.1$  ile  $\% 98 \pm 0.5$  arasında değişmektedir. Kolajen hidrolizati içeren gıda takviyelerinde kolajen hidrolizati biyoerişilebilirliği en fazla olan  $\% 98 \pm 0.5$  ile 14 numaralı kolajen hidrolizati içeren sıvı formdaki gıda takviyesi, en düşük kolajen hidrolizati biyoerişilebilirliği  $\% 50 \pm 0.12$  ile 13 numaralı kolajen hidrolizati içeren sıvı formdaki gıda takviyesidir.

-Toz formda bulunan kolajen hidrolizati içeren gıda takviye ürünleri arasında en yüksek biyoerişebilirlik oranına sahip olan  $\% 96 \pm 0.9$  ile 6 numaralı balık kaynaklı kolajen hidrolizati içeren örnektir. En düşük biyoerişebilirlik oranına sahip ürün  $\% 67 \pm 0.8$  ile 5 numaralı sığır kaynaklı kolajen hidrolizati içeren örnektir.

-Tablet formda bulunan kolajen hidrolizati içeren gıda takviye ürünleri arasında  $\% 96 \pm 0.2$  ile en yüksek biyoerişebilirlik oranına sahip olan 11 numaralı balık, sığır, tavuk ve yumurta kabuğu zarı kaynaklı kolajen hidrolizati içeren üründür. En düşük

biyoerişebilirlik oranına sahip ürünler; % 63±0.1 ile 9 numaralı sığır kaynaklı kolajen hidrolizatı içeriğine sahip ürün ve % 63±0.1 ile 7 numaralı tavuk kaynaklı kolajen hidrolizatı içeren üründür.

-Tablet formundaki kolajen hidrolizatı gıda takviyeleri incelendiğinde; hepsinde parlaticı, emülgatör, topaklanma önleyici, hacim arttırıcı, stabilizatör vb. maddelerin bulunduğu ve farklı oranlarda genellikle ortak şekilde bulunan, Tip II kolajen hidrolizatı varlığı görülmüştür, multivitamin, mineral ve biyoaktif bileşikler ilave edilerek fonksiyonel özellikleri arttırılmaya çalışılmıştır. Tablet formundaki kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinin biyoerişebilirlik oranları incelendiğinde 8 ve 11 numaralı örneklerin yüksek biyoerişebilirlik oranına sahip olduğu görülmüştür. % 96 ±0.2 ile en yüksek biyoerişebilirlik oranına sahip olan 11 numaralı tavuk kaynaklı kolajen hidrolizatının, multivitamin & mineral ve biyoaktif bileşenleri içerdiği; % 91 ±0.7 ile yüksek biyoerişebilirliğe sahip olan 8 numaralı örneğin, kolajen peptit Tip I & Tip III (sığır kaynaklı), kolajen peptit Tip I (balık kaynaklı), kolajen peptit (yumurta kabuğu zarı kaynaklı), kolajen Tip II (sığır ve tavuk kaynaklı) ve vitamin & biyoaktif bileşik içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Tablet formdaki kolajen hidrolizatlarının biyoerişebilirliğini etkileyen faktörlerin daha ayrıntılı çalışmalar ile ortaya koyulması gerekmektedir. Aynı kolajen hidrolizatına ilave edilen vitamin, mineral vb. biyoaktif bileşiklerin ve tablet formunun oluşturulması için ilave edilen parlaticı, emülgatör, topaklanma önleyici, hacim arttırıcı, stabilizatör vb. maddelerin her birinin veya kombinasyonlarının biyoerişebilirliğe etkisinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile aydınlatılması gerekmektedir.

-Sıvı formda bulunan kolajen hidrolizatı gıda takviye ürünleri arasında % 98 ±0.5 ile en yüksek biyoerişebilirlik oranına sahip olan 14 numaralı sığır kaynaklı kolajen hidrolizatı içeren üründür. En düşük biyoerişebilirlik oranına sahip ürünler, % 50 ±0.1 ile 10 numaralı sığır kaynaklı kolajen hidrolizatı ve % 52 ±0.3 biyoyararlılık oranı ile 12 numaralı balık kaynaklı kolajen hidrolizatı içeren örnektir.

-Multivitamin- mineral veya biyoaktif bileşik içermeden saf halde ve toz formunda olan sığır ve balık kaynaklı kolajen hidrolizatı gıda takviye ürünlerinin biyoerişebilirlik oranları kıyaslandığında; 5 ve 1 numaralı sığır kaynaklı kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürününün biyoerişebilirlik oranı sırayla % 67±0.8 ve % 89±0.9'dur, 6 numaralı balık kolajen hidrolizatı içeren gıda takviye ürününün biyoerişebilirlik oranı sırayla % 96±0.9'dır. Elde edilen verilere göre balık kaynaklı

kolajen hidrolizatının biyoerişebilirlik oranının sığır kaynağından elde edilen kolajen hidrolizatlarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Litaratür çalışmalarında da balık kaynaklı kolajen hidrolizatlarının biyoyararlılık değerinin sığır ve domuz kaynaklardan elde edilen kolajen hidrolizatına göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Hong vd., 2019; Yetim, 2011). Litaratür ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

