



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ



Fen Bilimleri Enstitüsü

**KUZU AYAKLARINDAN BAZI
EKSTRASELLÜLER MATRİKS BİLEŞENLERİNİN
(KOLAJEN VE GAG) ULTRASON DESTEKLİ
EKSTRAKSİYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Özge ATA

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

İZMİR

2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**KUZU AYAKLARINDAN BAZI
EKSTRASELLÜLER MATRİKS BİLEŞENLERİNİN
(KOLAJEN VE GAG) ULTRASON DESTEKLİ
EKSTRAKSİYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Özge ATA

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şebnem TAVMAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
GIDA Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

Sunuş Tarihi: 08/08/2019

Bornova- İZMİR

2019

Özge ATA tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “Kuzu Ayaklarından Bazı Ekstrasellüler Matriks Bileşenlerinin (Kolajen ve GAG) Ultrason Destekli Ekstraksiyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08.08.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı :Prof Dr Şebnem TAVMAN

Raportör Üye:Dr.Öğretim Üyesi Burcu Kaplan Türköz

Üye: Dr Öğretim Üyesi Tuncay YILMAZ

İmza

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “ Kuzu Ayaklarından Bazı Ekstrasellüler Matriks Bileşenlerinin (Kolajen ve GAG) Ultrason Destekli Ekstraksiyonu ve Karakterizasyonu ” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

08/08/2019

İmzası



Özge ATA

ÖZET**KUZU AYAKLARINDAN BAZI EKSTRASELLÜLER
MATRİKS BİLEŞENLERİNİN (KOLAJEN VE GAG) ULTRASON
DESTEKLİ EKSTRAKSİYONU VE KARAKTERİZASYONU**

ATA, Özge

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şebnem TAVMAN

Ağustos 2019, 91 Sayfa

Bu tez çalışmasında, ekstrasellüler matriks bileşenlerinden kolajen ve glukozaminoglikanların (GAG) ultrason destekli ekstraksiyonu ve saflaştırılması hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında, kuzu ayakları, hammadde kaynağı olarak kullanılmış ve en yüksek düzeyde verim eldesi için uygun ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir. Farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan ultrason işleminin kolajen ve GAG yapısı üzerine etkileri incelenmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında, kolajen eldesi için uygun ekstraksiyon parametreleri belirlenmiştir. Ekstraksiyon işleminde enzimatik hidroliz yöntemi seçilmiş ve pepsin enzimi kullanılmıştır. Ön işlemleri tamamlanan kuzu ayakları, ekstraksiyon işlemi için % 0.1 (w/v) pepsin içeren 1:20 (w/v) oranda %5'lik laktik asit çözeltisi içinde 6 saat bekletilmiştir. Ardından 3 farklı sıcaklık ($20 \pm 2^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ve $30 \pm 2^\circ\text{C}$) ve sürede (20, 40, 60 dk.) ultrason destekli ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işleminin ardından örnekler saflaştırma işlemi için diyaliz edilerek -56°C 'de 32 sa boyunca dondurarak kurutulmuştur. En yüksek kolajen konsantrasyonuna 25°C -60 dk parametresinde ($5061,75 \pm 171,41 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) ulaşılmıştır. SDS-PAGE elektroforez ve FTIR analizi sonuçları, farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan ultrason işleminin, kolajen yapısına zarar vermediğini ve tüm kolajenlerin yapısal bütünlüğünü koruduğunu göstermiştir. SEM analizi sonucunda, tüm kolajen örneklerinin lifli ve gözenekli yapıya sahip olduğu gözlenmiştir.

Kolajen örneklerinin b* ve L* değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Örneklerin a* değerleri arasındaki fark ise sadece dört grup için anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

Çalışmanın ikinci aşamasında, GAG eldesi için uygun ekstraksiyon parametreleri belirlenmiştir. Ekstraksiyon işleminde papain enzimi ve sodyum asetat çözeltisi kullanılmıştır. Katı:çözgen oranı 1:20 (w/v), enzim miktarı (5 mg papain / 1 gr kuzu ayağı), sıcaklık (60°C) ve ekstraksiyon süresi 20 saat olarak belirlenmiştir. 20 saat ekstraksiyon işleminin ardından ultrason uygulamasının etkilerinin incelenmesi amacıyla, 3 farklı sıcaklık (60± 2°C, 65± 2°C ve 70± 2°C) ve sürede (20, 40, 60 dk.) ultrason destekli ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işleminin ardından örnekler saflaştırma işlemi için diyaliz edilerek -56°C'de 24 sa boyunca dondurarak kurutulmuştur. En yüksek kondroitin sülfat konsantrasyonuna 60°C-20 dk parametresinde (471,38±49,96 mg/L) ulaşılmıştır. FTIR analizi sonucunda, farklı ekstraksiyon koşulları altında elde edilen GAG örnekleri ile standarda ait spektrumlarının benzerlik gösterdiği görülmüştür. SEM analizi sonuçları, GAG örneklerindeki kümeleşmiş yapının ultrason süresi ve sıcaklığına bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Genel olarak farklı sıcaklık ve sürelerde uygulana ultrason işleminin GAG örneklerinin renk değerleri üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Ekstrasellüler matriks, kolajen, glukozaminoglikan, ultrason, ekstraksiyon

ABSTRACT**ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION AND
CHARACTERIZATION OF SOME EXTRACELLULAR MATRIX
COMPONENTS (COLLAGEN AND GAG) FROM LAMB FEET**

ATA, Özge

MSc in Food Eng.

Supervisor: Prof. Dr. Şebnem TAVMAN

August 2019, 91 Pages

In this thesis, ultrasound-assisted extraction and purification of collagen and glucosaminoglycans (GAG), one of the extracellular matrix components, was aimed. Within the scope of the study, lamb legs were used as raw material source and suitable extraction conditions were determined for obtaining the highest yield. The effects of ultrasound treatment on collagen and GAG structure were investigated at different temperatures and durations.

In the first stage of the study, suitable extraction parameters for the production of collagen were determined. Enzymatic hydrolysis method was selected for extraction and pepsin enzyme was used. The lambs which were pre-treated were left for 6 hours in a 1:20 (w / v) 5% lactic acid solution containing 0.1% (w / v) pepsin for extraction. Then, ultrasound-assisted extraction was performed at 3 different temperatures ($20 \pm 2^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $30 \pm 2^\circ\text{C}$) and time (20, 40, 60 min). After extraction, the samples were dialyzed for purification and freeze-dried at -56°C for 32 hours. The highest collagen parameter was reached at 25°C -60 min ($5061,75 \pm 171,41 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). The results of SDS-PAGE electrophoresis and FTIR analysis showed that ultrasound applied at different temperatures and times did not damage the collagen structure and retain the structural integrity of all collagen. As a result of SEM analysis, it was observed that all collagen samples have fibrous and porous structure. The difference between b^* and L^* values of collagen samples was statistically significant

($p < 0.05$). The difference between the a^* values of the samples was significant only for the four groups.

In the second stage of the study, suitable extraction parameters for GAG were determined. Papain enzyme and sodium acetate solution were used in the extraction process. The solid to solvent ratio was 1:20 (w / v), the amount of enzyme (5 mg papain / 1 g lamb's foot), temperature (60°C) and extraction time was determined as 20 hours. After 20 hours of extraction, ultrasound assisted extraction was performed in 3 different temperatures ($60 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and time (20, 40, 60 min) to examine the effects of ultrasound application. After extraction, the samples were dialyzed for purification and freeze-dried at -56°C for 24 hours. The highest chondroitin sulfate concentration was reached at 60°C -20 min ($471,38 \pm 49,96$ mg/L). As a result of FTIR analysis, it was seen that GAG samples obtained under different extraction conditions were similar to the spectra of the standard. The results of SEM analysis showed that the clustered structure of GAG samples changed depending on the ultrasound time and temperature.

Key words: Extracellular matrix, collagen, glucosaminoglycan, ultrasound, extraction

ÖNSÖZ

“Kuzu Ayaklarından Bazı Ekstrasellüler Matriks Bileşenlerinin (Kolajen ve GAG) Ultrason Destekli Ekstraksiyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı bu tez çalışması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında kuzu ayaklarından kolajen ve GAG ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Her iki bileşen için uygun ekstraksiyon koşulları yapılan ön denemelerle belirlenmiştir. Ekstraksiyon işleminin ardından örnekler saflaştırma amacıyla diyaliz edilmiştir.

Üç farklı sıcaklık ve sürede uygulanan ultrason işleminin kolajen ve GAG yapısı ile verim üzerine etkileri incelenmiştir. Kolajen veriminin artan ultrason süresiyle beraber arttığı, GAG örnekleri içinse ultrason uygulamasının verim üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür. Kolajen yapısının, ultrason uygulamasıyla birlikte bozulmadığı, tüm kolajen örneklerinin üçlü sarmal yapıya sahip olduğu yapılan analizlerle doğrulanmıştır. Benzer şekilde ultrason uygulamasının GAG yapısı üzerine de olumsuz bir etkisi gözlenmemiştir.

İZMİR

08/08/2019

Özge ATA

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET | VII |
| ABSTRACT..... | IX |
| ÖNSÖZ | XI |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | XV |
| TABLolar DİZİNİ..... | XIX |
| TABLolar DİZİNİ (DEVAM)..... | XX |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | XXI |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Kolajen Yapısı ve Kolajen Tipleri | 3 |
| 2.2. Kolajenin Uygulama Alanları | 7 |
| 2.3. Kolajen Kaynakları | 8 |
| 2.4. Ekstraksiyon Yöntemleri..... | 9 |
| 2.4.1. Tuzla Çöktürme | 9 |
| 2.4.2. Asitle Hidroliz | 11 |
| 2.4.3. Enzimatik Hidroliz | 13 |
| 2.5. Ultrason Destekli Ekstraksiyon..... | 15 |
| 2.5.1. Ultrason Destekli Kolajen Ekstraksiyonu | 17 |
| 2.6. Glukozaminoglikanların Yapısı | 19 |
| 2.7. GAG Kaynakları | 21 |
| 2.8. GAG Ekstraksiyonuyla İlgili Yapılan Çalışmalar | 22 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 24 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 3.1 Gereç | 24 |
| 3.2. Yöntem | 24 |
| 3.2.1. Kolajen Ekstraksiyonu | 24 |
| 3.2.2. GAG Ekstraksiyonu | 29 |
| 3.2.3. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon) | 30 |
| 3.2.4. Analiz Yöntemleri | 32 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA | 38 |
| 4.1 Kuzu Ayaklarına Ait Analiz Sonuçları | 38 |
| 4.2. Kolajen Analizi Sonuçları | 39 |
| 4.3. Elektroforez | 41 |
| 4.4. Kolajen Örneklerinin FTIR Spektrumları | 43 |
| 4.5. Kolajen Örneklerinin SEM Analizi | 47 |
| 4.6. Kolajen Örneklerinin Renk Değerleri | 52 |
| 4.7. Kondroitin Sülfat Analiz Sonuçları | 54 |
| 4.8. GAG Örneklerinin FTIR Spektrumları | 56 |
| 4.9. GAG Örneklerinin SEM Analizi | 59 |
| 4.10. GAG Örneklerinin Renk Değerleri | 64 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER | 67 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ | 71 |
| TEŞEKKÜR | 90 |
| ÖZGEÇMİŞ | 91 |
| EKLER DİZİNİ | |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil | Sayfa |
|--|-------|
| Şekil 2.1. Kolajen heliks yapısı..... | 4 |
| Şekil 2.2. Kolajendeki amino asit dizisi- birincil yapı..... | 5 |
| Şekil 2.3. Glukozaminoglikanların sınıflandırılması..... | 19 |
| Şekil 2.4. Kondroitin 4- Sülfat ve Kondroitin 6- Sülfat Yapısı..... | 21 |
| Şekil 3.1. Kuzu ayaklarının Tris-HCl ile parçalama işlemi sonrasında elde edilen alt faz..... | 25 |
| Şekil 3.2. Kuzu ayağına uygulanan ön işlemlerin akış şeması..... | 26 |
| Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan ultrasonik banyo..... | 27 |
| Şekil 3.4. Kuzu ayaklarından kolajen üretimi akış şeması..... | 28 |
| Şekil 3.5. Etanol ile çöktürme sonrası santrifüj ile ayrılan alt faz..... | 30 |
| Şekil 3.6. Kuzu ayaklarından GAG üretimi akış şeması..... | 31 |
| Şekil 4.1. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ultrason süresinin kolajen konsantrasyonuna etkisi..... | 39 |
| Şekil 4.2. Farklı ekstraksiyon koşullarında elde edilen kolajen örneklerinin SDS-PAGE bantları | 42 |
| Şekil 4.3. 20°C’de farklı ultrason sürelerinde elde edilen kolajenlerin FTIR spektrumları..... | 45 |
| Şekil 4.4. 25°C’de farklı ultrason sürelerinde elde edilen kolajenlerin FTIR spektrumları..... | 45 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

| Şekil | Sayfa |
|--|--------------|
| Şekil 4.5. 30°C’de farklı ultrason sürelerinde elde edilen kolajenlerin FTIR spektrumları..... | 46 |
| Şekil 4.6. 20°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... | 47 |
| Şekil 4.7. 25°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... | 48 |
| Şekil 4.8. 30°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... | 48 |
| Şekil 4.9. 20°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü | 49 |
| Şekil 4.10. 25°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... | 49 |
| Şekil 4.11. 30°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... | 50 |
| Şekil 4.12. 20°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü | 50 |
| Şekil 4.13. 25°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü | 51 |
| Şekil 4.14. 30°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... | 51 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

| Şekil | Sayfa |
|---|-------|
| Şekil 4.15. 25°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen liyofilize kolajen örneği..... | 53 |
| Şekil 4.16. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ultrason süresinin kondroitin sülfat konsantrasyonuna etkisi..... | 54 |
| Şekil 4.17. 60°C'de farklı ultrason sürelerinde elde edilen GAG örneklerinin FTIR spektrumları..... | 58 |
| Şekil 4.18. 65°C'de farklı ultrason sürelerinde elde edilen GAG örneklerinin FTIR spektrumları..... | 58 |
| Şekil 4.19. 70°C'de farklı ultrason sürelerinde elde edilen GAG örneklerinin FTIR spektrumları..... | 59 |
| Şekil 4.20. Saf kondroitin 4- sülfat standardının FTIR spektrumu..... | 59 |
| Şekil 4.21. 60°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... | 60 |
| Şekil 4.22. 60°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... | 60 |
| Şekil 4.23. 60°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... | 61 |
| Şekil 4.24. 65°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü | 61 |
| Şekil 4.25. 65°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... | 62 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

| Şekil | Sayfa |
|--|--------------|
| Şekil 4.26. 65°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü | 62 |
| Şekil 4.27. 70°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü | 63 |
| Şekil 4.28. 70°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... | 63 |
| Şekil 4.29. 70°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü..... | 64 |
| Şekil 4.30. 60°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen liyofilize GAG örneği | 65 |

TABLolar DİZİNİ

| Tablo | Sayfa |
|--|--------------|
| Tablo 2.1. Ekstrasellüler matriks bileşenleri..... | 3 |
| Tablo 2.2. Farklı yapıdaki kolajen tipleri ve dağılımları..... | 6 |
| Tablo 2.3. Kolajenin uygulama alanları..... | 8 |
| Tablo 2.4. Kolajen ekstraksiyonunda kullanılan hammaddeler..... | 9 |
| Tablo 2.5. Enzim destekli kolajen ekstraksiyonu ile ilgili çalışmalar..... | 14 |
| Tablo 2.6. Gıda işlemede ultrason uygulamaları..... | 17 |
| Tablo 2.7. GAG'ların temel disakkarit birimleri ve ilgili proteoglikanları..... | 20 |
| Tablo 3.1. Kromatografik Koşullar..... | 36 |
| Tablo 4.1. Kuzu ayağının bileşimi (yaş temel)..... | 38 |
| Tablo 4.2. Farklı ekstraksiyon koşulları altında üretilen örneklerin kolajen konsantrasyonları..... | 40 |
| Tablo 4.3. Kolajen ekstraksiyon verimleri (Kuru temel)..... | 41 |
| Tablo 4.4. Kuzu ayağı kolajenine ait FTIR spektrumunda yer alan bantlar ve atamaları..... | 46 |
| Tablo 4.5. Farklı ekstraksiyon koşulları altında üretilen kolajen örneklerinin renk değerleri..... | 53 |
| Tablo 4.6. Farklı ekstraksiyon koşulları altında üretilen örneklerin kondroitin sülfat konsantrasyonları..... | 55 |

TABLolar DİZİNİ (DEVAM)**Tablo****Sayfa****Tablo 4.7.** Kondroitin sülfat ekstraksiyon verimleri (Kuru temel).....56**Tablo 4.8.** Tüm GAG örnekleri ve kondroitin 4-sülfat standardına ait FTIR spektrumundaki karakteristik bantlar ve dalga sayısı aralıkları.....57**Tablo 4.9.** Farklı ekstraksiyon koşulları altında üretilen GAG örnekleri ve kondroitin 4-sülfat standardına ait renk değerleri.....65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

k_a

Açıklama

Asitlik sabiti

MW

Moleküler ağırlık (g/mol)

MWCO

Moleküler ağırlık eşiği (kDa)

T_d

Denatürasyon sıcaklığı (°C)

T_m

Erime sıcaklığı (°C)

Kısaltmalar

Açıklama

ESM

Ekstrasellüler matriks

GAG

Glukozaminoglikan

DSC

Fark taramalı kalorimetre
(Differential Scanning Calorimeter)

FACIT

Kesintili üçlü sarmal fibril ilişkili

BSE

Deli dana hastalığı

FMD

Ayak-ağız hastalığı

ASC

Asitte çözünür kolajen

AFM

Atomik kuvvet mikroskobu

CD

Dairesel dikroizm

FTIR

Fourier dönüşümü kızılötesi

1.GİRİŞ

Ekstrasellüler matriks (ESM), hücreler arası boşlukları dolduran ve hücreleri birbirine bağlayan, çoğu protein, hormon, proteoglikan ve büyüme faktörlerini içeren, hücrelerin özel fonksiyonları gerçekleştirilmesi için hücre içi sinyalleme yolları ile etkileşimlerini sağlayan, kompleks ve dinamik bir yapıdır (Uslu ve Eltas, 2015). Sıklıkla bağ doku olarak adlandırılan ESM, kıkırdak ve kemikte fazla miktarda bulunur. Kolajen ve glukozaminoglikanlar ESM'nin önemli bir kısmını oluşturan iki temel ekstrasellüler bileşendir.

Kolajen, deri, kemik, kıkırdak ve tendon gibi farklı bağ dokularında bulunan ve memelilerde toplam proteinin yaklaşık %30'unu oluşturan lifli bir proteindir. Bağ dokuda son derece önemli yapısal bir protein olan kolajen molekülü, genellikle ağsı veya lifsi yapıdadır (Yang and Shu, 2014). ESM'nin önemli bir kısmını oluşturan kolajen biyolojik yapılardaki bağ rolü nedeniyle birçok canlı organizmada en çok bulunan moleküllerden biridir. Kolajen moleküllerinin ana görevi omurgalılara yapısal ve mekaniksel özellikler sağlamaktır (Ferraro et al., 2017).

Geniş hammadde kaynaklarına sahip olması, yenilenebilir, parçalanabilir, biyouyumlu ve yapısının ayarlanabilir olması kolajen proteinin sahip olduğu avantajlardandır. Bu nedenle, sağlık ürünlerinde, gıdalarda, kozmetikte, tıbbi malzemelerde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Yang and Shu, 2014). Bununla birlikte kolajenin, eklem ağrılarını azaltma, kas kütlesini koruma ve arttırma, sindirimi iyileştirme, cilt ve doku esnekliğini arttırma gibi sağlığa yararlı birçok fonksiyonu vardır (Song and Li, 2017).

Kolajen ekstraksiyonu için en sık kullanılan hammaddeler, deri veya postlar, kemikler, tendonlar ve kıkırdaklardır (Gómez-Guillén et al., 2011). Ticari kolajenlerin birçoğu, özellikle sığır ve domuz gibi memeli hayvanların yan ürünlerinden elde edilmektedir (Arumugam et al., 2018). Bununla beraber, balık yan ürünleri ve kümes hayvanı kesim atıkları da kolajen eldesi için hammadde olarak kullanılmaktadır.

Molar kütlenin, yapının, bileşimin dağılımı ve kolajenin fonksiyonel özellikleri, elde edildiği hammaddenin işlem koşullarına ve ekstraksiyon sürecinde kullanılan enzimin özgünlüğüne bağlıdır. Bu nedenle, yüksek verim ve en iyi kolajen özelliklerini elde etmek için her hammaddeye uygun ekstraksiyon sürecinin belirlenmesi gereklidir. En çok kullanılan ekstraksiyon yöntemleri kolajenin nötr tuzlu çözeltiler, asit çözeltileri ve enzimlerin eklendiği asit çözeltilerindeki çözünürlüğüne dayanmaktadır (Schmidt et al., 2016). Son yıllarda yapılan çalışmalar, ultrason kullanımının ekstraksiyon verimini artırmada etkili olduğunu göstermektedir (Ali et al., 2018; Ran and Wang, 2014; Kim et al., 2013; Li et al., 2009).

Glukozaminoglikanlar, mukus salgıları, bağ dokusu, deri, tendon, bağ ve kıkırdaklardaki negatif yüklü karbonhidrat zincirlerinin geniş kompleksleridir (Anderson et al., 2005). Farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrilerinde geniş bir uygulama alanına sahip olan GAG, kıkırdak dokusunda su tutma özelliği ve elektrolit kontrolü dahil olmak üzere önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptir (Nakano et al., 2001).

Glukozaminoglikanlar, genellikle papain veya pronaz gibi hücre dışı (eksojen) bir enzim aracılığıyla ekstrakte edilir. Papain veya pronaz ile proteoliz, birkaç amino asitten oluşan küçük bir peptidin kovalent olarak bağlandığı tek bir GAG zincirini vermektedir (Nakano et al., 2010). Bununla beraber, son derece negatif yüklü zincirlere sahip olan glukozaminoglikanlar pozitif yüklü kimyasallarla da çöktürülebilmektedir (Raghuraman, 2013). Ultrason kullanımının ise GAG yapısı ve ekstraksiyon verimi üzerine etkisiyle ilgili çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, kuzu ayaklarından sağlığa yararlı etkileri bilinen kolajen ve glukozaminoglikanların ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle eldesi ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Hücre dışı matriks olarak da bilinen ESM molekülleri temel olarak su, polisakkaritler ve proteinlerden oluşmasına rağmen, doku gelişimi sırasında meydana gelen farklı hücresel bileşenler arasındaki dinamik etkileşimler sonucu özel bir kompozisyona sahip olmaktadır (Frantz et al., 2010). Özellikle kemik ve kıkırdakta fazla miktarda bulunan ESM bileşenleri, glukozaminoglikanlar ve fibröz proteinler olmak üzere 2 sınıfta incelenmektedir. Tablo 2.1’de ESM bileşenleri görülmektedir.

Tablo 2.1. Ekstrasellüler Matriks Bileşenleri

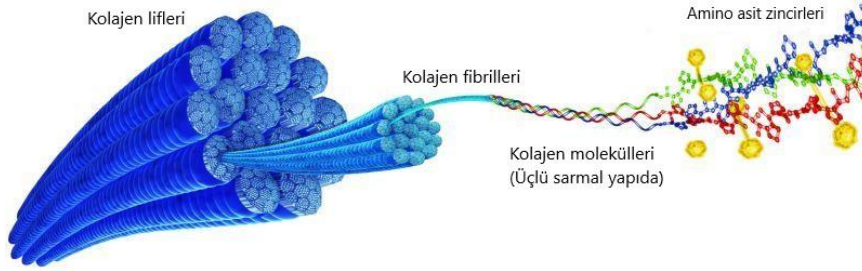
| Glukozaminoglikanlar | Fibröz Proteinler |
|--|--|
| Sülfatlanmış GAG: a) kondroitin sülfat b) dermatan sülfat c) keratan sülfat d) heparin e) heparan sülfat Sülfatlanmamış GAG: a) hyalüronik asit | Yapısal Proteinler: a) kolajen b) elastin Yapıştırıcı Proteinler: a) fibronectin b) laminin c) tenaskin d) vitronektin e) integrin |

2.1. Kolajen Yapısı ve Kolajen Tipleri

Hayvanlarda bulunan farklı bağ dokuların temel yapısal proteini olan kolajen, genellikle tendonlar ve ligamentler gibi lifli dokularda bol miktarda bulunmaktadır (Sibilla et al., 2015). Bağ doku proteini olarak da bilinen kolajen, çoğunlukla ağsı veya lifsi yapıdadır (Yang and Shu, 2014). ESM’nin önemli bir kısmını oluşturan kolajen moleküllerinin temel görevi omurgalılara yapısal ve mekaniksel özellikler sağlamaktır (Ferraro et al., 2017).

Kolajen molekülleri, sarmal yapıda üç polipeptit zincirinden oluşmaktadır. Polipeptit alt birimler olan α -zincirler, kolajen molekülünün üçlü sarmal (heliks)

yapısını oluşturmaktadır. İki α zinciri, β -peptit zinciri olarak bilinen bir peptit zincir dimerine dönüşürken, üç α zinciri, γ -peptit zinciri (tropokolajen molekülü) olarak bilinen peptit zincir trimerine dönüşür (Yang and Shu, 2014).



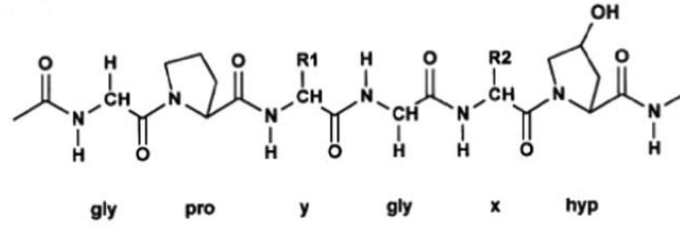
Şekil 2.1. Kolajen heliks yapısı (Brodsky and Persikov, 2005)

Her bir peptit zinciri yaklaşık 100 kDa'lık molar kütle ile ortalama 300 nm uzunluğa sahiptir. Bununla birlikte, karakteristik üçlü bir sarmalda birbiri etrafına sarılmış tam 1050 amino asit kalıntısı içerir (Lodish et al., 2000).

Kolajen, özel bir amino asit bileşimine sahip olmasıyla diğer proteinlerden ayrılmaktadır. Yapısında on dokuz farklı amino asit bulunduran kolajen, zorunlu amino asitlerden histidin, izölösün, lösün, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin, tirozin ve valini içermektedir (Li and Wu, 2018).

Kolajenin sarmal yapısı başlıca alanin, fenilalanin, asparajin, glutamin, histidin, lösün, metiyonin ve tirozinden oluşmaktadır. Yan zincirlerin büyük boyutundan dolayı valin ve izölösün α -sarmalının kararlı yapısına katılmaz. Sarmalın düzenli yapısı serin, treonin, prolin ve hidroksiprolin tarafından bozulur (Włodarczyk et al., 2017).

Genel olarak, kolajendeki amino asit dizisi tekrarlayan tripeptit birimidir (Gly-X-Y). Gly, glisin, X sıklıkla prolin, Y ise hidroksiprolindir. Şekil 2.2'de kolajene ait amino asit dizisi görülmektedir.



Şekil 2.2. Kolajendeki amino asit dizisi- birincil yapı (Friess, 1998)

Prolin ve hidroksprolin, kolajene sertlik kazandırır. Kolajenin amino asit karakteristiği olan hidroksprolin, kolajenin termal stabilitesini belirler (Liu and Huang, 2016). Hidroksprolinin, hayvanların çoklu dokularında glisin sentezi, bağ doku yapısının onarımı, hücrel redoks reaksiyonlarının düzenlenmesi gibi birçok fonksiyonu vardır (Li and Wu, 2018). Kolajendeki toplam amino asitlerin %10'nunu oluşturan hidroksprolin, kolajenin kantitatif tayininde kullanılmaktadır (Bhagwat and Dandge, 2018).

Kolajen molekülünün ayırt edici özelliklerinden biri de, üçlü sarmal yapının her üç konumunda da glisin kalıntılarının sıklığıdır. Glisin, üçlü sarmalın merkez çekirdeğindeki kısıtlı alana sığacak kadar küçük olan tek amino asittir (Stuart et al., 2008). Glisin, prolin ve hidroksprolin kolajendeki toplam amino asitlerin %57'sini oluşturmaktadır (Li and Wu, 2018). Kolajenin bu üç amino asidi yüksek düzeylerde içermesi, vücuttaki kolajen sentezi ve onarımı açısından önemlidir.

İnsanlarda bulunan ve literatürde rapor edilen en az yirmi farklı kolajen tipi bildirilmiştir (Bhagwat et al., 2018; Ehrlich et al., 2018; Avila-Rodríguez et al., 2018; Ferraro et al., 2017; Ricard-Blum, 2011; Shoulders et al., 2009). Bununla beraber, vücuttaki kolajenlerin %80-90'ı tip I, tip II ve tip III grubuna aittir. Diğer kolajen tipleri çok düşük miktarlarda, özellikle bağırsak mukozası, akciğer, kalp kası ve bazal membran gibi spesifik organlarda bulunur (Schmidt et al., 2016). Başlıca kolajen tipleri aşağıda özetlenmiştir.

- İki eşdeğer $\alpha 1$ ve bir $\alpha 2$ zincirinden oluşan Tip I kolajen $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$ insan vücudunda en fazla bulunan ve en dayanıklı kolajen tipidir. Başlıca

deride, ligamentlerde, tendonlarda, kemikte ve bağ dokusunda bulunur (Krishnamoorthi et al., 2017).

- Üç $\alpha 1(\text{II})$ zincirinden oluşan Tip II kolajen $[\alpha 1(\text{II})]_3$ kıkırdak dokusunun esas kolajenidir. Kıkırdaktaki toplam protein içeriğinin % 90-95'ini oluşturur (Jeevithan et al., 2015). Etki mekanizması itibariyle, osteoartrit/romatoid artrit gibi eklem hastalıklarının tedavisinde kullanılır.
- Üç $\alpha 1(\text{III})$ zincirinden oluşan Tip III kolajen $[\alpha 1(\text{III})]_3$ ağ yapılı liflere sahiptir. Genellikle Tip I kolajenle birlikte bulunur. Cildin elastikiyetini ve sıkılığını sağlar. Kan damarında, yaralarda ve belirli tümörlerde bulunur (Liu et al., 2001).

Kolajen yapısı ve üç boyutlu organizasyonu temel alınarak yapılan sınıflandırmada kolajenler; fibril oluşturan kolajenler, ağ oluşturuvcu kolajenler, kesintili üçlü sarmallı fibril ilişkili kolajenler (FACIT), ankraj fibrilleri, transmembran, bazal membran, mikrofibriler kolajen ve multipleksin olarak gruplandırılmaktadır. Tablo 2.2'de farklı kolajen yapılarına ait kolajen tipleri ve dokudaki dağılımları görülmektedir.

Tablo 2.2. Farklı yapıdaki kolajen tipleri ve dağılımları (Gelse et al., 2003)

| Familiya | Kolajen Tipi ve Hücre Dağılımı |
|-----------------------------|---|
| Fibril oluşturan kolajenler | Tip I : tendon, ligamentler, kemik, dermis Tip II : kıkırdak, camsı cisim Tip III : deri, retiküler lif Tip V: akciğer, plasenta, kornea Tip XI: camsı cisim, eklem kıkırdağı |
| Ağ oluşturuvcu kolajenler | Tip VIII: endotel hücreleri Tip X: hipertrofik kıkırdak |
| FACIT kolajenler | Tip IX: kıkırdak, kornea, camsı cisim Tip XII: perikondrium, ligamentler, tendon Tip XIV: dermis, tendon, plasenta, akciğer Tip XIX: rabdomiyosarkom hücresi Tip XX: embriyonik deri, sternal kıkırdak, tendon) Tip XXI: kan damarı duvarı |

| | |
|--------------------------|--|
| Ankraj fibrilleri | Tip VII: oral mukoza, deri |
| Transmembran kolajenler | Tip XIII: epidermis, saç folikülü, endomisyum) Tip XVII: dermal - epidermal eklemler |
| Bazal membran kolajenler | Tip IV: bazal membran |
| Mikrofibriler kolajen | Tip VI: deri, kıkırdak, plasenta, omurlar arası disk |
| Multipleksin | Tip XV: fibroblastlar, düz kas hücreleri, böbrek Tip XVI: fibroblastlar, amniyon, keratinositler Tip XVIII: karaciğer, akciğer |

2.2. Kolajenin Uygulama Alanları

Kolajen, suda çözünmeyen ve genellikle lifli yapıda bir proteindir. Kolajenin lifimsi ve α -heliks yapısı, kolajene yüksek gerilme ve direnç özelliği sağlar (Yoruç ve Uğraşkan, 2017). Kolajenin homojenlik, esneklik, gerilme direnci, biyo-uyumluluk ve biyo-bozunabilirlik gibi benzersiz fiziksel özelliklere sahip olması, farklı uygulama alanlarında kullanımına olanak sağlar. Kolajen molekülleri, doku mühendisliğinde iskele olarak, cerrahi uygulamalarda implantasyon veya yara pansuman malzemesi yapımında, farmasötik uygulamalarda kapsül matris malzemesi veya bağlayıcı olarak kullanılmaktadır (Oechsle et al., 2016). Ayrıca, iyi bir nemlendirici özelliğe sahip olan kolajen, kozmetik ürünlerinin üretiminde de tercih edilmektedir (Nagai et al., 2015). Kolajenden elde edilen biyopolimerik lifler ilaç taşıyıcı (drug delivery) sistemleri, enzim immobilizasyonu ve ileri biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Dhakal et al., 2018).

Gıda endüstrisinde ise kolajen, köpürme ajanı, emülgatör, stabilizatör, mikroenkapsülasyon ajanı ve biyo- bozunur film oluşturucu malzemeler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Gómez-Guillén et al., 2011). Bununla beraber, doğal bağırsak kaynaklı sosis kılıflarının maliyetlerindeki hızlı artış nedeniyle, kolajen, gıda endüstrisindeki çeşitli uygulamalarda biyopolimer esaslı doğal kaplamalar olarak baskın hale gelmiştir (Dhakal et al., 2018). Kolajen filmler veya kaplamalar, ürünlerin raf ömrünü uzatmaya yardımcı olur ve aynı zamanda aktif

maddelerin taşıyıcıları olarak işlev görür (Bhagwat and Dandge, 2018). Tablo 2.3’de kolajenin farklı uygulama alanları gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Kolajenin uygulama alanları

| Gıda alanındaki uygulamalar | Medikal alandaki uygulamalar |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ➤ fonksiyonel gıdalar (Lordan et al., 2011) ➤ içecekler (Bilek and Bayram, 2015) ➤ diyet takviyeleri (Clark et al., 2008) ➤ şekerleme (Cai et al., 2017) ➤ tatlılar (Li et al., 2015) ➤ katkı maddesi (Baziwane and He, 2003) | <ul style="list-style-type: none"> ➤ membranlar (Nakahara et al., 2017) ➤ tüpler (Fujimaki et al., 2017) ➤ kompozitler (Fu et al., 2017) ➤ enjekte edilebilir solüsyonlar (Moreira et al., 2016) ➤ dispersiyonlar (Mottahedi and Han, 2016) |

2.3. Kolajen Kaynakları

Kolajen ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılan hammaddeler, deri veya postlar, kemikler, tendonlar ve kıkırdaklardır (Gómez-Guillén et al., 2011). Ticari kolajenlerin birçoğu, özellikle domuz ve sığır gibi memeli hayvanların yan ürünlerinden elde edilir (Arumugam et al., 2018). Ancak, sığırlarda görülen deli dana hastalığı (BSE), ayak-ağız hastalığı (FMD) ve inanca dayalı kısıtlamalar gibi problemler, araştırmacıları, kolajen için farklı hammaddeler arayışına yönlendirmiştir (Liang et al., 2014; Ninan et al., 2014; Jeevithan et al., 2015; Mohammadi et al., 2016; Sun et al., 2017).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, balık yan ürünleri kolajen eldesi için alternatif ve güvenli bir kaynak olarak görülmektedir. Özellikle deri, pul ve yüzgeç gibi kolajence zengin olan yan ürünlere ilgi artmaktadır (Dun vd., 2008).

