

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**FARKLI TÜR BALIK PULLARINDAN ALKALAZ ENZİMİ İLE
BİYOMALZEME AMAÇLI KOLAJEN ELDESİ VE KARAKTERİZASYONU**

Gözde KÖYLÜ BİLGİN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MALZEME BİLİMİ VE MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**FARKLI TÜR BALIK PULLARINDAN ALKALAZ ENZİMİ İLE
BİYOMALZEME AMAÇLI KOLAJEN ELDESİ VE KARAKTERİZASYONU**

Gözde KÖYLÜ BİLGİN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MALZEME BİLİMİ VE MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI TÜR BALIK PULLARINDAN ALKALAZ ENZİMİ İLE
BİYOMALZEME AMAÇLI KOLAJEN ELDESİ VE KARAKTERİZASYONU**

**Gözde KÖYLÜ BİLGİN
MALZEME BİLİMİ VE MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafında FYL-
2020-5173 nolu proje ile desteklenmiştir.**

TEMMUZ 2021

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI TÜR BALIK PULLARINDAN ALKALAZ ENZİMİ İLE
BİYOMALZEME AMAÇLI KOLAJEN ELDESİ VE KARAKTERİZASYONU**

Gözde KÖYLÜ BİLGİN
MALZEME BİLİMİ VE MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 09/07/2021 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / ~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Numan HODA (Danışman)

Prof. Dr. İbrahim Halil MUTLU

Dr. Öğr. Üyesi Firdevs MERT SİVRİ



ÖZET

FARKLI TÜR BALIK PULLARINDAN ALKALAZ ENZİMİ İLE BİYOMALZEME AMAÇLI KOLAJEN ELDESİ VE KARAKTERİZASYON

Gözde KÖYLÜ BİLGİN

Yüksek Lisans Tezi, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Numan HODA

Temmuz 2021; 35 sayfa

Kolajen kelimesi “kola”nın sakız ve “gen” üretmek anlamına geldiği bir Yunanca kelimeden türetilmiştir. Kolajen son dönemde değerine değer katan bir proteindir. Çünkü birçok sanayide kendine yer açmıştır. Özellikle gıda ve kozmetik sanayisi başı çekmektedir. Bu nedenle kolajen elde edilmesi ve uygulamaları alanındaki çalışmalar hız kazanmıştır.

Bu çalışmada; granyöz (*Argyrosomus regius*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) balık türlerinin işlem atığı olarak çıkan balık pullarından alkalaz enzimi ile hidrolize kolajen eldesi ve potansiyel biyomalzeme olarak kullanılabilirliklerinin araştırılması yapılmıştır. Çalışmada enzim oranları değiştirilerek (%0,1, %0,3, %0,5) pH 10 da (NaOH ile pH ayarlanmıştır) ve 45°C de 5 saat boyunca enzim ekstraksiyonu yapılmış ve kolajen verimleri belirlenmiştir. En düşük verim bütün türlerde %0,1 enzim oranında elde edilirken, en yüksek verimin %0,5 oranında olduğu tespit edilmiştir. Çalışılan türler arasında ise en yüksek kolajen verimi bütün çalışılan oranlarda çipura balığı pullarında olduğu belirlenmiştir. Enzim oranlarının elde edilen hidrolize kolajenlerin moleküler ağırlık dağılımlarına etkileri jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile tespit edilmiştir. Çipura pulları için %0,1 enzim oranıyla yapılan çalışmadan elde edilen kolajenin SDS-PAGE ile yapılan moleküler ağırlık dağılımı analizinde elde edilen hidrolize kolajenin moleküler ağırlığının 29 kDa'dan küçük olduğu ve ağırlık yoğunluğunun 6,5 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir. Çipura pullarından %0,3 ve %0,5 oranlarında ve granyöz balığının pullarından bütün enzim oranlarında elde edilen hidrolize kolajenlerin moleküler ağırlık dağılımlarında da yoğunluğun 6,5 kDa civarında olduğu görülmektedir. Levrek balığı pulların %0,1 enzim oranıyla elde edilen hidrolize kolajenin moleküler ağırlık dağılımında büyük bir yayılım olduğu tespit edilmiş bu yayılımın herhangi bir bölgesinde yoğunluk oluşmadığı belirlenmiştir. Levrek balığı pullarında kolajen eldesinde çalışılan diğer oranlarda elde edilen kolajenlerin moleküler ağırlık dağılımında yoğunluğun yine 6,5 kDa civarında olduğu sonucuna varılmıştır. Projede balık pullarının enzimatik hidrolize kolajen kaynağı olarak kullanılabilmesi, atık pulların ekonomiye katılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca elde edilen hidrolize kolajenin karakterizasyonu sonucunda literatürde biyomalzeme olarak kullanılanlarla benzerlik gösterdiği bu nedenle elde edilen kolajenlerin biyomalzeme olarak kullanım potansiyellerine sahip oldukları ortaya çıkartılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Alkalaz enzimi, Balık atığı, Biyomalzeme, Enzimatik hidroliz, Hidrolize kolajen, Jel elektroforezi.

JÜRİ: Prof. Dr. Numan HODA

Prof. Dr. İbrahim Halil MUTLU

Dr. Öğr. Üyesi Firdevs MERT SİVRİ

ABSTRACT

OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF COLLAGEN FOR BIOMATERIALS BY ALKALASE ENZYME FROM DIFFERENT KINDS OF FISH SCALS

Gözde KÖYLÜ BİLGİN

MSc in Material Science and Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Numan HODA

July 2021; 35 pages

The word collagen is derived from a Greek word "cola" meaning to produce gum and "gene". Collagen is a protein that has attracted much interest due to its valuable properties in the last period. It has unusual applications in many industries. Especially the food and cosmetics industry are leading the way. For this reason, studies in the field of collagen production and applications have accelerated.

In this study, the production of hydrolysed collagen using alkalase enzyme from fish scales of graniöse (Argyrosomus regius), sea bass (Dicentrarchus labrax) and sea bream (Sparus aurata) and their use as potential biomaterial were investigated. In the study, collagen extraction was performed at pH 10 (pH adjusted with NaOH) and at 45°C for 5 hours by changing the enzyme ratio (0.1%, 0.3%, 0.5%) and the collagen yields were determined, and their characterization were performed. While the lowest yield was obtained at 0.1% enzyme ratio in all species, the highest yield was found to be at 0.5%. Among the studied species, the highest collagen yield was determined in sea bream scales in all studied ratios. The effects of enzyme ratios on the molecular weight distributions of the obtained hydrolysed collagens were determined by gel electrophoresis (SDS-PAGE). In the molecular weight distribution analysis of the collagen obtained from the study with 0.1% enzyme rate for sea bream, it was determined that the molecular weight of the hydrolysed collagen obtained by SDS-PAGE was less than 29 kDa and its weight density was around 6.5 kDa. Molecular weight distributions of hydrolysed collagens obtained at 0.3% and 0.5% ratios from sea bream scales and at all enzyme ratios from graniöse scales show that the density is around 6.5 kDa. It was determined that there was a large distribution in the molecular weight distribution of the hydrolysed collagen obtained with 0.1% enzyme rate of sea bass fish scales, and it was determined that there was no density in any region of this distribution. It was concluded that the density in the molecular weight distribution of the collagen obtained at other ratios studied in the production of collagen in sea bass fish scales was around 6.5 kDa. It was concluded that fish scales could be used as a source of enzymatic hydrolysed collagen in the project, and waste scales could contribute to the economy. In addition, as a result of the characterization of the obtained hydrolysed collagen, it has been revealed that the collagens obtained are similar to those used as biomaterials in the literature, therefore the obtained collagens have the potential to be used as a biomaterial.

KEYWORDS: biomaterial, enzymatic hydrolysis, fish scales, fish processing waste, gel electrophoresis, hydrolysed collagen.

COMMITTEE: Prof. Dr. Numan HODA

Prof. Dr. İbrahim Halil MUTLU

Assist. Prof. Dr. Firdevs MERT SİVRİ

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın hazırlanmasında, gerekli ortamı sağlayan ve çalışmanın her safhasında bana destek olan tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Numan HODA, bu disiplinler arası çalışmaya destek vererek Gıda Mühendisliği araştırma laboratuvarındaki deneylerimde destek sağlayan en doğru sonuçlar için yardımlarını esirgemeyerek çalışmanın tamamlanmasına destek veren Sayın Prof. Dr. Ayhan TOPUZ, doktora öğrencisi Sayın Ecem VURAL'a ve Sayın Arş. Gör. Fatma ERSÖZ'e Malzeme Bilimi ve Mühendisliği araştırma laboratuvarındaki yardımları, fikirleri ve hayat görüşleriyle bana sürekli yardım eden Sayın hocam Prof. Dr. Meltem ASİLTÜRK ve canım arkadaşım Merve TUNÇ'a deney çalışmalarımı yürütülmesinde ve tezin şekillenmesinde yardımlarından dolayı Arş. Gör. Tunç Eren AKAY'A teşekkürü bir borç bilirim.

Yalnız bu çalışmada değil, hayatımın her alanında desteğiyle yanımda olan ve ne yaparsam beni destekleyen annem Ayşe KÖYLÜ'ye, babam Adnan KÖYLÜ'ye, kardeşim Kübra KÖYLÜ'ye, eşim Süleyman BİLGİN'e ve ailemdeki herkese minnet ve şükranlarımı sunuyorum.

Çalışmama verdikleri katkılardan dolayı Akdeniz Üniversitesi BAP birimine teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	4
2.1. Kolajenin Yapısı.....	4
2.2. Kolajen Çeşitleri.....	5
2.3. Kolajenin Özellikleri.....	5
2.4. Hayvandan Kolajen Kaynakları.....	5
2.5. Ekstraksiyon ve Hayvansal Kaynaklardan Kolajen Ekstraksiyonu.....	8
2.6. Kolajenin Uygulamaları.....	9
2.7. Doku Mühendisliği Kolajen Kullanım Alanları.....	10
2.8. Jel Elektroforezi.....	11
3. MATERYAL VE METOT.....	13
3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	14
3.2. Ön İşlemler.....	15
3.3. Kurutma ve Öğütme.....	15
3.4. Enzim Ekstraksiyonu Aşaması.....	17
3.5. Santrifüj ve Dondurarak Kurutma.....	18
3.6. SDS-PAGE Analizi.....	20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	21
4.1. Ön İşlemlerin Değerlendirilmesi.....	21
4.2. Kurutma ve Öğütmenin Değerlendirilmesi.....	21
4.3. Enzim Ekstraksiyonu.....	22
4.4. Kolajen Verimin Belirlenmesi.....	22
4.5. Çözünürlük.....	25
4.6. pH Hesaplamaları.....	25

4.7. SDS-PAGE Analizi Sonuçları	26
5. SONUÇLAR	28
6. KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Farklı Tür Balık Pullarından Alkalaz Enzimi ile Biyomalzeme Amaçlı Kolajen Eldesi ve Karakterizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

09/07/2021

Gözde KÖYLÜ BİLGİN



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

a/a	: Ağırlık/ağırlık oranı
a/h	: Ağırlık/çözgen oranı
C ₄ H ₉ OH	: Bütanol
kDa	: Kilo Dalton
mm	: Milimetre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
M	: Molar
nm	: Nanometre
NaOH	: Sodyum Hidroksit
pI	: İzoelektrik noktalar
pH	: Hidrojenin gücü
rpm	: Santrifüj cihazı dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar

AOSB	: Akdeniz Organize Sanayi Bölgesi
BSE	: Deli Dana Hastalığı
Ç	: Çipura
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik asit
FMD	: Şap Hastalığı
G	: Granyöz
KM	: Kuru Madde
L	: Levrek
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrlamid Jel Elektroforezi
TBP	: Temizlenmiş Balık Pulu

TSE : Bulaşıcı Süngerimsi Ensefalopati

Ondalık sayı yazımı “21,01” şeklindedir.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kolajen yapısı	4
Şekil 2.2. Kolajenin doku mühendisliğinde kullanım alanları.....	10
Şekil 3.1. Hammadde olarak temin edilen balık pulları a) Granyöz balık pulu; b) Levrek balık pulu; c) Çipura balık pulu.....	13
Şekil 3.2. Kolajen üretim basamakları	14
Şekil 3.3. Temizlik aşamaları a) NaOH yıkaması; b) Bütanol yıkaması; c) EDTA yıkaması	15
Şekil 3.4. Vakum Fırını.....	16
Şekil 3.5. Kurutma aşaması a) Temizleme sonrası levrek balığı pul görüntüsü; b) Kurutulmuş levrek balığı pul görüntüsü.....	16
Şekil 3.6. Santrifüj aşaması.....	18
Şekil 3.7. Kolajen çözeltisi	18
Şekil 3.8. Dondurarak kurutma cihazı	19
Şekil 3.9. Kurutulmuş ve etiketlenmiş kolajen numuneleri.....	20
Şekil 4.1. Hidrolize kolajenlerin SDS-PAGE analiz sonuçları.....	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı ekstraksiyon teknikleri kullanılarak çeşitli balık türlerinden elde edilen kolajen örneklerinin biyomalzeme olarak kullanım alanları.....	11
Çizelge 3.1. Elek çapının kolajen yüzdesi üzerine etkisi.....	17
Çizelge 4.1. Balık çeşidine göre yüzde kuru madde değerleri.....	22
Çizelge 4.2. Ön işlem sonrası kuru balık pullarında oluşan kayıp miktar ve oranları....	23
Çizelge 4.3. Enzim miktarına göre elde edilen kolajen verimi yüzdesi.....	24
Çizelge 4.4. Balık çeşidi ve enzim miktarına göre pH değerleri	25

1. GİRİŞ

Vücutta, doku ve organlarda yer alan çok sayıda farklı tipte protein mevcuttur. Bu tür yapıların gerek yapısal gerekse de fonksiyonel özelliklerinin korunması vücudun genç ve zinde kalmasını sağlamaktadır. Farklı tiplerdeki proteinler, farklı görev ve yapıları ile bir arada uyumlu bir şekilde vücudun sağlıklı kalmasını sağlamaktadırlar. Bu proteinlerin en önemli olanlarından birisi de kolajendir.

