ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Gözde GERÇEK

BAZI BALIK TÜRLERİNİN DERİ VE KEMİKLERİNDEN KOLLAJEN ELDESİ VE KARAKTERİZASYONU

SU ÜRÜNLERİ AVLAMA VE İŞLEME TEKNOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

ADANA-2020

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BALIK TÜRLERİNİN DERİ VE KEMİKLERİNDEN KOLLAJEN ELDESİ VE KARAKTERİZASYONU

Gözde GERÇEK

DOKTORA TEZİ

SU ÜRÜNLERİ AVLAMA VE İŞLEME TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 16/01/2020 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

……	……	……
Doç. Dr. Aygül KÜÇÜKGÜLMEZ YANDIM DANIŞMAN	Prof.Dr. Yasemen YANAR ÜYE	Prof. Dr. Osman GÜLNAZ ÜYE
……...	……..	
Prof. Dr. Haşim KELEBEK ÜYE	Dr.Öğr.Üyesi Ali Eslem KADAK ÜYE	

Bu Tez Enstitümüz Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

BAZI BALIK TÜRLERİNİN DERİ VE KEMİKLERİNDEN KOLLAJEN ELDESİ VE KARAKTERİZASYONU

Gözde GERÇEK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ AVLAMA VE İŞLEME TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Aygül KÜÇÜKGÜLMEZ YANDIM
Yıl: 2020, Sayfa: 115
Jüri : Doç. Dr. Aygül KÜÇÜKGÜLMEZ YANDIM
: Prof. Dr. Yasemen YANAR
: Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
: Prof. Dr. Haşim KELEBEK
: Dr. Öğr. Üyesi Ali Eslem KADAK

Bu çalışmada, kolyoz (*Scomber japonicus*), kupes (*Boops boops*), berlam (*Merluccius merluccius*) deri ve kemiklerinden kollajen eldesi ve karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Elde edilen kollajen örneklerinin fizikokimyasal özelliklerini belirlemek amacı ile verim, nem, ham kül ve protein tayini analizleri, amino asit analizi, Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC), Ultraviyole ve Görünür Işık Absorpsiyon Spektroskopisi (UV-Vis), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), X-Işını Kırınım Difraktometresi (XRD) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ölçümleri yapılmıştır. Tüm türlerin deri örneklerindeki kollajen verimi (%4,08-9,32) ve protein değerleri (%91,00-93,60) kemik örneklerindeki kollajen verimi (%0,34-2,15) ve protein değerlerine (%87,35-90,20) göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). UV-Vis sonuçlarına göre tüm kollajen örnekleri maksimum absorpsiyonu 232 nm'de vermiştir. FTIR sonuçları, ekstrakte edilen kollajen örneklerinin üçlü sarmal yapıya sahip olduklarını desteklemektedir. Termal denatürasyon sıcaklıkları, deriden elde edilen kollajen örneklerinde 26,36-32,03ºC aralığında bulunurken kemik örneklerinde 26,94-33,73ºC aralığında bulunmuştur. SEM görüntüleri ile kollajen örneklerinin fibriler ve gözenekli yapıda olduğu belirlenmiştir. Tüm örneklerin amino asit değerlerine bakıldığında ise en yüksek glisin bulunurken bunu alanin, arjinin, glutamik asit ve aspartik asit takip etmiştir. Balık işleme atıklarından elde edilen kollajenin, birçok alanda katma değeri yüksek materyal olarak kullanılabileceği ve en önemlisi işleme atıklarını değerlendirip çevresel kirliliğin önlenebileceği mevcut çalışma ile bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Balık, Deri, Kemik, Kollajen, Karakterizasyon

ABSTRACT

PhD THESIS

COLLAGEN EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF SKIN AND BONE OF SOME FISH SPECIES

Gözde GERÇEK

ÇUKUROVA UNIVERSITY
THE INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FISHING AND PROCESSING TECHNOLOGY

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Aygül KÜÇÜKGÜLMEZ YANDIM
Year: 2020, Pages: 115
Jury : Assoc. Prof. Dr. Aygül KÜÇÜKGÜLMEZ YANDIM
: Prof. Dr. Yasemen YANAR
: Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
: Prof. Dr. Haşim KELEBEK
: Asst. Prof. Dr. Ali Eslem KADAK

This study aim of extraction and characterization of collagen from skin and bones of *Scomber japonicus*, *Boops boops* and *Merluccius merluccius*. Yield, moisture, crude ash and protein determination analyzes, amino acid analysis, Differential Scanning Calorimetry (DSC), Ultraviole and Visible Light Absorption Spectroscopy (UV-Vis), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) , X-Ray Diffraction (XRD) and Scanning Electron Microscopy (SEM) analyses were performed to determine the physicochemical properties of the extracted collagen samples. The collagen yield (%4.08-9.32) and protein contents (%91.00-93.60) of the skin samples of all species was higher than the collagen yields (%0.34-2.15) and protein contents (%87.35-90.20) ($p<0.05$) of the bone samples All collagen samples showed maximum absorption at 232 nm according to UV-Vis results. FTIR results support that the extracted collagen samples have triple helix structure. Thermal denaturation temperatures was determine range of 26.36-32.03ºC for skin samples and the range of 26.94-33.73ºC was found on bone samples. Fibrillar and porous samples was determine with SEM images. Glysin was the most abundant amino acid and there were relatively high contents of alanine, arginine, glutamic acid and aspartic acid. The present study found that collagen from fish processing wastes can be used as a high value material in many areas and most importantly, it is possible to prevent environmental pollution with evaluate fish processing waste.

Key Words: Fish, Skin, Bone, Collagen, Characterization

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Dünya genelinde gıda endüstrisinin hızla büyümesine bağlı olarak gıda atıklarının da değerlendirilmesi konusu oldukça önem kazanmıştır. Son zamanlarda modern su ürünleri işletmeleri, biyoteknolojinin de yardımıyla atıklardan elde ettikleri yan ürünleri çeşitli amaçlar için değerlendirmektedir. Bu yöntemlerle elde edilen yeni yan ürünlerle birlikte sahillerin, büyük barajların ve sulak alanların önemli çevre sorunlarından olan organik atıklarında çözümüne katkıda bulunulmaktadır. Su ürünleri içerisinde de kemik, deri, pul, yüzgeç ve kafa gibi atıklarından dolayı balık ilk sırayı almaktadır. Gelişen teknoloji ve artan araştırmalar ile bu atıkların kollajen gibi çok değerli bir biyoaktif maddeye dönüştürülmesi oldukça önem arz etmektedir.

Protein Veri Bankası'na (PDB) göre kollajen cilt, eklemler, kıkırdak, dişler (mineral kristallerine eklenen kollajen), tendon, kemikler ve diğerleri dahil bağ dokularında mevcut olan en bol fibriller proteindir. Memeli kollajeni üzerine geniş çapta araştırmalar mevcuttur ve buna göre; memeli proteinin yaklaşık %25'i doku ve organların stabilitesine ve yapısal bütünlüğüne katkıda bulunan kollajenlerdir. İnsanda, her biri ayrı genler tarafından kodlanan 46 ayrı polipeptit zincirinden oluşan yaklaşık 29 ayrı kollajen türü tanımlanmıştır. Bunlar arasında tip I'den tip V'e olanlar en yaygın türlerdir (Raman ve Gopakumar, 2018).

Kollajen lifleri temel olarak tropokollajen adı verilen bir proteinden oluşmaktadır. Tropokollajenin kristalleşmesiyle mikrofibriller, mikrofibrillerin bir araya gelmesi ile kollajen fibrilleri ve kollajen fibrillerinin bir araya gelmesi ile de kollajen lifleri oluşmaktadır. Kollajenin temel yapısı üç adet çoklu prolin zincirinin oluşturduğu üçlü sarmaldır. Bu zincirlerde her üç aminoasitten birinin glisin (GLY) olması üçlü sarmal yapının oluşmasında önemli rol oynar ve kollajen molekülünün en karakteristik özelliğidir. Bu zincirlerin genel aminoasit dizilimi GLY-X-Y şeklindedir. Bu dizilimde X genellikle prolin (PRO) ve Y genellikle prolinin hidroksillenmiş hali olan hidroksiprolin (HYP)'dir. Ancak X ve Y pozisyonunda,

triptofan (TRP) ve sistin (CYS) hariç DNA tarafından kodlanan diğer 16 aminoasitten herhangi biri bulunabilir.

Kollajen kaynağı olarak sığır, domuz ve tavuk kaynaklarının kullanımı ucuz ve elde edilmesi kolaydır ancak uzun süreli kullanımdan sonra bu kaynaklardan elde edilen kollajenin alerjenik olabileceği ve osteogenez imperfekta gibi bazı hastalıkları tetikleme eğilimi olduğu bildirilmiştir. Günümüzde ticari kollajenin çoğu memelilerden elde edilse de bazı sosyo-kültürel sebeplerden dolayı alternatif kaynak arayışına geçilmiştir. Bu sebepler arasında deli dana hastalığı olarak bilinen sığır spongiform encepholopathy (BSE)'nin, dünyada geniş yankı uyandırması ve domuz deri ve kemiklerinden elde edilen kollajenin İslam dininde ve Musevilikte dini kurallara göre yenilmesine izin verilmiş yiyecekler kapsamında yer almaktadır. Bu nedenle, memeli kaynaklarının atıklarından elde edilen kollajen ve jelatinin gıda sanayi, kozmetik ve eczacılıkta kullanımlarında sınırlamalara gidilmektedir. Bir başka doğal kollajen kaynağı ise denizel kollajendir. Denizel kollajende bulaşıcı hastalık riskinin olmadığı, FDA tarafından GRAS olarak (genel olarak güvenli) kabul edildiği ve aynı zamanda ucuz bir üretim kaynağı olduğu bildirilmiştir.

Kollajen temel olarak kimyasal hidroliz ve enzimatik hidroliz ile elde edilebilir. Kimyasal hidroliz, endüstride daha yaygın olarak kullanılır ancak yüksek besin değeri ve gelişmiş fonksiyonelliğe sahip ürünler gerektiğinde, enzim ilavesini kullanan biyolojik işlemler daha ümit vericidir. Ayrıca enzimatik işlemler daha az atık oluşturur ve işlem süresini azaltabilir ancak daha pahalıdır. Kollajeni ekstrakte etmek için öncelikle işlemi oldukça karmaşık hale getiren, temel olarak lizin ve hidroksilisin kalıntıları, ester bağları ve sakkarit gibi diğer bağları da içeren çok sayıda kovalent intra ve moleküller arası çapraz bağın uzaklaştırılması gerekir. Kollajen ekstrakte edilmeden önce, hammaddenin kaynağına göre değişen bir asit veya alkali işlem kullanılarak ön işlem yapılır. Ön işlem kollajen olmayan maddeleri ayırmak ve daha yüksek verim elde etmek için kullanılır. Yaygın olarak

kullanılan ekstraksiyon metodları daha çok kollajenin asit çözeltileri, nötr tuz çözeltileri ve enzim eklenmiş asidik çözeltilerdeki çözünürlüğüne dayanır.

Çeşitli hayvansal kaynaklardan izole edilerek saflaştırılan kollajen preparatları özellikle tıp, fotoğrafçılık, kozmetik ve biyomedikal malzeme üretimi gibi alanlarda yaygın bir kullanım alanına sahiptirler. Kollajenin hem laboratuar hem de canlı ortamda iyi doku toleransı göstermesi, yapay böbreklerde diyaliz zarı, yapay kornea zarı, deri ve kan damarlarında, cerrahide hemostatik ajan olarak birçok biyomedikal uygulamada kullanım olanağı bulmuştur. Ayrıca kozmetik sanayinde, sabun, şampuan, yüz kremi, vücut losyonu ve diğer kozmetik ürünlerinin temel bileşenini oluşturan gözde bir biyomateryaldir. Günümüzde de bu konudaki araştırmalar yoğun olarak devam etmekte ve bu ürünlerden faydalanma olanaklarının arttırılmasına yönelik kollajen içerikli yeni ürün ve malzemelerin geliştirilmesi konusunda çalışmalar sürdürülmektedir.

Bu amaçla mevcut çalışmada ülkemiz sularında önemli derecede avcılığı yapılan kolyoz (*Scomber japonicus*), berlam (*Merluccius merluccius*) ve kupes (*Boops boops*) türleri deri ve kemiklerinden kollajen eldesi ile öncelikle balık işleme atıklarından elde edilecek katma değeri yüksek bir ürünün ekonomiye kazandırılması amaçlanmıştır.

Çalışma Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Enstrümantal Analiz Laboratuvar'ında yürütülmüştür. Çalışmada deri ve kemik materyalleri temini için kullanılan balık örnekleri Adana'da bulunan bir su ürünleri marketinden temin edilmiş ve strafor kutular içerisinde Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi laboratuvarına getirilmiştir. Laboratuvara getirilen örneklerin öncelikle soğuk zincir altında sırasıyla deri ve kemikleri ayrılmış, blender ile kıyılmış, saf su ile yıkanmış ve kollajen eldesi için hazır hale getirilmiştir. Ön işlemler sonrası kollajen ekstraksiyonuna geçilmiştir.

Fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacı ile kollajen verimi, protein, nem, su, ve kül tayini, amino asit analizi, denatürasyon sıcaklığı, ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi (UV-Vis), fourier

dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), X-Işını kırınım difraktometresi (XRD) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri yapılmıştır.

Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin verimleri sırası ile %9,32, %4,08 ve %6,60; protein değerleri sırası ile %91, %91,05 ve %93,6; nem değerleri ise sırası ile %6,01, %5,33 ve %5,24 olarak bulunurken kül değerleri sırası ile %0,67, %0,59 ve %0,56 olarak bulunmuştur. Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin verimleri sırasıyla %0,78, %2,15 ve %0,34; protein değerleri sırası ile ile %87,35, %88,35 ve %90,20; nem değerleri ise sırası ile %9,13, %9,26 ve %8,83 olarak bulunurken kül değerleri sırası ile %0,89, %0,98 ve %0,91 olarak bulunmuştur. Mevcut çalışma sonuçlarına göre; kupes, kolyoz ve berlam deri ve kemiklerinden esktrakte edilen kollajen örneklerinde glisin her üç örnekte de en yüksek miktarda bulunan amino asit olarak saptanmıştır. Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden esktrakte edilen kollajen örneklerinde glisin sırasıyla 24,39, 20,82 ve 37,20 g/100g protein olarak bulunurken; kemik örneklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde glisin sırası ile 24,39, 31,59 ve 32,13 g/100g protein olarak bulunmuştur.

Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde toplam iminoasit içeriği sırası ile %11,98, %13,33 ve %15,41 olarak bulunurken; kemik örneklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde iminoasit içeriği sırası ile %25,47, %11,5 ve %22,22 olarak bulunmuştur. Diğer bir önemli parametre olan denatürasyon sıcaklığı kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde sırasıyla 29,13 ºC, 32,03 ºC ve 26,36 ºC olarak bulunmuştur. Mevcut çalışmada kollajenlerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile 2000x büyütmede elde edilen görüntülerinden hesaplanan lif kalınlığı ölçümlerinin bazıları şu şekildedir; kolyoz derilerinden elde edilen kollajen örneklerinde 2,24 µm ve 4,31 µm, kupes derilerinden elde edilen kollajen örneklerinde 2,56 µm ve 2,96 µm, berlam derilerinden elde edilen kollajen örneklerinde 0,87 µm ve 1,44 µm; kolyoz kemiklerinden elde edilen kollajen

örneklerinde 5,92 µm, kupes kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinde 2,91 µm ve 3,44 µm ve berlam kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinde 1,77 µm, 5,21 µm ve 7,66 µm. Çalışmada fonksiyonel grupların gözlemlenmesi ve proteinlerin ikincil yapılarını belirlemek amacı ile FTIR analizinden yararlanılmıştır. Deri örneklerinin FTIR analiz sonuçları birbirlerine çok yakın bulunmuş, Amid III bandı tüm örneklerde aynı sonucu vermiştir. Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin FTIR analizi sonuçlarına göre; Amid A bandı sırasıyla 3290 cm^{-1}, 3295 cm^{-1}, 3290 cm^{-1}, Amid B bandı sırasıyla 2923 cm^{-1}, 2925 cm^{-1}, 2935 cm^{-1}, Amid I bandı sırasıyla 1629 cm^{-1}, 1632 cm^{-1}, 1632 cm^{-1}, Amid II bandı sırasıyla 1534 cm^{-1}, 1551 cm^{-1}, 1535 cm^{-1} ve Amid III bandı sırasıyla 1234 cm^{-1}, 1240 cm^{-1} ve 1235 cm^{-1} olarak bulunmuştur.

Ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis) absorpsiyon spektroskopisi ile kollajeni karakterize etmenin temel ve basit yolunun örneği 200-400 nm dalga boyu aralığında taramanın olduğu ve kollajenin maksimum absorbansı 230 nm' de verdiği bildirilmiştir (Piez, 1965). Mevcut çalışmada 190-800 nm aralığında tarama yapılmış, bu sonuca çok yakın sonuçlar elde edilmiş ve kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin maksimum absorbansı 232 nm'de verdiği sonuçlarına ulaşılmıştır. Çalışma kapsamında X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) analizine tabi tutulan kolyoz, kupes, berlam deri ve kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde belirgin bir şekilde iki ana karakteristik kristalinize pik olduğu görülmektedir. Mevcut çalışma sonuçlarına göre elde edilen kollajen örneklerinde birinci kristalizasyon piki; kolyoz deride 5,39º, kupes deride 5,81º, berlam deride 5,01º, kolyoz kemikte 6.60º, kupes kemikte 5,04º ve berlam kemikte 5,05º 2 Θ olarak bulunmuştur. Mevcut çalışma sonuçlarına göre elde edilen kollajen örneklerinde ikinci ve ana kristalizasyon piki; kolyoz deride 21,59 º, kupes deride 21,37º, berlam deride 21,58º, kolyoz kemikte 22,15º, kupes kemikte 23,89º ve berlam kemikte 22,78º 2 Θ olarak bulunmuştur.

Mevcut çalışma ile böylesine geniş kullanım alanı olan kollajenin su ürünleri atıkları ve yan ürünlerinden elde edilmesi ile atıkların çevre için potansiyel

olabilecek zararları engellenmiş olacak ve atık değerlendirme ile de ekonomik katkı sağlanmış olacaktır. Helal ürün kapsamında yer alan su ürünleri ve yan ürünlerinden elde edilen kollajen, bu pazardaki fırsatları fark eden büyük medikal, gıda ve kozmetik firmaları tarafından diğer memeli kollajenine göre tercih edilecektir. Sonuç olarak mevcut çalışma ile öncelikle balık işleme atıklarından elde edilecek katma değeri yüksek bir ürünün ekonomiye kazandırılması sağlanmış olacak ve balık işleme atıklarından üretilecek kollajenin özelliklerinin tespit edilmesi ile de çalışmanın özgün değeri arttırılacaktır.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca sonsuz desteğini gördüğüm, bilgi birikimi ve donanımı ile yoluma ışık olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Aygül KÜÇÜKGÜLMEZ YANDIM'a, doktora tezimin planlanmasında ve yürütülmesinde önemli katkıları olan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yasemen YANAR'a, tezimin her aşamasında yönlendirici fikirleri ile yol gösteren, teknik ve akademik bilgi birikimini her zaman bizlerle paylaşan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Osman GÜLNAZ'a teşekkürü borç bilirim.

Manevi desteğini her zaman hissettiğim sayın hocalarım Prof. Dr. Mehmet ÇELİK ve Nesim YANDIM'a, tezimin yürütülmesinde sonsuz desteğini gördüğüm ve her zaman yanımda olan çok değerli arkadaşlarım Mehmet GÖKÇİN ve Serdar KİLERCİOĞLU'na, tanıştığımız günden bu yana samimi ve eşsiz destekleri için çok sevgili arkadaşlarım Songül TÜRKMEN, Emel KESKİN, Sanem ÇULFA, Seçil UYSAL, İdil Yelki ÖZ ve ailelerine kalpten teşekkür ederim.

Yaşamın her döneminde beni anlayabilen, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli büyüğüm çok sevdiğim anneannem Nevruz ŞAHİN başta olmak üzere, hayatta sahip olduğum ve olabileceğim en değerli varlıklarım annem Tülin GERÇEK ve babam Ali GERÇEK'e, saygı ve sevgisi ile her zaman yanımda olan hayat arkadaşım Zekeriya SARIGÖZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR IX
İÇİNDEKİLER X
ÇİZELGELER DİZİNİ XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR XX
1. GİRİŞ 1
1.1. Kollajen 3
1.2. Kollajen Tipleri 6
1.3. Kollajen Kaynakları 9
1.4. Kollajen Ekstraksiyon Metotları 11
1.4.1. Ön İşlem 11
1.4.2. Kimyasal Hidroliz 12
1.4.3. Enzimatik Hidroliz 13
1.4.4. Kollajen Ekstraksiyonunda Ultrason Kullanımı 13
1.5. Kollajenin Fizikokimyasal Özellikleri 13
1.5.1. Aminoasit Kompozisyonu 14
1.5.2. Termal Stabilite (Denatürasyon Sıcaklığı) 14
1.5.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) 14
1.5.4. Ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi (UV-Vis) 15
1.5.5. X-Işını Kırınım Difraktometresi (XRD) 16
1.5.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) 16
1.6. Kollajen Kullanım Alanları 16
1.7. Çalışmanın Amacı 19
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 21

3. MATERYAL VE METOT 41
3.1. Materyal 41
3.1.1. Kolyoz (*Scomber japonicus*) 41
3.1.2. Berlam (*Merluccius merluccius*) 42
3.1.3. Kupes (*Boops boops*) 43
3.2. Metot 44
3.2.1. Deri ve Kemik Materyallerinin Hazırlanması 44
3.2.2. Farklı Balık Türlerinin Derilerinden ve Kemiklerinden Kollajen Eldesi 46
3.2.3. Elde Edilen Kollajenlerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu 50
3.2.3.1. Verim 50
3.2.3.2. Protein, Nem ve Kül Analizleri 50
3.2.3.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi 51
3.2.3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi 52
3.2.3.5. X-Işını Kırınım Difraktometresi (XRD) Analizi 52
3.2.3.6. Ultraviyole ve Görünür Işık (UV-Vis) Absorpsiyon Spektroskopi Analizi 52
3.2.3.7. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi 52
3.2.3.8. Amino Asit Analizi 53
3.2.4. İstatistiksel Analizler 53
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 55
4.1. Kupes, Kolyoz, Berlam Deri ve Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Verim ve Besin Kompozisyonu 55
4.2. Kupes, Kolyoz, Berlam Deri ve Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi Sonuçları 58

4.3. Kupes, Kolyoz, Berlam Deri ve Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Ultraviyole ve Görünür Işık (UV-Vis) Absorpsiyon Spektroskopi Analizi Sonuçları 68
4.4. Kupes, Kolyoz, Berlam Deri ve Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi Sonuçları 74
4.5. Kupes, Kolyoz, Berlam Deri ve Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçları 79
4.6. Kupes, Kolyoz, Berlam Deri ve Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin X-Işını Kırınım Difraktometresi (XRD) Analizi Sonuçları 87
4.7. Kupes, Kolyoz, Berlam Deri ve Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Amino Asit Analizi Sonuçları 91
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 99
KAYNAKLAR 103
ÖZGEÇMİŞ 115

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Türlere Göre Türkiye Denizel Su Ürünleri Avcılık Verileri..... 2
Çizelge 1.2. Kollajen Tipleri ve İnsan Vücudundaki Dağılımları..... 8
Çizelge 1.3. Biyomateryal Olarak Kollajenin Avantajları ve Dezavantajları..... 18
Çizelge 4.1. Kupes, Kolyoz ve Berlam Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Verim ve Besin Kompozisyonu..... 55
Çizelge 4.2. Kupes, Kolyoz ve Berlam Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Verim ve Besin Kompozisyonu..... 57
Çizelge 4.3. Kupes, Kolyoz ve Berlam Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumlarında Gözlenen Fonksiyonel Gruplar ve Bunların Karakteristik Dalga Sayıları..... 62
Çizelge 4.4. Kupes, Kolyoz Ve Berlam Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumlarında Gözlenen Fonksiyonel Gruplar ve Bunların Karakteristik Dalga Sayıları..... 67
Çizelge 4.5. Kupes, Kolyoz ve Berlam Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Amino Asit Kompozisyonu (g/100 g protein)..... 92
Çizelge 4.6. Kupes, Kolyoz ve Berlam Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Amino Asit Kompozisyonu (g/100 g protein)..... 95

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Kollajenin Genel Yapısı 4
Şekil 1.2. Kollajenin Birincil, İkincil ve Üçlü Sarmal Yapısı 6
Şekil 3.1. Kolyoz (*Scomber japonicus*) 41
Şekil 3.2. Berlam (*Merluccius merluccius*) 42
Şekil 3.3. Kupes (*Boops boops*) 43
Şekil 3.4. Balık Deri Atıkları 45
Şekil 3.5. Balık Kemik Atıkları 45
Şekil 3.6. Deri ve Kemik Örneklerinden Kollajen Olmayan Proteinlerin Uzaklaştırılması 46
Şekil 3.7. Ekstraktların NaCl ile Çöktürülmesi İşlemi 47
Şekil 3.8. Santrifüj Sonrası Toplanan Kollajen Örnekleri 48
Şekil 3.9. Diyaliz İşlemi 48
Şekil 3.10. Liyofilizasyon İşlemi 49
Şekil 3.11. Liyofilizasyon Sonrası Kollajen Örnekleri 49
Şekil 4.1. Kupes Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumu 59
Şekil 4.2. Kolyoz Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumu 60
Şekil 4.3. Berlam Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumu 61
Şekil 4.4. Kupes Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumu 64
Şekil 4.5. Kolyoz Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumu 65

Şekil 4.6. Berlam Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumu 66
Şekil 4.7. Kupes Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin UV-Vis Spektrumu 69
Şekil 4.8. Kolyoz Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin UV-Vis Spektrumu 70
Şekil 4.9. Berlam Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin UV-Vis Spektrumu 70
Şekil 4.10. Kupes Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin UV-Vis Spektrumu 71
Şekil 4.11. Kolyoz Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin UV-Vis Spektrumu 72
Şekil 4.12. Berlam Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin UV-Vis Spektrumu 73
Şekil 4.13. Kupes Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerine Ait Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Grafiği 75
Şekil 4.14. Kolyoz Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerine Ait Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Grafiği 75
Şekil 4.15. Berlam Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerine Ait Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Grafiği 76
Şekil 4.16. Kupes Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerine Ait Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Grafiği 78

Şekil 4.17. Kolyoz Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerine Ait Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Grafiği 78
Şekil 4.18. Berlam Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerine Ait Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Grafiği 79
Şekil 4.19. Kolyoz Derilerinden Elde Edilen Kollajenin SEM Görüntüleri (A) 200x; (B) 500x; (C) 1000x; (D) 2000x 81
Şekil 4.20. Kupes Derilerinden Elde Edilen Kollajenin SEM Görüntüleri (A) 200x; (B) 500x; (C) 1000x; (D) 2000x 82
Şekil 4.21. Berlam Derilerinden Elde Edilen Kollajenin SEM Görüntüleri (A) 200x; (B) 500x; (C) 1000x; (D) 2000x 83
Şekil 4.22. Kolyoz Kemiklerinden Elde Edilen Kollajenin SEM Görüntüleri (A) 200x; (B) 500x; (C) 1000x; (D) 2000x 84
Şekil 4.23. Kupes Kemiklerinden Elde Edilen Kollajenin SEM Görüntüleri (A) 200x; (B) 500x; (C) 1000x; (D) 2000x 85
Şekil 4.24. Berlam Kemiklerinden Elde Edilen Kollajenin SEM Görüntüleri (A) 200x; (B) 500x; (C) 1000x; (D) 2000x 86
Şekil 4.25. Kolyoz derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) sonuçları..... 88
Şekil 4.26. Kupes derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) sonuçları..... 88
Şekil 4.27. Berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) sonuçları..... 89

Şekil 4.28. Kolyoz kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) sonuçları 89
Şekil 4.29. Kupes kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) sonuçları 90
Şekil 4.30. Berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) sonuçları 90

SİMGELER VE KISALTMALAR

ASC	: Asitte Çözünür Kollajen
PSC	: Pepsinde Çözünür Kollajen
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi
UV-Vis	: Ultraviyole ve Görünür Işık Absorpsiyon Spektroskopisi
XRD	: X-Işını Kırınımı
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
KBr	: Potasyum Bromür
GLY	: Glisin
PRO	: Prolin
HYP	: Hidroksiprolin
TRP	: Triptofan
CYS	: Sistin
MET	: Metiyonin
PHE	: Fenilalanin
HIS	: Histidin
TYR	: Tirozin

1. GİRİŞ

Günümüzde, özelllikle gelişmiş ülkelerde insanlar, beslenmelerine çok daha fazla dikkat etmekte ve beslenme alışkanlıklarında sağlık açısından uygun gıdaları seçmeye özen göstermektedirler. Bu gıdalar içersinde balık; zengin protein içeriği ve yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri ile vücudun temel besin maddesi ihtiyacını karşılamakta, insan fizyolojisi ve metabolik fonksiyonları üzerinde olumlu etki yapması yönüyle önemli besin maddeleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Balıkçılık, günümüzde ve gelecekte tüm ülkelerin ekonomisine belirli bir yatırım ve çaba karşılığı sürekli girdi sağlayan önemli bir sektördür. Birleşmiş Milletler Tarım ve Gıda Örgütü (FAO) tarafından 2016 yılında dünya su ürünleri üretimi 171 milyon ton olarak açıklanmıştır (Anonim, 2018). Ülkemizde ise TÜİK verilerine göre 2018 yılında yetiştiricilik yoluyla 314,537 ton, avcılık yoluyla ise 314,094 ton balık üretimi gerçekleşmiştir. Çalışmamızın da ana materyalini oluşturan balık türleri berlam, kolyoz ve kupez sırasıyla 1019,3, 1503,5 ve 3559,3 ton üretim miktarları ile avcılık yoluyla elde edilen ve ekonomik değeri yüksek olan birçok balık türünden daha fazla üretilmişlerdir (TÜİK, 2018). Türlere göre Türkiye denizel su ürünleri avcılık verileri Çizelge 1.1’ de sunulmuştur.

