



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DENİZ ÜRÜNLERİNDEN ULTRASON DESTEKLİ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ
ile KOLAJEN ELDESİ**

Kübra GÜL

DANIŞMAN
Doç. Dr. Aslı GÖK

II. DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Emre YEMİŞKEN

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Temel İşlemler ve Termodinamik Programı

Haziran, 2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Kübra GÜL tarafından, **Doç. Dr. Aslı GÖK** danışmanlığında hazırlanan "**DENİZ ÜRÜNLERİNDEN ULTRASON DESTEKLİ ESTRAKSİYON YÖNTEMİ ile KOLAJEN ELDESİ**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **11/07/2023** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Doç. Dr. Aslı GÖK İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Doç. Dr. Melisa LALİKOĞLU İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Doç. Dr. Yavuz Selim AŞÇI İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Kimya Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

BÜTÇE DESTEKLERİ

DENİZ ÜRÜNLERİNDEN ULTRASON DESTEKLİ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ ile KOLAJEN ELDESİ

Bu tez çalışması için herhangi bir kurumdan bütçe desteği alınmamıştır.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesi sırasında ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, güleryüz ve samimiyetiyle her daim yanımda olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Aslı GÖK'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında fikirleriyle beni yönlendiren ve desteğini esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji A.B.D Dr. Öğr. Üyesi Emre YEMİŞKEN'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca doğaya ve tüm canlılara karşı sevgi ve saygı duymayı, dürüst, ahlaklı, çalışkan ve erdemli olmayı bana en güzel örnek olarak beni yetiştiren aynı zamanda maddi ve manevi her zaman yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Haziran 2023

Kübra GÜL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BÜTÇE DESTEKLERİ	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.2. GENEL BİLGİLER	2
1.2.1. Kolajen Yapısı ve Özellikleri	2
1.2.2. Kolajen Tipleri	5
1.2.3. Kolajen Uygulamaları	7
1.2.4. Kolajen Kaynakları	9
1.2.5. Kolajen Ekstraksiyon Yöntemleri	12
1.2.6. Deniz Ürünlerinin Kolajen Eldesindeki Potansiyeli	17
1.2.7. Tez Kapsamında Kullanılan Denizel Kaynaklı Türler.....	19
2. MATERYAL VE METOT	29
2.1. MATERYAL	29
2.1.1. Ön Hazırlık ve Ekstraksiyon Aşamasında Kullanılan Kimyasallar	29
2.2. METOT.....	29
2.2.1. Örneklerin Temizlenmesi	29
2.2.2. Kolajen Olmayan Proteinlerin Uzaklaştırılması	29
2.2.3. Yağların Uzaklaştırılması.....	30
2.2.4. Ultrases Destekli Ekstraksiyon.....	31
2.2.5. Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) ile Optimizasyon Çalışması	35

2.2.6. SDS-PAGE Analizi	38
2.2.7. FTIR Analizi	39
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	40
3.1. EKSTRAKSİYON VERİMİ.....	40
3.2. SDS-PAGE SONUÇLARI	40
3.3. KOLAJEN FTIR SPEKTROSKOPİSİ SONUÇLARI	42
3.4. YANIT YÜZEY METODU (RSM) OPTİMİZASYON SONUÇLARI	48
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR.....	59



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. 1: Prolin molekül yapısı	3
Şekil 1. 2: Hidroksiprolin molekül yapısı	4
Şekil 1. 3: Glisin molekül yapısı	4
Şekil 1. 4: Üçlü sarmal yapı	5
Şekil 1. 5: Kolajen eldesinde kullanılan kaynaklar	10
Şekil 1. 6: Kolajen ekstraksiyon yöntemleri	12
Şekil 1. 7: <i>S. solea</i> genel görünüşü	20
Şekil 1. 8: <i>L. sceleratus</i> genel görünüşü	21
Şekil 1. 9: <i>R. clavata</i> genel görünüşü	22
Şekil 1. 10: <i>U. scaber</i> genel görünüşü	24
Şekil 1. 11: <i>G. niger</i> genel görünüşü	25
Şekil 1. 12: <i>A. aurita</i> genel görünüşü	27
Şekil 2. 1: Ön hazırlık süreci şematik gösterimi	31
Şekil 2. 2: Kolajen ekstraksiyonu akış şeması	32
Şekil 2. 3: Liyofilize edilmiş <i>L. sceleratus</i> görünümü	33
Şekil 2. 4: Liyofilize edilmiş <i>R. clavata</i> görünümü	33
Şekil 2. 5: Liyofilize edilmiş <i>S. solea</i> görünümü	34
Şekil 2. 6: Liyofilize edilmiş <i>U. scaber</i> görünümü	34
Şekil 2. 7: Liyofilize edilmiş <i>G. niger</i> görünümü	35
Şekil 2. 8: Denizanasının diyaliz aşamasındaki görünümü	37
Şekil 2. 9: Ultrasonik ekstraksiyon aşaması	37
Şekil 2. 10: Denizanasının ultrasonik ekstraksiyon sırasında görünümü	38

Şekil 2. 11: Liyofilize edilmiş denizanası numunesinin görünümü.....	38
Şekil 3. 1: Balık derisi kolajeni SDS- PAGE bant görünümü.....	41
Şekil 3. 2: <i>S. solea</i> deri kolajeni FTIR analiz grafiği.....	42
Şekil 3. 3: <i>L. sceleratus</i> deri kolajeni FTIR analiz grafiği.....	43
Şekil 3. 4: <i>R. clavata</i> deri kolajeni FTIR analiz grafiği.....	44
Şekil 3. 5: <i>G. niger</i> deri kolajeni FTIR analiz grafiği.....	45
Şekil 3. 6: <i>U. scaber</i> deri kolajeni FTIR analiz grafiği.....	46
Şekil 3. 7: <i>A. aurita</i> kolajeni FTIR analiz grafiği.....	47
Şekil 3. 8: Öngörülen veriler ile deneysel veriler arasındaki ilişki grafiği.....	48
Şekil 3. 9: Ekstraksiyonda vuruş döngüsü ve sıcaklığın verime etkisinin üç boyutlu çizimi ..	50
Şekil 3. 10: Ekstraksiyonda süre ve sıcaklığın verime etkisinin üç boyutlu çizimi.....	51
Şekil 3. 11: Ekstraksiyonda genlik ve sıcaklığın verime etkisinin üç boyutlu çizimi	51
Şekil 3. 12: Ekstraksiyonda vuruş döngüsü ve sürenin verime etkisinin üç boyutlu çizimi....	52
Şekil 3. 13: Ekstraksiyonda genlik ve sürenin verime etkisinin üç boyutlu çizimi	52
Şekil 3. 14: Ekstraksiyonda genlik ve vuruş döngüsünün verime etkisinin üç boyutlu çizimi	53
Şekil 3. 15: Süre ve sıcaklığın ekstraksiyon verimine etkisinin iki boyutlu çizimi	53
Şekil 3. 16: Vuruş döngüsü ve sıcaklığın ekstraksiyon verimine etkisinin iki boyutlu çizimi	54
Şekil 3. 17: Genlik ve sıcaklığın ekstraksiyon verimine etkisinin iki boyutlu çizimi	54
Şekil 3. 18: Süre ve vuruş döngüsünün ekstraksiyon verimine etkisinin iki boyutlu çizimi ...	55
Şekil 3. 19: Süre ve genliğin ekstraksiyon verimine etkisinin iki boyutlu çizimi.....	55
Şekil 3. 20: Vuruş döngüsü ve genliğin ekstraksiyon verimine etkisinin iki boyutlu çizimi ..	56

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. 1: Vücutta yaygın olarak bulunan kolajen çeşitleri ve bulunduğu noktalar	5
Tablo 1. 2: Farklı kolajen tipleri ve buldukları dokular.....	6
Tablo 1. 3: Kolajen ekstraksiyonunda kullanılan kaynaklar	11
Tablo 1. 4: Karasal ve denizel kaynaklı kolajen arasındaki farklar.....	18
Tablo 2. 1: Merkezi Kompozit Tasarım modeline göre oluşturulan deneme çizelgesi	36
Tablo 3. 1: Çalışmada kullanılan balık türleri için ekstraksiyon verim değerleri	40
Tablo 3. 2: Ultrases destekli ekstraksiyonda elde edilen deneysel veriler için ANOVA test sonuçları	49

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
-----------------	-----------------

%	: Yüzde
dk	: Dakika
m	: Metre
M	: Molar
°C	: Derece Santigrat
µL	: Mikrolitre
g	: Gram
kDa	: Kilo dalton
mL	: Mililitre
v	: Hacim
w	: Ağırlık
kg	: Kilogram
nm	: Nanometre
cm	: Santimetre
s	: Saniye

Kısaltmalar	Açıklama
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
ESM	: Ekstraselüler matriks
PGA	: Poliglikolik asit
PLA	: Polilaktik asit
UV	: Ultraviyole
FDA	: U.S. Food and Drug Administration
BSE	: Bovine Spongiform Encephalopathy
TSE	: Transmissible Spongiform Encephalopathy
FMD	: Foot and Mouth Disease
UAE	: Ultrasound Assisted Extraction
MAE	: Microwave Assisted Extraction
SSC	: Salt Soluble Collagen
ASC	: Acid Soluble Collagen
PSC	: Pepsin Soluble Collagen
CCD	: Central Composite Design
RSM	: Response Surface Methodology
FTIR	: Fourier Transform Infrared
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
A.B.D	: Anabilim Dalı
TTX	: Tetrodotoxin

ÖZET

[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

DENİZ ÜRÜNLERİNDEN ULTRASON DESTEKLİ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ ile KOLAJEN ELDESİ

[Kübra GÜL]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Temel İşlemler ve Termodinamik Programı

[Danışman : Doç. Dr. Aslı GÖK

II. Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Emre YEMİŞKEN]

[Kolajen, insan vücudunda bulunan toplam proteinin yaklaşık %30'unu oluşturur ve ekstraselüler matrisin ana bileşenidir. Dünyada artan nüfus sonucu gıda ihtiyacının artması, sağlık ve kozmetik sektöründeki gelişmeler, beslenme alışkanlıklarında artan bilinç, salgın hastalıklar sonucu gıda takviyelerinin yaygınlaşması gibi etkenler kolajenin daha popüler olmasına neden olmuştur. Kolajenin kozmetik, gıda, farmasötik, doku mühendisliği gibi birçok uygulama alanı bulunmaktadır. Genel olarak sığır ve domuz gibi karasal memelilerden elde edilir fakat bazı zoonotik hastalıklar ve dini engeller gibi nedenlerden dolayı kullanımı kısıtlanmaktadır. Kolajen ekstraksiyonu için yapılan son çalışmalar daha çok omurgalı ve omurgasız deniz canlıları üzerinedir. Dünya'nın ¾'ü sularla kaplı olup bunun büyük bir kısmını denizler oluşturmaktadır. Bu durum denizel kaynakların ne kadar zengin olduğunu ve deniz canlılarının potansiyel araştırma konusu olabileceğini göstermektedir.

Balık işleme proseslerinde bir balığın türüne ve yapılan işleme göre %20-80'i atık olabilmektedir. Atık olarak görülen kısımların önemli yağ asitleri, bazı vitamin ve mineraller,

protein gibi bileşenlere sahip olduğu araştırmalar sonucu kanıtlanmıştır. Kolajen eldesinde önemli bir potansiyel kaynak olarak görülen deniz canlılarından biri de denizanasıdır. Türüne bağlı olarak ağırlıkça %1-2 protein içermektedir ve neredeyse tamamını kolajen oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın amacı bazı balık türlerinin (*S. solea*, *L. sceleratus*, *G. niger*, *U. scaber*, *R. clavata*) derilerinden ve denizanasından (*A. aurita*) modern ve yeşil teknoloji olan ultrases destekli kolajen ekstraksiyonu gerçekteşirmek olup ayrıca denizanası kolajeni için yanıt yüzey metodu ile optimizasyon çalışması yaparak ticari değeri olmayan denizel kaynaklardan çevreci, sürdürülebilir kalkınma hedefine uygun ve katma değeri yüksek ürün elde etmektir. Çalışma şartlarının optimizasyonu için sıcaklık (4,14,24 °C), süre (10,15,20 dk), genlik (%20,30,40), atış (1,2,3 s) olmak üzere 4 değişken belirlenmiştir ve en yüksek verim 6,25 olup optimum koşulların 4°C, %30, 2s,15 dk olduğu görülmüştür.

Elde edilen kolajene ait FTIR ve SDS PAGE analiz sonuçları denizel kaynaklı kolajenin ağırlıklı olarak Tip I kolajen içerdeğini, yapısındaki üçlü sarmalın bozulmadığını ve sığır kolajeniyle benzer özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. |

Haziran 2023 , [...88..] sayfa.

Anahtar kelimeler: |ultrases destekli ekstraksiyon, yanıt yüzey metodu, deniz kolajeni, sürdürülebilirlik |

ABSTRACT

[M.Sc. THESIS]

**[COLLAGEN EXTRACTION FROM SEA PRODUCTS BY ULTRASOUND
ASSISTED EXTRACTION METHOD]**

[Kübra GÜL]

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemical Engineering

Basic Operations and Thermodynamics Program

[Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Aslı GÖK

Co-Supervisor: Assist. Prof. Dr. Emre YEMİŞKEN]

[Collagen is the main component of the extracellular matrix and constituting approximately 30% of the total protein in the human body. Factors such as the increase in the need for food as a result of the increasing population in the world, the developments in the health and cosmetics industry, the spread of food supplements as a result of epidemics and the increasing awareness about nutrition have made collagen more popular. Collagen has many different applications such as cosmetics, food, pharmaceutical, tissue engineering. It's generally obtained from terrestrial mammals such as bovine and porcine but its use is restricted due to some zoonotic disease and religious barriers. Recent studies for collagen extraction are mostly on marine vertebrates and invertebrates. Three fourths of the Earth's surface is covered with water. This situation shows how rich the marine resources and that sea creatures can be a potential research topic.

In fish processing processes, 20-80% of a fish can be waste, depending on the type of fish and the process. It has been proven as a result of research that the parts seen as waste include

components such as essential fatty acids, some vitamins and minerals, and protein. One of the marine organisms that is seen as an important potential source for collagen production is jellyfish. Depending on the species, it contains 1-2% protein by weight and almost all of the protein is collagen.

The aim of this study is to perform ultrasound assisted collagen extraction which is a modern and green technology from the skins of some fish species (*S. solea*, *L. sceleratus*, *G. niger*, *U. scaber*, *R. clavata*) and jellyfish (*A. aurita*). At the same time, it is to obtain an environmentally friendly product with high added value, suitable for sustainable development, from marine resources that have no commercial value, by performing an optimization study for jellyfish collagen with the response surface method. For the optimization of the working conditions, 4 variables were determined as temperature (4,14,24 °C), time (10,15,20 min), amplitude (20,30,40%) and pulse (1,2,3 s). Optimum conditions were found to be 4°C, 30%, 2s,15 minutes.

The FTIR and SDS PAGE analysis results of the obtained collagen showed that the marine-derived collagen mainly contained Type I collagen, the triple helix in its structure was not disrupted and it had similar properties to bovine collagen. |

June 2023, [.88...] pages.

Keywords: [ultrasound assisted extraction, response surface methodology, marine collagen, sustainability]

1. GİRİŞ

1.1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolajen, omurgalı vücudunda bulunan tendon, kıkırdak, deri, kemik, eklem gibi çeşitli bağ dokuların yapısında bulunan lifsi yapıda bir proteindir. Aynı zamanda hücre dışı matrisin ana bileşenidir [1], [2] Bununla birlikte vücuttaki toplam proteinin yaklaşık %30' unu oluşturur. Doku ve organları korumak, desteklemek, eklem hareketlerini kolaylaştırmak en önemli görevlerindedir. Günümüze kadar en az 29 tip kolajen tanımlanmış olup her biri farklı aminoasit bileşimine sahiptir. Kolajenin suyu emme ve tutma, nemlendirme, düşük viskozite, emülsifikasyon gibi özelliklere sahip olması geniş bir kullanım alanı sunmaktadır. Başta gıda, kozmetik, tıp olmak üzere birçok farklı sektörde kolajen kullanılmaktadır. Günümüzde farklı kaynaklardan kolajen eldesi mümkün olmakla beraber büyük oranda sığır veya domuz deri ve kemiklerinden elde edilir. Fakat bazı hayvan hastalıkları ve dini hassasiyetler domuz veya sığırdan kolajen eldesini sınırlandırmıştır. Bu gibi nedenler araştırmacıları alternatif kolajen kaynakları aramaya teşvik etmiştir [3]. Alternatif kolajen kaynaklarından en önemlisi deniz ürünleridir. Balık, denizanası, sünger başlıca kolajen kaynaklarına örnek olarak verilebilir [4].

2050 yılına kadar dünya nüfusunun yaklaşık 2 milyar daha artarak 9,6 milyar olacağı öngörülmektedir. Artan nüfusa karşılık mevcut kaynakların etkili ve verimli şekilde kullanılması giderek daha önemli hale gelmektedir. Balık ve deniz ürünleri dünya genelinde ticareti en fazla yapılan gıda ürünleri arasındadır [116]. Nüfus artarken balıkçılık sektöründe de her geçen gün büyüme gözlenmektedir. 2020 yılında yaklaşık 214 milyon ton balıkçılık ve su ürünleri üretimi gerçekleşmiştir. Su ürünleri tüketimi kişi başına 1960'larda ortalama 9,9 kg iken 2020 yılında 20,2 kg olmuştur. Bu miktarın, değişen beslenme programları ve insanların gıda tüketimi konusunda giderek bilinçlenmesi sonucu 2030 yılında kişi başına 21,4 kg olacağı düşünülmektedir [117]. İşleme aşamasında bir balığın türüne ve uygulanan işleme göre yaklaşık %20-80' i atık olabilmektedir [5].

Dünya genelinde sayıları giderek artan ve ciddi anlamda sorunlara yol açan denizaneleri daha çok yerel pazarlarda bulunmakta ve tüketimi çok fazla yapılmamaktadır. Deniz anası, türüne bağlı olarak yapısında ağırlıkça yaklaşık % 95-99 su, % 1-2 protein, % 2-3 tuz bulundurur ve

yapısındaki proteinin büyük bir çoğunluğu kolajendir. Doğada bol miktarda bulunan, bulaşıcı hastalık riski olmayan ve düşük maliyetli bu deniz canlısından kolajen eldesi son yıllarda çok daha ilgi çekici hale gelmiştir. Yapılan çalışmalar, deniz anasından kolajen ekstraksiyonunun sığır ve domuz kaynaklı kolajene alternatif olabileceğini göstermiştir [6].

2022 yılında kolajenin küresel çapta pazar payı yaklaşık 9,1 milyar ABD dolarıdır ve 2030'a kadar yıllık %10,2 gibi bir büyüme oranı ile daha da artması öngörülmektedir. Sağlık sektöründeki gelişmeler, nüfusla birlikte artan gıda ihtiyacı, kişisel bakım endüstrisinin ön plana çıkması, koronavirüs salgını ve diğer salgın hastalıklara karşı bağışıklığın güçlendirilmesi gibi nedenler pazar hacminin büyümesine katkı sağlamaktadır [118].

Kolajen ekstraksiyonu için literatürde yer alan çalışmaların çoğunda geleneksel yöntemler kullanılmıştır ve bu yöntemlerden en sık kullanılanı asitle ekstraksiyondur (ASC). Geleneksel yöntemler; ekstraksiyon süresinin uzun olması, fazla miktarda çözücü kullanımı, verimin düşük olması gibi dezavantajlara sahiptir [7]. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak için son yıllarda kolajen ekstraksiyonunda kullanılabilecek modern, yenilikçi ve aynı zamanda çevreci bazı yöntemler geliştirilmiştir. Bu modern yöntemlerden biri de ultrases destekli ekstraksiyon yöntemidir. Bu yöntem; ürün verimini ve kalitesini artırmak, işlem süresini kısaltmak, daha az çözücü kullanmak gibi avantajlarından dolayı hızla gelişen yöntemlerden biri olarak görülmektedir. Karıştırma, homojenizasyon, kurutma ve ekstraksiyon işlemlerindeki kütle transferini hızlandırmak amacıyla ultrases tekniğinin kullanıldığı çalışmalar artış göstermiştir [8].

Bu çalışmada, elde edilmek istenen maddenin ısıya karşı duyarlılığı ve katma değer oranının yüksek olması göz önüne alındığında mümkün olan en iyi yöntem olan ultrasonik ekstraksiyon tercih edilmiştir. Ekstraksiyon sırasında denizanası numunesi için çalışma parametreleri (süre, genlik, sıcaklık, vuruş) değiştirilerek optimizasyonu sağlamak amaçlanmıştır.

Tez kapsamında balıkçılık faaliyetleri sırasında atık olarak görülen ve ekonomik değeri olmayan canlı türleri kullanılmıştır.

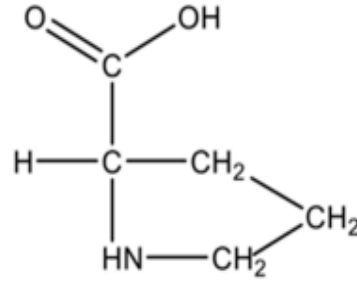
1.2. GENEL BİLGİLER

1.2.1. Kolajen Yapısı ve Özellikleri

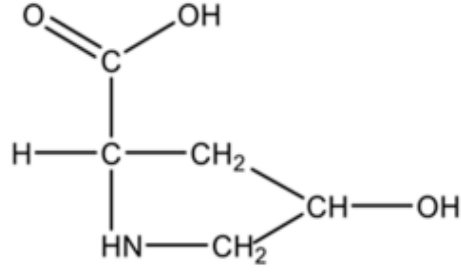
Kolajen hücre dışı matrisin (ESM) önemli bir kısmını oluşturan yapısal bir proteindir. Lifsi veya ağsı formda olabilmektedir. Daha çok tendon, deri, kemik, kıkırdak, eklem gibi bağ

dokularda bulunmakla birlikte kan damarları ve korneada da bulunmaktadır [5], [9], [10]. Omurgalı vücudundaki toplam proteinin yaklaşık üçte birini oluştururken doku ve organlara destek sağlama, dokuların kendini yenileme sürecini hızlandırma, yeni hücrelerin oluşumu veya oluşan hücrelerin hızlı şekilde gelişmesi, cildi çevresel zararlara (mikroorganizma, toksin, patojen) karşı koruma gibi temel görevleri bulunmaktadır [9].