Kümes hayvanı kesim atıkları da kolajen ekstraksiyonu için hammadde olarak kullanılmaktadır. Tablo 2.4’de kolajen ekstraksiyonu için kullanılan hammaddeler görülmektedir.

Tablo 2.4. Kolajen ekstraksiyonunda kullanılan hammaddeler

| Memeliler | Kümes hayvanları | Bahk |
|--|---|--|
| sığır derisi (De Moraes and Cunha, 2013) | tavuk ayağı (Hashim et al., 2014; Zhou et al., 2016; Dhakal et al., 2018) | deri (Sadowska et al., 2003; Tamilmozhi et al., 2013; Liu et al.,2015; Ali et al., 2018) |
| sığır kemiği (Ferraro et al., 2017) | tavuk kemiği (Dong et al., 2014) | hava kesesi (Kaewdang et al., 2014) |
| sığır tendonu (Ran and Wang, 2014) | tavuk derisi (Lin et al., 2013; Oechsle et al., 2016) | pul (Chuaychan et al., 2015; Mahboob, 2015; Chen et al.,2016) |
| domuz testisi (Simões et al., 2014) | | kılçık (Kittiphattanabawon et al., 2005; Liu and Huang, 2016) |
| domuz derisi (Yang and Shu, 2014) | | kıkırdak (Jeevithan et al., 2015) |
| koyun kemikleri (Gao et al., 2017) | | |

Kolajen ekstraksiyonunda kullanılan hammaddelerin genelde deri, kemik, ayak ve pul gibi insan tüketimi amacıyla kullanılmayan hayvansal yan ürünlerden oluştuğu gözlenmiştir. Bu yan ürünlerin kullanılarak katma değeri yüksek olan kolajen üretilmesi, hayvansal atıkların da verimli bir şekilde değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.

2.4. Ekstraksiyon Yöntemleri

Kolajen özellikleri hammaddeye ve ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak değişir. En sık kullanılan ekstraksiyon yöntemleri kolajenin nötr tuzlu çözeltiler, asit çözeltileri ve enzimlerin eklendiği asit çözeltilerindeki çözünürlüğüne dayanır (Schmidt et al., 2016).

2.4.1. Tuzla Çöktürme

Genel olarak tuz ile çöktürme yöntemi, ekstraksiyon ve çöktürme olarak iki aşamadan meydana gelir. Tuzun konsantrasyonunu kontrol etmek, bu

yöntemdeki kilit noktadır. Bir protein çözeltisine düşük tuz konsantrasyonlarında nötral tuz ilave edildiğinde, tuz molekülleri proteinlerin çözünürlüğünü arttıran moleküller arasındaki elektrostatik enerjiyi azaltarak protein moleküllerinin çözünürlüğünü artırır (tuzla çözündürme=salting in). Yüksek tuz konsantrasyonlarında nötral tuz ilave edildiğinde ise, hidrofobik gruplar etrafındaki su molekülleri tuz molekülleri tarafından uzaklaştırılır; bu durumda hidrofobik etki artar, çözünürlük azalır ve proteinler çöker (tuzla çöktürme=salting out). Tuzla çöktürme yönteminde, öncelikle çözünürlük artırılarak proteinler ekstrakte edilir, sonrasında ise çözünürlük azaltılarak proteinlerin çökmesi sağlanır (Duong-Ly and Gabelli, 2014). Çöktürme işleminde genellikle, NaCl (sodyum klorür), Tris-HCl (Tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorür), fosfat veya sitrat çözeltisi gibi nötr tuz çözeltileri kullanılır (Yang and Shu, 2014).

Tuzla çöktürme işleminden sonra tuzun uzaklaştırılması amacıyla diyaliz işlemi gerçekleştirilir (Duong-Ly and Gabelli, 2014). Diyaliz, yarı geçirgen bir membran yardımıyla proteinleri tuz gibi diğer küçük moleküllerden ayıran bir protein saflaştırma işlemidir. Gözenek çapından daha büyük boyutlara sahip protein molekülleri diyaliz torbası içinde tutulurken, küçük moleküller ve tuz tampon çözeltisine difüzyonla geçer. Uygulama kolaylığı ve düşük maliyetli olması nedeniyle protein saflaştırmada, diyaliz işlemi sıklıkla tercih edilmektedir (Rigaud and Levy, 2003).

Kolajen ekstraksiyonunda tuzla çöktürme yönteminin prensibi esas olarak çözünür kolajeni dokulardan ekstrakte etmektir. Zhou ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan çalışmada, tavuk ayaklarından tuzda (sodyum klorür), asitte (asetik asit) ve enzimde (pepsin) çözünür kolajen ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Tavuk ayakları, tuzla ekstraksiyon işleminde (0.05 M Tris-HCl içinde 0.45 M NaCl, pH 7.5) tuz çözeltisi içinde; asitle ekstraksiyon işleminde 0.5 M asetik asit çözeltisinde; enzimle ekstraksiyon işleminde % 0.1 (w/v) pepsin içeren 0.5 M asetik asit çözeltisinde 48 saat bekletilmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilen her bir kolajen çözeltisi, bir gece boyunca 2.4 M NaCl çözeltisi ile çöktürülmüş ve ardından tuzun uzaklaştırılması amacıyla diyaliz edilmiştir. Tuzda, asitte ve enzimde çözünür kolajen verimlerinin

sırasıyla %1.13, % 14.49 ve % 49.10 (kuru ağırlık bazında) sahip olduğu gözlenmiştir.

Hayvan dokularında, protein moleküllerinin birbirine çapraz bağlı olmasından dolayı çözünür kolajen miktarının az olması, genellikle düşük kolajen verimi ve saflığına yol açmaktadır (Liu et al., 2015a). Bu yüzden tuzla ekstraksiyon yönteminin kullanımı diğer yöntemlere göre sınırlıdır.

2.4.2. Asitle Hidroliz

Asit hidrolizi, asetik asit, sitrik asit ve laktik asit gibi organik asitler ve hidroklorik asit gibi inorganik asitler kullanılarak gerçekleştirilir. Organik asitler çapraz bağlanmamış kolajenleri çözme yeteneğine sahiptir. Aynı zamanda kolajen içindeki zincirler arası çapraz bağların bir kısmını kırarak ekstraksiyon sırasında kolajenin daha fazla çözünmesini sağlar (Liu et al., 2015b). Asetik asit, kolajen ekstraksiyonu için en yaygın kullanılan organik çözügendir.

Wang ve arkadaşları (2008), farklı asetik asit konsantrasyonlarının (0.3, 0.5 ve 0.8 M), sıcaklığın (10, 20 ve 30 °C) ve ekstraksiyon sürelerinin (12, 24 ve 36 saat) ekstraksiyon verimine olan etkisini değerlendirerek ot sazani (*Ctenopharyngodon idella*) derisinden asitte çözünür kolajen (ASC) ekstraksiyon koşullarını optimize etmişlerdir. Test edilen üç değişkenin de kolajen ekstraksiyonunu belirgin şekilde etkilediği gözlenmiştir. Sıcaklığın ve asetik asit konsantrasyonunun artmasıyla verim belirli bir değere kadar artış göstermiş, daha sonra ise azalmıştır. Ot sazani derisinden en yüksek verimle asitte çözünür kolajeni (ASC) elde etmek için optimum koşullar; asetik asit konsantrasyonu 0.54 M, sıcaklık 24.7°C ve süre 32.1 saat olarak belirlenmiştir.

Liu ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan çalışmada, tavuk ayaklarından kolajen ekstraksiyonu için farklı asitlerin etkisi değerlendirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi %5 oranında 4 farklı asit (asetik asit, sitrik asit, hidroklorik asit ve laktik asit) kullanılarak tavuk ayağı/çözelti oranı 1:8 (w/v) olacak şekilde farklı sürelerde (12, 24, 36 ve 48 saat) gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, (%) kolajen verimi, (%) kolajen, saf kolajen (g /100g) ve (%) kolajen kaybı miktarları

kıyaslandığında optimum koşul 36 saat laktik asit uygulaması olarak belirlenmiştir.

Arumugam ve arkadaşlarının (2018) balık derisi ile yaptıkları optimizasyon çalışmasında, asetik asit konsantrasyonu (0.2-1 M), çözen/katı oranı (8-16 ml/g), ekstraksiyon süresi (12-60 saat) ve tuz konsantrasyonu (0.5-2.5 M) değişkenlerinin kolajen verimine etkisi incelenmiştir. Varyans analizi ve kontur grafikleri, seçilen tüm değişkenlerin kolajen ekstraksiyonu üzerinde anlamlı bir etkisi olduğunu göstermiştir. Asetik asit konsantrasyonu arttıkça, kolajen veriminin kademeli olarak arttığı, ancak 0.6 M üzerindeki konsantrasyonlarda, kolajen denatürasyonunun başladığı gözlenmiştir. Yaklaşık 2 M tuz konsantrasyonunda en yüksek kolajen verimine ulaşılmıştır. 2 M üzerindeki konsantrasyonlarda ise kolajen veriminin azaldığı görülmüştür. En yüksek kolajen verimi, 36 saat sonra gözlenmiştir; bu süreden sonra asetik asitin kolajen denatürasyonuna sebep olması nedeniyle verimde kademeli bir düşüş gözlenmiştir. 0.54 M asetik asit, 8.97 çözen/katı oranı, 32 saat ve 1.9 M NaCl konsantrasyonlarında maksimum verime (19.27 mg kolajen /g balık derisi) ulaşılmıştır.

Skierka ve Sadowska (2007) tarafından morina balığı derisi ile yapılan bir diğer çalışmada, farklı asitlerin (asetik asit, laktik asit, hidroklorik asit ve sitrik asit) kolajen verimine etkisi incelenmiştir. Ekstraksiyon işlemi 1:16 (w/v) katı:sıvı oranında farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) 4°C'de gerçekleştirilmiştir. Hidroklorik asit, sitrik, laktik ve asetik asit çözeltilerinin son pH'ları sırasıyla 2.0, 2.2, 2.8, 2.9 olarak belirlenmiştir. Çalışma sonunda, asetik asit ve laktik asitteki kolajen çözünürlüklerinin çok benzer olduğu gözlenmiş ve %90 kolajen verimlerine ulaşılmıştır. Sitrik asitle gerçekleştirilen ekstraksiyonda maksimum %60 kolajen verimine ulaşılırken, hidroklorik asitle 72 saat ekstraksiyon sonrasında bile sadece %18 kolajen verimine ulaşılmıştır.

Güçlü asitlerin (düşük pH ve yüksek ka değeri) kolajen ekstraksiyon hızını arttırdığı bilinmektedir. Ancak, pH değeri (<2.0) olan asitler, ekstraksiyon sırasında kolajen denatürasyonu ve sindirimine yol açmakta ve kolajenin su emilimini azaltmaktadır. (Gómez-Guillén and Montero,2001; Cheng et al., 2009;

Skierka and Sadowska, 2007). Asit ile hidroliz yönteminde konsantrasyon, pH değeri, sıcaklık ve işlem süresi gibi faktörler ekstraksiyon verimini etkilemektedir. Bununla birlikte, enzim destekli asit hidrolizinin kolajen verimini arttırdığı bilinmektedir.

2.4.3. Enzimatik Hidroliz

Enzimatik hidroliz, enzimlerin moleküllerdeki bağların bölünmesini kolaylaştırdığı bir işlemdir. Proteinlerin enzimatik hidrolizi, proteinlerin fiziksel, kimyasal ve fonksiyonel özelliklerini geliştirmek için önemli bir biyoproses olarak görülmektedir (Sarbon et al., 2018). Proteazlar, proteinlerdeki peptid bağlarını hidrolize eder ve bu amaçla gıda endüstrisinde de yaygın olarak kullanılırlar (Temiz, 2014). Pepsin, papain ve tripsin kolajen ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılan proteaz enzimleridir. Yan ürünlerin enzimatik hidrolizi, özellikle hayvan ve balık işleme endüstrilerinde etkili protein geri kazanım yöntemi olarak görülmektedir (Bhaskar et al., 2008).

Hashim ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan çalışmada, tavuk ayaklarından kolajen ekstraksiyonu için papain ve pepsin enzimlerinin ekstraksiyon verimine olan etkisi incelenmiştir. Tavuk ayakları, ekstraksiyon işlemi için % 0.1 (w/v) enzim içeren 0.5 M asetik asit içinde 4 °C'de 24 saat boyunca hidroliz edilmiştir. Papain ve pepsinle ekstrakte edilen kolajen verimleri sırasıyla % 18.16 ve % 22.94 (kuru ağırlık bazında) olarak belirlenmiştir. Cheng ve arkadaşları (2009), kolajenin enzimatik hidrolizinde farklı asitlerin etkisini incelemişlerdir. Bu kapsamda, çalışmada kullanılan tavuk ayakları, ön işlemlerinin tamamlanmasının ardından % 0.1 pepsin + 0.5 M (asetik asit, sitrik asit, laktik asit, hidroklorik asit) ile 4 °C'de 24 saat boyunca hidroliz edilmiştir. Çalışma sonunda en yüksek kolajen içeriği, asetik asit+pepsin uygulamasında görülürken, en düşük kolajen içeriği hidroklorik asit+pepsin uygulamasında görülmüştür. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid jel elektroforez (SDS-Page) sonuçları ise, farklı asitler tarafından ekstrakte edilen kolajenlerin protein dağılımları arasında bir fark olmadığını göstermiştir. Tüm kolajenlerin, kolajenin ana bileşenleri olan $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve β zincirleri içerdiği görülmüştür. Tablo 2.5'de

farklı hammaddelerden enzim destekli kolajen ekstraksiyonu ile ilgili çalışmalar görülmektedir.

Tablo 2.5. Enzim destekli kolajen ekstraksiyonu ile ilgili çalışmalar

| Hammadde | Uygulanan Ön İşlemler | Kullanılan Enzim ve Yöntem | Sonuç | Kaynak |
|-------------------------|--|--|--|----------------------------------|
| Tavuk sternum kıkırdağı | Kloroform-metanol (2:1, v/v) ile yağ uzaklaştırma işlemi ardından 0.05 M Tris-HCl çözeltisinde (pH 7.5) 4°C'de 24 saat bekletme | Pepsin (%1, %0.5, %0.25 oranlarında) farklı sıcaklık (4, 20 ve 37°C) ve sürelerde (16, 32, 48 saat) hidroliz | %0.5 pepsin ile 20°C'de 32 saat ekstraksiyon süresinde en yüksek kolajen verimine ulaşılmıştır | Cao and Xu, 2008 |
| Kalamar derisi | Kolajen olmayan proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla 0.1 M NaOH ile 6 saat karıştırma işlemi ve %10 butil alkol ile 18 saat boyunca yağ uzaklaştırma | %0.1 pepsin (w/w) + 0.5 M asetik asit ile 4°C'de 72 saat hidroliz | Kolajen verimi %75.3 (kuru ağırlık bazında) olarak belirlenmiştir | Kittiphatt anabawon et al., 2015 |
| Tavuk derisi | %20'lik etanol ile yağ uzaklaştırılma işlemi ardından kolajen olmayan proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla 0.2 M NaOH ile 24 saat karıştırma işlemi | %0.1 pepsin (w/v)+1:10 (w/v) oranında 0.5 M organik asit (laktik asit, asetik asit, sitrik asit) ile 4°C'de 24 saat hidroliz | Asetik asit/pepsin kombinasyonunda en yüksek kolajen verimine (%3.68); sitrik asit/pepsin kombinasyonunda ise en düşük kolajen verimine (%1.99) ulaşılmıştır | Lin et al., 2013 |
| Tavuk ayağı | 0.8 M NaCl ile 20 dk bekletme ve kolajen olmayan proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla 0.1 M NaOH ile 24 saat karıştırma işlemi | %1 papain (w/v), farklı sıcaklık (4, 30 ve 56 °C) ve sürelerde (20, 24 ve 28 saat) hidroliz | 30°C'de 28 saat optimum hidroliz koşulu olarak belirlenmiştir | Dhokal et al., 2018 |

Yapılan çalışmalar, enzimatik hidrolizde yaygın olarak kullanılan pepsinin kolajenin üçlü sarmal yapısını bozmadığını göstermektedir. Gao ve arkadaşlarının (2017), koyun kemikleriyle yaptıkları çalışmada, pepsin içeren 0.5 M asetik asitte

4°C'de 3 gün boyunca enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) sonuçları, kolajendeki üçlü sarmal yapının korunduğunu göstermiştir. Tamilmozhi ve arkadaşlarının (2013) yelken balığı derisiyle; Zhou ve arkadaşlarının (2016) tavuk ayağıyla yaptıkları çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş, pepsin hidroliziyle üçlü sarmal yapının bozulmadığı belirtilmiştir.

Enzimatik hidroliz yöntemi diğer yöntemlere göre daha maliyetli olmasına rağmen; yüksek kolajen verimi ve saflığı sunmaktadır. Liang ve arkadaşları (2014), Amur mersin balığı (*Acipenser schrenckii*) kıkırdağından kolajen ekstraksiyonu gerçekleştirerek tuzda (sodyum klorür), asitte (asetik asit) ve enzimde (pepsin) çözünür kolajen verimlerini ve özelliklerini kıyaslamışlardır. Tuzda çözünür kolajen verimi %2.18, asitte çözünür kolajen verimi %27.04 ve enzimde çözünür kolajen verimi %55.92 bulunmuştur. Her bir kolajenin amino asit içeriğinin benzer olduğu görülmüştür. Genel olarak, pepsinde çözünür kolajenin termal kararlılığı (denatürasyon sıcaklığı Td ve erime sıcaklığı Tm), tuzda ve asitte çözünür kolajene göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. SDS-PAGE sonuçları, tuzda ve asitte çözünür kolajenlerin tip I kolajen olduğunu, enzimde çözünür kolajenin ise diğer küçük tiplerle birlikte ağırlıklı olarak tip II kolajen olduğunu göstermiştir.

Enzimatik hidroliz yönteminin, yüksek kolajen verimi sunmasıyla birlikte düşük enerji tüketimi, proses kontrolü kolaylığı, reaksiyon koşullarının hafif olması ve son ürün kalitesini iyileştirmesi gibi avantajlara sahip olması, kolajen ekstraksiyonu için sıklıkla tercih edilen bir yöntem olmasını sağlamaktadır (Ilchenco et al., 2017).

2.5. Ultrason Destekli Ekstraksiyon

Ultras, 20 kHz'in (maksimum insan işitme sınırı) üzerinde bulunan mekanik titreşimlerden meydana gelmiş bir enerji çeşididir. Ultras dalgaları, ultrasonik banyolar ve probalar yardımıyla proseslere uygulanmaktadır. Ultrasonik probalar, transdüserden (dönüştürücü) aldığı enerjiyi sabit bir noktaya odaklarken; ultrasonik banyolarda transdüserler genellikle banyo haznesinin alt kısmına

konumlandırılmıştır (Güngören vd., 2017). Ultrasonik banyolar, problu sistemlere göre daha ucuz ve basit sistemlerdir. Problu sistemler, ultrasonik banyolara kıyasla daha yüksek ultras es yoğunluğu üretebilmektedir. Ancak kullanıma bağlı olarak probun içine daldırıldığı ürünün ısınması sıcaklığa duyarlı maddeler için sorun oluşturmaktadır.

Ses dalgalarındaki birbirine yakın iki tepe arasındaki mesafe dalga boyu (λ); ses dalgalarının yüksekliği genlik; bir saniyede oluşan ses titreşim sayısı frekans olarak ifade edilmektedir (Dinçer ve Topuz, 2018). Ultrason mekanik bir dalga olduğundan, frekans, dalga boyu ve genlik gibi parametreler akustik kavitasyonu ve dolayısıyla ekstraksiyonu etkilemektedir. Akustik kavitasyon, genel olarak, bir ultrason dalgasının sıvı bir ortamda yayılması sırasında meydana gelen kabarcık oluşumunu, büyümesini ve patlamasını ifade eder (Tavman vd., 2009). Bir sıvı ultrasona maruz bırakıldığında; sıvı ortam içinden geçen yüksek yoğunluklu ses dalgaları, kabarcık oluşumuna sebep olmaktadır. Kabarcıkların büyüklüğü kritik bir noktaya ulaştığında, kabarcıklar patlamakta ve patlama sonucunda yüksek bir enerji açığa çıkmaktadır. “ Sıcak nokta (Hot spot) ” teorisine göre, patlama sonucunda yaklaşık 5000 K ve 1000 atm üzerinde basınca ulaşılmaktadır. Patlama esnasında kabarcıkların etrafında meydana gelen şok dalgaları ve mikrojetler, kütle transferini arttırmakta ve bununla birlikte yüzey temizlemede kullanılmaktadır (Tiwari and Mason, 2012; Kim et al., 2013; Chemat et al., 2017).

Ultrasonun, gıda endüstrisindeki farklı işlemler üzerinde önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir. Tablo 2.6’da gıda işlemede bazı ultrason uygulamaları ve avantajları görülmektedir. Gıda güvenliğinin sağlanması, işlem süresinin kısaltılması ve ürün kalitesinin artırılmasında ultrason uygulaması etkili bir yöntem olarak görülmektedir (Majid et al., 2015). Diğer yöntemlere kıyasla güvenli, ucuz, çevre dostu olması ve sürdürülebilir ‘yeşil’ kimyası hedefine ulaşmada önemli bir rol oynaması, ultrason uygulamasının yaygın şekilde kullanılmasını sağlamaktadır (Zou et al., 2017).

Tablo 2.6. Gıda işlemede ultrason uygulamaları (Chemat et al., 2011)

| Uygulama | Avantaj | Ürün |
|----------------|--|------------------------------------|
| Pişirme | ısı transferi ve organoleptik kalitenin iyileştirilmesi, daha kısa işlem süresi | et, sebzeler |
| Dondurma | difüzyonun iyileştirilmesi hızlı sıcaklık düşüşünün sağlanması, daha kısa işlem süresi | et, sebze ve meyveler süt ürünleri |
| Kurutma | ısı transferi ve organoleptik kalitenin iyileştirilmesi, daha kısa işlem süresi | kuru ürün (meyve, sebze vb.) |
| Emülsifikasyon | emülsiyon oluşumu ve kararlılığı, daha kısa işlem süresi | emülsiyonlar (ketçap, mayonez vb.) |
| Kesme | ürün kayıplarının azaltılması, doğru ve tekrarlı kesim, daha kısa işlem süresi | kırılgan ürünler (kek, peynir vb.) |
| Köpük giderme | hijyenin iyileştirilmesi, daha kısa işlem süresi | gazlı içecekler, fermente ürünler |

2.5.1. Ultrason Destekli Kolajen Ekstraksiyonu

Ultrason destekli ekstraksiyon, proteinlerin enzimatik hidrolizinin iyileştirilmesinde etkili bir yöntem olarak görülmektedir (Chen et al., 2011). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kolajen ekstraksiyonunda ultrason kullanımının artış gösterdiği görülmüştür. Kim ve arkadaşları (2013), Japon levreği (*Lateolabrax japonicus*) derisiyle yaptıkları çalışmada, farklı asetik asit konsantrasyonlarında (0.01, 0.05, 0.1 M) 0-24 saat aralığında ultrason destekli (%20, %40, %60, %80 genlik, 20 kHz frekans, 750 W) kolajen ekstraksiyonu (darbeli modda 20/20 saniye) gerçekleştirmişlerdir. Kontrol örneği, ultrason uygulaması olmaksızın aynı koşullar altında 0.5 M asetik asitle ekstrakte edilmiştir. Tüm işlemler 4°C'de gerçekleştirilmiştir. Kolajen veriminin genlik ve ultrason süresinin artışına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. 0.1 M asetik asit konsantrasyonunda, %80 genlikte 24 saatlik ultrason uygulamasıyla en yüksek kolajen verimine (% 90.40) ulaşılmıştır. Kontrol örneğiyle (0.5 M asetik asit) kıyaslandığında kolajen veriminin 4.4 kat daha fazla olduğu görülmüştür.

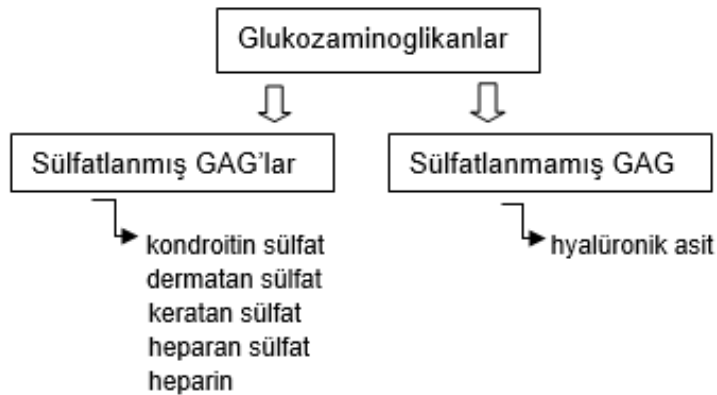
Ali ve arkadaşları (2017), ultrasonun sazan balığı (*Probarbus Jullieni*) derisinden asitte ve pepsinde çözünür kolajen ekstraksiyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Ultrason destekli ekstraksiyon (20 kHz, 750 W), farklı zamanlarda (10, 20 ve 30 dakika; darbeli modda 5/5 saniye) ve farklı genlik seviyelerinde (%20, %50 ve %80) gerçekleştirilmiştir. Asitte çözünür kolajen ekstraksiyonu için, deriler 1:15 (w/v) oranında 0.5 M asetik asitle; pepsinde çözünür kolajen ekstraksiyonu içinse aynı oranda 0.5 M asetik asit ve farklı oranlarda pepsinle (%0.1, %0.5 ve %1) muamele edilmiştir. Ultrason uygulamasının ardından, örnekler 4°C'de 48 saat boyunca sürekli karıştırılmıştır. Genlik seviyesi arttıkça kolajen veriminin artış gösterdiği ve %80 genlik seviyesinde %1 pepsin ve 30 dakika ultrason uygulamasıyla pepsinde çözünür kolajen veriminin %94.88; benzer şekilde %80 genlik seviyesinde 30 dakika ultrason uygulamasıyla asitte çözünür kolajen veriminin %81.53 olduğu görülmüştür. Dairesel dikroizm (CD), FTIR ve elektroforez sonuçları, tüm kolajenlerin üçlü sarmal yapıda olduğunu göstermiştir. Kolajenlerin protein bantları incelendiğinde, ultrason uygulamasının kolajenin ana bileşenleri olan $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve β zincirlerini değiştirmedeği görülmüştür.

Sığır tendonuyla yapılan diğer bir çalışmada, enzimatik hidroliz ve ultrason uygulamasının kolajen verimine etkisi incelenmiştir. Enzimatik hidrolizde örnekler, pepsin içeren 0.5 M asetik asit çözeltisinde 2 gün boyunca ekstrakte edilmiştir. Ultrason uygulamasında ise ekstra ultrason basamağı dışında, yöntem enzimatik hidrolizle tamamen aynıdır. Örnekler, sıcaklığı 20°C'de sabit tutulan bir su banyosunda ultrasona (40 kHz, 120 W) maruz bırakılmıştır. Sonuçlar, ultrason uygulamasının enzimatik hidrolize kıyasla daha yüksek verim sunduğunu göstermiştir. 48 saat sonunda, enzimatik hidroliz sonucu elde edilen kolajen verimi %71.4 iken ultrason uygulamasında %88 olarak belirlenmiştir. Ultrason uygulamasıyla enzim aktivitesinin arttığı dolayısıyla enzimatik hidrolizin kolaylaştığı görülmüştür. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntüleri, her iki yöntemle elde edilen kolajenlerin aynı fibril yapıda olduklarını göstermiştir. CD ve FTIR analizi sonuçları, ultrason uygulamasından sonra bile kolajenin üçlü sarmal yapısının bozulmadan korunduğunu ortaya koymuştur. (Li et al., 2009).

Kolajen ekstraksiyonunda ultrason kullanımı kullanılan çözgen miktarını ve ekstraksiyon süresini önemli ölçüde azaltmakla beraber, verimi de büyük ölçüde arttırmaktadır. Yapılan çalışmalar, ultrasonunun ekstraksiyon etkinliğini arttırmak için etkili bir araç olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, ultrasonun enzim aktivitesi üzerindeki etkisine dair çalışmaların sınırlı olduğu görülmüştür. Ultrasonun enzim aktivitesi üzerine etkilerinin daha iyi değerlendirilmesi ve diğer yöntemlerle birlikte kullanımının etkilerinin detaylı incelenmesi için çalışmalar yaygınlaştırılmalıdır (Schmidt et al., 2016).

2.6. Glukozaminoglikanların Yapısı

Glukozaminoglikanlar, kolajen moleküllerine ek olarak ESM'de en çok bulunan yapısal bileşenlerdir (Lee et al., 2016). Uzun, doğrusal ve tekrar eden disakkarit birimlerden oluşan glukozaminoglikanlar, negatif yüklü polisakkaritlerdir. Çekirdek proteindeki GAG zincirleri, asetillenmiş amino şeker parçaları (N-asetil-galaktozamin veya N-asetil-glukozamin) ve ağırlıklı olarak üronik asit (D-glukronik asit veya L-iduronik asit) içeren tekrarlayan disakkarit birimlerinden oluşmaktadır (Schaefer and Schaefer, 2010). GAG zincirleri, dokuya mekaniksel destek vermekle beraber aynı zamanda suda çözünebilir moleküllerin hızlı difüzyonunu ve hücre göçünü sağlamaktadır (Üçgül vd., 2018). GAG'lar sülfatlanmış (Kondroitin sülfat, Dermatan sülfat, Keratan sülfat, Heparin ve Heparan sülfat) ve sülfatlanmamış (Hyalüronik asit) olmak üzere olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Glukozaminoglikanların sınıflandırılması

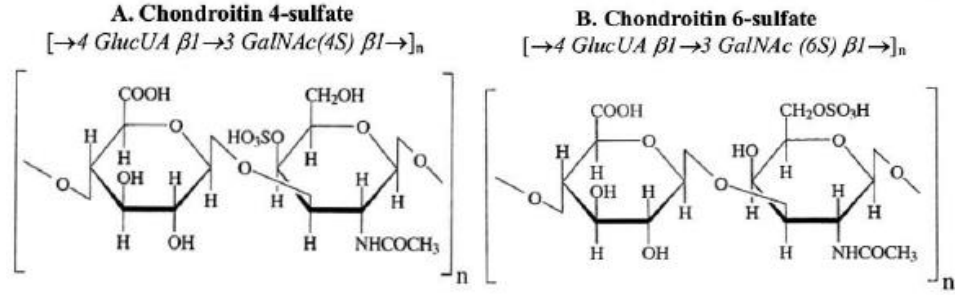
Kondroitin sülfat, dermatan sülfat, keratan sülfat, heparan sülfat ve heparini içeren sülfatlanmış glukozaminoglikanlar, hücre içine salgılanan sülfat ile sentezlenir (Üçgül vd., 2018). Proteoglikanlar olarak adlandırılan spesifik bir çekirdek proteinine kovalent olarak bağlanan GAG'lar, sülfatlanmamış GAG olan hyalüronik aside göre daha karmaşık bir yapıya sahiptir (Lee et al., 2016). Tablo 2.7' de glukozaminoglikanların temel disakkarit birimleri ve ilgili proteoglikanları verilmiştir.

Tablo 2.7. GAG'ların temel disakkarit birimleri ve ilgili proteoglikanları (Lee et al., 2016)

| 1. ŞEKER | 2. ŞEKER | | |
|-------------------|-----------------------|----------------|-------------------------|
| | N-asetil-D-glukozamin | D-glukozamin | N-asetil-D galaktozamin |
| D-glukuronik Asit | Hyalüronik asit | Heparan sülfat | Kondroitin sülfat |
| L-iduronik asit | | Heparin (HP) | Dermatan sülfat |
| D-galaktoz | Keratan sülfat | | |

Disakkarit birimi N-asetil-D-glukozamin ve D-glukuronik asit olan hyalüronik asit çekirdek proteine sahip değildir. Cildin bağ dokusu, göbek kordonu ve eklemlerdeki sinoviyal sıvı olmak üzere vücudun genelinde doğal olarak bulunmaktadır (Papakonstantinou et al., 2012). Proteine bağlı şekilde bulunan keratan sülfatın disakkarit birimi N-asetil-D-glukozamin ve D-galaktozdur. Keratan sülfat I, korneada bulunurken keratan sülfat II kıkırdak ve kemikte bulunmaktadır (Funderburgh, 2002). Çekirdek proteinine bağlı olarak hücre yüzeyinde veya hücre dışı matriste bulunan heparin ve heparan sülfatın disakkarit birimi D-glukozamin ve D-glukuronik asit veya L-iduronik asittir (Shriver et al., 2012). Tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılan heparin iyi bir antikoagülan (kanın pıhtılaşmasını önleyen bir madde) olarak bilinmektedir (Wardrop and Keeling, 2008). Disakkarit birimi N-asetil-D-galaktozamin ve L-iduronik asit olan dermatan sülfat glukozaminoglikan zinciri çekirdek proteininde sentezlenir. Başlıca deride, tendonlarda, kan damarlarında ve kıkırdakta bulunur (Hileman and Linhardt, 1995).

Eklem kıkırdağındaki proteoglikanlarda en çok bulunan glukozaminoglikan olan kondroitin sülfat, hayvansal dokunun temel yapı maddeleri arasında yer alır (Garnjanagoonchorn et al., 2007). Çekirdek proteinine bağlı olarak bulunan kondroitin sülfat, dönüşümlü bağlarla birbirine bağlı bir D-glukuronik asit ve N-asetil-D-galaktozamin-4/6-sülfat tortusundan oluşmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kondroitin 4- Sülfat ve Kondroitin 6- Sülfat Yapısı (Nakano, 2010)

Glukozaminoglikanların yapı taşı olan glukozamin ve kondroitin sülfat kıkırdak koruyucu ajanlar olarak da bilinmektedir. Kıkırdak koruyucu terimi, dejeneratif eklem hastalığının ilerlemesini durduran ve zarar görmüş kıkırdağın onarımını uyarıcı her ilaç veya bileşimi tanımlamak için kullanılır (Akgün ve Ögüt, 2002). Glukozamin, kıkırdakta kolajen sentezinden sorumludur. Kondroitin sülfat ise eklem sıvısında ve kıkırdakta yıkıcı enzimleri inhibe eder (Bhathal et al., 2017). Kolajen ve GAG moleküllerinin bir arada sinerjistik etki gösterdiklerini bilinmektedir (Zhong et al., 2007).

2.7. GAG Kaynakları

GAG kaynaklarından kıkırdakta en yaygın olarak bulunan kondroitin sülfat ticari olarak sığır kıkırdağı, sığır nefes borusu ve köpekbalığı yüzgeci gibi çeşitli kaynaklardan temin edilmektedir (Rani et al., 2017). Ancak sığırlarda görülen deli dana hastalığının potansiyel bir risk olduğu bilinmektedir. Kondroitin sülfata olan talebin gelecekte de artmaya devam etmesi durumunda, köpekbalığı kıkırdağı kaynağından eldesinde kısıtlar olacağı düşünülmektedir (Nakano et al., 2012). Yüksek hammadde maliyeti ve GAG'lara olan taleple birlikte, ticari olarak farklı GAG kaynaklarına ihtiyacın arttığı görülmektedir. Yapılan çalışmalarda, timsah kıkırdağı, vatoz kıkırdağı ve tavuk omurgası (Garnjanagoonchorn et al.,

2007); tavuk ayağı kıkırdağı (Widyaningsih et al., 2016); geyik boynuzu (Gujral et al., 2014) kondroitin sülfat kaynağı olarak değerlendirilmiştir.

2.8. GAG Ekstraksiyonu İlgili Yapılan Çalışmalar

Glukozaminoglikanlar, genellikle papain veya pronaz gibi hücre dışı (eksojen) bir enzim aracılığıyla ekstrakte edilir. Papain veya pronaz ile proteoliz, birkaç amino asitten oluşan küçük bir peptidin kovalent olarak bağlandığı tek bir GAG zincirini vermektedir (Nakano et al., 2010). Bununla beraber, son derece negatif yüklü zincirlere sahip olan glukozaminoglikanlar pozitif yüklü kimyasallarla da çöktürülebilmektedir (Raghuraman, 2013).