-Toz formunda sadece Tip I & Tip III kolajen hidrolizatı (sığır kaynaklı) içeren gıda takviyesinin biyoerişebilirlik oranı % 67 ±0.8 ve % 89 ±0.9' dir. Multivitamin & mineral ve biyoaktif bileşenler ile zenginleştirilen toz formundaki Tip I & Tip III kolajen hidrolizatı (sığır kaynaklı) biyoerişebilirlik oranı % 86 ±0.26 ve % 92 ±0.5'dir. Elde edilen verilere göre multivitamin & mineral ve biyoaktif bileşenler ile zenginleştirilen kolajen hidrolizatının (sığır kaynaklı) biyoerişebilirlik oranlarının saf kolajen hidrolizatına kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür.

Genel olarak kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinin biyoerişebilirliğini etkilen faktörlerin başında; kolajen hidrolizatlarının elde edildiği kaynak (sığır, balık, tavuk), üretim metodu ve son ürüne gelinceye kadar maruz kaldığı prosesler (yüksek basınç, yüksek sıcaklık vb.) ve son ürün formu, amino asit kompozisyonu, düşük molekül ağırlığı, kolajen hidrolizatlarına ilave edilen multivitamin, mineral, polifenol, probiyotik vb. biyoaktif bileşikler ve topaklanma önleyici, parlatici, asitlik düzenleyici vb. gibi son ürün formülasyonuna ilave edilen bileşiklerin sinejik veya antagonistik etki yaratması vb. faktörler gelmektedir. Bu nedenle kolajen hidrolizatı içeren gıda takviyelerinin reçetelerinde yer alan tüm bileşenlerin ve uygulanan proses adımlarının biyoerişebilirlik ve biyoyararlılık etkilerinin *in vitro*, *in vivo* yöntemler ile araştırılarak, klinik çalışmalar ile desteklenerek, istenilen sağlık etkilerini karşılama durumunun değerlendirilmesi ve bu şartları karşılayan uygun kombinasyonda reçete ile ürünlerin tüketiciye sunulması önerilmektedir.

Biyoerişebilirliği zayıf bir kolajen hidrolizatı, tüketiciye yüksek maliyet ve düşük fayda sunar. Kolajen hidrolizatı gıda takviyesinin biyoerişebilirliği ne kadar fazlaysa, o kadar verimli bir şekilde emilir ve yüksek biyoyararlılık sağlar. Çeşitli sağlık problemlerine faydalı hale gelir. Bu nedenle biyoerişebilirlik, hem üretici hemde tüketici için çok önemli bir özelliktir. Bu nedenle son zamanlarda geniş kullanım kitlesine sahip olan kolajen hidrolizatı gıda takviyelerinde bulunan kolajen hidrolizatı miktarının ve biyoerişilebilirliğinin bilinmesi sağlık etkilerinden ne ölçüde

faýdalanacağınyň belirlenmesi aýasından önem arz eder. Bu nedende yüksek biyoerişebilirlik ve biyoyararlılık gösteren kolajen hidrolizatlarının düşük moleköl ağırlığında ve günlük tavsiye edilen dozda tüketilmesi önem arz etmektedir. Bu doğrultuda ürünlerin biyoerişebilirliğinin kesin olarak anlaşılabilmesi için *in vitro* ortamda gerçekleştirilen biyoerişebilirlik çalışmalarının *in vivo* ve klinik çalışmalarla desteklenmesi, biyoerişebilirliği etkileyen tüm faktörlerin ayrıntılı şekilde belirlenmesi gerekmektedir.



## KAYNAKÇA

- Ahmed, M., Verma, A.K., Patel, R. (2020). *Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: a review*, *Sustain Chem Pharm*:18.
- Ali, A. M. M., Benjakul, S., Kishimura, H. (2017). *Molecular characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the scales of golden carp (*Probarbus jullieni*)*. *Emir J Food Agric*, 29(6): 450- 457.
- Altunay, N., Elik, A., ve Gürkan, R. (2019). Preparation and application of alcohol based deep eutectic solvents for extraction of curcumin in food samples prior to its spectrophotometric determination. *Food Chemistry*, 310: 125933.
- Anonim. (2020b). Kolajen tozu [Online]. <https://www.supraprotein.com/kolajen-tozu/> [Ziyaret Tarihi: 15.05.2021].
- Anonim. (2020b). Kolajen tozu [Online]. <https://www.supraprotein.com/kolajen-tozu/> [Ziyaret Tarihi: 15.05.2022].
- Anonim. (2022). Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği(2013/28693) [Online]. <http://www.tarim.gov.tr/Mevzuat/Turk-Gida-Kodeksi/> [Ziyaret Tarihi: 12.04.2022].
- AOAC., 2006, Official Methods of Analysis 990.26, Hydroxyproline in Meat and Meat Products.
- Arvanitoyannis, I.S. ve Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(4):726-745.
- Asghar A., Henrickson R.L. (1982), Chemical, biochemical, functional characteristics of collagen in food system, *Advances in Food Research*, 28: 231-372.
- Asghar, A. ve Henrickson, R.L. (1982). Chemical, biochemical, functional characteristics of collagen in food system. *Advances in Food Research* 28: 231- 372-7.
- Asserin J., Lati E., Shioya T., Prawitt J. (2015). The effect of oral collagen peptide supplementation on skin moisture and the dermal collagen network: Evidence