Çizelge 1.1. Türlere Göre Türkiye Denizel Su Ürünleri Avcılık Verileri (TUİK, 2018)

Balık türü Type of fish	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Toplam - Total	**295 167,9**	**231 058,3**	**345 765,0**	**263 724,5**	**269 676,4**	**222 023,6**
Akya - Leer fish	333,5	173,5	109,3	186,6	211,9	181,7
Avcı - Greater amberjack	54,3	9,2	8,8	7,0	8,5	8,4
Albakor (Patlakgöz) - Albacore	70,6	0,3	53,4	25,2	44,0	37,8
Bakalorya-Berlam - Hake-Eurepean hake	676,0	642,2	706,0	783,8	1 011,3	1 019,3
Barbunya - Red mullet	2 055,4	1 426,1	1 255,2	1 453,6	1 406,4	1 399,3
Barbunya (Paşa barbunu) - Goldon banded	88,8	34,8	25,3	78,7	69,4	49,9
Çaça - Sprat	9 764,0	41 647,9	76 995,6	50 224,9	33 949,5	20 056,6
Çipura - Seabream	943,5	606,3	480,9	495,1	590,0	544,1
Dil - Common sole	693,6	411,3	328,0	352,2	486,4	432,4
Dülger - John dory	61,5	44,8	46,0	47,1	48,3	52,1
Fangri - Common seabream	70,7	36,3	31,3	25,3	28,8	44,7
Fener balığı - Angler fish	204,6	190,0	166,0	176,0	185,2	219,9
Gelincik - Shore rockling	14,1	11,6	7,4	10,4	11,7	15,8
Gobene (Tombik) - Frigate mackerel	863,3	561,7	476,0	406,8	474,1	367,0
Grenyüz - Meagre	16,5	17,5	20,0	23,6	10,1	55,9
Gümüş - Silverside	886,3	447,1	326,9	516,5	489,3	591,5
Hamsi - Anchovy	179 615,2	96 440,0	193 492,3	102 595,2	158 093,8	96 451,7
Hani - Painted comber	36,6	44,6	16,8	17,9	12,1	11,0
İskarmoz - Eurepean barracude	370,1	124,7	171,3	115,7	96,2	75,3
İskorpit - Black skorpion fish	192,2	201,9	143,2	138,6	306,0	208,2
İsparoz - Annular bream	106,6	58,7	75,0	84,2	86,6	45,9
İstavrit(Kraça)-Horse mackerel	21 817,8	12 213,2	14 290,4	8 859,8	8 065,6	14 221,8
İstavrit (Karagöz) - Scad	6 606,3	4 110,4	2 373,1	2 288,6	4 919,3	6 456,1
İşkine - Brown mearge	2,5	7,6	5,0	4,5	3,0	4,3
İzmarit - Picarel	765,7	349,9	332,0	328,9	285,9	255,3
Kalkan - Turbot	209,4	197,8	239,3	221,1	167,4	139,2
Karagöz - Two banded bream	123,0	147,9	108,8	125,0	210,9	128,4
Kayabalığı - Gobies	67,2	42,8	38,5	50,5	2,8	12,8
Kefal - Grey mullet	2 504,9	1 721,0	1 782,9	1 825,7	2 313,6	1 592,4
Keler - Angelshark	17,0	8,3	1,3	2,8	0,9	0,3
Kılıç - Sword fish**	96,8	55,7	34,9	76,5	441,0	427,0
Kırlangıç - Red gurnard	220,4	66,4	54,3	54,3	56,6	43,8
Kırlangıç (Mazak) - Trigla lineata	26,8	6,5	2,9	4,2	7,5	6,8
Kolyoz - Chup mackerel	2 573,7	1 695,0	1 209,9	1 602,0	2 043,0	1 503,5
Köpek - Topeshark	110,9	108,9	77,6	22,3	23,2	21,0
Kupez - Bogue	2 226,2	2 208,4	2 207,8	2 795,1	3 175,0	3 559,3
Lahoz - Waker	260,5	191,5	166,9	230,6	32,6	111,1
Levrek - Seabas	186,9	110,5	139,0	131,7	135,1	151,4
Lipsöz - Small-Scalled	51,3	20,4	17,3	28,2	20,4	40,6
Lüfer - Blue fish	5 225,2	8 386,3	4 135,7	9 573,6	1 935,7	5 767,4
Melanurya -Saddled seabream	113,6	127,9	59,3	90,2	92,3	63,7
Mercan - Striped bream	990,0	788,9	895,5	980,0	1 171,7	1 062,7
Mezgit - Whiting	9 396,9	9 555,1	13 158,3	11 540,8	8 248,0	6 813,9
Mığrı - European coger	1,5	0,2	1,4	2,6	0,3	-
Mırmır - Conger eel	122,6	143,8	83,1	123,7	152,3	181,7
Minekop - Croaker	25,8	91,1	28,9	30,9	26,7	25,3
Orfoz - Dusky grouper	20,1	13,4	16,6	11,0	3,1	2,6
Orkinos - Bluefin tuna*	551,4	555,0	1 091,0	1 324,0	1 514,7	1 283,7
Yazılı Orkinos - Little tunny	1 385,8	681,9	325,5	184,1	479,8	616,6
Oksüz - Piper	9,4	8,3	11,6	3,4	2,5	2,2
Palamut-Torik - Atlantic bonito	13 157,6	19 031,5	4 573,0	39 459,6	7 577,6	30 920,4
Patlakgöz mercan - Large-eye dentex	33,7	19,3	27,5	32,9	9,4	8,2
Pisi - Flounder	80,7	6,2	9,8	8,8	7,1	6,3
Sardalya - Pilchard	23 919,0	18 077,2	16 693,4	18 162,1	23 425,7	18 854,0
Sarıgöz - Black sea bream	25,9	26,9	21,9	51,4	19,8	52,0
Sarpa - Saupe	203,1	145,1	189,1	127,6	144,6	120,0
Sinagrit - Dentex	60,3	55,0	58,9	53,9	47,2	69,4
Sivriburun karagöz - Sharpsnout seabream	6,4	3,7	1,2	2,1	2,1	2,0
Tekir - Striped red	2 332,8	3 616,5	3 476,4	3 047,0	2 074,4	2 914,9
Tirsi - Twaite shad	1 541,0	2 094,4	2 034,7	1 642,0	1 576,2	1 605,3
Trança - Blue spatled bream	31,4	22,3	8,1	13,5	17,2	26,2
Uskumru - Mackerel	119,0	46,6	102,9	61,9	728,2	368,8
Vatoz - Thornback ray	299,0	196,4	168,6	116,1	183,0	82,6
Zargana - Gar fish	204,7	334,4	314,2	267,8	252,8	263,6
Zurna - Saury	191,1	218,8	102,8	131,3	152,9	139,3
Diğer - Other	135,2	419,4	159,0	266,0	307,7	227,2

*2011 yılından itibaren orkinos balığı verisi Tarım ve Orman Bakanlığı'nın idari kayıt verisidir.

**2017 yılından itibaren kılıç balığı verisi Tarım ve Orman Bakanlığı'nın idari kayıt verisidir.

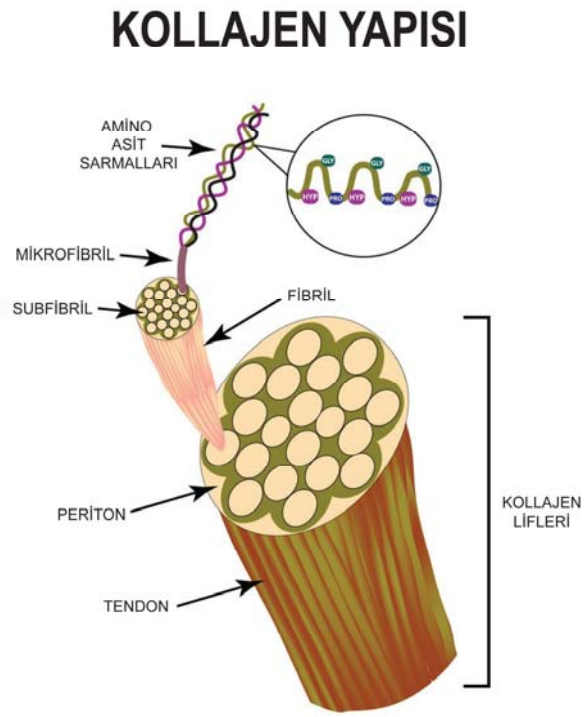
Kaynak: Deniz ürünlerine ait veriler, Aylık Büyük Balıkçı ve Sezonluk Küçük Balıkçı Deniz Ürünleri anketleriyle derlenmektedir.

Günümüzde aşırı avcılık ile balık kaynakları tüketilmekte ve avlanan balığın sadece %50-60'ı, insan tüketiminde kullanılmaktadır. Geriye kalan atık ham materyalin büyük çoğunluğu ya atılmakta ya da ekonomik değerleri düşük balık yağı, balık yemi, evcil hayvan maması ve balık silajı olarak değerlendirilmektedir (Choudry ve Gogoi, 1995; Choudry ve Bublitz, 1996). Günümüzde atık değerlendirmeye yönelik araştırmalar yoğun olarak devam etmekte ve atıklardan faydalanma olanaklarının arttırılmasına yönelik çalışmalar sürdürülmektedir. Yapılan son çalışmalarda, balık atıklarından; kollajen ve jelatin gibi biyoaktif bileşikler elde edilmiştir (Kim ve ark., 2001; Jeong ve ark., 2002; Park ve ark., 2009). Diğer hayvanlarda olduğu gibi balıkların da deri, kemik ve kıkırdak dokuları kollajen ve jelatin bakımından oldukça zengindir (Kim ve ark., 1994; Gomez-Gillen ve ark., 2002).

1.1. Kollajen

Kollajen, tüm hayvanların deri, kemik, tendonlarında ve kıkırdakta önemli miktarlarda bulunan başlıca yapısal proteindir. Kollajen, hayvanlar aleminde çok yaygındır; memeli hayvanları vücut ağırlığının %6'sını, tüm vücut proteinlerinin %30'unu oluşturur (Min ve Oh, 2009). Genellikle sığır, koyun ve domuz gibi bazı omurgalı türlerinin derisi ve kemiklerinden ekstrakte edilmekle birlikte, balık kemikleri, derisi ve yüzgeci kollajen kaynağı olarak oldukça zengindir. Kollajen doğal olarak oluşan bir protein grubudur. Fonksiyonları enzimler gibi globüler proteinlerden farklı olan uzun, lifli yapısal proteinlerden biridir (Adams, 1978; Gallop ve Paz, 1975). Bağ dokusunun ana proteinidir ve birçok hayvandaki toplam protein içeriğinin yaklaşık dörtte birini oluşturur (Bailey, 1968). Kollajen yüksek hidroksiprolin içeriğine sahiptir ve amino asit kompozisyonu tipik bir proteinden oldukça farklıdır. Kollajen bağ dokularda bulunan ana proteindir ve α zincirleri olarak adlandırılan üçlü polipeptit zincirinden oluşmaktadır.

Kollajen lifleri temel olarak tropokollajen adı verilen bir proteinden oluşmaktadır. Tropokollajenin kristalleşmesiyle mikrofibriller, mikrofibrillerin bir araya gelmesi ile kollajen fibrilleri ve kollajen fibrillerinin bir araya gelmesi ile de kollajen lifleri oluşmaktadır (Aykın ve Erbaş, 2016). Kollajenin genel yapısı Şekil1.1'de sunulmuştur.

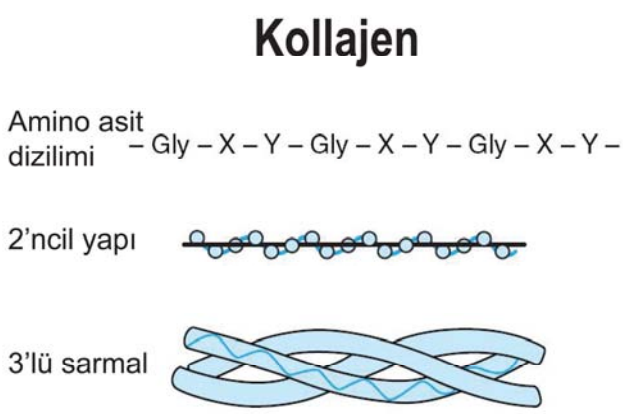


Şekil 1.1. Kollajenin Genel Yapısı

Kollajenin temel yapısı üç adet çoklu prolin zincirinin oluşturduğu üçlü sarmaldır. Bu zincirlerde her üç aminoasitten birinin glisin (GLY) olması üçlü sarmal yapının oluşmasında önemli rol oynar ve kollajen molekülünün en karakteristik özelliğidir. Bu zincirlerin genel aminoasit dizilimi GLY-X-Y şeklindedir.

Bu dizilimde X genellikle prolin (PRO) ve Y genellikle prolinin hidroksillenmiş hali olan hidroksiprolin (HYP)'dir. Ancak X ve Y pozisyonunda, triptofan (TRP) ve sistin (CYS) hariç DNA tarafından kodlanan diğer 16 aminoasitten herhangi biri bulunabilir. Genel olarak kollajenin yapısında TRP ve CYS bulunmaz. Bununla birlikte kükürt içeren amino asitlerden metiyonin (MET) ve yan zinciri halkalı olan aminoasitlerden fenilalanin (PHE), histidin (HIS) ve tirozin (TYR) kollajenin yapısında az miktarda bulunur. Kollajen, oransal olarak prolin ve hidroksiprolin içeriği ile diğer proteinlerden ayrılır. Öyle ki, başka hiçbir proteinde oransal olarak kollajende olduğu kadar prolin ve hidroksiprolin bulunmaz. Kollajenin toplam prolin ve hidroksiprolin oranı kollajenin elde edildiği kaynağa bağlı olarak değişmekle birlikte %20 civarındadır. Benzer şekilde, kollajenin hidroksiprolin içeriği de kollajenin kaynağına bağlı olarak değişir ve %10 civarındadır. Doğrudan hidroksiprolin miktarının tespiti kollajen miktarı hakkında bilgi verir (Boran, 2011).

Primer yapı içerisine düzenli bir şekilde yerleşen Gly-Pro-Hyp dizini kollajenin sekonder yapısından sorumludur. Sekonder yapı, α zincirlerinin her birinin bir turda üç aminoasit bulunduracak şekilde dönmesi ile meydana gelmektedir. Kollajen üçlü sarmal yapısı ise, esas olarak karbonil ve amin grupları arasındaki zincir içi hidrojen bağlarının oluşumu ile meydana gelmektedir (Aykın ve Erbaş, 2016). Kollajenin birincil, ikincil ve üçlü sarmal yapısı Şekil 1.2' de verilmiştir.