Widyaningsih vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, tavuk ayağı kıkırdağından kondroitin sülfat (CS) ve glukozamin (GS) eldesi için farklı ekstraksiyon yöntemleri değerlendirilmiştir. Örnekler 37°C'de 7 ve 17 saat boyunca asetik asit ile 100°C'de 2 ve 2.5 saat kaynar su ile; 65°C'de 24 ve 48 saat papain ile ekstrakte edilmiştir. En yüksek GS seviyesine (% 8.1) 2.5 saatlik kaynar su uygulaması ile ulaşılırken, en yüksek CS seviyesine (% 2.47) 48 saatlik enzim muamelesi ile ulaşılmıştır. Uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinin GS ve CS seviyelerini önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. Nakano vd. (2012), öğütülmüş kemik, kıkırdak, deri, kas ve yağ dokusu karışımından elde edilen tavuk mekanik sıyırma artığı kemiklerinden farklı proteolitik aktiviteye sahip kaynaklarla (papain, pankreatin, flavourzyme ve kivi meyvesi homojenatı) CS ekstraksiyonu gerçekleştirmişler ve kaynakların CS-peptid yapısı üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu kapsamda kemik karışımı, papain ile 65°C'de 1 gece; pankreatin ile 50°C'de 1 gece; flavourzyme ile 50°C'de 1 gece ve kivi meyvesi homojenatı ile 65°C'de 8 saat boyunca inkübe edilmiştir. Çalışma sonunda, kullanılan tüm enzim kaynaklarının CS-peptid üretimi için yeterli aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Bununla beraber, iyon değişim kromatografisi sonuçları CS'nin geri kazanımının papain ve flavourzymede daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Qingman Cui vd. (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada deniz tarağı (*Patinopecten yessoensis*) atığından GAG ekstraksiyonu, cevap-yüzey

metodolojisi ile optimize edilmiştir. Tek faktör deneyi temel alınarak, enzimatik hidroliz, reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon süresi ve katı-sıvı oranı bağımsız değişken, cevap değeri (response value) ise ekstraksiyon hızı olarak belirlenmiştir. Optimizasyon sonucunda enzimatik pH'ın glukozaminoglikan ekstraksiyon hızını, katı-sıvı oranı, reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığına göre daha çok etkilediği görülmüştür. Optimum koşullar altında (enzimatik hidroliz pH değeri 8.0, reaksiyon sıcaklığı 40°C, reaksiyon süresi 3.5 saat ve katı sıvı oranı 1:2) ekstraksiyon hızı % 0.265 olarak belirlenmiştir. Khan vd. (2013) çalışmalarında GAG kaynağı olarak tavuk omurgası kıkırdağını kullanmışlardır. Bu kapsamda GAG'lar 3M MgCl₂ kullanılarak önceden yıkanmış ve öğütülmüş tavuk kıkırdaklarından ekstrakte edilmiştir. Ardından diyaliz uygulanmış ve papainle sindirim gerçekleştirildikten sonra etanol ile çöktürülmüş ve kuru toz haline liyofilize edilmiştir. Ekstrakte edilen örneklerde toplam GAG miktarı %70.77 ± 2.27 ve tahmini protein miktarı %4.64 ± 0.29 olarak tespit edilmiştir. Kang ve vd. (2006) tavuk omurgası kıkırdağından kondroitin sülfat içeren mukopolisaakkarit protein eldesi için sıcak su ekstraksiyonu (100°C'de 30-60-90-120 dak.) ve alkalaz hidrolizi ((%2 alkalaz, 55°C, pH 8.0), 30-60-90-120 dak.) yöntemlerini incelemişlerdir. Her iki yöntem için optimum ekstraksiyon süresi 120 dakika olarak belirlenmiştir. Sıcak su için %40.09 verim ve %28.46 kondroitin sülfat içeriği; alkalaz hidrolizi içinse %75.87 verim ve %26.61 kondroitin sülfat içeriği gözlenmiştir.

Genellikle hayvansal yan ürünler normal şartlarda gübre, hayvan yemi ve yakıt üretiminde kullanılmaktadır. Bu yan ürünlerden çeşitli mineraller, vitaminler, yağ asitleri, protein hidrolizatları, kolajen ve GAG gibi katma değeri yüksek ürün eldesi için giderek büyüyen bir pazar mevcuttur. Bu çalışmada hammadde olarak seçilen kuzu ayakları, katma değeri yüksek kolajen ve GAG eldesi için değerlendirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

Tez çalışması kapsamında, kolajen ve GAG üretimi için hammadde olarak kuzu ayağı kullanılmıştır. Kuzu ayakları, yerel bir kasaptan satın alınmış ve kıl, kan vb. kirletici maddelerin uzaklaştırılması amacıyla yıkandıktan sonra boyut küçültmesi amacıyla endüstriyel bir mekanik öğütücüde (Beehive Mechanical Grinder, ABD) öğütülmüştür. Öğütülen kuzu ayakları küçük paketlere koyularak işleme alınincaya kadar soğuk odada (-18°C) muhafaza edilmiştir. Kolajenin enzimatik ekstraksiyon işleminde kullanılan pepsin (EC 3.4.23.1; 0.7 FIP-U / mg) ve laktik asit ile GAG ekstraksiyonunda kullanılan papain (EC 3.4.22.2; 30000 units/mg) ve sodyum asetat SIGMA-ALDRICH firmasından temin edilmiştir. Kolajen analizi için kullanılan Total Collagen Assay Kit (Colorimetric, K218, ABD) Biovision firmasından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kolajen Ekstraksiyonu

Kuzu ayaklarından kolajen eldesi için enzimatik hidroliz yöntemi kullanılmıştır. Ardından, ultrason uygulamasının kolajen verimi ve kolajen yapısına etkilerinin incelenmesi amacıyla farklı sıcaklık ve sürelerde ultrason destekli ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. Ön İşlemler

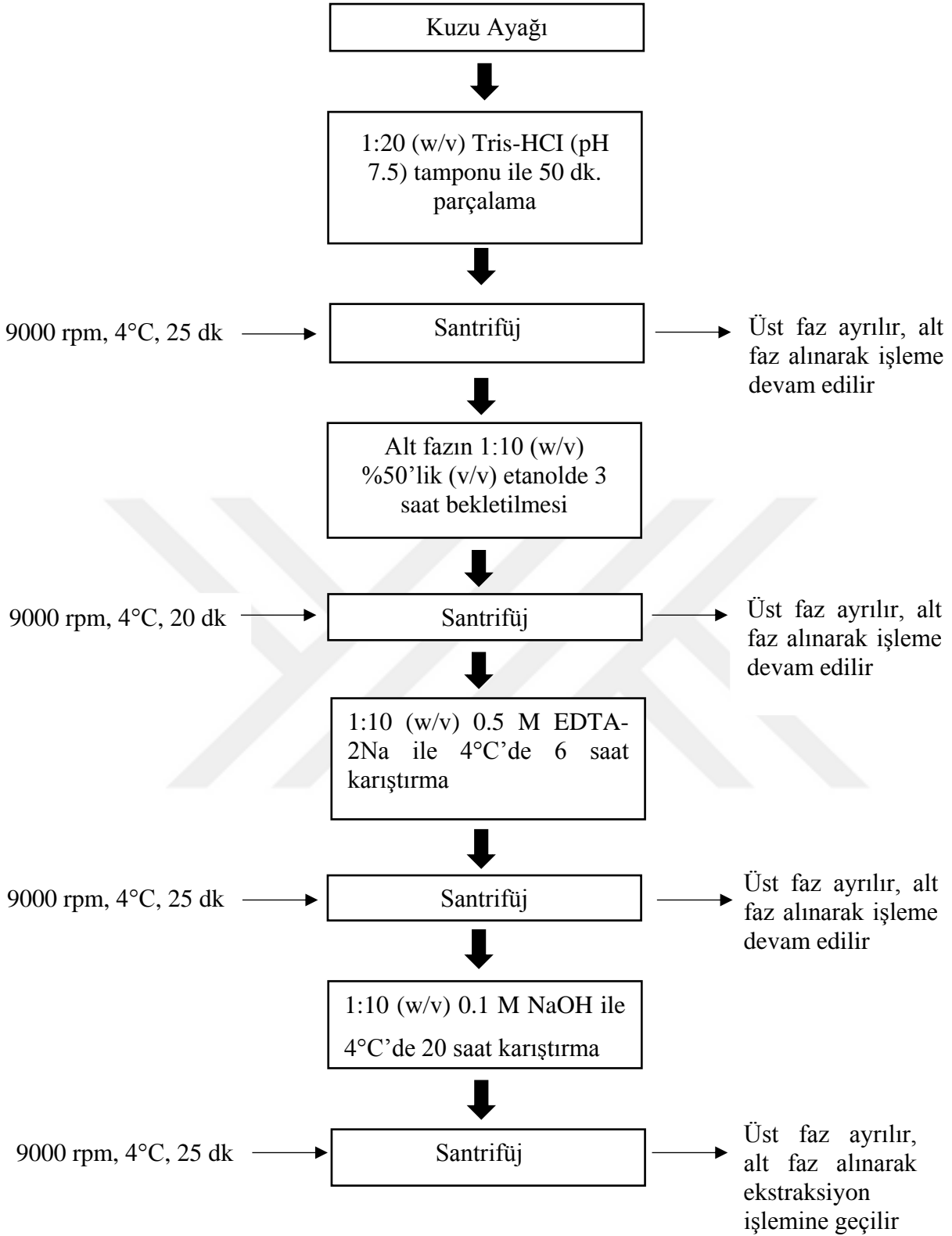
Kolajen ekstraksiyonu öncesinde kuzu ayaklarına bazı ön işlemler uygulanmıştır. Kuzu ayakları ön işlemler öncesi 4°C'de çözdürülmüştür.

İlk olarak, kuzu ayakları 1:20 (w/v) oranında 0.15 M NaCl içeren 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) ile 50 dk boyunca Waring Comercial marka blender içinde parçalanmıştır. Parçalama işlemi aşırı ısınmayı önlemek amacıyla kesikli (toplam 6 saat olacak şekilde) olarak yapılmıştır. Daha sonra, santrifüj (Universal 320R, Hettich Zentrifugen, Almanya) işlemi uygulanarak (9000 rpm, 4°C, 25 dk.) üst faz (süpernatant) uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kuzu ayaklarının Tris-HCl ile parçalama işlemi sonrasında elde edilen alt faz.

Santrifüj sonrası alınan alt faz, yağın uzaklaştırılması amacıyla 1:10 (w/v) oranda %50'lik (v/v) etanolde 3 saat bekletilmiştir. Yağ uzaklaştırma sonucu, santrifüj işlemi (9000 rpm, 4°C, 20 dk.) uygulanarak üst faz uzaklaştırılmıştır. Yağdan arındırılmış alt faz, kalsiyum tuzlarının uzaklaştırılması amacıyla 1:10 (w/v) oranda 0.5 M EDTA-2Na ile 4°C'de 6 saat karıştırılmıştır. Ardından santrifüj (9000 rpm, 4°C, 25dk.) işlemi uygulanmış ve elde edilen alt faz, kolajen olmayan proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla 1:10 (w/v) oranda 0.1 M NaOH içinde 4°C'de 6 saat bekletilmiştir. Daha sonra, santrifüj işlemi (9000 rpm, 4°C, 25 dk.) uygulanarak üst faz uzaklaştırılmış ve elde edilen alt faz, ekstraksiyon işlemine kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir (Hashim et al., 2014; Zhou et al., 2016; Gao et al., 2017). Kuzu ayağına uygulanan ön işlemler için akış şeması Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Kuzu ayağına uygulanan ön işlemlerin akış şeması

3.2.1.2. Ekstraksiyon Aşaması

Enzimatik hidroliz işleminde pepsin enzimi (enzim aktivitesi 0.7 FIP-U/mg) kullanılmıştır. Enzim miktarı ve katı:çözgen oranı parametreleri yapılan ön denemeler ve literatür çalışmaları göz önünde bulundurularak sırasıyla %0.1 (w/v) ve 1:20 (w/v) olarak belirlenmiştir (Cheng et al., 2009; Hashim et al., 2014; Ran et al., 2014).

Ön işlemleri tamamlanmış kuzu ayakları, ekstraksiyon işlemi için % 0.1 (w/v) pepsin içeren 1:20 (w/v) oranda %5'lik laktik asit içinde 6 saat boyunca 4°C'de karıştırılmıştır. Daha sonra karışıma, yapılan ön denemeler sonucu belirlenmiş olan sıcaklık ($20 \pm 2^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $30 \pm 2^\circ\text{C}$) ve sürelerde (20, 40, 60 dk) Şekil 3.3'de verilen ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex Digitec, Almanya) içinde ultrases (35 kHz; 140/560 W) uygulanmıştır.

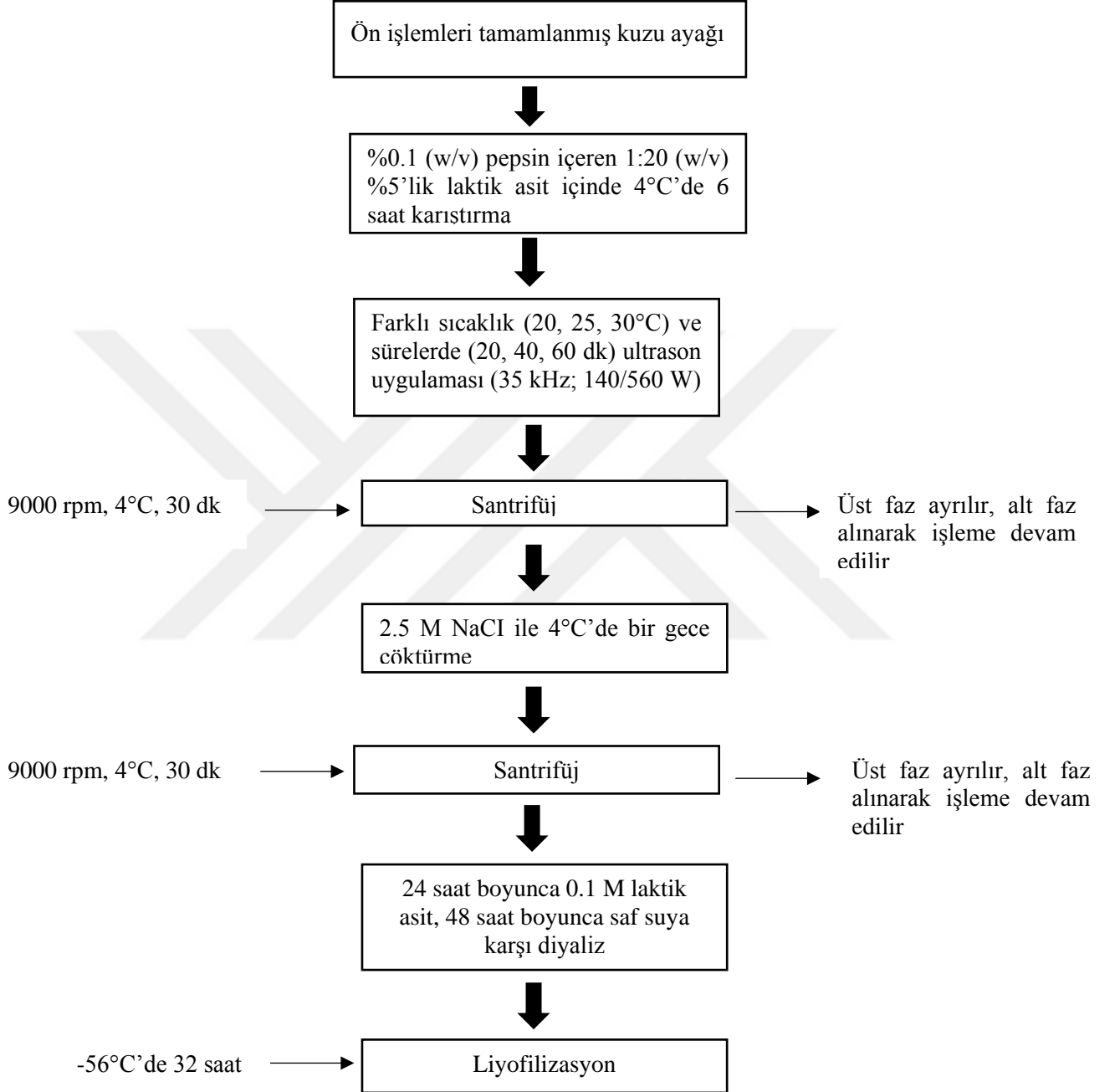


Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan ultrasonik banyo

3.2.1.3. Diyaliz

Ekstraksiyon işlemi sonrası, karışım santrifüj (9000 rpm, 4°C, 30 dk.) edilmiş ve üst faz alınarak 2.5 M NaCl ile 4°C'de 1 gece boyunca çöktürülmüştür. Çöktürme işlemi sonrası, karışım santrifüj (9000 rpm, 4°C, 30 dk.) edilerek, alt faz toplanmıştır. Toplanan alf fazlar, %5'lik laktik asitte çözdürülerek 24 saat boyunca 0.1 M laktik asite, 48 saat boyunca saf suya karşı diyaliz torbası içinde

(Sigma- Aldrich, 33 mm, Moleküler ağırlık eşiği (MWCO)-14 kDa) diyaliz edilmiştir. Kuzu ayaklarından kolajen eldesi için uygulanan tüm işlemler Şekil 3.4'te gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Kuzu ayaklarından kolajen üretimi akış şeması

3.2.2. GAG Ekstraksiyonu

Kuzu ayaklarından GAG eldesi için enzimatik ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Kuzu ayaklarının kıkırdak ve kemikçe zengin kısımları seçilmiştir. Ekstraksiyon işlemi öncesinde, kuzu ayaklarına herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Ekstraksiyon işleminin ardından farklı sıcaklık ve sürelerde ultrason destekli ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Ekstraksiyon Parametrelerinin Belirlenmesi

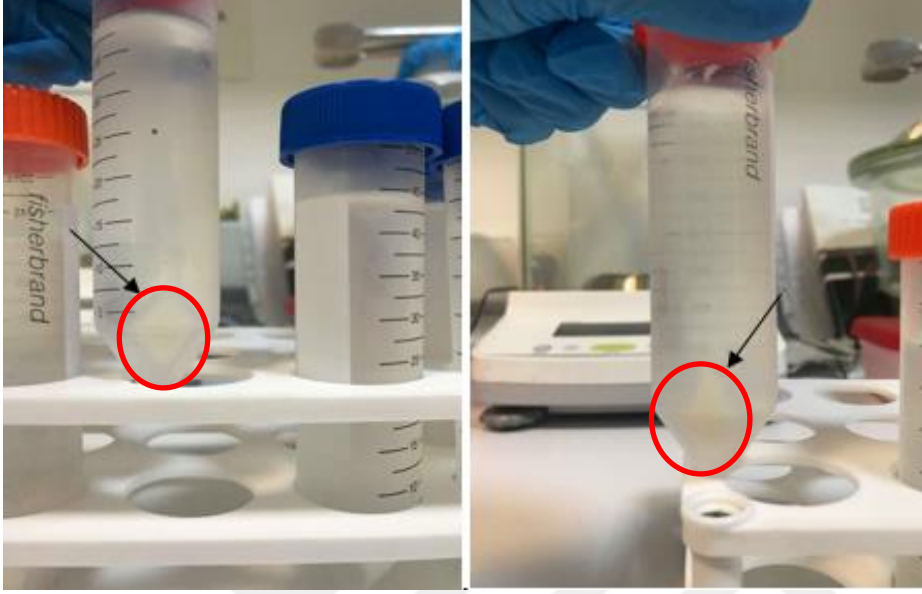
Ekstraksiyon işleminde papain enzimi (enzim aktivitesi 30000 units/mg) ve sodyum asetat çözeltisi kullanılmıştır. Papain enziminin optimum düzeyde çalışması için (pH 6.0-7.0), farklı ekstraksiyon parametreleriyle (katı: çözgen oranı, enzim miktarı, sıcaklık, süre) ön denemeler yapılmıştır. Yapılan ön denemeler ve literatür çalışmaları göz önünde bulundurularak, katı:çözgen oranı 1:20 (w/v), enzim miktarı (5 mg enzim / 1 gr örnek), sıcaklık 60°C ve ekstraksiyon süresi 20 saat olarak belirlenmiştir (Nakano et al., 2012; Widyaningsih and Wijayanti, 2016; Nogueira et al., 2019).

Kuzu ayakları, ekstraksiyon işlemi için 1:20 (w/v) oranda 0.1 M sodyum asetat çözeltisinde (pH 5.6) 25 dk boyunca Waring Comercial marka blender içinde parçalanmıştır. Parçalama işlemi aşırı ısınmayı önlemek amacıyla kesikli olarak (toplam 2 saat olacak şekilde) yapılmıştır. Daha sonra karışıma, ön denemelerle belirlenen miktarda papain (5 mg / 1 gr örnek) eklenmiş ve 60°C' deki çalkalamalı su banyosunda 20 saat boyunca karıştırılmıştır (çalkalama hızı: 85 rpm). Ardından, karışıma, farklı sıcaklık (60 ± 2°C, 65 ± 2°C, 70± 2°C °C) ve sürelerde (20, 40, 60 dk) ultrasonik banyo (Bkz. Şekil 3.3) içinde ultrases (35 kHz; 140/560 W) uygulanmıştır.

3.2.2.2. Diyaliz

Ekstraksiyon işlemi sonrası, karışım santrifüj (9000 rpm, 4°C, 30 dk.) edilmiş ve süpernatant kısım alınarak %80'lik (v/v) etanol ile 4°C'de 1 gece boyunca çöktürülmüştür. Çöktürme işlemi sonrası, karışım santrifüj (9000 rpm, 4°C, 30 dk.) edilerek, alt faz toplanmıştır (Şekil 3.5). Elde edilen alt faz, suda

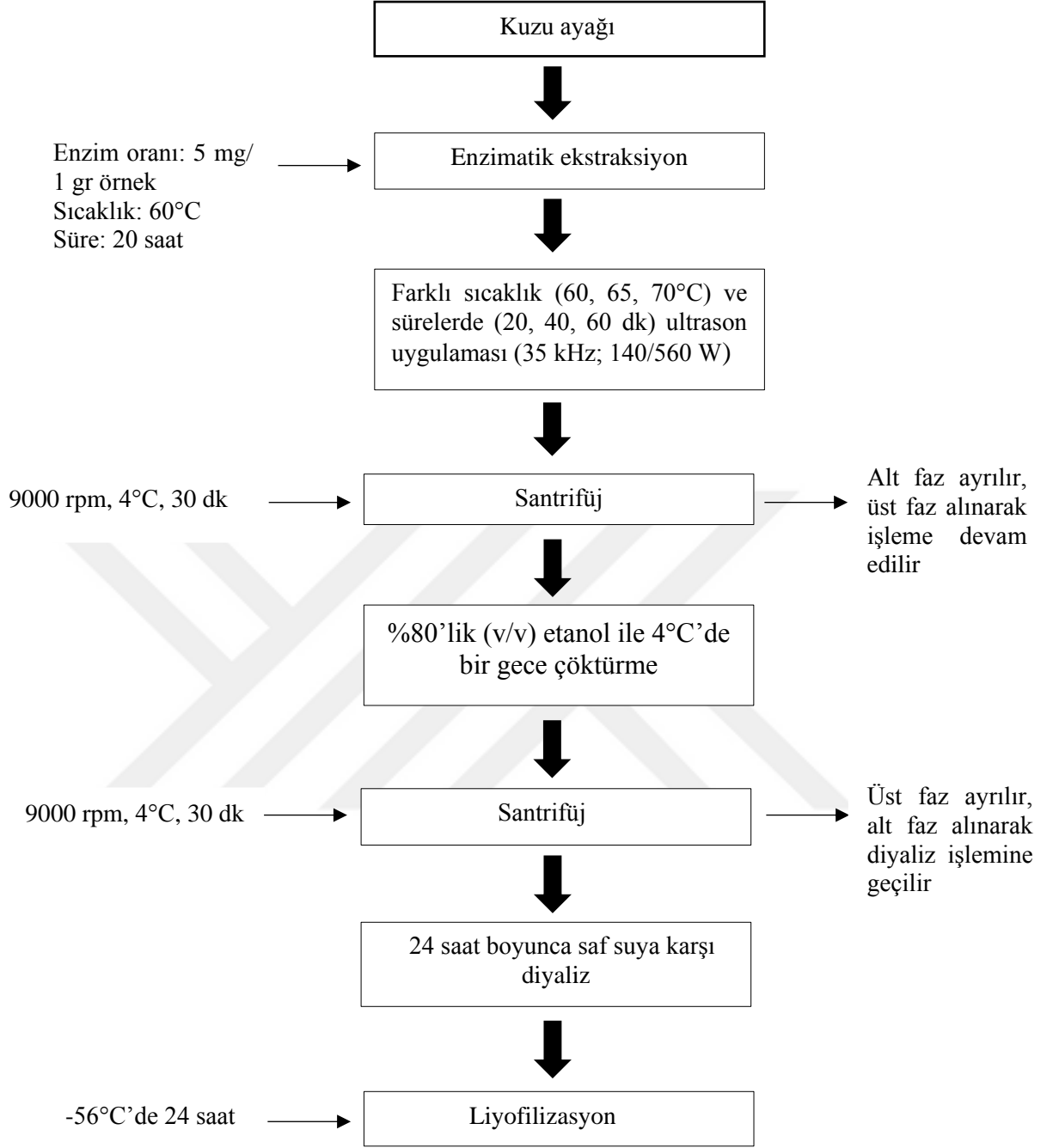
çözdürülerek 24 saat boyunca saf suya karşı diyaliz torbası içinde (Thermo Fisher, 16 mm, MWCO-3.5 kDa) diyaliz edilmiştir. Kuzu ayaklarından GAG eldesi için uygulanan tüm işlemler Şekil 3.6'da özetlenmiştir.



Şekil 3.5. Etanol ile çöktürme sonrası santrifüj ile ayrılan alt faz

3.2.3. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon)

Diyaliz edilen kolajen örnekleri -56°C 'de 32 saat, GAG örnekleri ise -56°C 'de 24 sa boyunca liyofilize edilmiştir (Martin Christ alpha 1-2 LD plus, Germany).



Şekil 3.6. Kuzu ayaklarından GAG üretimi akış şeması

3.2.4. Analiz Yöntemleri

Hammade, kolajen ve GAG örneklerine yapılan tüm analizler 3 paralel ve 2 tekrarlı olarak yürütülmüştür.

3.2.4.1. Protein Miktarı Tayini

Hammadde olarak kullanılan kuzu ayaklarının toplam protein miktarı Kjeldahl yöntemi (Kjeldahl, 1883) referans alınarak belirlenmiştir (Gerhardt Co. Bonn Almanya). Yaklaşık 1 gram örnek tartılarak Kjeldahl balonuna konduktan sonra üzerine 10 g katalizör ve 25 ml derişik sülfirik asit (H₂SO₄) ilave edilerek Kjeldahl balonu yakma setine yerleştirilmiştir. Ardından, örnek ilk 15 dakika 200-250°C'de, daha sonra 350-400°C'de siyah nokta kalmayınca kadar yakılmıştır. Yakma işleminin ardından yaş yakma tüpleri oda sıcaklığında soğutulmuştur. Daha sonra, üzerine 25 ml saf su ilave edilerek destilasyon cihazına yerleştirilmiştir. Bir erlene 50 ml borik asit çözeltisi koyularak adaptörün ağzı erlenin dibine degecek şekilde yoğunlaştırıcının altına yerleştirilmiştir. Borik asit çözeltisi mavi-yeşil renk aldığıında destilasyon işlemi sona erdirilmiştir. Ardından erlen içindeki çözelti, 0.1 N hidroklorik asit (HCl) ile pembe renk gözleninceye kadar titre edilmiştir. Kör deney için örnek yerine filtre kâğıdı koyularak aynı işlemler tekrarlanmıştır.

$$\% \text{ azot} = [0,014 \times N \times (V_1 - V_2) \times 100] / m$$

V₁= Titrasyonda harcanan HCl çözeltisinin mL hacmi

V₂= Şahit deneyde titrasyonda harcanan HCl çözeltisinin mL hacmi

N= Ayarı yapılan hidroklorik asit çözeltisinin derişimi

m= Alınan örneğin g ağırlığı

Örneklerin % azot miktarı belirlendikten sonra 6.25 dönüşüm faktörü ile çarpılarak toplam protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.4.2 Yağ Miktarı Tayini

Kuzu ayaklarının yağ içeriği, AOAC 960.39'a göre belirlenmiştir. İlk olarak örnekler 105°C'de etüvde nemin uzaklaştırılması amacıyla 1-2 saat kurutulmuştur. Ardından, kaba süzgeç kağıdı üzerine yaklaşık 10 gram örnek

tartılarak ekstraktöre yerleştirilmiştir. Analizde kullanılacak balonlar etüvde sabit tartıma getirildikten sonra desikatörde soğutularak daraları kaydedilmiştir. Balona ve gövdeye yaklaşık 1.5 sifon yapacak kadar hekzan ilave edilmiştir. Balon, ekstraktör ve geri soğutucu birbirine bağlanarak, su banyosu üzerine yerleştirilmiş ve yaklaşık 6 saat ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra balonun içerisindeki hekzan rotary evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Balonun son ağırlığı kaydedildikten sonra içindeki yağ miktarı % yağ olarak aşağıdaki formülden hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Yağ Miktarı} = [100 \times (M_2 - M_1) / M_0]$$

M₀:Deney numunesinin kütlesi, g

M₁:Ekstraksiyon balonunun darası, g

M₂:Ekstraksiyondan sonra yağ ve balonun birlikte kütlesi, g

3.2.4.3. Kül Miktarı Tayini

Kuzu ayaklarının kül miktarı, AOAC 920.153'e göre saptanmıştır. Ön yakması tamamlanan örnekler, sabit tartıma getirilmiş krozede 550°C'deki kül fırını (Carbolite Ltd., Almanya) içinde açık gri kül elde edene kadar yakılmıştır. Sonuçlar % kül olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Hesaplama: } \% \text{ Kül} = [\text{kül ağırlığı (g)} / \text{örnek ağırlığı (g)}] \times 100$$

3.2.4.4. Nem Analizi

Hammadde, liyofilize kolajen ve GAG örneklerinin nem analizi AOAC 950.46 B (a) referans alınarak yapılmıştır. Ağırlığı bilinen petri kaplarına örnekler tartılmış ve 105°C etüvde (Mettler Model 30-1060, Almanya) sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur. Kurutma işleminin ardından, örnekler desikatörde soğutularak tartılmıştır. Tartım farkı bulunarak örneğin nem yüzdesi hesaplanmıştır.

$$\text{Hesaplama: } \% \text{ Nem} = [\text{nem ağırlığı (g)} / \text{örnek ağırlığı (g)}] \times 100$$

3.2.4.5. Renk Tayini

Liyofilize kolajen ve GAG örneklerinin renk ölçümleri, Minolta Colour Reader (CR10, Minolta Camera Co., Osaka, Japan) kullanılarak CIE (L*a*b*) renk uzayına göre ölçülmüştür (Liu et al., 2001). Bu renk uzayına göre, L* değeri parlaklık/koyuluk, a* değeri yeşillik (-a*)/kırmızılık (+a*), b* değeri ise sarılık (+b*)/mavilik (-b*) değerini göstermektedir (Hunter, 1975). Tüm ölçümler 4 paralel şekilde yapılarak, ortalama değerler alınmıştır.

3.2.4.6. Kolajen Analizi

Kolajen miktarı *Total Collagen Assay Kit* (K218, BioVision, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Analizdeki temel prensip hidrokspirolin ve hidrolizat oluşturmak için örneğin asit hidrolizine dayanmaktadır. Örnekler kitteki prosedüre uygun olarak hazırlanmıştır. 10 mg örnek / 100 µl saf suda çözdürülmüştür. Ardından 100 µl homojen örneğe, 100 µl (~12 M) HCl eklenerek basınca dayanıklı Teflon kapaklı vial içinde 120 °C de 3 saat hidrolize edilmiştir. Hidroliz işlemi sonrası, örnekler aktif kömür ile temizlenmiştir. Ardından santrifüj edilerek aktif kömürlü çökelti uzaklaştırılmıştır. Berrak hidrolize edilmiş örneklerden 20 µl alınarak, 96 oyuklu plakaya transfer edilmiş ve örnekler tamamen kuruyana kadar 70°C deki vakumlu etüvde buharlaştırılmıştır. Buharlaştırma işlemi sonrasında, her bir örneğe 100 µl Kloramin T reaktifi eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. 5 dakika sonunda, her bir oyuğa 100 µl DMAB reaktifi eklenmiştir ve örnekler 60°C'de 90 dk inkübe edilmiştir. Ardından, 560 nm dalga boyunda plaka okuyucu (UV/VIS Multi well Spektrofotometre/ Thermo Scientific Multiskan GO) kullanılarak örneklerin absorbans değerleri okunmuştur.

Standart eğri grafiği için ise, teflon kapaklı viallere 0, 20, 40, 60, 80, 100 µl saf tip I kolajen standardı (1 mg/mL) aktarılmıştır. Ardından 100 µl 0.02 M asetik asit ve 100 µl (~12 M) HCl eklenerek 120 °C de 3 saat hidrolize edilmiştir. Hidroliz işlemi sonunda, her bir vialden 15 µl çekilerek, 96 oyuklu plakaya transfer edilmiştir. Bu aşamadan sonra uygulanan tüm işlemler, örneklerle uygulanan işlemlerle aynıdır. Absorbans değerleri okunduktan sonra, standart eğri çizilmiştir (Ek 1).

Hesaplama: **Toplam Kolajen Konsantrasyonu**= (B/V) x D $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

B: Standart eğriden alınan örnekteki kolajen miktarı (μg)

V: Reaksiyon kuyucuğuna eklenen örnek hacmi (20 μl)

D: seyreltme faktörü (2100 μl)

Örneklerin absorban değerlerinden kör değeri çıkarılarak, standart eğriden alınan örnekteki kolajen miktarı (μg) bulunmuştur ve toplam kolajen konsantrasyonu hesaplanmıştır. Sonuçlar ($\mu\text{g} / \mu\text{l}$) olarak ifade edilmiştir.

3.2.4.7. Sodyum Dodesil Sülfat Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Kolajen örneklerinin protein dağılımlarını karşılaştırmak için Biorad Protean Tetrad sistemi ile SDS- poliakrilamid jel elektrofrez yapılmıştır (Laemmli 1970). Liyofilize kolajen örnekleri, % 10 (w/v) SDS ve 0.1 M NaCl içeren 0.1 M Tris-HCl (pH 6.8) içerisinde % 0.2 (w/v) oranında çözdürülerek, yükleme boyasıyla 95°C'de 10 dk kaynatılarak kuyulara yüklenmiştir. Elektrofrez işlemi için %10'luk ayırma jeli ile %5'lik toplama jeli kullanılmıştır. 20 μl örnek, jele yüklendikten sonra, öncelikle 85 voltta 15-20 dakika, ardından 120 voltta yaklaşık 2 saat elektrik alan altında yürütülmüştür. Elektrofrez sonrası jel, Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyanmış ve görüntülenmiştir.

3.2.4.8. HPLC Analizi

GAG örneklerindeki kondroitin sülfat miktarı HPLC yöntemi ile belirlenmiştir (Nagarajan et al., 2013). Mobil faz ve örnek hazırlamada, asetik asit (Merck-537020), asetonitril HPLC grade (Sigma Aldrich-34851), oktan sülfonik asit (Merck-1.18307) ve trietilamin (Merck-T0886) kullanılmıştır.

Mobil faz ve çözeltilerin hazırlanması: Örnek ve standart hazırlamada kullanılan çözelti, 0.3 mL asetik asit ile 5 mL asetonitril karışımının ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Mobil faz olarak, sulu oktan sülfonik asit: asetonitril: trietilamin (90.65: 8.96: 0.381) karışımı hazırlanmıştır. Orto fosforik asit ile pH 4'e ayarlanmıştır. Hazırlanan mobil faz ve çözelti, vakum altında 0,45 μm membran filtreden geçirilmiş ve 5 dakika ultrasonik banyoda degaz edilmiştir.