Kolajen, kemik, deri, tendon, ligamentler vb. yapılar başta olmak üzere vücudun birçok bölgesindeki farklı organ ve dokularda yer alan yapısal proteindir. Vücutta en çok yer alan protein olmakla birlikte tüm vücut proteinlerinin dörtte birini oluşturmaktadırlar. Bağ dokularda önemli bir yere sahip olan kolajen, dokuları yapıştırıcı gibi bir arada tutma özelliği ile ön plana çıkmaktadır. Vücutta bol miktarda yer alan ve farklı dokularda çeşitli görevlere sahip olan kolajen, vücut yapısını koruma görevini üstlenen temel maddelerden bir tanesidir. Yaşın ilerlemesi ile vücutta kolajen üretimi azalmakla birlikte üretilen kolajenin kalitesi de düşmektedir. Bu durum, cildin esnekliğini kaybetmesine ve ciltte kırışıklıklar oluşmasına sebebiyet vermektedir. Bununla beraber, kırık dokunun da zayıflaması sonucu eklemlerle ilgili problemler de ortaya çıkmaktadır. Yaşın ilerlemesi ile kolajen üretiminin azalması doğal bir süreçtir. Bunun yanında farklı sebeplerden dolayı da kolajen üretimi zayıflayabilir. Bu etkenlerden bazıları, fazla miktarda rafine edilmiş karbonhidrat tüketimi, aşırı miktarda şeker tüketimi, güneş ışığına uzun süre maruz kalmak, sigara içmek gibi etkenler de kolajen üretimini azaltabilir ve kalitesini de düşürebilmektedir. Bu durumda vücutta kolajen takviyesi yapılması bu tür sıkıntıların bir miktar önüne geçilmesinde yardımcı olabilecek niteliktedir.

Kozmetik ve medikal sektörde yapılan çalışmalar, vücuttaki kolajen miktarını artırarak daha sağlıklı bir yaşamı sağlayabilmeyi hedeflemektedir. Kolajen takviyesi, saç ile ilgili problemlerden kırık dokulara, yüzde ve ciltte oluşan kırışıklardan, bacak bölgesindeki selülitlerden, kalp rahatsızlıklarına kadar uzanan geniş bir yelpazeye sahiptir. Bu tür problemlerin azaltılmasına yardımcı bir uygulama olarak yer almaktadır.

Özellikle kozmetik endüstrisi ve medikal sektörde oldukça yaygın kullanılmaktadır. Kozmetik olarak, kolajen takviyesi cilt esnekliğini artırarak, cildin nem dengesini düzenlemeye yardımcı olmaktadır. Cildin daha derin tabakalarındaki kolajen yoğunluğunu artırarak, kırışıklıkları önler ve cildin daha genç görünmesini sağlamaktadır. Kolajen takviyesi kas hacmi ve kütlesinin artırılmasında da kullanılabilir. Düzenli egzersiz yapan ve kolajen alan bireylerde kas kütlesinin normale göre daha çok arttığını gösteren bazı çalışmalar da bulunmaktadır. Kolajen, aynı zamanda, kırık dokuların üretiminde de yer alan önemli bir proteindir. Kırık dokular, eklemlerin esnek ve rahatça hareket etmesini sağlamaktadır. Yaşın ilerlemesi ile kırık dokular ve eklem yapısı bozularak vücutta eklem ağrılarına sebep olmaktadır. Kolajen takviyesi ile eklemlerdeki bu ağrıların hafifletilmesi de sağlanmaktadır. Bunlara ek olarak, kolajen takviyesi kalp rahatsızlıklarında da kullanılabilir. Kolajen takviyesi ile, koroner arter, kalp krizi gibi rahatsızlıkların önüne geçilebilmektedir. Kolajen, saç köklerinin sağlıklı kalmasına da yardımcı olarak, saçlarda beyazlamanın azalmasına da katkıda bulunmaktadır. Ayrıca saç köklerini içeren cilt dokusunu koruyarak, yaşlanma ile ortaya çıkabilecek saç güçsüzlüğü ve dökülmesi gibi problemlere de çözüm olabilmektedir. Bunun yanında kolajen takviyesi vücutta daha birçok yerde de önemli katkılar sağlayabilmektedir.

Kolajen, hammaddesi kaynağına göre farklılık gösteren bir malzemedir. Bu hammaddeleri şu şekilde sıralayabiliriz. Karasal hayvan kolajen kaynakları, sığır, inek, tavuk, geyik ve keçi olarak sıralanabilir. Bu hayvanların özellikle kemik, deri ve sakatat bölgelerinde kolajen miktarı daha fazladır. Kara hayvanlarında domuzun helal gıda olarak görülmemesi, sığırlarda çıkan hastalıklar kolajen üretiminde deniz kaynaklarına olan ilgiyi arttırmaktadır. Deniz kaynaklarında ise hem omurgalı ve hem de omurgasız canlılarda kolajen olduğu bilinmektedir. Omurgalı deniz canlıları grubundan olan balıklarda ise deri, iç organlarda ve pullarda kolajen olduğu bilinmektedir.

Diğer taraftan, yaklaşık dörtte üçü su ile çevrili olan dünyada, deniz mahsulleri ve balıkçılık oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Deniz mahsulleri, önemli bir yiyecek kaynağı olarak ifade edilirken diğer taraftan da endüstride bazı ürünler içinde temel bir hammadde kaynağı olarak ele alınmaktadır. Üç tarafı denizlerle çevrili olan Türkiye’de ise Karadeniz, Ege ve Marmara denizi başta olmak üzere balıkçılık önemli bir geçim kaynağı olarak ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla, Türkiye’de balıkçılık ve su ürünleri ile ilgili endüstri alanlarının gelişmesi ve bu alanlarda yeni atılımların gerçekleştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla, deniz ürünleri üzerine yapılan araştırmalarında hız kazanması gerekmektedir. Deniz ürünleri arasında en çok tüketilen ve en yaygın bulunan mahsul balıklardır. Balıklar gıda sektöründe oldukça yaygın bir yer tutmakta iken, yiyecek olarak tüketimi sonrası atık olarak birçok kemik, pul ve iç organlar ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda balık atıkları temizleme işlemi sırasında atılarak değersiz hale gelmektedir.

Oysaki yukarıda bahsedilen kolajen üretimi sağlanan hammadde kaynakları arasında, deniz mahsulleri ve özellikle balıklar kaynak olarak büyük bir kitleye sahiptir. Üç tarafı denizlerle çevrili bir ülke içerisinde, böyle bir atık maddeyi hayata ve üretime geçirmek, ulusal ve uluslararası anlamda önemli bir katkı sağlayacaktır.

İnsan vücudunda, yaş ilerlemesi ile kolajen üretiminin azalması ve kalitesinin düşmesi ile ortaya çıkan eksikliklerin giderilmesi adına kolajen takviyesine katkıda bulunmak oldukça önemlidir. Ülkemize çok büyük paralar ödenerek ithal edilen kolajenin ülkemizde üretimi istenmektedir. Bu bilgilerden yola çıkılarak planlanan tez çalışmasında, öncelikle literatür çalışması yapılmış ve literatür çalışması sonucunda, kolajen üretiminin farklı hammadde ve farklı üretim teknikleri ile kazanımları mercek altına alınmıştır.

Kolajen farklı kaynaklardan elde edildiği gibi en önemli elde edilme kaynakları, hayvansal kaynaklardır. Gerçekleştirilen tez çalışmasında, Türkiye’nin denizlerle ilgili coğrafi konumu ve atık maddelerin yoğunluğu göz önünde bulundurularak bir kolajen üretim hammaddesi ve bu hammaddenin işlenmesi ile ilgili araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda, ülkede yaygın olarak yetiştirilen granyöz, çipura ve levrek balıklarının pulları değerlendirilmiş ve çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmada, ilk etapta, hammadde temini sağlanmıştır. Hammadde temininden sonra elde edilen balık pulları bir takım ön işlemden geçirilmiştir. Ön işlem sonucunda elde edilen madde farklı yöntemlerle işlenmiş ve değerlendirme analizlerine tabi tutulmuştur. Çalışma Akdeniz Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği ile Gıda mühendisliği laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Hammadde ise yine Antalya Organize Sanayi Bölgesi (AOSB) bünyesinde bulunan Antalya Balık A.Ş. firmasından

temin edilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen numunelerin analizleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar tezin içerisinde açıklanmıştır.

Tezin giriş bölümünde çalışmanın yapılmasına neden ihtiyaç duyulduğu ve tezin gerçekleşmesi ile ekonomiye ve bilime nasıl bir katkı sağlayacağı kısaca özetlenmiştir. Tezin ikinci bölümünde ise konu ile ilgili bir literatür taraması yapılmış ve çalışma ile ilgili karşılaştırılması yapılmıştır. Tezin üçüncü kısmında materyal ve metotlardan bahsedilmiştir. Dördüncü kısımda ise tezin sonuçlarının bulunduğu bulgular kısmı ve literatürde yapılan çalışmalar ile karşılaştırma ve çalışmanın verimliliği ile ilgili tartışma kısmı ve son olarak beşinci bölümde ise çalışmanın literatüre genel katkısı ile sonuç kısmı yer almaktadır.

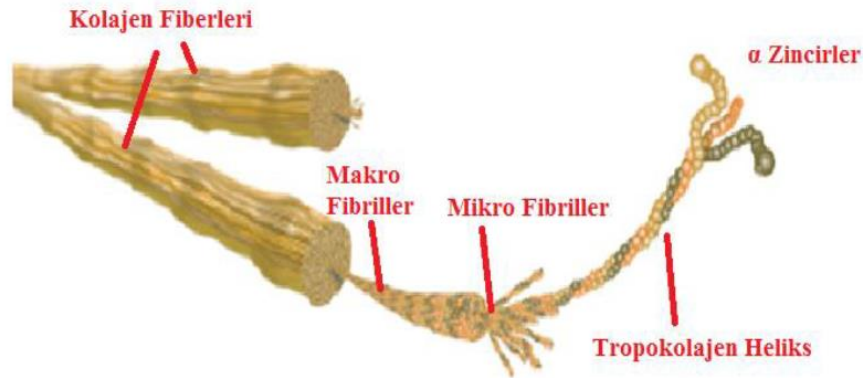
2. KAYNAK TARAMASI

Kolajen kelimesi “kola”nın sakız ve “gen” üretmek anlamına geldiği bir Yunanca kelimedenden türetilmiştir. Kolajen, hücre dışı matriste ve hayvanların bağ dokusunda bulunan lifli bir yapısal proteindir (Ramshaw vd. 2009). Hayvanda en bol bulunan proteindir ve bitkilerde ve tek hücreli organizmalarda yoktur. Omurgasızlarda vücut duvarlarında ve tırnak etlerinde bulunur. Kolajen, özellikle memelilerde tüm vücudun protein içeriğinin %25'ini oluşturur (Muller 2003). Hayvanlarda kornealarda, kemiklerde, kan damarlarında, kırıkta, diş kemiklerinde vb. bulunur.

Deri, tendonlar ve bağlar gibi lifli dokularda uzun lifler olarak bulunur. Endomisyumun en önde gelen bileşeni olan kas dokusunun %1-2'sini oluşturur. Kolajen, çoğunlukla bağ dokusunun fibroblast kısmından ve epitel dokulardan sentezlenmektedir (Lullo vd. 2002; Kadler vd. 2007).

2.1. Kolajenin Yapısı

Kolajenin temel yapısal birimi, iki özdeş zincirli ($\alpha 1$) ve üçüncüsü kimyasal bileşiminde ($\alpha 2$) bir dereceye kadar değişen üçlü bir sarmal şeklinde düzenlenmiş üç polipeptit zincirinden oluşan bir heteropolimerdir. Her bir zincir, 300 nm uzunluğunda olan tipik bir sağ el sarmal yapı içerisinde birbirlerinin etrafına sarılmış 1050 amino asite sahiptir. Çapı yaklaşık 1,5 nm'dir ve molekül ağırlığı yaklaşık 290 kDa'dur. Yapısı, X ve Y'nin herhangi bir amino asit olabileceği, ancak çoğunlukla prolin ve hidrokisprolin olduğu yinelenen bir motif Gly-X-Y'ye sahiptir. Her üçüncü amino asit pozisyonunda glisin, tropokolajen molekülünde 3α zincirlerinin sıkı bir şekilde paketlenmesini sağlamak için çok önemlidir. Kolajen, fibril kolajen tiplerini oluşturan altıgen ve yarı altıgen şekillerde paketlenir. Bu paket, tabaka benzeri veya mikrofibriller olabilir. Mikroskopik olarak kolajen, uzun lifler olarak bulunur (Szpak 2011). Şekil 2.1'de kolajen yapısı gösterilmektedir (Yetim 2011).



Şekil 2.1. Kolajen yapısı

2.2. Kolajen Çeşitleri

Şu ana kadar 46 ayrı polipeptit zincirinden oluşan yaklaşık 28 kolajen türü tanımlanmıştır. Kolajen türlerinin hepsi karakteristik üçlü sarmala sahiptir, ancak sarmalın uzunluğu, sarmal olmayan kısmın büyüklüğü ve yapısı bir türden diğerine değişir (Miller 1984). Bunlar arasında en yaygın 5 tanesi şunlardır:

Kolajen I: Cilt, kemik, dişler, tendon, bağ, damar bağları, organlar (kemiğin organik kısmının ana bileşeni). Vücutta en çok bulunan dayanıklılığı sağlayan kolajendir. Bu kolajen çeşidi genellikle Tip 1 olarak adlandırılmaktadır (Krishnamoorthi vd. 2017).

Kolajen II: Kıkırdak yapının oluşmasını sağlayan kolajendir. Kıkırdak yapının %90-95'ni karşılayan tip 2 kolajenidir (Jeevithan vd. 2015). Gözün yapısında da bulunduğu bilinmektedir.

Kolajen III: Genelde kolajen 1 ile bulunur. Vücuda elastikiyet katar ve sarkmaları önler (Liu vd. 2001). Diğer bulunduğu yerler ise kas, kan damarlarıdır.

Kolajen IV: Bazal membran ve bazal laminanın epitel salgılanan tabakasını oluşturur (Włodarczyk vd. 2017).

Kolajen V: Saç, hücre yüzeyleri, gözün korneasında ve plasenta da bulunmaktadır (Gelse vd. 2003).

Vücuttaki kolajenin %90'ı tip I'dir ve bunu tip II ve III izler. Tip I kolajen bolluğunun nedeni, hemen hemen tüm bağ dokularında yaygın olarak bulunmasından kaynaklanmaktadır (Cheah 1985).