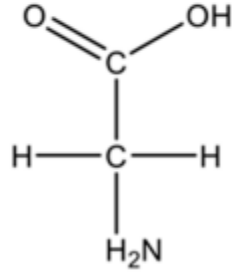
Kolajen yapısal olarak 3 polipeptit zincirden oluşmuş sarmal (üçlü heliks) bir formdadır. Üçlü sarmalı oluşturan zincirler α -zincirleridir. Bir zincir, kolajenin tipine bağlı olarak 1000 veya daha fazla aminoasitten oluşabilir. Kolajenin yapısındaki aminoasit dizisi tekrarlayan tripeptit birimleridir. Tekrarlayan birimler Gly-X-Y (Glisin-Prolin-Hidroksiprolin) şeklindedir [11], [12]. Kolajen proteininin özel aminoasit dizilimi ve içeriği onu diğer proteinlerden farklı kılar. İçeriğinde yaklaşık %20 glisin, %25 prolin ve hidroksiprolin, %11 glutamik asit, belirli miktarda da hidroksilizin ve alanin bulunmaktadır. Sadece kolajen proteininde yer alan hidroksilizin başka bir proteinde bulunmaz. Yapıdaki bu çeşitlilik ve karmaşıklık kolajenin çok fazla uygulama alanı bulmasına olanak sağlamaktadır [12]. Şekil 1.1’de kolajenin yapısında bulunan aminoasitlerden biri olan prolin molekül yapısı, Şekil 1.2’de diğer fazla bulunan aminoasitlerden biri olan hidroksiprolin molekül yapısı, Şekil 1.3’te prolinden sonra en fazla bulunan aminoasit olan glisin molekül yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1. 1: Prolin molekül yapısı

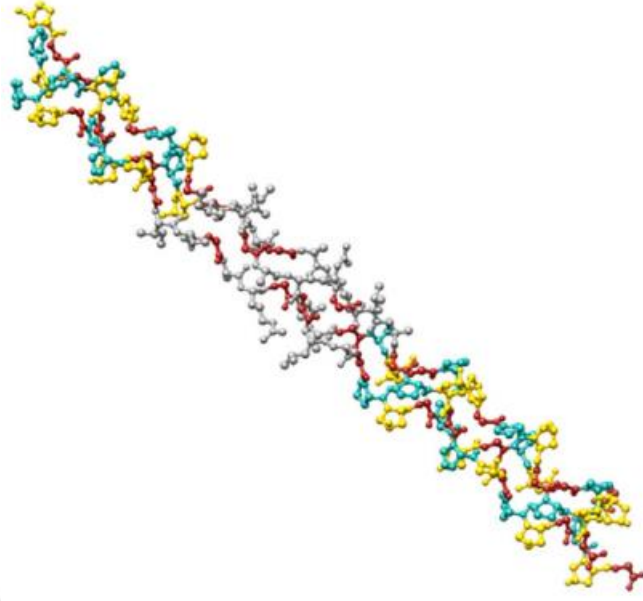


Şekil 1. 2: Hidroksiprolin molekül yapısı



Şekil 1. 3: Glisin molekül yapısı

Kolajeni oluşturan üçlü sarmal yapıların bir araya gelerek paketçik oluşturmaları ve içerdikleri hidrojen bağları yapının stabilitesini artırır [13]. 3 polipeptit zincirinin sarmal şekilde birbirine bağlanarak oluşturduğu temel birim tropokolajen olarak adlandırılır ve yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak 300 nm uzunluğunda ve 2 nm çapında olduğu belirlenmiştir [9], [14]. Şekil 1.4'te kolajenin üçlü sarmal yapısı görülmektedir.



Şekil 1. 4: Üçlü sarmal yapı [15]

1.2.2. Kolajen Tipleri

Şimdiye kadar bilinen 29 çeşit kolajen mevcuttur [15] [16], [17]. En yaygın kolajen tipleri ve bulunduğu dokular Tablo 1.1’de belirtildiği gibidir. Bunlardan ilk üçü (Tip-I, Tip-II, Tip-III) omurgalı vücudunda en fazla bulunan kolajen çeşitleridir. Bu üç kolajen vücuttaki toplam kolajen miktarının yaklaşık %80-85’ini oluşturur ve bu da vücut için ne kadar önemli olduklarını gösterir. Diğer tipler ise farklı doku ve organlara dağılmıştır [18].

Tablo 1. 1: Vücutta yaygın olarak bulunan kolajen çeşitleri ve bulunduğu noktalar [16]

Kolajen Çeşidi	Bulunduğu Doku
TİP-I	Kas ve kemik bağ, cilt, kornea
TİP-II	Omurlar arası disk, kıkırdak, göz
TİP-III	Akciğer, deri, bağırsak, dalak, karaciğer, damar çeperi
TİP-IV	Bazal membran

Literatürde farklı kolajen aileleri yer almaktadır. Bunların en basit ve yaygın olanı fibril oluşturan fibriler kolajen ailesidir. İnsan vücudunda bulunan kolajenin büyük bir kısmı fibril kolajen ailesindedir [19]. Fibril olmayan (non-fibriler) kolajen ailesi ise ağ oluşturu (network-forming), kesintili üçlü sarmallarla fibril ilişkili (FACIT), kesintili üçlü sarmallarla membran ilişkili (MACIT), kesintili çoklu üçlü sarmal alan (MULTIPLEXIN) olarak sınıflandırılır [20], [21]. Kolajen tiplerinin hangi doku veya organlarda bulunduğu Tablo 1.2’de belirtilmiştir.

Tablo 1. 2: Farklı kolajen tipleri ve buldukları dokular

Familiya	Tip	Bulunduğu Doku
Fibril	I	Tendon, bağ, cilt, kornea [15], [22]
	II	Camsı cisim, kıkırdak [16]
	III	Akciğer, deri, bağırsak, dalak, karaciğer, damar çeperi [16]
	V	Plasenta, hücre yüzeyi [23]
	XI	Göz sıvısı, kıkırdak [24]
Ağ oluşturu (Network-forming)	VIII	Endotel hücreleri [23]
	X	Hipertrofik kıkırdak [20]
FACIT	IX	Kornea, kıkırdak [23], [25]
	XII	Ligament, kıkırdak zarı [23], [24]
	XIV	Plasenta, akciğer, karaciğer [23], [24]
	XIX	Rabdomiyosarkom [24]
	XX	Kornea epiteli, embriyonik deri [24]
	XXI	Kan damarı duvarı [24]
MACIT	XIII	Epidermis, saç folikülü [24]
	XVII	Epidermis ve dermis bağı [24]
MULTIPLEXIN	XV	Pankreas, düz kas hücreleri, fibroblast [24]
	XVI	Fibroblast, keratinosit [24]
	XVIII	Akciğer, karaciğer [24]

1.2.3. Kolajen Uygulamaları

Kolajen; biyolojik olarak uyumluluğu, yeni hücre oluşumunu desteklemesi, herhangi bir yan etkisinin bulunmaması, nem tutma kapasitesinin yüksek olması, vücudun ihtiyacı olan aminoasitleri içermesi, kemik ve bağ dokuyu desteklemesi gibi daha birçok avantajından ötürü başta gıda, kozmetik ve sağlık olmak üzere çok çeşitli uygulama alanlarında tercih edilen bir biyopolimerdir [26].

Kolajenin uygulama alanlarından bazıları şöyledir:

- Gıda (Şekerleme, tatlı, besin takviyesi, yiyecek-içecek...)
- Tıp (Doku rejenerasyonu, kemik-eklem sıvı enjeksiyonu...)
- Doku Mühendisliği (Doku iskelesi, deri modellemesi...)
- Diş Hekimliği (İmplant, kemik rejenerasyonu için membran...)
- Eczacılık (İlaç, vitamin-mineral takviyeleri...)
- Kozmetik (Ten ürünleri, nutrikozmetik, saç-tırnak ürünleri...)

Nüfusun artması, diyet gıdaların daha fazla tercih edilmesi, ürün yelpazesinin genişlemesi gibi nedenlerden dolayı gıda sektörü kolajen uygulama alanlarının başında gelir. Ürünün stabilizasyonu, tadı ve kokusu, rengi gibi özelliklerine fayda sağlamak amacıyla tercih edilir. Meyve-sebze suları, enerji içecekleri, diyet içeceklerinde de kullanılır [118].

Kolajenin yapısında bulundurduğu hidrofobik ve hidrofilik kısımlar film oluşturma, köpürtme, emülsifiye etme gibi özellikler kazandırmakta ve bu sayede gıda endüstrisinde kullanımına olanak sağlamaktadır. Bunun yanında bazı çalışmalar, denizel kaynaklardan elde edilen kolajenin yiyecek ürünlerinde bulunan protein miktarını artırma, gıdaların bozulmasını önleme ve gıda ürünlerinde antioksidan olarak yer alma gibi özelliklerinin olduğunu göstermiştir [27].

Rejeneratif tıbbın en önemli parçasından biri doku mühendisliğidir. Kaza veya yaralanma sonucu yaşanan doku ve organ kayıplarının işlevselliğini yeniden kazandırmak, hücre onarımını sağlamak amacıyla çalışmalar yapılır. Bu çalışmalarda en önemlisi biyolojik olarak uyumlu,

yan etki yaratmayacak biyomalzemeler kullanmaktır. Kolajen de biyoyumluluğu, hücre dışı matristeki miktarı ve görevleri, yeni hücre oluşumunu desteklemesi vb. özelliklerinden dolayı bu alanda tercih edilen biyomalzemelerin başında gelmektedir [28].

Doku mühendisliğinde hücrelerin tutunması ve çoğalması için ortam sağlamak amacıyla yapı iskeleleri oluşturulur. Yapı iskelesinde kullanılacak materyaller hücre dışı boşluk ve hücre ile temas halinde olduğu için biyoyumlu, biyobozunur ve düşük alerjen özelliklere sahip olmalıdır. Burada görev alacak biyomateryal doğal (kolajen, jelatin) veya sentetik (PGA, PLA) polimer olabilir. Alternatif olarak polisakkaritler (kitosan, selüloz) de yapı iskelelerinde kullanılabilir [29].

Biyomedikal ve farmasötik alanda kullanımı kolajenin daha ziyade yüksek hücre bağlanma yeteneği, düşük antijenite ve biyolojik olarak bozunabilirlik avantajlarından ileri gelmektedir [22].

İnsanlar ilk çağlardan günümüze kadar hoş ve güzel görünmek için birçok yöntem ve malzeme kullanmıştır. Zaman ilerledikçe de bu güzellik algısı değişmeye başlamıştır. Son yıllarda sosyal medya kullanımının yaygınlaşması ve estetik teknolojilerinin gelişmesi insanlar üzerinde güzellik baskısını artırmaktadır. Bugün neredeyse her yaş grubundan insan kozmetik ürün satın almakta ve bu pazar giderek büyümektedir. Güzellik ve kişisel bakım sektöründeki payın 2023 yılında yaklaşık olarak 570 milyar ABD doları olması beklenmektedir [119].

Sıcak veya nemin düşük olduğu hava şartlarında ciltte su kaybı meydana gelir. Bu durum transepidermal su kaybı olarak isimlendirilir. Cilt yüzeyinde doğal olarak bulunan koruyucu tabaka sayesinde bu kaybın önüne geçilir. Bu tabakanın yapısında da büyük oranda kolajen mevcuttur. Kolajenin suyu emme ve tutma kapasitesi oldukça yüksektir. Bu özelliği sayesinde hem nemlendirici hem de cilt bariyerini onarıcı olarak birçok kozmetik üründe yer almaktadır. Yaş aldıkça cilt elastikiyetini kaybeder ve su tutma kapasitesi düşer. Sadece yaşlanma ile değil son yıllarda yaşanan hava kirliliği, iklim değişikliği, UV ışınlarına maruz kalma, stres ve hastalıklar da vücudun en dış katmanı olan cilt üzerinde lekelenme, cildin parlaklığının azalması, deri tabakasının incilmesi, cildin elastikiyetinde azalma, kırışıklık gibi olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bu durumda sadece içten değil dıştan da topikal destek ön plana çıkmaktadır. Kozmetik endüstrisi de her geçen gün artan talebe yönelik çözüm odaklı ürünler geliştirmektedir. Hücre yenileme, cilt elastikiyetini artırma, biyoyumluluk, toksik etki

oluşturmama gibi birçok özelliğinden dolayı geliştirilen ürünlerin büyük bir bölümünde kolajen başrolde [30].

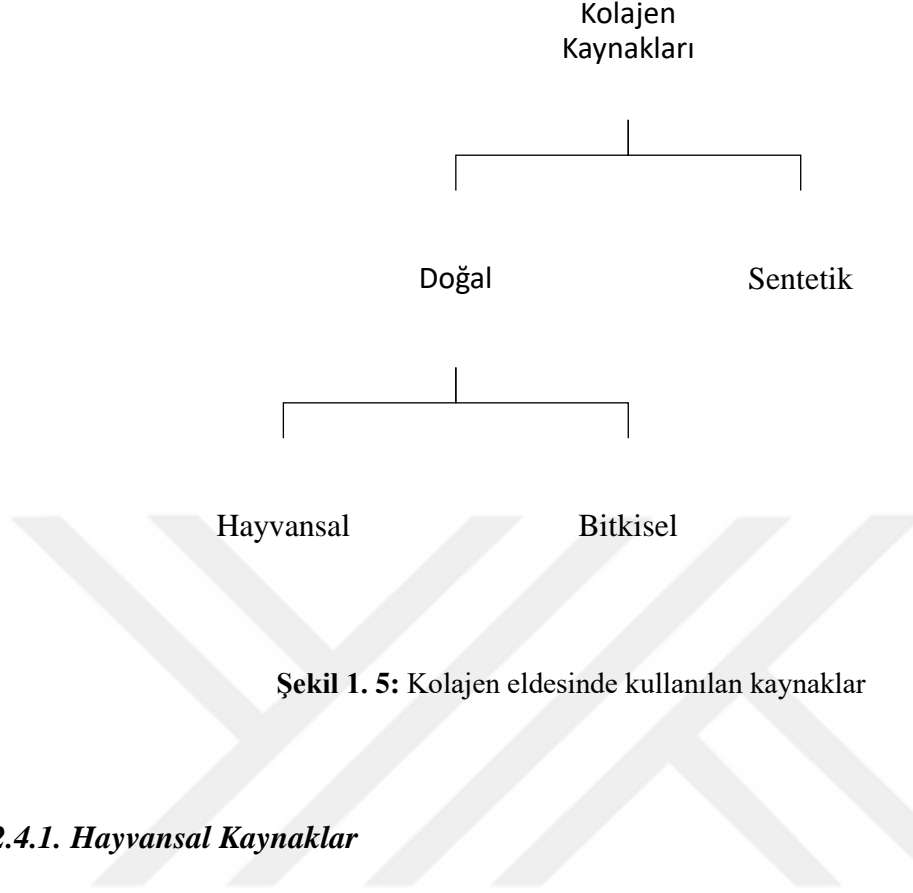
Kozmetikte genel olarak fibril oluşturma özelliğinden dolayı Tip-1 kolajen kullanılır. Tırnak ve saçların güçlendirilmesi, ince kırışıklıkların giderilmesi, cildin elastikiyetinin artırılması gibi faydaları bulunur [5]. Omurgalı vücudunda bulunan kolajenin çok büyük bir kısmı Tip-1'dir ve en fazla bulunduğu organ ise deridir. Bu durum cilt sağlığı için ne kadar önemli olduğunu kanıtlar niteliktedir [9].

Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'nin yapmış olduğu tanımlamaya göre kozmetik ürün; diş, saç, tırnak, deri gibi vücudun dış kısımlarının daha güzel görünmesini ve hijyenini sağlama, temizleme, hoş koku verme gibi amaçlarla kullanılan ürünlerdir [31].

Son yıllarda kolajenin en yaygın kullanıldığı alanlardan biri de kozmetik dermatolojidir. Daha güzel görünmek veya herhangi bir dermatolojik hastalığa bağlı kusurları gidermek amacıyla kolajen belirli dozlarda deri altına enjekte edilir. Yaşlanmayla birlikte vücuttaki kolajen üretimi azalır ve buna bağlı olarak ciltte sarkma, kırışıklık, selülit, nem kaybı, elastikiyetin azalması gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar, deri altı enjeksiyonunun yanı sıra oral yolla alınan kolajen takviyesinin de cilt problemlerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur. Biyolojik olarak parçalanabildiği için de toksik etki bırakmayan bu kolajen dolgularına ilgi her geçen gün artmaktadır [32].

1.2.4. Kolajen Kaynakları

Kolajen doğal ve sentetik kaynaklardan elde edilebilir. Doğal kaynaklar da kendi arasında hayvansal ve bitkisel olmak üzere ikiye ayrılır [24]. Kolajen eldesinde en yaygın tercih edilen hayvansal kaynakların başında sığır ve domuz gelmektedir [24], [33]. Şekil 1.5'te farklı kolajen kaynakları gösterilmiştir.



1.2.4.1. Hayvansal Kaynaklar

Endüstriyel olarak en fazla kullanılan hayvansal kolajen kaynağı sığır ve domuz olmakla birlikte tavuk, inek, koyun gibi karasal hayvanlar da kullanılmaktadır [34], [35]. Bu canlıların tendon, deri, kemik, kıkırdak gibi farklı dokularından kolajen ekstraksiyonu gerçekleştirilir [20] [27].

Sığır kolajeni, insan vücuduyla uyum sağlayabilen ve biyobozunur özellikleri sayesinde gıda, kozmetik, biyomedikal gibi birçok alanda kendine yer bulmuştur. Domuz kolajeni ise daha çok yumuşak dokularda greftleme gibi cerrahi işlemlerde tercih edilmektedir [24].

Karasal hayvanlardan elde edilen kolajen kullanımı yaygın olsa da bazı dezavantajlara sahiptir. Örneğin; sığırlarda görülen ve halk arasında deli dana olarak bilinen BSE, TSE, ayak-ağız hastalığı veya yaygın adıyla şap hastalığı olan FMD gibi zoonotik hastalıklar ilaç, gıda, mama, kozmetik ürünlerle insana bulaşabilmektedir [33], [36], [37]. Kümes hayvanlarında görülen kuş gribi de kolajen eldesini sınırlandırmaktadır [29]. Bunun dışında Hinduların inek türü ürünleri, Müslümanların ve Yahudilerin ise domuz türü ürünleri tüketmesi dini olarak yasaktır. Bu gibi inanca dayalı kısıtlamalar da kaynakların yetersiz ve sınırlı kalmasına neden

olmaktadır [38]–[40]. Bu dezavantajlar, araştırmacıları alternatif kolajen kaynakları bulmaya teşvik etmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, deniz ürünlerinin güvenli ve alternatif kolajen kaynağı olabileceğini göstermektedir [41].

Suda yaşayan canlılar, omurgalı ve omurgasız olarak sınıflandırıldığında çoğunluk omurgasız canlılardan oluşur. Bunlara denizanası, süngerler, denizyıldızı, deniz keşanesi, yumuşakçalar örnek verilebilir. Bu canlılardan kolajen ekstraksiyonu için birçok çalışma bulunmaktadır ve özellikle son yıllarda bu çalışmalar hız kazanmıştır. Sadece akademik çalışmalarda değil endüstriyel alanda da giderek genişleyen bir yer edinmektedir. Kolajen eldesi için omurgasız su canlılarından üzerinde en çok çalışma yapılan denizanası ve süngerler olarak görülmektedir. Omurgalı su canlıları da alternatif kolajen kaynağı olarak gösterilmektedir. Bu canlılara balıklar ve suda yaşayan memeliler örnek verilebilir. Omurgalı su canlılarından üzerinde en çok çalışma yapılan dünya genelinde işleme prosesi sonucunda ortaya çıkan fazla miktarda yan ürün, sayıca fazla olması ve ekonomik olarak da katma değerinin yüksek olması sebebiyle balıklardır [35], [42]. Tablo 1.3'te kolajen ekstraksiyonunda kullanılan kaynaklar belirtilmiştir.