Standart hazırlama: Kondroitin sülfat standardından (Merck- 9819) 80 mg tartılarak, 25 ml asetik asit: asetonitril karışımında çözdürülmüştür. Çözdürme işleminin ardından standart karışım 5 dakika boyunca ultrasese tabi tutularak asetik asit: asetonitril karışımı ile 100 ml'e tamamlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden, 45, 85, 200, 400 ve 600 ppm (mg/L) çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. Karışım 0.45 µm membran filtreden geçirilerek HPLC viallerine aktarılmıştır.

Örneklerin hazırlanması: 5 mg liyofilize GAG örneği tartılarak, 1 ml asetik asit: asetonitril karışımında çözdürülmüştür. Çözdürme işleminin ardından örnek karışım 5 dakika boyunca ultrasese tabi tutularak 0.45 µm filtreden geçirilmiştir. Ardından HPLC viallerine aktarılmıştır.

Kromatografik Analiz: Çalışmada ters fazlı, C18 kolonlu HPLC (Agilent Technologies 1260 Infinity II, ABD) kullanılmıştır. Hazırlanan örnek çözeltilerinden 20 µl HPLC sistemine enjekte edildikten sonra, mobil faz çözeltilisi Tablo 3.1'de verilen kromatografik koşullar altında yürütülmüştür.

Tablo 3.1. Kromatografik Koşullar

| | |
|--------------------|---------|
| Kolon sıcaklığı | 25°C |
| Kolon akış hızı | 1 ml/dk |
| Enjeksiyon hacmi | 20 µl |
| Dalga boyu aralığı | 195 nm |

Analiz sonunda farklı konsantrasyonlara denk gelen pik alanları belirlenerek standart kalibrasyon eğrisi (Ek 2) çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem ile kondroitin sülfat miktarları hesaplanmıştır. Örneklerin kondroitin sülfat içeriği (mg/L) olarak ifade edilmiştir.

3.2.4.9. Ekstraksiyon verimlerinin belirlenmesi: Kolajen ve GAG ekstraksiyon verimleri, aşağıda belirtilen formüle göre kuru ağırlık bazında hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Ekstraksiyon Verimi (kuru ağırlık)} = (A / (B - C) \times 100)$$

A: Ekstraktın kuru ağırlığı

B: kuzu ayağının ağırlığı

C: kuzu ayağının nem içeriği

3.2.4.10. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Kolajen ve GAG örneklerinin morfolojik özellikleri, taramalı elektron mikroskobu (ThermoFisher, QUANTA FEG 250, ABD) ile incelenmiştir. Örnekler, görüntülemeye önce iletken altın-paladyum tabakası ile kaplanmıştır (Zhou et al., 2016). SEM analizi hizmet alımı yoluyla Ege Üniversitesi-Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (MATAL) gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.11. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektrometresi analizi

Kolajen ve GAG örneklerinin kızılötesi spektrumları, Zayıflatılmış Toplam Yansıma (ATR)- FTIR cihazı (Thermo Scientific NICOLET iS10, ABD) kullanılarak 4000-400 cm⁻¹ dalga boyunda ölçülmüştür (Ferraro et al., 2017). FTIR analizi hizmet alımı yoluyla Dokuz Eylül Üniversitesi- Elektronik Malzemeler Üretim ve Uygulama Merkezi'nde (EMUM) gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.12. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen sonuçların istatistiksel analizi SPSS (SPSS 11.0, Chicago, IL, ABD) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar arasında önemli düzeyde fark (p<0.05) olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %95 güven aralığında incelenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, çalışmada hammadde olarak kullanılan kuzu ayağı ile kuzu ayağından elde edilen kolajen ve GAG tozlarına ilişkin analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

4.1 Kuzu Ayaklarına Ait Analiz Sonuçları

Yıkama ve boyut küçültme amacıyla mekanik öğütücüde parçalanmış kuzu ayaklarının toplam nem içeriği $45 \pm 4,06$ olarak bulunmuştur. Kuru maddenin yaklaşık %40'ını protein, %30'unu kül, %17'sini ise yağ oluşturmaktadır. Geriye kalan %13'lük kısmı ise karbonhidrat oluşturmaktadır. Kuzu ayaklarının bileşimi Tablo 4.1'de görülmektedir.

Tablo 4.1. Kuzu ayaklarının kimyasal bileşimi (Yaş temel)

| | |
|----------------------|------------------|
| Nem(%) | $45 \pm 4,06$ |
| Protein(%) | 21.86 ± 1.42 |
| Kül (%) | 16.72 ± 3.04 |
| Yağ (%) | 9.44 ± 1.73 |
| <i>Karbonhidrat*</i> | 6.98 |

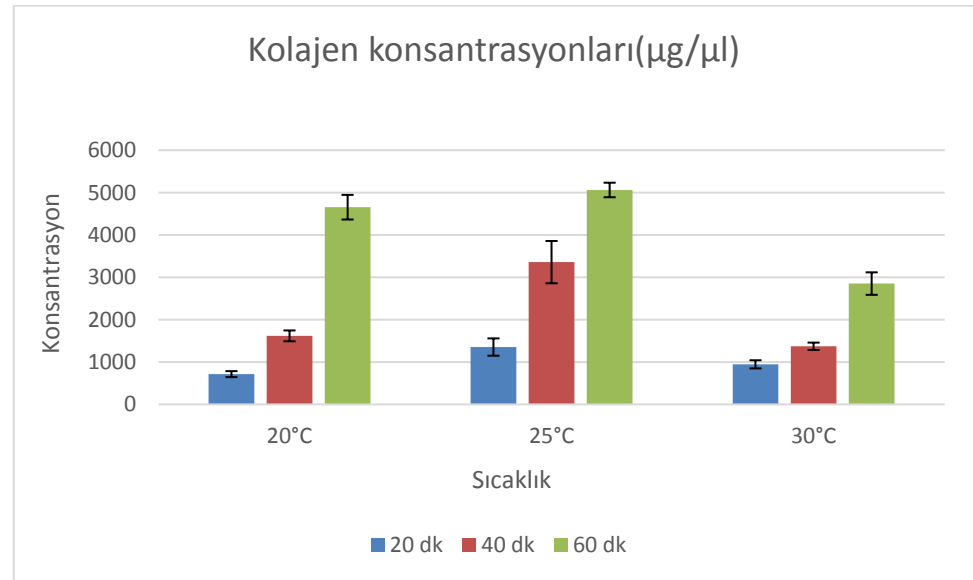
Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, kuzu ayaklarının bileşimine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Kolajen kaynağı olarak değerlendirilen tavuk ayağı ve balık derisi ile kıyaslandığında, kuzu ayağı protein içeriğinin (%21.86), tavuk ayağı protein içeriğinden (%17.42, Liu et al., 2001) fazla olduğu, balık derisinin (*Osteochilus vittatus*) protein içeriği (%21.80, Anto et al., 2018) ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Kuzu ayağının protein içeriğinin fazla olması, kolajen ekstraksiyonu için alternatif hammadde olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Ticari kolajenlerin birçoğunun özellikle sığır ve domuz gibi memeli hayvanların yan ürünlerinden elde edildiği, ancak sığırlarda görülen deli dana hastalığı, inanca dayalı kısıtlamalar gibi problemlerin araştırmacıları kolajen için farklı hammaddeler arayışına yönlendirdiği görülmüştür. Bu tez çalışması ile kuzu ayakları alternatif kolajen kaynağı olarak değerlendirilmiştir.

Kuzu ayaklarının kül içeriğinin yüksek olmasının yüksek oranda kemik kalıntısı içermesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ön işlemlerle birlikte kolajen saflığı ve ekstraksiyon veriminin arttığı bilinmektedir (Schmidt et al., 2016; Xu et al., 2017). Kül ve yağ içeriğinin fazla olması, nedeniyle, ekstraksiyon işlemi öncesinde yağ uzaklaştırma ve dekalsifikasyon işlemleri uygulanmıştır.

Yapılan bir çalışmada kemik, kıkırdak, deri, kas ve yağ dokusundan oluşan tavuk yan ürünleri karışımı kondroitin sülfat kaynağı olarak değerlendirilmiştir (Nakano et al., 2012). Et endüstrisinde, kıkırdak, kemik, deri ve tendon dokularını içeren bağ dokuları nispeten katma değeri düşük olan yan ürünler sayıldığı için, bu yan ürünlerden katma değeri yüksek GAG eldesinin endüstri için oldukça önemli olduğu belirtilmektedir (Nakano et al., 2010). Kuzu ayağı karbonhidrat içeriğinin yaklaşık %13 (kuru temelde) olduğu göz önüne alındığında, kuzu ayaklarının alternatif GAG kaynağı olarak değerlendirilebileceği öngörülmektedir.

4.2. Kolajen Analizi Sonuçları

Farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan ultrason işleminin kolajen konsantrasyonlarına etkisi Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ultrason süresinin kolajen konsantrasyonuna etkisi

Aynı sıcaklıkta artan ultrason süresine bağlı olarak kolajen konsantrasyonlarında da artış gözlenmiştir. 25°C sıcaklıkta farklı ultrason sürelerinde elde edilen kolajen örneklerinin en yüksek kolajen konsantrasyonuna sahip olduğu görülmüştür. 25°C sıcaklığın üzerindeki sıcaklık ve sürelerde kolajen konsantrasyonunun azalmaya başladığı gözlenmiştir. Farklı ekstraksiyon koşulları altında üretilen ekstraktların kolajen konsantrasyonları Tablo 4.2’de görülmektedir.

Tablo 4.2. Farklı ekstraksiyon koşulları altında üretilen örneklerin kolajen konsantrasyonları

| Ekstraksiyon Koşulu | Kolajen içeriği (ug/uL) |
|---------------------|-------------------------------|
| 20°C-20dk | 715,13±70,94 ^a |
| 20°C-40 dk | 1618,51±127,96 ^{bc} |
| 20°C- 60dk | 4655,31±290,73 ^e |
| 25°C- 20 dk | 1354,10±204,45 ^{abc} |
| 25°C- 40 dk | 3358,60±499,14 ^d |
| 25°C- 60 dk | 5061,75±171,41 ^e |
| 30°C- 20 dk | 946,28±96,15 ^{ab} |
| 30°C- 40 dk | 1372,56±86,69 ^{abc} |
| 30°C- 60 dk | 2852,49±265,39 ^c |

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

Tüm kolajen örneklerinin, kolajen konsantrasyonları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05) (Ek 3). Genel olarak ultrason süresinin, kolajen konsantrasyonunu sıcaklığa göre daha fazla etkilediği görülmektedir. 60 dk ultrason süresinde elde edilen ekstraktların kolajen konsantrasyonlarının daha fazla olduğu görülmüştür. Kolajen konsantrasyonunun en fazla olduğu ekstraksiyon koşulu 25°C-60dk ultrason uygulaması (5061,75 µg/µl) olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında maksimum 14.49±0.72 mg /g kuzu ayağı kolajen verimi elde edilmiştir. Arumugam ve ark. (2018), balık derisiyle yaptıkları çalışmada, maksimum kolajen verimini 19.27 ± 0.05 mg/g balık derisi olarak bildirmişlerdir. Sonuçların birbiriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Kolajen ekstraksiyon verimleri Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3. Kolajen Ekstraksiyon verimleri (Kuru temel)

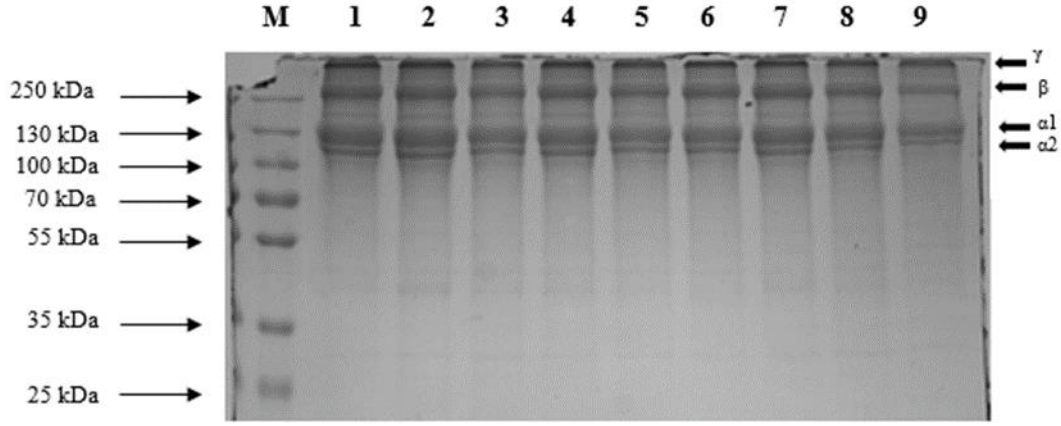
| Ekstraksiyon Koşulu | Ekstraksiyon verimi (% g/ g kuzu ayağı) |
|---------------------|---|
| 20°C-20 dk | 2.06±0.28 |
| 20°C- 40 dk | 5.15±0.64 |
| 20°C- 60 dk | 2.5±0.41 |
| 25°C- 20 dk | 1.77±0.12 |
| 25°C- 40 dk | 3.22±0.15 |
| 25°C- 60 dk | 2.73±0.25 |
| 30°C- 20dk | 2.11±0.11 |
| 30°C-40 dk | 2.44±0.13 |
| 30°C- 60dk | 3.34±0.36 |

Ekstraksiyon verimlerinin %1.77-%5.15 aralığında değiştiği görülmektedir. 20 dk ultrason süresinde elde edilen kolajen örneklerinin daha düşük verime sahip olduğu görülmüştür. En yüksek ekstraksiyon verimine, 20°C-40 dk ultrason uygulamasında ulaşılmıştır. Tan ve Chang (2018), farklı balık türlerinden elde edilen kolajen verimlerinin %2 ila %51,4 arasında değiştiğini bildirmiştir. Farklı asitlerin tavuk ayağı kolajeni verimine etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada, maksimum kolajen verimine laktik asit ile (%8.34±0.99) ulaşılmıştır (Cheng et al., 2009). Literatürdeki çalışmalar ile kıyaslandığında, kuzu ayağı kolajen verimlerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Kuzu ayağındaki çapraz bağların fazla olması, ekstraksiyon süresinin literatürdeki çalışmalara kıyasla daha kısa olması gibi sebeplerden dolayı ekstraksiyon veriminin daha düşük olduğu düşünülmektedir.

Kolajen analizi sonuçları, kuzu ayaklarının alternatif kolajen kaynağı olarak kullanılabilceğini göstermiştir.

4.3. Elektroforez

Kolajen örneklerinin protein dağılımlarını gösteren SDS-PAGE bantları ve alt birim bileşenleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı ekstraksiyon koşullarında elde edilen kolajen örneklerinin SDS-PAGE bantları. (M: Moleküler ağırlık belirteci. 1- 20°C-20 dk. ultrason uygulaması. 2- 20°C-40 dk. ultrason uygulaması. 3- 20°C-60 dk. ultrason uygulaması. 4- 25°C-20 dk. ultrason uygulaması. 5- 25°C-40 dk. ultrason uygulaması. 6- 25°C-60 dk. ultrason uygulaması. 7- 30°C-20 dk. ultrason uygulaması. 8- 30°C-40 dk. ultrason uygulaması. 9- 30°C-60 dk. ultrason uygulaması)

Farklı ekstraksiyon koşulları altında üretilen tüm kolajenlerin, $\alpha 1$, $\alpha 2$, β ve γ zincirlerinden oluştuğu gözlenmiştir (~130 kDa/ $\alpha 1$; ~ 116 kDa/ $\alpha 2$; 250 kDa/ β ; ~300 kDa/ γ). Yüksek moleküler ağırlığa sahip β (α - zincirlerinin dimerleri) ve γ (α - zincirlerinin trimerleri) zincirlerinin varlığı, kuzu ayağı kolajenin yüksek çapraz bağlara sahip olduğunu göstermektedir (Shoulders and Raines, 2009; Skierka and Sadowska, 2007). Kuzu ayağı kolajeni moleküler ağırlık dağılımının ($\alpha 1$ - MW 130 kDa; $\alpha 2$ - MW 116 kDa), literatürde kolajen kaynağı olarak bildirilen sığır tendonu kolajeni ($\alpha 1$ - MW 120 kDa; $\alpha 2$ - MW 116 kDa) (Ran and Wang, 2014), Tilapiya balığı derisi kolajeni ($\alpha 1$ - MW 130 kDa; $\alpha 2$ - MW 120 kDa) (Chen et al., 2016) ve levrek pulu kolajeni ($\alpha 1$ - MW 118 kDa; $\alpha 2$ - MW 105 kDa) (Chuaychan et al., 2015) moleküler ağırlık dağılımı ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. 55 kDa altında ihmal edilebilir düşük molekül ağırlığına sahip proteinlerin varlığı da tespit edilmiştir. Bu durumun, ultrason uygulaması ile birlikte kolajen olmayan bazı proteinlerin de ortaya çıkmış olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Kim et al., 2012; Ali et al., 2018).

SDS-Page elektroforez sonuçlarına göre, 30°C-60 dk. ultrason uygulaması dışındaki tüm sıcaklık ve sürelerde uygulanan ultrason işleminin, kolajen örneklerinin protein bantlarını, moleküler ağırlık veya yoğunluk açısından etkilemediğini göstermiştir. 30°C-60 dk. ultrason uygulamasındaki kolajenin ise diğer parametrelerdeki kolajen örneklerine kıyasla daha düşük α -zinciri yoğunluğuna sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durumun, artan sıcaklık ve ultrason süresine bağlı olarak, protein yapısının etkilenmeye başlamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Elektroforez sonuçları, farklı ekstraksiyon koşulları altında üretilen tüm kolajenlerin yapısal bütünlüğünü koruduğunu ve Tip I kolajenin [α 1(I)]₂ α 2(I)] kuzu ayağı kolajeninin ana bileşeni olduğunu göstermiştir (Kittiphattanabawon et al., 2005; Hashim et al., 2014; Zhou et al., 2016).

4.4. Kolajen Örneklerinin FTIR Spektrumları

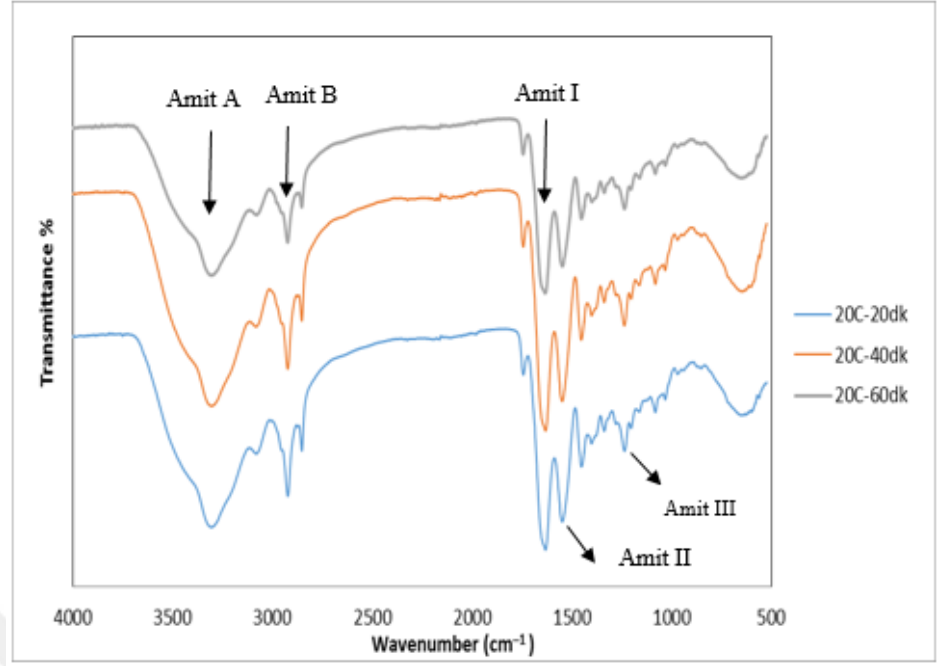
Farklı sıcaklık ve sürelerde elde edilen kolajen örneklerinin FTIR spektrumları Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5’de görülmektedir. Her bir kolajen örneğinin FTIR spektrumları ayrı ayrı olarak EK 4-12’de verilmiştir. Her bir tepe noktasına karşılık gelen fonksiyonel gruplar ve atamaları Tablo 4.4’de verilmiştir. Tüm kolajen örneklerinin FTIR spektrumunda karakteristik olan amit A, amit B, amit I, amit II ve amit III bantları görülmüştür.

Amit A bandı, genellikle N-H germe titreşiminden kaynaklanır ve 3400-3440 cm^{-1} dalga sayısı (Wavenumber) aralığında meydana gelir (Riaz et al., 2018). Farklı ekstraksiyon koşulları altında üretilen kolajen örneklerinin Amit A bantları, “3303-3307 cm^{-1} ” dalga sayısı aralığında görülmüştür. Bu durum, N-H fonksiyonel grubunun hidrojen bağları ile birleştiğinde, bant konumunun daha düşük frekans bölgelerine kaymasından kaynaklanmaktadır (Doyle et al., 1975). 30°C-20 dk ultrason uygulamasındaki kolajen örneğinin Amit A bandı “3303.97 cm^{-1} ” diğer kolajen örneklerine göre daha düşük frekans göstermiştir. Bu durum, polipeptit zincirindeki hidrojen bağına katılan N-H grubunun, 30°C-20 dk’daki kolajen örneğinde daha fazla olduğunu göstermektedir.

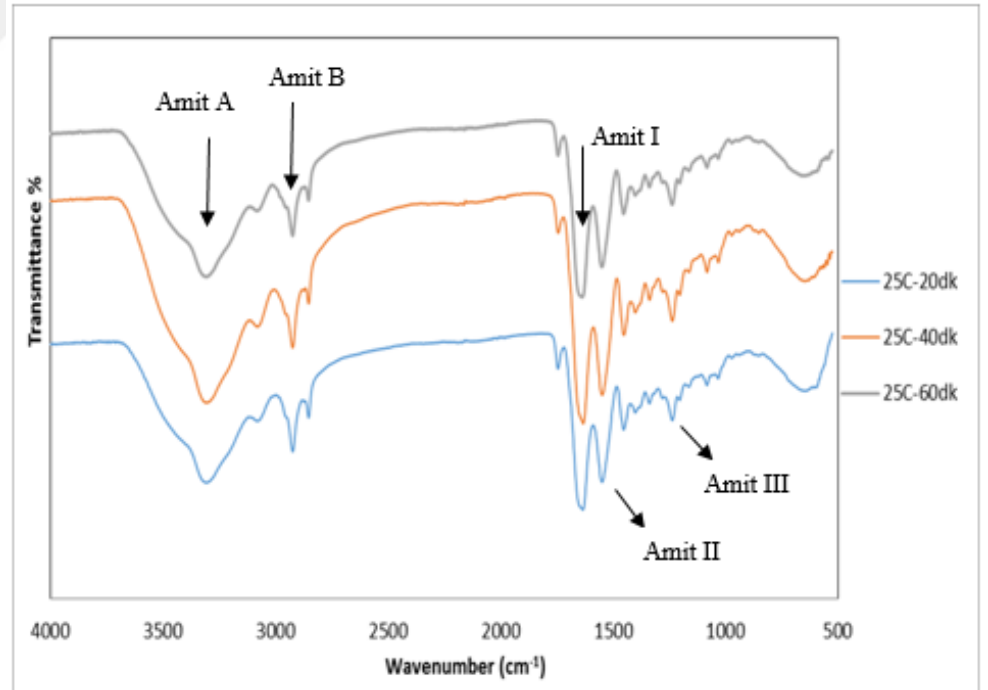
Amit B bandı, asimetrik CH₂ gerilmesi ve -CH₂ alkil zincirinden kaynaklanan emilim ile ilgilidir (Hsu et al., 2005). Kolajen örneklerinin amit B bantları “2922-2924 cm⁻¹” dalga sayısı aralığında görülmüştür. Amit I, II ve III bantlarının, kolajende bulunan moleküler düzenin derecesinden sorumlu olduğu ve sırasıyla C=O gerilmesi, N-H bükülmesi ve C-N gerilmesi sonucu meydana gelen üçlü sarmal yapının oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir (Muyonga et al., 2004). Kolajen örneklerinin amit I, II ve III bantlarının dalga sayısı aralığı sırasıyla “1631-1636 cm⁻¹”, “1547-1549 cm⁻¹”, “1236-1237 cm⁻¹” olarak bulunmuştur. Amit I ve II bantları, 25°C-60 dk ultrason uygulamasında en yüksek frekansı “1636.85 ve 1549.46 cm⁻¹” göstermiştir. Bantların daha yüksek frekans bölgesine kayması, 25°C-60 dk’daki kolajen örneğinin daha yüksek bir moleküler düzene sahip olduğunu, dolayısıyla moleküller arası çapraz bağların da fazla olduğunu göstermektedir (Liang et al., 2014).

Tüm kolajen örneklerinde “1451-1453 cm⁻¹” dalga sayısı aralığında CH₂ bükülmesi gözlenmiştir. Amit III bandı ile “1450-1454 cm⁻¹” bandı arasındaki yoğunluk oranının, 1’e yakın olması kolajenin üçlü sarmal yapısının bozulmadığını göstermektedir (Plepis et al., 1996). Tüm kolajen örnekleri için bu oran 1.17 olarak bulunmuştur.

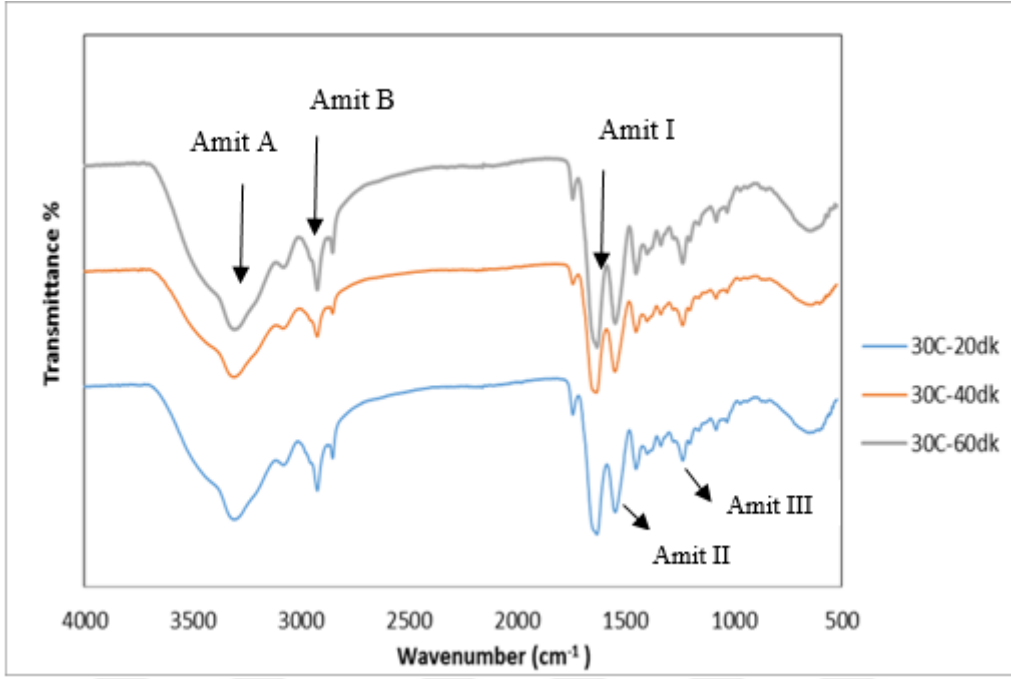
Kuzu ayağından elde edilen kolajenlerin, literatürdeki diğer kolajen örnekleri ile benzer FTIR spektrumları sergilediği görülmüştür (Sinthusamran et al., 2013; Kaewdang et al., 2014; Gao et al., 2017). Farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan ultrason işleminin, kolajen yapısına zarar vermediği FTIR sonuçları ile desteklenmiştir.



Şekil 4.3. 20°C’de farklı ultrason sürelerinde elde edilen kolajenlerin FTIR spektrumları



Şekil 4.4. 25°C’de farklı ultrason sürelerinde elde edilen kolajenlerin FTIR spektrumları



Şekil 4.5. 30°C’de farklı ultrason sürelerinde elde edilen kolajenlerin FTIR spektrumları

Tablo 4.4. Kuzu ayağı kolajenine ait FTIR spektrumunda yer alan bantlar ve atamaları

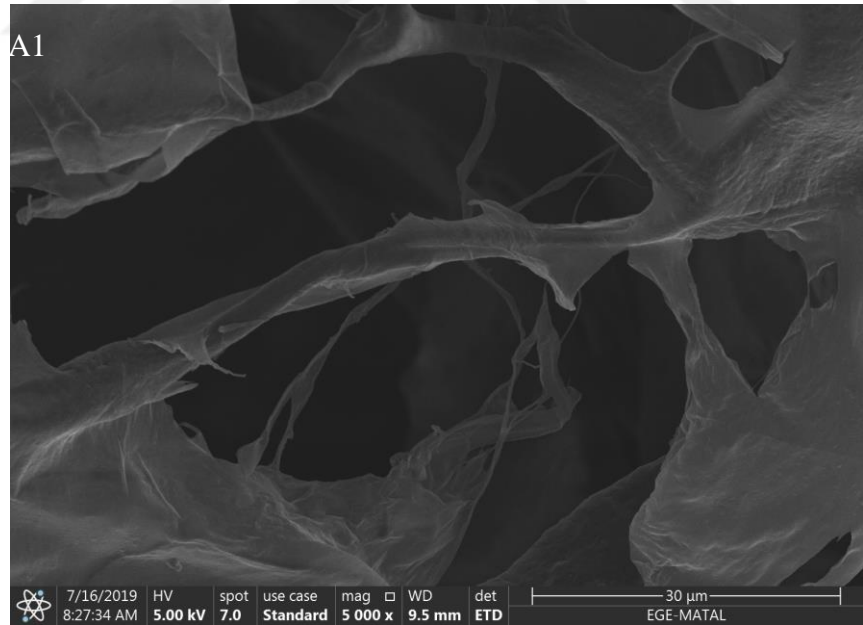
| Bant | Dalga sayısı aralığı (cm ⁻¹) | Atamalar (Liang et al., 2014) |
|---------|--|---|
| Amit A | 3303-3307 | N-H gerilmesi ile intermoleküler H bağı |
| Amit B | 2922-2924 | CH ₂ asimetrik gerilmesi |
| — | 3072-3088 | CH ₂ asimetrik gerilimi |
| Amit I | 1631-1636 | C=O gerilmesi/ COO ⁻ ile birlikte H bağı |
| Amit II | 1547-1549 | N-H bükülmesi, C-N gerilmesi |
| — | 1451-1453 | CH ₂ bükülmesi |

| | | |
|----------|-----------|-------------------------------------|
| — | 1400 | COO ⁻ simetrik gerilmesi |
| — | 1337 | CH ₂ sallanma |
| Amit III | 1236-1237 | N-H bükülmesi, C-N gerilmesi |
| — | 1082 | C-O gerilme titreşimi |
| — | 644-656 | İskelet titreşimi |

— : spektral bölge için ortak bir isim yok.

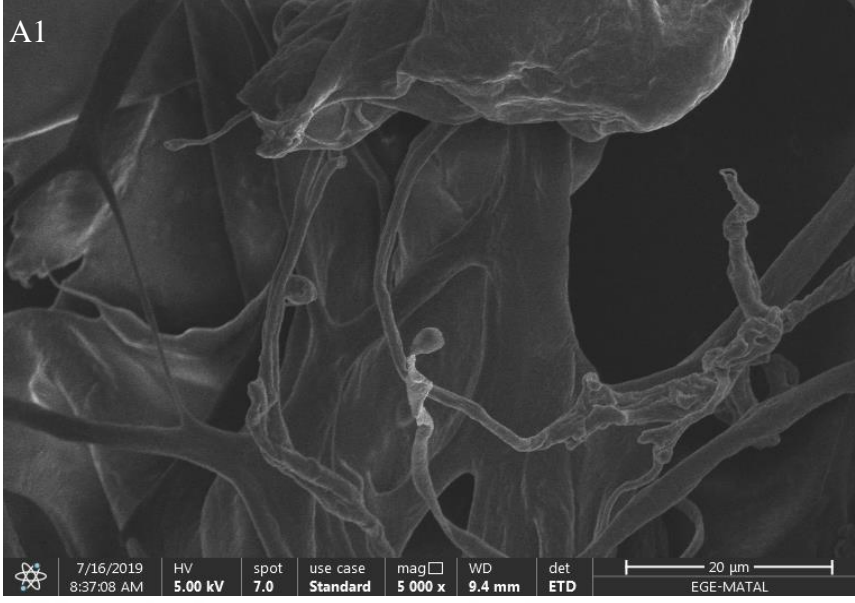
4.5. Kolajen Örneklerinin SEM Analizi

Kolajen örneklerinin yüzey morfolojisi ve parçacık boyutları, taramalı elektron mikroskobu ile belirlenmiştir. SEM görüntüleri 5000x büyütme ile alınmıştır. Farklı ekstraksiyon koşullarında elde edilen kolajen örneklerinin SEM görüntüleri Şekil 4.6 - 4.14' de verilmiştir.