2.3. Kolajenin Özellikleri

Hücre dışı matris formundaki dokuların çoğunu destekler ve hücrelere yapı kazandırır. Tendonlarda, kemiklerde, kıkırdakta, fasyada, vb. Varlığında sergilenen büyük çekme mukavemeti vardır. Cilde esneklik ve kuvvet kazandırır, doku ve organ gelişimine yardımcı olur. Kolajen, toksinlerin ve patojenlerin emilimini engelleyerek cilde koruma sağlar (Fratzl 2008). Bir hücrenin biyolojik fonksiyonlarında rol oynar (hücre yaşaması, çoğalması ve farklılaşması), hasarlı kemiklerin veya kan damarlarının iyileşmesine yardımcı olur ve yapısal bütünlüğü korur (Buehler 2006).

2.4. Hayvandan Kolajen Kaynakları

Sığırların, derisinden ve kemiklerinden faydalanılır. En büyük endüstriyel kolajen kaynaklarından biridir. İnsanlara tehdit oluşturan BSE, TSE, FMD, özellikle de deli dana hastalığı gibi hastalıkların patlaması nedeniyle araştırmacılar alternatif daha güvenli bir kolajen kaynağı aramaktadırlar. Sığır kolajeninin en büyük dezavantajlarından biri, kullanılan popülasyonun yaklaşık %3'ünde alerjik etki göstermesidir. Sığır aşil tendonu, tip I kolajen elde etmek için endüstriyel olarak kullanılır. Tip IV plasental villiden (bağırsak içi kılsı çıkıntı) ve tip II nazal veya eklem kıkırdaktan elde edilir.

Domuzların derisi ve kemikleri, endüstriyel amaçlı kolajen elde etmek için yaygın olarak kullanılır. Domuz kolajeni neredeyse insan kolajenine benzer olduğundan,

kullanıldığında fazla alerjik soruna yol açmaz. Ancak sığır kaynağında olduğu gibi, zoonozun (insanlara geçebilen hayvan hastalığı) oluşmasına yol açan kirlenme riski taşır ve ayrıca dini kısıtlamalar nedeniyle domuz kolajeninin kullanılmasında zorluklar yaşanmaktadır. Yetişkin domuz iç derisi ve ince bağırsak mukozasından elde edilen kolajenler tendon takviyesi, fitik onarımı, cilt ve yara iyileşmesi, plastik ve rekonstrüktif cerrahi için kullanılmaktadır (Cortial vd. 2006).

Diğer hayvansal kaynaklar tarafından bakıldığında ise, tavuk, kanguru kuyruğu, sıçan kuyruğu tendonu, ördek ayağı, at tendonu, timsah kemik ve derisi, kuş ayakları, koyun derisi, kurbağa derisi ve hatta bazen insansal kaynakları içermektedir (Johnson vd. 1999; Wood vd. 2008). Rekombinant insan kolajenin, immünojenikliğin diğer kaynaklarla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu zaman kullanılır. Yetişkin at perikardiyum (kalp dış zarı) kolajeni tendon takviyesi, cilt ve yara iyileşmesi ve fitik onarımı için kullanılır. Tip I ve II kolajen at derisinden, eklem kıkırdağından ve fleksör tendonundan izole edilir (Cortial vd. 2006). Tip I kölenin baskın olarak bulunduğu tavuk boynundan tip I, II, III ve V kolajenleri elde edilmiştir. Tavuk ayağı önemli bir kolajen kaynağıdır. Tip IX tavuk embriyosunda sternal kıkırdağta bulunur ve derisinden tip I ve III, kas dokularından tip IV elde edilir (Mayne vd. 1980; Hutmacher 2000; Quereshi 2010). Tip I kolajen, su kurbağasının yumurtalık tüplerinden de elde edilmiştir (Wang vd. 2011).

Günümüzde kolajen elde etmek için deniz kaynağının en güvenli kaynak olduğu tespit edilmiştir. Bu kaynağı onaylamanın bir diğer nedeni de “yaşamın deniz kaynaklı” olduğu inancıdır. Sığır ve domuz gibi kara hayvanları kaynaklarından kolajen ekstraksiyonu karmaşık, zaman alıcı ve pahalıdır. Elde edilen verim diğer kaynaklara kıyasla daha düşüktür. Olumsuz enflamatuvar ve immünolojik cevap ve sağlık sorunlarına neden olan kara hayvanları arasında çeşitli hastalıkların yaygınlığı konusundaki endişeler nedeniyle, deniz kaynakları araştırılmaya başlanmıştır (Exposito vd. 1999, 2002; Addad vd. 2011; Krishnan ve Perumal 2013).

Dünyada ve Türkiye’de, deniz balıkçılığının ve yetiştirme balıkçılığın sayısı her geçen gün artmaktadır. Bu artış tüketilir olmayan balık yan ürünlerinin artışına da sebep olmaktadır. Balık yan ürünleri (balık pulu, organları, derisi, kılçıkları vb.) yüksek protein içermelerine rağmen atık olarak çevreyi kirletmektedir ve bu kirlilik hiç de yadsınacak kadar az değildir. İnsanların tükettiği su ürünlerinin %20-50’si yenilebilir kısım olurken, kalan kısımlar ise atık haline gelmektedir. Dünya genelinde su ürünlerinin işlenmesinden sonra yaklaşık olarak yıllık 200 milyon ton atık ortaya çıkmakta ve bu atıklar uygun şekilde değerlendirilememektedir (Pal ve Suresh 2016). Atık kısmının büyük çoğunluğunu da kemikler, deri ve pullar oluşturmaktadır. Bu atıklar değerlendirilerek ucuz kolajen elde edilmesi sağlanabilmektedir (Srikanya vd. 2017).

Bu kirlenmenin azaltılması için birçok alanda çalışmalar yürütülmektedir. Balık atıkları yüksek protein içerikleri sayesinde, hayvan yemi, toprak gübresi, protein tozları olarak sporcu beslenmesinde ve daha birçok alanda kullanılmaktadır. Ancak bu ürünler ekonomik olarak balıkçılık endüstrisi için yeterli değildir.

Bu kadar değerli bir proteinin daha fazla getirisi olan bir alanda kullanılması gerekmektedir. Çünkü balık, insan vücudunda en bol bulunan protein olan tip 1 kolajen bakımından zengin bir ürün olarak sürdürülebilir kolajen kaynağıdır (Arvanitoyannis ve

Kassaveti 2008). Balık atıklarından kolajeni elde etme oranı uygulanan deney türlerine, mevsime, balık çeşidine göre bazı farklılıklar gösterebilmektedir. Balık kolajeni, memeli kolajenine alternatif bir hammadde olarak kullanılabilir. Böylelikle, biyoatık olarak kaybedilen bu yan ürünlerin değerlendirilmesi sağlanacak, bu sayede, çevre kirliliği azalacak ve aynı zamanda bu ürünler ile canlılar için faydalı kolajen ortaya çıkarılacaktır.

Deniz kaynağının aşağıdaki gibi kara hayvanı kaynaklarına göre büyük avantajları vardır:

- i) BSE, TSE ve FMD gibi zoonoz içermez.
- ii) Yüksek kolajen içeriğine sahiptir.
- iii) Çevre dostudur.
- iv) Hayvanlardan daha düşük vücut sıcaklığına sahiptir, böylece daha büyük emilim sağlar.
- v) Düşük moleküler ağırlık nedeniyle daha fazla emilim sağlar.
- vi) Daha az dini ve etik kısıtlamalar vardır.
- vii) Biyolojik kirleticilerin ve toksinlerin neredeyse ihmal edilebilir düzeyde bulunması.
- viii) Düşük inflamatuvar cevap.
- ix) Daha az immünojenik.
- x) Metabolik olarak uyumlu.

Bu kaynak, balıklar, yıldız balıkları, deniz anası, süngerler, deniz kestanesi, ahtapot, kalamar, mürekkep balığı, deniz anemonu ve karides gibi deniz omurgasızlarının ve omurgalıların kullanımını içerir (Strawich ve Nimni 1971; Song vd. 2006; Sugiura vd. 2009).

Literatürde derisinden Tip I kolajen elde edilen balık türlerinden bazıları;

- i) Gadus morhua
- ii) Gümüş sazan Hipofthal michthysmolitrix,
- iii) Japon levrekleri,
- iv) Tombul uskumru boğa başı köpekbalığı,
- v) Dil balığı;

Şeklindedir.

Genel olarak, balık pulu ve balık kemiğinden elde edilen örnekler ise:

- i) Gadus morhua
- ii) Thunnus obesus
- iii) Orkinos atla,
- iv) Japon levrekleri,
- v) Sarı çipura,
- vi) Uskumru'da; yüzgeci
- vii) Japon levrek skalası
- viii) Pagrus majör
- ix) Oreochromis niloticus
- x) Sazan

Şeklinde sıralanabilmektedir (Nagai vd. 2004; Bhagwat ve Dandge 2016; Abdollahi vd.

2018; Subhan vd. 2020).

Sazanın (*Cyprinus carpio*) pulu, derisi ve kemiğinden (Duan vd. 2009), dev kızıl deniz hıyarının (*Parastichopus californicus*) derisinden (Liu vd. 2010), büyük göz aslanın (*Priacanthus tayenus* ve *Priacanthus macracanthus*) derisinden (Benjakul vd. 2010), süslü iplik çipurasının (*Nemipterus hexodon*) derisinden (Nalinanon vd. 2011), yılan (*Ophiocephalus*, *Argus*) kafasının pullarından (Liu vd. 2009), sardalya (*Sardinops melanostictus*), kızıl deniz çipurası (*Pagrus major*) ve Japon levreklerinin (*Lateolabrax japonicas*) (Nagai vd. 2004) pullarından kolajen ekstrakte ve karakterize edilmiştir.

Başka bir çalışmada, rohu (*Labeo rohita*) ve catla (*Catla catla*) pullarından elde edilen kolajenin, memelilerde bulunan kolajenlerle benzerlik gösterdiğini rapor etmişlerdir (Pati vd. 2010). Ayrıca, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ heterotrimerlerinin sazan balığı (*Ctenopharyngodon idellus*) pullarındaki kolajende de bulunmuştur (Li vd. 2008). 0,5 M asetik asit ile ekstrakte edilen sazan (*Cyprinus carpio*) pullarından elde edilen kolajenin, doğal formda olduğu tespit edilmiş ve ayrıca 28 °C civarında denatürasyon sıcaklığı gösterdiği bulunmuştur (Duan vd. 2009). Kolajenin amino asit kompozisyonlarında, özellikle amino asit içeriğinde (prolin, hidroksiprolin) geniş ölçüde değiştiği gösterilmiştir (Muyonga vd. 2004). Sardalya, kızıl deniz çipurası ve japon levreği pullarından elde edilen kolajenlerin bol miktarda glisin ve alanin, prolin, hidroksiprolin ve glutamik asit içerdiği rapor edilmiştir (Nagai vd. 2004). Temel özelliklerdeki farklılıklar, suda yaşayan hayvanlara alternatif kolajen kaynakları olarak ilgide artış göstermiş ve çeşitli hastalıklarda hastalık bulaşma eksikliği ve diyet kısıtlaması nedeniyle potansiyel kaynaklar olarak tanınmıştır (Liu vd. 2010).

2.5. Ekstraksiyon ve Hayvansal Kaynaklardan Kolajen Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon iki veya daha çok bileşene sahip olan ürünlerin birbirinden ayrılmasına yarayan bir sistemdir. Bu ayırma işlemi, doğal yollarla oluşan maddelerden istenilen kısmın ayrılması olabileceği gibi, karışımlardan da istenilen ürünün ayrılması şeklinde de yapılabilmektedir. Bu sistem ilk olarak 1879 yılında F. Soxhlet tarafından kullanılmış ve bugün de hala gelişmiş ekstraksiyon yöntemleri de eklenerek kullanımı devam etmektedir.

Enzimler ekstraksiyon yöntemlerinde sıkça kullanılmaktadır. Özellikle reaksiyonları hızlandırmaları ve malzemeleri katma değeri yüksek ürünlere dönüştürmektedirler (Hordur vd. 2000). Çok spesifik yapıya sahip olan enzimler ürüne özgü olarak seçilmektedirler. Enzimler çeşitlerine göre sınıflandırılmaktadır. Bu çeşitlere bakılacak olunursa, proteazlar protein zincirini belirli bölgelerden peptit bağlarını kestikleri için bu isimleri almışlardır (Neil vd. 2013). Proteaz enzimlerinin üretimleri farklı yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemler hayvan, bitki ve mikrobiyolojik kaynakları kullanılarak sağlanabilmektedir. Ancak son yıllarda mikrobiyolojik yöntemler hız kazanmıştır. Çünkü hayvan ve bitkisel kaynaklar talebi karşılamada yetersiz kalmaya başlamıştır (Kristinsson vd. 2000). Mikrobiyal proteaz enzimleri *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilmektedir.

Genel olarak hayvansal kaynaklardan kolajen elde edilmesi ile ilgili işlem basamakları ise aşağıdaki şekilde sıralanmaktadır.

- i) Hammaddenin -25 ° C veya -4 ° C'de saklanması.
- ii) Sodyum klorür/sodyum hidroksit/kalsiyum hidroksit kullanılarak kolajen olmayan pigmentlerin ve proteinlerin uzaklaştırılması.
- iii) Demineralizasyon işleminden geçirilmesi
- iv) Asit veya enzim ile sindirim.
- v) Morfolojik analiz.
- vi) Asetik asit veya disodyum hidrojen fosfat kullanılarak diyalizle kolajen ekstraksiyonu.
- vii) Amino asit analizi, elektroforez, denatürasyon sıcaklık analizi, X-ışını difraksiyon analizi, UV-görünür spektrum metodlarla kolajenin incelenmesi yapılmaktadır (Mocan vd. 2011).

2.6. Kolajenin Uygulamaları

Kolajen, ilaç endüstrisinde mikropartiküller, enjekte edilebilir dispersiyonlar, oftalmolog süngerlerdeki kalkanlar, ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılır. Biyomedikal alanında olduğu gibi, farmasötik uygulamalarda da tercih edilmesinin nedeni düşük antijenite, yüksek hücre bağlama kabiliyeti, biyobozunurluk ve biyouyumluluk gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Leitinger ve Hohenester 2007).