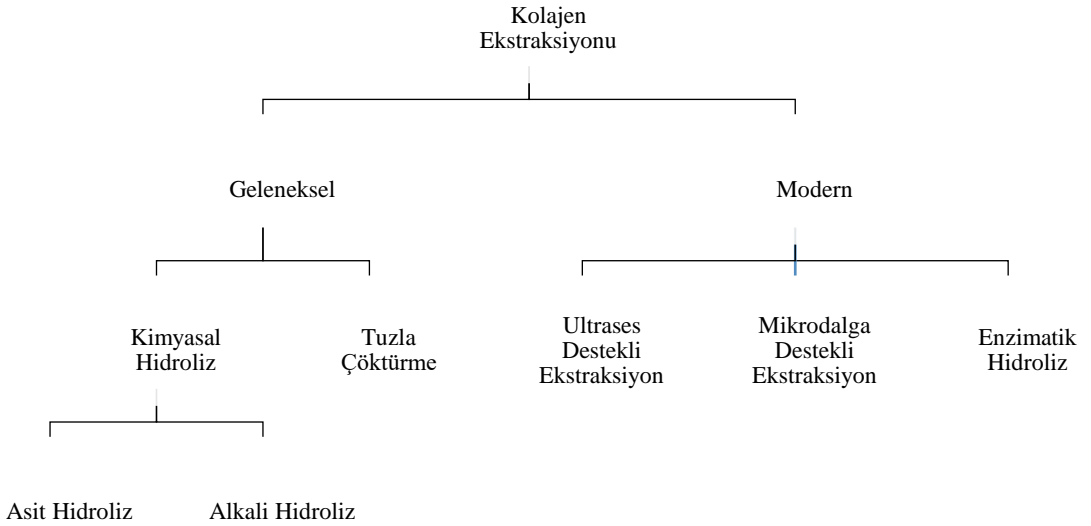
Tablo 1. 3: Kolajen ekstraksiyonunda kullanılan kaynaklar

Karasal Hayvanlar	Suda Yaşayan Omurgalılar	Suda Yaşayan Omurgasızlar
Sığır akciğeri [5]	Balık derisi [10], [24], [47]	Sünger [33], [41], [53]–[55]
Sığır derisi [37], [43], [44]	Balık yüzgeci [9], [22], [29]	Kalamar [49], [56]
Sığır tendonu [45]	Balık pulu [48]–[51]	Denizanası [21], [57]–[60]
Sığır kemiği [45]	Balık kılçığı [20], [27], [52]	Ahtapot [21], [25], [56]
Domuz derisi [16], [37], [43]	Balina derisi [28]	Deniz hıyarı [21], [25]
Domuz testisi [23]	Köpekbalığı derisi [14]	Mercan [49], [53], [54]
Tavuk kıkırdağı [46]	Yumuşak kabuklu kaplumbağa [38]	

1.2.5. Kolajen Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon, bir karışımdan istenilen bileşenin (organik/inorganik) uygun bir çözücü yardımıyla elde edilmesi amacıyla gerçekleştirilen en önemli temel işlemlerden biridir [61]. Kolajen, genel olarak ekstraksiyon yöntemiyle elde edilir. Tercih edilen ekstraksiyon yöntemi ve ham maddeye bağlı olarak kolajen özellikleri değişebilir. Ekstraksiyon parametreleri, ön işlemler, ham madde yapısı gibi özellikler de elde edilen kolajenin kalitesini etkilemektedir [25].

Kolajen ekstraksiyonunda geleneksel ve yeni olmak üzere iki yöntem bulunmaktadır. Geleneksel yöntemler, tuzla çöktürme ve kimyasal hidroliz olarak tanımlanabilir. Yeni yöntemler ise ultrases destekli ekstraksiyon (UAE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) ve enzimatik hidroliz olarak karşımıza çıkmaktadır [5], [39]. Genel olarak kolajen ekstraksiyon yöntemleri Şekil 1.6’da belirtilmiştir.



Şekil 1. 6: Kolajen ekstraksiyon yöntemleri [25]

Modern ekstraksiyon yöntemlerinin geleneksel yöntemlere göre avantajları şöyledir:

- Çok az çözücü sarfiyatı
- Kısa sürede ekstraksiyon
- Yüksek verim
- Enerji tasarrufu
- Yüksek saflık derecesi
- Çevreci (yeşil teknoloji)
- Yüksek ürün güvenliği
- Yüksek kalite
- Kolay tekrarlanabilirlik

1.2.5.1. Tuzla Çöktürme Yöntemi

Proteinler suda çok az çözünür. Bu yüzden çözeltiye belirli bir miktarda (düşük konsantrasyon) nötral tuz ilave edilir. Böylece protein moleküllerinin hidrofobik uçlarının su ile etkileşimi sonucu çözünürlüğü artar. Tuz konsantrasyonu artırıldığında ise hidrofobik uçlarda bulunan su molekülleri tuz iyonları tarafından uzaklaştırılır ve çözünürlük azalır. Proteinler de bu olay sonucu çöker [23], [62].

Bu ekstraksiyon yönteminde tuz konsantrasyonu kilit rol oynamaktadır. Ayrıca nötral tuz olarak genellikle fosfat, sitrat, sodyum klorür (NaCl), Tris-aminometan hidroklorür (Tris-HCl) kullanılmaktadır [25].

Kolajen ekstraksiyonu için sodyum klorür (NaCl) en çok tercih edilen nötral tuzdur. Bu yöntem sonucu elde edilen kolajen tuzda çözünür kolajen (SSC) olarak adlandırılır [5].

Tuzla çöktürme yönteminde amaç ilk olarak kolajeni dokulardan ekstrakte etmek daha sonra çözünürlüğü azaltarak kolajenin çökmesini sağlamaktır. Hayvansal kaynaklı kolajenin çözünürlüğü içerdiği çapraz bağlardan dolayı çok daha az olduğundan ekstraksiyon işlemi

düşük verimle neticelenmektedir. Bu durum tuzla çöktürme yönteminin sınırlı kalmasına ve pek tercih edilmemesine neden olmaktadır [12].

1.2.5.2. Asit Hidroliz Yöntemi

Kolajen lifleri sulu çözeltide asidik çözeltiliye kıyasla daha az çözünmektedir. Bu nedenle ekstraksiyon sırasında kolajen moleküllerinin daha iyi çözünmesini sağlamak amacıyla asidik çözeltiler kullanılır [5]. Sitrik asit, laktik asit, asetik asit gibi organik asitlerin haricinde hidroklorik asit gibi inorganik asitler de bu yöntemde kullanılmaktadır [26]. Fakat asetik asit (0,5 M) kolajen ekstraksiyonunda en fazla tercih edilen ve üzerinde en çok çalışma yapılan organik asittir. Ekstraksiyon sürecinde yalnız asit çözeltisi kullanıldığında elde edilen kolajen asit çözünür kolajen (ASC) olarak isimlendirilir [18].

Organik asitler, çapraz bağlı olmayan kolajen liflerinin neredeyse tamamını ve çapraz bağlı liflerin de bir kısmını parçalayarak kolajenin dokudan çok daha kolay ekstrakte edilmesini sağlar [23]. Asidik ortam, aynı zamanda kolajen liflerinin zayıflamasını ve gevşemesini sağlayarak Schiff ve iyonik bağların koparılmasına yardımcı olmaktadır [12], [63].

1.2.5.3. Alkali Hidroliz

Alkali hidroliz metodu daha çok çapraz bağ sayısının nispeten fazla olduğu kemik doku gibi kolajen kaynakları için kullanılmaktadır [63]. Aynı zamanda deri atıklarından kolajen ekstraksiyonu için de kullanılan bu yöntemde kireç, sodyum hidroksit, sodyum karbonat gibi alkali maddeler tercih edilmektedir. Ekstraksiyon sonrasında kül ve krom içeriğinin nispeten yüksek olması, molekül ağırlığının düşük çıkması, sülfidril ve hidroksil içeren aminoasitleri olumsuz etkilemesi gibi dezavantajlarından dolayı bu metotla elde edilen kolajenin medikal ve gıda alanlarında kullanılması uygun değildir [12].

1.2.5.4. Enzimatik Hidroliz

Enzimatik hidroliz, polimerlerin kendini oluşturan daha küçük birimlere ayrılması işleminde enzimlerin de rol alması ile gerçekleşen bir biyoprosesdir. Bu proses, protein gibi polimerlerin kimyasal, fiziksel ve fonksiyonel özelliklerini geliştirmek amacıyla gerçekleştirilir [23].

Genel olarak kolajen ekstraksiyonunda asidik çözeltiler kullanılmaktadır. Fakat yapılan bazı çalışmalarda deniz yan ürünlerinden kolajen eldesinde sadece asit hidrolizinin tüm kolajeni ekstrakte etmediği ve verimin düşük kaldığı görülmüştür. Bu nedenle kolajen verimini maksimize etmek için enzimatik ekstraksiyon geliştirilmiştir [45].

Enzimatik hidroliz metodunda hayvansal kaynaklı tripsin veya pepsin enzimleri kullanılabildiği gibi bitkisel kaynaklı bromelin, papain, ficin gibi enzimler de kullanılmaktadır [25]. Proteaz enzimleri çapraz bağlı kısımları ayırır ve telopeptitleri parçalayarak daha kolay ekstraksiyon sağlar. Aynı zamanda kolajenin üçlü sarmal yapısını koruyarak kolajen olmayan proteinleri de hidroliz eder. Böylece daha yüksek saflıkta kolajen ekstrakte edilmiş olur [18], [23].

Yapılan çalışmalarda deniz kaynaklı ürünlerden kolajen ekstraksiyonunda en sık kullanılan enzimlerden biri pepsin enzimidir. Pepsin kullanılarak ekstrakte edilen kolajene ise pepsin çözünür kolajen (PSC) denir [45].

Enzimatik hidroliz, yukarıda belirtilen geleneksel yöntemlere kıyasla daha kısa ekstraksiyon süresi ve daha yüksek saflıkta kolajen eldesi sağlamaktadır. Fakat kullanılan enzimler nispeten pahalıdır [26].

1.2.5.5. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE)

Mikrodalga ışınları, frekansı 300–300.000 MHz aralığında olan elektromanyetik dalgalara denir. Bu ışınlar, ekstraksiyon sırasında örneğin moleküler yapısını koruyarak ısınmasını sağlamaktadır [39]. Isıtmanın prensibi, iyonların iletimi ve dipol rotasyonu aracılığıyla maddenin molekülleri üzerine direkt olarak etki etmesine dayanmaktadır. Isınma moleküler düzeyde gerçekleşmektedir [64].

Mikrodalga destekli ekstraksiyon için 2 tür sistemden söz edilebilir. Açık kap (atmosfer sıcaklığı) ve kapalı kap (kontrollü sıcaklık ve basınç) olarak adlandırılan bu sistemlerden en çok tercih edilen kapalı sistem olmaktadır. Aralarında küçük bazı farklar vardır. Örneğin, kapalı kaptaki örnekler aynı anda ısınırken açık kaptaki örnekler sıralı olarak ısınmaktadır. Kapalı kaptaki sıcaklık basınçla yükseltilebilirken açık kaptaki sıcaklık çözücünün atmosfer basıncı altındaki kaynama noktasıyla sınırlı kalmaktadır [65].

Bu yöntemde çözücü seçimi önemlidir. Çözücünün matrisle etkileşimi, çözücünün dielektrik sabitinin yüksek olması, solventin mikrodalga enerjisini iyi absorplaması gibi dikkat edilmesi gereken noktalar bulunmaktadır [66].

Mikrodalga destekli ekstraksiyon metodunun en büyük yararı ekstraksiyon süresinin kısa olması ve çözücü miktarının nispeten az olmasıdır. Bunun yanı sıra bu yöntem polifenollerin eldesi gibi daha çok bitki ekstraksiyonunda kullanılmaktadır [67].

1.2.5.6. Ultrases Destekli Ekstraksiyon

Ultrases, 20 kHz'in üzerinde frekansa sahip ve insan kulağının işitemediği ses dalgalarını ifade etmektedir [68]. Ultrases dalgaları düşük frekanslı (yüksek şiddetli) ve yüksek frekanslı (düşük şiddetli) olarak ikiye ayrılmaktadır. Düşük frekanslı ultrason uygulaması daha çok gıda teknolojisinde kullanılmaktadır. Örneğin, patojenik bakterilerin inaktivasyonu, dondurma, kurutma ve emülsifikasyon gibi süreçlerde yararlanılmaktadır. Yüksek frekanslı ultrason ise genellikle maddenin fizikokimyasal veya biyokimyasal özelliklerinin farklılaştırılması için tercih edilmektedir [23], [64], [69].

Ultrases destekli ekstraksiyonda mekanizma, kavitasyon ve mekanik etki olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Kavitasyon, ultrases dalgalarının sıvı içinde oluşturduğu kabarcık anlamına gelir. Bu da hücre zarlarının geçirgenliğini artırır ve solventin matris içerisine etkili bir şekilde nüfuz etmesini sağlar. Mekanik etki ise solventle temas edecek yüzeyin alanını artırarak ekstrakte edilecek biyoaktif bileşiklerin serbest kalmasını kolaylaştırır [70].

Ultrases uygulamalarında moleküllerin titreşimiyle ısı enerjisi kısa sürede eşit şekilde matrise yayılır. Kütle transferi doğrudan ısı olarak değil mekanik destek ile gerçekleştiğinden ısıya karşı duyarlı bileşenlerin ekstraksiyonunda çok önemlidir. Uçucu yağların veya bileşenlerin ekstraksiyonu, antioksidan maddelerin ekstraksiyonu, ilaç endüstrisinde önemli yere sahip biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda genellikle tercih edilmektedir [71].

Ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi; daha az solvent kullanımı, enerji tasarrufu, daha yüksek verim, daha kısa sürede ekstraksiyon, daha yüksek ürün saflığı gibi avantajlarıyla geleneksel

yöntemlerden ayrılır [72]. Kompleks yapıda olmaması, düşük maliyetli olması, çok yönlü olması gibi özellikleriyle de diğer modern yöntemlerden sıyrılarak öne çıkmaktadır [61].

1.2.6. Deniz Ürünlerinin Kolajen Eldesindeki Potansiyeli

Dünyada su ürünleri ve balıkçılık faaliyetleri işleme sürecinde birçok yan ürün (kılçık, pul, iç organlar, deri vb.) oluşmaktadır. İşleme prosesinin farklı aşamalarında yaklaşık %50-80 katı ve sıvı atık meydana gelmektedir. Oluşan bu ürünler genelde deniz ve okyanuslara atık olarak bırakılır ve açığa çıkan nitrat ve fosfat bileşikleri sudaki çözünmüş oksijen seviyesini azaltarak sudaki yaşamı tehdit eder [47]. Karada ise yakılarak veya depolanarak bertaraf edilen bu atıklar hem çevre kirliliğine hem de önemli biyomoleküllerin kaybına neden olur [5].

Balık işleme tesislerinden elde edilen yan ürünlerin, yüksek kalitede protein (kolajen, jelatin) içerdiğine ait çalışmalar mevcuttur. Bunların dışında bazı vitamin (A, D, B) ve mineraller (Ca, P, Zn), omega-3 yağ asitleri, lipidler açısından da zengin olduğu bildirilmiştir [73], [74]. Yan ürünlerde bulunan protein miktarının ham maddeye bağlı olarak yaklaşık 20-80 g/100 g olduğu saptanmıştır [74].

Balık kolajeni, farmasötik (doku mühendisliği, ilaç, biyomateryal, dental uygulamalar) ve gıda (takviyeler, katkı maddeleri, yenilebilir film ve kaplamalar, içecekler) endüstrisinde kullanılmaktadır [29].

Deniz ürünlerinden ilk akla gelen balık olsa da birçok ülke besin değeri yüksek olan diğer su ürünlerinden de farklı alanlarda yararlanmayı tercih etmektedir. Balık dışında en bol bulunan ve farklı amaçlarla kullanılan diğer bir su ürünü de deniz anasıdır. Denizlerdeki aşırı avlanma, kirlilik, küresel ısınma gibi faktörler balık popülasyonunu ciddi anlamda tehdit etmektedir. Bu sebeple dev biyokütleler halinde yaşayan ve sayıları her geçen gün artan deniz anaları geleceğin gıda kaynağı olarak görülmektedir [75].

Denizanası, son yıllarda iklim değişikliği sonucu deniz ve okyanuslarda meydana gelen değişimlere bağlı olarak nüfus patlaması yaşamaktadır. Bu durum belli bir bölgeye ait sorun olmaktan çok küresel anlamda ekolojik kriz haline gelmiştir [76]. Dünya çapında artan

denizanası nüfusu beraberinde insan sağlığı, kıyı turizmi, kıyı endüstrisi, balıkçılık faaliyetleri gibi farklı alanları da olumsuz etkilemektedir [77], [78].

Bir denizanası türüne bağlı olarak ağırlıkça yaklaşık %95-99 su, %1-2 protein, %2-3 tuz içermektedir. İçerdiği proteinin büyük bir kısmı ise kolajenden oluşmaktadır [40]. Buna ek olarak iyot, fosfor, demir ve kalsiyum da içermektedir. Bu durum tıbbi ve besin kaynağı olarak araştırılmasını teşvik etmiştir [76]. Aynı zamanda bileşiminde bulunan kolajen miktarı ve yapısı, denizanasından elde edilen kolajenin memeli kolajenine alternatif olabileceğini göstermektedir [79]–[81].

Yapılan son araştırmalar, denizanası kolajeninin memeli kolajenlerinden Tip I, II ve V' e çok benzer olduğunu göstermiştir. Ayrıca; hücrelerin farklılaşmasını desteklediği ve hücre fenotipi koruduğu, kolajen üretiminden sorumlu osteoblast ve fibroblast hücrelerinin canlılığını sığır kolajenine kıyasla daha yüksek oranda koruduğu, uzun vadede antiinflamatuvar etki gösterdiği saptanmıştır. Bu özelliklerinden ötürü doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında denizanası kolajeninin çok büyük potansiyel kaynak olduğu bildirilmiştir [81]. Karasal ve denizel kaynaklı kolajen arasındaki farklar kısaca Tablo 1.4'te belirtilmiştir.

Tablo 1. 4: Karasal ve denizel kaynaklı kolajen arasındaki farklar [57]

Karasal (Memeli) Kaynaklı Kolajen	Denizel Kaynaklı Kolajen
Yüksek viskozite	Düşük viskozite
Pahalı	Ucuz
Yüksek erime noktası	Düşük erime noktası
Organik çözücüde çözünme	Suda çözünme
Bulaşıcı hastalık riski	Hastalık riski yok
Düşük glisin ve alanin içeriği	Yüksek glisin ve alanin içeriği
Yüksek prolin içeriği	Düşük prolin içeriği

Denizel kaynaklı elde edilen kolajenin biyoaktif özelliklerinden bazıları aşağıda belirtilmiştir [36]:

- Yara iyileştirici
- Antioksidan
- Anti-aging

- Nemlendirici
- Antimikrobiyal

Deniz ürünlerinden elde edilen kolajenin yukarıda da belirtildiği üzere birçok yönden karasal hayvanlardan elde edilen kolajene alternatif olabileceği yapılan araştırmalar sonucu ortaya konmuştur. Bu çalışmalarda alınan olumlu sonuçlar, bilim insanlarını bu alanda daha fazla araştırma yapmaya teşvik etmiştir.

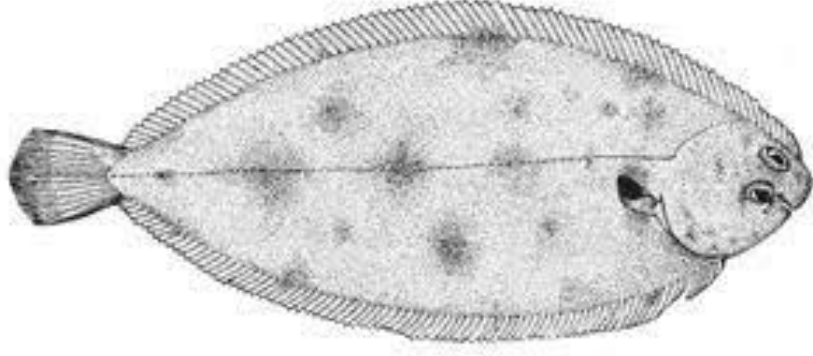
Bu tez kapsamında ülkemizde en fazla bulunan denizanası türlerinden biri olan ay denizanası (*Aurelia aurita*) ve sofralık olarak tüketilmeyen bazı balık türlerinden (*Gobius niger*, *Lagocephalus sceleratus*, *Uranoscopus scaber*, *Solea solea*, *Raja clavata*) kolajen ekstraksiyonu çalışması yapılmıştır.

1.2.7. Tez Kapsamında Kullanılan Denizel Kaynaklı Türler

S. Solea

Türkiye’de bulunan en yüksek ticari değere sahip yassı balık türlerinden biridir [82]. Kumlu ve çamurlu zeminlerde yaşar [83]. Aynı zamanda Marmara Denizi ve İstanbul Boğazı dahil güneye doğru geniş alanda yayılım gösteren bir dil balığı olan bu tür 8-24 °C arasında değişen sıcaklıklarda hayatta kalabilir [84].

Akdeniz bölgesinde ekonomik değeri yüksek ve avlanan yassı balıkların arasında *S. solea* 6.857 ton/yıl avlanma miktarı ile ilk sırada yer alır. Genellikle 0-150 m derinlikte yaşar, kış mevsiminde daha derinlere gömülürler ve boyları ortalama 30-35 cm civarındadır [85]. Şekil 1.7’de *S. solea* türüne ait genel bir görsel sunulmuştur.



Şekil 1. 7: *S. solea* genel görünüşü [120]

Taksonomi

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Sınıf: Teleostei

Takım: Pleuronectiformes

Familiya: Soleidae

Cins: Solea

Tür: *S. solea* [121]

L. Sceleratus

Hint-Pasifik okyanusunda yaygın olarak görülen bu tür, Süveyş Kanalı yoluyla Akdeniz, Ege ve Marmara Denizi'ne kadar gelmiştir [86]. Yaygın adı balon veya kirpi balığı olan *L. sceleratus*, Türkiye kıyılarında görülen istila gücü yüksek türlerdendir [87]. Bünyesinde bulunan tetrodotoksin (TTX) çok kuvvetli bir zehir olup tüketildiğinde insan sağlığını ciddi anlamda tehdit etmektedir [88]–[91].

İstila ve yayılma potansiyeli yüksek olan balon balıkları, son derece hızlı üreme ve büyüme yeteneğine sahiptir. Aynı zamanda buldukları ekosisteme kolay uyum sağlamaları ve zehirli olmaları nedeniyle avcı konumundadırlar. Böylece hem buldukları ekosisteme hem de

balıkçılık sektörüne büyük zarar veren bu türler dünya genelinde büyük sorun haline gelmiştir. [92].