- from an ex vivo model and randomized, placebo-controlled clinical trials. *J. Cosmet Dermatol*, *14*:291–301.
- Balian, G., Bowes, J.H. (1977). The Structure and Properties of Collagen, In: The Science and Technology of Gelatin, Ward AG, Courts A (eds), *Academic Press*, UK, 1-27.
- Baysal, A. (2017). Beslenme (17. baskı). Ankara: Hatiboğlu yayıncılık.
- Benito, P., Miller, D. (1998). Iron absorption and bioavailability: an updated review. *Nutr Res.*, *18*: 581-603.
- Berillis, P. (2015). Marine collagen: Extraction and applications. *Research trends in biochemistry, molecular biology and microbiology*: 1-13.
- Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., & Tarvin, T. L. (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications*, *336*(1): 93-104.
- Bilek, S.E., ve Bayram, S.K. (2015). Fruit juice drink production containing hydrolyzed collagen, *J. Funct. Foods*, *14*:562–569.
- Bouayed J., Hoffmann L., Bohn, T. (2010). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of apple varieties, *Bioaccessibility and potential uptake*, *128*: 14–21.
- Brinckmann, J. (2015). Collagens at a glance. *Top. Curr. Chem*, *247*:1-6.
- Brinckmann, J., Notbohm, H, Müller, P. K. (2005). *Collagens at a Glance In: Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*, Springer, USA: 1-6.
- Bruyère, O., Zegels, B., Leonori, L., Rabenda, V., Janssen, A., Bourges, C., Reginster, J.Y., (2012). Effect of collagen hydrolysate in articular pain: a 6- month randomized, double-blind, placebo controlled study, *Complementary Therapies in Medicine* *20*: 124-130.
- Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P.E. (1989). *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, Merck & Co., Inc , ABD.
- Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., Hall, R.D., De Vos, C.H.R. (2008). Changes in antioxidants and metabolite profiles during production of tomato

- paste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3): 964-973.
- Chaudhuri, R.K., Majewski, G., Gutierrez, G. ve Serrar, M. (2000). Collagen III amplifier system, *Cosmet and Toilet*, 115 (3):53 – 59.
- Cheah, K.S., Stoker, N.G., Griffin, J.R. (1985). Identification and characterization of the human type II collagen gene (COL2A1), *Proc Natl Acad Sci USA*, 82(9): 2555-2559
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., AbertVian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review, *Ultrason Sonochem*, 34: 540- 560.
- Chen, L., Shen, X., Xia, G. (2020). Effect of Molecular Weight of Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Skin Collagen Peptide Fractions on Zinc-Chelating Capacity and Bioaccessibility of the Zinc-Peptide Fractions Complexes *in vitro* Digestion. *Appl. Sci*, 10, 2041.
- Chen, Y.P., Wu, H.T., Wang, G.H., Liang, C.H. (2018). *Improvement of Skin Condition on Skin Moisture and Anti-Melanogenesis by Collagen Peptides from Milkfish (Chanos chanos) Scales*, IOP Conference Series, Materials Science and Engineering: Nanjing, China:1–7.
- Choi, F.D, Sung, C.T, Juhasz, M., Mesinkovsk, N.A. (2019). Oral collagen supplementation: a systematic review of dermatological applications, *Journal of drugs in dermatology*, *JDD*. 18(1):9-16.
- Chuaychan, S., Benjakul, S., Kishimura, H. (2015). Characteristics of acid-and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*), *LWT-Food Sci Technol*, 63(1): 71-76.
- Clark, K.L., Sebastianelli, W., Flechsenhar, K.R., Aukermann, D.F., Meza, F., Millard, R.L., Deitch, J.R., Sherbondy, P.S., Albert, A. (2008). 24 Week study on the use of collagen hydrolysate as a dietary supplement in athletes with activity-related joint pain, *Current Medical Research and Opinion* 24(5): 1485-1496.
- Courraud, J., Berger, J., Cristol, J. P., & Avallone, S. (2013). Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during *in vitro* digestion. *Food chemistry*, 136(2):871-877.