Doku mühendisliği açısından incelendiğinde ise, kolajen tip I, yüksek biyouyumluluk nedeniyle bu alan için altın standart olarak kabul edilir. Hücre kültür sistemi için temel matris olarak kullanılır. Kolajen bazlı biyomalzemeler, enjekte edilebilir matrisler, kemik rejenerasyonu için tasarlanmış iskeleler vb. gibi formlarda doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu biyomalzemeler esas olarak tip I, II, III, V, XI içeren fibril oluşturan kolajenlerden üretilir (Oliveira vd. 2009; Parenteau-Bareil vd. 2010).

Biyomedikal endüstrisi açısından bakıldığında ise, doku yenilenmesi için iskeleler gereklidir. Kolajen yapı iskeleleri, sinir sistemindeki hücreleri görselleştirmek için sayısız amaca hizmet eder.

Modern tıpta da kolajen bazlı yapı iskeleleri hayati bir rol oynamaktadır. Kıkırdak ve kemik rekonstrüksiyonunda yardımcı olur. İskeleler aşılama başarısızlık veya kaçınma durumlarında ve bu gibi kusurlar yüksek bir seviyeye yükseldiğinde implante edilir. Vasküler ve kardiyak rekonstrüksiyonda, doku tasarımı kan damarları şeklindeki kolajen, hastalarda başarıyla aşılanır. Kolajen filmleri ve tozları şeklinde yaralar veya yanıklar için sünger formunda kolajen bazlı pansuman, cerrahi dikiş şeklinde tıp alanında kullanımları mevcuttur. Ayrıca, ürogenital bozukluklarda kornea defektlerinde, kemik greftlerinde ve obezite çalışmalarında da kullanılmaktadır (Sanz-Herrera vd. 2011; Cunniffe ve Brien 2011). Kolajen, kardiyoloji (kalp kapakçığı) dermatoloji (cilt değiştirme, yumuşak doku büyütme, cilt doku mühendisliği, yapay deri dermisi) gibi bölümlerde çeşitli uygulamalara sahiptir. Cerrahi (hemostatik ajan, yara onarımı ve pansuman, sinir onarımı, kan damarı protezleri), ortopedik (tendon, kemik ve ligament onarımı, kıkırdak rekonstrüksiyonu), oftalmoloji (kornea greftleri, kontakt lensler), üroloji (diyaliz zarı hemodiyaliz, sfinkter onarımı) ve vasküler (vasküler greft, damar replasmanı) alanlarında da kullanılmaktadır (Rose ve Oreffo 2002).

2.7. Doku Mühendisliği Kolajen Kullanım Alanları

Kolajen, mükemmel biyoyumluluğu, düşük antijenik yapıya sahip olması, yüksek biyobozunurluğu sayesinde doku mühendisliğine oldukça uygun bir malzemedir. Ayrıca, iyi bir mekanik yapıya sahip olması, hemostatığının yüksek olması, hücre bağlama ve hücre çoğalmasına katkı sağlaması gibi özelliklerinden dolayı doku mühendisliği uygulamaları için sıklıkla kullanılmaktadır. Şekil 2.2’de kolajenin hangi dokularda kullanıldığı ile ilgili bir görsel sunulmaktadır.



Şekil 2.2. Kolajenin doku mühendisliğinde kullanım alanları

Farklı ekstraksiyon çeşitleri kullanarak, farklı balık türlerinden elde edilen kolajenler çeşitli biyomalzeme uygulama alanlarında kullanılabilir. Bu kullanım alanları ile ilgili bazı örnekler Çizelge 2.1’de gösterilmektedir (El-Rashidy vd. 2015; Manikandan vd. 2018; Govindharaj vd. 2019). Çizelgede, kullanılan kolajen kaynağı, ekstraksiyon yöntemi ve elde edilen kolajenin hangi biyomalzeme alanında kullanıldığı ile ilgili bilgiler gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Farklı ekstraksiyon teknikleri kullanılarak çeşitli balık türlerinden elde edilen kolajen örneklerinin biyomalzeme olarak kullanım alanları

Kolajen kaynağı	Kolajen ekstraksiyon yöntemi	Uygulama alanları	Referanslar
Deniz yılan balığı derisi	Asit çözünür pepsin enzimi	İnsan göbek kordonundan kök hücre üretimi Doku mühendisliği	(Govindharaj vd. 2019)
Nil tilapia balık pulu	Pepsin enzimi	Fibroblast hücreleri üzerine denemiştir. Doku mühendisliği	(El-Rashidy vd. 2015)
Balık pazarından toplanan balık pulları	Asit çözünür	Doku mühendisliği Yara iyileşmesi	(Manikandan vd. 2018)
Somon derisi	Asit çözünür	Kıkırdak ve kemik doku	(Raftery vd. 2016)

2.8. Jel Elektroforezi

Elektroforez, makromoleküllerin elektrik akımına maruz kalması ile agaroz olarak adlandırılan özel bir matrikste bir yön boyunca taşınarak analizlenmesini sağlayan yaygın bir yöntemdir. Bu prensibi temel alan teknik, 1807 yılında Frederic Reuss tarafından her ne kadar “Elektrokinetik Görüngü” adıyla ortaya atılsa da 1900’lü yılların başında electron (elektrik) ve phore (taşıyıcı) kavramlarının sentezi olan elektroforez olarak değiştirilmiştir (Mozioglu 2019). 1948 yılında Arne Tiselius kimya alanında, serum proteinlerinin kompleks yapılarının analizlenmesinde elektroforez yöntemini kullanarak nobel ödülünü almaya hak kazanmıştır (Tiselius 2015). 1955 yılında ise Oliver Smithies’in nişasta jelleri elektroforez için ayırıcı ortamlar olarak kullanması, biyokimya alanında makromoleküllerin analizlenmesinde yol gösterici olmuştur. Elektroforezin, kâğıt ve selüloz asetat elektroforezi, poliakrilamid jel elektroforezi, ince tabaka elektroforezi (PAGE), kapiler elektroforez, agaroz jel elektroforezi olmak üzere farklı türleri mevcuttur.

Makromoleküllerin tasnif edilmesinde yaygın olarak kullanılan jel elektroforezi, bu moleküllerin boyut ve elektrik yüklerine göre ayırt edilmesini sağlar. SDS-PAGE tekniği ilk olarak et proteinlerinin ayırımı için kullanılmış ve daha sonraları bu metodun, et karışımlarındaki ve et ürünlerindeki et türlerini belirlemede çok değerli bir metod olduğu anlaşılmıştır. SDS-PAGE metodu kullanılarak yapılan bir çalışmada, SDS-PAGE metodunun yüksek çözünürlük sağlaması, kolay tekrarlanabilirliği ve elektroferogramlarda proteinlerin molekül ağırlıklarına göre hareket etmesinden dolayı üstün olduğu bildirilmiştir (Ekici ve Akyüz 2003).

Tüm elektroforez tiplerinin temeli; $V=IR$ ve $P=I^2R$ elektriksel eşitliklerine dayanır. İşlem sırasında yüklü moleküllerin bir elektriksel alandaki hareketleri

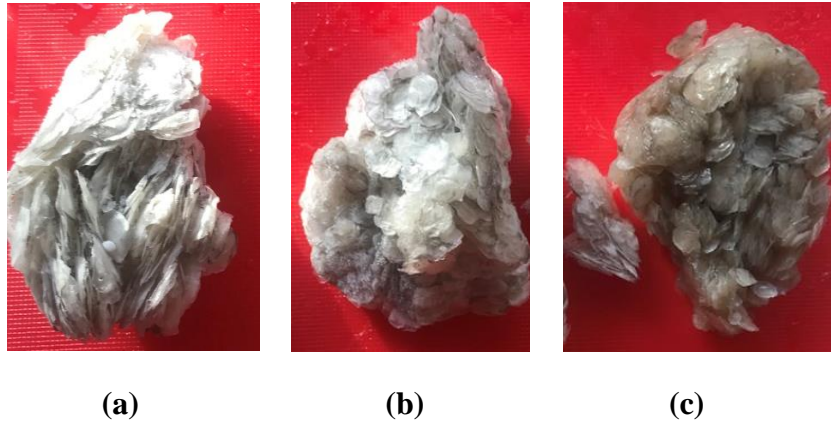
izlenmektedir. Çözünmüş durumdaki moleküllerin elektrik yüklerinin kütlelerine oranıyla belirlenen hızlarda elektriksel alanda hareket etmeleri prensibine dayanır. Proteinler izoelektrik noktalarının (pI) üzerindeki pH değerlerinde (-) yüklüdürler ve elektriksel alanda anoda doğru hareket ederler; bu noktanın altında ise, proteinler (+) yüklüdür ve katoda hareket ederler (Gedikli ve Gökçe 2015).

Literatür taramasından da görüleceği üzere, kolajen elde etmek için birçok farklı hammadde ve bunların işlenmesi ile ilgili de çok farklı metotlar yer almaktadır. Çalışmalar genellikle bitkisel ve hayvansal hammaddeleri kullanmışlardır. Ayrıca deniz mahsulleri ile ilgili de oldukça fazla çalışma mevcuttur. Bu tez kapsamında, literatürden farklı olarak, ülkemizde yetiştiriciliği yapılan ve en fazla tüketilen balık türlerinden, granyöz, levrek ve çipura balıklarının pulları kullanılmış ve üretim prosesi içinde enzim ekstraksiyonu metodu kullanılmıştır. Ayrıca, elde edilen kolajenlerin biyomalzeme olarak kullanım potansiyelleri belirlemek amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmadaki temel amaç, kültür balığı olarak yetiştirilen granyöz, levrek ve çipura balıklarının dış kısmında bulunan ve tamamı atık olarak değerlendirilen balık pullarından enzimatik yöntemle ticari değeri yüksek kolajen elde edilmesi ve potansiyel biyomalzeme olarak kullanılabilirliğini araştırmaktır. Bu amaç için deneyler ve analizler yürütülmüştür.

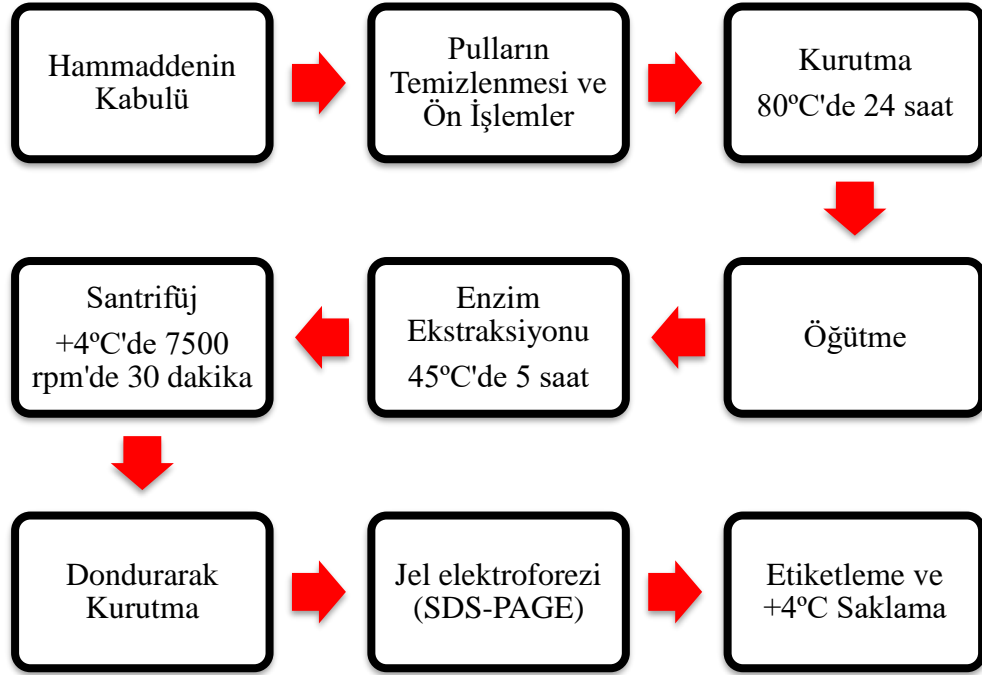
Akdeniz Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalında gerçekleştirilen bu proje kapsamında, ilk etapta, belirlenen balık türlerinin (yetiştirme levrek, çipura ve granyöz balığı) pulları Antalya Balık firmasından temin edilerek, işlem zamanına kadar -20°C de saklanmıştır. Bu örnekler Şekil 3.1'de gösterilmektedir. Şekil 3.1.a'da granyöz balık pulu, Şekil 3.1.b'de levrek balık pulu, Şekil 3.1.c'de ise çipura balık pulu görülmektedir. İşlemden önce dondurucudan çıkartılarak oda sıcaklığına geldiğinde işleme alınmıştır.



Şekil 3.1. Hammadde olarak temin edilen balık pulları **a)** Granyöz balık pulu; **b)** Levrek balık pulu; **c)** Çipura balık pulu

Kolajen üretim basamakları ile ilgili akış diyagramı Şekil 3.2'de görülmektedir. Diyagramda görüldüğü üzere, çalışmanın en başında, hammadde temini yapılmıştır. Çalışmada kullanılan hammadde, çalışma süresince tedarik edilen levrek, çipura ve granyöz balık pullarıdır. Laboratuvara gelen balıkların pullarının ayıklanıp temizlenmesi ise ikinci işlem basamağını oluşturmaktadır. Ayıklanıp temizlenmesi sağlanan balık pulları daha sonra ön işleme tabi tutulmuştur. Ön işlemlerde kolajen olmayan proteinlerin uzaklaştırılması için pullar NaOH içerisinde 24 saat bekletilmiştir. 24 saatin sonunda yağ arındırma işlemine geçilmiştir. Balık pulları 24 saat boyunca %20'lik bütanol çözeltisine alınmıştır. Yağı arındırılan balık pulları demineralizasyon işlemi için EDTA çözeltisine alınarak 48 saat bekletilmiştir. Ön işlemleri tamamlanan balık pulları kurutma için, 24 saat boyunca 80°C sıcaklıkta fırında tutulmuştur. Kurutma işleminden sonra öğütme işlemine tabi tutulmuştur. Öğütme işleminde pullar toz haline gelinceye kadar öğütme makinasında öğütülmüştür. Öğütülmüş olan pulların enzim ekstraksiyonu için 5 saat boyunca 45°C 'de bekletilmesi işlemi gerçekleştirilmiş ve sonrasında, santrifüj için hazır hale gelmiştir. Santrifüj sırasında, öğütülmüş ve ekstrakte olmuş pullar, 30 dakika boyunca, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ve 7500 rpm'de işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında ise, dondurarak kurutma ve jel elektroforez karakterizasyonundan sonra hazır hale gelen

kolajen numuneleri etiketlenip +4 °C’de saklanmıştır. Burada verilen çalışma basamakları detaylı olarak aşağıda açıklanmaktadır.