Şekil 1.2. Kollajenin Birincil, İkincil ve Üçlü Sarmal Yapısı

Kollajen oluşmasında hidrojen bağları büyük rol oynar. Hidrojen bağları bir α zincirinde bulunan GLY'nin amino grubu ile komşu α zincirinde X pozisyonunda bulunan aminoasidin karboksil grubu arasındadır. α zincirler arasındaki hidrojen bağlarına ek olarak, su ile yapılan hidrojen bağları da kollajenin yapısı açısından önem taşımaktadır.

X ve Y pozisyonunda bulunan aminoasitlerin yan zincirleri kollajen molekülünün merkezine göre dışa dönüktür. Bu yan zincirlerdeki yüklü gruplar (bazik ve asidik aminoasitler) ve aminoasitlerin yan zincirleri arasındaki iyonik etkileşimler kollajen fibrillerinin oluşmasında rol oynar. Ancak, kollajen fibrilleri esasen farklı kollajen moleküllerinde bulunan lisin (LYS)'ler arasında oluşan kovalent bağlar ile oluşur. HYP 'nin de kollajen fibrilleri oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Boran, 2011).

1.2. Kollajen Tipleri

Protein Veri Bankası'na (PDB) göre kollajen cilt, eklemler, kıkırdak, dişler (mineral kristallerine eklenen kollajen), tendon, kemikler ve diğerleri dahil bağ dokularında mevcut olan en bol fibriller proteindir. Memeli kollajeni üzerine geniş çapta araştırmalar mevcuttur ve buna göre; memeli proteinin yaklaşık %25'i doku

ve organların stabilitesine ve yapısal bütünlüğüne katkıda bulunan kollajenlerdir. İnsanda, her biri ayrı genler tarafından kodlanan 46 ayrı polipeptit zincirinden oluşan yaklaşık 29 ayrı kollajen türü tanımlanmıştır. Bunlar arasında tip I'den tip V'e olanlar en yaygın türlerdir. Farklı kollajen tipleri yapıları, zincir bağları ve insan vücudundaki dağılımına göre 8 gruba ayrılmıştır (Raman ve Gopakumar, 2018).

Tip I kollajen başlıca bağ dokular, deri, tendon ve kemikler gibi dokularda en yaygın olan kollajen tipidir. Tip I kollajen α1 ve α2 zincirleri olarak adlandırılan ve farklı amino asitlerden oluşan, ikisi aynı olan üç polipeptit zincirinden oluşur. Tip II kollajen neredeyse sadece kıkırdak dokularda meydana gelir ve α1 (I) ile α1 (II) alt birimlerinin benzer olduğuna inanılır. Tip III kollajen kuvvetle yaşa bağlıdır: çok genç cilt %50'ye kadar içerebilir ancak zaman geçtikçe bu oran %5-10' lara kadar düşebilir. Diğer kollajen türleri sadece çok küçük miktarlarda, temelde bazal membranlar, kornea, kalp kası, akciğerler ve bağırsak mukozası gibi spesifik organlarda bulunur (Schmidt ve ark., 2016).

Kollajen tipleri ve insan vücudundaki dağılımı Çizelge 1.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Kollajen Tipleri ve İnsan Vücudundaki Dağılımları (Raman ve Gopakumar, 2018)

Grup	Tip	Dağılım	Uygulama
Fibril Oluşturma	I	Deri, kemik, tendon, dermis, kornea, ligament	Güdümlü doku rejenerasyonu için membranlar
	II	Kıkırdak, vitrözhümor, omurlar arası disk, akciğer, kornea, deri, kemik	Kıkırdak onarımı, artrit tedavisi
	III	Genişletilebilir bağ doku, deri, damar duvarı, çoğu dokudaki retiküler lifler	Hemostatlar ve doku sızdırmazlık maddeleri
	V	Tip I ile eş dağılım, özellikle korneada	Kornea uygulamaları
	XI	Tip II ile birlikte, vitröz gövde ve kıkırdak	Osteoartrit için mAbs gelişimi
Bazal Membran	IV	Bazal Membran	Hücre kültürünün güçlendirici parçası ve diyabetik nefropati göstergesi
Mikrofibriller	VI	Kas, dermis, plasenta, akciğerler, intervertebral disk, kıkırdak	Kanama durdurucu
Bağlayıcı Fibriller	VII	Dermal-epidermal bağlantı noktası, deri, serviks, oral mukoza	Epidermolizisbülloza tedavisi
Kesilmiş üçlü sarmal yapılı kollajen ilişkili fibrillller (FACIT)	IX	Tip II ile birlikte korneada, vitröz gövde ve kıkırdak	
	XII	Tendon, pericondrium ve bağlar	Erken evrelerde fibrilojenez düzenleyicisi
	XIV	Tip I ile birlikte damar duvarlarında, plasenta, karaciğer, dermis ve akciğerlerde	
	XIX	Birçok doku, insan rabdomiyosarkom	Antianjiyogenik ve antitümoral özellikler
	XX	Kornea epiteli, sternal kıkırdak, embriyonik deri, tendon	

Çizelge 1.2. devamı

	XXI	Birçok doku ve kan damarı duvarı	Kan damarı oluşumu sırasında vasküler ağın matris oluşumuna katkıda bulunmak
Transmembran	XIII	Nöromusküler bağlantı, deri, kıl folikülü, bağırsak, akciğerler	İltihaplanma ve vaskülojenezde rol alır, kemik kütlesini düzenler
	XVII	Epitel, cilt hemidesmosomları	Diş oluşumu
Çoğullama	XV	Bazal membranlara yakın, böbrek, düz kas hücreleri ve pankreas ile ilişkili olan kollajenler	
	XVI	Keratinositler ve fibroblastlardahil birçok doku	İlaç hedefleri ve biyomarkırlar
	XVIII	Karaciğer ve akciğerlerin yakın yapısal homologları	Retina yapısı, nöral tüpün kapanması
Çeşitli	VIII	Endotel	
	X	Hipertrofik kıkırdak	
	XXII	Doku bağlantıları	
	XXIII	Dokularda sınırlı, esas olarak transmembran ve sızdırma formları	
	XXIV	Kornea, kemik gelişimi	
	XXV	Beyin	
	XXVI	Testis, yumurtalık	
	XXVII	Embriyonik kıkırdak	
	XXVIII	Schwann hücreleri çevresindeki bazal membran	

1.3. Kollajen Kaynakları

Kollajen, hayvan ve bitki kaynaklarından elde edilebilir. Hayvan kaynaklarından en yaygın olanı sığır, domuz ve balık gibi sucul canlılardır. Sığır

kollajeni yararlılığı ve biyouyumluluğu nedeni ile geniş uygulama alanına sahiptir. Domuz kollajeni ise otojen nakil işlemine alternatif olarak biyouyumlu bir cerrahi materyal sağlayabilmesi ile önem kazanmaktadır. Tavuk, kanguru kuyruğu, sıçan kuyruğu tendonları, ördek ayakları, at tendonu, timsah kemik ve derisi, kuş ayakları, koyun derisi ve kurbağa derisi kollajen kaynağı olarak kullanılmıştır. Kollajen kaynağı olarak sığır, domuz ve tavuk kaynaklarının kullanımı ucuz ve elde edilmesi kolaydır ancak uzun süreli kullanımdan sonra bu kaynaklardan elde edilen kollajenin alerjenik olabileceği ve osteogenez imperfekta gibi bazı hastalıkları tetikleme eğilimi olduğu bildirilmiştir (Rodriguez ve ark., 2017).

Günümüzde ticari kollajenin çoğu memelilerden elde edilse de bazı sosyo-kültürel sebeplerden dolayı alternatif kaynak arayışına geçilmiştir. Bu sebepler arasında deli dana hastalığı olarak bilinen sığır spongiform encepholopathy (BSE)'nin, dünyada geniş yankı uyandırması ve domuz deri ve kemiklerinden elde edilen kollajenin İslam dininde ve Musevilikte dini kurallara göre yenilmesine izin verilmiş yiyecekler kapsamında yer almaması yer almaktadır. Bu nedenle, memeli kaynaklarının atıklarından elde edilen kollajen ve jelatinin gıda sanayi, kozmetik ve eczacılıkta kullanımlarında sınırlamalara gidilmektedir.

Bir başka doğal kollajen kaynağı ise denizel kollajendir. Denizel kollajende bulaşıcı hastalık riskinin olmadığı, FDA tarafından GRAS olarak (genel olarak güvenli) kabul edildiği ve aynı zamanda ucuz bir üretim kaynağı olduğu bildirilmiştir (Rodriguez ve ark., 2017). Balıktan kollajen üretimi yeni olmayıp 1957 yılından beri gerçekleştirilmektedir (Eastoe, 1957). Bu güne kadar sazan deri ve kemikleri (Duan ve ark., 2009), kanal kedi balığı (Liu ve ark., 2007), sardalya, levrek ve sargos atıkları (Nagai ve ark., 2004), kolyoz, levrek köpek balığı deri ve kemikleri (Nagai ve ark., 2000) ve balon balığı atıklarından (Huang ve ark., 2011) kollajen üretimi gerçekleştirilmiş ve balık atıklarının kollajen kaynağı olarak iyi bir potansiyele sahip oldukları ve fonksiyonel gıda, kozmetik ve farmakolojide uygulama alanı bulabileceği bildirilmiştir. Aynı zamanda balık işleme atıklarından

kollajen elde edilmesi sonucunda ekonomik bir katma değer sağlanırken çevre kirliliğinin önlenmesi açısından da oldukça büyük bir yarar sağlanmaktadır.

1.4. Kollajen Ekstraksiyon Metotları

Kollajen temel olarak kimyasal hidroliz ve enzimatik hidroliz ile elde edilebilir. Kimyasal hidroliz, endüstride daha yaygın olarak kullanılır ancak yüksek besin değeri ve gelişmiş fonksiyonelliğe sahip ürünler gerektiğinde, enzim ilavesini kullanan biyolojik işlemler daha ümit vericidir. Ayrıca enzimatik işlemler daha az atık oluşturur ve işlem süresini azaltabilir ancak daha pahalıdır. Kollajeni ekstrakte etmek için öncelikle işlemi oldukça karmaşık hale getiren, temel olarak lizin ve hidroksilisin kalıntıları, ester bağları ve sakkarit içeren diğer bağları da içeren çok sayıda kovalent intra ve moleküller arası çapraz bağın uzaklaştırılması gerekir. Kollajen ekstrakte edilmeden önce, hammaddenin kaynağına göre değişen bir asit veya alkali işlem kullanılarak ön işlem yapılır. Ön işlem kollajen olmayan maddeleri ayırmak ve daha yüksek verim elde etmek için kullanılır. Yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon metodları daha çok kollajenin asit çözeltileri, nötr tuz çözeltileri ve enzim eklenmiş asidik çözeltilerdeki çözünürlüğüne dayanır (Schmidt ve ark., 2016).

1.4.1. Ön İşlem

Hayvanların bağ dokularında bulunan çapraz bağlı kollajen yapısı nedeni ile kaynar suda bile çok yavaş çözünür, bu nedenle kollajen ekstraksiyonu öncesi çapraz bağları parçalamak için hafif bir kimyasal işlem gerekir. Bu amaçla, seyreltilmiş asitler ve bazlar kullanılır. Kısmi hidroliz ile kollajen zincirleri bozulmadan çapraz bağların parçalanması sağlanır. Asidik uygulama, domuz ve balık derileri gibi daha az iç içe kollajen lifleri olan daha kırılgan hammaddeler için daha uygundur. Alkali işlem, ham materyalin bazik bir çözelti olarak genellikle sodyum ile muamele edilmesinden oluşur. Deride ise ön işlem olarak NaOH kullanılması daha uygudur çünkü NaoH, doku matrisinde kütlenin transfer hızını

artırarak kollajen çıkarılmasını kolaylaştıran önemli bir işleme neden olur (Schmidth ve ark., 2016).

1.4.2. Kimyasal Hidroliz

Tuzda çözünür kollajen ekstraksiyonunda sodyum klorür (NaCl), Tris-HCl (Tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorür), fosfatlar veya sitratlar gibi nötr tuz çözeltileri kullanılır. Tuz konsantrasyonunu kontrol edebilmek için bu süreçte dikkat gereklidir ancak kollajen moleküllerinin çoğunun çapraz bağa sahip olduğu göz önüne alındığında, bu yöntemin kullanımı sınırlıdır.

Asit hidrolizi, asetik asit, sitrik asit ve laktik asit gibi organik asitler ve hidroklorik asit gibi inorganik asitler kullanılarak gerçekleştirilebilir ancak organik asitler inorganik asitlerden daha etkilidir. Organik asitler, çapraz bağlı olmayan kollajenleri çözme yeteneğine sahiptir ayrıca kollajen içindeki zincirler arası çapraz bağların bir kısmının parçalanması ekstraksiyon işlemi sırasında daha yüksek kollajen çözünürlüğüne yol açar. Bu nedenle, asidik çözeltiler, özellikle asetik asit, kollajen akstraksiyonunda yaygın olarak kullanılır.

Asitte çözünür kollajen ekstraksiyonu için, ön işlemden geçmiş materyal genellikle 0,5 M asit çözeltisine eklenir ve ham materyale bağlı olarak 4 ºC ‘de 24-72 saat süre ile bekletilir. Ekstraksiyon aşamasından sonra, kalıntıları sıvı fazda olan kollajenden ayırmak için bir filtreleme ve sonrasında ise Nacl ile çökeltme işlemleri yapılır. Çökelti daha sonra santrifüj ile toplanır, ardından minimum 0.5 M asetik asit çözeltisinde tekrar çözdürülür ve daha sonra 2 gün boyunca 0.1 M asetik asit çözeltisinde diyaliz edilir.

Yapılan çalışmalarda; konsantrasyon, pH, sıcaklık ve işlem süresi gibi işlem değişkenleri kontrol edilerek daha yüksek verim elde etmek için optimum koşullar belirlenmektedir (Schmidt ve ark., 2016).

1.4.3. Enzimatik Hidroliz

Kollajenin enzimatik hidrolizle ekstraksiyonu için asidik ekstraksiyon kalıntısı olabilen ham materyal; pepsin, Alcalase® ve Flavourzyme® gibi seçilmiş enzimleri içeren 0.5 M asetik asit çözeltisine eklenir. Karışım yaklaşık 48 saat boyunca 4 °C' de sürekli olarak karıştırılır ve ardından filtre edilir. Filtrat, asitte çözünür kollajen elde etmekle aynı koşullar altında çökeltme ve diyalize tabi tutulur (Schmidt ve ark., 2016).

1.4.4. Kollajen Ekstraksiyonunda Ultrason Kullanımı

Ultrason, literatürdeki birçok çalışmada işlem süresini kısaltarak ve verimi artırarak kollajen ekstraksiyonunda başarıyla kullanılmıştır. Ultrason, insanın işitme kapasitesinden (16 kHz'den yüksek) daha yüksek frekansta üretilen ses dalgalarının enerjisini kullanan bir işlemdir. Kim ve ark. (2012) *Lateolabrax japonicus* türü derilerinden asitte çözünür kollajen ekstraksiyonunda 0,5 M asetik asit içerisinde 20 kHz'lik bir frekansta kullanılan ultrasonik uygulamanın verimi arttırdığını ve ekstraksiyon süresini azalttığını bildirmişlerdir. Ultrasonun uzun süre kullanılması, yüksek kavitasyon nedeni ile ortamdaki yüksek basınçların yanı sıra yüksek sıcaklıklara da neden olabilir. Ultrasonun uzun süre kullanımı ayrıca hidrojen bağlarını ve van der Waals polipeptit zincirlerindeki bağları kırabilir ve protein/enzim denatürasyonuna neden olur (Schmidt ve ark., 2016).