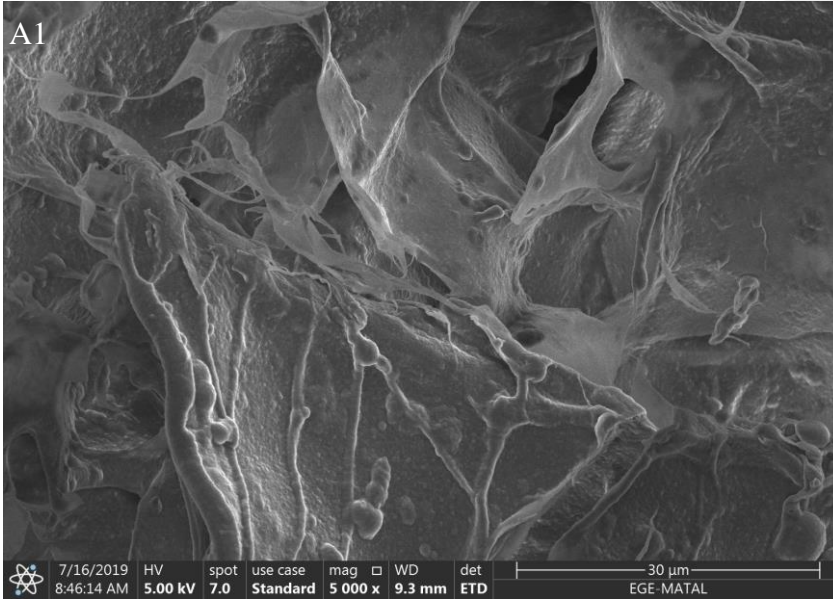
A1: büyütme = 5000x

Şekil 4.6. 20°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



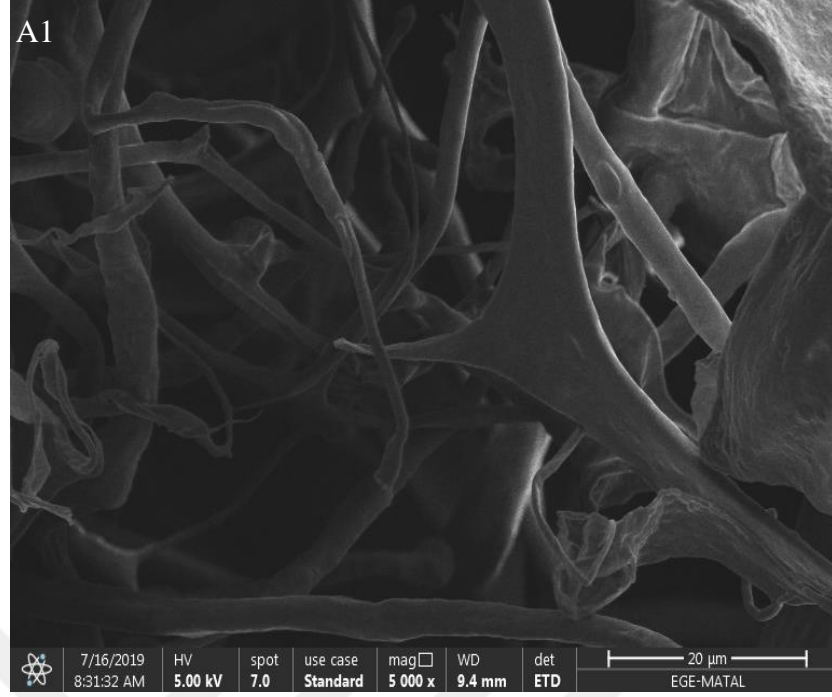
A1: büyütme = 5000x

Şekil 4.7. 25°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



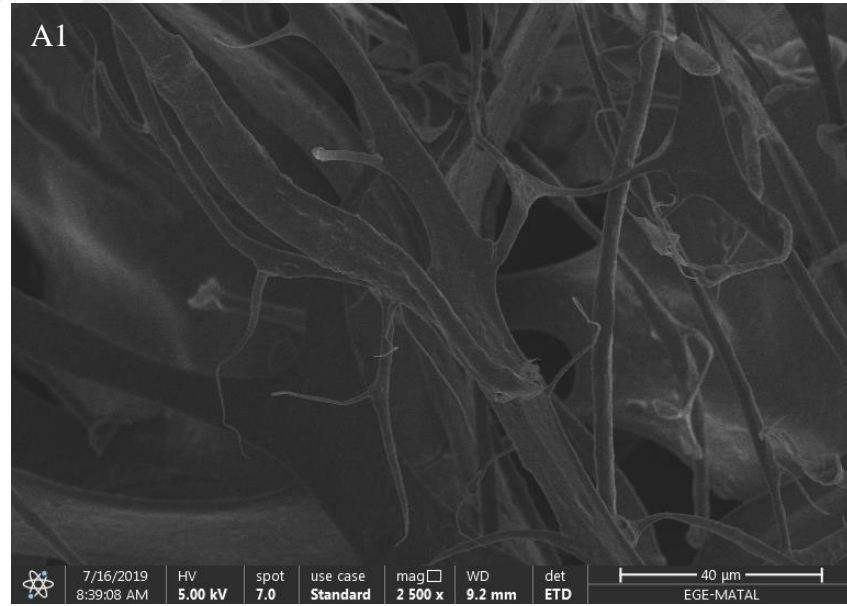
A1: büyütme = 5000x

Şekil 4.8. 30°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



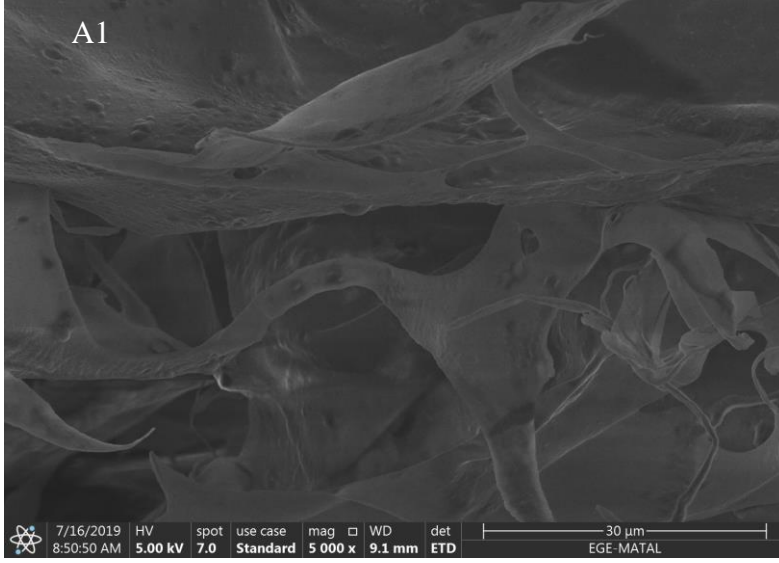
A1: büyütme = 5000x

Şekil 4.9. 20°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



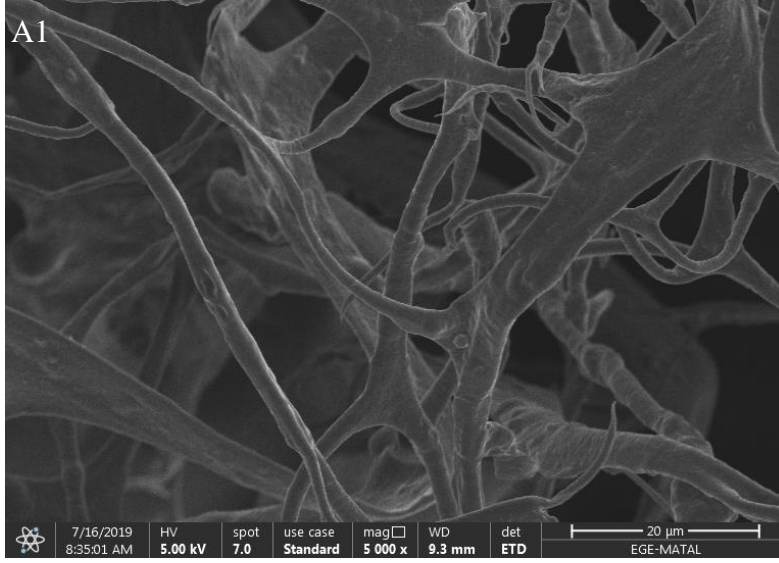
A1: büyütme = 5000x

Şekil 4.10. 25°C-40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



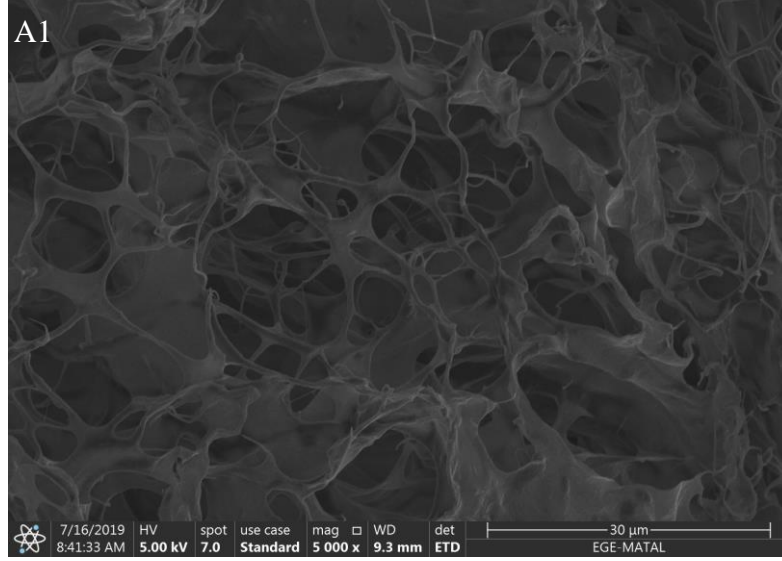
A1: büyütm = 5000x

Şekil 4.11. 30°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



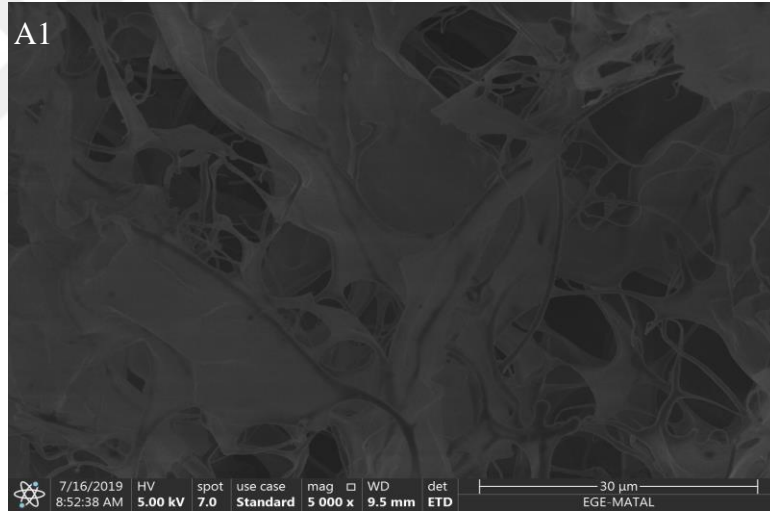
A1: büyütm =5000x

Şekil 4.12. 20°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



A1: büyütme = 5000x

Şekil 4.13. 25°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü



A1: büyütme = 5000x

Şekil 4.14. 30°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin 5000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü

Kolajen örneklerinin yüzey morfolojileri ve mikroyapıları incelendiğinde, tüm örneklerin lifli ve gözenekli yapıya sahip olduğu görülmektedir. Kolajen örneklerinin ortalama lif çapının 0.1~0.9 µm aralığında değiştiği görülmüştür. Ultrason sıcaklığı ve süresine bağlı olarak bazı farklılıklar gözlenmiştir. 20°C'deki kolajen örneklerinde daha düzenli ve belirgin lif yapısı görülürken sıcaklık arttıkça, daha düzensiz, pürüzlü ve küçük gözeneklere sahip süngerimsi

yapı gözlenmiştir. Sıcaklığın ve artan ultrason sürelerinin kolajen yapısını etkilediği açık şekilde görülmektedir. Daha yüksek sıcaklıklarda, kolajendeki lif yapısının kaybolmaya başladığı gözlenmiştir. Bu durumun, kolajendeki üçlü sarmal yapının kırılmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Özellikle 30°C’de farklı ultrason sürelerinde elde edilen kolajen örneklerinde, pürüzlü ve çok katmanlı yapı gözlenmiştir. Bu durumun liyofilizasyon sırasındaki dehidrasyondan kaynaklı olabileceği bildirilmiştir(Wang et al., 2014; Zou et al., 2017).

İç içe geçmiş tabakalar arasındaki boşluk, kolajene gözeneklilik kazandırmaktadır. Spiral benzeri görünümdeki lifler, literatürde bildirildiği gibi, birbirine bağlanmış bir tabaka olarak gözlenmiştir (Zhou et al., 2016; Zou et al., 2017; Arumugam et al., 2018). Gözeneklilik, gözeneklerin büyüklüğü ve malzeme yüzey alanı, biyomalzemelerin biyomedikal açıdan önemli parametreleri olarak kabul edilmektedir. Kuzu ayağından elde edilen kolajendeki homojen ve düzenli ağ yapısı, ilaç taşıyıcı olarak kolajeni elverişli hale getirmektedir (Ho et al., 1997; Tamilmozhi et al., 2013; Veeruraj et al., 2013; Jeevithan et al., 2015).

SEM analizi sonuçları, kolajen örneklerinin mikroskobik yapısının ultrasonik dalga uygulamasındaki kavitasyondan ve mekanik salınımlardan etkilendiğini ve ultrason uygulamasının görünür fiziksel değişikliklere neden olduğunu göstermiştir.

4.6. Kolajen Örneklerinin Renk Değerleri

Farklı ekstraksiyon koşulları altında (sıcaklık ve ultrason süresi) üretilen kolajen örneklerinin renk değerleri (L^* , a^* ve b^*) Tablo 4.5’de, liyofilize kolajen örneği (25°C- 60 dk) görseli Şekil 4.15’de verilmiştir.

Tablo 4.5. Farklı ekstraksiyon koşulları altında üretilen kolajen örneklerinin renk değerleri

| Parametre | L* | a* | b* |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 20°C-20dk | 67,51±0,47 ^b | 0,82±0,02 ^c | 9,39±0,13 ^d |
| 20°C-40 dk | 63,97±1,87 ^a | -0,11±0,05 ^a | 8,39±0,53 ^{bc} |
| 20°C- 60dk | 64,37±1,02 ^a | 0,42±0,05 ^b | 8,92±0,18 ^{cd} |
| 25°C- 20 dk | 63,17±0,52 ^a | -0,03±0,08 ^a | 8,75±0,14 ^c |
| 25°C- 40 dk | 71,31±0,22 ^c | -0,09±0,02 ^a | 7,72±0,16 ^a |
| 25°C- 60 dk | 69,48±0,28 ^{cd} | 1,02±0,06 ^d | 11,93±0,31 ^f |
| 30°C- 20 dk | 71,44±0,56 ^d | 0,45±0,02 ^b | 10,40±0,14 ^c |
| 30°C- 40 dk | 71,39±0,36 ^d | -0,075±0,01 ^a | 8,14±0,03 ^{ab} |
| 30°C- 60 dk | 81,64±0,07 ^e | -0,025±0,01 ^a | 8,47±0,008 ^{bc} |

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



Şekil 4.15. 25°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen liyofilize kolajen örneği

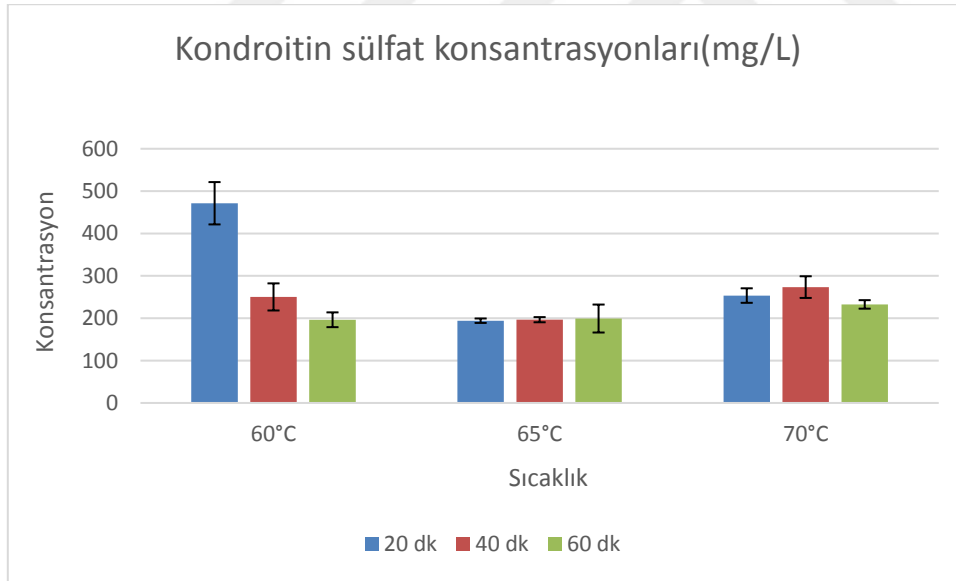
Kolajen örneklerinin L* değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) (Ek 13). Ultrason süresi sabitken, sıcaklık artışına bağlı olarak L* değerlerinin genellikle arttığı görülmektedir. 30°C sıcaklıkta elde edilen kolajen örneklerinde daha parlak renk gözlenmiştir. Sıcaklık artışına bağlı olarak a* ve b* değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) (Ek 14-15).

Ticari sığır jelatininin L* değeri ($69,70 \pm 0,56$), a* değeri ($2,36 \pm 0,10$), b* değeri ($21,38 \pm 0,12$) olarak bildirilmiştir (Widyasari and Rawdkuen, 2014). Kuzu ayağı kolajeni ile kıyaslandığında, parlaklık (L*) değerinin 25°C-60 dk ultrason uygulamasıyla elde edilen kolajen örneğiyle (L*: $69,48 \pm 0,28$) benzerlik

gösterdiği, ancak kırmızılık (a^*) ve sarılık (b^*) değerlerinin tamamen farklı olduğu görülmüştür. Bu durum, jelatinin kolajene göre daha yüksek sıcaklıklarda ve uzun sürelerde ekstrakte edilmesi, ön işlem esnasında kullanılan kimyasallar, hammadde farklılığı vb. nedenlerden kaynaklanmaktadır (Erge ve Zorba, 2016). Tavuk ayağıyla yapılan bir çalışmada ise, laktik asit ile 12-48 saat aralığında ekstraksiyon işlemiyle elde edilen kolajenin renk değerleri aralığı L^* değerleri (64.06 ± 1.78 - 69.20 ± 0.93), a^* değerleri (4.47 ± 0.67 – 2.27 ± 0.51), b^* değerleri (18.88 ± 0.19 – 19.27 ± 0.17) olarak bildirilmiştir (Liu et al., 2001). Kuzu ayağı kolajeni renk değerleriyle kıyaslandığında, özellikle a^* ve b^* değerlerinin farklı olduğu göze çarpmaktadır. Kolajen renk değerlerinin, elde edildiği hammadde ve işlem koşullarına bağlı olarak değiştiği görülmektedir.

4.7. Kondroitin Sülfat Analiz Sonuçları

Farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan ultrason işleminin kondroitin sülfat konsantrasyonlarına etkisi Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ultrason süresinin kondroitin sülfat konsantrasyonuna etkisi

60°C- 20 dk ultrason uygulamasında en yüksek kondroitin sülfat konsantrasyonuna ulaşılmıştır. 60°C sıcaklıkta artan ultrason süresine bağlı olarak kondroitin sülfat konsantrasyonlarında azalma gözlenmiştir. 65°C ve 70°C'deki örneklerin kondroitin sülfat konsantrasyonlarının yakın olduğu görülmektedir.

Farklı ekstraksiyon koşulları altında üretilen örneklerin kondroitin sülfat konsantrasyonları Tablo 4.6’da görülmektedir.

Tablo 4.6. Farklı ekstraksiyon koşulları altında üretilen örneklerin kondroitin sülfat konsantrasyonları

| Ekstraksiyon koşulu | Kondroitin sülfat konsantrasyonu (mg/L) |
|---------------------|---|
| 60°C-20dk | 471,38±49,96 ^b |
| 60°C-40 dk | 250,26±31,96 ^a |
| 60°C- 60dk | 196,35±17,43 ^a |
| 65°C- 20 dk | 194,16±5,26 ^a |
| 65°C- 40 dk | 196,52±6,05 ^a |
| 65°C- 60 dk | 199,24±33 ^a |
| 70°C- 20 dk | 253,47±17,15 ^a |
| 70°C- 40 dk | 273,45±25,59 ^a |
| 70°C- 60 dk | 232,60±10,05 ^a |

60°C-20dk ultrason uygulaması dışındaki, farklı sıcaklık ve sürelerde elde edilen kondroitin sülfat konsantrasyonları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p<0.05$) (Ek 16). Kondroitin sülfat konsantrasyonunun en fazla olduğu ekstraksiyon koşulu 60°C-20dk ultrason uygulaması (471,38±49,96 mg/L) olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında maksimum 8,98±1.19 mg /g kuzu ayağı kondroitin sülfat verimi elde edilmiştir. Sundaresan ve ark. (2018), bufalo soluk borusu, burun kemiği ve eklem kıkırdaklarından elde edilen kondroitin sülfat verimlerini kuru temelde 62.05±0.5, 60.47±1.19 ve 60.76±0.38 mg/g olarak bildirmişlerdir. Kondroitin sülfat ekstraksiyon verimleri Tablo 4.7’de verilmiştir.

20 g / 100 g kuru kıkırdak dokusu oluşturan CS-peptidin yüksek verim ekstraksiyonunun mümkün olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.7. Kondroitin sülfat ekstraksiyon verimleri (Kuru temel)

| Ekstraksiyon Koşulu | Ekstraksiyon verimi (% g/ g kuzu ayağı) |
|---------------------|--|
| 60°C-20 dk | 9.54±0,09 |
| 60°C- 40 dk | 8.24±0,15 |
| 60°C- 60 dk | 8.56±0.13 |
| 65°C- 20 dk | 6.77±0.09 |
| 65°C- 40 dk | 8.40±0.07 |
| 65°C- 60 dk | 7.27±0.11 |
| 70°C- 20dk | 7.82±0.08 |
| 70°C-40 dk | 8.56±0.09 |
| 70°C- 60dk | 8.82±0.13 |

Kondroitin sülfat konsantrasyonunun en fazla olduğu 60°C-20 dk parametresinde en yüksek ekstraksiyon verimine ulaşılmıştır. Ekstraksiyon verimlerinin %6.77- %9.54 aralığında değiştiği görülmektedir. Tavuk omurgası ile yapılan iki farklı çalışmada kondroitin sülfat verimi %15 olarak bildirilmiştir (Khan et al., 2013; Rani ve Goyal, 2017). Çin mersin balığı kıkırdağı ile yapılan bir optimizasyon çalışmasında ise maksimum kondroitin sülfat verimi %26.51 olarak bildirilmiştir (Zhao et al., 2012). Bu çalışmada elde edilen ekstraksiyon verimleri ile literatüre göre daha düşük bulunmuştur. Çalışmalarda genellikle kondroitince zengin kıkırdak dokularının kullanıldığı görülmüştür. Bu çalışmada ise kıkırdakla birlikte deri, kemik parçaları vb. içeren kuzu ayakları kullanılmıştır. Dolayısıyla kuzu ayaklarının kondroitin sülfatla birlikte farklı GAG fraksiyonlarını da içerdiği bu durumda verimi etkilediği düşünülmektedir.

Kondroitin sülfat analizi sonuçları, kuzu ayaklarının alternatif GAG kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

4.8. GAG Örneklerinin FTIR Spektrumları

GAG örnekleri ve saf kondroitin 4-sülfat standardının (Merck- 9819) FTIR spektrumları sırasıyla Şekil 4.17, Şekil 4.18, 4.19 ve 4.20'de görülmektedir. Her bir GAG örneğinin FTIR spektrumları ayrı ayrı olarak Ek 19-27'de verilmiştir.

Örneklere ait karakteristik bantlar ve dalga sayısı aralıkları Tablo 4.8’de verilmiştir. Örneklerin spektrum sonuçları standart spektrumla karşılaştırılmıştır.

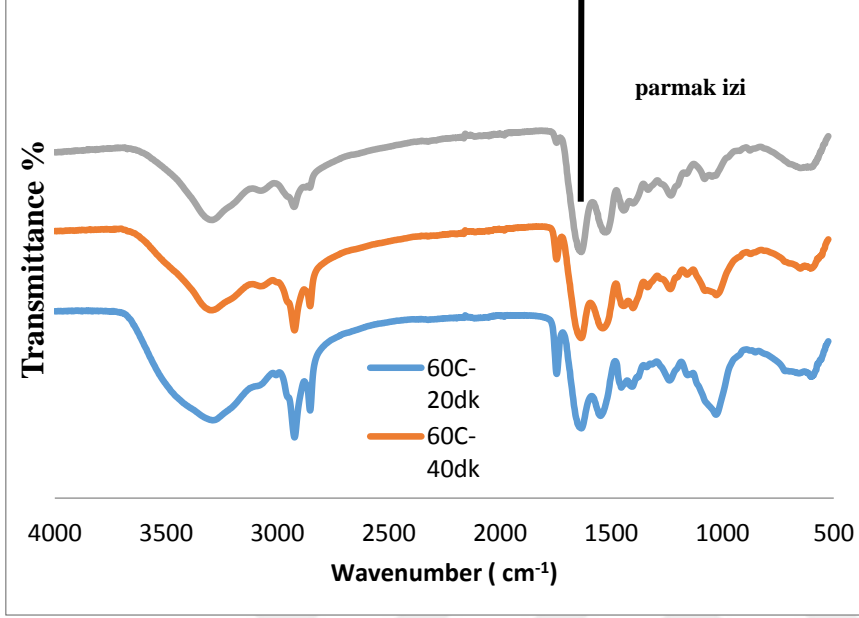
Tablo 4.8. Tüm GAG örnekleri ve kondroitin 4-sülfat standardına ait FTIR spektrumundaki karakteristik bantlar ve dalga sayısı aralıkları

| Karakteristik Bantlar | Dalga sayısı aralığı (cm ⁻¹) | |
|--|--|---------------|
| | Standart | GAG örnekleri |
| O-H gerilme titreşimi (Christou et al., 2018) | 3285 | 3290 - 3304 |
| Alifatik C-H (Ramdhani, 2017) | 2879 | 2927- 2853 |
| Amit grubunun -CONH titreşimi (Khan et al., 2013) | 1608 | 1633 - 1639 |
| C-O gerilme titreşimi bağlantısı, Serbest COO- varlığı (Khan et al., 2013) | 1403 | 1435 - 1454 |
| C=O (-COO) titreşimi (Zhao et al., 2013) | 1374 | 1334- 1336 |
| S=O gerilme titreşimi (Khan et al., 2013) | 1221 | 1228 - 1238 |
| C-O (Ramdhani, 2017) | 1025 | 1072 -1081 |

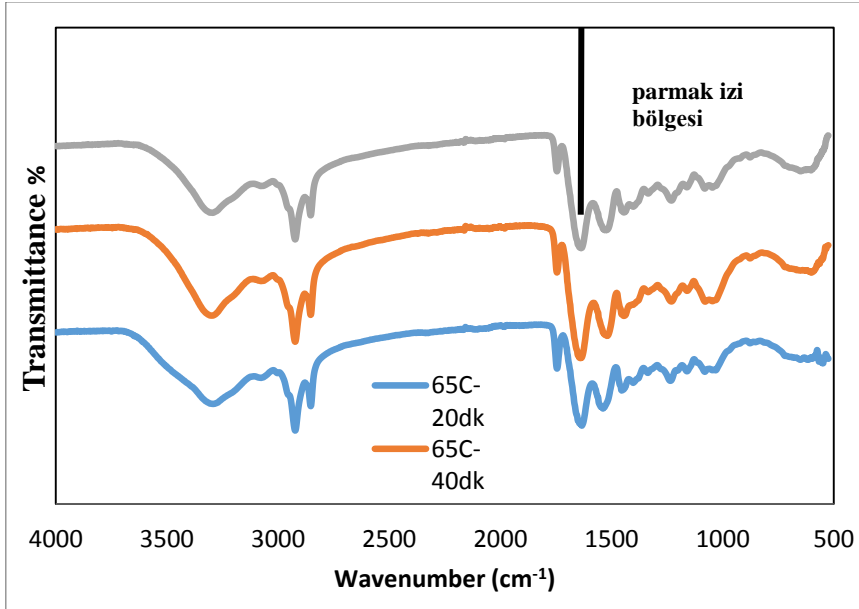
FTIR analizi sonucunda, farklı ekstraksiyon koşulları altında elde edilen GAG örnekleri ile standarda ait spektrumlarının benzerlik gösterdiği görülmüştür. 1633 – 1639 cm⁻¹ dalga sayısı aralığı karbonil grubunu; 1228 – 1238 cm⁻¹ dalga sayısı aralığı sülfat grubunu (O=S=O) göstermektedir (Ramdhani, 2017). Saarakkala vd. (2010), 1374 cm⁻¹ dalga sayısında glukozaminoglikanlara ait CH₃ gerilme titreşiminin olduğunu bildirmiştir. Tüm GAG örnekleri bu değere yakın dalga sayısı aralığı (1334- 1336 cm⁻¹) göstermiştir. Yaklaşık 1240-925 cm⁻¹ dalga sayısı aralığındaki bantların, sakkarit halkası ve sülfat gruplarına ait karakteristik bantlar olabileceği belirtilmiştir (Zhao et al., 2013).

Aynı sıcaklıkta farklı ultrason sürelerinde elde edilen GAG örneklerinin FTIR spektrumlarının benzer olduğu gözlenmiştir. Ancak sıcaklık artışına bağlı olarak örneklerin parmak izi bölgesinde farklılıklar gözlenmiştir. Bu farklılığın

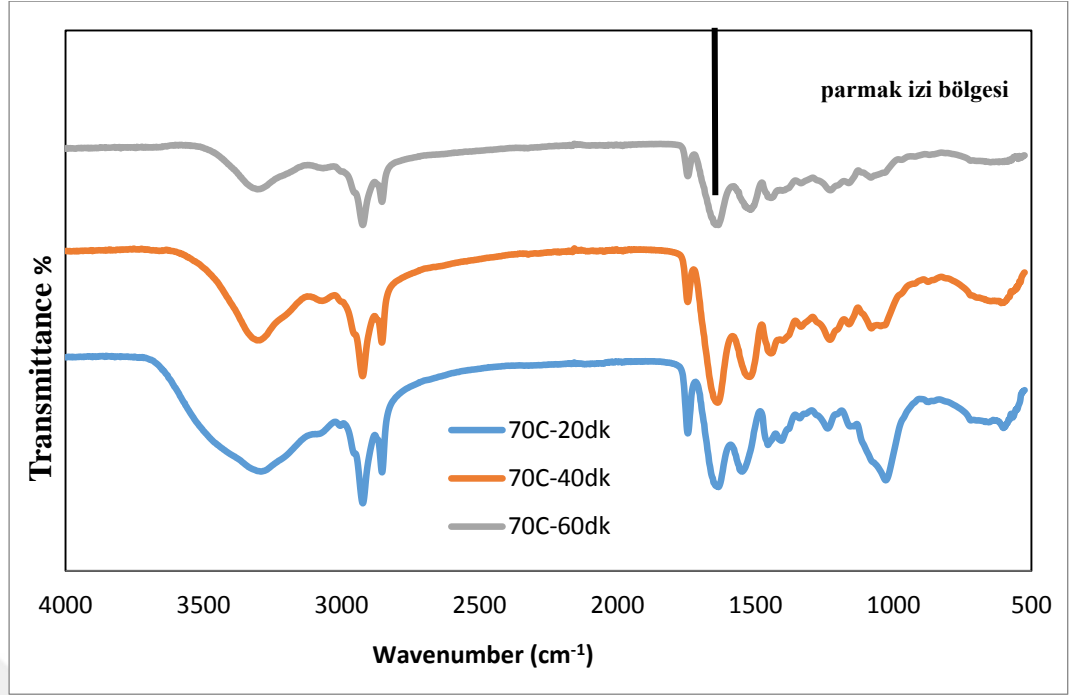
sıcaklık artışına bağlı olarak yapıda bazı değişikliklerin meydana gelmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



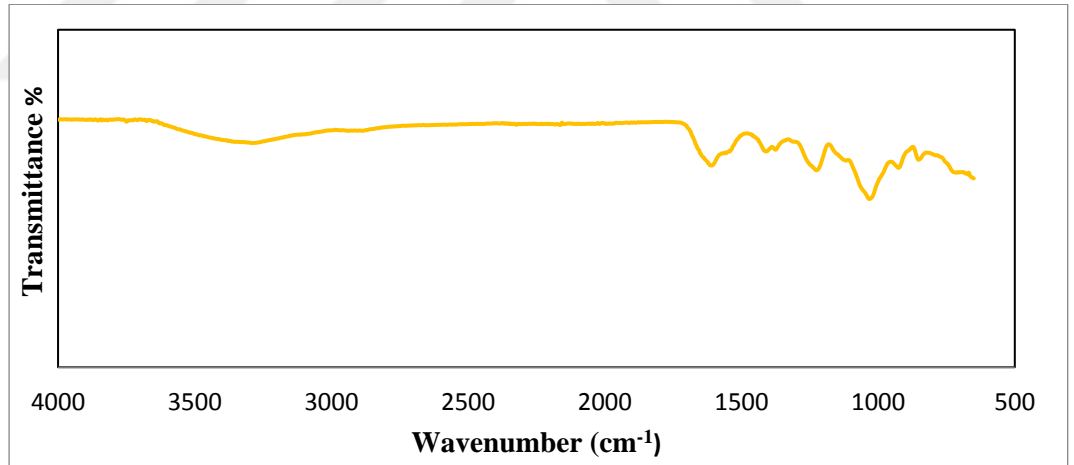
Şekil 4.17. 60°C’de farklı ultrason sürelerinde elde edilen GAG örneklerinin FTIR spektrumları



Şekil 4.18. 65°C’de farklı ultrason sürelerinde elde edilen GAG örneklerinin FTIR spektrumları



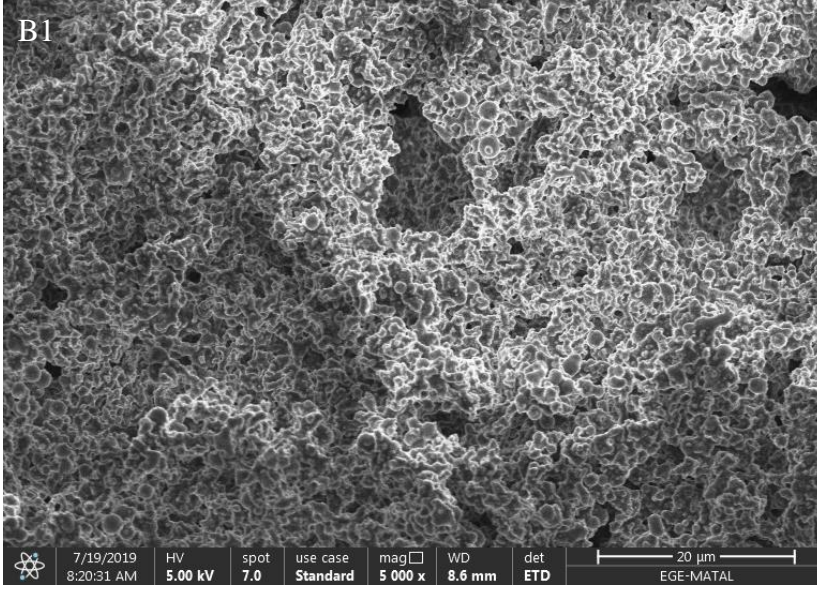
Şekil 4.19. 70°C'de farklı ultrason sürelerinde elde edilen GAG örneklerinin FTIR spektrumları



Şekil 4.20. Saf kondroitin 4- sülfat standardının FTIR spektrumu

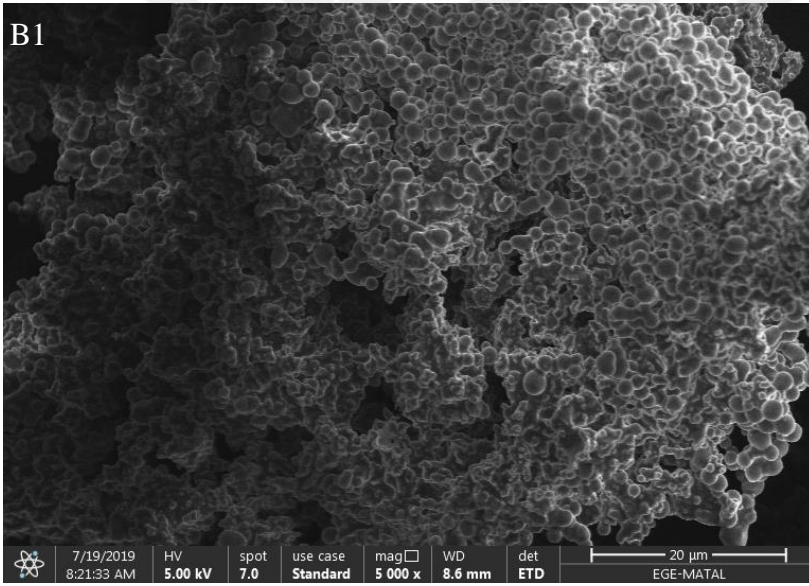
4.9. GAG Örneklerinin SEM Analizi

GAG örneklerinin yüzey morfolojisi ve parçacık boyutları, taramalı elektron mikroskobu ile belirlenmiştir. SEM görüntüleri 5000x büyütme ile alınmıştır. Farklı ekstraksiyon koşullarında elde edilen GAG örneklerinin SEM görüntüleri Şekil 4.21-4.29' da verilmiştir.