En tehlikeli balon balığı türlerinden biri olan *L. sceleratus*, maksimum 110 cm boy ve 7 kg ağırlığa kadar ulaşabilmektedir. Yaklaşık 25-200 m arasında değişen derinlikte yaşamaktadırlar [87]. Boy ve kilo değerleri biyolojik ve çevresel koşullara, yaşa, cinsiyete göre değişebilmektedir [93]. İlkbahar ve yaz ayları üreme dönemleridir. Balon balıklarının beslendiği türler arasında karides, kalamar, yengeç ve balıklar bulunmaktadır [94]. *L. sceleratus* türüne ait genel görünüm Şekil 1.8’de sunulmuştur.



Şekil 1. 8: *L. sceleratus* genel görünüşü [122]

Taksonomi

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Sınıf: Actinopterygii

Takım: Tetraodontiformes

Familya: Tetraodontidae

Cins: Lagocephalus

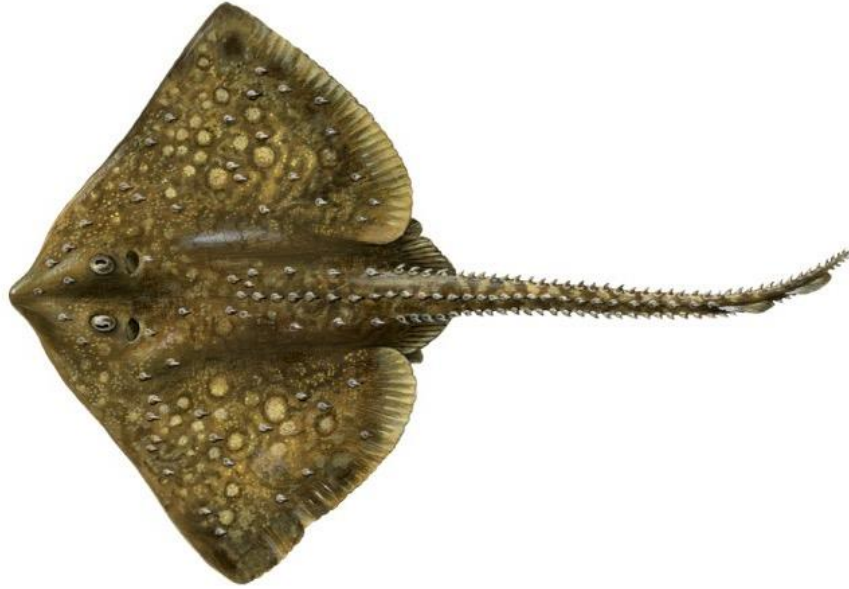
Tür: *L. sceleratus* [123]

R. Clavata

Dikenli vatoz veya deniz tilkisi olarak da bilinen *R. clavata*, Doğu Atlantik ve Güneybatı Hint Okyanusu civarında geniş yayılım göstermektedir [95]. Türkiye’de Akdeniz kıyıları ve Karadeniz’de görülen bu tür kumlu ve çamurlu zeminde yaşamaktadır [95], [96].

Yapılan çalışmalarda *R. clavata* türüne ait kas dokudan elde edilen hidrolizatların antioksidan, antihipertansif ve antitümör özelliklere sahip olduğu görülmüştür [97].

R. clavata, Manş Denizi ve Kuzey Deniz’de yaşayan ekonomik değeri yüksek balık türlerinden biri olarak gösterilir. Gündüz daha çok kuma gömülü halde ve hareketsiz olan bu türün gece olduğunda aktif şekilde hareket ettiği bilinmektedir. Çoğu zaman ortama göre renk değiştirmekle birlikte genelde kahverengi veya siyah olarak görülür [96]. Çevresel ve biyolojik faktörlere bağlı olarak 28-625 m arasında değişen derinlikte yaşayabilmektedir [98]. Genellikle kabuklular (yengeç, karides) ve bazı balık türleri (mezgıt, kayabalığı) ile beslenir [95]. *R.clavata*’ya ait genel görünüm Şekil 1.9’da yer almaktadır.



Şekil 1. 9: *R. clavata* genel görünüşü [124]

Taksonomi

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Sınıf: Chondrichthyes

Takım: Rajiformes

Familya: Rajidae

Cins: Raja

Tür: *R. clavata* [125]

U. Scaber

Doğu Atlantik'ten Karadeniz ve Akdeniz'e kadar uzanan bölgede yaygın olarak görülmektedir. Kurbağa balığı olarak da bilinen tür, kuma gömülü halde durarak başının üstündeki gözleriyle küçük balıkları avlar. Aynı zamanda akustik ve elektrik darbeler üretebilen özelliğe sahiptir [99].

Bentik bir tür olan *U. scaber*, ortalama 17-18 cm uzunluğundadır. Omuz dikenleri ağırlı sokmalara sebep olmaktadır [100]. 15-400 m derinlikte ve kumlu-çamurlu zeminde yaşar. Yumurtlama dönemi çevresel şartlara bağlı olarak Mart-Eylül aylarında gerçekleşir [101].

U. scaber her ne kadar ekonomik değeri yüksek olmayan bir tür olsa da özellikle Karadeniz ekosisteminde önemli rol oynamaktadır [100]. *U. scaber* türüne ait genel görünüm Şekil 1.10'da yer almaktadır.



Şekil 1. 10: *U. scaber* genel görünüşü [126]

Taksonomi

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Sınıf: Actinopterygii

Takım: Trachiniformes

Familya: Uranoscopidae

Cins: *Uranoscopus*

Tür: *U. scaber* [127]

G. Niger

Kömürcü kayabalığı olarak bilinen *G. niger*, daha çok ılıman denizlerde ve tatlı sularda yaşamaktadır [102]. Belli bir orana kadar acı sularda da yaşayabilen bu tür denizlerdeki en geniş balık ailesine mensuptur. Ailenin birçok türü akvaryum balığı olarak tanınır [103].

G. niger, kumlu dibe sahip hemen hemen tüm denizlerde yayılış göstermekte ve resif ya da deniz çayırına gizlenebilmektedir. Ortalama olarak beş yıl ömürleri vardır [104].

Bu tür, Türkiye’de tüm kıyılarda görülmesine rağmen hakkında fazla çalışma bulunmamaktadır ve ticari olarak değerlendirilememektedir. Kirliliğin izlenmesinde yararlanılabilecek indikatör türlerden biri olup besin zincirinde de önemli role sahiptir. Yaklaşık 2-70 m derinlikte yaşar [105].

Bu türün de içinde bulunduğu ailenin dünyada yaklaşık 2000 türü bulunmaktadır ve 29’u ülkemiz sularında yaşamaktadır. Boyları ortalama 10 cm olup ağırlıkları 13 g civarındadır [102]. *G. niger* türüne ait bir görsel Şekil 1.11’de yer almaktadır.



Şekil 1. 11: *G. niger* genel görünüşü [128]

Taksonomi

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Sınıf: Actinopterygii

Takım: Gobiiformes

Familya: Gobiidae

Cins: Gobius

Tür: *G.niger* [129]

A. Aurita

Kozmopolit bir tür olan *A. aurita* ya da bilinen adıyla ay denizanası, dünya genelinde geniş yayılım alanına sahip denizanası türlerindedir. Farklı çevresel koşullara adapte olabilen bu tür, tüm ılıman deniz kıyılarında görülmektedir [106].

Şemsiye biçiminde ve sapsız olan ay denizanalarının çapı 10 cm ile 3 m arasında olabilir. Vücutları yarı saydam bir görünüme sahip olup yaklaşık % 95 su, % 4 protein ve % 1 tuz içerir [107].

Yapılan çalışmalarda *A. aurita* türünün başta glisin, glutamik asit, triyonin, tirozin, serin ve lizin olmak üzere toplam 15 çeşit aminoasit içerdiği belirlenmiştir [108].

Ay denizanasından elde edilen kolajenin diğer türlerden ekstrakte edilen kolajene kıyasla suda çözünürlüğü çok daha yüksektir. Bu özelliği onu benzersiz kılar [109].

A. aurita, patolojik ve periodontal hastalıklar sebebiyle oluşabilen alveolar kemik defekti rahatsızlığına çözüm olabilecek potansiyel kolajen kaynağı olarak görülmektedir. Biyobozunur, biyoyumlu ve gözenekli yapısı ile alveolar kemiğin rejenerasyonunda tercih edilebilecek ideal seçimdir [108].

Mevsimlere bağlı olarak bu türün biyokütlesi değişmekle birlikte ilkbahar ve yaz aylarında maksimum seviyeye ulaşır [110].

Denizanası popülasyonundaki hızlı artış ciddi sosyo-ekonomik ve ekolojik sorunlara yol açmaktadır. Fakat dünya genelinde artan kaygılara rağmen bu olumsuzlukların önüne geçmek için henüz net bir adım atılamamaktadır [111].

Biyokütlenin büyüklüğü, yüksek rejeneratif ve üreme potansiyeli nedeniyle denizaneleri; nutrasötik, farmakolojik, doku mühendisliği ve gıda alanlarında tercih edilebilecek alternatif kaynak olarak görülmektedir [77]. *A. aurita* türü denizanasının bir görseli Şekil 1.12'de verilmiştir.



Şekil 1. 12: *A. aurita* genel görünüşü [130]

Taksonomi

Alem: Animalia

Şube: Cnidaria

Sınıf: Scyphozoa

Takım: Semaestomeae

Familya: Ulmaridae

Cins: Aurelia

Tür: *A. aurita* [131]

Literatürde balık kolajeni için en fazla kullanılan yöntemlerden biri asitle hidroliz yöntemidir. Fakat bu yöntem fazla çözücü sarfiyatına neden olması, uzun zaman alması, verimin ve ürün güvenliğinin düşük olması gibi dezavantajlara sahiptir [25]. Bu dezavantajları minimum seviyeye indirmek için son yıllarda alternatif ve çevreci metotlar geliştirilmiş olup ultrasonik ekstraksiyon bunlardan biridir. Bu yöntem doğrudan ısı sağlamayıp hücre zarlarını mekanik olarak ses dalgalarının oluşturduğu kavitasyon etkisiyle parçalamakta ve materyal aktarımı gerçekleşmektedir. Özellikle protein gibi ısıya karşı duyarlılığı olan maddelerin ekstraksiyonunda tercih edilmektedir [62], [72].

İşleme aşamasında bir balığın türüne ve uygulanan işleme göre yaklaşık %20-80' i atık olabilmektedir [5]. İşleme sırasında açığa çıkan yan ürünlerin yüksek kalitede kolajen ve jelatin içerdiği aynı zamanda vitamin, mineral ve yağ asitleri açısından da zengin olduğu yapılan araştırmalar sonucunda tespit edilmiştir [74], [75].

Bir denizanası vücudunda bulunan proteinin tamamına yakınının kolajen olduğu tespit edilmiştir [40]. Bunun haricinde insan vücudu için önemli olan bazı mineralleri de bulundurmaktadır [77].

Bu çalışma kapsamında amaç, ekonomik değeri olmayan bazı balık türlerinin derilerinden ve *A. aurita* türü denizanasından memeli kolajenine alternatif olabilecek, çevreci aynı zamanda katma değeri yüksek kolajen eldesi sağlamaktır. Ekstraksiyon metodu, ekstrakte edilecek maddenin ısıya karşı duyarlılığı ve birçok avantajından ötürü ultrases destekli ekstraksiyon olarak belirlenmiştir.

2. MATERİYAL VE METOT

2.1. MATERİYAL

Çalışmada kullanılan denizanası türü (*A. aurita*) ve balık derisi numuneleri dondurulmuş şekilde İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji A.B.D tarafından sağlanmıştır.

2.1.1. Ön Hazırlık ve Ekstraksiyon Aşamasında Kullanılan Kimyasallar

Ön hazırlık aşamasında NaOH çözeltisi (Merck KGaA, Almanya), saf su ve etanol (Merck KGaA, Almanya) kullanılmıştır.

Ekstraksiyon işlemi sırasında çözücü olarak 0.5 M asetik asit (Merck KGaA, Almanya) çözeltisi kullanılmıştır.

2.2. METOT

2.2.1. Örneklerin Temizlenmesi

Çalışmada kullanılan balık derisi ve denizanası numuneleri İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji A.B.D tarafından dondurulmuş olarak temin edilmiştir.

Çalışılan maddenin protein yapıda olması nedeniyle sıcaklık denemeler yapıncaya kadar sabit (-4°C) tutulmuştur.

İlk olarak deri parçaları soğuk su altında gözle görülür yabancı maddelerden arındırılması amacıyla iki kez yıkanmıştır. Sonrasında çok küçük parçalara ayrılarak bir sonraki işleme hazır hale getirilmiştir.

2.2.2. Kolajen Olmayan Proteinlerin Uzaklaştırılması

Çalışmada kullanılan örneklerin yapısında bulunan ve kolajen olmayan proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla 0,1 M NaOH çözeltisi kullanılmıştır.

Bir önceki aşamada küçük parçalara ayrılan örnek üzerine 1:10 (w:v) oranında 0,1 M NaOH çözeltisi eklenmiştir. Bu karışım 4°C'de 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda karışıma 1:5 (w:v) oranında saf su ilavesi yapıp pH nötrlenmiştir. Daha sonra karışım 4500 rpm hızda 20

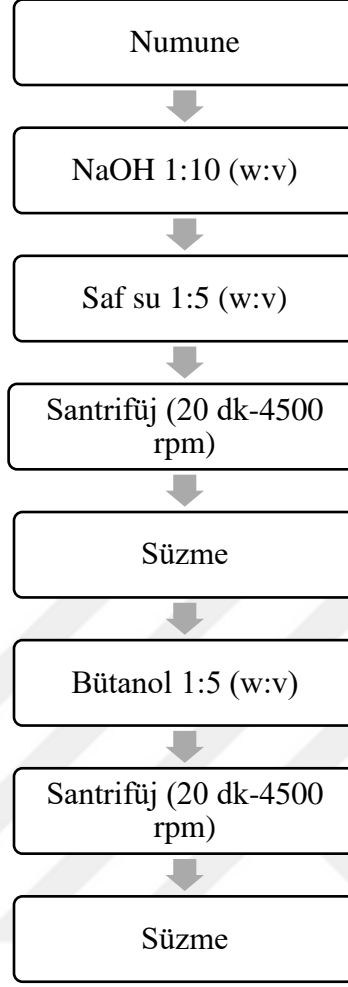
dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden alınan çözelti süzülerek bir sonraki aşamaya hazır hale getirilmiştir.

2.2.3. Yağların Uzaklaştırılması

Kolajen olmayan proteinlerin uzaklaştırılması aşamasından sonra örneklerin yüzeylerinde bulunan yağların uzaklaştırılması gereklidir. Bunun için %10 bütanol çözeltisi kullanılmıştır.

Ekstraksiyona hazırlanan örnek üzerine 1:5 (w:v) oranında %10 bütanol eklenmiştir. Çözelti 4°C'de 24 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda çözelti 4500 rpm hızda 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden alınan çözelti süzülerek bütanolden arındırılmış ve ekstraksiyon aşamasına hazır hale getirilmiştir.

Ön işlemler burada tamamlanmış olup ekstraksiyon aşamasına geçilmiştir. Şekil 2.1'de ön hazırlık aşamasının şematik olarak gösterimi yer almaktadır.



Şekil 2. 1: Ön hazırlık süreci şematik gösterimi

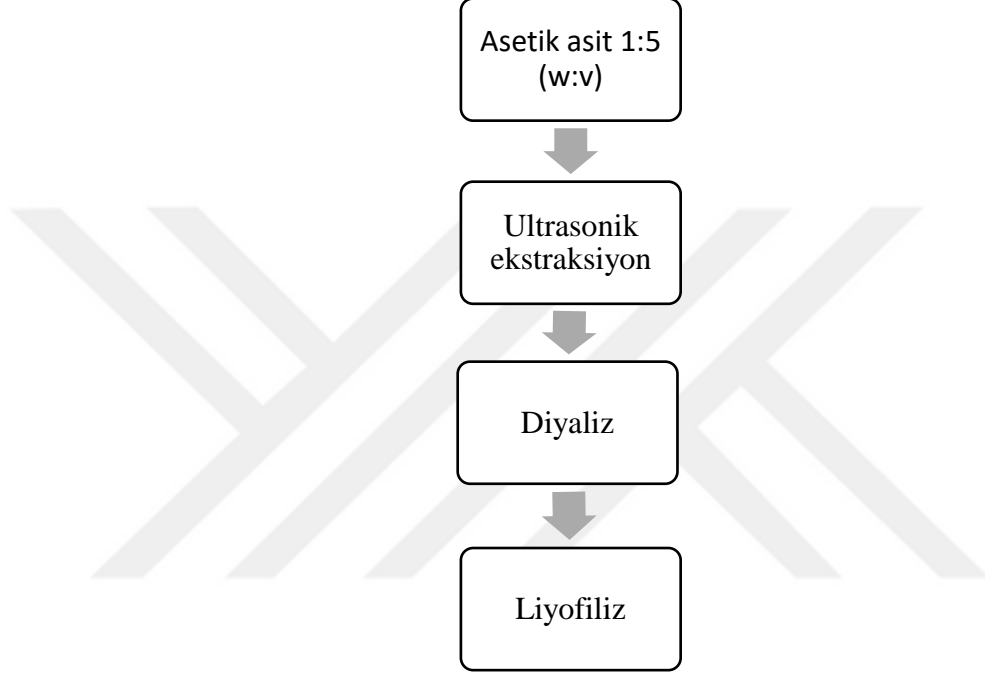
2.2.4. Ultrases Destekli Ekstraksiyon

Ön hazırlık süreci tamamlanan numune 1:5 (w:v) 0,5 M asetik asit çözeltisinde ultrases desteği ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığı, ultrases cihazına bağlı su banyosu termostatından ayarlanmıştır ve ekstraktör probundan kontrol edilmiştir.

Balık türleri için ekstraksiyon işlemi 4 °C, %30 genlik, 01:01 atış ve 30 dk. olarak gerçekleştirilmiştir.

Denizanası numunesi için RSM kullanılarak optimizasyon koşulları belirlenmiştir. Ekstraksiyon parametreleri (sıcaklık, atış, genlik, süre) yukarıda bahsedilen değerlerden farklı olup ayrıca belirtilmiştir.

Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra ekstraktörden alınan çözelti, membrana alınır. 72 saat 0,05 M asetik asit çözeltisinde diyaliz için bekletilir. 72 saat sonunda membran açılır ve numune temiz bir behere alınır, dondurularak kurutma işlemi için liyofilizatöre konulur. Liyofilizatörden çıkarılan numune verim ve diğer analizler için kullanılabilir. Ekstraksiyon aşaması genel olarak Şekil 2.2’de şematik olarak verilmiştir. Şekil 2.3’ten 2.7’ye kadar denemede kullanılan türlere ait liyofilizasyon sonrası görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 2. 2: Kolajen ekstraksiyonu akış şeması



Şekil 2. 3: Liofilize edilmiş *L. sceleratus* görünümü



Şekil 2. 4: Liofilize edilmiş *R. clavata* görünümü



Şekil 2. 5: Liofilize edilmiş *S. solea* görünümü



Şekil 2. 6: Liofilize edilmiş *U. scaber* görünümü



Şekil 2. 7: Liyofilize edilmiş *G. niger* görünümü

2.2.5. Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) ile Optimizasyon Çalışması

Literatürdeki çalışmaların bazılarında denizel kaynaklı kolajen ekstraksiyonunda ekstraksiyon sıcaklığı 4 °C [59], [113] olarak belirlenirken bazı çalışmalarda 25 °C'ye kadar çıkmıştır [64], [114]. Ekstraksiyon süresinin 10-30 dk, genliğin %20-80 [72], [113] ve atış (vuruş) süresinin 2-5 s [38], [72] olarak değişebildiği görülmüştür.

Denizanasından ultrason destekli kolajen ekstraksiyonunun optimizasyonunda laboratuvar imkanları ve yukarıda bahsedilen literatür çalışmaları dikkate alınarak bağımsız değişkenler aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında kullanılan denizanasından (*A. aurita*) ultrason destekli ekstraksiyon çalışma şartlarının optimizasyonu için 4 farklı bağımsız değişken belirlenmiş olup ekstraksiyon sıcaklığı (X1) (4,14,24 °C), ekstraksiyon süresi (X2) (10,15,20 dk), genlik (X3) (%20,30,40) ve atış (X4) (1,2,3 s) şeklindedir.

Tez kapsamında balık türlerinden farklı olarak denizanası (*A. aurita*) örneği için ekstraksiyon şartlarının optimizasyon çalışması yapılmıştır. Genel olarak ön hazırlık ve ekstraksiyon basamakları aynı olup sadece ekstraksiyon sırasındaki parametreler (sıcaklık, süre, genlik, atış) farklıdır.

Denizanasından kolajen ekstraksiyonunun optimizasyonu Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) Merkezi Kompozit Tasarım (CCD) modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Merkezi Kompozit Tasarım modeline göre hazırlanan deney planı ile elde edilen kolajen örneklerinde ekstraksiyon verim değerleri belirlenip veriler tasarım modelinde yerine yazılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel analizinden faydalanarak bağımsız değişkenler (sıcaklık, süre, genlik, atış) optimize edilmiştir. Aşağıda Tablo 2.1’de Merkezi Kompozit Tasarım modeline göre oluşturulan çizelge yer almaktadır. Şekil 2.8’den 2.11’e kadar denizanasına ait ekstraksiyon aşamalarındaki görseller yer almaktadır.