1.5. Kollajenin Fizikokimyasal Özellikleri

Amino asit bileşimi ve termal stabilite, kollajenin fizikokimyasal özelliklerine katkıda bulunan ana faktörlerdir. Bu özellikler balık türleri arasında değişkenlik gösterir. Kollajenin amino asit bileşimi termal stabilitede önemli bir rol oynar (Berisio ve ark., 2004). Kollajenin fizikokimyasal özellikleri belirlenirken kullanılan diğer yöntemler ise ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi (UV-Vis), fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), X-Işını kırınım difraktometresi (XRD) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM)'dur.

1.5.1. Aminoasit Kompozisyonu

Aminoasit bileşimi kollajenin molekül yapısını etkilediğinden balık ve memeli kollajenlerinde aminoasit içerikleri açısından az da olsa farklılıklar vardır (Zhang ve ark, 2011). Farklı balık türleri de aminoasit bileşenleri açısından kendi içinde oldukça farklılık gösterir. Özellikle, prolin ve hidroksiprolini ifade eden imino asit içerikleri açısından türler arasında önemli ölçüde değişkenlik mevcuttur (Duan ve ark., 2009). Huang ve ark. (2011) imino asit (prolin ve hidroksiprolin) içeriğinin kollajenin yapısal bütünlüğü için önemli olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda glisin, kollajende en bol bulunan aminoasit olarak ifade edilir. Bunun nedeni glisinin, N terminusundan ilk 14 amino asit kalıntısı ve C terminusundan ilk 10 amino asit kalıntısı hariç tüm kollajen peptit zincirinin her üç kalıntısında ortaya çıkması ve yaklaşık toplam amino asit kalıntısının üçte birini oluşturmasıdır (Ali ve ark., 2018; Kittiphattanabawon ve ark., 2015).

1.5.2. Termal Stabilite (Denatürasyon Sıcaklığı)

Termal stabilite, moleküllerin yüksek sıcaklıklarda kararlı olma yeteneğidir. Kollajen için termal stabilite denatürasyon sıcaklığı olarak (T_d) tanımlanır (Nagai ve ark., 2010). Tüm balık türlerinde ve memelilerde denatürasyon sıcaklığı, yaşam çevreleri ve vücut sıcaklığına bağlı olarak değişiklik gösterir. Ayrıca denatürasyon sıcaklığının farklılık göstermesinde iminoasit içeriği, iminoasitlerin çapraz bağlanması ve prolinin hidroksilasyon derecesinin etkisi olduğu bildirilmiştir (Kittiphattanabawon ve ark., 2005). Diferansiyel taramalı kalorimetrenin (DSC), denatürasyon gerçekleştiğinde önemli derecede ısı emilimi olması nedeni ile kollajenin termal denatürasyonunu incelemek için en iyi tekniklerden biri olduğu kanıtlanmıştır (Liu ve ark. 2014a).

1.5.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR spektroskopisi, proteinlerin ikincil yapısını belirlemek için yararlı olabilecek moleküler yapı hakkında benzersiz bilgi sağlayabilir (Petibois ve ark.,

2006). Fonksiyonel grupların gözlemlenmesi ve proteinlerin ikincil yapılarının belirlenmesi amacı ile FTIR analizleri sıklıkla yapılmaktadır. Kollajen için karakteristik absorpsiyon pikleri Amid A, Amid B, Amid I, Amid II ve Amid III' dür. Amid A bandı genellikle N-H gerilme titreşimi ile ilgilidir. Serbest bir N-H gerilme titreşimi 3400-3440 cm^{-1} aralığında meydana gelir. Bir peptidin N-H grubu bir hidrojen bağı içerdiğinde, band görünümü genellikle 3.300 cm^{-1} gibi düşük dalga boylarına kaydırılır (Doyle ve ark., 1975). Amid B bandı, alkenil C-H' nin asimetrik gerilme titreşimini ve ayrıca $NH3^{+}$'ü temsil etmektedir ve 2850-2950 cm^{-1} dalga boyunda gözlenmiştir (Lee ve ark., 2016). Amid I, II ve III bölgelerinin bir polipeptitin şekli ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir. Polipeptitlerdeki karbonil gruplarının gerilme titreşimleriyle ilişkili olan 1600-1700 cm^{-1} dalga boyunda bulunan Amid I bandı, bir proteinin ikincil yapısını belirlemede en önemli faktör olarak kabul edilmektedir (Pati ve ark., 2010; Liu ve ark., 2014b). 1550-1600 cm^{-1} aralığında normal bir absorpsiyon değerine sahip olan Amid II bandı, esas olarak C-N gerilme titreşimleriyle birleştirilmiş N-H bağı ile ilişkilidir ve daha düşük dalga boylarına kayma, hidrojen bağı oluşumunu göstermektedir. Amid III bandı C-N gerilme titreşimi ile N-H bağı ile ilgilidir ve kollajenin üçlü sarmal yapısını göstermektedir (Woo ve ark., 2008).

1.5.4. Ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi (UV-Vis)

Ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis) absorpsiyon spektroskopisi bir ışın demetinin bir örnekten geçtikten veya bir örnek tarafından yansıtıldıktan sonra ışının azalmasının ölçülmesidir. Işının şiddetinin azalması absorpsiyonun arttığını gösterir. Örneğin derişimi, belirli bir dalga boyundaki absorpsiyonunu ölçerek bulunur. UV-Vis spektroskopisi genellikle çözeltideki moleküller veya inorganik iyon ve komplekslerin ölçümünde kullanılır. Bir başka amaçla Uv-Visible spektrofotometre 190-900 nanometre arasındaki renkli anorganik kompleksler ve organik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif belirlenmesinde kullanılır. Genellikle protein molekülleri, UV ışığını absorbe eden 3 farklı bölgeye sahiptir, bunlar: (1)

250 ~ 280 nm aralığında, aromatik seri kalıntısı absorpsiyonu; (2) 210-250 nm aralığında, bazı hidrojen bağı ya da diğer yapı ve sarmalların etkileşimi ile aromatik ve diğer kalıntıların absorpsiyonu gibi birçok faktörden dolayı absorpsiyon ; (3) 210 nm'nin altındaki peptit bağı ve birçok yapı faktörü nedeniyle absorpsiyondur (Li-li ve ark., 2011). Kollajeni karakterize etmenin temel ve basit yolunun örneği 200-400 nm dalga boyu aralığında taramanın olduğu ve kollajenin maksimum absorbansı 230 nm' de verdiği bildirilmiştir (Piez, 1965).

1.5.5. X-Işını Kırınım Difraktometresi (XRD)

X-ışını kırınım yöntemi (XRD), her bir kristalin fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak, X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanmaktadır. XRD genellikle polimer kristal yapılarını analiz etmek için kullanılır. X-ışını kristalimsi parçacıkları karşıladığında kırınım meydana gelir ve kırılma tepe noktasının konumu ve yoğunluğu kristallerin yapısal özelliklerini yansıtabilir (Duan ve ark., 2018).

1.5.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu elektronları kullanarak numune yüzeyinden yüksek çözünürlüklü görüntü almaya yarayan sistemdir ve numune yüzeyinin üç boyutlu görüntülerinin elde edilmesinde kullanılmaktadır.

1.6. Kollajen Kullanım Alanları

Kollajen; mükemmel bir biyouyumlu materyal olması, zayıf antijenisite göstermesi, yüksek düzeyde doğrudan hücreye bağlanabilme özelliği, yüksek derecede biyobozunur olması gibi özellikleri ile tıp, diş hekimliği, ilaç sanayi, gıda endüstrisi, fotoğrafçılık, kozmetik sanayi ve biyomedikal gibi birçok alanda yaygın uygulamalara sahiptir. Gelişen teknoloji ve artan araştırmalar ile atık olabilecek biyolojik materyalin değerlendirilmesi ve yeni ürünlerin eldesi yoluna gidilmektedir.

Kollajen bazlı membranlar lokal ilaç taşıyıcı sistemlerde başarıyla test edilmiştir. Tatlı su balığı (*Labeo rohita*) hava kesesi, deri ve pulları kullanılarak geliştirilen kollajen membranlar, ilaç taşıyıcı sistemlerde olanak gösteren parçacıklar, süngerler ve tabakalar geliştirmek için kullanılır. Yaygın olarak kullanılan bir başka kollajen bazlı ilaç taşıyıcı sistem, kontrollü ilaç salımı sergileyen kollajen liflerine emprenye edilmiş tetrasiklin liflerinden oluşan emilebilir Periodontal Plus AB ™ (EnColl) 'dür (Raman ve Gopakumar, 2018).

Kollajenin hem laboratuar hem de canlı ortamda iyi doku toleransı göstermesi, yapay böbreklerde diyaliz zarı, yapay kornea zarı, deri ve kan damarlarında, cerrahide hemostatik ajan olarak birçok biyomedikal uygulamada kullanım olanağı bulmuştur. Tıbbi alandaki gelişmeler, elastikiyet ve onarım gibi özellikleri ile kollajenin diş hekimliğinde de geniş bir uygulama alanı bulabileceği anlayışına yol açmıştır. Diş hekimliğinde kollajen, membran, kemik grefti materyali, ilaç dağıtım aracı (lokal) ve hemostatik ajan olarak kullanılır. Kollajen dolgu materyali olarak kanamayı kontrol etmek, oral yaraları kaplama, greft ve ekstraksiyon bölgelerinin kapatılması ve iyileşmeyi teşvik etmek için kullanılırken; membran olarak periodontal ve implant tedavisinde epitelyal göçü ve kusurlu bölgedeki hücrelerin rejenerasyonunu ve repopülasyonunu önlemek için kullanılır (Raman ve Gopakumar, 2018).

Kollajen, bol bulunması, biyolojik olarak parçalanabilmesi, hücreler arası matrikste bulunan bileşenlerle benzer özellik göstermesi, cilt, tendon, kemik, kıkırdak, kan damarları ve bağ dokuları desteklemesi gibi özelliklere sahip olması ile birlikte doku mühendisliğinde temel oluşturma ve taşıyıcı olarak en umut verici doğal biyomateryaldir (Raman ve Gopakumar, 2018). Biyomateryal olarak kollajenin avantajları ve dezavantajları Çizelge 1.4’ te verilmiştir.

Çizelge 1.3. Biyomateryal Olarak Kollajenin Avantajları ve Dezavantajları (Raman ve Gopakumar, 2018)

Avantajlar	*Dezavantajlar*
Bol bulunabilirlik	Saf tip I kollajenin yüksek maliyeti
Anitejik olmama	**İzole formlarda değişkenlik (çapraz bağlar, yoğunluk, lif boyutu, eser kirlilikler)**
Biyobozunur, biyolojik olarak yeniden emilebilir, toksik olmama, biyouyumluluk	Hidrofilik doğa nedeni ile şişme ve hızlı salınım
Biyoaktif bileşikler ile uyum sağlayabilme	**Hidrolitik bozunma ile karşılaştırıldığında enzimatik bozunma hızında değişkenlik**
Yüksek gerilme mukavemeti ve minimum ekspresyon ile biyolojik plastik gibi davranabilme	Kullanımının karmaşık olması
Hemostatik	**Yan etkiler**
Farklı formlarda formüle edilmesi ve fonksiyonel grupları kullanılarak kolayca değiştirilebilir olması	
Sentetik polimerlerle uyumluluk	

Kollajen, sağlıklı gıda bileşeni olarak oldukça talep görmekte ve çeşitli yiyecek ve içecek ürünleri ile kullanılabilmektedir. Kollajen ve fraksiyonlarının nem absorpsiyon özellikleri, kollajenin değerli bir besleyici lif ve protein kaynağı olarak kabul edilmesine katkı sağlamaktadır. İnsanlar yaş aldıkça kollajen sentezi azalır, dokular incelir, zayıflar ve esnekliğini kaybeder; bu takviyeler cildi, saçları, tırnakları ve vücut dokularını korumaya yardımcı olur. Kollajen takviyeleri, sıvılar, haplar veya fonksiyonel gıdalar şeklinde sunulan besleyici kozmetikler şeklinde olabilir. Kollajen takviyeleri aynı zamanda sporcu beslenmesinde yüksek talep görmektedir. Kollajen, yağsız kas kazanımını arttırır, hasarlı eklem bölgelerini onarır ve egzersiz sonrası yeni kas büyümesinde önemli bir amino asit olan kreatin oluşumu ile kardiyovasküler performansların iyileştirilmesini sağlar. Oral kollajen takviyelerinin aynı zamanda eklem ağrısı osteoartriti ve romatoid artriti önlemede bir potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Raman ve Gopakumar, 2018).

Küresel pazarda diğer bir eğilim kollajen katkılı içeceklerdir. Kollajen katkılı içecekler vücuttaki kollajen oluşturma mekanizmasını uyarır, vücut dokularını destekler ve cilt kırışıklıkları ile sarkmaları azaltır. Kollajen, maya ve

diğer çözünmeyen partiküllerin agregasyonu ile bulanık alkollü içeceklerde arıtma maddesi olarak da kullanılabilir (Raman ve Gopakumar, 2018).

Kollajen; film veya kaplama materyali olarak, antioksidanlar, antimikrobiyaller, renk ve tat pigmentleri gibi aktif maddelerin dağıtımında taşıyıcı olarak işlev görebilir. Balık kollajen liflerinin işlenmiş et endüstrisinde biberiye özütünün taşıyıcısı olarak kullanıldığı ve bunların antioksidan kapasitesini arttırıcı özellikteki ürünler olduğu bildirilmiştir. Kollajen esaslı yenilebilir filmler, yağ oksidasyonunu, renk bozulmasını, mikrobiyal çoğalmayı önlediği ve duyusal özellikleri koruduğu için plastik kaplamaların yerini alabilecek konumdadır (Raman ve Gopakumar, 2018).

1.7. Çalışmanın Amacı

Mevcut çalışmada öncelikle, oldukça geniş kullanım alanına sahip olan kollajen biyoaktif bileşeninin balık atıklarından eldesi hedeflenmiştir. Ülkemizde değerlendirilmeden atık olarak ayrılan balık deri ve kemiklerinin çok değerli bir biyoaktif bileşene dönüştürülmesi ile ekonomiye katkı sağlanmış olacaktır. Ayrıca helal ürün kapsamında yer alan su ürünleri ve yan ürünlerinden elde edilen kollajen, bu pazardaki fırsatları fark eden büyük medikal, gıda ve kozmetik firmaları tarafından diğer memeli kollajenine göre tercih edilecektir.