- Da Mata Rigoto, J., Ribeiro, T.H.S., Stevanato, N., Sampaio, A.R., Ruiz, S.P. Bolanho, B.C. (2019). Effect of açai pulp, cheese whey, and hydrolysate collagen on the characteristics of dairy beverages containing probiotic bacteria, *J. Food Process*, 42: 2953.
- Duan, R., Zhang, J, Du, X, Yao, X., & Konno, K. (2009). Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*, 112: 702-706.
- Dun, R., Jackson, H. T., Smith, Y. (2008). Methods for processing and utilization of low cost fishes: a critical appraisal, *J Food Sci Technol*, 32: 1-12.
- Edgar, S., Hopley, B., Genovese, L. (2018). Effects of collagen-derived bioactive peptides and natural antioxidant compounds on proliferation and matrix protein synthesis by cultured normal human dermal fibroblasts. *Sci Rep* 8, 10474. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28492-w>
- Engel, J., ve Bachinger, H.P. (2005). *Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix*. In: *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*, Springer, USA: 8-24.
- Ercan P, Nehir-El S. (2010). Koenzim Q10'un beslenme ve sağlık açısından önemi ve biyoyararlılığı. *TUBAV Bilim Dergisi*, 3 (2), 48-56.
- Exposito, J.Y., Cluzel, C., Garrone, R., Lethias, C. ve Garrone, Q. (1999). Short chain collagens in sponges are encoded by a family of closely related genes, *J. Biol. Chem.*, 266: 21923-21928.
- Eyre, D. R. ve Wu, J. J., (2005). Collagen Cross-Links, *Topics in Current Chemistry*: 207-229.
- Fairweather-Tait SJ. (1993). *Bioavailability of nutrients*. In: *Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ*, editors. *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. London: Academic Press: 384-388.
- Fitzgerald, R.J., Murray, B.A., ve Walsh, D.J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr*, 134: 980–988.
- Fratzl, P. (2008). *Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction*. In: *Collagen: Structure and Mechanics*, Fratzl P (ed), Springer, USA:1-13.

- Friess, W. (1998). Collagen – Biomaterial for Drug Delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45(2):113–136.
- Gao, L. L., Wang, Z. Y., Li, Z., Zhang, C. X., Zhang, D.Q. (2017). The characterization of acid and pepsin soluble collagen from ovine bones (Ujumuqin sheep), *J Integr Agr*,17(3): 704-711.
- Gelse, K., Pöschl, E. ve Aigner, T., (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis, *Advanced drug delivery reviews*, 55(12), 1531-1546.
- Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.E., Montero, M.P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocoll*, 25: 1813–1827.
- Grand View Research. (2022). Collagen Market Size, Share & Trends Analysis Report By Source, By Product (Gelatin, Hydrolyzed, Native, Synthetic), By Application (Food & Beverages, Healthcare, Cosmetics), By Region, And Segment Forecasts [Online]. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/collagen-market/> [Ziyaret Tarihi: 12.04.2022].
- Guillerminet, F., Beaupied, H., Fabien-Soule, V., Tome, D., Benhamou, C.L, Roux, C. ve Blais, A. (2010). Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: an *in vitro* and *in vivo* study, *Bone*. 46(3): 827-834.
- Gülmez, M. ve Güven, A. (2005). Fonksiyonel Gıdalar ve Sağlıkla İlişkisi, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 11(1): 17-24.
- Hedren, E., Diaz, V., & Svanberg, U. (2002). Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in vitro* digestion method. *European journal of clinical nutrition*, 56(5): 425-430.
- Holst, B., Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: From bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 73–82.
- Hong, H., Fan, H., Chalamaiah, M., ve Wu, J. (2019). Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives, *Food Chem.*,301, Article 125222.
- Hunter, D.J. (2011). Pharmacologic therapy for osteoarthritis the era of disease

- modification, *Nature Reviews Rheumatology* 7 (1): 13-22.
- Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K. ve Nakamura, Y. (2005). Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates, *Journal of agricultural and food chemistry*.53(16): 6531-6
- Jafari, H., Lista, A., Siekapen, M.M., Ghaffari-Bohlouli, P., Nie, L., Alimoradi, H., ve Shavandi, A. (2020). Fish collagen: Extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering, *Polymers*, 12, 2230.
- Jain, S., Kaur, H., Pandav, G., Dewan, A. ve Saxena, D. (2014). Collagen: Basis of Life, *Universal Research Journal of Dentistry*, 4(1): 1-9.
- Jeevithan, E., Wu, W., Nanping, W., Lan, H., ve Bao, B. (2014). Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone, *Process Biochem*, 49(10): 1767-1777.
- Kim, D.-U., Chung, H.-C., Choi, J., Sakai, Y., Lee, B.Y. (2018). Oral intake of low-molecular-weight collagen peptide improves hydration, elasticity, and wrinkling in human skin: randomized, double-blind, placebo-controlled study, *Nutrients*, 10: 826.
- Kim, H.K., Kim, Y.H., Park, H.J., Lee, N.H. (2013). Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from the skins of sea bass *Lateolabrax japonicus*, *Fish Sci.*,79: 849–856
- King'ori, A. M. (2011). A Review of the Uses of Poultry Eggshells and Shell Membranes, *International Journal of Poultry Science*, 10(11): 908–912.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Shahidi, F. (2010). Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) *Food Sci Technol*. 43:792–800.
- Kleinnijenhuis, A.J., Holthoorn, F.L., Maathuis, A.J., Wittrant, Y. (2020). Non-targeted and targeted analysis of collagen hydrolysates during the course of digestion and absorption. *Anal Bioanal Chem*. 412: 973–982.
- Krishnamoorthi, J., Ramasamy, P., Shanmugam, V. ve Shanmugam, A. (2017).

- Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831) from Puducherry coast. *Biochem biophys rep*, 10: 39-45.
- Kulkarni, S., Acharya, R., Rajurkar, N., & Reddy, A. (2007). Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by *in vitro* digestion method. *Food chemistry*, 103(2),681-688.
- Kutlu Kantar, N. , Yılmaz, M. S. , İşçi Yakan, A. ve Şakıyan Demirkol, Ö. (2021). Gıdalardan biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda derin ötektik çözücülerin kullanımı, *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 10 (2) : 591-597.
- Kutlu, N., Yeşilören, G., İşçi, A. ve Şakıyan, Ö. (2017). Konvansiyonel ekstraksiyona alternatif: Yeşil teknolojiler. *GIDA*, 42 (5): 514-526.
- Lafarga, T., ve Hayes, M. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Sci*, 98(2): 227-239.
- Larder, C. E. (2022). Simulated Gastrointestinal Digestion of Collagen Hydrolysates: Assessment of Peptide Bioavailability, Bioactivity and Impact on Gut Microbial Metabolites. McGill University.
- Lee, S.J., Lee, S.Y., Chung, M.S., Hur, S.J. (2016). Development of novel *in vitro* human digestion systems for screening the bioavailability and digestibility of foods. *Journal of Functional Foods*, 22 pp, 113-121.
- León-López, A., Morales-Peñaloza, A., Martínez-Juárez, V.M., Vargas-Torres, A., Zeugolis, D.I., Aguirre-Álvarez, G. (2019). Hydrolyzed Collagen Sources and Applications. *Molecules*, 24: 4031.
- Li Z., Wang B., Chi C., Gong Y., Luo H., ve Ding G. (2013). Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa*. *Food Res. Int.* 51: 283–293. Doi: 10.1016/j.foodres.12.031.
- Li, D., Mu, C., Cai, S., Lin, W. (2009). Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. *Ultrason Sonochem*, 16: 605–609.
- Liang, Q., Wang, L., Sun, W., Wang, Z., Xu, J. ve Ma, H. (2014). Isolation and

- characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Process Biochemistry*, 49(2): 318–323.
- Liu, D., Wei, G., Li, T., Hu, J., Lu, N., Regenstein, J. M., ve Zhou, P. (2015a). Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin, *Food Chem*, 172: 836- 843.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., ve Darnell, J. (2000). *The Fibrous Proteins of the Matrix*, Edited by W. H. Freeman, New York.
- Aguirre, R., & May, J. M. (2008). Inflammation in the vascular bed: importance of vitamin C, *Pharmacology & therapeutics, Molecular Cell Biology*, Section 22.3 : Collagen:119(1): 96-103.
- López, A., Marroquín, X.A., Lozada, G., Montiel, R.G., Álvarez, G. (2020). Characterization of Whey-Based Fermented Beverages Supplemented with Hydrolyzed Collagen: Antioxidant Activity and Bioavailability. *Foods* 9: 1106.
- Löker, G., Amoutzopoulos, B., Çevikkalp, S., Yaman, M., Şanlı, F., Küçük, F., Ötleş, S., Küçükçetin, A. (2015). TürKomp: Ülkesel düzeyde ve uluslararası standartlarda gıda bileşen veri üretme sistemi. *Dünya Gıda Dergisi*, 37-44.
- Luo, J., Zhou, Z., Yao, X., ve Fu, Y. (2020). Mineral-chelating peptides derived from fish collagen: Preparation, bioactivity and bioavailability, *Lwt-Food Science and Technology*, Article, 110209.
- Lupo, M.P. (2001). Antioxidants and vitamins in cosmetics. *Clin Dermatol* 19: 467-473.
- Mahboob, S. (2015). Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. *J Food Sci Technol*, 52(7): 4296-4305.
- Maia Campos, P. M., Melo, M. O. ve Siqueira César, F. C. (2019). Topical application and oral supplementation of peptides in the improvement of skin viscoelasticity and densit, *J. Cosmet. Dermatol*, 18: 1693-1699.
- McDougall, G. J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion

- system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 5896–5904.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food and international consensus. *Food & Function*, 5: 1113-1124.
- Mohammadi, R., Mohammadifar, M. A., Mortazavian, A. M., Rouhi, M., Ghasemi, J. B. ve Delshadian, Z. (2016). Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM), *Food chemistry*, 190: 186-193.
- Moskowitz R.W. (2000). Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Seminars in arthritis and rheumatism; Elsevier*; 30(2): 87-99.
- Musayeva, F., Özcan, S., ve Kaynak, M. (2022). A review on collagen as a food supplement, *Journal of Pharmaceutical Technology* , 3(1): 7-29.
- Myllyharju, J. ve Kivirikko, K. I. (2004). Collagens, Modifying Enzymes and Their Mutations in Humans, Flies and Worms, *Trends in Genetics*, 20(1): 33-43.
- Nicolaidou, E. ve Katsambas, A.D. (2000). Vitamins A, B, C, D, E, F, Trace Elements and Heavy Metals: Unapproved Uses or Indications. *Clin. Dermatol.* 18: 87-94.
- Ninan, G., Joseph, J. ve Aliyamveetil, Z. A. (2014). A comparative study on the physical, chemical and functional properties of carp skin and mammalian gelatins, *Journal of Food Science and Technology*, 51(9): 2085–2091.
- Nomura, Y., Oohashi, K., Watanabe, M. ve Kasugai, S., (2005). Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatine to ovariectomized rats. *21(11-12)*: 1120– 1126.
- Nusgens, B.V., Humbert, P., Rougier, A., Colige, A.C., Haftek, M., Lambe, C.A., Richard, A., Creidi, P. ve Lapiere, C.M. (2001). Topically applied Vitamin C enhances the m-RNA level of collagens I and III, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in the human dermis. *J. Invest. Dermatol.* 116(6): 853-859.
- Oesser S., Adam M., Babel W., Seifert J. (1999). Oral administration of <sup>14</sup>C labelled gelatine hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL) *Journal of Nutrition*, 129 :1891-1895.

- Oğuz, O. (2002). Yaşlılık ve Deri. *T Klin Dermatol*. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 12: 225-8.
- Ohara H, Matsumoto H, Ito., vd., (2007) Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J Agric Food Chem* 55:1532–1535.
- Pal, G.K. ve Suresh, P.V. (2016). Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagenbased novel functional food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37: 201-215.
- Pasini, G., Simonato, B., Giannattasio, M., Peruffo, A. D., & Curioni, A. (2001). Modifications of wheat flour proteins during *in vitro* digestion of bread dough, crumb, and crust: an electrophoretic and immunological study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(5): 2254-2261.
- Peptan, (2022). *A Highly Bioavailable Peptide with Clinically Proven Efficacy*. [Online]. [https://www.therascience.com/en\\_int/peptan-en/](https://www.therascience.com/en_int/peptan-en/) [Ziyaret Tarihi: 12.02.2022].
- Phillips, C.L., Tajima, S. ve Pinnel, S.R. (1992). Ascorbic acid and transforming growth factor beta1 increase collagen biosynthesis via different mechanisms: coordinate regulation of pro alfa(1) and pro alfa(III) collagens. *Arch. Biochem. Biophys.* 295: 397-403.
- Porrini, M.; Riso, P. (2008). Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutr. Metab. Cardiovasc Dis.* 18, 647–650.
- Postlethwaite, A.E, Seyer, J.M. ve Kang, A.H., (1978). Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen derived peptides. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States America* 75(2): 871-875.
- Prockop, D. J. ve Kivirikko, K. I., (1995). Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potential For Therapy, *Annual Review of Biochemistry*, 64(1): 403–434.
- Ramadass, S.K., Perumal, S., Gopinath, A., Nisal, A., Subramanian, S., Madhan, B. (2014). Sol–gel assisted fabrication of collagen hydrolysate composite

scaffold: A novel therapeutic alternative to the traditional collagen scaffold. *Acs Appl. Mater. Interfaces*. 6: 15015–15025.

Rodriguez-Roque, M. J., Rojas-Graue, M. A., Elez-Martinez, P., & Martin-Belloso, O. (2014). *In vitro* bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice-and milk-based beverages. *Food Research International*, 62: 771-778.

Ross, A. C., Caballero, B., Cousins, R. J., Tucker, K. L., & Ziegler, T. R. (2012). *Modern nutrition in health and disease* (No. Ed. 11). Lippincott Williams & Wilkins.

Rousselot, (2011). *The production of collagen hydrolysate*. [Online]. <https://peptan.com/whats-the-difference-between-collagen-peptides-and-hydrolyzed-collagen/> [Ziyaret Tarihi: 12.02.2022].

Sarbon, N. M., Badii, F., ve Howell, N. K. (2018). Purification and characterization of antioxidative peptides derived from chicken skin gelatin hydrolysate. *Food Hydrocoll*, 85: 311-320.

Schumann, K., Classen, H.G., Hages, M., Prinz-Langenhof, R., Pietrzik, K., Biesalski, H.K. (1997). Bioavailability of oral vitamins, minerals and trace elements in perspective. *Drug Res* 47: 369-80.

See, S. F., Ghassem, M., Mamot, S., ve Babji, A. S. (2015). Effect of different pretreatments on functional properties of African catfish (*Clarias gariepinus*) skin gelatin. *J Food Sci Technol*, 52(2): 753-762.

Sharma, S.R., Poddar, R., ve Sen, P. (2008). Effect of vitamin C biosynthesis degree of birefringence in polarization sensitive optical coherence tomography. *African Journal of Biotechnology* 7: 2049-2054.