Tablo 2. 1: Merkezi Kompozit Tasarım modeline göre oluşturulan deneme çizelgesi

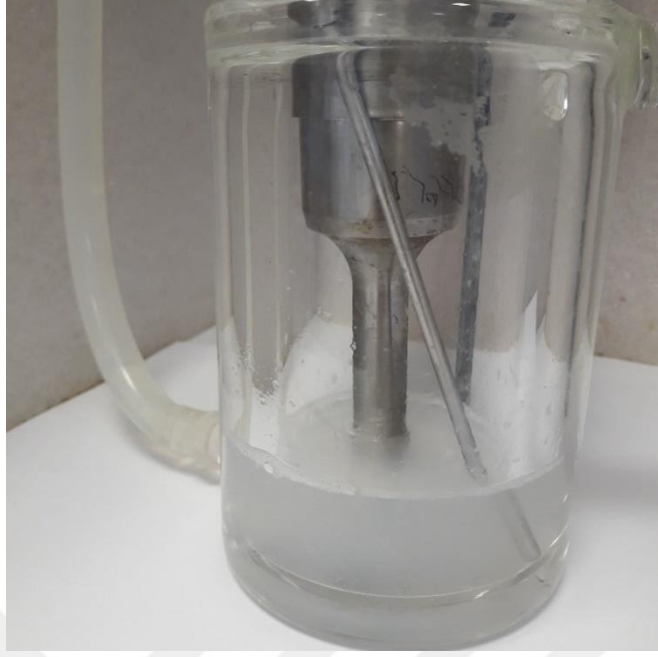
Deney No	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Vuruş (s)	Genlik (%)
1	14	15	2	30
2	4	20	3	20
3	24	10	1	40
4	4	20	1	20
5	4	10	3	20
6	24	10	1	20
7	24	10	3	20
8	4	15	2	30
9	24	15	2	30
10	4	10	1	20
11	24	10	3	40
12	4	10	3	40
13	24	20	1	20
14	24	20	3	40
15	14	20	2	30
16	4	20	3	40
17	24	20	1	40
18	14	15	2	20
19	24	20	3	20
20	14	10	2	30
21	4	10	1	40
22	4	20	1	40
23	14	15	3	30
24	14	15	2	40
25	14	15	1	30



Şekil 2. 8: Denizanasının diyaliz aşamasındaki görünümü



Şekil 2. 9: Ultrasonik ekstraksiyon aşaması



Şekil 2. 10: Denizanasının ultrasonik ekstraksiyon sırasında görünümü



Şekil 2. 11: Liyofilize edilmiş denizanası numunesinin görünümü

2.2.6. SDS-PAGE Analizi

Bu çalışmada Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) (Laemmli,1970) tarafından önerilen protokol modifiye edilerek uygulanmıştır. Tris/HCl

tampon sistemi, %7,5 ayırma jeli ve %3 toplayıcı jel kullanılmıştır. Kolajen çözeltisi 5mg/ml β -merkaptotanol içeren numune tamponunda 70°C sıcaklıkta 10 dk denatüre edilmiştir. 10 μ l kolajen örneği moleküler işaretleyici ile birlikte yüklenmiştir. Elektroforez Mini-PROTEAN Tetra Cell sistemi (Bio Rad Laboratories, Inc) kullanılarak yapılmıştır. Jeller %40 (v:v) su, %50 (v:v) metanol, %10 asetik asit çözeltisi içinde hazırlanan %0,1 (w:v) Coomassie Brilliant Blue R250 ile boyanmış ve sabitlenmiştir. Bantlar belirginleşinceye kadar %5 metanol (v:v) ve %7 (v:v) asetik asit içeren çözelti ile muamele edilmiştir [112].

2.2.7. FTIR Analizi

FTIR, maddeleri karakterize etmek için ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen analiz yöntemidir. IR spektrumu, moleküller arasındaki bağların titreşimi sonucu oluşan frekanslara karşılık gelen absorpsiyon pikleri ile maddeyi karakterize etmektedir. Spektrum aralığı geniş olduğu için birçok alanda (kimya, tıp, gıda vb.) uygulanmaktadır. Ayrıca hızlı sonuç alınması, az miktarda örnek ile detaylı sonuç vermesi, malzeme maliyeti olmaması gibi avantajları sayesinde maddelerin karakterizasyonunda sıklıkla tercih edilmektedir. Katı, sıvı, gaz fazındaki maddelerin yapısında bulunan bağlar, fonksiyonel gruplar, alifatik veya aromatik yapılar hakkında bilgi edinilebilir. Katı numuneler KBr ile pellet haline getirilip analiz edilmektedir [113].

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. EKSTRAKSİYON VERİMİ

Kolajen ekstraksiyonu sonucunda elde edilen verim eşitlik 2.1 kullanılarak hesaplanmıştır [58].

$$\text{Verim (\%)} = \text{dondurulmuş madde (g)} / \text{Başlangıçtaki madde (g)} \times 100 \quad (2.1)$$

Eşitlik 2.1’de belirtilen verim yaş ağırlık bazındadır.

Denemede kullanılan türlere ait verim değerleri Tablo 3.1’de görülmektedir.

Tablo 3. 1: Çalışmada kullanılan balık türleri için ekstraksiyon verim değerleri

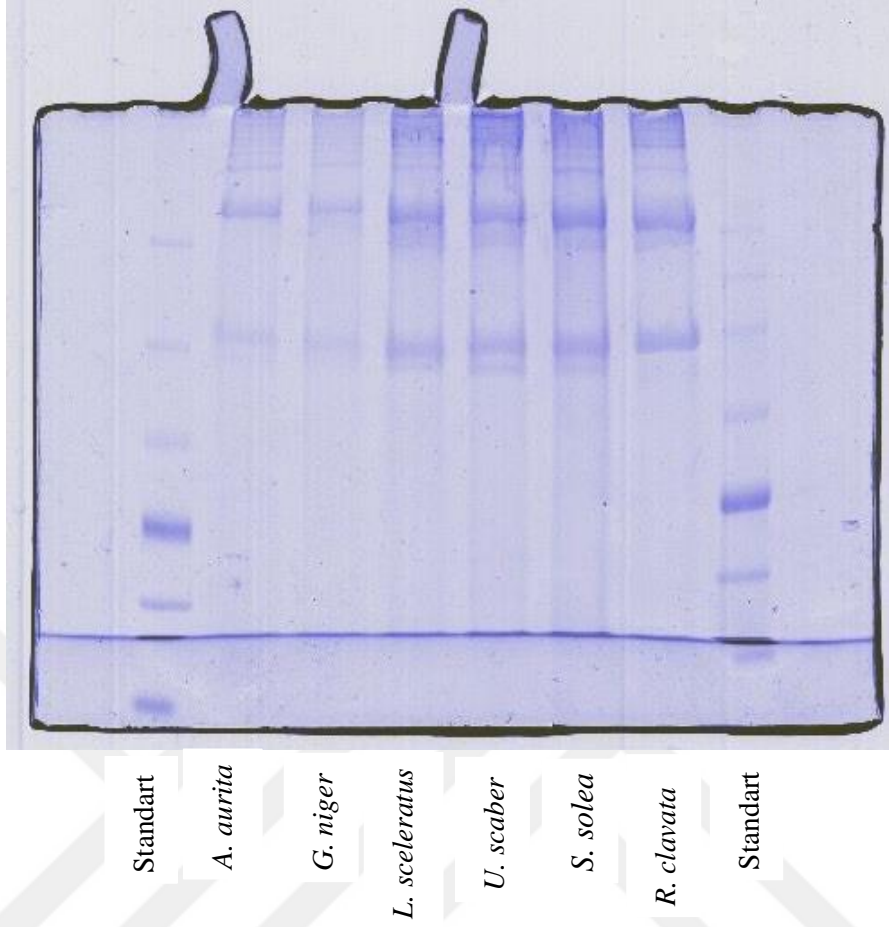
Tür	Verim (%)
<i>S. solea</i>	6.32
<i>L. sceleratus</i>	25.92
<i>U. scaber</i>	3.09
<i>G. niger</i>	5.80
<i>R. clavata</i>	3.04
<i>A. aurita</i>	6.25

Tablo 3.1’de belirtilen sonuçlar çalışmada kullanılan balık türlerinin derilerinden (4 °C, %30 genlik, 01:01 atış ve 30 dk) elde edilen ultrases destekli kolajen ekstraksiyon verim değerleridir.

Denizanası (*A. aurita*) için elde edilen en yüksek verim 4 °C, %30 genlik, 02:02 atış ve 15 dk koşullarında elde edilmiştir.

3.2. SDS-PAGE SONUÇLARI

Şekil 3.1 SDS-PAGE analizi sonrası kolajen örneklerinde oluşan molekül ağırlıklarına göre protein dağılımlarını göstermektedir.



Şekil 3. 1: Balık derisi kolajeni SDS- PAGE bant görünümü

Ultrason destekli ekstraksiyon sonucu balık türlerinden ve denizanasından elde edilen kolajenin karakteristik protein bantlarını içerdiği Şekil 3.1’de görülmektedir. SDS-PAGE analizi sonucu oluşan bant görüntülerinde numunelerin tamamında Tip 1 (100-190 kDa) kolajenini oluşturan α -1, α -2 ve β zincirlerinin belirgin olduğu görülmektedir. *L. scleratus*, *U. scaber* ve *S. solea* türlerinden elde edilen bant görünümünün en üstünde yer alan ve yüksek molekül ağırlığına sahip β (α zincirlerinin dimerleri) zincirlerinin varlığı diğerlerine göre daha belirgindir.

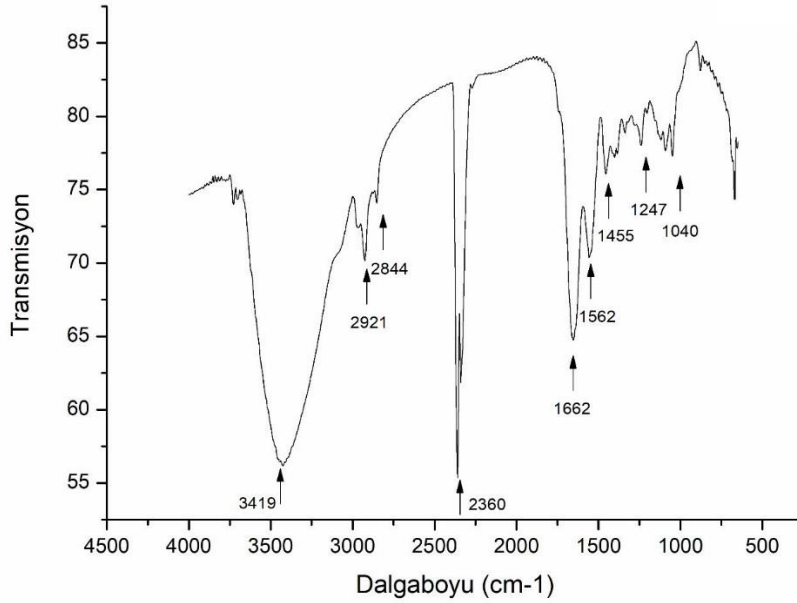
Balık derisi kolajeni için elde edilen sonuçların literatürde bildirilen *Catla catla* (112-220 kDa) ve *Cirrhinus mrigala* (114-210 kDa) [10] , *golden carp* (~ 108 kDa) [71] türlerinden ekstrakte edilen balık derisi kolajeni ile yakın molekül ağırlıklarına sahip olduğu görülmüştür. Bant görünümünde çok düşük molekül ağırlığına sahip proteinlerin varlığı da saptanmış olup bunun sebebi olarak ultrases desteğiyle birlikte kolajen olmayan az miktarda proteinin de açığa çıkmış olabileceği tahmin edilmektedir.

Denizanasından elde edilen kolajenin moleküler ağırlığının balık derisinden elde edilen kolajene çok yakın olduğu görülmektedir.

Tez kapsamında kullanılan deniz canlılarından elde edilen kolajene ait SDS-PAGE sonuçlarının literatürde belirtilen sığır tendonu kolajeniyle [114]benzer şekilde Tip 1 kolajeni fibrilleri bulundurduğu saptanmıştır.

3.3. KOLAJEN FTIR SPEKTROSKOPİSİ SONUÇLARI

Kolajen FT-IR analizinde genellikle görülebilecek olan bantlar amit I bandı olup yaklaşık 1650 cm^{-1} görülür. Bu bağ peptit bağlarının çevresinden ve proteinin ikinci amininden etkilenebilir. Amit II bandı 1530 cm^{-1} civarında gözlenebilirken amit III bandı 1245 cm^{-1} civarında gözlenir. Görülebilecek diğer bantlardan bazıları şunlardır. 1450 cm^{-1} , 1390 cm^{-1} , 1310 cm^{-1} . Bu bilgiler ışığında türlere göre yapılan FTIR analiz sonuçları aşağıdaki gibidir [115]. Şekil 3.2’de *S. solea* türüne ait deri kolajeni için FTIR sonucu grafikte gösterilmiştir.

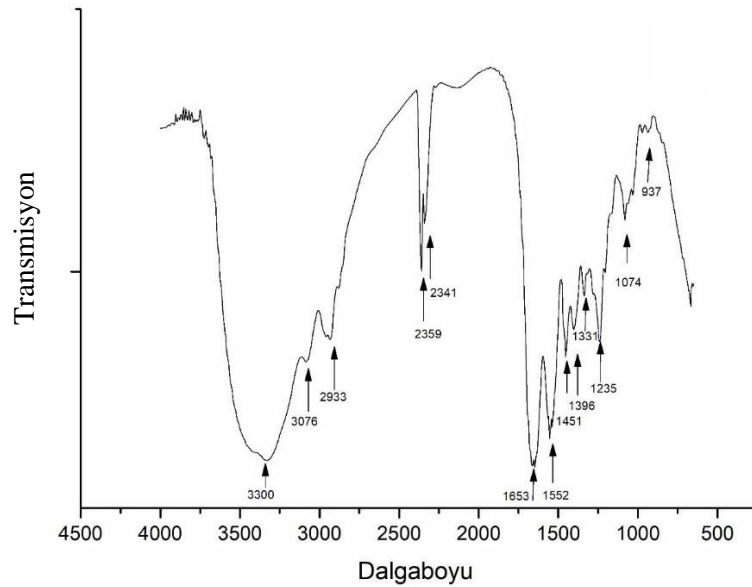


Şekil 3. 2: *S. solea* deri kolajeni FTIR analiz grafiği

3419’da C=N-H grubundaki N-H gerilme titreşimi görülmektedir. 2921’de $-\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ fonksiyonel grubu asimetrik NH_3 gerinimi görülmektedir. 2844’te Alifatik C-H gerinimleri

görülmektedir. 2360'ta $>C=NH^+$ fonksiyonel grubuna ait titreşim görülmektedir. 1662 karakteristik amit I bandı görülmektedir. 1562'de amit II bandı görülmektedir. 1455'te halkalı yapılara ait olan $-C=C-$ bağları görülmektedir. 1247'de amit III β heliks yapısı titreşimi gözlemlenmektedir. 1040'ta fosfat grubuna ait asimetrik gerinim titreşimleri görülmektedir. 670'te amit V bandı görülmektedir.

Şekil 3.3'te *L. sceleratus* türüne ait deri kolajeni için FTIR sonucu grafikte gösterilmiştir.

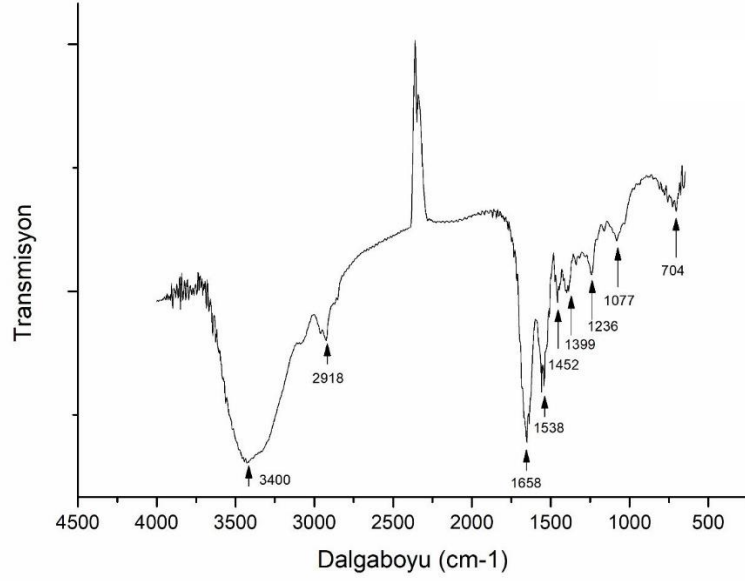


Şekil 3. 3: *L. sceleratus* deri kolajeni FTIR analiz grafiği

3300'de $C=N-H$ grubundaki $N-H$ gerilme titreşimi gözlemlenmiştir. 2933'te $-CH_2NH_3^+$ fonksiyonel grubu asimetrik NH_3 gerinimi görülmektedir. 2359 ve 2341'de $>C=NH^+$ fonksiyonel grubuna ait titreşim görülmektedir. 1653' de amit I bandı görülmektedir. 1552' de amit II bandı görülmektedir. 1451'de halkalı yapılara ait olan $-C=C-$ bağları görülmektedir. 1396'da amit II bandının düşük yoğunluklu hali gözlenmektedir. 1331'de sekonder aminlere ait (cis formu) $-C-N$ gerilmesi görülebilir. 1235'te amit III β heliks yapısı titreşimi gözlenmektedir. 1074'te serbest amino asitlere ait olan $NH_3^+ / -C-N$ gerinim titreşimi

görülmektedir. 937'de $-C-C-$ gerilme titreşimi görülmektedir. 670'te amit V bandı görülmektedir.

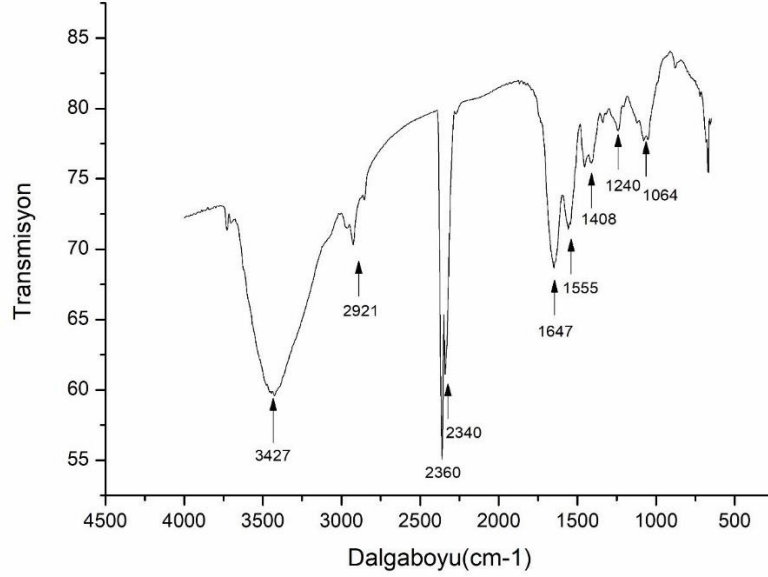
Şekil 3.4'te *R. clavata* türüne ait deri kolajeni için FTIR sonucu grafikte gösterilmiştir.



Şekil 3. 4: *R. clavata* deri kolajeni FTIR analiz grafiği

3400-3300 arasında olması gereken $C=N-H$ grubundaki $N-H$ Gerilme titreşimi 3400'de gözlemlenmiştir. 2918'de $-CH_2NH_3^+$ fonksiyonel grubu asimetrik NH_3 gerinimi görülmektedir. 1658'de amit I bandı görülmektedir. 1538'de amit II bandı görülmektedir. 1450'de halkalı yapılara ait olan $-C=C-$ bağları görülmektedir. 1399'da $N(CH_3)$ fonksiyonel grubuna ait simetrik deformasyon titreşimleri görülmektedir. 1236'da amit III β heliks yapısı 1077'de serbest amino asitlere ait olan $NH_3^+ / -C-N$ gerinim titreşimi görülmektedir. 704'te amit V bandı görülmektedir.

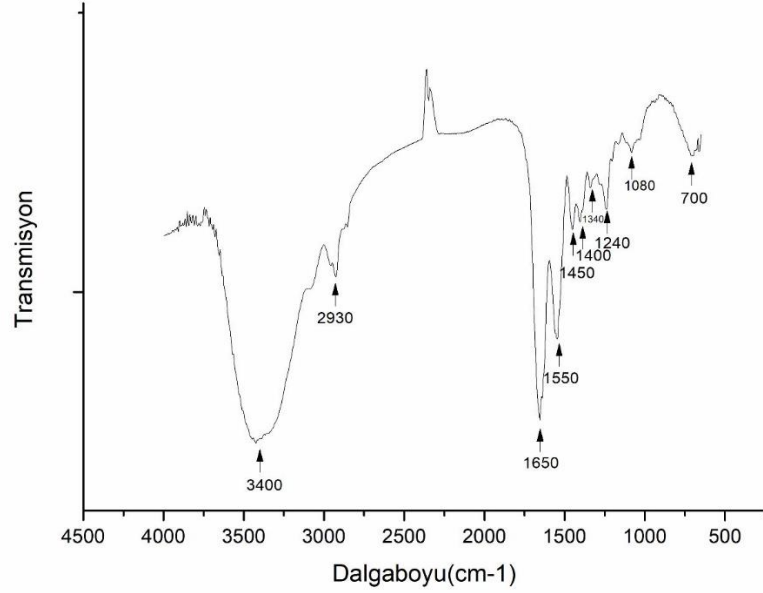
Şekil 3.5'te *G. niger* türüne ait deri kolajeni için FTIR sonucu grafikte gösterilmiştir.