Çalışmanın ikinci önemli aşamasında ise farklı balık türlerinin deri ve kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinin geniş kapsamlı karakterizasyonu hedeflenmiştir. Bu amaçla da verim, nem, ham kül ve protein tayini analizleri, amino asit analizi, Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC), Ultraviyole ve Görünür Işık Absorpsiyon Spektroskopisi (UV-Vis), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), X-Işını Kırınım Difraktometresi (XRD) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ölçümlerinin yapılması planlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Nagai ve ark. (2002) kalın olması ve toksik özellik göstermemesi sebebi ile Japonya'da ticari öneme sahip olan balon balığı (*Takifugu rupripes*) derisinden kollajen elde etmişlerdir. Kollajen karakterizasyonunda SDS-PAGE, alt birim kompozisyonu, peptit haritası, denatürasyon sıcaklığı ve aminoasit kompozisyonu analizleri yapılmıştır. Kollajen veriminin kuru ağırlık baz alındığında, peptinde çözünen kollajenin (%44,70) asitte çözünen kollajene (%10,70) göre daha yüksek verimde olduğu sonucuna varmışlardır. Çalışmada, asitte çözünür kollajen ve peptinde çözünür kollajenin elektroforez modellerinin benzer olduğu, peptinde çözünür kollajen denatürasyon sıcaklığının 28ºC ile domuz derisi kollajeninden yaklaşık 9ºC düşük olduğu fakat diğer deniz canlıları ile benzerlik gösterdiği belirtilmiştir.

Duan ve ark. (2009)'nın yaptıkları çalışmada sazan (*Cyprinus carpio*) balığının deri, pul ve kemiklerinden asitte çözünebilir kollajen elde etmişlerdir. Asitte çözünür kollajenin verimi deri, pul ve kemikte sırasıyla %41,30, %1,35 ve %1,06 olarak bulunmuştur. SDS-PAGE sonuçlarına göre elde edilen tüm kollajen örnekleri iki α1 ve bir α2 zincirlerinden oluşan tip1 kollajendir. α2 zinciri moleküler ağırlığı 116 kDa olarak bulunmuştur. Asitte çözünür kollajen örneklerinin amino asit kompozisyonu ve peptit haritasının diğer türler ile benzer olduğu, morina derisinden elde edilen asitte çözünür kollajenden ise farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Asitte çözünür kollajenin denatürasyon sıcaklığı yaklaşık olarak 28ºC olarak bulunmuştur. Araştırmacılar sazan deri, pul ve kemiklerinden elde edilen kollajenin çeşitli alanlarda kullanılabilecek alternatif bir kaynak olabileceğini bildirmişlerdir.

Kanal kedi balığı (*Ictalurus punctatus*) ile yapılan bir çalışmada, ekstraksiyon koşullarının optimize edilmesi, maksimum verim için ekstraksiyon metotlarının modifiye edilmesi ve farklı ekstraksiyon yöntemleri ile kollajen eldesi için sistematik yaklaşımların kullanılması amaçlanmıştır (Tan ve Chang, 2018).

Kanal kedi balığı derilerinden kollajen eldesinde; asit, homojenizasyon destekli ve pepsin destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır. Üç farklı yöntemle ekstrakte edilen kollajen örneklerinde besin bileşenleri analizi, kinetik analiz, SDS-PAGE, pH'ın çözünmedeki etkisi, NaCl'nin çözünmedeki etkisi, zeta potansiyeli, dairesel dikroizm, diferansiyel tarama kalorimetresi ve jel gücü analizleri yapılmıştır. Araştırmacılar protein geri dönüşüm oranının en yüksek 23,60 KU/g pepsin içeren pH 2,4 HCl ile ekstrakte edilmiş kıyılmış derilerde olduğunu bildirmişlerdir (%64,19). Çalışmadaki SDS-PAGE sonuçlarına göre farklı metotlarla ekstrakte edilen kollajen örneklerinde moleküler ağırlıklarının benzer olmasına rağmen protein modellerinin farklılık gösterdiği belirtilmiştir.

Duan ve ark. (2018) kuzey yılanbaşı balığı (*Channa argus*) derilerinden asitte ve pepsinde çözünür kollajen ekstrakte etmişler ve karakterizasyonu üzerine çalışmışlardır. Asitte çözünür kollajen verimi %28 ve pepsinde çözünür kollajen verimi ise %16,80 olarak bulunmuştur. Asitte çözünür kollajen veriminin pepsinde çözünür kollajen veriminden yüksek olmasının sebebinin kollajen moleküllerinin yüksek çapraz bağlı telopeptit bölgelerine sahip olmamasından kaynaklandığını bildirmişlerdir. SDS-PAGE modeli ile ekstrakte edilen kollajenlerin tip I kollajen oldukları tespit edilmiştir. Denatürasyon sıcaklığı yaklaşık 27ºC olarak bulunmuştur. Çalışmadaki kollajen örneklerinin aminoasit profillerinin her ikisinde de aynı olduğunu ve toplam amino asitin yaklaşık 1/3'ünü glisinin oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan farklı bir araştırmada mürekkep balığı (*Sepia lycidas*) derisinden kollajen ekstraksiyonu ve karakterizasyonu üzerine çalışılmıştır (Nagai ve ark., 2001). Araştırmacılar, liyofilize kuru ağırlık baz alındığında asitte çözünür kollajen veriminin çok düşük olduğunu bildirmişlerdir. Asitte çözünür kollajen verimini yaklaşık %2 ve pepsinde çözünür kollajen verimini ise yaklaşık %35 olarak bulmuşlardır. SDS-PAGE sonuçlarına göre, asitte çözünür kollajen örneklerinin yalnızca α1 bandı gösterirken pepsinde çözünür kollajen örneklerinin α1 ve α2 bandı gösterdiği bildirilmiştir. Peptit haritası sonuçlarına göre ise elektroforetik

modellerin ekstrakte edilen kollajen örnekleri ile karşılaştırmada kullanılan domuz deri örneklerinde benzer özellikte olduğu bildirilmiştir. Denatürasyon sıcaklığı aynı koşullar altında ölçülmüş, pepsinde çözünür kollajen örneklerinin denatürasyon sıcaklığı 27ºC ve domuz deri kollajeninin denatürasyon sıcaklığı 37ºC olarak bulunmuştur.

Malezya kedi balığı (*Hybrid clarias* sp.) derisinden kollajen ekstraksiyonu ve karakterizasyonun yapıldığı bir çalışmada bölgesel marketten sağlanan balıkların derisi küçük parçalara ayrılarak asit ve pepsinde çözünür kollajenlerin eldesi yapılmıştır. Yaş ağırlık üzerinden asit ve pepsin ekstraksiyonlarında verim sırasıyla %18,11 ve 26,69 olarak bulunmuştur. Ayrıca HPLC ile gerçekleştirilen amino asit analizleri sonucunda toplam 1000 amino asit kalıntısı arasından ASC'de 207, PSC'de ise 223 birim amino asit kalıntısına rastlanmıştır (Kiew ve Mashitah, 2013).

Asya kedi balığı (*Pangasius hypophthalmus*) derilerinden asitte çözülebilir saf kollajen eldesinin amaçlandığı bir çalışmada, asetik asit ile diyaliz, liyofilizasyon ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyon tekniklerinin kullanıldığı bildirilmiştir (Huong ve ark., 2014). Diyaliz yöntemi ile kollajen örneklerinde bulunan tuz oranı %3,74'ten %0,25'e düşürülmüştür. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyon yöntemi ile kollajen içeriğindeki yağ oranı ise %4,07' den %0,33' e düşürülmüştür. Araştırmacılar ekstrakte edilen kollajenin renksiz, kokusuz, yüksek moleküler ağırlığa sahip olduğunu ve kozmetik, farmasötik ile gıda uygulamalarına uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Ali ve ark. (2018) altın sazan balığı *(Probarbus jullieni)* derilerinden asitte ve pepsinde çözünür kollajen elde etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Her iki tip kollajen de tip I kollajen olarak karakterize edilmiştir. Amino asit içeriği, asitte çözünür kollajen ve pepsinde çözünür kollajende 1000 amino asit kalıntısı içerisinde sırasıyla 197 ve 199 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar toplam amino asitin yaklaşık olarak 1/3' ünü glisinin oluşturduğunu bildirmişlerdir. FTIR ve CD spektra sonuçları her iki örnekte de neredeyse benzer bulunmuştur.

Araştırmacılar her iki kollajen örneğinin asitik pH (1-3)'da yüksek çözünebilirlik gösterdiğini böylece alternatif bir termal kararlı kollajen kaynağı olabileceğini ifade etmişlerdir.

Joukar ve ark. (2014) uzun kuyruklu orkinos *(Thunnus tonggo)* deri ve yüzgeçlerinden kollajen ekstrakte etmişler, besin bileşenleri, amino asit içeriği ile elektroforez sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Nem içeriği açısından her iki örnek arasında önemli farklılık bulunmadığını, protein içeriğinin en yüksek deri örneklerinde olduğunu bildirmişlerdir. Amino asit açısından örnekler karşılaştırıldığında baskın amino asit glisin olarak bulunmuş, hidroksiprolin içeriğinin deride yüzgeçten daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Deri ve yüzgeç kollajeni elektroforez modelleri arasında herhangi bir farklılığın bulunmadığı, her iki kollajen örneğinin α1 ve α2 olmak üzere en az iki zincir içerdikleri bildirilmiştir.

Aberoumand (2011) İranda'ki bazı balık türü derilerinden kollajen izolasyonu üzerine çalışmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki asit ve sodyum hidroksitte kollajen ektraksiyonu yapılmıştır. Boğa köpek balığı ve palamut kolyozu kollajen verimi karşılaştırıldığında palamut kolyozunda verim daha yüksek bulunmuştur. Tavşan balığı ve pasifik kral uskumru kollajen verimi karşılaştırıldığında ise kollajen verimi tavşan balığında daha yüksek bulunmuştur. Verimin yüksek olması örnek kalitesine ve türlerdeki kollajen içeriğinin yüksek olmasına bağlanmıştır. Diğer türler ile karşılaştırıldığında en yüksek verim palamut kolyozu derisinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde bulunmuştur. Yazar kollajenin gelecekteki biyomateryal uygulamaları ve özel karakteristiğinden dolayı yüksek değerde bir materyal olduğunu ifade etmiştir. Çalışmada kullanılan balık türlerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin de ekonomik açıdan uygun olduğunu bildirmiştir.

Basra körfezinin ana ve ekonomik türü olan *Scomberomorus guttatus* derilerinden kollajen eldesi ve karakterizasyonun yapıldığı çalışmada asitte çözülür kollajen elde edilmiştir (Gharagheshlagh ve ark., 2018). Kollajen karakterizasyonu

SDS-PAGE, FTIR ve UV spektrofotometri ile yapılmıştır. SDS-PAGE verileri ve amino asit bileşenlerine göre kollajen örekleri tip I kollajen sınıfı olarak değerlendirilmiştir. Kollajeni, α1 ve α2 içeren iki tip α zinciri ve β bileşenlerinin oluşturduğu bildirilmiştir. FTIR sonuçları kollajenin sarmal düzene sahip olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar kuru ağırlık baz alındığında asitte çözünür kollajen verimini %14,5 olarak hesaplamışlardır. Her 706 amino asit kalıntısında prolin 86,8 ve glisin 188,6 olarak bulunduğu bildirilmiştir.

Tanaka ve ark. (2018) mavi yüzgeçli orkinos *(Thunnus orientalis)* derilerinden asitte çözünür kollajen elde etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Kollajen örneklerinin iki α ve bir β zincirinden oluştuğu, prolin ve hidroksiprolin yönünden zengin olmasına rağmen denatürasyon sıcaklığının düşük olduğu bildirilmiştir. Mavi yüzgeçli orkinos derilerinden elde edilen kollajen örnekleri ile sığır kollajeni FTIR sonuçları açısından benzer bulunmuştur. UV-Vis sonuçlarına göre kollajen örnekleri 190-590 nm' de görüntülenmiş, en büyük pik 238 nm' de gözlemlenmiştir. Araştırmacılar %27,58 ile glisinin en baskın amino asit olduğu bildirmişlerdir.

Güney kedi balığı (*Silurus meridionalis*) derilerinden iyileştirilmiş ön işlem metotları sayesinde ekstrakte edilen kollajenin verimi ve saflaştırılması üzerine yapılan bir çalışmada yüksek saflık ve verimde ürün elde edildiği bildirilmiştir (Xu ve ark., 2017). Araştırmacılar çoklu yağ alma yöntemleri ile balık derilerinden yağları etkin bir şekilde uzaklaştırmışlar ve maksimum yağ alma oranını ise %90,24 olarak bulmuşlardır. Elektroforetik sonuçlarına göre, hidroksiprolin içeriği ve ekstraksiyon oran analizi, %0,5 hidrojen peroksit solüsyonu içerisinde bekletilen derilerden elde edilen kollajenin yüksek saflık ve yüksek verimde olduğunu ortaya koymuştur. Amino asit analizi, UV spektrum, FTIR, ve termal stabilite analizleri sonucu elde çalışmada elde edilen kollajen örnekleri Tip I kollajen olarak değerlendirilmiştir.

Nibea japonica türü derileri ile yapılan çalışmada asitte ve pepsinde çözünür kollajen ekstrakte edilmiş, örneklerin fizikokimyasal özellikleri ile

biyouyumlulukları değerlendirilmiştir (Tang ve ark., 2018). Prolin hidroksilasyon oranı ASC ve PSC' de sırasıyla %38,1 ve %39,3; her iki örnekte de denatürasyon sıcaklığı yaklaşık olarak 34,5 ºC olarak bulunmuştur. Araştırmacılar SDS-PAGE ve FTIR sonuçlarına örneklerin tip I kollajen olduğunu, ek olarak ekstrakte edilen kollajenin gliserol ile karşılaştırıldığında nem absorsiyonu ve koruma özelliğinin daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Muyonga ve ark. (2004) genç ve yetişkin nil levreği *(Lates niloticus)* derilerinden 0,5 M asetik asit ve çökeltmede 0,9 M NaCl kullanarak asitte çözünür kollajen ekstrakte etmişlerdir. Kuru ağırlık baz alındığında genç ve yetişkin nil levreği derilerinde asitte çözünür kollajen verimi sırasıyla %63,1 ve %58,7 olarak bulunmuştur. SDS-PAGE sonuçlarına göre kollajen örneklerinin iki α bileşeninden oluştuğu bildirilmiştir. Her iki örnekte de denatürasyon sıcaklığı 36ºC olarak bulunmuş ve sonucun birçok balık türünden daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Sonuç olarak, genç ve yetişkin nil levreği derilerinden elde edilen kollajen örneklerinde yaşa bağlı olarak belirgin farklılıkların olmadığı bildirilmiştir.

Joukar ve ark. (2014) uzun kuyruklu orkinos (*Thunnus tonggol*) deri, kemik ve yüzgeçlerinden kollajen elde etmişler ve özelliklerini karşılaştırmışlardır. Nem ve protein içeriği en yüksek deride bulunmuş, kemik ve yüzgeç ile karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bildirilmiştir. Nem oranı açısından örnekler arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır. Her üç kollajen örneği amino asit bileşenlerinde baskın amino asitin glisin olduğu bildirilmiştir. Hidroksiprolin amino asit oranı deride kemik ve yüzgeçten daha yüksek bulunmuştur. SDS-PAGE sonuçlarına göre örnekler arasında önemli farklılık bulunmamış ve tüm örneklerin α1 ve α2 içeren iki tip α zincirinden oluştukları bildirilmiştir.