Sibilla, S., Godfrey, M., Brewer, S., Budh-Raja, A., ve Genovese, L. (2015). An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen as a nutraceutical on skin properties: Scientific background and clinical studies. *Open Nutraceuticals J*. 8: 29–42.

Silva, J.O.C., Barros, A.A., Aroso, I.M., Fassini, D., Silva, T.H., Reis, R.L., Duarte, A.R.C. (2016). Extraction of collagen/gelatin from the marine demosponge *Chondrosia reniformis* (Nardo, 1847) using water acidified with carbon

- dioxide–process optimization. *Ind. Eng. Chem. Res.* 55: 6922–6930.
- Skov, K., Oxfeldt, M., Thøgersen, R., Hansen, M., Bertram, H.C. (2019). Enzymatic hydrolysis of a collagen hydrolysate enhances postprandial absorption rate-a randomized controlled trial. *Nutrients*,11: 1064.
- Avcı, C. (2022). Kolajenin Fonksiyonel Özellikleri Ve Kullanımı Üzerine Tüketici Algısının Değerlendirilmesi (Yayımlanmış yüksek lisans tezi). Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Konya.
- Song, H. ve Li, B. (2017). Beneficial Effects of Collagen Hydrolysate: A Review on Recent Developments. *Biomed J Sci & Tech Res*, 1(2): 1-4.
- Song, K. M., Jung, S. K., Kim, Y. H., Kim, Y. E., ve Lee, N. H. (2018). Development of industrial ultrasound system for mass production of collagen and biochemical characteristics of extracted collagen. *Food Bioprod Process*, 110: 96- 103.
- Sousa, R.O., Martins, E., Carvalho, D.N., Alves, A.L., Oliveira, C., Duarte, A.R.C., Silva, T.H., ve Reis, R.L. (2020). Collagen from Atlantic cod (*Gadus morhua*) skins extracted using CO<sub>2</sub> acidified water with potential application in healthcare, *J. Polym. Res.* 27: 1–9.
- Srikanya, A., Dhanapal, K., Sravani, K. Madhavi, K. ve Kumar, G.P. (2017). A study on optimization of fish protein hydrolysate preparation by enzymatic hydrolysis from tilapia fish waste mince. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(12): 3220–9
- Strawich, E. ve Nimni, M.E. (1971). Properties of a collagen molecule containing three identical components extracted from bovine articular cartilage. *Biochemistry*, 10 (21): 3905-3911.
- Sun, L., Hou, H., Li, B. ve Zhang, Y. (2017). Characterization of acid-and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *International Journal of Biological Macromolecules*, 99: 8-14.
- Tanaka, M., Koyama, Y., ve Nomura, Y. (2009). Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-Induced. *Biosciences Biotechnology Biochemistry, Japan*, 73 (4): 930-2.
- Tang et al. (2017;2021). *Journal of Voice, published by Elsevier Inc.* (Amsterdam, The

Netherlands), Reilly and Lozano, Plastic and Aesthetic Research, published by OAE Publishing Inc.

Tavman, Ş., Kumcuoğlu, S. ve Akkaya, Z. (2009). Bitkisel ürünlerin atıklarından antioksidan maddelerin ultrason destekli ekstraksiyonu. *34*(3): 175-182.

Temiz, A. (2014). *Enzimler*. Gıda Kimyası, Saldamlı, İ., Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, Türkiye: 392.

Thakur, N., Raigond, P., Singh, Y., Mishra, T., Singh, B., Lal, M. K., & Dutt, S. (2020). Recent updates on bioaccessibility of phytonutrients. *Trends in Food Science & Technology*, *97*: 366-380.

Thomas, D.P. (1997). Sailors scurvy and science. *J. R. Soc. Med.* *90*(1): 50-54.

Türközü, D. (2014). Marul ve roka sebzelerine uygulanan bazı dezenfektanların sebzelerin c vitamini içerikleri üzerine etkisinin değerlendirilmesi. (Yayımlanmış yüksek lisans tezi). Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara.

Udenigwe, C., Abioye, R.O., Okagu, I.U., Obeme-Nmom, J.I. (2021). Bioaccessibility of bioactive peptides: recent advances and perspectives *Curr. Opin. Food Sci.*, 39 pp. 182-189.

Uğur, H., Çatak, J., Mızrak, Ö. F., Çebi, N. ve Yaman, M. (2020). Determination and evaluation of *in vitro* bioaccessibility of added vitamin C in commercially available fruit, vegetable and cereal-based baby foods. *Food Chemistry*, 330.

Varani, J., Dame, M.K., Rittie, L., Fligel, S.E.G., Kang, S., Fisher, G.J. ve Voorhees, J.J. (2006). Decreased collagen production in chronologically aged skin: Roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am. J. Pathol*, *168*: 1861–1868.

Walran, S., Chiotelli, E., Noirt, F., Mwewa, S., Lassel, T. (2008). Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen – specific amino acids in plasma. *Journal of Agriculture and Food Chemical* *56* (17): 7790-5.