Şekil 3. 5: *G. niger* deri kolajeni FTIR analiz grafiği

3427'de C=N-H grubundaki N-H gerilme titreşimi görülmektedir. 2921'de $-\text{CH}_2\text{NH}_3$ fonksiyonel grubu asimetrik NH_3 gerinimi görülmektedir. 2360 ve 2340 $>\text{C}=\text{NH}^+$ fonksiyonel grubuna ait titreşim görülmektedir. 1647'de amit I bandı görülmektedir. 1555'te amit II bandı görülmektedir. 1408'de $\text{N}(\text{CH}_3)$ fonksiyonel grubuna ait simetrik deformasyon titreşimleri görülmektedir. 1240'ta da amit III β heliks yapısı ve 1064'te serbest amino asitlere ait olan NH_3^+ / $-\text{C}-\text{N}$ gerinim titreşimi görülmektedir.

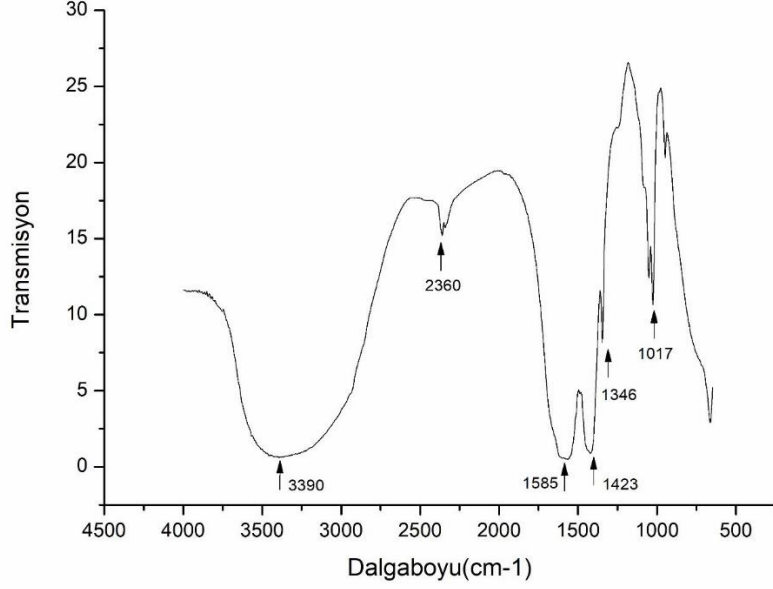
Şekil 3.6’da *U. scaber* türüne ait deri kolajeni için FTIR sonucu grafikte gösterilmiştir.



Şekil 3. 6: *U. scaber* deri kolajeni FTIR analiz grafiği

3400’de C=N-H grubundaki N-H Gerilme titreşimi gözlemlenmiştir.2930’da $-\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ fonksiyonel grubu asimetrik NH_3 gerinimi görülmektedir. 1650’de amit I bandı görülmektedir. 1550’de amit II bandı görülmektedir.1450’de halkalı yapılara ait olan $-\text{C}=\text{C}-$ bağları görülmektedir.1400’de amit II bandının düşük yoğunluklu hali gözlenmektedir.1340’ta sekonder aminlere ait (cis formu) $-\text{C}-\text{N}$ gerilmesi görülebilir.1240’ta amit III β heliks yapısı titreşimi gözlemlenmektedir.1080’de serbest amino asitlere ait olan $\text{NH}_3^+ / -\text{C}-\text{N}$ gerinim titreşimi görülmektedir.700’de amit V bandı görülmektedir.

Şekil 3.7’de *A. aurita* türüne ait deri kolajeni için FTIR sonucu grafikte gösterilmiştir.



Şekil 3. 7: *A. aurita* kolajeni FTIR analiz grafiği

3390’de de C=N-H grubundaki N-H Gerilme titreşimi görülmektedir. 2360’ta $>C=NH^+$ fonksiyonel grubuna ait titreşim görülmektedir. 1585’te amit II bandı görülmektedir. 1423’te ve 1346’da 1450-1340 arasında olması beklenen Nitrat titreşimi gözlemlenmektedir. 1017’de her zaman görülemeyen $NH_2(CH_2-CO-NH)_n-CH_2COOH$ grubu titreşimi görülmektedir. 660’ta amit V bandı görülmektedir.

FTIR spektrometresinde kolajen örnekleri için amit A bantları yaklaşık $3400-3440\text{ cm}^{-1}$ olup çalışmadaki türler için elde edilen amit A bantlarının $3300-3427\text{ cm}^{-1}$ aralığında değiştiği görülmektedir. Amit A bantları N-H ve O-H gerilimini temsil etmektedir. *L. sceleratus* türüne ait amit A bandı 3300 dalga sayısı ile diğer türlerden elde edilen kolajenlere göre daha düşük frekansa sahiptir. Bunun nedeni daha fazla sayıda N-H fonksiyonel grubunun polipeptit zincirinde bulunan hidrojen bağına katılmasıdır.

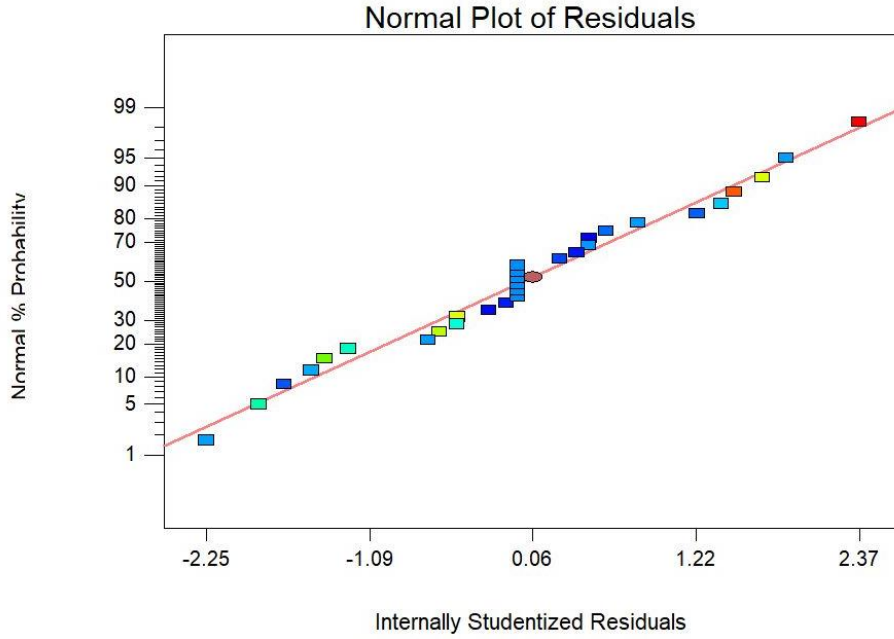
Amit B bandı simetrik veya asimetrik CH₂ gerilimini ifade etmektedir. Çalışmadaki türler için elde edilen amit B bant değerleri *A. aurita* türü dışında yaklaşık 2921-2933 cm⁻¹ olarak görülmektedir. 2800-3000 cm⁻¹ aralığındaki pikler C-H gerilmelerinden kaynaklanmaktadır.

Amit I bandı denemede kullanılan çoğu tür için 1647-1662 cm⁻¹ aralığındadır ve C=O gerilim titreşimlerinden meydana gelir. Amit II bandı çalışmada kullanılan tüm türler için 1538-1585 aralığında olup C-N gerilimi ve N-H bükülmesini göstermektedir. Amit III bandı çalışma kapsamındaki balık türlerinden elde edilen kolajen için 1235-1247 aralığındadır. Amit III bağının 1'e yakın olması kolajenin üçlü sarmal yapısının bozulmadığını göstermektedir.

Bu çalışmada kullanılan deniz canlılarına ait FTIR spektroskopi sonuçları literatürde yer alan *Centroluphus niger* [47] balık türü ve sığır tendonundan [114] elde edilen kolajene ait FTIR sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

3.4. YANIT YÜZEY METODU (RSM) OPTİMİZASYON SONUÇLARI

Aşağıda Şekil 3.8'de model tarafından öngörülen veriler ile deneysel verilerin uyumluluğu arasındaki ilişki grafik üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 3. 8: Öngörülen veriler ile deneysel veriler arasındaki ilişki grafiği

Denizanasından ultrases destekli kolajen ekstraksiyonu için yapılan optimizasyon çalışması sonucunda en uygun modelin kuadratik model olduğu belirlenmiştir.

Denizanası türü için yapılan ultrases destekli kolajen ekstraksiyonunun deneysel verilerine ANOVA testi uygulanmış olup sonuçları Tablo 3.2’de verilmiştir.

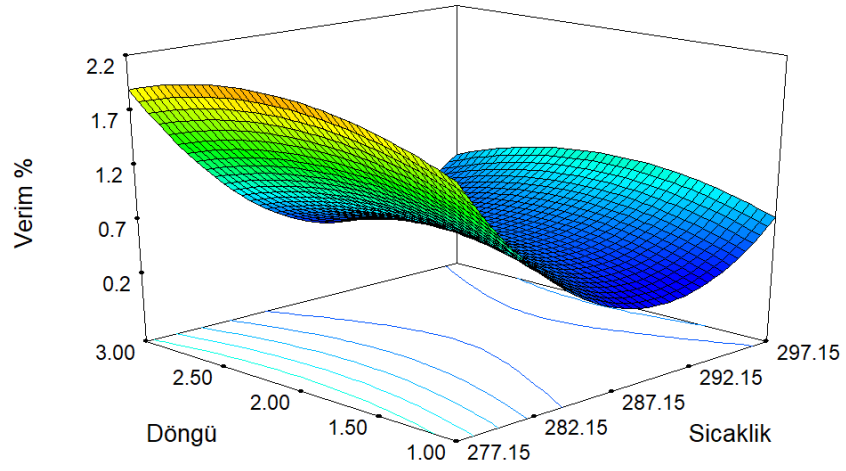
Tablo 3. 2: Ultrases destekli ekstraksiyonda elde edilen deneysel veriler için ANOVA test sonuçları

	Kareler Toplamı (KT)	df	Kareler Ortalaması (KO)	F-değeri	p-değeri
Model	10,15	14	0,73	13,51	0,0001
A	5,44	1	5,44	101,41	0,0001
B	3,289	1	3,289	0,061	0,8079
C	0,023	1	0,023	0,43	0,5225
D	0,27	1	0,27	5,11	0,0391
AB	1,984	1	1,984	0,037	0,8501
AC	0,045	1	0,045	0,84	0,3728
AD	0,77	1	0,77	14,25	0,0018
BC	0,046	1	0,046	0,86	0,3693
BD	0,19	1	0,19	3,46	0,0826
CD	0,22	1	0,22	4,04	0,0628
A ²	2,36	1	2,36	43,95	0,0001
B ²	0,13	1	0,13	2,35	0,1458
C ²	0,23	1	0,23	4,23	0,0575
D ²	4,061	1	4,061	7,566	0,9318
	R ² =0,9265	R _{adj} ² =0,8579	AP=11,518	%CV=26,58	SD=0,23

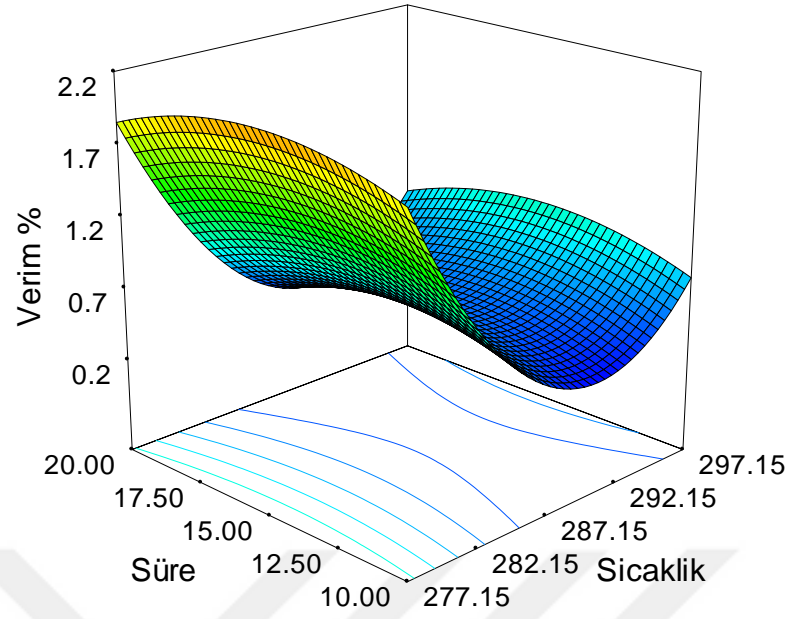
$$\text{Verim (\%)} = 0,60 - 0,55A - 0,014B + 0,036C - 0,12D + 0,011AB - 0,053AC + 0,22AD - 0,054BC - 0,11BD + 0,12CD + 0,95A^2 - 0,22B^2 - 0,30C^2 + 0,013D^2$$

Sonuçlar, ekstraksiyon şartları arasında iyi bir kuadratik ilişki olduğunu ($R^2 = 0,9265$) göstermektedir. Modelin F-değerinin 13,51 olması anlamlı olduğunu ifade etmektedir.

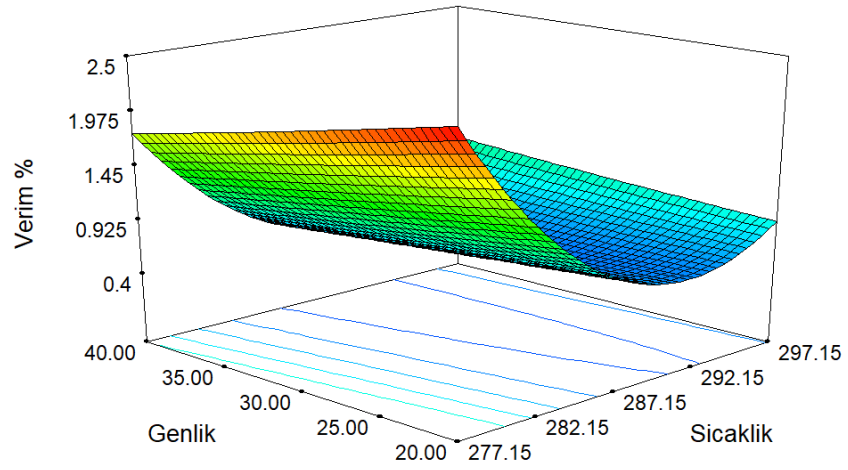
Tablo 2.1’de belirtilen parametreler doğrultusunda denemeler yapılmış olup yanıt yüzey metodu uygulanarak verim üzerine etkileri Şekil 3.9-3.20 arasındaki grafiklerle gösterilmiştir.



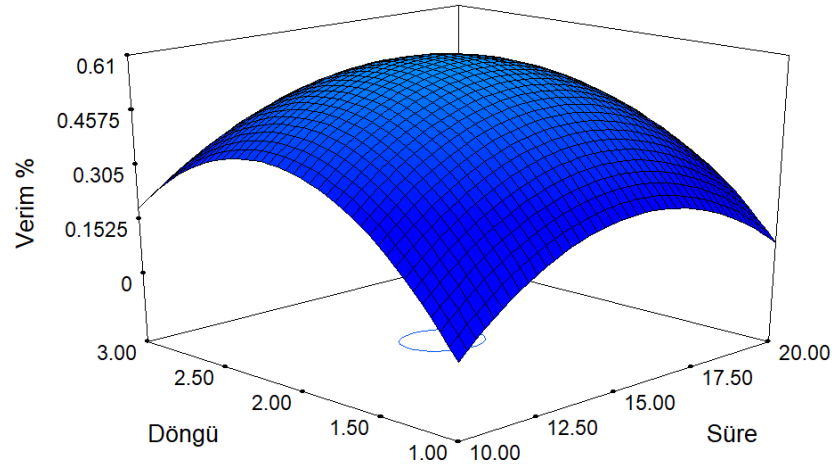
Şekil 3. 9: Ekstraksiyonda vuruş döngüsü ve sıcaklığın verime etkisinin üç boyutlu çizimi



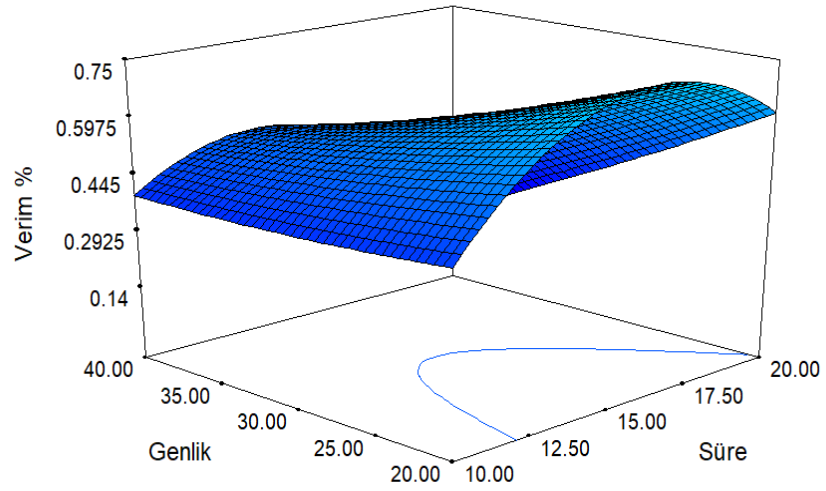
Şekil 3. 10: Ekstraksiyonda süre ve sıcaklığın verime etkisinin üç boyutlu çizimi



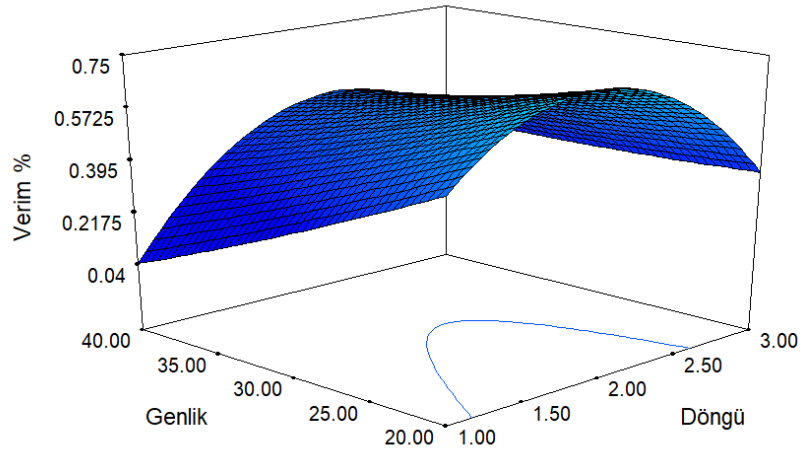
Şekil 3. 11: Ekstraksiyonda genlik ve sıcaklığın verime etkisinin üç boyutlu çizimi



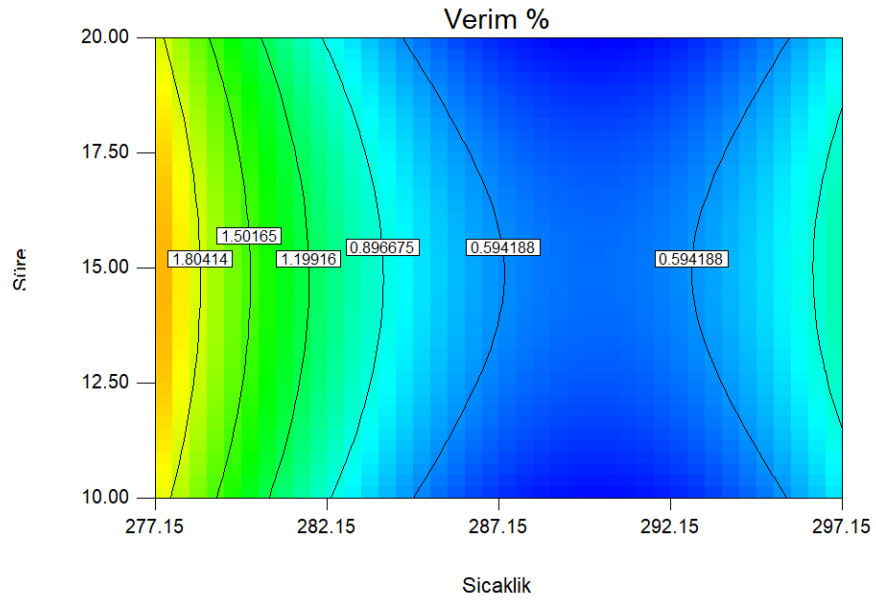
Şekil 3. 12: Ekstraksiyonda vuruş döngüsü ve sürenin verime etkisinin üç boyutlu çizimi



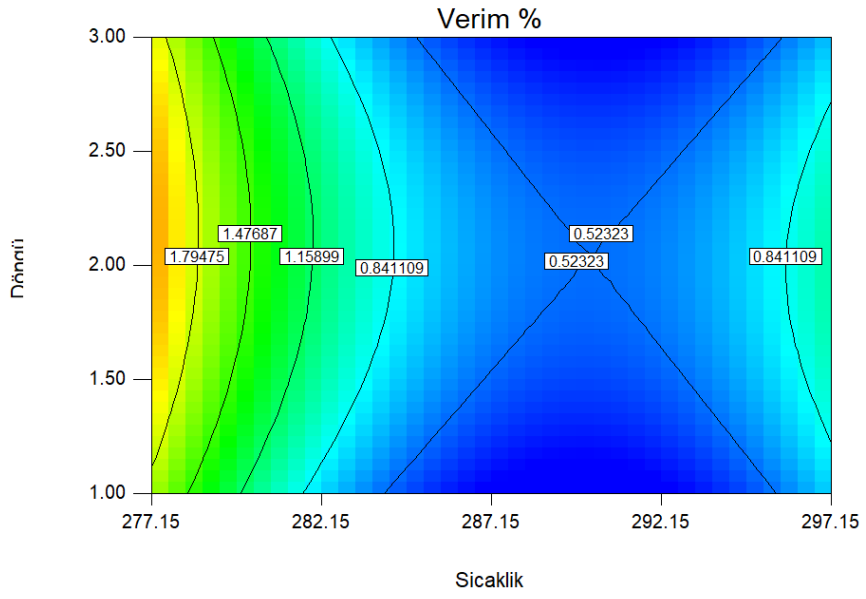
Şekil 3. 13: Ekstraksiyonda genlik ve sürenin verime etkisinin üç boyutlu çizimi