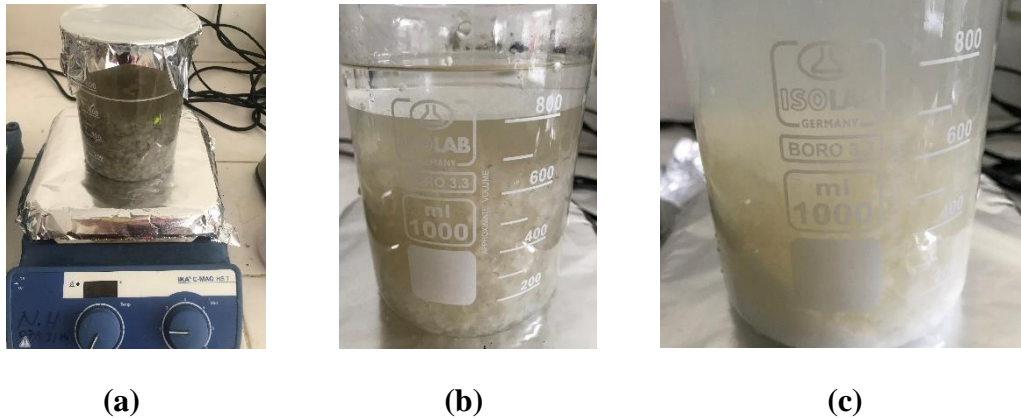
Şekil 3.2. Kolajen üretim basamakları

3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Balık pullarının temizlik aşamasında kullanılan kimyasallar; Sodyum Hidroksit (NaOH), Bütanol (C₄H₉OH), EDTA (etilendiamintetraasetik asit) bu kimyasallar sırasıyla kullanılarak temizlik gerçekleştirilmiştir. Kurutma işlemlerinde Nüve EV18 vakumlu fırın, temizlenmiş kurutulmuş balık pullarının öğütülmesinde Fakir marka aromatik öğütme robotu ve porselen havan kullanılmıştır. Kolajen ekstraksiyon işleminde Xtisinobest şirketine ait alkalın proteaz 200.000 U/g aktiviteye sahip enzim kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi KA C-MAG HS 7 marka ve modele sahip manyetik karıştırıcı kullanılarak istenilen ısıda ve karıştırma sağlanmıştır. İstenilen pH değeri için Mettler Toledo Five Easy pH metre ile ayarlama yapılmıştır. Santrifüj için, Hermle markalı Z 236 X modeli cihaz kullanılmıştır. Akdeniz üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümü temel bilimler laboratuvarı bünyesinde bulunan dondurarak-kurutma cihazı OPERON FDU & FDB marka Kore üretimi cihaz kullanılmıştır. Moleküler ağırlık dağılımı belirlemek için sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için OWL P8D8 (Thermo Scientific, IL, ABD) cihazı kullanılmıştır. Bu işlemde kullanılan kimyasallar ise TEKKİM firmasına ait üre, SİGMA firmasına ait Trizma ve MERCK firmasına ait Dithiothreitol kullanılmıştır. Protein standartı SİGMA firmasına ait M3313-1VL kodlu ürün kullanılmıştır.

3.2. Ön İşlemler

Çalışmadaki ilk önce, gelen balık pullarının kolajen harici içeriklerinden temizleme aşamasıdır. Bu aşamanın önemi kolajen olmayan kısımları uzaklaştırmak ve verimi arttırmak için yapılmaktadır. Temizleme aşamasında ilk olarak, balık pulları 0,1 M NaOH içerisinde (1:10 (a/h)) 24 saat bekletilerek balık pullarının üzerinde bulunan protein artıkları temizlenmiştir. 24 saatin sonunda pullar nötral hale gelene kadar saf su ile yıkanmıştır. Sonrasında pullardan yağı uzaklaştırmak için pullar %10 bütanol çözeltisine pul/çözgen oranı 1:15 (a/h) olacak şekilde konularak 24 saat bekletilmiştir. Her 8 saatte taze çözgen ile değiştirilmiştir. Süre sonunda pullar alkolden saf su ile yıkanılarak alkolden arındırılmıştır. Son temizlik aşaması olarak ise, 0,5 M EDTA (etilendiamintetraasetik asit) saf su çözeltisine konularak deminerilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 24 saat aralıklarla 2 defa bu işlem tekrarlanmıştır. EDTA'dan alınan balık pulları 3 kez saf su ile yıkanarak pullardan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu aşama ile ilgili görseller Şekil 3.3.a'da, NaOH yıkaması, Şekil 3.3.b'de Bütanol yıkaması ve Şekil 3.3.c'de EDTA yıkaması gösterilmektedir. Temizleme aşamasından sonra temiz balık pulları 80°C de kurutulmuştur. Kuru madde miktarı baz alınarak temiz balık pullarının (TBP) verimleri hesaplanmıştır. Ön işlem sonrası (NaOH muamelesi, deminerilizasyon ve yağ alımı) balık pulları üzerinde kalan kolajen harici proteinler, organikler, yağ ve mineraller uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.3. Temizlik aşamaları **a)** NaOH yıkaması; **b)** Bütanol yıkaması; **c)** EDTA yıkaması

3.3. Kurutma ve Öğütme

Ön işlemden geçen balık pulları 80°C de kurutulmuştur. 24 saat sonunda sabit tartıma gelen balık pulları kurutucudan alınmıştır. Şekil 3.4'te gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Vakum Fırını

Bu kurutma ile ilgili görseller Şekil 3.5.a ve Şekil 3.5.b’de gösterilmektedir. Şekil 3.5.a’da temizleme sonrası elde edilen levrek balığının pulları gösterilirken, Şekil 3.5.b’de 80°C de 24 saat boyunca kurutulma işlemine tabi tutulmuş levrek balığı pulları gösterilmektedir.



(a)



(b)

Şekil 3.5. Kurutma aşaması **a)** Temizleme sonrası levrek balığı pul görüntüsü; **b)** Kurutulmuş levrek balığı pul görüntüsü

Öğütme işleminde ise, TBP'ları, küçük manuel el değirmeni kullanılarak 0,5 mm. çapındaki bir elekten geçecek hale gelinceye kadar öğütülmüştür. Buradaki 0,5 mm. çapındaki büyüklük deneysel yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Bu enzim oranlarına göre elek çapının yüzde üzerine etkisi Çizelge 3.1'de gösterilmektedir. Bu çizelge içerisinde, G1, G3, G5 örnekleri içerisinde yer alan '1' değeri alkalaz enzim oranının %0,1 değerinde olduğunu ifade etmekte iken '3' değeri %0,3 ve '5' değeri ise, %0,5 değerini ifade etmektedir.

Çizelge 3.1. Elek çapının kolajen yüzdesi üzerine etkisi

Granyöz Örnek	Elde Edilen Kolajen Yüzdesi (%)	Elek Çapı
G1A	20,95	0,5 mm Elek Geçen Numune
G1B	20,39	1 mm Elekten Geçen Numune
G1C	16,97	1 mm Elekten Geçmeyen Numune
G3A	21,99	0,5 mm Elek Geçen Numune
G3B	21,27	1 mm Elekten Geçen Numune
G3C	19,12	1 mm Elekten Geçmeyen Numune
G5A	23,82	0,5 mm Elek Geçen Numune
G5B	23,50	1 mm Elekten Geçen Numune
G5C	23,42	1 mm Elekten Geçmeyen Numune

3.4. Enzim Ekstraksiyonu Aşaması

Çalışmanın bu kısmında, öğütülmüş TBP'ları kullanılarak alkalaz enzimi ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Alkalaz enzim oranları değiştirilerek elde edilen kolajen miktarındaki değişimler gözlenmek istenmiştir. Burada, sıcaklık ve pH değerinin değiştirilmemesinin sebebi enzimin alındığı firmadan verilen bilgiler doğrultusunda, enzimin en ideal çalışma sıcaklığı 45°C-50°C aralığında iken, ideal pH değerinin de 10 olarak bildirilmiş olmasıdır. Dolayısıyla, çalışmada firmadan alınan bu bilgiler dikkate alınmıştır.

Ekstraksiyon 45°C'deki 100 mL saf suyun içine alınan öğütülmüş balık pullarının NaOH ile pH derecesi 10-pH değerine ayarlanarak, üzerine %0,1, %0,3 ve %0,5 (a/a) alkalaz enzimi ilave edilmiştir. Ekstraksiyon, 5 saat boyunca sabit karıştırma ile 45°C sabit sıcaklıkta devam ettirilmiştir. Ekstraksiyon süresi tamamlanan balık pulları, alkalaz enzimini inaktif duruma getirmek için, 80°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Enzimin inaktif hale gelmesinden sonra soğutma işlemi yapılmıştır. Sıcaklık +4°C'ye getirilmiştir. Bu

sıcaklığa gelen balık pulları santrifüje alınmıştır.

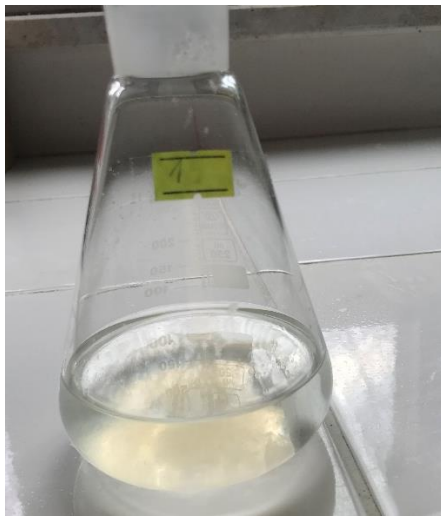
3.5. Santrifüj ve Dondurarak Kurutma

Bu aşamada ise, ekstraksiyondan çıkan balık pulları çözünmeyen kısmın sistemden uzaklaştırılması için Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü Araştırma Laboratuvarında bulunan santrifüj cihazına (Hermle Z 236 X) alınarak +4°C 7500 rpm de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Falkon tüplerinin alt tarafında biriken kısım çözünmeyen balık pulu miktarı olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.6'da çipura örneklerinin santrifüj işlemi ve santrifüj yapılan cihaz gösterilmektedir.



Şekil 3.6. Santrifüj aşaması

Dondurarak kurutma işlemi santrifüjden alınan homojen sıvının su oranını azaltmak için yapılmıştır. Bununla ilgili görsel Şekil 3.7'de gösterilmektedir.



Şekil 3.7. Kolajen çözeltisi

Su oranının fazla olması mikroorganizmaların çoğalması için elverişli bir ortamdır. Bu durum, ancak su oranının azaltılması ile çözüme kavuşabilmektedir. Su oranının fazla olmasının bir diğer kötü yanı ise, tüketicinin suya para vermek istememesi, hem de su oranının fazlalığının maliyeti arttırmasıdır. Bu sebeplerden dolayı elde edilen örneğin dondurularak kurutulması işlemi gerçekleştirilmiştir. Akdeniz üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümü temel bilimler laboratuvarı bünyesinde bulunan dondurarak-kurutma cihazı (OPERON FDU & FDB, Kore) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan OPERON marka dondurarak kurutma cihazı Şekil 3.8’de gösterilmektedir.



Şekil 3.8. Dondurarak kurutma cihazı

Dondurarak kurutma yönteminde ürünün ilk önce -80°C dondurulması yapılır. Bu sıcaklıkta donmuş olan örnekler dondurarak kurutma cihazına alınırlar. Ortamdaki basıncın da düşürülmesiyle birlikte, örneklerin suyunun sıvı hale geçmeden buharlaştırılması sağlanır. Bu yöntemle örneğin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin çok büyük bir kısmı korunur. Ve bu yöntemle örneğin içerisindeki suyun %98’lik kısmı uçurulmuş olur (Ratti 2001). Bu yöntem sayesinde elde edilen kolajen örneklerinin raf ömrü uzatılması amaçlanmıştır. Ve taşımada maliyet azaltılmıştır.

Kurutulan örnekler tartım alınarak etiketlenmiş ve paketlenmiştir. Bu şekilde çipuradan elde edilen kolajen numunelerinin paketlenmiş hali Şekil 3.9’da gösterilmektedir.



Şekil 3.9. Kurutulmuş ve etiketlenmiş kolajen numuneleri

3.6. SDS-PAGE Analizi

Bu etapta elde edilen kolajen tozlarının molekül ağırlık dağılımını ve proteinlerin hangi düzeyde parçalandığını belirlemek için SDS-PAGE analizi yapılmıştır. İlk olarak örnek hazırlama eppendorf tüplerine kolajen 0,1 mg hassas terazide tartılarak konulmuştur. Üzerine 8 M üre, 550 mM tris-HCl, 140 mM ditiotritol ve 5 mM EDTA içeren çözeltiden 1'er mL eklenmiş ve 12 saat boyunca azotlu ortamda karıştırmaya bırakılmıştır.