Yapılan farklı bir çalışmada, morina *(Gadus macrocephaius)* derisinden asitte ve pepsinde çözünür kollajen ekstrakte edilmiş, örneklerin fiziksel ve kimyasal özellikleri karşılaştırılmıştır (Shu ve ark., 2017). Kollajen verimi ASC ve PSC' de sırasıyla %37,36 ve %55,96 olarak bulunmuştur. Elektroforez sonuçlarına

göre her iki örneğin de tip I kollajen olarak karakterize edilen iki farklı α zincirinden oluştuğu bildirilmiştir. Araştırmacılar amino asit analizleri sonucunda toplam 1000 amino asit kalıntısı arasından ASC'de 216,1, PSC'de ise 190,6 birim amino asit kalıntısı olduğunu bildirmişlerdir. FTIR sonuçları her iki örnekte de benzer bulunmuştur. Termal denatürasyon sıcaklık ölçümü viskozimetre ile yapılmış, ASC ve PSC' de sırasıyla 26,8 ºC ve 25,6 ºC olarak bulunmuştur.

Alizadeh Nodeh ve ark. (2014) doku mühendisliği uygulamalarında önemli bir biyomateryal olması amacı ile *Parastromateus niger* derisinden kollajen elde etmişler ve saflaştırmışlardır. Asitte çözünür kollajen; 4 ºC' de 5 gün süre ile asidik yöntemler ile izole edilmiş, sonrasında NaCl ile çöktürülmüş ve 0,1 M asetik asit solüsyonu ve distile su ile saflaştırılmıştır. SDS-PAGE sonuçlarına göre, bu türden elde edilen asitte çözünür kollajen örneklerinin α1 ve α2 içeren iki tip α zincirinden oluştuğu ve hetrotrimer yapıya sahip olduğu bildirilmiştir. UV-spektrum sonuçlarına göre araştırmacılar siyah pomfret derisinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin absorbansını 220 nm olarak bulmuşlardır. Siyah pomfret derisinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin alternatif bir kollajen kaynağı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Atlantik morinası derilerinden elde edilen kollajen örneklerinin optimum koşullarda kokusuz ve renksiz kollajen üretiminin amaçlandığı çalışmada çözgen ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır (Sadowska ve ark., 2003). Çözgen olarak kullanılan asetik asit ve sitrik asit oranları sırasıyla 1:6 ve 1:4 olarak bildirilmiştir. Tüm deriler 24 saat süre ile ekstraksiyona bırakılmış ve kollajenin yaklaşık %20' si ekstrakte edilmiştir. Araştırmacılar kokusuz kollajen elde etmek isterken derileri birçok aşamadan geçirmişler ve bunun sonucunda verimde %25' lik bir kayıp olduğunu bildirmişlerdir. Kokusuz kollajen ekstraksiyonunda kullanılan yöntemin yeterince efektif olmadığı ifade edilmiştir.

Lee ve ark. (2016) deniz ve tatlı su gökkuşağı alabalık derilerinden kollajen ekstrakte etmişler ve örneklerin amino asit kompozisyonu, SDS-PAGE, FTIR, termal denatürasyon sıcaklığı sonuçlarını değerlendirimişlerdir. Her iki kollajen

örneğinde baskın amino asit glisin olarak bulunmuş, yüksek miktarda alanin, prolin ve hidroksiprolin içerdikleri bildirilmiştir. Araştırmacılar kollajen örneklerinin ağırlıklı olarak α1, α2 ve β zincirlerinden oluştuğunu, FTIR sonuçlarının benzer olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak çalışma bulgularında habitatın, gökkuşağı alabalıklarının amino asit içeriği ve moleküler ağırlıklarına etki etmediği ifade edilmiştir.

Memeli kollajenine alternatif olarak yapılan bir çalışmada *Lates calcarifer* ve *Pagrus auratus* derilerinden kollajen ekstrakte edilmiş, örneklerin biyokimyasal ve termo mekanik analizleri yapılmıştır (Anand ve ark., 2013). Ekstrakte edilen örnekler asitte çözünür kollajen olup Asya deniz levreği ile gümüş çipura derilerinde kollajen verimi sırasıyla yaklaşık %8-7,5 olarak bulunmuştur. Elektroforetik ve kromotografi sonuçlarına göre örneklerin α1, α2, α 3 ve β zincirlerinden oluştuğu, tip I sığır deri kollajeni ile eş özeliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Her iki örnekte de baskın amino asit glisin olarak bulunmuştur. UV-VIS ölçümleri sonucu, maksimum absorbansın Asya deniz levreği deri kollajen örneklerinde 236 nm ve gümüş çipura deri kollajen örneklerinde ise 239 nm olarak bulunduğu bildirilmiştir.

Kittiphattanabawon ve ark. (2015) *Chitala ornata* derilerinden asitte ve pepsinde çözünür kollajen ekstrakte etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Kuru ağırlık baz alındığında asitte çözünür kollajen verimi %27,64 ve pepsinde çözünür kollajen verimi %44,63 olarak bulunmuştur. Her iki kollajen örneğinde baskın aminoasitin glisin olduğu, örneklerin yüksek miktarda prolin, hidroksiprolin ve glutamin içerdikleri bildirilmiştir. Kollajen örnekleri tip I olarak karakterize edilmiştir. Termal geçiş sıcaklığı asitte çözünür kollajen örneğinde 36,28ºC ve pepsinde çözünür kollajen örneğinde ise 35,23ºC olarak bulunmuştur. İzoelektrik noktasında her iki örnek arasında farklılık saptanmamıştır. İleriki uygulamalar için elde edilen bu kollajenin başarılı bir ekstrakt olabilceği bildirilmiştir.

Karabalık *(Clarias gariepinus),* salmon *(Salmo salar)* ve Atlantik morinası *(Gadus morhua)* derilerinden asitte çözünür kollajen ekstrakte edilmiş ve

karakterizasyonu yapılmıştır (Tylingo ve ark., 2016). Asitte çözünür kollajen verimi karabalık, salmon ve atlantik morinasında sırasıyla %75, %73 ve %68 olarak bulunmuştur. Denatürasyon sıcaklığı karabalıkta (29,30-100ºC) diğer örneklere göre daha yüksek bulunmuştur. SDS-PAGE sonuçlarına göre örneklerin tip I kollajen oldukları, FTIR sonuçlarının tüm örneklerde benzer olduğu belirtilmiştir. Balık deri kollajeninin hazırlanması kolay uygun bir kaynak olarak endüstride kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Wang ve ark. (2007) atıl kaynakların daha efektif kullanılmasını sağlamak ve ticari uygulamalardaki potansiyeli açısından *Sebastes mentella* türü derilerinden asitte çözünür ve pepsinde çözünür kollajen ekstrakte etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Asitte çözünür kollajen verimi (%47,5) pepsinde çözünür kollajen veriminden (%92,2) daha düşük bulunmuştur fakat asitte çözünür kollajen örnekleri saflıklarının önemli derecede yüksek olduğu bildirilmiştir. Denatürasyon sıcaklıkları çözünür ve pepsinde çözünür kollajen örneklerinde sırasıyla 16,1ºC ve 15,7ºC olarak bulunmuş, bu durumda pepsinde çözünür kollajen örneklerinin üçlü sarmal yapısının hala baskın olduğu düşünülmektedir. Her iki örneğin amino asit profilleri benzer bulunmuş, düşük amino asit içerikleri ile diğer türlerden farklılık gösterdikleri ve bunun sebebinin kollajen örneklerinin düşük denatürasyon sıcaklığına sahip olmaları olabileceğini bildirmişlerdir.

Thuanthong ve ark. (2016) Nil tilapyası derilerinden asitte çözünür kollajen ekstrakte etmişler ve ekstraksiyon sıcaklığının ekstraksiyon verimi, karakteristiği ve özellikle üçlü sarmal yapıya olan etkilerini araştırmışlardır. Asitte çözünür kollajen 5±1, 15±1 ve 25±1°C' de 0–24 saat süre ile 0,3 veya 0,5 mol L^{-1} asetik asitte ekstrakte edilmiştir. Araştırmacılar 0,5 mol L^{-1} asetik asitte ekstraksiyon etkinliğinin 0,3 mol L^{-1} asetik asitte ekstraksiyonundan daha etkin olduğunu bildirmişlerdir. 0,5 mol L^{-1} asetik asit ile 25±1°C' de 5 saat süre ile yapılan ekstraksiyonun en yüksek etkinliğe (%73,73) sahip olduğu, asitte çözünür kollajen örneklerinin tip I kollajen olduğu ve benzer fizikokimyasal özellik gösterdikleri ifade edilmiştir.

Gelecekteki kullanımları göz önüne alınarak, *Channa striata* türü deri ve kemiklerinin kimyasal bileşenleri, amino asit ve kollajen içeriklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır (Rosmawati ve ark., 2018). Örneklerde su ve yağ içeriği deride yüksek bulunmuştur. Deri ve kemikte en yüksek amino asit yüzdesinin glisin ve prolin olduğu bildirilmiştir. Hidroksiprolin içeriği deride (%95,25) kemikten (%89,01) daha yüksek bulunmuş, hidroksiprolin varlığı *Channa striata* derisinin iyi bir kollajen kaynağı olduğunu göstermiştir.

Tabarestani ve ark. (2012) gökkuşağı alabalık *(Onchorhynchus mykiss)* deri ve kemiklerinden kollajen elde etmişler ve bazı özelliklerini incelemişlerdir. Deri ve kemik verimi yaş ağırlık baz alındığında sırasıyla %9,44 ve %1,12 olarak bulunmuştur. SDS-PAGE sonuçlarına göre her iki örnekte benzer sonuçlara rastlanmış, kollajen örneklerinin en az iki α zinciri ve β bileşenlerinden oluştuğu bildirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre kollajen örnekleri tip I kollajen olarak değerlendirilmiştir. Deri ve kemikten elde edilen kollajen örneklerinin çözündüğü minimum pH değerleri sırasıyla 9 ve 7 olarak bulunmuştur. NaCl'nin kollajen çözünürlüğündeki etkisi incelendiğinde %3'e kadar NaCl varlığında kollajen çözünürlüğünde herhangi bir değişim olmadığı bildirilmiştir.

Alaska mezgiti *(Theragra chalcogramma)* derilerinden kollajen ekstraksiyonu ve kısmi karakterizasyonun yapıldığı çalışmada araştırmacılar, UV-vis spektrum sonuçlarına göre Alaska mezgiti derilerinden elde edilen örnekleri kollajen olarak değerlendirmişlerdir (Yan ve ark., 2008). Kollajen örneklerinin 220-230 nm'de absorbans vermesinin bu görüşü desteklediği ifade edilmiştir. Amino asit kompozisyonu ve SDS-PAGE sonuçlarına göre ekstrakte edilen kollajen örnekleri tip I kollajen sınıfında değerlendirilmiştir. Örneklerin denatürasyon sıcaklığı 24,6°C olarak bulunmuş ve memeli kollajen örneklerinden daha düşük olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre Alaska mezgiti derilerinden ekstrakte edilen kollajenin potansiyel bir kollajen kaynağı olabileceği ifade edilmiştir.

Palanivel ve ark. (2018) *Channa striatus* türü derilerinden asitte çözünür kollajen ekstrakte etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Kollajen karakterizasyonunu SDS-PAGE, amino asit analizi, FTIR ve çözünürlük analizleri ile gerçekleştirmişlerdir. SDS-PAGE sonuçlarına göre çalışmada ekstrakte edilen kollajen örnekleri temelde α1, α2 ve β zincirlerinden oluşan tip I kollajen olarak tanımlanmıştır. Amino asit karakterizasyonunda glisinin takip eden diğer asitler alanin, prolin, hidroksiprolin ve glutamin ile karılaştırıldıklarında miktarca daha fazla olduğu vurgulanmıştır. Araştırmacılar çalışma sonuçlarına göre *Channa striatus* türü derilerinden ekstrakte edilen asitte çözünür kollajenin alternatif tıpta kullanılabilecek iyi bir kaynak olduğunu bildirmişlerdir.

Shu ve ark. (2017) Morina *(Gadus macrocephaius)* derilerinden asitte çözünür ve pepsinde çözünür kollajen ekstrakte etmişler, kollajen örneklerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini karşılaştırmışlardır. Asitte çözünür ve pepsinde çözünür kollajen verimi sırasıyla %37,6 ve %55,96 olarak bulunmuştur. Liyofilize kuru ağırlık baz alındığında toplam verim %93,92 olarak diğer kaynaklardan yüksek bulunmuştur. Elektroforez sonuçlarına göre kollajen örneklerinin iki farklı α zinciri içeren tip I kollajen olduğu bildirilmiştir. Amino asit analizleri sonucu her iki kollajen örneğinin de imino asit içerdiği (ASC ve PSC'de sırasıyla 1000 amino asit kalıntısında 216,1 ve 190,6 kalıntı) , FTIR sonuçlarının ise her iki kollajen örneğinde benzer olduğu ve pepsin hidrolizinin örneklerin üçlü sarmal yapılarına etkisi olmadığı bildirilmiştir.

Li ve ark. (2018) tilapya *(Oreochromis niloticus)* derilerinden tip I kollajen ekstrakte etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Liyofilize kuru ağırlık baz alındığında asitte çözünür ve pepsinde çözünür kollajen örneklerinde verim yaklaşık olarak %19-20 olarak bulunmuştur. Her iki kollajen örneği α1 ve α2 zinciri içeren tip I kollajen olarak karakterize edilmiş, memeli kaynaklı kollajen ile karşılaştırıldıklarında daha düşük denatürasyon sıcaklığına sahip oldukları bildirilmiştir. Mevcut sonuçlara göre, asitte çözünür ve pepsinde çözünür tilapya deri kollajen örneklerinde fizikokimyasal açıdan önemli farklılıkların olmadığı,

biyomedikal kullanımlarda su kaynaklı kollajenlerin memeli kaynaklı kollajenlere alternatif olabileceği vurgulanmıştır.