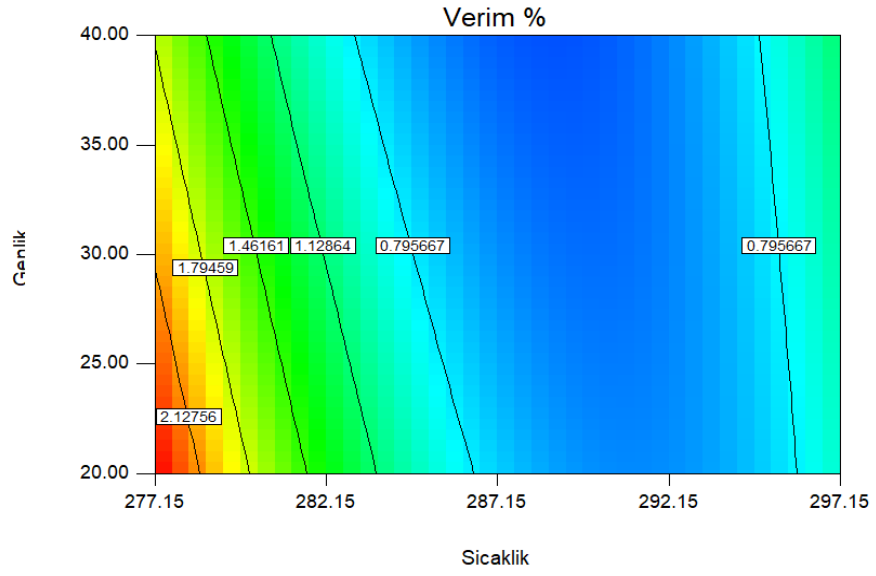
Şekil 3. 14: Ekstraksiyonda genlik ve vuruş döngüsünün verime etkisinin üç boyutlu çizimi



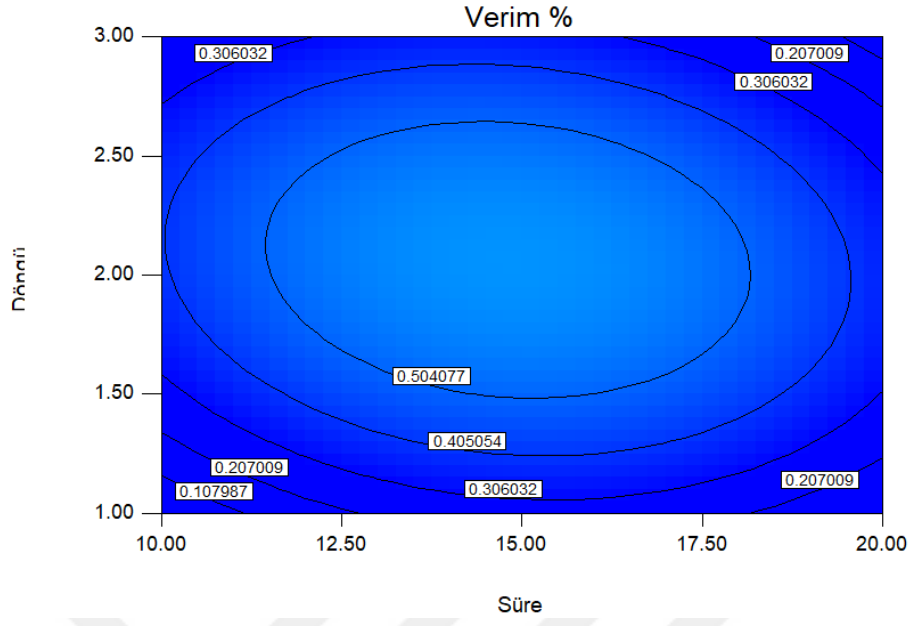
Şekil 3. 15: Süre ve sıcaklığın ekstraksiyon verimine etkisinin iki boyutlu çizimi



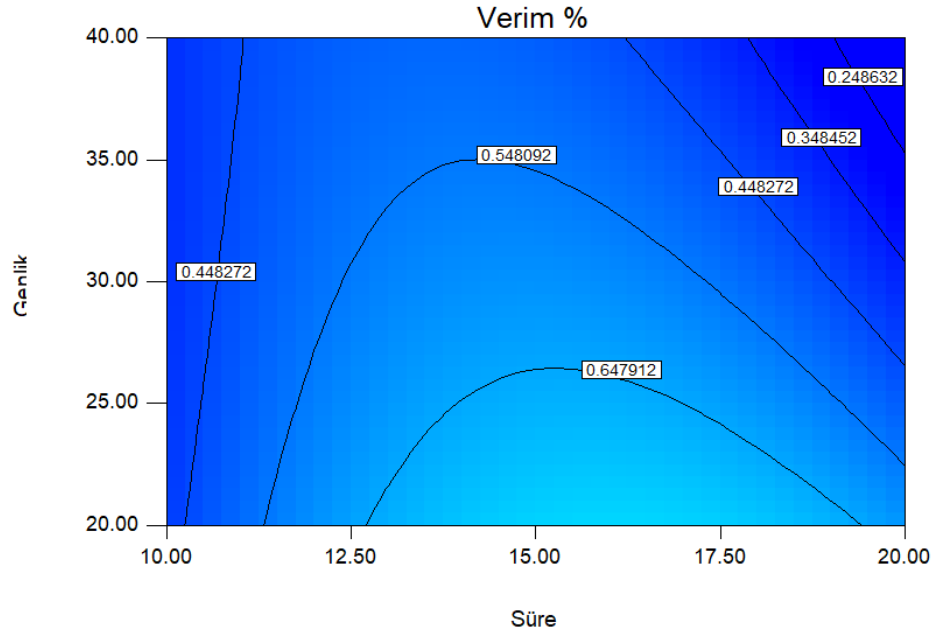
Şekil 3. 16: Vuruş döngüsü ve sıcaklığın ekstraksiyon verimine etkisinin iki boyutlu çizimi



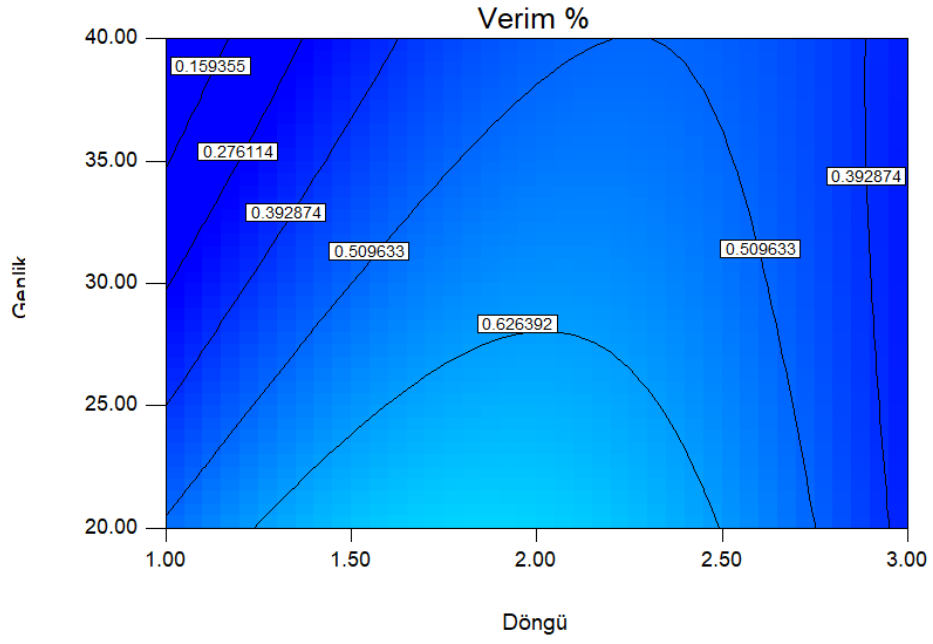
Şekil 3. 17: Genlik ve sıcaklığın ekstraksiyon verimine etkisinin iki boyutlu çizimi



Şekil 3. 18: Süre ve vuruş döngüsünün ekstraksiyon verimine etkisinin iki boyutlu çizimi



Şekil 3. 19: Süre ve genliğin ekstraksiyon verimine etkisinin iki boyutlu çizimi



Şekil 3. 20: Vuruş döngüsü ve genliğin ekstraksiyon verimine etkisinin iki boyutlu çizimi

Yanıt yüzey metodu uygulanarak yapılan optimizasyon çalışması, denizanası (*A. aurita*) için en yüksek verimin 4 °C, %30 genlik, 02:02 atış ve 15 dk koşullarında elde edildiğini göstermiştir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında yapılan denemeler sonucunda balık işleme prosesleri sırasında oluşan yan ürünlerin ve ekonomik değeri olmayan denizel türlerin kolajen kaynağı olarak büyük potansiyele sahip olduğu görülmüştür.

Ultras ses destekli ekstraksiyon sonucu elde edilen kolajene ait FTIR ve SDS PAGE analiz sonuçları genel olarak normal aralıktadır ve üçlü sarmal yapının korunduğu saptanmıştır. Deniz kaynaklı kolajenin SDS PAGE analiz sonucuna göre ağırlıklı olarak Tip I kolajen içerdiği ve RSM ile optimizasyon çalışmalarında denizanasından (*A. aurita*) ultras ses destekli ekstraksiyon için optimum koşulların 4 °C, %30 genlik, 02:02 atış ve 15 dk olduğu sonucuna varılmıştır.

Memeli kolajeniyle benzer özelliklere sahip olduğu belirlenen deniz kaynaklı kolajenin hem kaynakları daha verimli kullanma hem de geliştirme yönünde çok iyi bir alternatif olabileceği anlaşılmıştır. Denizel kaynaklı kolajen; dini açıdan engel bulunmaması, hastalık riski taşımaması, yüksek ürün güvenliği, suda çözünürlüğünün yüksek olması gibi avantajlarıyla da karasal hayvan kolajeninden üstün konumdadır.

Dünya nüfusunun gün geçtikçe artması sonucu beraberinde gıda tüketiminin de artması, insanların estetik açıdan kaygı ve takıntılarına bağlı olarak her geçen gün gelişen kozmetik endüstrisi, beslenme konusunda giderek artan bilinç, salgın hastalıklar sebebiyle takviye gıdaların yaygınlaşması gibi etkenler kolajene olan ilgiyi daha da artırmıştır. Balık yan ürünlerinin ve denizanelerinin içerdiği besin değerleri ve bunlardan ekstrakte edilen biyoaktif bileşiklerin birçok alandaki potansiyel faydaları göz önüne alındığında deniz kaynaklarının sürdürülebilir kullanımı çok büyük önem arz etmektedir.

Küresel olarak artan insan nüfusu için ürün kalitesinin ve güvenliğinin mümkün olan en yüksek seviyeye ulaşmasına izin veren, çevreci (yeşil) ve aynı zamanda sürdürülebilir kalkınma hedeflerini karşılayan ekstraksiyon teknolojilerini belirlemek kritik öneme sahiptir.

Literatürde deniz kaynaklı kolajen ekstraksiyonu hakkında birçok çalışma bulunmakla birlikte modern ve çevreci teknolojilerden biri olan ultras ses destekli deniz kolajeni ekstraksiyonu için yapılan az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Tez kapsamında denizanası kolajeni için RSM kullanılarak yapılan optimizasyon çalışması ve ultrases destekli deniz kolajeni ekstraksiyonu çalışmalarıyla literatüre yenilikçi bir çalışma kazandırılacağı düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmayla ticari değeri olmayan, doğal ve bol kaynağa sahip deniz canlılarından katma değeri yüksek, sürdürülebilir kalkınma hedefine uygun, çevreci ve birçok alanda ekonomiye katkısı yüksek ürün elde edilebileceği ortaya konmuştur.



KAYNAKLAR

- [1] H. Jafari *et al.*, “Fish collagen: Extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering,” *Polymers*, vol. 12, no. 10. MDPI AG, pp. 1–37, Oct. 01, 2020. doi: 10.3390/polym12102230.
- [2] S. Mahboob, “Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*,” *J Food Sci Technol*, vol. 52, no. 7, pp. 4296–4305, Jul. 2015, doi: 10.1007/s13197-014-1520-6.
- [3] Y. Zou *et al.*, “Effect of ultrasound assisted extraction on the physicochemical and functional properties of collagen from soft-shelled turtle calipash,” *Int J Biol Macromol*, vol. 105, pp. 1602–1610, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.011.
- [4] Y. Salci, “Importance Of Seafood Gelatin For Food Industry”, *Eurasian Journal of Food Science and Technology*, vol. 3, no. 1, pp. 19-25, Aug. 2019
- [5] M. Ahmed, A. K. Verma, and R. Patel, “Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review,” *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, vol. 18. Elsevier B.V., Dec. 01, 2020. doi: 10.1016/j.scp.2020.100315.
- [6] N. M. H. Khong *et al.*, “Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes,” *Food Chem*, vol. 251, pp. 41–50, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.12.083.
- [7] A. M. M. Ali, H. Kishimura, and S. Benjakul, “Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus Jullieni*) as affected by ultrasonication,” *Process Biochemistry*, vol. 66, pp. 237–244, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.procbio.2018.01.003.
- [8] I. Majid, G. A. Nayik, and V. Nanda, “Ultrasonication and food technology: A review,” *Cogent Food Agric*, vol. 1, no. 1, 2015, doi: 10.1080/23311932.2015.1071022.
- [9] H. Jafari *et al.*, “Fish collagen: Extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering,” *Polymers*, vol. 12, no. 10. MDPI AG, pp. 1–37, Oct. 01, 2020. doi: 10.3390/polym12102230.
- [10] S. Mahboob, “Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*,” *J Food Sci Technol*, vol. 52, no. 7, pp. 4296–4305, Jul. 2015, doi: 10.1007/s13197-014-1520-6.
- [11] P. K. Bhagwat and P. B. Dandge, “Collagen and collagenolytic proteases: A review,” *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 15. Elsevier Ltd, pp. 43–55, Jul. 01, 2018. doi: 10.1016/j.bcab.2018.05.005.

- [12] H. Yang and Z. Shu, "The extraction of collagen protein from pigskin", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2014, vol. 6, no. 2, pp. 683–687.
- [13] L. Salvatore *et al.*, "Marine collagen and its derivatives: Versatile and sustainable bio-resources for healthcare," *Materials Science and Engineering C*, vol. 113. Elsevier Ltd, Aug. 01, 2020. doi: 10.1016/j.msec.2020.110963.
- [14] Panagiotis, B., "Marine Collagen: Extraction and Applications", *Research Trends in Biochemistry, Molecular Biology and Microbiology*, SM Group, April 2015.
- [15] G. K. S. Arumugam, D. Sharma, R. M. Balakrishnan, and J. B. P. Ettiyappan, "Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin," *Sustain Chem Pharm*, vol. 9, pp. 19–26, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.scp.2018.04.003.
- [16] S. Gorgieva and V. Kokol, Biomaterials Applications for Nanomedicine, "2 Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives", 2011, doi: 10.5772/24118.
- [17] R. Nurubhasha, N. S. Sampath Kumar, S. K. Thirumalasetti, G. Simhachalam, and V. R. Dirisala, "Extraction and characterization of collagen from the skin of Pterygoplichthys pardalis and its potential application in food industries," *Food Sci Biotechnol*, vol. 28, no. 6, pp. 1811–1817, Dec. 2019, doi: 10.1007/s10068-019-00601-z.
- [18] D. Coppola *et al.*, "Marine collagen from alternative and sustainable sources: Extraction, processing and applications," *Marine Drugs*, vol. 18, no. 4. MDPI AG, Apr. 01, 2020. doi: 10.3390/md18040214.
- [19] B. Funda Eken, C. Sercan, D. Kaya, and K. Ulucan, "Darbeye Bağlı Olmayan Yumuşak Doku Yaralanmalarında Moleküler Yaklaşım Molecular Approach to Soft Tissue Injuries Not Affected by Pulse," *Eurasian Research in Sport Science, Avrasya Spor Bilimleri Araştırmaları*, vol. 3, 2018, doi: 10.22396/ERISS.2018.32.
- [20] A. León-López, A. Morales-Peñaloza, V. M. Martínez-Juárez, A. Vargas-Torres, D. I. Zeugolis, and G. Aguirre-Álvarez, "Hydrolyzed collagen-sources and applications," *Molecules*, vol. 24, no. 22. MDPI AG, 2019. doi: 10.3390/molecules24224031.
- [21] L. Maistrenko *et al.*, "Collagen Obtained from Leather Production Waste Provides Suitable Gels for Biomedical Applications," *Polymers (Basel)*, vol. 14, no. 21, Nov. 2022, doi: 10.3390/polym14214749.
- [22] K. S. Silvipriya, K. Krishna Kumar, A. R. Bhat, B. Dinesh Kumar, A. John, and P. Lakshmanan, "Collagen: Animal sources and biomedical application," *J Appl Pharm Sci*, vol. 5, no. 3, pp. 123–127, 2015, doi: 10.7324/JAPS.2015.50322.
- [23] Ö. Ata and Ş. Tavman, "Kolajen Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması," *Gıda / The Journal of Food*, pp. 383–395, Apr. 2019, doi: 10.15237/gida.gd18112.
- [24] M. I. Avila Rodríguez, L. G. Rodríguez Barroso, and M. L. Sánchez, "Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications," *Journal of Cosmetic Dermatology*, vol. 17, no. 1. Blackwell Publishing Ltd, pp. 20–26, Feb. 01, 2018. doi: 10.1111/jocd.12450.

- [25] T. R. L. Senadheera, D. Dave, and F. Shahidi, "Sea cucumber derived type i collagen: A comprehensive review," *Marine Drugs*, vol. 18, no. 9. MDPI AG, Sep. 01, 2020. doi: 10.3390/md18090471.
- [26] A. Afifah, O. Suparno, L. Haditjaroko, and K. Tarman, "Utilisation of fish skin waste as a collagen wound dressing on burn injuries: A mini review," in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Institute of Physics Publishing, Oct. 2019. doi: 10.1088/1755-1315/335/1/012031.
- [27] C. Espinales, M. Romero-Peña, G. Calderón, K. Vergara, P. J. Cáceres, and P. Castillo, "Collagen, protein hydrolysates and chitin from by-products of fish and shellfish: An overview," *Heliyon*, vol. 9, no. 4. Elsevier Ltd, Apr. 01, 2023. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e14937.
- [28] F. F. Felician, C. Xia, W. Qi, and H. Xu, "Collagen from Marine Biological Sources and Medical Applications," *Chemistry and Biodiversity*, vol. 15, no. 5. Wiley-VCH Verlag, May 01, 2018. doi: 10.1002/cbdv.201700557.
- [29] M. Raman and K. Gopakumar, "Cronicon EC NUTRITION Review Article Fish Collagen and its Applications in Food and Pharmaceutical Industry: A Review."
- [30] A. Sionkowska, K. Adamiak, K. Musial, and M. Gadomska, "Collagen based materials in cosmetic applications: A review," *Materials*, vol. 13, no. 19. MDPI AG, Oct. 01, 2020. doi: 10.3390/MA13194217.
- [31] C. Metin and T. Baygar, "Denizel Kaynaklardan Elde Edilen Biyoaktif Maddeler ve Kozmetik Alanında Kullanımı," *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, vol. 14, no. 4, pp. 339–350, Dec. 2018, doi: 10.22392/egirdir.399363.
- [32] A. Irastorza, I. Zarandona, M. Andonegi, P. Guerrero, and K. de la Caba, "The versatility of collagen and chitosan: From food to biomedical applications," *Food Hydrocolloids*, vol. 116. Elsevier B.V., Jul. 01, 2021. doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106633.
- [33] A. L. Alves, A. L. P. Marques, E. Martins, T. H. Silva, and R. L. Reis, "Cosmetic potential of Marine fish skin collagen," *Cosmetics*, vol. 4, no. 4, Dec. 2017, doi: 10.3390/cosmetics4040039.
- [34] X. Zhao, X. Zhang, and D. Liu, "Collagen peptides and the related synthetic peptides: A review on improving skin health," *Journal of Functional Foods*, vol. 86. Elsevier Ltd, Nov. 01, 2021. doi: 10.1016/j.jff.2021.104680.
- [35] L. Salvatore *et al.*, "Marine collagen and its derivatives: Versatile and sustainable bio-resources for healthcare," *Materials Science and Engineering C*, vol. 113. Elsevier Ltd, Aug. 01, 2020. doi: 10.1016/j.msec.2020.110963.
- [36] W. C. Lu, C. S. Chiu, Y. J. Chan, A. T. Mulio, and P. H. Li, "Characterization and biological properties of marine by-product collagen through ultrasound-assisted extraction," *Aquaculture Reports*, vol. 29. Elsevier B.V., Apr. 01, 2023. doi: 10.1016/j.aqrep.2023.101514.