Hazır olan karışım Akdeniz Üniversitesi Gıda mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji ve Fermantasyon laboratuvarında OWLP8D8 (Thermo Scientific IL, ABD) markalı cihaz ile Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) analizi gerçekleştirilmiştir. Örnekler yükleme jeli (%30 akrilamid karışımı, dH₂O) varlığında işleme alınmıştır. Jel yükleme tamponu toplam 5 ml olacak şekilde (3 M tris-Cl/sds, pH 8,45) hazırlanarak 70°C de karıştırılmış ve 10 dk bekletilmiştir. Karışım 10'ar µl alınarak yüklenmiştir. Jel elektrofrezisi için Anode ve Cathode Buffer kullanılmıştır. Seyreltme işlemi uygulanan örnekler ilk olarak 100 V akım altında 10 dakika bekletilmiş olup ardından sabit akım altında 200 V'a çıkarılmıştır. Burada 30 dakika bekletilerek ilgili kısım tamamlanmıştır. Yürütücü jel alındıktan sonra örnekler 15 dakika boyunca saf su ile yıkanmıştır. Yıkanan örnekler boyama işlemine alınmıştır. Boyama işlemi için hazırlanan solüsyonda (%70 saf su, %10 asetik asit, %20 metanol, %0,1 Coomassie Blue R250) 1 saat karıştırıcıda bekletilmiştir. Fazla boyanın giderilmesi için (%10 asetik asit, %20 metanol, %70 saf su) hazırlanan solüsyona alınan örnekler 1 saat karıştırıcıda solüsyon içerisinde bekletilmiştir. Süre sonunda saf su içerisinde geçirilen örnekler alınmış ve protein bantları görüntülenmiştir. Protein standardı için SİGMA M3313-1VL kod numaralı ürün kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada balık artıklarının değerlendirilmesi hidrolize kolajen eldesi yönünden araştırılması ve elde edilen kolajenlerin biyomalzeme olarak kullanım potansiyellerinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Hedeflenen sonuçlara ulaşılmış ve sonuçlar bu bölümde verilmiştir. Çalışma kapsamında, granyöz, levrek ve çipura için ayrı ayrı verim hesaplanmıştır. Sonuçlar çizelge halinde hesaplamalarıyla birlikte verilmiştir. SDS–PAGE analizi sonucu kolajen proteinlerin enzimatik parçalanması ve elde edilen hidrolize kolajenlerin molekül ağırlıkları belirlenmiştir. Kolajenin %100 suda çözünür olduğu belirlenmiş ve suda çözülmüş kolajenin pH değeri ölçülmüştür. Buna göre, sonuçlar balık çeşitlerine göre rapor edilmiştir.

4.1. Ön İşlemlerin Değerlendirilmesi

Çalışmada, balık pullarının temizlenmesi için gerekli olan ön işlemler uygulanmıştır. Kolajen olmayan kısımlar bu aşamada pullardan uzaklaştırılmıştır. En ideal uygulama, tezin 3.2 başlığı altında açıklanmaktadır. Yapılan diğer uygulamalara ise tezin bu bölümünde yer verilmektedir. İlk olarak deminerilizasyon işlemi ile pullardan yağ uzaklaştırılması işlem sırası yer değiştirilmiştir. Kolajen verimi açısından farklılık olmamasına rağmen deminerilizasyon işlemimin yağ alma işleminden önce yapılması öğütmede zorluk çıkarmaktadır. Verim hesaplandığında deminerilizasyonun yağ alma işleminden önce yapıldığı durumda verim 0,1 enzimde %18,99 iken, aynı enzim oranında iken yağ alma işlemimin deminerilizasyondan öncesine alınmasını sonucu verimin, %18,75 olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmanın kalan kısımlarında pullardan yağ alma işlemi deminerilizasyondan önce gerçekleştirilmiştir.

Deminerilizasyon işleminde EDTA çözeltisinden çıkan balık pullarının saf su ile yıkaması yapılarak EDTA çözeltisinin balık pullarından uzaklaştırılması amaçlanmaktadır. Çalışma kapsamında, saf su ile yıkama denemeleri yapılmış, saf suda bekletme süresi ve sayısının artırılması ile pH derecesinin düştüğü saptanmıştır. Bu düşüş ise, enzim ekstraksiyon işleminde ekstra NaOH eklenmesi anlamına gelmektedir. Üç defadan az yıkandığında ise EDTA kalıntısına rastlanmıştır. Bu nedenle çalışmalarda yıkama sayısı üç olarak kullanılmıştır.

4.2. Kurutma ve Öğütmenin Değerlendirilmesi

İdeal kurutma sıcaklığı için 60°C, 80°C ve 100°C de kurutma denemiştir. En ideal kurutma derecesi 80°C belirlenmiştir. TBP'lerinin tekstüründe en iyi sonuç 80°C 'de alınmıştır. Öğütmede ideal kurutma derecesi incelendiğinde yine 80°C'de kurutulmuş balık pullarında istenilen öğütme kolaylığı sağlanmıştır.

Elek çapının doğrudan verim üzerine etkisi Çizelge 3.1'de gösterilmektedir. Granyöz balık pullardan hidrolize kolajen eldesinde 3 enzim miktarında ve 3 farklı elek çapında incelenmesi yapılmıştır. İncelemede 1 mm çapındaki elekten geçmeyen %0,1 enzim oranına sahip örneğin verimi %16,97 iken aynı enzim oranında 1 mm'den daha küçük pullar yani 1 mm'den geçen örneklerin verimi %20,39 yükselmiştir. Elek çapı daha da küçültülüp incelendiğinde ise 0,5 mm lik elek çapından geçen örneklerde verimin arttığı (%20,95) ancak farkın 1 mm'den geçmeyen örnekteki gibi yüksek olmadığı görülmektedir. Diğer enzim oranlarına bakıldığında ise %0,3 enzim oranında aradaki

farkın azaldığını %0,5 lik enzim oranında ise elek çapına göre aralığın iyice daraldığı görülmektedir. Bu doğrultuda verimin en yüksek olduğu 0,5 mm lik elek tercih edilmiştir. Öğütmedeki zorlukların daha küçük boyutlara geçerken artması ve yapıda meydana gelen değişiklikler göz önünde bulundurularak daha küçük elek çapları denememiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi enzim miktarı artıkça öğütmenin önemi azalmaktadır. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda çalışmada 0,5 mm'lik eleğin kullanılmasının uygunluğuna karar verilmiştir.

4.3. Enzim Ekstraksiyonu

Enzim ekstraksiyonu sürecindeki parametrelerin belirlenmesinde enzim tedarikçisi firmanın önerileri dikkate alınmıştır. Süre bazında, ilk olarak 3 saat sonunda değerlendirilme yapılmış ve çözülmenin devam ettiği görülmüştür. Ekstraksiyon sürecindeki 5 saat sonunda ise, %0,5'lik enzim içeren erlende çözülecek malzeme kalmazken, %0,1 ve %0,3'lük enzim içeren erlenlerde malzeme varlığı gözlenmiş ama çözünme gözlenmemiştir. Dolayısıyla, optimum ekstraksiyon süresi 5 saat olarak belirlenmiştir.

4.4. Kolajen Verimin Belirlenmesi

Çalışmada, kolajen verim hesabı için, ilk olarak Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği temel bilimler laboratuvarına ham balık pul örnekleri götürülmüş ve burada, balık pullarının kuru maddesinin (KM) hesaplanması sağlanmıştır. Her cins balığa ait balık pulları 3-4 g alınarak 2 tekrarlı olacak şekilde standart tartıma gelene kadar 103°C de bekletilmiştir. Standart tartıma gelen sonuçlar yüzde hesaplanarak balık pullarının kuru madde değerleri Çizelge 4.1 gösterilmektedir. Çizelgede görüldüğü üzere, granyöz pullarının ortalama KM yüzdesi %45,73 olarak hesaplanırken, bu oran, çipura için %48,31 ve levrek için ise %41,68 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. Balık çeşidine göre yüzde kuru madde değerleri

Balık Çeşidi	Dara (g)	Dara+örnek (g)	Son tartım (g)	KM (%)	Ortalama KM (%)
Granyöz 1	46,7	49,9	48,1	45,1	45,8
Granyöz 2	56,4	60,3	58,2	46,4	
Levrek 1	49,8	55,4	52,1	41,9	41,7
Levrek 2	53,4	58,3	55,4	41,5	
Çipura 1	49,3	54,0	51,7	49,3	48,4
Çipura 2	52,9	57,0	54,8	47,4	

Çalışmada her bir balık türünün kurutulmuş pullarından 50'şer g alınarak ön işlemlerden (NaOH muamelesi, yağ alımı ve deminerilizasyon işlemleri) geçirilerek kalan miktarlar kurutulularak tartılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmektedir. Aynı zamanda ön işlemlerden sonraki kayıp ve verim oranları yine Çizelge 4.2'de verilmektedir. Bilindiği gibi kayıp pul üzerinde bulunan kolajen harici proteinlerin, organik kirliliklerin, yağların ve pulu oluşturan minerallerin (kalsiyum hidroksiapatit gibi) uzaklaştırılmasından kaynaklanmaktadır. Her üç balığın pulların yaklaşık

ağırlıklarının %50'si ön işlem sonrasında kaybolmaktadır.

Çizelge 4.2. Ön işlem sonrası kuru balık pullarında oluşan kayıp miktar ve oranları

Balık pulu türü	KM oranı (%)	Ön işlem (NaOH muamelesi, yağ alımı, deminerilizasyon) sonrasında		
		50 g kuru balık pulundan elde edilen TBP miktarı (g)	KM üzerinden TBP oranı (%)	KM üzerinden azalan miktar oranı (%)
Granyöz	45,8	26,5	53	47
Levrek	41,7	28,0	56	44
Çipura	48,4	26,5	53	47

Çalışmada her bir türün TBP'larından 3'er g alınarak enzimatik hidroliz reaksiyonları gerçekleştirilerek hidrolize kolajenler elde edilmiştir. Her bir enzim oranında çalışılan, 3 g TBP'larından elde edilen hidrolize kolajen oranları Çizelge 4.3'te verilmektedir. Kuru madde, TBP'ları ve yağ ağırlık üzerinden her bir balık pulunun içerdiği kolajen oranları hesaplanarak Çizelge 4.3'te gösterilmektedir. Aynı koşullar altında tüm veriler aynı tutularak ikişer kez deneyler tekrar edilmiştir. Bu çizelgedeki A ve B harfleri tekrarı simgelemektedir. Çizelge 4.3'te de görüldüğü gibi her bir balık pulu için kullanılan enzim oranları arttıkça elde edilen kolajen miktarı artmaktadır. Örneğin, granyöz balığı pullarından %0,1 enzim oranıyla elde edilen kolajen oranı (KM üzerinden) 40,2 iken, %0,3 oranında %49,2'ye, %0,5 enzim oranında ise %52,4 oranına çıkmaktadır. Bu durum levrek ve çipura balığı pullarında da gözlenmiştir. Ayrıca TBP'larından elde edilen kolajen oranlarına bakıldığında enzim oranı arttıkça kolajen elde oranı da artmaktadır. %0,5 enzim oranında elde edilen kolajen oranına bakıldığında bütün balık pulları için oranın %97,5'in üzerinde olduğu fark edilmektedir. Dolayısıyla TBP'larının tamamının kolajen olduğunu söyleyebiliriz.

Çizelge 4.3. Enzim miktarına göre elde edilen kolajen verimi yüzdesi

Balık Pulu	Enzim oranı (%)	3 g TBP'larından elde edilen kolajen miktarı (g)	Elde edilen Kolajen oranı (%) (TBP üzerinden)	Elde edilen Kolajen oranı (%) (KM üzerinden)	Elde edilen Kolajen oranı (%) (Yaş ağırlık üzerinden)
G1A	0,1	2,15	75,8	40,2	18,12
G1B	0,1	2,40			
G3A	0,3	2,76	92,8	49,2	22,19
G3B	0,3	2,81			
G5A	0,5	2,99	98,8	52,4	23,62
G5B	0,5	2,94			
L1A	0,1	2,71	89,2	49,9	20,81
L1B	0,1	2,64			
L3A	0,3	2,88	94,3	52,8	22,02
L3B	0,3	2,78			
L5A	0,5	2,95	97,7	54,7	22,80
L5B	0,5	2,91			
Ç1A	0,1	2,77	87,8	46,6	22,46
Ç1B	0,1	2,50			
Ç3A	0,3	2,91	93,0	49,3	23,79
Ç3B	0,3	2,67			
Ç5A	0,5	2,98	98,8	52,4	25,28
Ç5B	0,5	2,95			

Hidrolize kolajen eldesinde optimum enzim türü, enzim oranı (dozu), pH, sıcaklık ve enzimatik hidroliz reaksiyon süresi belirlenmelidir. Çünkü bu parametreler balık bulundan kolajen eldesinde hayati rol oynarlar. Jiang'ın 2013'te yayınlanan çalışmasında farklı tür enzimler kullanılarak balık pullarından kolajen eldesi çalışılmıştır (Jiang, 2013). Çalışmada alkalaz enziminin diğer enzimlere göre daha yüksek kolajen verimi (%48,1) sağladığı bulunmuştur. Bu nedenle projede alkalaz enzimi kullanılmıştır. Alkalaz enziminin sağlandığı firma projede kullanılan enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık aralığı bilgilerini sağlamıştır. Bu nedenle projede optimum pH ve sıcaklık araştırması yapılmamıştır. Enzimatik reaksiyon süresinin optimizasyonu için çalışma yapılmıştır. İlk denemelerde 3 ve 5 saat reaksiyon süreleri çalışılmış 3 saat sonunda balık pullarının reaksiyon kabı içerisinde tamamının çözünmediği fakat 5 saat reaksiyon süresinde balık pullarının tamamının reaksiyon kabı içerisinde çözündüğü gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmada enzimatik reaksiyon süresi 5 saat tutularak optimum enzim oranının bulmak için çalışmalar yapılmıştır. Yine Jiang'ın çalışmasında kullanılan alkalaz enzimi için optimum reaksiyon süresinin 6 saat olduğu tespit edilmiştir.

Tang vd. (2012) alkalaz enzimi kullanarak balık pullarından kolajen elde edilmesi

için optimum parametreleri çalışmışlardır. Reaksiyon sıcaklığının 60 °C, süresinin 1,5 saat ve enzim oranının %3 (a/a) olduğu koşullarda hidrolize kolajen veriminin %32,38 olduğu rapor edilmiştir.

Daha önceden yapılan çalışmalarda Nagai ve Suzuki (2000) balık pulundan kolajen ekstraksiyonunda verimin %30 ile %50 arasında değiştiğini bulmuşlardır. Bu oranın balık yaşı, yetiştiği ortam ve bekleme süresi gibi çevresel faktörlerden de etkilendiği gibi ekstraksiyon çeşidine göre de değiştiği belirtilmiştir (Nagai ve Suzuki 2000).

Birkaç çalışmaya göre ise yapılan ön işlemler verimi etkilemektedir (Sivakumar vd. 2000; Ogawa vd. 2004; Senaratne vd. 2006; Skierka and Sadowska 2007; Liu vd. 2015). Örneğin Liu vd. (2015) balık derisinden kolajen elde edilmesi için yaptıkları çalışmada, ön işlem sırasında kullandıkları NaOH derişiminin kolajen verimini etkilediğini rapor etmişlerdir.