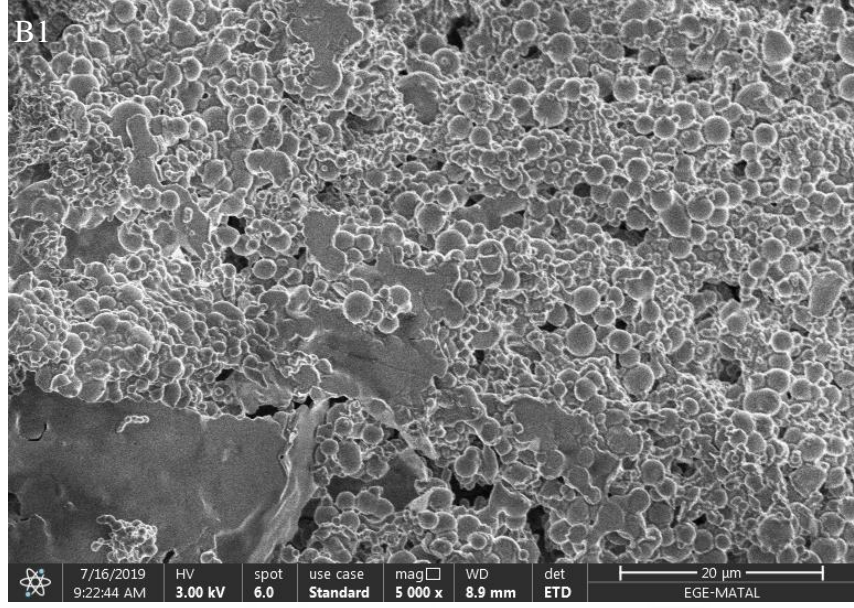
B1: büyütme = 5000x

Şekil 4.21. 60°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneği



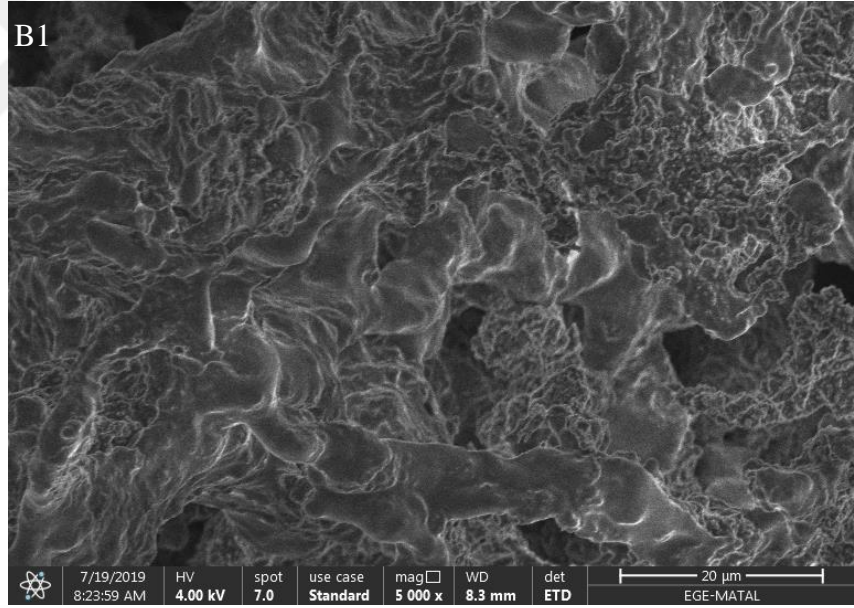
B1: büyütme = 5000x

Şekil 4.22. 60°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneği



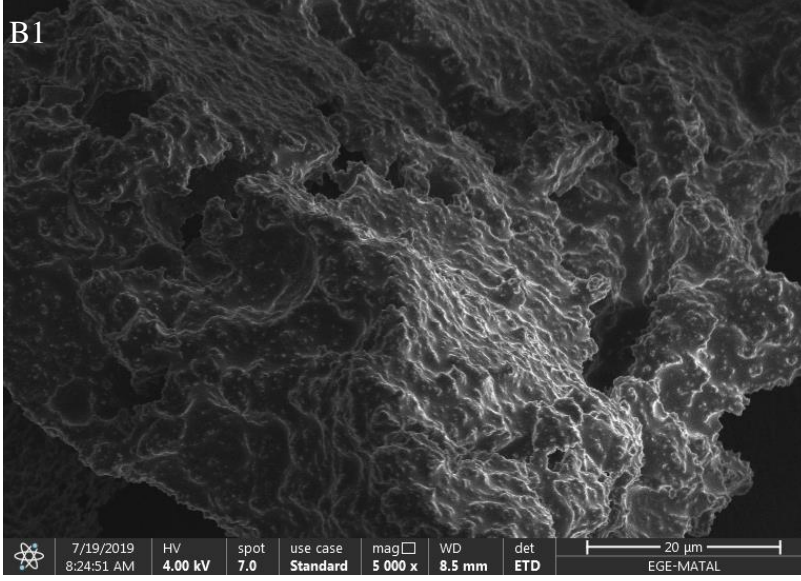
B1: büyütme = 5000x

Şekil 4.23. 60°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneği



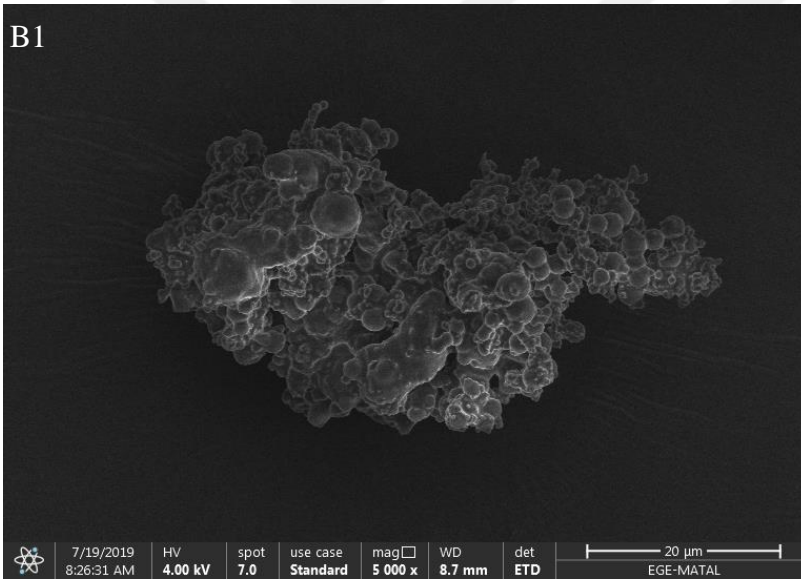
B1: büyütme = 5000x

Şekil 4.24. 65°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneği



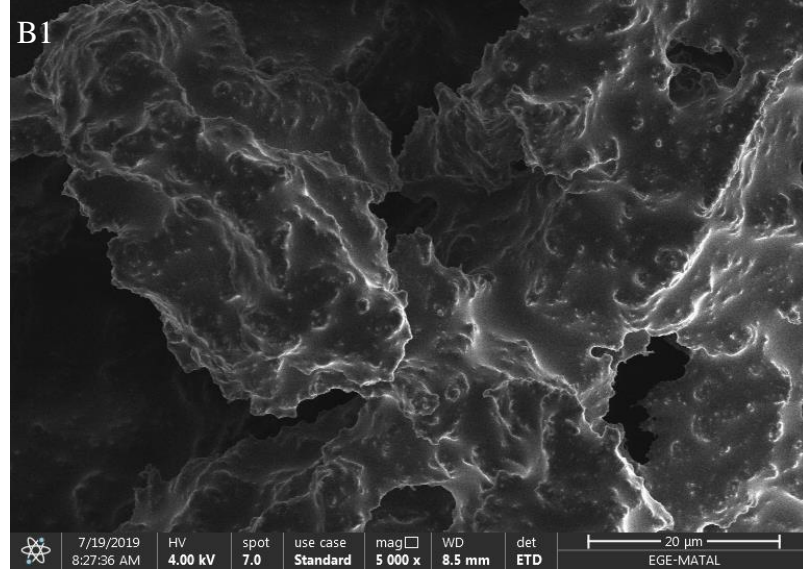
B1: büyütme = 5000x

Şekil 4.25. 65°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneği



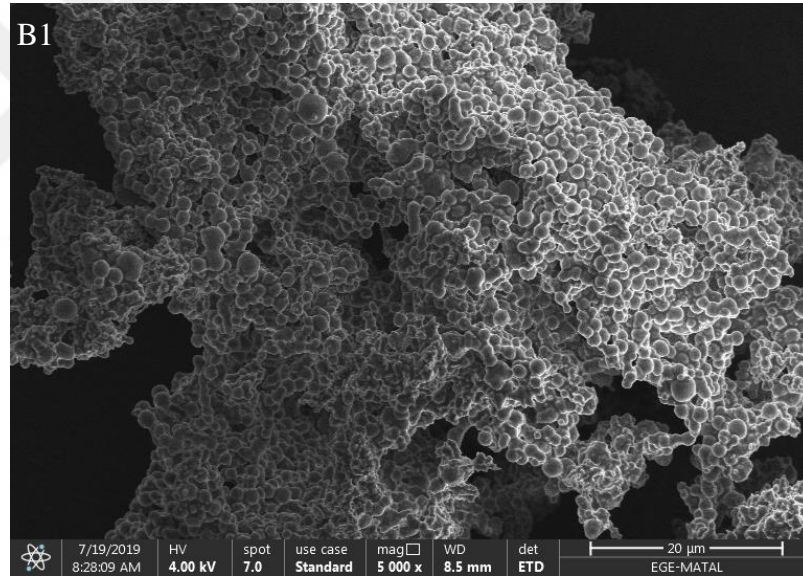
B1: büyütme = 5000x

Şekil 4.26. 65°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneği



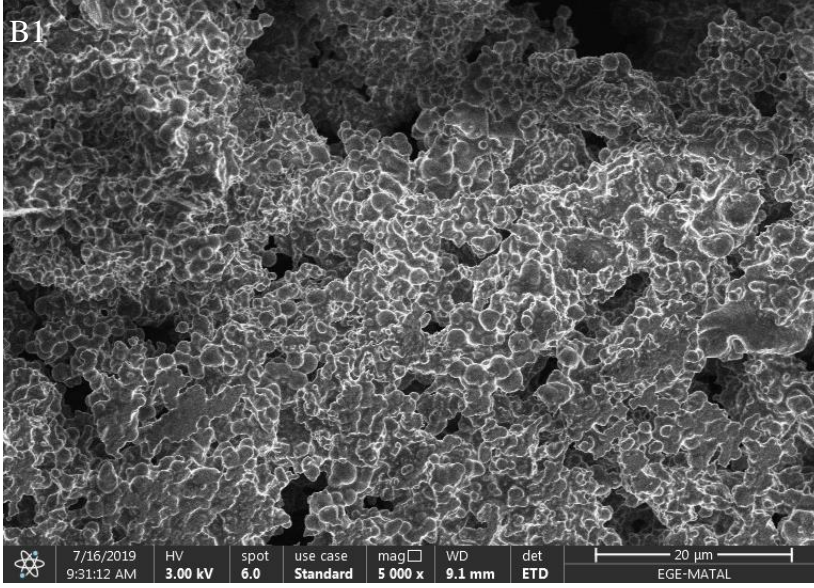
B1: büyütme = 5000x

Şekil 4.27. 70°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneği



B1: büyütme = 5000x

Şekil 4.28. 70°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneği



B1: büyütme = 5000x

Şekil 4.29. 70°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneği

GAG örneklerinin ortalama parçacık boyutunun 1~5 µm arasında değiştiği görülmüştür. Polisakkaritler genellikle 0.1-1 nm çapındaki zincirlerden oluşmaktadır (Li et al., 2017). GAG örneklerinin daha geniş çap aralığında zincirlere sahip olması, kondroitin sülfat ile küme oluşturan çekirdek proteinlerin varlığından kaynaklanmaktadır (Rani et al., 2017).

GAG örneklerindeki kümeleşmiş yapının ultrason süresi ve sıcaklığına bağlı olarak değiştiği görülmüştür. 60°C sıcaklıktaki ultrason uygulamalarında elde edilen GAG'larda daha sık ve düzenli küme yapısı gözlenmiştir. Kolajen örneklerinde olduğu gibi, GAG moleküllerinin mikroskobik yapısının da farklı ultrason koşulları altında değiştiği görülmüştür.

4.10. GAG Örneklerinin Renk Değerleri

Farklı ekstraksiyon koşulları altında üretilen GAG örnekleri ve Kondroitin 4-sülfat standardına ait CIELAB (L*, a* ve b*) değerleri Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Farklı ekstraksiyon koşulları altında üretilen GAG örnekleri ve kondroitin 4-sülfat standardına ait renk değerleri

| Parametre | L* | a* | b* |
|---------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 60°C-20dk | 90,99±1,22 ^{ab} | 0,30±0,02 ^b | 10,20±0,37 ^{bc} |
| 60°C-40 dk | 90,78±0,45 ^a | 0,33±0,05 ^b | 9,41±0,69 ^{abc} |
| 60°C- 60dk | 91,57±1,23 ^{ab} | 0,40±0,05 ^b | 9,28±1,12 ^{abc} |
| 65°C- 20 dk | 93,01±1,11 ^{ab} | 0±0,08 ^b | 7,05±0,62 ^a |
| 65°C- 40 dk | 88,43±2,81 ^a | 0,24±0,02 ^b | 7,84±0,45 ^{ab} |
| 65°C- 60 dk | 92,63±0,82 ^{ab} | -0,15±0,06 ^b | 8,68±0,89 ^{abc} |
| 70°C- 20 dk | 88,45±0,37 ^a | 0,28±0,02 ^b | 14,38±0,08 ^d |
| 70°C- 40 dk | 89,62±2,34 ^a | 0,03±0,01 ^b | 8,58±1,20 ^{abc} |
| 70°C- 60 dk | 89,56±4,08 ^a | 0,03±0,01 ^b | 8,32±2,32 ^{ab} |
| Kondroitin 4-sülfat | 95,49±1,23 ^b | -1,23±0,20 ^a | 11,02±0,95 ^c |

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



Şekil 4.30. 60°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen liyofilize kolajen örneği

Kondroitin 4-sülfat standardı (Kontrol örneği) ile GAG örneklerinin L*, a* ve b* değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05) (Ek 28-30). Bu durumun hammadde farklılığı, saflık derecesi ve işlem koşullarının farklı olması gibi faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kontrol örneğine en yakın renk değerini 65°C- 60 dk ultrason uygulamasıyla elde edilen GAG örneği göstermiştir. Genellikle aynı sıcaklıktaki farklı ultrason sürelerinin GAG örneklerinin L* ve a* değerleri üzerine önemli bir etkisi olmadığı görülmektedir. Örneklerin a* değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sarılık değerlerinin, genellikle artan ultrason süresine bağlı olarak azalış eğilimi gösterdiği görülmüştür. Farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan ultrason işleminin genel olarak GAG örneklerinin renk değerleri üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında, elde edilen sonuç ve öneriler aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

1- Hayvansal yan ürünlerin genellikle gübre, hayvan yemi ve yakıt üretiminde kullanıldığı bilinmektedir. Bu yan ürünlerden katma değeri yüksek ürün elde etmek için giderek büyüyen bir pazar mevcuttur. Bu kapsamda hammadde olarak seçilen kuzu ayaklarının katma değeri yüksek kolajen ve GAG eldesi için değerlendirilebilirliğinin incelenmesi hedeflenmiştir. Kuzu ayaklarının protein içeriği kuru madde bazında %39 olarak belirlenmiştir. Literatürdeki diğer kolajen kaynakları ile karşılaştırıldığında, kuzu ayaklarının protein içeriğinin yüksek olduğu görülmüştür. Bununla beraber, kuzu ayaklarının karides ve yengeç gibi kabuklu deniz hayvanlarında olduğu gibi alerjen maddeleri içermemesi ve daha ucuz olması açısından, GAG üretiminde iyi bir hammadde olabileceği düşünülmektedir.

2- Kolajen eldesinde, tuzla çöktürme, asitle hidroliz ve enzimatik hidroliz yöntemleri kullanılmaktadır. Enzimatik hidroliz yönteminin diğer yöntemlere göre daha yüksek kolajen verimi sunduğu bilinmektedir. Bununla beraber, kolajen ekstraksiyonunda ultrason uygulaması ile ilgili çalışmaların son yıllarda artış gösterdiği görülmüştür. Bu çalışma kapsamında, yüksek protein verimi elde etmek ve ultrason uygulamasının kolajen yapısı üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla enzimatik hidroliz yöntemi ile birlikte 3 farklı sıcaklık (20°C, 25°C, 30°C) ve sürede (20, 40, 60 dk) ultrason destekli ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Farklı sıcaklık ve ultrason süresinde elde edilen kolajenler arasındaki verim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). En yüksek kolajen konsantrasyonuna 25°C-60 dk'lık ultrason uygulaması ile ulaşılmıştır. Bu koşullar altında maksimum 14.49 ± 0.72 mg /g kuzu ayağı kolajen verimi elde edilmiştir.

3- GAG ekstraksiyonunda 3 farklı sıcaklık (20°C, 25°C, 30°C) ve ultrason süresi (20, 40, 60 dk) kullanılmıştır. 60°C-20dk ultrason uygulaması dışındaki, farklı sıcaklık ve sürelerde elde edilen kondroitin sülfat konsantrasyonları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p < 0.05$). En yüksek

kondroitin içeriğine 60°C-20 dk'lık ultrason uygulaması ile ulaşılmıştır. Bu koşullar altında 8,98±1.19 mg /g kuzu ayağı kondroitin sülfat verimi elde edilmiştir.

4- Farklı parametrelerdeki kolajen örneklerinin L* değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). Özellikle sıcaklığın L* değerlerini etkilediği görülmüştür. Örneklerin a* değerleri arasındaki fark 5 grup için anlamlı bulunmazken, kalan 4 grup ile fark anlamlı bulunmuştur. Aynı sıcaklıkta, artan ultrason süresine bağlı olarak sarılık (+b*) değerleri arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. İşlem koşullarına bağlı olarak rengin farklılık gösterdiği görülmüştür.

5- Kondroitin 4-sülfat standardı (Kontrol örneği) ile GAG örneklerinin L*, a* ve b* değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). Örneklerin a* değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, b* değerleri arasındaki fark 3 grup için anlamlı bulunmuştur. Genel olarak farklı sıcaklık ve sürelerde uygulana ultrason işleminin GAG örneklerinin renk değerleri üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür.

6- SDS-Page elektroforez sonuçlarına göre, farklı ekstraksiyon koşullarında üretilen tüm kolajenlerin, sırasıyla ~130 kDa, ~ 116 kDa, 250 kDa ve ~300 kDa moleküler ağırlığa sahip α_1 , α_2 , β ve γ zincirinden oluştuğu görülmüştür. Kolajenlerin elektroforetik desenleri, üçlü sarmal yapının korunduğunu ve Tip I kolajenin [$\alpha_1(I)$] $_2$ $\alpha_2(I)$] kuzu ayağı kolajeninin ana bileşeni olduğunu göstermiştir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, kolajen yapısının bozulmaması için ekstraksiyon işleminin genellikle daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirildiği görülmüştür. Yapılan çalışma ile birlikte artan sıcaklık ve ultrason süresine bağlı olarak, kolajenin bantları arasında bir farklılık gözlemlenmemiştir. Ancak sıcaklık ile birlikte ultrason uygulamasının kolajen yapısı üzerine etkilerinin daha detaylı şekilde incelenmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın, gelecekteki çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

7- Farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan ultrason işleminin, kolajen yapısına zarar vermediği FTIR sonuçları ile desteklenmiştir. Tüm kolajen örneklerinin FTIR spektrumunda karakteristik olan amit A, amit B, amit I, amit II ve amit III bantları görülmüştür.

8- FTIR analizi sonucunda, farklı ekstraksiyon koşulları altında elde edilen GAG örnekleri ile standarda ait spektrumlarının benzerlik gösterdiği görülmüştür. Aynı sıcaklıkta farklı ultrason sürelerinde elde edilen GAG örneklerinin FTIR spektrumlarının benzer olduğu gözlenmiştir. Ancak sıcaklık artışına bağlı olarak örneklerin parmak izi bölgesinde farklılıklar gözlenmiştir. Bu farklılığın sıcaklık artışına bağlı olarak yapıda bazı değişikliklerin meydana gelmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

9- SEM analizi sonuçları, tüm kolajen örneklerinin lifli ve gözenekli yapıya sahip olduğunu göstermiştir. Kolajen örneklerinin ortalama lif çapının 0.1~0.9 µm aralığında değiştiği görülmüştür. Ultrason sıcaklığı ve süresine bağlı olarak bazı farklılıklar gözlenmiştir. Kolajen örneklerinin mikroskobik yapısının ultrasonik dalga uygulamasındaki kavitasyondan ve mekanik salınımlardan etkilendiği ve ultrason uygulamasının görünür fiziksel değişikliklere sebep olduğu görülmüştür.

10- SEM analizi sonucunda, GAG örneklerinin ortalama parçacık boyutunun 1~5 µm arasında değiştiği görülmüştür. 60°C sıcaklıktaki ultrason uygulamalarında elde edilen GAG'larda daha sık ve düzenli küme yapısı gözlenmiştir. Kolajen örneklerinde olduğu gibi, GAG moleküllerinin mikroskobik yapısının da farklı ultrason koşulları altında değiştiği görülmüştür.

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında, hayvansal yan ürün olarak kabul edilen kuzu ayaklarından katma değeri yüksek yeni ürünler elde edilmiştir. Ekstraksiyon veriminin artırılması için sıcaklık ve süre dışındaki önemli parametrelerin (enzim miktarı, kullanılan çözen ve oranı, ultrason genliği, frekansı gibi) göz önünde bulundurulduğu optimizasyon çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

Ekstrasellüler matriksin önemli iki bileşeni olan kolajen ve GAG moleküllerinin bir arada sinerjistik etki gösterdikleri bilinmektedir. Bununla beraber, kolajen ve kondroitin sülfat içeren gıda takviyeleri eklem rahatsızlıklarında sıklıkla kullanılmaktadır. Gıda takviyelerine ilave olarak, kolajen ve GAG içeren fonksiyonel gıdaların geliştirilebileceği düşünülmektedir. Bu iki bileşenin gıda matriksindeki davranışlarının detaylı şekilde incelenmesi ile birlikte literatüre birçok yenilikçi çalışmanın kazandırılacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

Akgün, I. ve Ögüt, T., 2002, Oral Glukozamin ve Kondroitin Sülfatın Osteoartrit Tedavisindeki Yeri, *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği*, 1(2): 66-70s.

Ali, A. M. M., Kishimura, H. and Benjakul, S., 2018, Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus Jullieni*) as affected by ultrasonication, *Process Biochemistry*, 66: 237-244pp.

Anderson, J. W., Nicolosi, R. J. and Borzelleca, J. F., 2005, Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy, *Food and Chemical Toxicology*, 43(2): 187-201pp.

Anonymous, 2004, US Food and Drug Administration (FDA), <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Allergens/ucm106187.htm>, Son Erişim Tarihi: 27 Kasım 2018.

Anto, J., Iskandar, I. and Rizal, A., 2018, Characteristics of Physical-Chemical Properties of Collagen Extracted from the Skin of Bonylip Barb Fish (*Osteochilus vittatus*), *World Applied Sciences Journal*, 36 (1): 78-84pp.

AOAC International, 1995, Ash of meat in Official Methods of AOAC International, method 920.153.

AOAC International, 1995, Total fat of meat in Official Methods of AOAC International, method 960.39.

AOAC International, 2012, Moisture determination by gravimetry”in Official Methods of AOAC International, method 950.46 B (a).

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Arumugam, G. K. S., Sharma, D., Balakrishnan, R. M. and Ettiyappan, J. B. P., 2018, Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin, *Sustainable Chemistry Pharmacy*, 9: 19-26pp.

Barbut, S., 2010, Microstructure of natural, extruded and co-extruded collagen casings before and after heating, *Italian Journal of Food Science*, 22(2): 126–133pp.

Baziwane, D. and He, Q., 2003, Gelatin: the paramount food additive, *Food Reviews International*, 19(4): 423-435pp.

Bhagwat, P. K. and Dandge, P. B., 2018, Collagen and collagenolytic proteases: A review, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15: 43-55pp.

Bhaskar, N., Modi, V. K., Govindaraju, K., Radha, C. and Lalitha, R. G., 2007, Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass, *Bioresource technology*, 98(2): 388-394pp.

Bhathal, A., Spryszak, M., Louizos, C. and Frankel, G., 2017, Glucosamine and chondroitin use in canines for osteoarthritis: A review, *Open Veterinary Journal*, 7(1): 36-49pp.

Bilek, S. E. and Bayram, S. K., 2015, Fruit juice drink production containing hydrolyzed collagen, *Journal of Functional Foods*, 14: 562-569pp.

Brodsky, B. and Persikov, A. V., 2005, Molecular structure of the collagen triple helix, *Advances in protein chemistry*, 70: 301-339pp.

Cai, L., Feng, J., Regenstein, J., Lv, Y. and Li, J., 2017, Confectionery gels: Effects of low calorie sweeteners on the rheological properties and microstructure of fish gelatin, *Food hydrocolloids*, 67: 157-165pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Cao, H. and Xu, S. Y., 2008, Purification and characterization of type II collagen from chick sternal cartilage. *Food chemistry*, 108(2): 439-445pp.

Chemat, F. and Khan, M. K., 2011, Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction, *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4): 813-835pp.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S. and Abert-Vian, M., 2017, Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review, *Ultrason Sonochemistry*, 34: 540-560pp.

Cheng, F.Y., Hsu, F.W., Chang, H.S., Lin, L.C. and Sakata, R., 2009, Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet, *Food Chemistry*, 113(2): 563–567pp.

Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R. and Hong, B., 2016, Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*), *LWT-Food Science and Technology*, 66: 453-459pp.

Chen, L., Chen, J., Ren, J. and Zhao, M., 2011, Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6): 2600-2609pp.

Chuaychan, S., Benjakul, S. and Kishimura, H., 2015, Characteristics of acid-and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*), *LWT-Food Science and Technology*, 63(1): 71-76pp.

Christou, C., Agapiou, A. and Kokkinofta, R., 2018, Use of FTIR spectroscopy and chemometrics for the classification of carobs origin, *Journal of advanced research*, 10: 1-8pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Clark, K. L., Sebastianelli, W., Flechsenhar, K. R., Aukermann, D. F., Meza, F., Millard, R. L., Deitch, J. R., Sherbondy, P. S. and Albert, A., 2008, 24-Week study on the use of collagen hydrolysate as a dietary supplement in athletes with activity-related joint pain, *Current medical research and opinion*, 24(5): 1485-1496pp.

De Moraes, M. C. and Cunha, R. L., 2013, Gelation property and water holding capacity of heat-treated collagen at different temperature and pH values, *Food Research International*, 50(1): 213-223pp.

Dhakal, D., Koomsap, P., Lamichhane, A., Sadiq, M. B. and Anal, A. K., 2018, Optimization of collagen extraction from chicken feet by papain hydrolysis and synthesis of chicken feet collagen based biopolymeric fibres, *Food bioscience*, 23: 23-30pp.

Dinçer, C. ve Topuz, A., 2018, Meyve Suyu İşlemede Ultrases Kullanımı, *GIDA*, 43(4): 569-581s.

Dong, X. B., Li, X., Zhang, C. H., Wang, J. Z., Tang, C. H., Sun, H. M., Jia, W., Li, Y. and Chen, L. L., 2014, Development of a novel method for hot-pressure extraction of protein from chicken bone and the effect of enzymatic hydrolysis on the extracts, *Food Chemistry*, 157: 339-346pp.

Doyle, B. B., Bendit, E. G. and Blout, E. R., 1975, Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 14(5): 937-957pp.

Duan, L., Li, J., Li, C. and Li, G., 2013, Effects of NaCl on the rheological behavior of collagen solution, *Korea-Aust Rheology Journal*, 25(3): 137-144pp.

Duong-Ly, K. C. and Gabelli, S. B., 2014, Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation, *Methods in Enzymology*, 541: 85-94pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Dun, R., Jackson, H. T. and Smith, Y., 2008, Methods for processing and utilization of low cost fishes: a critical appraisal, *Journal of Food Science and Technology*, 32: 1-12pp.

Ehrlich, H., Wysokowski, M., Zóltowska-Aksamitowska, S., Petrenko, I. and Jesionowski, T., 2018, Collagens of Poriferan Origin, *Marine Drugs*, 16(3): 1-21pp.

Erge, A. ve Zorba, Ö., 2016, Jelatin ve Fizikokimyasal Özellikleri, *Academic Food Journal/Akademik GIDA*,14(4).

Ferraro, V., Martinie, B. G., Sayd, T., Chambon, C., Anton, M. and Lhoutellier, V.S., 2017, Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential, *International Journal of Biological Macromolecules*, 97: 55–66pp.

Frantz, C., Stewart, K. M. and Weaver, V. M., 2010, The extracellular matrix at a glance, *Journal of Cell Science*, 123(24): 4195-4200pp.

Friess, W., 1998, Collagen–biomaterial for drug delivery, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 45(2): 113-136pp.

Fu, J. H., Zhao, M., Lin, Y. R., Tian, X. D., Wang, Y. D., Wang, Z. X. and Wang, L. X., 2017, Degradable chitosan-collagen composites seeded with cells as tissue engineered heart valves, *Heart, Lung and Circulation*, 26(1): 94-100pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Fujimaki, H., Uchida, K., Inoue, G., Miyagi, M., Nemoto, N., Saku, T., Isobe, Y., Inage, K., Matsushita, O., Yagishita, S., Sato, J., Takano, S., Sakuma, Y., Ohtori, S., Takahashi, K. and Sato, J., 2017, Oriented collagen tubes combined with basic fibroblast growth factor promote peripheral nerve regeneration in a 15 mm sciatic nerve defect rat model, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105: 8–14pp.

Funderburgh, J. L., 2002, Keratan Sulfate Biosynthesis, *IUBMB Life*, 54(4): 187-194pp.

Gao, L. L., Wang, Z. Y., Li, Z., Zhang, C. X. and Zhang, D. Q., 2017, The characterization of acid and pepsin soluble collagen from ovine bones (Ujumuqin sheep), *Journal of Integrative Agriculture*, 17(3): 704-711pp.

Garnjanagoonchorn, W., Wongekalak, L. and Engkagul, A., 2007, Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5): 465-471pp.

Gelse, K., Pöschl, E. and Aigner, T., 2003, Collagens – structure, function, and biosynthesis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55: 1531-1546pp.

Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E. and Montero, M. P., 2011, Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review, *Food Hydrocolloids*, 25(8): 1813-1827pp.

Gómez-Guillén, M. C. and Montero, P., 2001, Extraction of gelatin from megrim (*Lepidorhombus boscii*) skins with several organic acids, *Journal of Food Science*, 66(2): 213-216pp.

Gray, H. C., Hutcheson, P. S. and Slavin, R. G., 2004, Is Glucosamine Safe in Patients with Seafood Allergy?, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(2): 459-460pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Gujral, N., Ganguly, A., Sunwoo, H. H., Kim, C. T., Suh, J. W., 2014, Chondroitin sulphate extracted from antler cartilage using high hydrostatic pressure and enzymatic hydrolysis, *Biotechnology Reports*, 4: 14-20pp.

Güngören, C., Özkan, Ş. G. ve Özdemir, O., 2017, Ultrasonik İşlemlerin Flotasyonda Kullanımında Farklı Yaklaşımlar, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17(2): 727-735s.

Hashim, P., Ridzwan, M. M. and Bakar, J., 2014, Isolation and characterization of collagen from chicken feet, *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*, 8(3): 250-254pp.

Hileman, R. E. and Linhardt, R. J., 1995, Dermatan Sulfate as a Potential Therapeutic Agent, *General Pharmacology*, 26(3): 443-451pp.

Ho, H. O., Lin, L. H. and Sheu, M. T., 1997, Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as a drug carrier, *Journal of controlled release*, 44(2-3): 103-112pp.

Hsu, B. L., Weng, Y. M., Liao, Y. H. and Chen, W., 2005, Structural investigation of edible zein films/coatings and directly determining their thickness by FT-Raman spectroscopy, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(13): 5089-5095pp.

Hunter, R., 1975, The Measurement of Appearance, John Wiley & Sons, New York.

Itchenco, S., Kempka, A. P. and Prestes, R. C., 2017, Profiles of enzymatic hydrolysis of different collagens and derivatives over time, *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 11(1): 2165-2185pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Jeevithan, E., Jingyi, Z., Wang, N., He, L., Bao, B. and Wu, W., 2015, Physico-chemical, antioxidant and intestinal absorption properties of whale shark type-II collagen based on its solubility with acid and pepsin, *Process Biochemistry*, 50(3): 463-472pp.

Kaewdang, O., Benjakul, S., Kaewmanee, T. and Kishimura, H., 2014, Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), *Food Chemistry*, 155: 264-270pp.

Kang, C. W., Shin, S. C., You, S. J. and An, B. K., 2006, Study on Extraction of Mucopolysaccharide-protein Containing Chondroitin Sulfate from Chicken Keel Cartilage Electrophoresis, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(4): 601-604pp.

Kanungo, I., Chellappa, N., Fathima, N. N. and Rao, J. R., 2011, Calorimetric analysis of gelatine–glycosaminoglycans blend system, *International journal of biological macromolecules*, 49(3): 289-296pp.

Khan, H. M., Ashraf, M., Hashmi, A. S., Ahmad, M. U. D. and Anjum, A. A., 2013, Extraction and biochemical characterization of sulphated glycosaminoglycans from chicken keel cartilage, *Pakistan Veterinary Journal*, 33: 471-475pp.

Kim, H. K., Kim, Y. H., Kim, Y. J., Park, H. J. and Lee, N. H., 2012, Effects of ultrasonic treatment on collagen extraction from skins of the sea bass *Lateolabrax japonicus*, *Fisheries science*, 78(2): 485-490pp.

Kim, H. K., Kim, Y.H., Park, H.J. and Lee, N.H., 2013, Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from the skins of sea bass *Lateolabrax japonicas*, *Fisheries Science*, 79(5): 849-856pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. and Tanaka, M., 2005, Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*), *Food chemistry*, 89(3): 363-372pp.

Kittiphattanabawon, P., Nalinanon, S., Benjakul, S. and Kishimura, H., 2015, Characteristics of pepsin-solubilised collagen from the skin of splendid squid (*Loligo formosana*), *Journal of Chemistry*, 2015: 1-8pp.

Kjeldahl J., 1883, New Method for the Determination of Nitrogen, *Chemistry News*, 48 (1240): 101–102pp.

Krishnamoorthi, J., Ramasamy, P., Shanmugam, V. and Shanmugam, A., 2017, Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831) from Puducherry coast, *Biochemistry and biophysics reports*, 10: 39-45pp.

Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259): 680-685pp.

Lee, D. H., Oh, J. H. and Chung, J. H., 2016, Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging, *Journal of Dermatological Science*, 83(3): 174-181pp.

Liang, Q., Wang, L., Sun, W., Wang, Z., Xu, J. and Ma, H., 2014, Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Process Biochemistry*, 49(2): 318–323pp.

Li, D., Mu, C., Cai, S. and Lin, W., 2009, Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen, *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(5): 605-609pp.

Li, J., Yuan, P., Wang, X., Aipire, A., Li, M., Yang, J., ... and Zhang, F., 2017, Purification, characterization and bioactivities of polysaccharides from *Pleurotus ferulae*, *Food & function*, 8(5): 1905-1914pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Li, L., Kim, J. H., Jo, Y. J., Min, S. G. and Chun, J. Y., 2015, Effect of Porcine Collagen Peptides on the Rheological and Sensory Properties of Ice Cream, *Korean journal for food science of animal resources*, 35(2): 156pp.

Li, P. and Wu, G., 2018, Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth, *Amino Acids*, 50(1): 29-38pp.

Lin, C. W., Loughran, M., Tsai, T. Y. and Tsai, S. W., 2013, Evaluation of convenient extraction of chicken skin collagen using organic acid and pepsin combination, *J. Chin. Soc. Anim. Sic*, 42(1): 27-38pp.

Liu, D. C., Lin, Y. K. and Chen, M. T., 2001, Optimum Condition of Extracting Collagen from Chicken Feet and its Characteristics, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14(11): 1638-1644pp.

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

Liu, D., Zhang, X., Li, T., Yang, H., Zhang, H., Regenstein, J. M. and Zhou, P., 2015a, Extraction and characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), *Food Bioscience*, 9: 68-74pp.

Liu, H. and Huang, K., 2016, Structural Characteristics of Extracted Collagen from Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Bone: Effects of Ethylenediaminetetraacetic Acid Solution and Hydrochloric Acid Treatment, *International Journal of Food Properties*, 19(1): 63-75pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J., 2000, Molecular Cell Biology. Section 22.3: Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix, Edited by W. H. Freeman, New York.

Lordan, S., Ross, R. P. and Stanton, C., 2011, Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases, *Marine drugs*, 9(6): 1056-1100pp.

Mahboob, S., 2015, Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*, *Journal of Food Science and Technology*, 52(7): 4296-4305pp.