Wang J., Pei X., Liu H., Zhou D. (2018). Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) *Int. J. Biol. Macromol*, *106*: 544–550.

- Wang, B., Xie, N., Li, B. (2019), Influence of peptide characteristics on their stability, intestinal transport, and *in vitro* bioavailability: A review, *Journal of Food Biochemistry*, 43:12571.
- Wang, L., Jiang, Y., Wang, X., Zhou, J., Cui, H., Xu, W., He, Y., Ma, H., Gao, R. (2018). Effect of oral administration of collagen hydrolysates from Nile tilapia on the chronologically aged skin. *J. Funct. Foods*, 44: 112–117
- Wang, L.; Wang, Q.; Qian, J.; Liang, Q.; Wang, Z.; Xu, J.; He, S.; Ma, H. (2015). Bioavailability and bioavailable forms of collagen after oral administration to rats. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 3752–3756.
- Wang, W., Chen, M., Wu, J., ve Wang, S. (2015). Hypothermia protection effect of antifreeze peptides from pigskin collagen on freeze-dried *Streptococcus thermophiles* and its possible action mechanism, *Lwt-Food Sci. Technol*, 63: 878–885.
- Wauquier F., Daneault A., Granel H., Prawitt J., Fabien Soulé V., Berger J., Pereira B., Guicheux J., Rochefort G.Y., Meunier N. (2019). Human Enriched Serum Following Hydrolysed Collagen Absorption Modulates Bone Cell Activity: From Bedside to Bench and Vice Versa. *Nutrients*.11:1249.
- Williams, M. (2013). *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, 15th Edition Edited by M.J. O’Neil, Royal Society of Chemistry, Cambridge, Drug Development Research, 74(5): 339-339.
- Wu, J., Fujioka, M., Sugimota, K., Mu., G., ve Ishimi, Y. (2004). Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 22-47-553.
- Yaman, M., Çatak, J., Uğur, H., Gürbüz, M., Belli, İ., Tanyıldız, S. N.,LEE Yıldız, M. C. (2021). The bioaccessibility of water review. *Trends in Food Science & Technology* .soluble vitamins.
- Yang, H., ve Shu, Z. (2014). The extraction of collagen protein from pigskin. *J Chem Pharm Res*, 6(2): 683-687.
- Yazaki, M., Ito, Y., Yamada, M., Goulas, S., Teramoto, S., Nakaya, M., Ohno, S., ve Yamaguchi, K. (2017). Oral ingestion of collagen hydrolysate leads to the

transportation of highly concentrated Gly-Pro-Hyp and its hydrolyzed form of Pro-Hyp into the bloodstream and skin. *J. Agric. Food Chem*, 65: 2315–2322.

Yener, G. ve Erdal, S. (2015). Kolajen biyosentezini aktive eden maddeler ve etki mekanizmaları, *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(1): 3-13.

Yetim, H., (2011). Jelatin üretimi, özellikleri ve kullanımı. 1. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi: Gıda Katkı Maddeleri: Sorunlar ve Çözüm Önerileri, 19-20 Kasım, 2011, Erciyes Üniversitesi, Kayseri: 86-94.

Yuswan, M.H, Jalil N.H.A., Mohamad, H., Keso, S., Mohamad, N.A., Yusoff T.S.T.M., et al. (2020). Hydroxyproline determination for initial detection of halal-critical food ingredients (gelatin and collagen), *Food chemistry*. 337:127762.

Zhang Y., Zhang Y., Liu X., Huang L., Chen Z., ve Cheng J. (2017). Influence of hydrolysis behaviour and microfluidisation on the functionality and structural properties of collagen. *Food Chem*, 227:211–218.

# ÖZGEÇMİŞ

**AD SOYAD: HANDAN DOĞAN**

## **A. EĞİTİM DURUMU**

**Lisans** : Namık Kemal Üniversitesi, Gıda Mühendisliği (2011-2015), Tekirdağ

**Yüksek Lisans**: İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi (2021-2023), İstanbul

## **B. MESLEKİ DENEYİM**

FMA Tavukçuluk Ltd. Şti. - Gıda Mühendisi (İZP) (2015-2018)

Tek Doğan Tur. Taş. Ltd. Şti.- Danışman Gıda Mühendisi- Denetçi (2018-2021)

Collaxir Arge ve Biyoteknoloji San. Tic. A.Ş. – Kurucu, Genel Müdür (2021- )

## **C.PROJELER**

TÜBİTAK- 1512 Bireysel Genç Girişim Programı- Geliştirmiş Güncel Yeşil Teknoloji Temelli Üretim Metodu ile Türkiye'nin İlk Balık Kolajeni Üretimi- Proje Yürütücüsü (2020-2022)

## **D. YAYINLAR**

Doğan, H. (2023). Piyasada Satılan Kolajen Hidrolizatlarının *İn Vitro* Ortamda Biyoerişebilirliklerinin İncelenmesi, 1. Uluslararası Öğrenci Kongresi, Batman Üniversitesi.