4.5. Çözünürlük

Granyöz, levrek ve çipura pulundan farklı enzim oranlarında ekstraksiyon sonucunda elde edilen kolajen hidrolizatı, suda çözünür yapıdadır. Yapılan deneyler sonucunda da bu durum kanıtlanmıştır. Çalışmada, 10 ml saf suyun içerisine çözüldükçe 0,1 g toz ilave edilmiş 1 g malzemenin çözünmesi sağlandıktan sonra %100 çözünür olduğu tespit edilmiştir.

4.6. pH Hesaplamaları

Bu aşamada, öncelikle granyöz, levrek ve çipura balıklarından elde edilen 1 g ölçüğindeki kolajen tozunun, 9 ml distile su içerisinde çözdürülmesi sağlanmıştır. Daha sonra ise bu çözelti, pH metre ile ölçülerek hesaplanmıştır. Sonuçlar ise, balık çeşidine ve enzim miktarına göre Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

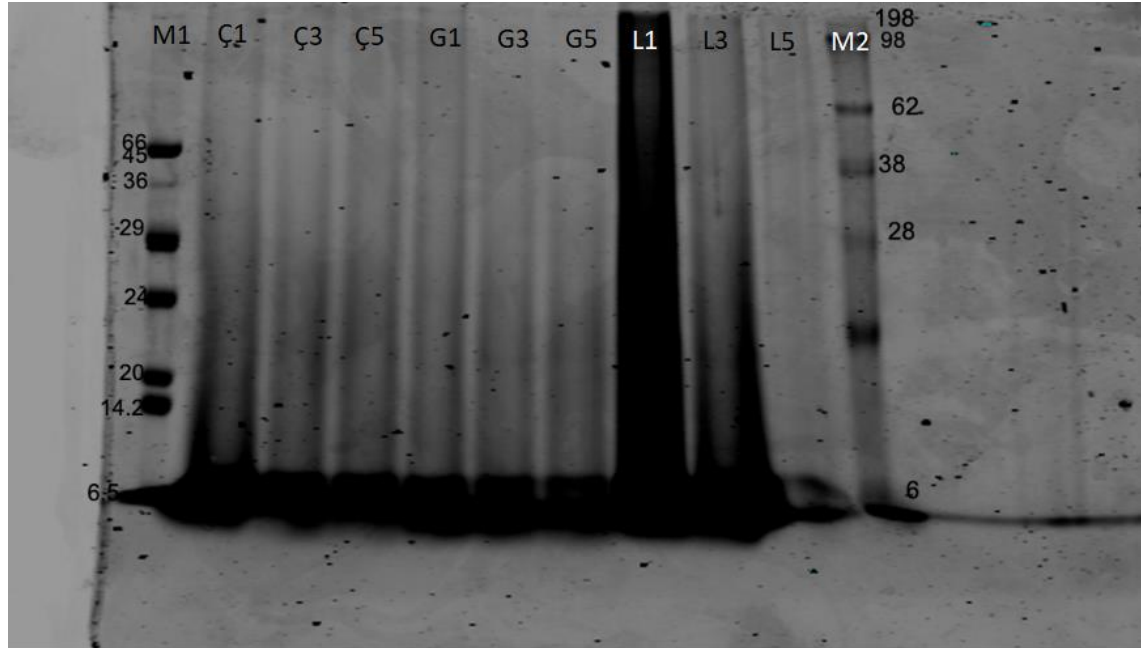
Çizelge 4.4. Balık çeşidi ve enzim miktarına göre pH değerleri

Balık çeşidi	Enzim Değeri (%)	pH Değeri
Granyöz	0,1	8,9
	0,3	8,6
	0,5	8,6
Levrek	0,1	9,0
	0,3	8,5
	0,5	8,5
Çipura	0,1	9,3
	0,3	9,0
	0,5	9,0

Bu çizelgede görüldüğü üzere çipuranın pH değerlerinin 9,0 ile 9,3 arasında değiştiği gözlemlenirken, levrek ve granyöz balıklarında 8,5 ile 9,0 arasında değişim gösterdiği görülmektedir. Bununla birlikte, enzim yüzde değeri 0,1 değerinden, 0,3 değerine yükseldikçe pH'nın düştüğü gözlemlenirken, 0,3 değerinden, 0,5 değerine geçişte ise pH değerinde bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir.

4.7. SDS-PAGE Analizi Sonuçları

Şekil 4.1'de elde edilen hidrolize kolajenlerin SDS-PAGE analiz sonuçları verilmektedir. Kodlamada Ç, G ve L harfleri sırasıyla çipura, granyöz ve levrek pullarını göstermekte ve harflerin yanında bulunan sayılar kullanılan enzim oranlarını vermektedir (1=%0,1, 3=%0,3, 5=%0,5). M1 şeriti düşük moleküler ağırlığa sahip markırı vermektedir. M2 ise yüksek moleküler ağırlığa sahip markırı vermektedir. Çipura pullarından elde edilen hidrolize kolajenlerin kullanılan enzim oranlarına göre moleküler ağırlık dağılımına bakıldığında her üç oran içinde (Ç1, Ç2, Ç3) yoğunluğun 6,5 kDa civarında olduğu görülmektedir. Ç1 şeridinde yani %0,1 enzim oranında 29 kDa'na kadar peptitlerin olduğu görülmektedir. Enzim oranı artıkça 29 kDa'dan daha düşük moleküler ağırlıklı peptitlerin olduğu tespit edilmiştir. Granyöz pullarından elde edilen kolajenlerin SDS-PAGE şeritleri (G1, G3, G5) arasında enzim oranına bağlı olarak değişiklik gözlenmemiştir. Fakat enzim oranına bağlı olarak en büyük değişiklik levrek balığı pullarında elde edilen hidrolize kolajenlerde görülmüştür. %0,1 oranında (L1 şeridi) elde edilen kolajenlerin moleküler ağırlık dağılımı 198 kDa'na kadar ulaşmaktadır. L3 (%0,3 enzim oranı) şeridinde ise dağılım yaklaşık 36 kDa'dan başlayarak daha düşük moleküler ağırlığa doğru gitmektedir. L5 şeridinde ise peptitlerin moleküler ağırlıklarının 6,5 kDa civarında yoğunluk kazandığı görülmektedir. L5 şeridinde ayrıca 6,5 kDa'dan daha büyük peptitlerin olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Hidrolize kolajenlerin SDS-PAGE analiz sonuçları

Kolajen memelilerde en bol bulunan protein olduğu için biyomedikal uygulamalarda en çok tercih edilen malzemelerden biridir. Bunun yanında biyomedikal uygulamalarda yararlı olmasının birincil nedeni, kolajenin kendi kendine kümelenmesi ve çapraz bağlanma yoluyla kararlı bir yapıya sahip lifler oluşturabilmesidir (Cascone vd. 1995). Kolajenin mukavemetinin düşük olması yanında farklı malzemeler kullanılarak artırılabilir. Eklenen malzemeler kolajen yapılarına hem farklılık katmıştır hem de farklı alanlarda kullanım olanağı sağlamıştır. Kolajenin hem tek başına kullanılabilir bir yapıda olması ve hem de farklı yapılarla kullanılabilmesi kolajen bazlı biyomalzeme çalışmalarına ivme kazandırmıştır. Ancak klinik çalışmalara bakıldığında, kara hayvanlarından elde edilen kolajen uygulamaları deniz canlılarından elde edilen kolajen uygulamalarına göre daha fazladır (Parenteau-Bareil vd. 2010).

Yapılan çalışmada SDS-PAGE sonuçları incelendiğinde üretilen kolajenlerin genellikle molekül ağırlığının ($\leq 6,5$ kDa) çok küçük olduğu görülmektedir (Şekil 4.1). Kolajen proteinin parçalanarak peptitlerine dönüştürülmesi ile elde edilen ürüne kolajen hidrolizati terimini de kullanılmaktadır. Literatür incelendiğinde kolajen hidrolizatının tek başına yapı iskeleti oluşturamamasının nedeni düşük moleküler ağırlıktan kaynaklanmakta ve bu nedenle kolajen hidrolizatları farklı malzemelerle birlikte kullanılabilmesi ön plana çıkmıştır (León-López vd. 2019).

İncelenen bir çalışmada kolajen hidrolizatının hidroksiapatit kompozit malzemelerle birlikte kullanımı incelenmiş, osteoporoz gibi kemik ve eklem bozukluklarının tedavisi için faydalı bulunmuştur. Kolajen hidrolizatının kompozit yapı içerisinde bulunması kolajen sentezini artırıcı olarak düşünülmüştür (Ficai vd. 2013).

Bir diğer çalışmada ise, kolajen hidrolizatına kompozit olarak tetraetoksisilan kullanılmış ve yapı iskeleti oluşturulmuştur. Sıçanlarda yapılan in vivo deneylerde yara iyileşmesinde de etkisi görülmüş ve kolajen iskeletine göre daha hızlı iyileşmenin gerçekleştiği görülmüştür. Böylece, kolajene göre daha uygun fiyatlı bir yapı oluşturulmuştur (Ramadass vd. 2014).

Denizsel kaynaktan üretilen kolajen hidrolizatı ile biyomalzeme olan kitosanın birleştirilmesi ile oluşan biyomalzeme yanık tedavisinde kullanılmaktadır. SDS-PAGE değerine bakıldığında molekül ağırlığının 1-3 kDa arasında olduğu görülmektedir. Düşük molekül ağırlığına sahip olması ve suda iyi çözünür olması deri emiliminin daha iyi olmasını sağlamaktadır (Ouyang vd. 2018).

Tez çalışmasında üretmiş olduğumuz kolajen hidrolizatın potansiyel kullanım alanlarına birkaç örnek verilmiştir ve bu örnekler çoğaltılabilir. Sonuç olarak elde ettiğimiz hidrolize kolajenlerin biyomalzeme olarak kullanım potansiyelleri bulunmaktadır.

5. SONUÇLAR

Balık pulları atık olarak bertaraf edilen dönüşümü yapılmayan organik atıklardır. Bir balığın yaklaşık olarak %9'unu pullar kapsamaktadır. Bu balık pullarının kolajen üretimi için değerlendirilmesinin uygun olduğu literatürdeki çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Ancak balık pulların cinsine göre su oranının %45-55 olması verimi düşürmektedir. Su oranı düşürülen balık pullarında bu defa karşılaşılan sorunun kalsiyum gibi pulların sertliğini sağlayan minerallerin bol bulunmasıdır ve bu da puldan elde edilen kolajen miktarını düşürmektedir.

Bu çalışmada, enzim ekstraksiyonuyla kolajen elde edilerek suda çözünür bir yapıda ve düşük moleküler ağırlıkta kolajenler elde edilmek istenmiştir. Çalışmada;

- Çalışan balık pullarının hepsinde enzim miktarı artıça hidrolize kolajen veriminin arttığı tespit edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda yapılan çalışmada, en iyi verim üç tür içinde %0,5 enzim oranında yapılan ekstraksiyon işlemi alınmıştır. Levrek balık pullarından elde edilen kolajen verimi en yüksek verimdir ve değeri %54,7'dir. En düşük kolajen verimi ise tüm türler için %0,1 enzim oranındadır. %0,1 enzim oranında en düşük verim granyöz balığa aittir ve değeri %40,2'dir.
- Hidrolize kolajen verimi pulların öğütülmesi sonrasında elde edilen toz partikül büyüklüğüne göre değişim göstermiştir. Partikül boyutu küçüldükçe verim artmaktadır. Ancak enzim miktarı %0,1 iken partikül boyutu verimi daha çok etkilerken enzim oranının yükselmesi ile partikül boyutunun değişimi verimi daha az etkilemektedir.
- Ekstraksiyon işlemi 5 saat olarak optimize edilmiştir. Enzim miktarı %0,5 oranı ile çalışılan örneklerde reaksiyon kabı içerisinde hiç öğütülmüş pul kalmamıştır. 0,1 ve 0,3 enzim oranında çalışılan örneklerde ise, çözülmeyen katı kısım tespit edilmiştir.
- Çalışmada yapılan pH analizlerinde enzimin maksimum çalışma şartı dikkate alınmıştır. Bu neden ile ekstraksiyon işlemi sonuna kadar 10 pH da işlem yapılmıştır. Çalışma boyunca, her saat aralığında pH kontrolü sağlanmıştır. Dördüncü saatin sonunda her balık türü için pH değeri 10 iken, beşinci saatin sonunda balık türlerinde pH değerinin azaldığı gözlenmiştir.
- Ekstrakte edilen kolajenlerin hepsinin %100 suda çözünür olduğu belirlenmiştir.
- Granyöz, çipura ve levrek balık pulundan elde edilen kolajen tozlarına, molekül ağırlıklarını belirlemek ve protein karakterizasyonunun sağlanması için, sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılmıştır. Çalışılan en yüksek enzim oranında (%0,5) bütün balık pullarından elde edilen kolajenlerin molekül ağırlıklarının oratlama olarak 6,5 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir.
- SDS-PAGE analizlerine göre %0,1 enzim oranıyla levrek pullarından elde edilen kolajenin moleküler ağırlık dağılımının 198 kDa'na kadar uzandığı enzimatik parçalanmanın tamamlanmadığı belirlenmiştir.
- Balık pullarının enzimatik hidrolize kolajen kaynağı olarak kullanılabileceği, atık pulların ekonomiye katılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.
- Elde edilen hidrolize kolajenin karakterizasyonu sonucunda literatürde biyomalzeme olarak kullanılanlarla benzerlik gösterdiği bu nedenle elde

edilen kolajenlerin biyomalzeme olarak kullanım potansiyellerine sahip oldukları ortaya çıkartılmıştır.