Majid, I., Nayik, G. A. and Nanda, V., 2015, Ultrasonication and food technology: A review, *Cogent Food & Agriculture*, 1(1): 1071022pp.

Mohammadi, R., Mohammadifar, M. A., Mortazavian, A. M., Rouhi, M., Ghasemi, J. B. and Delshadian, Z., 2016, Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM), *Food chemistry*, 190: 186-193pp.

Moreira, C. D., Carvalho, S. M., Mansur, H. S. and Pereira, M. M., 2016, Thermogelling chitosan–collagen–bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 58: 1207-1216pp.

Mottahedi, M. and Han, H. C., 2016, Artery buckling analysis using a two-layered wall model with collagen dispersion, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 60: 515-524pp.

Muyonga, J. H., Cole, C. G. B. and Duodu, K. G., 2004, Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*), *Food Chemistry*, 85(1): 81-89pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Nagai, T., Tanoue, Y., Kai, N. and Suzuki, N., 2015, Characterization of collagen from emu (*Dromaius novaehollandiae*) skins, *Journal of Food Science and Technology*, 52(4): 2344-2351pp.

Nagarajan, P., Dinakaran, S. K., Ghosh, S., Avasarala, H., Nallayya, M. and Banji, D. 2013, Method Development and Validation for Glucosamine and Chondroitin Sulphate in Softlet Form by RP-HPLC, *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2(3): 6-10pp.

Nakahara, K., Haga-Tsujimura, M., Sawada, K., Mottini, M., Schaller, B. and Saulacic, N., 2017, Effects of collagen membrane application and cortical bone perforation on de novo bone formation in periosteal distraction: an experimental study in a rabbit calvaria, *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 123(2): 173-182pp.

Nakano, T., Betti, M. and Pietrasik, Z., 2010, Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate glycosaminoglycans, *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 2(1): 61-74pp.

Nakano, T., Ikawa, N. and Ozimek, L., 2001, Extraction of Glycosaminoglycans from Chicken Eggshell, *Poultry Science*, 80(5): 681-684pp.

Nakano, T., Pietrasik, Z., Ozimek, L., Betti, M., 2012, Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate from broiler chicken biomass, *Process biochemistry*, 47(12): 1909-1918pp.

Ninan, G., Joseph, J. and Aliyamveetil, Z. A., 2014, A comparative study on the physical, chemical and functional properties of carp skin and mammalian gelatins, *Journal of Food Science and Technology*, 51(9): 2085–2091pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Nogueira, A. V., Rossi, G. R., Iacomini, M., Sasaki, G. L., Trindade, E. S., Cipriani, T. R., 2019, Viscera of fishes as raw material for extraction of glycosaminoglycans of pharmacological interest, *International journal of biological macromolecules*, 121: 239-248pp.

Oechsle, A. M., Akgün, D., Krause, F., Maier, C., Gibis, M., Kohlus, R. and Weiss, J., 2016, Microstructure and physical–chemical properties of chicken collagen, *Food Structure*, 7: 29-37pp.

Papakonstantinou, E., Roth, M. and Karakiulakis, G., 2012, Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging, *Dermato-Endocrinology*, 4(3): 253-258pp.

Plepis, Guzzi., Goissis, A. M. D., G. and Das-Gupta, D. K., 1996, Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen, *Polymer Engineering & Science*, 36(24): 2932-2938pp.

Prayitno, P., 2007, Extraction of Collagen from Chicken Feet with Various Acidic Solutions and Soaking Time, *Animal Production*, 9(2): 99-104pp.

Qingman, C., Li, G. and Yuan, C., 2012, Optimization of Glycosaminoglycan Extraction on *Patinopecten Yessoensis* Waste, *Procedia Environmental Sciences*, 16: 131-137pp.

Raghuraman, H., 2013, Extraction of Sulfated Glycosaminoglycans from Mackerel and Herring Fish Waste, MSc Thesis, Dalhousie University, 156pp.

Ramdhani, D., 2017, Formulation and Characterization of Chondroitin Sulfate Nanoparticle with Chitosan as Polymer and Kappa Carrageenan as Crosslinker Using the Ionic Gelation Method, *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, S8: 1-6pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Ran, X. G. and Wang, L. Y., 2014, Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products, *Journal of the Science Food and Agriculture*, 94(3): 585-590pp.

Rani, A., Baruah, R. and Goyal, A., 2017, Physicochemical, antioxidant and biocompatible properties of chondroitin sulphate isolated from chicken keel bone for potential biomedical applications, *Carbohydrate polymers*, 159: 11-19pp.

Riaz, T., Zeeshan, R., Zarif, F., Ilyas, K., Muhammad, N., Safi, S. Z., ... and Rehman, I. U., 2018, FTIR analysis of natural and synthetic collagen, *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(9): 703-746pp.

Ricard-Blum, S., 2011, The collagen family, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3: 1-19pp.

Rigaud, J. L. and Lévy, D., 2003, Reconstitution of membrane proteins into liposomes, *Methods in Enzymology*, 372: 65-86pp.

Saarakkala, S., Rieppo, L., Rieppo, J. and Jurvelin, J. S., 2010, Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy of immature, mature and degenerated articular cartilage, *Microscopy: science, technology, applications and education*, 1: 403-14pp.

Sadowska, M., Kołodziejka, I. and Niecikowska, C., 2003, Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*), *Food Chemistry*, 81(2): 257-262pp.

Safandowska, M. and Pietrucha, K., 2013, Effect of fish collagen modification on its thermal and rheological properties, *International journal of biological macromolecules*, 53: 32-37pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

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

Schaefer, L. and Schaefer, R. M., 2010, Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules, *Cell and Tissue Research*, 339(1): 237-246pp.

Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. O., Kubota, E. H., Mazutti, M. A., Kempka, A. P. and Demiate, I. M., 2016, Collagen extraction process, *International Food Research Journal*, 23(3): 913-922 pp.

Setnikar, I. and Rovati, L. C., 2001, Absorption, distribution, metabolism and excretion of glucosamine sulfate, *Arzneimittelforschung*, 51(9): 699-725pp.

Shoulders, M. D. and Raines, R. T., 2009, Collagen structure and stability, *Annual review of Biochemistry*, 78: 929-958pp.

Shriver, Z., Capila, I., Venkataraman, G. and Sasisekharan, R., 2012, Heparin and Heparan Sulfate: Analyzing Structure and Microheterogeneity, *Handb Exp Pharmacol*, 207: 159-176pp.

Sibilla, S., Godfrey, M., Brewer, S., Budh-Raja, A. and Genovese, L., 2015, An Overview of the Beneficial Effects of Hydrolysed Collagen as a Nutraceutical on Skin Properties: Scientific Background and Clinical Studies, *The Open Nutraceuticals Journal*, 8: 29-42pp.

Skierka, E. and Sadowska, M., 2007, The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*), *Food Chemistry*, 105(3): 1302-1306pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Simões, G. S., Silveira, E. T. F., de Oliveira, S. R., Poleze, E., Allison, J. R., Ida, E. I. and Shimokomaki, M., 2014, Optimum conditions for extracting collagen from the tunica albuginea of immunologically castrated pig testes and the functional properties of the isolated collagen, *Meat Science*, 96(4): 1460-1468pp.

Sinthusamran, S., Benjakul, S. and Kishimura, H., 2013, Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*), *Food Chemistry*, 138(4): 2435-2441pp.

Song, H. and Li, B., 2017, Beneficial effects of collagen hydrolysate: a review on recent developments, *Biomed J Sci & Tech Res*, 1(2): 1-4pp.

Song, K. M., Jung, S. K., Kim, Y. H., Kim, Y. E. and Lee, N. H., 2018, Development of industrial ultrasound system for mass production of collagen and biochemical characteristics of extracted collagen, *Food Bioprod Process*, 110: 96-103pp.

Stuart, P. S., Bell, S. J. and Molnar, J., 2008, Use of Tryptophan-Fortified Hydrolyzed Collagen for Nutritional Support, *Journal Of Dietary Supplements*, 5(4): 383-400pp.

Sun, L., Hou, H., Li, B. and Zhang, Y., 2017, Characterization of acid- and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *International Journal of Biological Macromolecules*, 99: 8-14pp.

Tamilmozhi, S., Veeruraj, A. and Arumugam, M., 2013, Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*), *Food Research International*, 54(2): 1499-1505pp.

Tan, Y. and Chang, S. K., 2018, Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin, *Food chemistry*, 242: 147-155pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

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

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

Tiwari, B. K. and Mason, T. J., 2012, Ultrasound processing of fluid foods, In: *Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods*, Tiwari, B. K. (chief ed.), Academic Press, United States, 131-165pp.

Uslu, M. Ö. ve Eltas, Ş. D., 2015, Peridontal Hastalıklarda MMP-8 'in Rolü, *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, Ek 12: 80-85s.

Üçgül, İ., Aras, S. ve Elibüyük, U., 2018, EKSTRASELÜLER MATRİS YAPISI VE GÖREVLERİ, *Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering*, 23(1): 295-310s.

Wang, L., Liang, Q., Wang, Z., Xu, J., Liu, Y. and Ma, H., 2014, Preparation and characterisation of type I and V collagens from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*), *Food chemistry*, 148: 410-414pp.

Wang, L., Yang, B., Du, X., Yang, Y. and Liu, J., 2008, Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(4): 604-607pp.

Wardrop, D. and Keeling, D., 2008, The story of the discovery of heparin and warfarin, *British Journal of Haematology*, 141(6): 757-763pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Widyaningsih, T. D., Rukmi, W. D., Sofia, E., Wijayanti, S. D., Wijayanti, N., Ersalia, R., Rochmawati, N., Nangin, D., 2016, Extraction of Glycosaminoglycans Containing Glucosamine and Chondroitin Sulfate from Chicken Claw Cartilage, *Research Journal of Life Science*, 3(3): 181-189pp.

Widyasari, R. and Rawdkuen, S., 2014, Extraction and characterization of gelatin from chicken feet by acid and ultrasound assisted extraction, *Food and Applied Bioscience Journal*, 2(1): 85-97pp.

Włodarczyk, M. G., Kubisz, L. and Włodarczyk, D., 2017, Amino acid composition in determination of collagen origin and assessment of physical factors effects, *International Journal of Biological Macromolecules*, 104: 987-991pp.

Xu, S., Yang, H., Shen, L. and Li, G., 2017, Purity and yield of collagen extracted from southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) skin through improved pretreatment methods, *International Journal of Food Properties*, 20(sup1): S141-S153pp.

Yang, H. and Shu, Z., 2014, The extraction of collagen protein from pigskin, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(2): 683-687pp.

Yoruç, A. B. H. ve Uğraşkan, V., 2017, Yeşil Polimerler ve Uygulamaları, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri ve Mühendislik Dergisi*, 17(017102): 318-337s.

Zhao, T., Zhou, Y., Mao, G., Zou, Y., Zhao, J., Bai, S., ... and Wu, X. 2013, Extraction, purification and characterisation of chondroitin sulfate in Chinese sturgeon cartilage, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7): 1633-1640pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

Zhong, S. P., Teo, W. E., Zhu, X., Beuerman, R., Ramakrishna, S. and Yung, L. Y. L., 2007, Development of a novel collagen–GAG nanofibrous scaffold via electrospinning, *Materials Science and Engineering: C*, 27(2): 262-266pp.

Zhou, C., Li, Y., Yu, X., Yang, H., Ma, H., Yagoub, A. E. A., Cheng, Y., Hu, J. and Otu, P. N. Y., 2016, Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen, *LWT-Food Science and Technology*, 74: 145-153pp.

Zou, Y., Xu, P., Li, P., Cai, P., Zhang, M., Sun, Z., Sun, C., Xu, W. and Wang, D., 2017, Effect of ultrasound pre-treatment on the characterization and properties of collagen extracted from soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*), *LWT-Food Science and Technology*, 82: 72-81pp.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca bilgi ve birikimleri ile bana rehberlik eden ve beni cesaretlendiren, akademik alandaki en büyük ilham kaynağım değerli tez danışmanım sayın Prof. Dr. Şebnem TAVMAN'a,

Tez çalışmama fikirleriyle her daim katkıda bulunan ve bu süreçte desteğini hiç esirgemeyen hocam sayın Doç. Dr. Seher KUMCUOĞLU'na, Laboratuvar çalışmalarında emeği geçen ve bana sabırla yol gösteren Sayın Dr. Öğr. Üyesi Burcu Kaplan TÜRKÖZ'e, değerli katkıları ve yardımları için Ar. Gör. Onur ÖZDİKİCİLERLER'e,

Tez çalışmamla ilgili yaşadığım teknik sorunlarda bana her daim yardımcı ve destek olan emekli idari personel Süleyman IŞIKLI'ya,

Tez çalışmamda kullandığım kuzu ayaklarının parçalanması için yardımlarını esirgemeyen İzmir- PINAR ENTEGRE ET ve UN SANAYİ A.Ş'ye,

Bu süreçte manevi desteğini her zaman hissettiğim sevgili dostum Yağmur KÖMÜŞÇÜ'ye, aynı projede çalıştığım sevgili ekip arkadaşım Burcu KUBAN'a ve laboratuvar çalışmalarında desteğini her zaman hissettiğim sevgili Ebru ORMANLI, Ayça AKYÜZ, İdil TEKİN ve Arzu Yalçın MELİKOĞLU'na, analizlerimde yardımlarını esirgemeyen sevgili Buket AMCA ve Bahar BAKAR'a ve yanımda olup beni motive eden tüm arkadaşlarıma,

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde maddi desteklerinden dolayı, yüksek lisans bursiyeri olduğum 118-O-135 no'lu 1002 projesi ile TÜBİTAK'a, 17 MÜH 020 no'lu proje ile Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğüne,

Son olarak hayatım boyunca verdiğim her kararda beni destekleyen, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen babam İbrahim ATA'ya, annem Nazire ATA'ya ve kardeşim Beril ATA'ya çok teşekkür ederim.

Özge ATA

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Adı Soyadı: Özge ATA

Doğum Yeri/ Tarihi: Fethiye / 03.06.1993

e-mail: ozgeata93@gmail.com

Adres: Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği, 35040
Bornova/İzmir

Eğitim Bilgileri:

Yüksek Lisans (2016- devam): Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Gıda Mühendisliği

Erasmus+ (07.02.2014- 26.06.2014): University of Technology and Life
Sciences, Faculty of Agriculture and Biotechnology, Bydgoszcz/Poland

Lisans (2011-2016): Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda
Mühendisliği

Lise (2007-2011): Didim Esra Karakaya Anadolu Lisesi

Çalışmalar:

(Yayın) Özge Ata ve Şebnem Tavman (2019). Kolajen Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması, GIDA, 44(3), 383-395. doi: 10.15237/gida.GD18112. (TR-Dizin).

(Proje) 118O135 nolu “Bazı ekstrasellüler matriks bileşenlerinin (Kolajen ve GAG) ultrason destekli ekstraksiyonu, saflaştırılması, tanımlanması ve zenginleştirilmiş pastörize çorbanın üretiminde kullanılması” isimli TÜBİTAK-1002 projesinde bursiyer (2018-2019)

(Proje) 17-MÜH-020 nolu “Kemik Suyundan Suda Çözünen Bileşenlerin Ekstraksiyonunun Modellenmesi” isimli BAP projesinde çalıştı (2017-2019)

EKLER DİZİNİ

Ek 1 Kolajen standart eğrisi

Ek 2 Kondroitin sülfat standart eğrisi

Ek 3 Farklı ekstraksiyon koşulları altında elde edilen kolajen örneklerinin kolajen konsantrasyonlarına ait istatistiksel sonuçlar

Ek 4 20°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu

Ek 5 20°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu

Ek 6 20°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu

Ek 7 25°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu

Ek 8 25°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu

Ek 9 25°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu

Ek 10 30°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu

Ek 11 30°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu

Ek 12 30°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu

EKLER DİZİNİ (devam)

Ek 13 Kolajen örneklerinin L* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

Ek 14 Kolajen örneklerinin a* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

Ek 15 Kolajen örneklerinin b* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

Ek 16 Farklı ekstraksiyon koşulları altında elde edilen GAG örneklerinin kondroitin sülfat konsantrasyonlarına ait istatistiksel sonuçlar

Ek 17 Saf kondroitin 4- sülfat standardına ait kromatogram

Ek 18 60°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğine ait kromatogram

Ek 19 60°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu

Ek 20 60°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu

Ek 21 60°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu

Ek 22 65°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu

Ek 23 65°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu

Ek 24 65°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu

EKLER DİZİNİ (devam)

Ek 25 70°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu

Ek 26 70°C-40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu

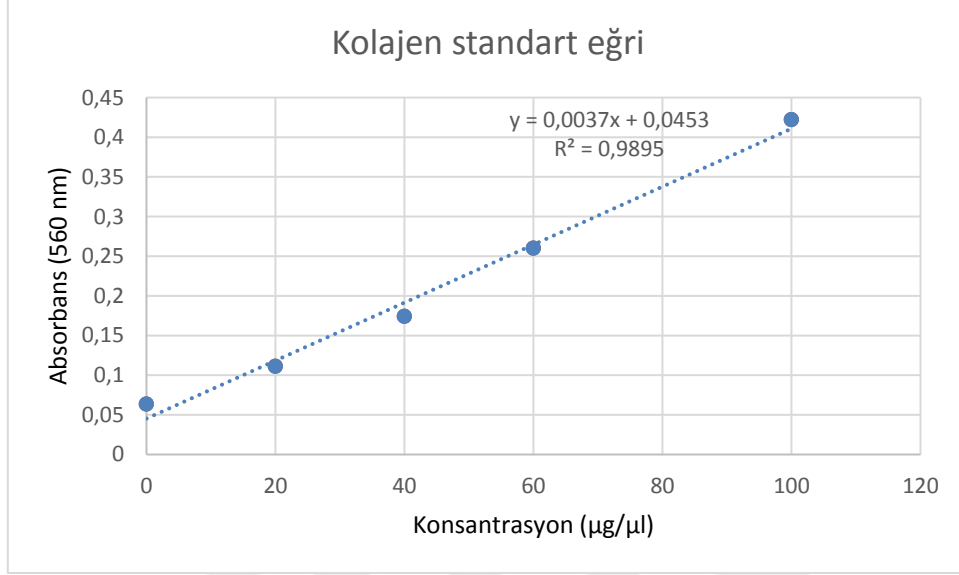
Ek 27 70°C-60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu

Ek 28 GAG örneklerinin L* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

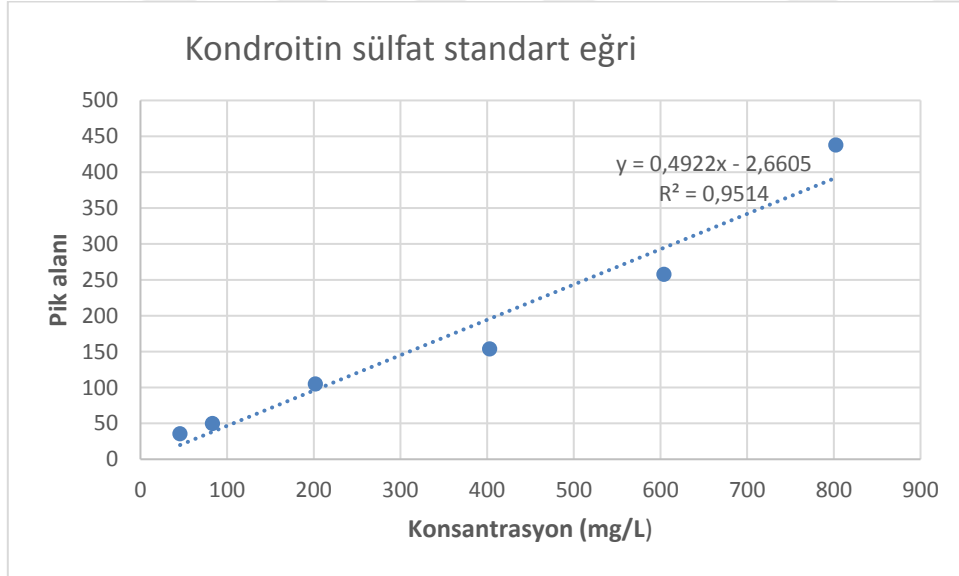
Ek 29 GAG örneklerinin a* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

Ek 30 GAG örneklerinin b* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

EK 1 Kolajen standart eğrisi



EK 2 Kondroitin sülfat standart eğrisi



EK 3 Farklı ekstraksiyon koşulları altında elde edilen kolajen örneklerinin kolajen konsantrasyonlarına ait istatistiksel sonuçlar

ANOVA

VAR00001

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 63159656,18 | 8 | 7894957,023 | 92,963 | ,000 |
| Within Groups | 1528659,641 | 18 | 84925,536 | | |
| Total | 64688315,83 | 26 | | | |

Homogeneous Subsets

VAR00001

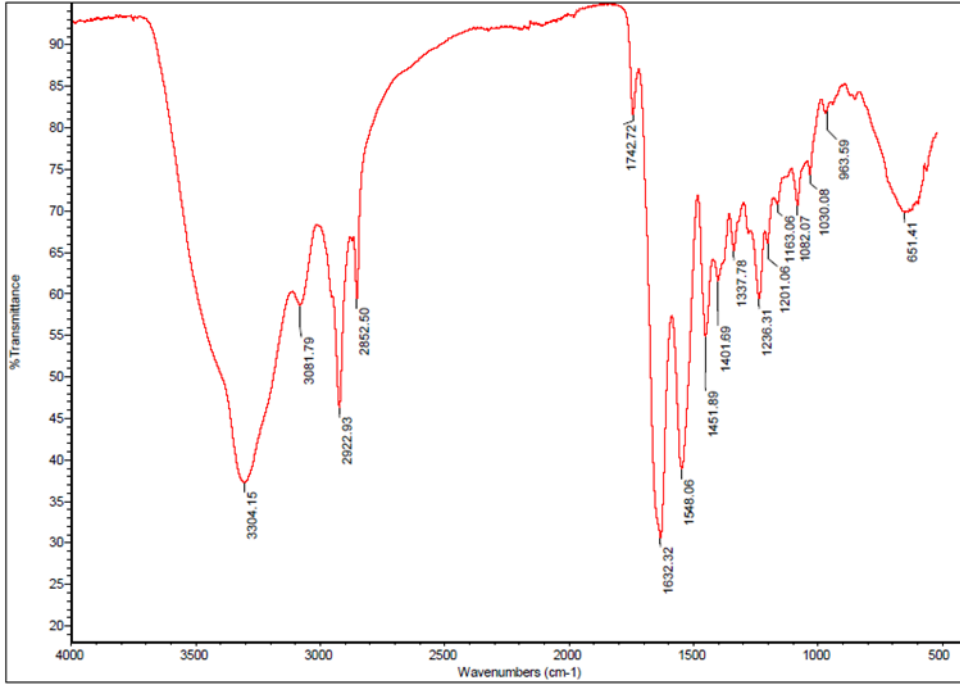
Tukey HSD^a

| parametre | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | |
|-------------|---|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 20°C-20 dk | 3 | 715,1350 | | | | |
| 30°C- 20 dk | 3 | 946,2800 | 946,2800 | | | |
| 25°C-20 dk | 3 | 1354,1000 | 1354,1000 | 1354,1000 | | |
| 30°C- 40dk | 3 | 1372,5667 | 1372,5667 | 1372,5667 | | |
| 20°C- 40dk | 3 | | 1618,5133 | 1618,5133 | | |
| 30°C- 60dk | 3 | | | 1852,4933 | | |
| 25°C- 40dk | 3 | | | | 3358,6033 | |
| 20°C-60 dk | 3 | | | | | 4655,3133 |
| 25°C- 60dk | 3 | | | | | 5061,7567 |
| Sig. | | ,194 | ,175 | ,505 | 1,000 | ,735 |

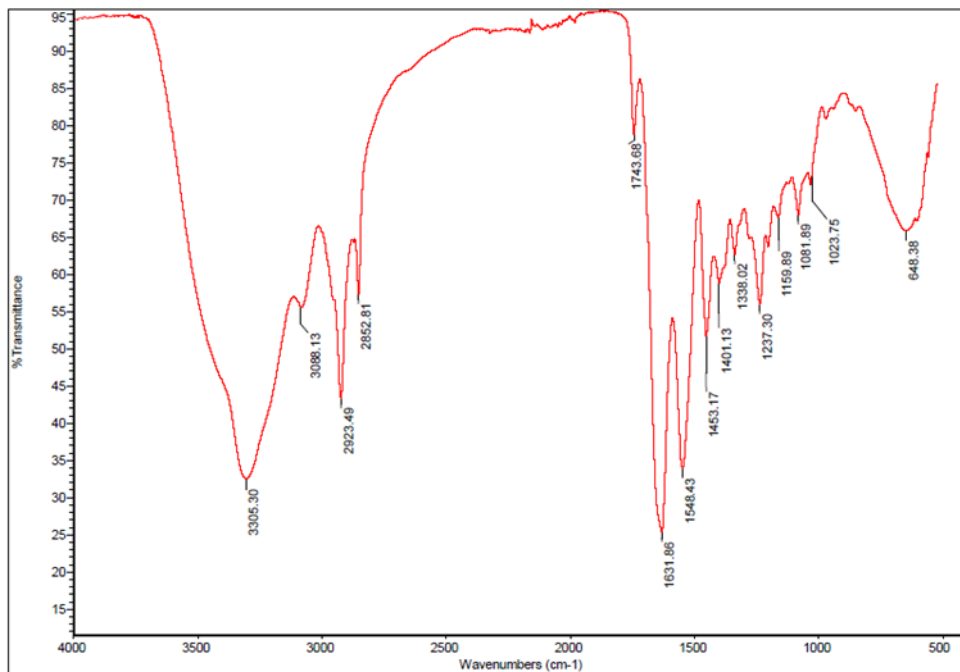
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

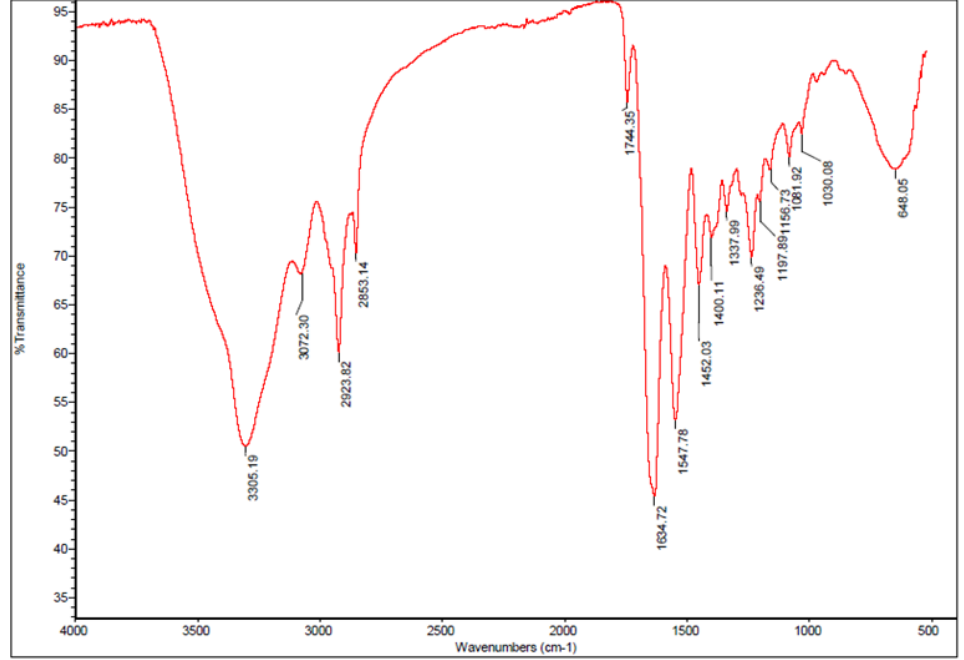
EK 4 20°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu



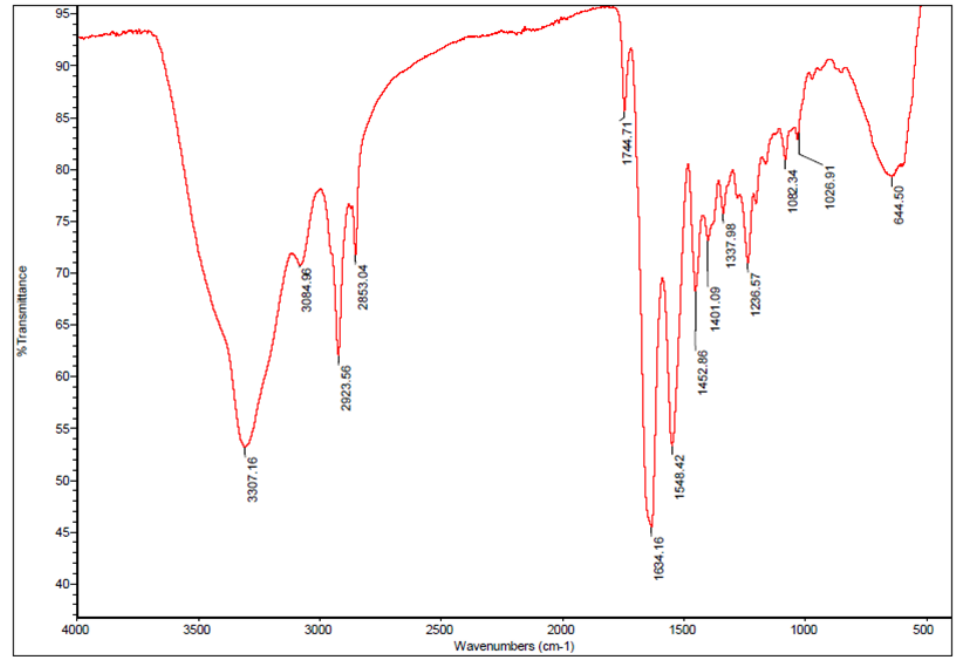
EK 5 20°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu



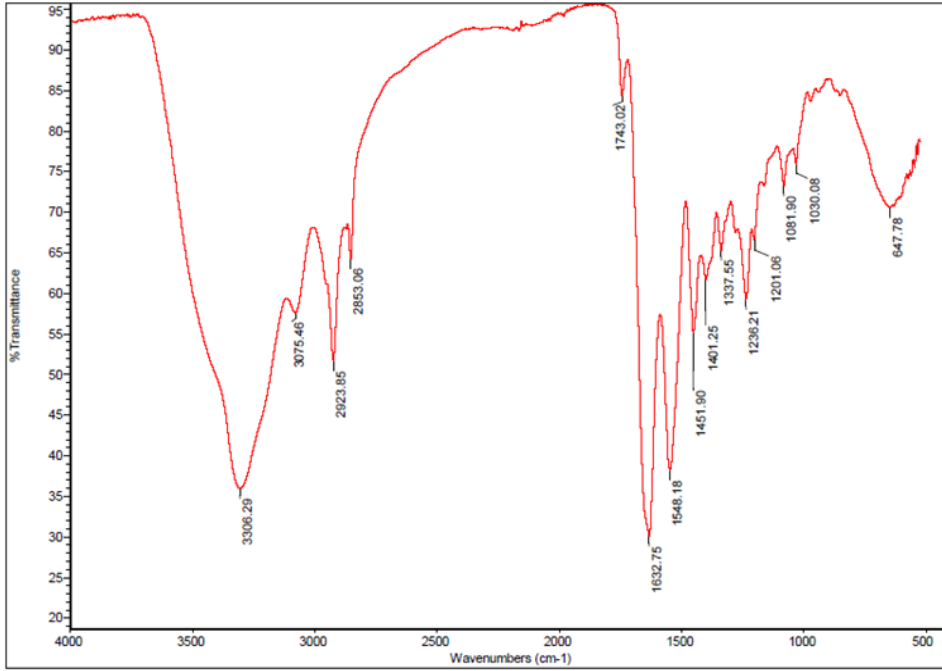
EK 6 20°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu



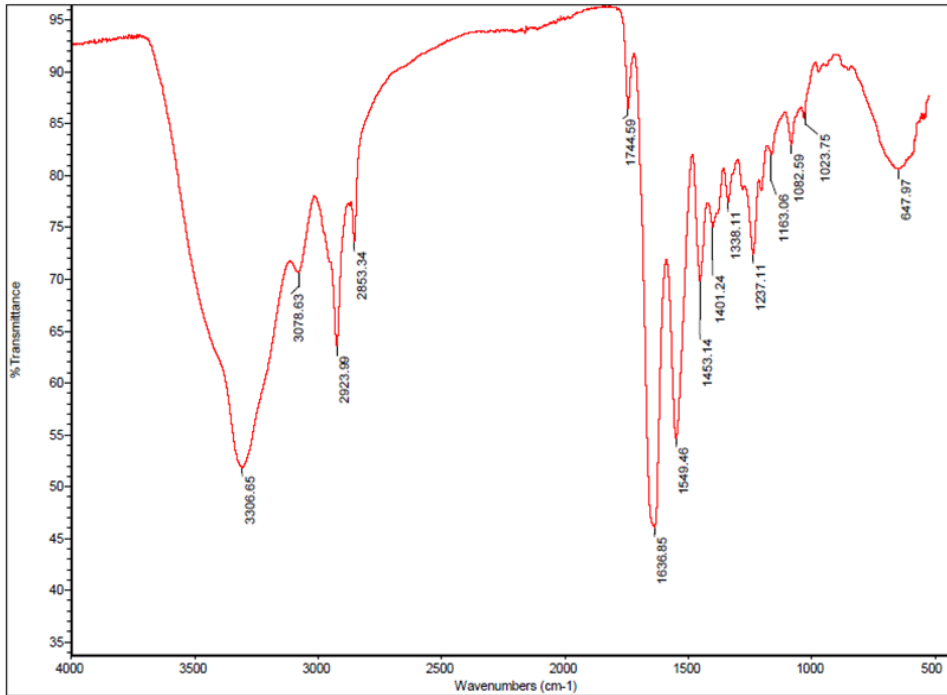
EK 7 25°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu



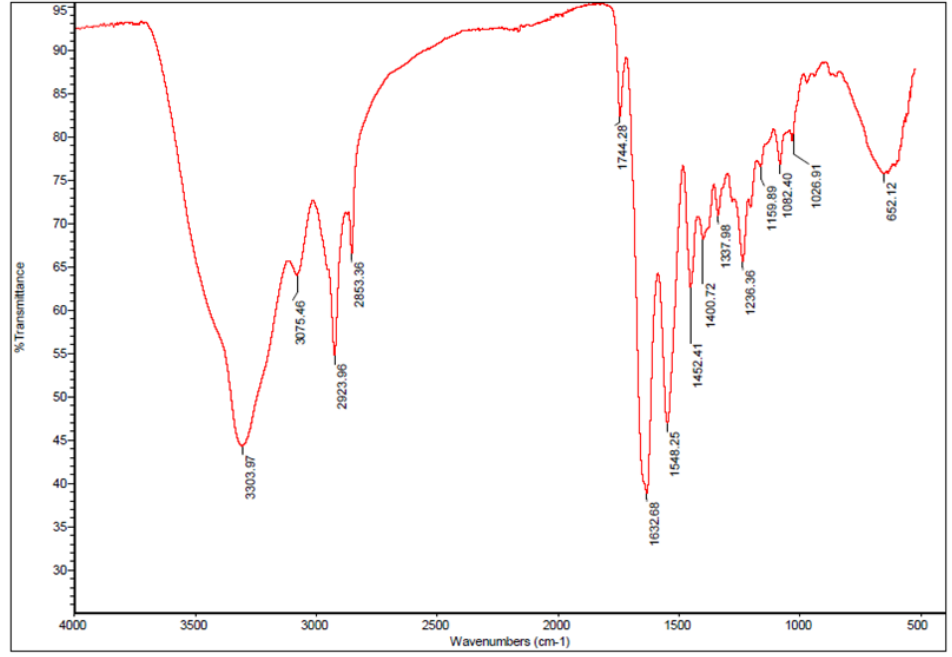
EK 8 25°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu



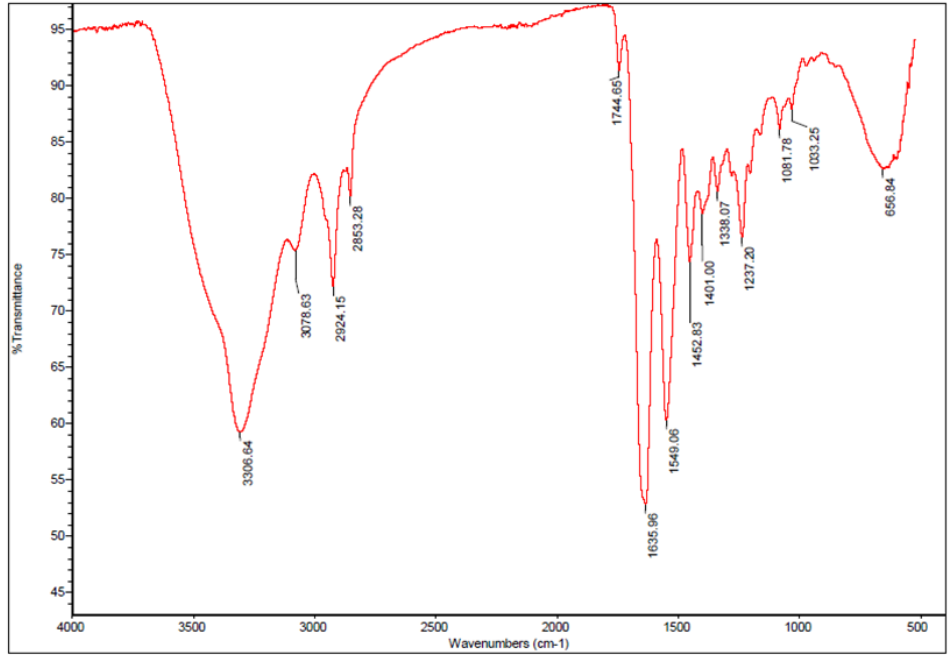
EK 9 25°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu



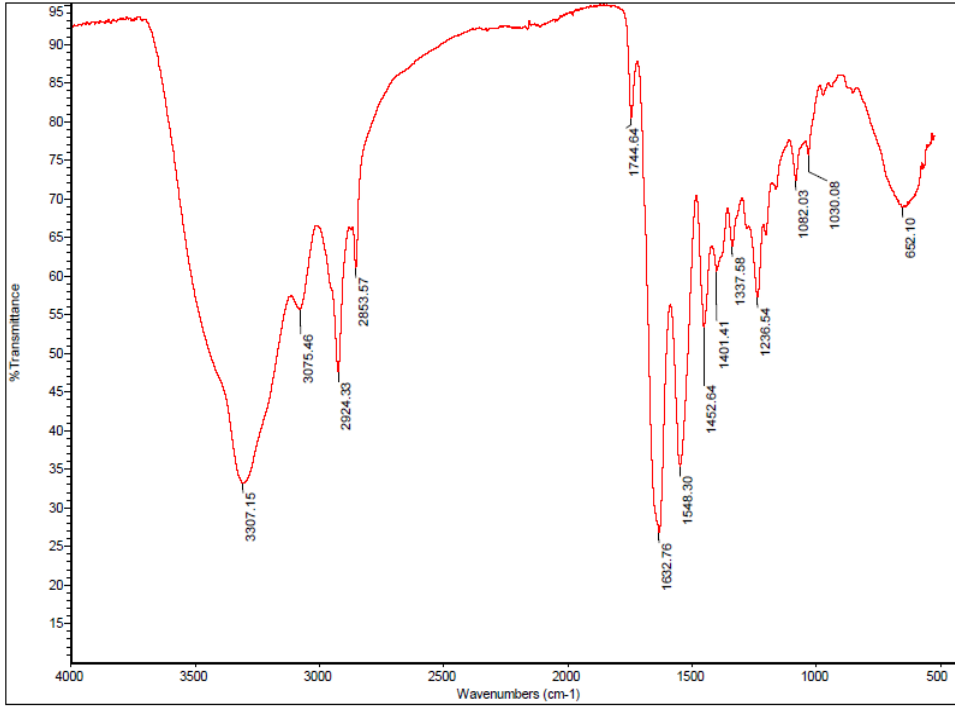
EK 10 30°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu



EK 11 30°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu



EK 12 30°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen kolajen örneğinin FTIR spektrumu



EK 13 Kolajen örneklerinin L* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

ANOVA

L*

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 1035,590 | 8 | 129,449 | 206,615 | ,000 |
| Within Groups | 16,916 | 27 | ,627 | | |
| Total | 1052,506 | 35 | | | |

Homogeneous Subsets

L*

Tukey HSD^a

| örnek parametreleri | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | |
|---------------------|---|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 25°C 20 dak | 4 | 63,172500 | | | | |
| 20°C 40 dak | 4 | 63,970000 | | | | |
| 20°C 60 dak | 4 | 64,370000 | | | | |
| 20°C 20 dak | 4 | | 67,510000 | | | |
| 25°C 60 dak | 4 | | | 69,487500 | | |
| 25°C 40 dak | 4 | | | 71,312500 | 71,312500 | |
| 30°C 40 dak | 4 | | | | 71,395000 | |
| 30°C 20 dak | 4 | | | | 71,445000 | |
| 30 °C 60 dak | 4 | | | | | 81,645000 |
| Sig. | | ,469 | 1,000 | ,063 | 1,000 | 1,000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

EK 14 Kolajen örneklerinin a* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

ANOVA

a*

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 5,983 | 8 | ,748 | 349,194 | ,000 |
| Within Groups | ,058 | 27 | ,002 | | |
| Total | 6,041 | 35 | | | |

Homogeneous Subsets

a*

Tukey HSD^a

| Parametre | N | Subset for alpha = 0.05 | | | |
|--------------|---|-------------------------|---------|---------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 20°C 40 dak | 4 | -,110000 | | | |
| 25°C 40 dak | 4 | -,092500 | | | |
| 30°C 40 dak | 4 | -,075000 | | | |
| 25°C 20 dak | 4 | -,032500 | | | |
| 30 °C 60 dak | 4 | -,025000 | | | |
| 20°C 60 dak | 4 | | ,420000 | | |
| 30°C 20 dak | 4 | | ,450000 | | |
| 20°C 20 dak | 4 | | | ,822500 | |
| 25°C 60 dak | 4 | | | | 1,020000 |
| Sig. | | ,234 | ,990 | 1,000 | 1,000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

EK 15 Kolajen örneklerinin b* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

ANOVA

b*

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 54,688 | 8 | 6,836 | 121,898 | ,000 |
| Within Groups | 1,514 | 27 | ,056 | | |
| Total | 56,202 | 35 | | | |

Homogeneous Subsets

b*

Tukey HSD^a

| Parametre | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | | |
|--------------|---|-------------------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 25°C 40 dak | 4 | 7,725000 | | | | | |
| 30°C 40 dak | 4 | 8,145000 | 8,145000 | | | | |
| 20°C 40 dak | 4 | | 8,395000 | 8,395000 | | | |
| 30 °C 60 dak | 4 | | 8,470000 | 8,470000 | | | |
| 25°C 20 dak | 4 | | | 8,755000 | | | |
| 20°C 60 dak | 4 | | | 8,927500 | 8,927500 | | |
| 20°C 20 dak | 4 | | | | 9,395000 | | |
| 30°C 20 dak | 4 | | | | | 10,407500 | |
| 25°C 60 dak | 4 | | | | | | 11,935000 |
| Sig. | | ,272 | ,594 | ,075 | ,164 | 1,000 | 1,000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

EK 16 Farklı ekstraksiyon koşulları altında elde edilen GAG örneklerinin kondroitin sülfat konsantrasyonlarına ait istatistiksel sonuçlar

ANOVA

CS.konsantrasyon

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 133816,276 | 8 | 16727,034 | 18,765 | ,000 |
| Within Groups | 15153,640 | 17 | 891,391 | | |
| Total | 148969,916 | 25 | | | |

Homogeneous Subsets

CS.konsantrasyon

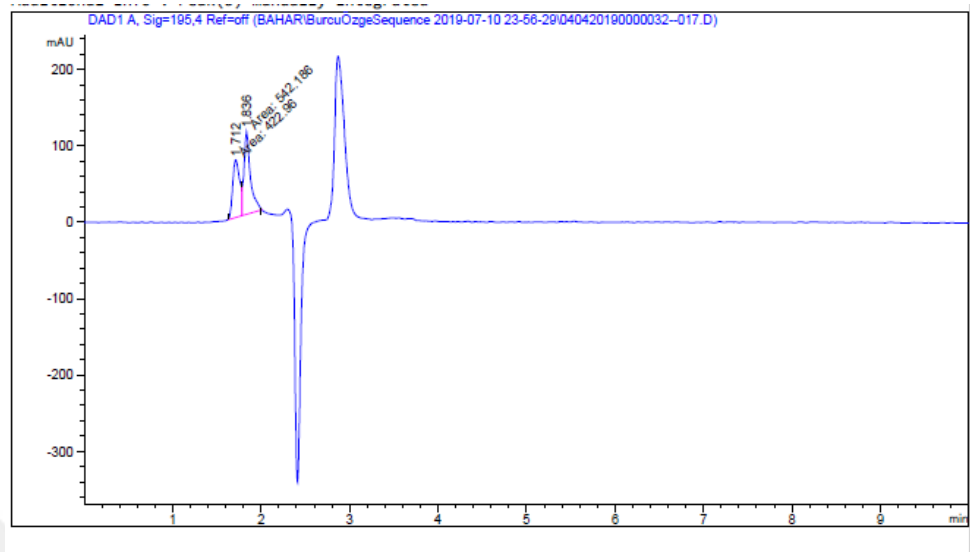
Tukey HSD^{a,b}

| parametre. | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|------------|---|-------------------------|------------|
| | | 1 | 2 |
| 65°C-20 dk | 3 | 194,161000 | |
| 60°C-60 dk | 3 | 196,350333 | |
| 65°C-40 dk | 3 | 196,523000 | |
| 65°C-60 dk | 3 | 199,245333 | |
| 70°C-60 dk | 3 | 232,600333 | |
| 60°C-40 dk | 3 | 250,264000 | |
| 70°C-20 dk | 3 | 253,472667 | |
| 70°C-40 dk | 3 | 273,455333 | |
| 60°C-20 dk | 2 | | 471,386000 |
| Sig. | | ,098 | 1,000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,842.

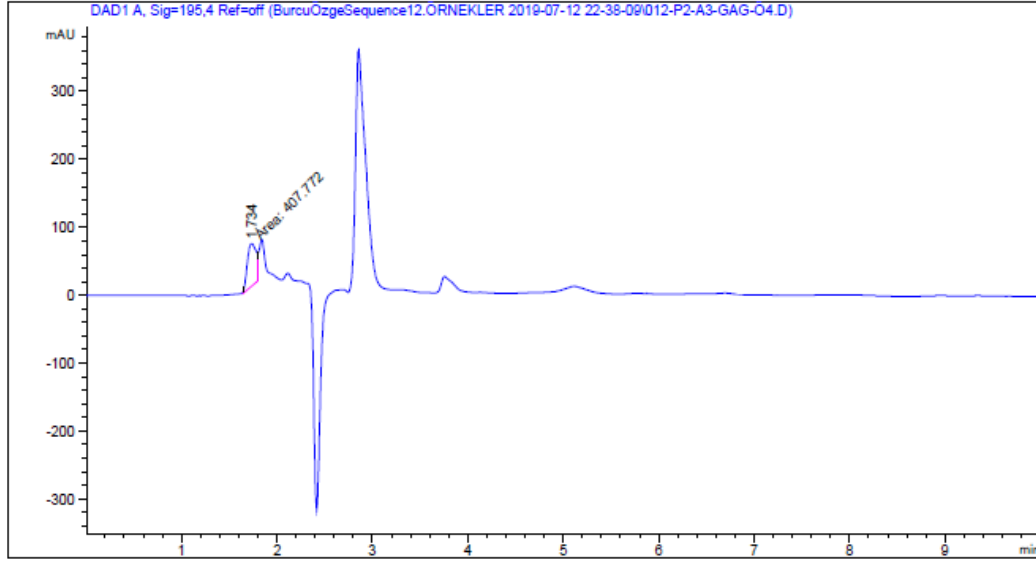
EK 17 Saf kondroitin 4- sülfat standardına ait kromatogram



Signal 1: DAD1 A, Sig=195,4 Ref=off

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % | |
|----------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|---------|---------------------|
| 1 | 1.712 | MF | 0.0932 | 422.96039 | 75.60345 | 43.8234 | → Kondroitin sülfat |
| 2 | 1.836 | FM | 0.0833 | 542.18646 | 108.42194 | 56.1766 | → Glukozamin |
| Totals : | | | | 965.14685 | 184.02538 | | |

EK 18 60°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğine ait kromatogram

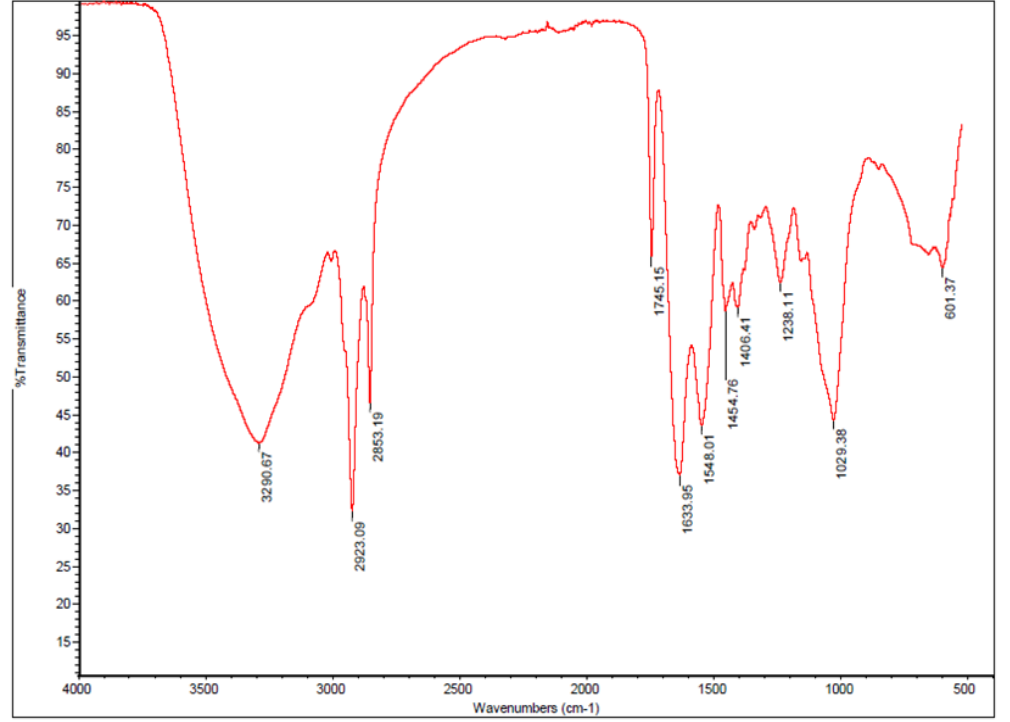


Signal 1: DAD1 A, Sig=195,4 Ref=off

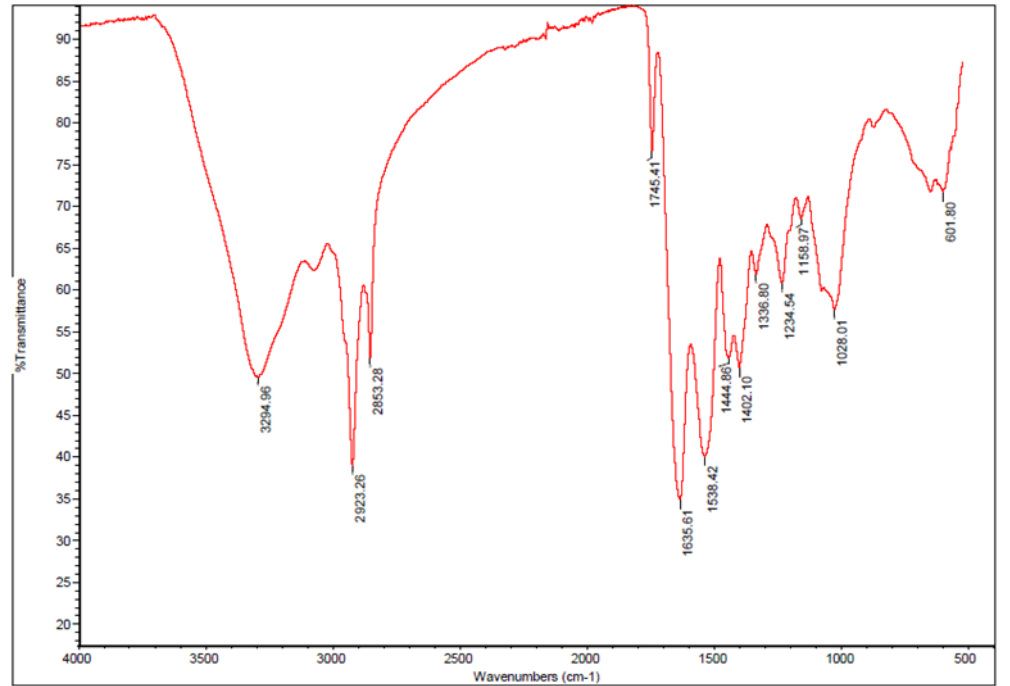
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|--------------|----------|
| 1 | 1.734 | MF | 0.1078 | 407.77167 | 63.03104 | 100.0000 |

Totals : 407.77167 63.03104

EK 19 60°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu

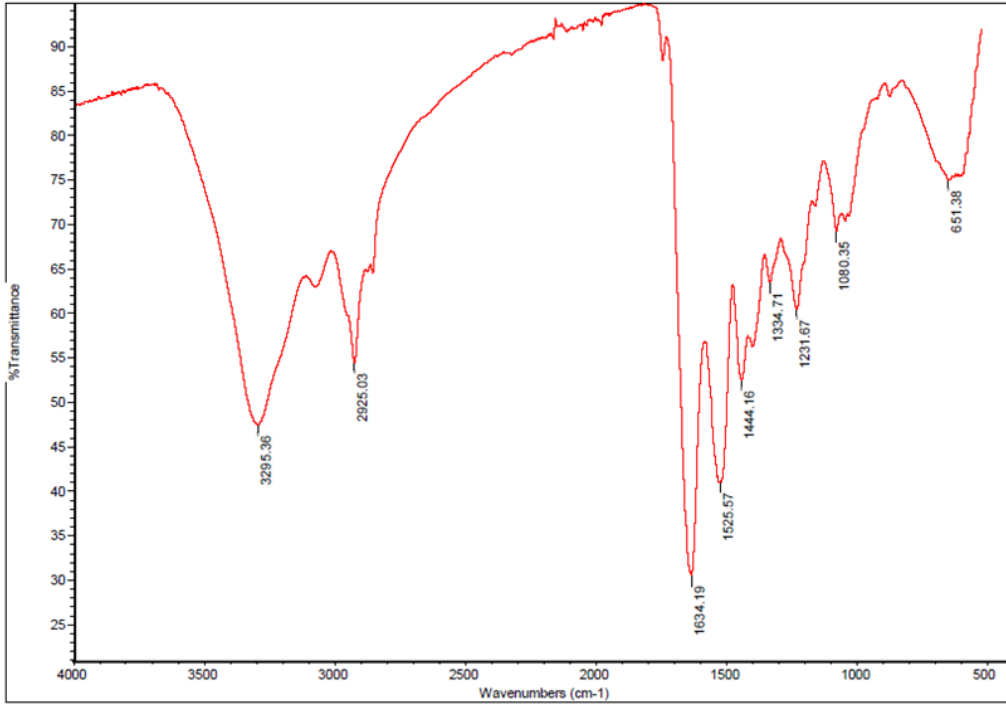


EK 20 60°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu



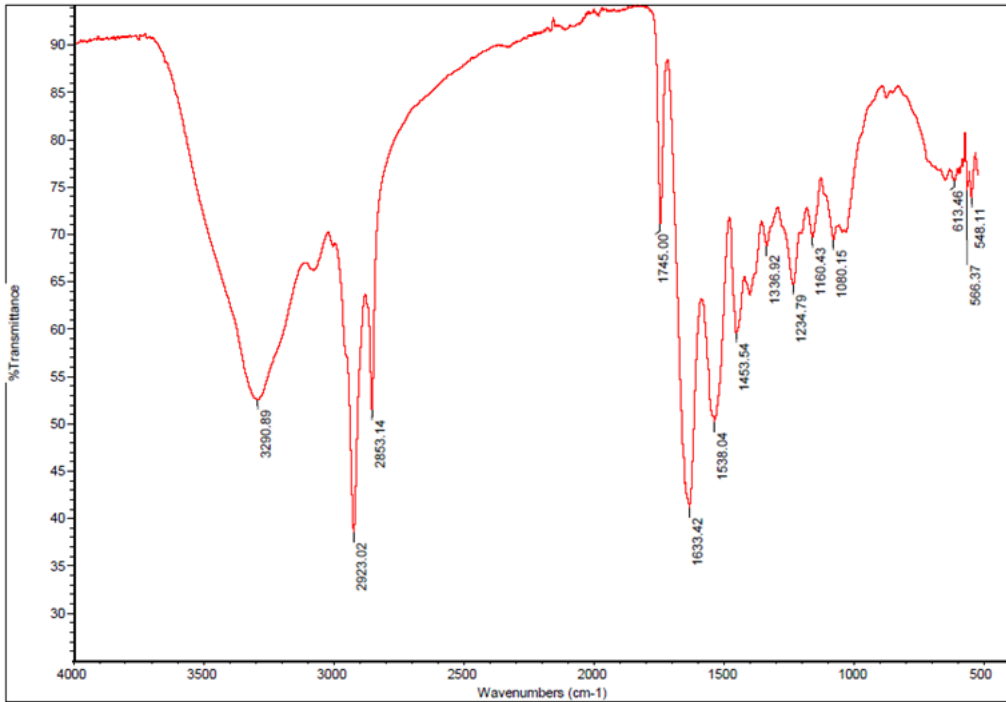
EK 21 60°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin

FTIR spektrumu

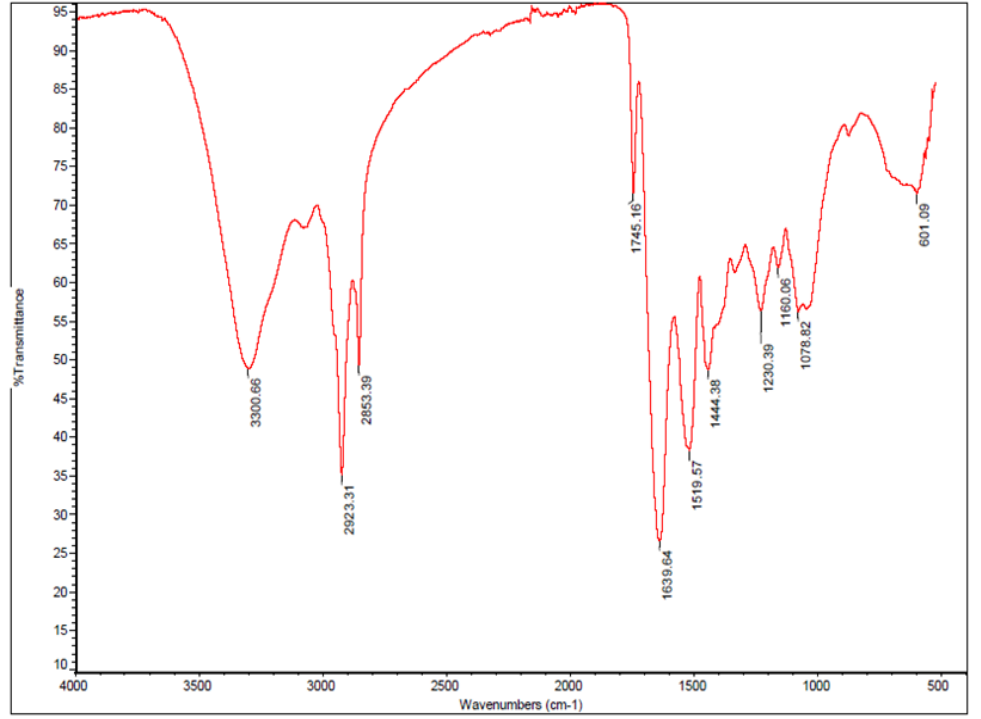


EK 22 65°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin

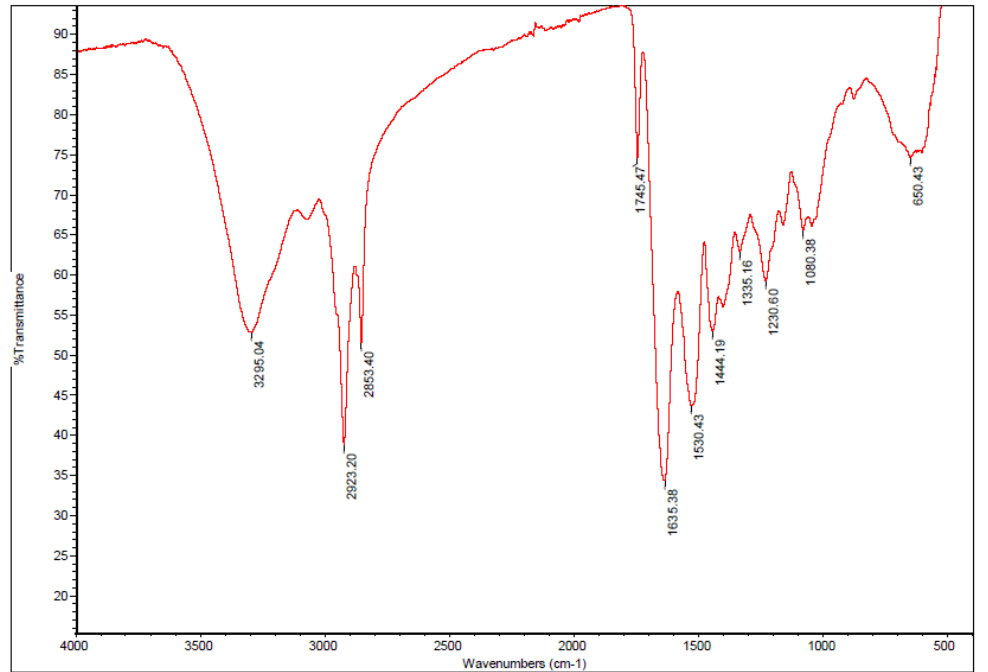
FTIR spektrumu



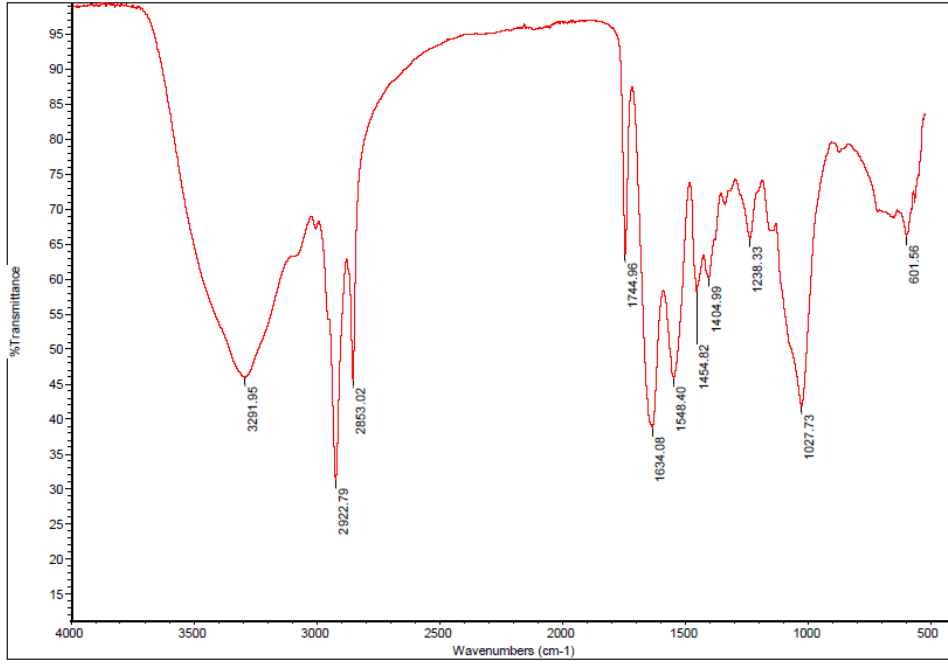
EK 23 65°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu



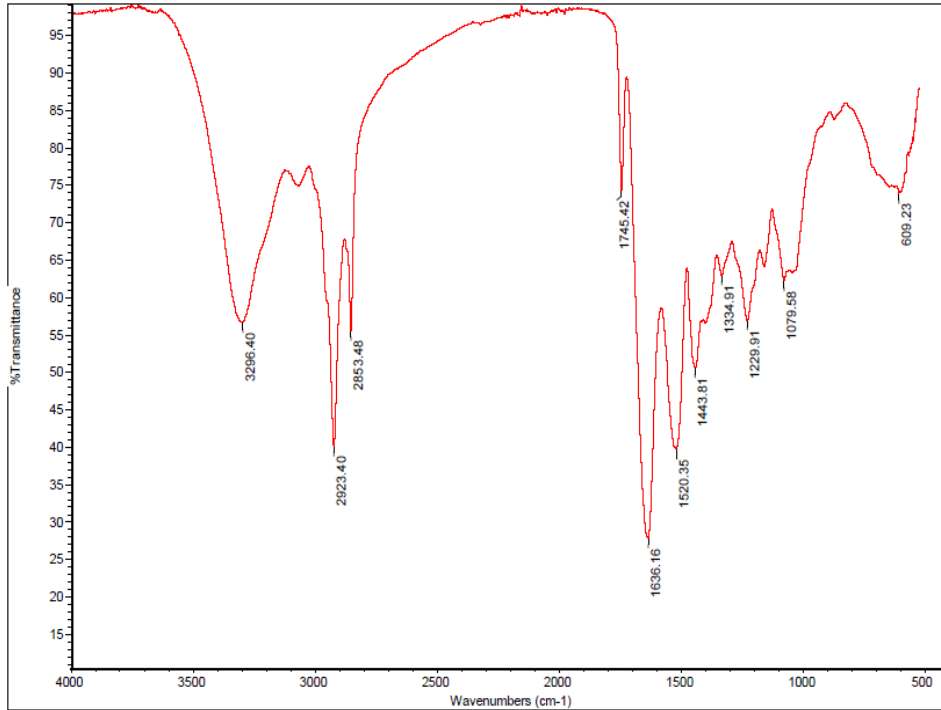
EK 24 65°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu



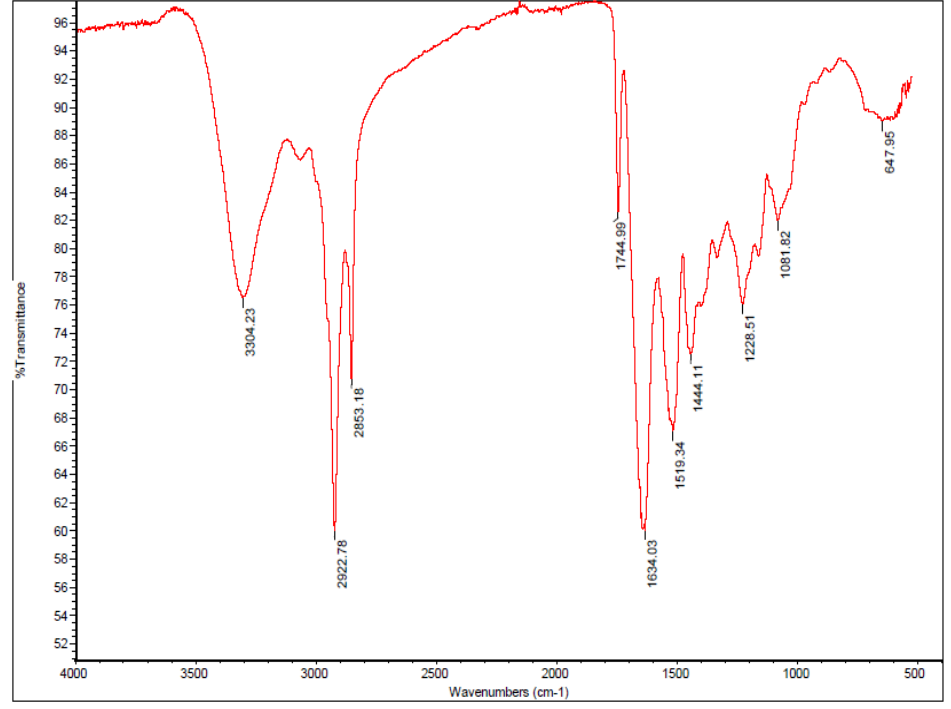
EK 25 70°C- 20 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu



EK 26 70°C- 40 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu



EK 27 70°C- 60 dk ultrason uygulaması ile elde edilen GAG örneğinin FTIR spektrumu



EK 28 GAG örneklerinin L* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

ANOVA

L.degeri

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 177,303 | 9 | 19,700 | 5,333 | ,000 |
| Within Groups | 110,816 | 30 | 3,694 | | |
| Total | 288,119 | 39 | | | |

Homogeneous Subsets

L.degeri

Tukey HSD^a

| parametre | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|------------|---|-------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| 65°C-40 dk | 4 | 88,4300 | |
| 70°C-20 dk | 4 | 88,4525 | |
| 70°C-60 dk | 4 | 89,5625 | |
| 70°C-40 dk | 4 | 89,6250 | |
| 60°C-40 dk | 4 | 90,7850 | |
| 60°C-20 dk | 4 | 90,9925 | 90,9925 |
| 60°C-60 dk | 4 | 91,5775 | 91,5775 |
| 65°C-60 dk | 4 | 92,6375 | 92,6375 |
| 65°C-20 dk | 4 | 93,0100 | 93,0100 |
| kontrol | 4 | | 95,4950 |
| Sig. | | ,055 | ,062 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

EK 29 GAG örneklerinin a* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

ANOVA

a.degeri

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 8,219 | 9 | ,913 | 12,810 | ,000 |
| Within Groups | 2,139 | 30 | ,071 | | |
| Total | 10,358 | 39 | | | |

Homogeneous Subsets

a.degeri

Tukey HSD^a

| parametre | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|------------|---|-------------------------|--------|
| | | 1 | 2 |
| kontrol | 4 | -1,2350 | |
| 65°C-60 dk | 4 | | -,1550 |
| 65°C-20 dk | 4 | | ,0000 |
| 70°C-40 dk | 4 | | ,0300 |
| 70°C-60 dk | 4 | | ,0350 |
| 65°C-40 dk | 4 | | ,2425 |
| 70°C-20 dk | 4 | | ,2825 |
| 60°C-20 dk | 4 | | ,3050 |
| 60°C-40 dk | 4 | | ,3375 |
| 60°C-60 dk | 4 | | ,4050 |
| Sig. | | 1,000 | ,131 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

EK 30 GAG örneklerinin b* değeri içeriklerine ait istatistiksel sonuçlar

ANOVA

b.degeri

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 152,375 | 9 | 16,931 | 15,290 | ,000 |
| Within Groups | 33,218 | 30 | 1,107 | | |
| Total | 185,593 | 39 | | | |

Homogeneous Subsets

b.degeri

Tukey HSD^a

| parametre | N | Subset for alpha = 0.05 | | | |
|------------|---|-------------------------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 65°C-20 dk | 4 | 7,0500 | | | |
| 65°C-40 dk | 4 | 7,8475 | 7,8475 | | |
| 70°C-60 dk | 4 | 8,3250 | 8,3250 | | |
| 70°C-40 dk | 4 | 8,5875 | 8,5875 | 8,5875 | |
| 65°C-60 dk | 4 | 8,6850 | 8,6850 | 8,6850 | |
| 60°C-60 dk | 4 | 9,2825 | 9,2825 | 9,2825 | |
| 60°C-40 dk | 4 | 9,4125 | 9,4125 | 9,4125 | |
| 60°C-20 dk | 4 | | 10,0200 | 10,0200 | |
| kontrol | 4 | | | 11,0275 | |
| 70°C-20 dk | 4 | | | | 14,3825 |
| Sig. | | ,085 | ,144 | ,067 | 1,000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.