- [37] V. Ferraro, A. P. Carvalho, C. Piccirillo, M. M. Santos, P. M. Paula, and M. E. Pintado, "Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues - A review," *Materials Science and Engineering C*, vol. 33, no. 6, pp. 3111–3120, Aug. 01, 2013. doi: 10.1016/j.msec.2013.04.003.
- [38] Y. Zou *et al.*, "Effect of ultrasound assisted extraction on the physicochemical and functional properties of collagen from soft-shelled turtle calipash," *Int J Biol Macromol*, vol. 105, pp. 1602–1610, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.011.
- [39] S. F. Bruno, F. J. A. A. Ekorong, S. S. Karkal, M. S. B. Cathrine, and T. G. Kudre, "Green and innovative techniques for recovery of valuable compounds from seafood by-products and discards: A review," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 85. Elsevier Ltd, pp. 10–22, Mar. 01, 2019. doi: 10.1016/j.tifs.2018.12.004.
- [40] N. M. H. Khong *et al.*, "Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes," *Food Chem*, vol. 251, pp. 41–50, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.12.083.
- [41] A. León-López, A. Morales-Peñaloza, V. M. Martínez-Juárez, A. Vargas-Torres, D. I. Zeugolis, and G. Aguirre-Álvarez, "Hydrolyzed collagen-sources and applications," *Molecules*, vol. 24, no. 22. MDPI AG, 2019. doi: 10.3390/molecules24224031.
- [42] T. H. Silva, J. Moreira-Silva, A. L. P. Marques, A. Domingues, Y. Bayon, and R. L. Reis, "Marine origin collagens and its potential applications," *Marine Drugs*, vol. 12, no. 12. MDPI AG, pp. 5881–5901, Dec. 05, 2014. doi: 10.3390/md12125881.
- [43] Y. Salci, "Importance Of Seafood Gelatin For Food Industry", *Eurasian Journal of Food Science and Technology*, vol. 3, no. 1, pp. 19-25, Aug. 2019
- [44] J. Glowacki and S. Mizuno, "Collagen scaffolds for tissue engineering," *Biopolymers*, vol. 89, no. 5, pp. 338–344, May 2008, doi: 10.1002/bip.20871.
- [45] G. K. Pal and P. V. Suresh, "Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients," *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 37, no. Part B, pp. 201–215, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.ifset.2016.03.015.
- [46] A. N. Akram and C. Zhang, "Effect of ultrasonication on the yield, functional and physicochemical characteristics of collagen-II from chicken sternal cartilage," *Food Chem*, vol. 307, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125544.
- [47] M. V. Bhimbar, P. K. Bhagwat, and P. B. Dandge, "Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagen-chitosan blend as food packaging film," *J Environ Chem Eng*, vol. 7, no. 2, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.jece.2019.102983.
- [48] S. Addad, J. Y. Exposito, C. Faye, S. Ricard-Blum, and C. Lethias, "Isolation, characterization and biological evaluation of jellyfish collagen for use in biomedical applications," *Mar Drugs*, vol. 9, no. 6, pp. 967–983, 2011, doi: 10.3390/md9060967.
- [49] A. M. Carvalho, A. P. Marques, T. H. Silva, and R. L. Reis, "Evaluation of the potential of collagen from codfish skin as a biomaterial for biomedical applications," *Mar Drugs*, vol. 16, no. 12, Dec. 2018, doi: 10.3390/md16120495.

- [50] Y. S. Lim, Y. J. Ok, S. Y. Hwang, J. Y. Kwak, and S. Yoon, "Marine collagen as a promising biomaterial for biomedical applications," *Marine Drugs*, vol. 17, no. 8. MDPI AG, Aug. 10, 2019. doi: 10.3390/md17080467.
- [51] S. N. H. Oslan, C. X. Li, R. Shapawi, R. A. M. Mokhtar, W. N. M. Noordin, and N. Huda, "Extraction and Characterization of Bioactive Fish By-Product Collagen as Promising for Potential Wound Healing Agent in Pharmaceutical Applications: Current Trend and Future Perspective," *Int J Food Sci*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/9437878.
- [52] I. Dini and A. Mancusi, "Food Peptides for the Nutricosmetic Industry," *Antioxidants*, vol. 12, no. 4, p. 788, Mar. 2023, doi: 10.3390/antiox12040788.
- [53] D. Benayahu, M. Sharabi, L. Pomeraniec, L. Awad, R. Haj-Ali, and Y. Benayahu, "Unique collagen fibers for biomedical applications," *Mar Drugs*, vol. 16, no. 4, Apr. 2018, doi: 10.3390/md16040102.
- [54] M. Azizur Rahman, "Collagen of extracellular matrix from marine invertebrates and its medical applications," *Marine Drugs*, vol. 17, no. 2. MDPI AG, Feb. 14, 2019. doi: 10.3390/md17020118.
- [55] L. A. Tziveleka, E. Ioannou, D. Tsiourvas, P. Berillis, E. Foufa, and V. Roussis, "Collagen from the marine sponges *Axinella cannabina* and *Suberites carnosus*: Isolation and morphological, biochemical, and biophysical characterization," *Mar Drugs*, vol. 15, no. 6, Jun. 2017, doi: 10.3390/md15060152.
- [56] F. Pati, B. Adhikari, and S. Dhara, "Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability," *Bioresour Technol*, vol. 101, no. 10, pp. 3737–3742, May 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.133.
- [57] Kantarcıoğlu, İlkim., 2017, *Denizanası Kollajeni/ Misvak Hibrit Membranların Üretimi ve Periodontal Doku Grefti Olarak Kullanımının Araştırılması*, Yüksek Lisans, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı.
- [58] N. M. H. Khong *et al.*, "Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes," *Food Chem*, vol. 251, pp. 41–50, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.12.083.
- [59] L. Prieto, A. Enrique-Navarro, R. L. Volsi, and M. J. Ortega, "The large jellyfish *Rhizostoma luteum* as sustainable a resource for antioxidant properties, nutraceutical value and biomedical applications," *Mar Drugs*, vol. 16, no. 10, Oct. 2018, doi: 10.3390/md16100396.
- [60] J. Fan, Y. Zhuang, and B. Li, "Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish umbrella on histological and immunity changes of mice photoaging," *Nutrients*, vol. 5, no. 1, pp. 223–233, Jan. 2013, doi: 10.3390/nu5010223.
- [61] K. S. Ojha, R. Aznar, C. O'Donnell, and B. K. Tiwari, "Ultrasound technology for the extraction of biologically active molecules from plant, animal and marine sources," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 122. Elsevier B.V., Jan. 01, 2020. doi: 10.1016/j.trac.2019.115663.

- [62] A. Akyüz ve S. Ersus Bilek, "Protein Çöktürme Yöntemlerinin Karşılaştırılması", *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 2018, c. 33, sayı. 2, ss. 83-92.
- [63] Wu Suo-Lian, Kang Huai-Bin, and Li Dong-Jiao, "Technology for Extracting Effective Components from Fish Scale," *J Food Sci Eng*, vol. 7, no. 7, Jul. 2017, doi: 10.17265/2159-5828/2017.07.003.
- [64] T. T. Dang *et al.*, "Emerging and potential technologies for facilitating shrimp peeling: A review," *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 45. Elsevier Ltd, pp. 228–240, Feb. 01, 2018. doi: 10.1016/j.ifset.2017.10.017.
- [65] Büyüktuncel, E., Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I, *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 2012, (2), 209-242.
- [66] Köşe, Ç., 2019, "Nigella Sativa ve Equisetum Arvense Bitki Ekstraktlarının Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Yaraların İyileşmesi Üzerindeki Etkileri", Doktora, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı.
- [67] Kılıç, A., Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri, *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 2008, 10 (13), 37-45.
- [68] S. U. Kadam, B. K. Tiwari, C. Álvarez, and C. P. O'Donnell, "Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 46, no. 1. Elsevier Ltd, pp. 60–67, 2015. doi: 10.1016/j.tifs.2015.07.012.
- [69] T. T. Dang *et al.*, "Facilitating shrimp (*Pandalus borealis*) peeling by power ultrasound and proteolytic enzyme," *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 47, pp. 525–534, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.ifset.2018.04.019.
- [70] F. Al Khawli *et al.*, "Innovative green technologies of intensification for valorization of seafood and their by-products," *Marine Drugs*, vol. 17, no. 12. MDPI AG, 2019. doi: 10.3390/md17120689.
- [71] A. M. M. Ali, H. Kishimura, and S. Benjakul, "Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus Jullieni*) as affected by ultrasonication," *Process Biochemistry*, vol. 66, pp. 237–244, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.procbio.2018.01.003.
- [72] S. Gulzar, N. Raju, R. Chandragiri Nagarajarao, and S. Benjakul, "Oil and pigments from shrimp processing by-products: Extraction, composition, bioactivities and its application- A review," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 100. Elsevier Ltd, pp. 307–319, Jun. 01, 2020. doi: 10.1016/j.tifs.2020.04.005.
- [73] F. Al Khawli *et al.*, "Innovative green technologies of intensification for valorization of seafood and their by-products," *Marine Drugs*, vol. 17, no. 12. MDPI AG, 2019. doi: 10.3390/md17120689.
- [74] G. Balçık Mısır, "Novel Utilization of Fish By-Products and Wastes: Protein Hydrolysates," *Acta Aquatica Turcica*, Feb. 2022, doi: 10.22392/actaquatr.1031442.
- [75] Taşer, Y., 2017, *Denizanalarının Farklı Alanlarda Değerlendirilmesi (Cnidaria=Coelenterata)*, Yüksek Lisans, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı.

- [76] L. Teng *et al.*, “Jellyfish Peptide as an Alternative Source of Antioxidant,” *Antioxidants*, vol. 12, no. 3, Mar. 2023, doi: 10.3390/antiox12030742.
- [77] A. Leone, R. M. Lecci, M. Durante, F. Meli, and S. Piraino, “The bright side of gelatinous blooms: Nutraceutical value and antioxidant properties of three Mediterranean jellyfish (Scyphozoa),” *Mar Drugs*, vol. 13, no. 8, pp. 4654–4681, Aug. 2015, doi: 10.3390/md13084654.
- [78] Boero, F., General Fisheries Commission For The Mediterranean, Food and Agriculture Organization of The United Nations, *Review of jellyfish blooms in the Mediterranean and Black Sea*, 2013, Rome.
- [79] F. F. Felician *et al.*, “The wound healing potential of collagen peptides derived from the jellyfish *Rhopilema esculentum*,” *Chinese Journal of Traumatology - English Edition*, vol. 22, no. 1, pp. 12–20, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.cjtee.2018.10.004.
- [80] E. Cadar, A. M. Pesterau, R. Sirbu, B. S. Negreanu-Pirjol, and C. L. Tomescu, “Jellyfishes—Significant Marine Resources with Potential in the Wound-Healing Process: A Review,” *Marine Drugs*, vol. 21, no. 4. MDPI, Apr. 01, 2023. doi: 10.3390/md21040201.
- [81] Z. Ahmed *et al.*, “Jellyfish collagen: A biocompatible collagen source for 3d scaffold fabrication and enhanced chondrogenicity,” *Mar Drugs*, vol. 19, no. 8, Aug. 2021, doi: 10.3390/md19080405.
- [82] H. Cerim and C. Ates, “Age, Growth and Length-weight Relations of Common Sole (*Solea solea* Linnaeus, 1758) from Southern Aegean Sea,” *Aquatic Sciences and Engineering*, vol. 35, no. 2, pp. 36–42, 2020, doi: 10.26650/ASE2020596672.
- [83] T. Fonseca, A. Teixeira, P. Doutora, M. M. Coelho, D. Henrique, and N. Cabral, “Genetic diversity and population structure of *Solea solea* and *Solea senegalensis* and its relationships with life history patterns,” 2007.
- [84] M. Türkmen, “Investigation of Some Population Parameters of Common Sole, *Solea solea* (L., 1758) from İskenderun Bay”, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, Jan. 2003, 27(2):317-323.
- [85] E. Ulutürk, M. Kaya, and E. Irmak, “The importance of flatfishes (Pisces / Pleuronectiformes) of the world and Turkish seas,” *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, pp. 101–108, Feb. 2013, doi: 10.12714/egejfas.2012.29.2.08.
- [86] M. Bilecenoglu, M. Kaya, and S. Akalin, “Range expansion of silverstripe blaasop, *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789), to the northern Aegean Sea,” *Aquat Invasions*, vol. 1, no. 4, pp. 289–291, 2006, doi: 10.3391/ai.2006.1.4.14.
- [87] D. Ayas and A. R. Köşker, “The effects of age and individual size on metal accumulation of *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from Mersin Bay, Turkey”, *Natural and Engineering Sciences*, 2018, doi:10.28978/nesciences.379321.
- [88] Y. Bilgin, Y. Yılmaz Abeşka, and L. Çavaş, “Can bioactive peptides of *Lagocephalus sceleratus* be evaluated in the functional food industry,” *Tarla Bitkileri Merkez Arastirma Enstitusu*, vol. 29, no. 2, pp. 77–84, Dec. 2020, doi: 10.38042/biost.2020.29.02.04.

- [89] A. El-Ganainy, "Biology and toxicity of the pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from the Gulf of Suez Item Type Journal Contribution Biology and Toxicity of The Pufferfish *Lagocephalus Sceleratus* (Gmelin, 1789) From The Gulf Of Suez", *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2006, 32(1):283-297.
- [90] G. Christidis, M. Mandalakis, T. I. Anastasiou, G. Tserpes, P. Peristeraki, and S. Somarakis, "Keeping lagocephalus sceleratus off the table: Sources of variation in the quantity of ttx, ttx analogues, and risk of tetrodotoxication," *Toxins (Basel)*, vol. 13, no. 12, Dec. 2021, doi: 10.3390/toxins13120896.
- [91] H. Bal and U. Khan, "The invasive silver-cheeked toadfish, *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) appeared in the Sea of Marmara after more than a decade: A call for awareness," *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 39, no. 3, pp. 261–266, Sep. 2022, doi: 10.12714/egejfas.39.3.12.
- [92] F. E. Kayhan ve N. D. Yön Ertuğ, "Türkiye Kıyılarında İstilacı Zehirli Balon Balığı (*Lagocephalus sceleratus* Gmelin, 1789)", *Doğanın Sesi*, 2021, sayı. 8, ss. 35-46,
- [93] K. Zengin and D. Türker, "Türkiye'nin Doğu Akdeniz Kıyılarından Balon Balığı *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789)'un Büyüme Parametreleri," *Acta Aquatica Turcica*, pp. 100–106, Mar. 2020, doi: 10.22392/actaquatr.602809.
- [94] Aydın, M., Erkan, S. & Dal, İ., "Antalya Körfezi'ndeki Tetraodontidae familyasına ait 3 türün (*Lagocephalus sceleratus*, *Lagocephalus spadiceus*, *Lagocephalus suezensis*) boy-ağırlık ilişkisi", *Turkish Journal of Maritime and Marine Sciences*, 2017, 3 (2), 67-74.
- [95] S. Bilgin and H. Onay, "Spawning Period and Size at Maturity of the Thornback ray, *Raja clavata* (Linnaeus, 1758), (Elasmobranchii: Rajidae) in the Black Sea," *Acta Aquatica Turcica*, Dec. 2020, doi: 10.22392/actaquatr.735868.
- [96] Yeldan, H., Avşar, D. & Manaşırılı, M., Kuzeydoğu Akdeniz'deki Deniz Tilkisi *Raja clavata* (Linnaeus, 1758)'nın Bazı Biyolojik Özellikleri, *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2008, 25 (3), 221-228.
- [97] A. García-De-vinuesa, M. Demestre, A. Carreño, and J. Lloret, "The Bioactive Potential of Trawl Discard: Case Study from a Crinoid Bed Off Blanes (North-Western Mediterranean)," *Mar Drugs*, vol. 19, no. 2, Feb. 2021, doi: 10.3390/MD19020083.
- [98] A. Bellodi *et al.*, "Assessing thornback ray growth pattern in different areas of Western-Central Mediterranean Sea through a Multi-Model Inference analysis," *J Sea Res*, vol. 179, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.seares.2021.102141.
- [99] N. Kasapoğlu, "Age, growth and mortality rates of discard species (*Uranoscopus scaber*, *Neogobius melanostomus* and *Gobius niger*) in the Black Sea," *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 33, no. 4, pp. 397–403, Dec. 2016, doi: 10.12714/egejfas.2016.33.4.14.
- [100] S. Özdemir, F. Buyukdeveci , U. Özsandıkçı and Y. Erdem , "Four Important Poisonous Fishes in the Black Sea Coasts: Some Biological Features and Length-Weight Relationships", *Journal of New Results in Science*, 2020, vol. 9, no. 3, pp. 16-24.

- [101] T. Çoker, O. Akyol, O. Özaydin, S. Leblebici, and Z. Tosunoğlu, “Determination of batch fecundity in *Uranoscopus scaber* Linnaeus, 1758 from the Aegean Sea, Turkey,” *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 24, no. 1, pp. 85–87, Feb. 2008, doi: 10.1111/j.1439-0426.2007.01035.x.
- [102] F. Kırdar, A. İşmen, “Some Population Parameters of Black Goby (*Gobius niger* Linnaeus, 1758) in The Sea of Marmara”, *COMU Journal of Marine Science and Fisheries*, 2018, 1(1): 7-12.
- [103] A. T. Ilkyaz, G. Metin, and H. T. Kinacigil, “The use of otolith length and weight measurements in ageestimations of three Gobiidae species (*Deltentosteus quadrimaculatus*, *Gobius niger*, and *Lesueurigobius friesii*),” *Turkish Journal of Zoology*, vol. 35, no. 6, pp. 819–827, 2011, doi: 10.3906/zoo-1001-13.
- [104] S. Bilgin and H. Onay, “Reproduction and seasonal growth estimates of the black goby, *Gobius niger* (Osteichthyes: Perciformes: Gobiidae) in the southeastern Black Sea region of Turkey,” *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, Dec. 2020, doi: 10.35229/jaes.764827.
- [105] H. Filiz, “Age and growth, reproduction and diet of the black goby, (*Gobius niger*) from Aegean Sea, Turkey,” *J Fishscicom*, 2009, doi: 10.3153/jfscom.2009030.
- [106] N. Weiland-Bräuer, S. C. Neulinger, N. Pinnow, S. Künzel, J. F. Baines, and R. A. Schmitz, “Composition of bacterial communities associated with *Aurelia aurita* changes with compartment, life stage, and population,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 81, no. 17, pp. 6038–6052, 2015, doi: 10.1128/AEM.01601-15.
- [107] Güneş, M., 2018, *Marmara Denizi’nde Yayılış Gösteren Aurelia aurita Denizanası Türünün Moleküler Filogenisi*, Yüksek Lisans, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.
- [108] R. Rachmawati, M. Hidayat, N. Permatasari, and S. Widyarti, “Potential Effect of Jellyfish *Aurelia aurita* Collagen Scaffold Induced Alveolar Bone Regeneration in Periodontal Disease,” *Systematic Reviews in Pharmacy*, 2021, 12(1): 1479-1486, doi: 10.31838/srp.2021.1.208.
- [109] H. Sumiyoshi *et al.*, “A Novel Composite Biomaterial Made of Jellyfish and Porcine Collagens Accelerates Dermal Wound Healing by Enhancing Reepithelization and Granulation Tissue Formation in Mice,” *Adv Wound Care (New Rochelle)*, vol. 9, no. 6, pp. 295–311, Jun. 2020, doi: 10.1089/wound.2019.1014.
- [110] L. Bat, H. Huseyin Satılmış, Z. Birinci-Ozdemir, F. Sahin, and F. Ustun, “Distribution and population dynamics of *Aurelia aurita* (Cnidaria; Scyphozoa) in the southern Black Sea,” *North-Western Journal of Zoology*, 2009, vol. 5, no. 2, pp. 225–241.
- [111] J. Goldstein and U. K. Steiner, “Ecological drivers of jellyfish blooms – The complex life history of a ‘well-known’ medusa (*Aurelia aurita*),” *Journal of Animal Ecology*, vol. 89, no. 3, pp. 910–920, Mar. 2020, doi: 10.1111/1365-2656.13147.

- [112] E. Yemiskan *et al.*, "Alternative sources of marine bioactive compounds from the Black Sea: Isolation and characterization of fish skin collagen from *Neogobius melanostomus* (Pallas 1814) (Perciformes: Gobiidae)," *Reg Stud Mar Sci*, vol. 60, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.rsma.2023.102887.
- [113] T. Büyüksırt ve H. Kuleaşan, "Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Gıda Analizlerinde Kullanımı", *Gıda*, Agu. 2014, c. 39, sayı. 4, ss. 235-241, doi:10.5505/gida.43434.
- [114] H. Ju, X. Liu, G. Zhang, D. Liu, and Y. Yang, "Comparison of the structural characteristics of native collagen fibrils derived from bovine tendons using two different methods: Modified acid-solubilized and pepsin-aided extraction," *Materials*, vol. 13, no. 2, Jan. 2020, doi: 10.3390/ma13020358.
- [115] Socrates, G., 2004, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies Tables and Charts*, 3rd ed., Wiley, ISBN: 978-0-470-09307-8.
- [116] *The State of World Fisheries and Aquaculture*, 2014, Rome, FAO, pp. 223
- [117] *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022, Towards Blue Transformation*. Rome, FAO, <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- [118] <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/collagen-market>
- [119] <https://www.statista.com/outlook/cmo/beauty-personal-care/worldwide>
- [120] https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/solea_spp/en
- [121] <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=127160>
- [122] <https://adriaticnature.com/archives/1011>
- [123] <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=219954>
- [124] https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/species_en?sn=31578
- [125] <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=105883>
- [126] <https://archipelago.gr/en/fishforlife/stargazer/>
- [127] <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=127093>
- [128] <https://www.monaconatureencyclopedia.com/gobius-niger/?lang=en>
- [129] <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=126892>
- [130] <https://www.european-marine-life.org/05/aurelia-aurita.php>
- [131] <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=135306>