Diğer çalışmalar bize göstermektedir ki üretmiş olduğumuz kolajen doku mühendisliği ve klinik uygulamalarda güvenilir bir biyomalzeme olarak yerini alacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Rezaei, M., Jafarpour, A., and Undeland, I. 2018. Sequential extraction of gel-forming proteins, collagen and collagen hydrolysate from gutted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), a biorefinery approach. *Food chemistry*, 242, 568-578.
- Addad S., Jean-Yves E., Faye C., Sylvie Ricard-Blum S. and Lethia C. 2011. Isolation, Characterization and Biological Evaluation of Jellyfish Collagen for Use in Biomedical Applications. *Mar Drugs*, 9(6): 967-983.
- Arvanitoyannis, I.S. and Kassaveti, A. 2008. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(4): 726-745.
- Bhagwat, P.K., and Dandge, P.B. 2016. Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7: 234-240.
- Benjakul, S., Thiansilakul, Y., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Kishimura, H., Prodpran, T., et al. 2010. Extraction and characterisation of pepsin solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). *Journal of the Science Food and Agriculture*, 90(1): 132–138.
- Buehler, M.J. 2006. Nature designs tough collagen: Explaining the nanostructure of collagen fibrils. *PNAS*, 103(33): 12285-12290.
- Cascone, M. G., Sim, B., and Sandra, D. 1995. Blends of synthetic and natural polymers as drug delivery systems for growth hormone. *Biomaterials*, 16(7): 569-574.
- Cheah K.S.E. 1985. Collagen genes and inherited connective tissue disease. *Biochem. J.* 229: 287-303.
- Cortial D., Gouttenoire J., Rousseau C.F., Ronziere M.C., Piccardi N., Msika P., Herbage D., Mallein-Gerin F. and Freyria A.M. 2006. Activation by IL-1 of bovine articular chondrocytes in culture within a 3D collagen-based scaffold. An in vitro model to address the effect of compounds with therapeutic potential in osteoarthritis. *Cartilage*, 14: 631-640.
- Cunniffe G.M. and Brien F.J.O. 2011. Collagen scaffolds for orthopedic regenerative medicine. *The Journal of the Minerals, Metals and Materials Society*, 63(4): 66-73.
- Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X., and Konno, K. 2009. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*, 112(3): 702–706.
- Ekici, K. ve Akyüz, N. 2003. Farklı Hayvan Türlerine Ait Çiğ Etlerin SDS-PAGE Yöntemiyle Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. *YYÜ Vet Fak Derg*, 14(2): 78-82.
- El-Rashidy, A. A., Gad, A., Abu-Hussein, A. E. H. G., Habib, S. I., Badr, N. A. and Hashem, A. A. 2015. Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish scale collagen. *International journal of biological macromolecules*, 79: 618-626.

- Exposito J.Y., Cluzel C., Garrone R., Lethias C. and Garrone Q. 1999. Short chain collagens in sponges are encoded by a family of closely related genes. *J. Biol. Chem.*, 266: 21923-21928.
- Exposito J.Y., Cluzel C., Garrone R. and Lethias C. 2002. Evolution of collagens. *Anat. Rec.*, 268: 302-316.
- Ficai, A., Albu, M.G., Birsan, M., Sonmez, M., Ficai, D., Trandafir, V. and Andronescu, E. 2013. Collagen hydrolysate based collagen/hydroxyapatite composite materials. *Journal of Molecular Structure*, 1037: 154-159.
- Fratzl P. 2008. Collagen: Structure and Mechanics. New York: Springer. p 1-496.
- Gedikli, F. ve Gökçe, İ. 2015. Protein Elektroferez Jellerinin Boyanmasında Coomassie'ye Alternatif Doğal Boyalar. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 11: 1-10.
- Gelse, K., Pöschl, E. and Aigner, T. 2003. Collagens – structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Delivery Rev*, 55: 1531-1546.
- Govindharaj, M., Roopavath, U. K. and Rath, S. N. 2019. Valorization of discarded Marine Eel fish skin for collagen extraction as a 3D printable blue biomaterial for tissue engineering. *Journal of Cleaner Production*, 230: 412-419.
- Hordur, G., Kristinsson, B. and Rasco, A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical ve functional properties. *Food Science ve Nutrition*, 40(1): 43–81.
- Hutmacher D.W. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 21: 2529-2543.
- Jeevithan, E., Wu, W., Nanping, W., Lan, H. and Bao, B. 2014. Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone. *Process Biochem*, 49(10): 1767-1777.
- Jiang, L. 2013. Preparation of Fish-scale Gelatins by Mild Hydrolysis and Their Characterization. *Journal of Polymers and the Environment*, 21: 564–567.
- Johnson K.A., Rogers G., Roe S.C., Howlett C.R., Clayton M., Milthorpe M.K. and Schindhelm K. 1999. Nitrous acid pretreatment of tendon xenografts cross-linked with glutaraldehyde and sterilized with gamma irradiation. *Biomaterials*, 20: 1003-1015.
- Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J. and Boot-Handford, R.P. 2007. Collagens at a glance. *Journal of cell science*, 120: 1955-1958.
- Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A., 2000. Biochemical ve Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkalie Proteases. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 657-666.
- 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. *Biochem biophys rep*, 10: 39-45.
- Krishnan S. and Perumal P. 2013. Preparation and Biomedical Characterization of

- Jellyfish (*Chrysaora quinquecirrha*) Collagen from Southeast Coast of India. *International Journal Of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3): 698-701.
- Leitinger B. and Hohenester E. 2007. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol.*, 26: 146-155.
- León-López, A., Morales-Peñaloza, A., Martínez-Juárez, V.M., Vargas-Torres, A., Zeugolis, D.I. and Aguirre-Álvarez, G. 2019. Hydrolyzed collagen—sources and applications. *Molecules*, 24(22): 4031.
- Li, C.-M., Zhong, Z.-H., Wan, Q.-H., Zhao, H., Gu, H.-F. and Xiong, S.-B. 2008. Preparation and thermal stability of collagen from scales of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *European Food Research and Technology*, 227(5): 1467–1473.
- Liang J., Pei X.R., Wang N., Zhang Z.F., Wang J.B. and Li Y. 2010. Marine collagen peptides prepared from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin extend the life span and inhibit spontaneous tumor incidence in Sprague-Dawley Rats. *J Med Food.*, 13 (4): 757-770.
- Liu, D., Wei, G. Li, T., Hu, J., Lu, N., Regenstein, J.M. and Zhou, P. 2015. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, 172: 836-843
- Liu, D.C., Lin, Y.K. and Chen, M.T. 2001. Optimum Condition of Extracting Collagen from Chicken Feet and its Characteristics. *Asian-Australas J Anim Sci*, 14(11): 1638-1644.
- Liu, W., Li, G., Miao, Y. and Wu, X. 2009. Preparation and characterization of pepsin-solubilized type I collagen from the scales of snakehead (*Ophiocephalus argus*). *Journal of Food Biochemistry*, 33(1): 20–37.
- Liu, Z., Oliveira, A. C. M. and Su, Y.-C. 2010. Purification and characterization of pepsin-solubilised collagen from skin and connective tissue of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2): 1270–1274.
- Lullo, D.D., Gloria, A., Shawn, S.M., Jarmo, K., Ala-Kokko, L., Antonio, S. and James D. 2002. Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen. *J. Biol. Chem.*, 277(6): 4223-4231.
- Manikandan, A., Thirupathi Kumara Raja, S., Thiruselvi, T., and Gnanamani, A. 2018. Engineered fish scale gelatin: An alternative and suitable biomaterial for tissue engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 33(3): 332-346.
- Mayne, R. and Zettergren, J.G. 1980. Type IV collagen from chicken muscular tissues. Isolation and characterization of the pepsin-resistant fragments. *Biochemistry*, 19(17): 4065-4072.
- Miller, E.J. 1984. Biomedical and industrial application of collagen; In: *Extracellular Matrix Biochemistry*, K. A. Piez and A. H. Reddi, eds. Elsevier, New York. pp. 41-81.
- Mocan, E., Tagadiuc, O. and Nacu, V. 2011. Aspects of Collagen Isolation Procedure. *Clinical Research Studies*, 2: 3-5.

- Mozioğlu, E. 2019. Elektroforezin Temelleri ve Türleri. 10.13140/RG.2.2.11720.47365.
- Muller, W.E.G. 2003. The Origin of Metazoan Complexity: Porifera as Integrated Animals. *Integrated Computational Biology*, 43(1): 10-30.
- 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): 81–89.
- Nagai, T. and Suzuki, N. 2000. Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68: 277-281.
- Nagai, T., Izumi, M. and Ishii, M. 2004. Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(3): 239–244.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. and Osako, K. 2011. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. *Food Chemistry*, 125(2): 500–507.
- Neil, D. and Guy, S. 2013. Handbook of proteolytic enzymes, volume 2. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 3rd edition.
- Ogawa M., Portier R.J., Moody M.W., Bell J., Schexnayder M.A. and Losso J.N. 2004. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chem*, 88(4): 495–501
- Oliveira S., Ringshia R., Legeros R., Clark E., Terracio L., Teixeira C. and Yost M. 2009. An improved collagen scaffold for skeletal regeneration. *Journal of Biomedical Materials*, 94(2): 371–379.
- Ouyang, Q. Q., Hu, Z., Lin, Z. P., Quan, W. Y., Deng, Y. F., Li, S. D. and Chen, Y. 2018. Chitosan hydrogel in combination with marine peptides from tilapia for burns healing. *International journal of biological macromolecules*, 112: 1191-1198.
- Pal, G.K. and Suresh, P.V. 2016. Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagenbased novel functional food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37: 201-215.
- Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R. and Berthod, F. 2010. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*. 3(3): 1863-1887.
- Pati, F., Adhikari, B. and Dhara, S. 2010. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology*, 101(10): 3737–3742.
- Quereshi, S., Mhaske, A., Raut, D., Singh, R., Mani, A. and Patel, J. 2010. Biotechnology Extraction And Partial Characterization Of Collagen From Different Animal Skins. *Recent Research in Science and Technology*, 2(9): 28-31.
- Raftery, R. M., Woods, B., Marques, A. L., Moreira-Silva, J., Silva, T. H., Cryan, S. A. and O'Brien, F. J. 2016. Multifunctional biomaterials from the sea: Assessing the effects of chitosan incorporation into collagen scaffolds on mechanical and biological functionality. *Acta biomaterialia*, 43: 160-169.
- Ramadass, S.K., Perumal, S., Gopinath, A., Nisal, A., Subramanian, S. and Madhan, B.

2014. Sol–gel assisted fabrication of collagen hydrolysate composite scaffold: A novel therapeutic alternative to the traditional collagen scaffold. *ACS applied materials & interfaces*, 6(17): 15015-15025.
- Ramshaw, J.A., Peng, Y., Glattauer, V. and Werkmeister, J.A. 2009. Collagens as biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 20(1): 3–8.
- Ratti, C. 2001. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*, 49(4): 311-319.
- Rose, F.R. and Oreffo, R.O. 2002. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun*, 292: 1-7.
- Sanz-Herrera, J.A. and Reina-Romo, E. 2011. Cell-Biomaterial Mechanical Interaction in the Framework of Tissue Engineering: Insights, Computational Modeling and Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 8217-8244.
- Senaratne, L.S., Park, P. and Kim, S. 2006. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technol* 97(2): 191–197.
- Sivakumar, P., Arichandran, R., Suguna, L., Mariappan, M. and Chandrakasan, G. 2000. The composition and characteristics of skin and muscle collagens from a freshwater catfish grown in biologically treated tannery effluent water. *J Fish Biol* 56: 999–1012.
- 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 Chem* 105(3): 1302–1306.
- Song, E., Yeon, K., Chun, T., Byun, H.J.N. and Lee, Y.M. 2006. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials*, 27: 2951-2995.
- Srikanya, A., Dhanapal, K., Sravani, K. Madhavi, K. and Kumar, G.P. 2017. A study on optimization of fish protein hydrolysate preparation by enzymatic hydrolysis from tilapia fish waste mince. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(12):3220–9.
- Strawich, E. and Nimni, M.E. 1971. Properties of a collagen molecule containing three identical components extracted from bovine articular cartilage. *Biochemistry*, 10 (21): 3905-3911.
- Subhan, F., Hussain, Z., Tauseef, I., Shehzad, A. and Wahid, F. 2020. A review on recent advances and applications of fish collagen. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-11.
- Sugiura, H., Yunoki, S., Kondo, E., Ikoma, T., Tanaka, J. and Yasuda, K. 2009. In vivo biological responses and bioresorption of tilapia scale collagen as a potential biomaterial. *J. Biomater. Sci. Polym.*, 20: 1353-1368.
- Szpak, P. 2011. Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis. *Journal of Archaeological Science*, 38(12): 3358–3372.
- Tang, X., Yang, L.H., Wu, Q.Q., and Xu, C.A. 2012. Process Improvement of Hydrolysis Marine Fish Scales with Alkaline Protease. *Journal of Xiamen University (Natural*

- Science*), 51(6): 1097-101.
- Tiselius A W. 2015 Nov 13. Video - Arne Tiselius (1958) - The Nobel Foundation: Some Thoughts on Its Work and Function (German presentation). <https://www.mediatheque.lindau-nobel.org/videos/33807/1958-die-nobelstiftung-einige-gedanken-ueber-ihre-tradition-und-ihr-wirken>. [Son erişim tarihi: 06.05.2021].
- Tzaphlidou, M. and Berillis, P. 2002. Structural alterations caused by lithium in skin and liver collagen using an image processing method. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, 20(4): 493-504.
- Wang, T., Lin, S., Shen, Y., Liu, S., Wang-McCall, T., Chin, M., Lin, T., Yang, C., Wu, W. and Yang, C. 2011. Type I collagen from bullfrog (*Ranacatesbeiana*) fallopian tube. *African Journal of Biotechnolog*, 10(42): 8414-8420.
- Włodarczyk, M. G., Kubisz, L. and Włodarczyk, D. 2017. Amino acid composition in determination of collagen origin and assessment of physical factors effects. *Int J Biol Macromol*, 104: 987-991.
- Wood, A., Ogawa, M., Portier, M., Schexnayder, M., Shirley, M. and Losso, J.N. 2008. Biochemical properties of alligator (*Alligator mississippiensis*) bone collagen. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.*, 151: 246–249.
- Yetim H. 2011. Jelâtin üretimi özellikleri ve kullanımı, I. Ulusal helal ve sağlıklı gıda kongresi, Gıda katkı maddeleri: Sorunlar ve çözüm önerileri, 19-20.11. Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

GÖZDE KÖYLÜ BİLGİN

Gozdekyl93@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2018-2021	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü, Antalya
Lisans 2013-2017	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Gıda Mühendisi 2018-2019	Perge Kâğıtçılık A.Ş.
-----------------------------	-----------------------