Scomberomorous niphonius deri ve kemiklerinden kollajen eldesi ve karakterizasyonunun yapıldığı çalışmada asitte çözünür ve pepsinde çözünür kollajen ekstrakte edilmiştir (Li ve ark., 2013). Yaş ağırlık baz alındığında deri örneklerinde verim ASC ve PSC'de sırasıyla 13,68 ve 3,49, ASC ve PSC kemik örneklerinde ise verim sırasıyla 12,54 ve 14,27 olarak bulunmuştur. Her dört örnekte de en baskın amino asit glisin (1000 amino asit kalıntısında 341,60-352,60 amino asit kalıntısı) ve imino asit içeriği 1000 imino asit kalıntısında 177,10-184,30 arasında imino asit kalıntısı olarak bulunmuştur. SDS-PAGE ve FTIR sonuçlarına göre tüm kollajen örnekleri tip I kollajen olarak sınıflandırılmıştır. Denatürasyon sıcaklıkları ASC deri, PSC deri, ASC kemik ve PSC kemik örneklerinde sırasıyla 15,20, 14,66, 18,02 ve 16,80°C olarak bulunmuştur. Araştırmacılar denatürasyon sıcaklığının memeli kaynaklı kollajenlere göre daha düşük olmasını düşük imino asit içeriğine sahip olmalarından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Yapılan farklı bir çalışmada *Magalaspis cordyla* ve *Otolithes ruber* kemiklerinden ekstrakte edilen tip I kollajenin yaraların iyileşmesine olan etkileri çalışılmıştır (Kumar ve ark., 2012). Kuru ağırlık baz alındığında *Magalaspis cordyla* ve *Otolithes ruber* kemiklerinden ekstrakte edilen asitte çözünür kollajen verimi sırasıyla %30,50 ve %27,60 olarak, pepsinde çözünür kollajen verimi ise sırasıyla %45,10 ve %48,60 olarak bulunmuştur. SDS-PAGE, UV-vis, FTIR ve amino asit analizi sonuçlarına göre ekstrakte proteinler tip I kollajen olarak karakterize edilmiştir. Araştırmacılar kemiklerin genelde atık olarak kabul edildiğini fakat yaptıkları çalışma için mükemmel tıbbi öneme sahip olduğunu ve bu atığın tıbbi açıdan önemli bir kaynağa dönüştürmenin olası olduğunu bildirmişlerdir.

Li-li ve ark. (2011) yılan balığı kemiklerinden kollajen ekstrakte etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Kollajen örnekleri karakterizasyonunda UV-

vis, SDS-PAGE, FTIR, termal denatürasyon sıcaklığı ve DSC analizleri yapılmıştır. Çalışma sonuçlara göre pepsinde çözünür kollajen örneklerinin termal denatürasyon sıcaklığı 25°C ve çekme sıcaklığı ise 57,94°C olarak bulunmuştur. Amino asit sonuçlarına göre glisinin %12,45 ile toplam amino asitin yaklaşık 1/6' sını oluşturduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, UV absorpsiyon değerinin 234 nm olduğunu ve FTIR sonucuna göre örneklerin üçlü sarmal yapıda olduklarını bildirmişlerdir.

Pogonia cromis ve *Archosargus probatocephalus* subtropikal türlerinin kemik ve pullarından kollajen ekstrakte edilmiş ve biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır (Ogawa ve ark., 2004). Kemik ve pullardan asitte çözünür ve pepsinde çözünür kollajen elde edilmiştir. Asitte çözünür ve pepsinde çözünür kollajen örneklerinin SDS-PAGE, amino asit kompozisyonu, ikincil yapı ve denatürasyon sıcaklığı analizleri gerçekleştirilmiştir. Kollajen örneklerinin moleküler ağırlıkları yaklaşık olarak α1 zinciri için 130 kDa ve α2 zinciri için ise 110 kDa olarak bulunmuştur. Pepsinde çözünür kollajen amino asit kompozisyonu, asitte çözünür sığır deri kollajenine asitte çözünür morina derisi kollajeninden daha yakın bulunmuştur. Asitte çözünür ve pepsinde çözünür kollajen örnekleri erime sıcaklıklarının 34°C' nin üzerinde olduğu bildirilmiştir. *Pogonia cromis* ve *Archosargus probatocephalus* türleri kemik ve pullarından ekstrakte edilen kollajen örneklerinin Tip I kollajen olduğu, gıda, kozmetik, biyomedikal ve ilaç sanayi uygulamalarında kullanılabileceği bildirilmiştir.

Nagai ve Suzuki. (2000a) çeşitli balık türleri kemiklerinden kollajen ekstrakte etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Çalışmada lokal marketlerden temin edilen Japon levreği (*Lateolabrax japonicus*), Japon istavriti (*Trachurus japonicus*) ve *Plecoglossus altivelis* türleri kullanılmıştır. Liyofilize kuru ağırlık baz alındığında örneklerin kollajen verimi %41'den %54'e değişen aralıklarda bulunmuştur. SDS-PAGE sonuçlarına göre, Japon levreği ve *Plecoglossus altivelis* kemiklerinden elde edilen kollajen örnekleri α1 ve α2 zincirlerinden oluşmaktadır fakat Japon levreği kemiklerinden elde edilen kollajen

örneklerinde α2 içeriği oldukça düşük bulunmuştur. Diğer yandan Japon istavriti kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinde yalnızca tek α bandına rastlanmış ve bunun α1 zinciri olabileceği düşünülmüştür. Çalışmada kullanılan balık kemiklerinin önemli bir kollajen kaynağı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Kumar ve ark. (2012) *Magalaspis cordyla* ve *Otolithes ruber* türleri kemiklerinden kollajen ekstrakte etmişler ve yara iyileştirme özelliklerini araştırmışlardır. Örneklerin kuru ağırlıkları baz alındığında asitte çözünür kollajen verimi %30,50 ve %27,60, pepsinde çözünür kollajen verimi ise %45,10 ve %48,60 olarak bulunmuştur. SDS-PAGE, UV-vis, FTIR ve amino asit kompozisyonu analizleri sonucuna göre esktrakte protein örnekleri tip I kollajen olarak sınıflandırılmıştır. UV-vis sonuçlarına göre çalışmada ekstrakte edilen tüm kollajen örnekleri 230 nm' de maksimum absorbans göstermişlerdir. Araştırmacılar amino asit analizi sonuçlarına göre, glisinin kollajen örneklerindeki en yüksek (~ %30) amino asit olduğunu bildirmişlerdir.

Jeong ve ark. (2013) bir orkinos türü olan *Thunnus obesus* kemiklerinden kollajen ekstrakte etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Kollajen ekstraksiyonunda asitte çözünür kollajen (ASC) ve asitte çözünür enzim kollajen (ASEC) yöntemleri olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen kollajen FTIR, SDS-PAGE, OM ve SEM analizleri ile karakterize edilmiştir. FTIR sonuçları kollajen varlığını ortaya çıkarmıştır. Araştırmacılar, çalışmada ekstrakte edilen kollajen örneklerinin biyouyumlu ve doğada nontoksik olduğunu vurgulamışlar, *Thunnus obesus* kemiklerinden ASEC yöntemi ile kollajen ekstraksiyonunun memeli kollajenine alternatif olarak yapılabileceğini bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (2008) *Sebastes mentella* türü deri, pul ve kemiklerinden kollajen ekstrakte etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. 24 saatlik hekzan ve EDTA uygulamaları ile örneklerdeki yağ ve kül materyalleri uzaklaştırılmıştır. Deri kollajen verimi %47,50 ile pul (%6,80) ve kemik (%10,30) kollajen verimlerinden önemli derecede yüksek bulunmuştur. Denatürasyon sıcaklığı deri,

pul ve kemikte sırasıyla 16,10°C, 17,70°C ve 17,50°C olarak bulunmuş, bu sonuçların çoğu balık türünden daha düşük olduğu bildirilmiştir. Örneklerin amino asit profilleri düşük imino asit içermeleri ile benzer bulunmuş, bu duruma örneklerin sahip oldukları düşük denatürasyon sıcaklıklarının neden olabileceği vurgulanmıştır. Tüm kollajen örneklerinin tip I kollajen olduğu bildirilmiştir.

Catla catla ve *Cirrhinus mrigala* türü deri, pul ve yüzgeçlerinden kollajen ekstrakte edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır (Mahboob, 2015). Kollajen karakterizasyonunda SDS-PAGE kullanılmış, *Catla catla* türü deri, pul ve yüzgeçlerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin molekül ağırlıkları sırasıyla 120-210, 70-201 ve 68-137 kDa aralıklarında bulunmuştur. *Cirrhinus mrigala* türü deri, pul ve yüzgeçlerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin molekül ağırlıkları ise sırasıyla 114-201, 77-210 ve 70-147 kDa aralıklarında bulunmuştur. Tüm doku kollajen örnekleri aminoasit içeriklerinde glisin ve alaninin baskın amino asit oldukları bildirilmiştir. Deri, pul ve yüzgeç örneklerinin besin bileşenleri analizleri de gerçekleştirilmiş ve maksimum protein içeriği *Catla catla* ile *Cirrhinus mrigala* türü derilerinde sırasıyla %26,10 ve %22,90 olarak bildirilmiştir.

Mahboob ve ark. (2014) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, sazan (*Cyprinus carpio*) ve gümüş sazanı (*Hypophthalmichthys molitrix*) atıklarının deri, pul ve yüzgeçlerinden kollajen ekstraksiyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışmada balıklar ağırlıklarına göre 3 gruba ayrılmış (W_1 (250-500g), W_2 (501-750 g) ve W_3 (751-1000g)) ve her gruptan 9'ar adet örnek alınmıştır. Bildirilene göre, deri ve pul protein oranları en fazla W_3 grubu örneklerinden elde edilmiştir. Bu grupta deri protein oranları sazan ve gümüş sazanında sırasıyla %28,13 ve %29,13; pul protein oranları ise sırasıyla %29,91 ve %28,38 olarak bulunmuştur. Protein karakterizasyonu SDS-PAGE ile yapılmış ve deri, pul ve yüzgeçleri moleküler ağırlıklarının sırasıyla sazanda 126-220 kDa, 78-211 kDa ve 72-141 kDa aralıklarında; gümüş sazanında ise 117-208 kDa, 81-219 kDa, 72-141 kDa aralıklarında bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca amino asit analizi sonucunda tüm

dokularda glisinin en yüksek düzeyde bulunduğu ancak triptofanın hiçbir dokuda tespit edilmediği bildirilmiştir.

Nibea japonica derilerinden ekstrakte edilen pepsinde çözünür kollajenin ekstraksiyon şartlarının optimizasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir (Yu ve ark., 2018) Pepsinde çözünür kollajenin optimum ekstraksiyon şartları; pepsin konsantrasyonu 1389 U/g, katı sıvı oranı 1:57 ve hidroliz zamanı 8,67 saat olarak bildirilmiştir. Bu şartlar altında PSC verimi %84,85 olarak bulunmuştur. Çözünürlük tüm örneklerde pH 1-4 arasındadır. SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre *Nibea japonica* derilerinden ekstrakte edilen pepsinde çözünür kollajen örneği tip I kollajen olarak karakterize edilmiştir. FTIR analizi sonuçlarına göre kollajen örneklerinin hidrojen bağıyla üçlü sarmal yapıya sahip oldukları bildirilmiştir. Araştırmacılar *Nibea japonica* derilerinin potansiyel bir kollajen kaynağı olabileceğini vurgulamışlardır.

Wang ve ark. (2018) *Misgurnus anguillicaudatus* türü derlerinden asitte çözünür (ASC) ve pepesinde çözünür (PSC) kollajen ekstrakte etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. ASC ve PSC' de verim %22,42 ve %27,32 olarak bulunmuştur. SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre kollajen örnekleri tip I kollajen olarak değerlendirilmiştir. 1000 amino asit kalıntısında ASC' de 212 imino asit, PSC' de ise 193 imino asit kalıntısı bulunmuştur. FTIR analizi, UV ölçümleri ve DCS sonuçlarına göre kollajen örneklerinin üçlü sarmal yapıya sahip oldukları bildirilmiştir. Denatürasyon sıcaklıkları ASC ve PSC' de sırasıyla 36,3 °C ve 33,61 °C olarak bulunmuş ve *Misgurnus anguillicaudatus* türü derilerinden ekstrakte edilen kollajenin memeli kollajenlerine alternatif olabileceği bildirilmiştir.

Ramanathan ve ark. (2014) doku mühendisliği için yeni bir kollajen kaynağı olarak *Arothron stellatus* derilerinden asitte çözünür kollajen ekstrakte etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Kuru ağırlıkta kollajen veriminin %80 olarak bulunduğu bildirilmiştir. Asitte çözünür kollajen örnekleri, farklı α zinciri içeren tip I kollajen olarak SDS-PAGE analizi ile karakterize edilmiştir.

Karakterizasyonda aynı zamanda FTIR, TGA, XRD, SEM ve amino asit analizleri de yapılmıştır. Araştırmacılar, *Arothron stellatus* derilerinden ekstrakte edilen asitte çözünür kollajenin çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Meksika körfezinden avlanan *Pogonias cromis ve Archosargus probatocephalus* türleri derilerinden asitte çözünür (ASC) ve pepsinde çözünür (PSC) kollajen ekstrakte edilmiş ve biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır (Ogawa ve ark., 2004). Kuru ağırlık baz alındığında *Pogonias cromis ve Archosargus probatocephalus* ASC verimi sırasıyla %2,3 ve %2,6 ve PSC verimi ise sırasıyla %15,8 ve %29,3 olarak bulunmuştur. Moleküler ağırlık profilleri, amino asit kompozisyonu ve ikincil yapıları her iki deri kollajen örneğinin tip I kollajen olduğunu göstermektedir. SDS-PAGE kullanılarak α1 ve α2 zincirleri moleküler ağırlıkları belirlenmiş sırasıyla 127 kDa ve 116 kDa olarak bulunmuştur. ASC ve PSC her iki türde amino asit kompozisyonunun sığır deri kollajenine balık deri kollajeninden daha yakın olduğu bildirilmiştir. Termal denatürasyon sıcaklığı erime noktası kullanılarak DSC ile belirlenmiş, denatürasyon sıcaklıklarının *P. cromis* ASC'de 34,2 °C, *P. cromis'de* PSC 35,8 °C, *A. Probatocephalus* ASC'de 34,0 °C ve *A. Probatocephalus* PSC' de ise 34,3 °C olduğu bildirilmiştir.

Nagai ve ark. (2004) balık pullarından kollajen ekstrakte etmişler ve kısmi karakterizasyonunu yapmışlardır. Çalışmada *Sardinops melanostictus*, *Pagrus major* ve *Lateolabrax japonicus* türleri kullanılmıştır. Kuru ağırlıkta verimin oldukça yüksek olduğu, *S. melanostictus*, *P. major* ve *L. Japonicus* pulları kollajen örneklerinde sırasıyla %50,9, %37,5 ve %41,0 olarak bulunduğu bildirilmiştir. Kara hayvanları kollajeni ile karşılaştırıldıklarında çalışmada ekstrakte edilen kollajen örneklerinin denatürasyon sıcaklıkları daha düşük bulunmuştur. Çalışmada elde edilen kollajen örnekleri tip I kollajen olarak karakterize edilmiş ve balık pullarının çeşitli endüstrilerde önemli kollajen kaynağı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Zhang ve ark. (2011) sazan pullarından asitte çözünür (ASC) ve pepsinde çözünür (PSC) kollajen ekstrakte etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. SDS-PAGE sonuçları ekstrakte edilen kollajen örneklerinin en az iki α zincirinden oluşan tip I kollajen olduğunu göstermektedir. Sazan pullarından ekstrakte edilen tip I kollajenin domuz deri tip I kollajen ve diğer deniz canlı kollajenleri ile karşılaştırıldıklarında daha yüksek yarı sistin içerdiği fakat denatürasyon sıcaklığının daha düşük olduğu bildirilmiştir. UV-vis sonuçlarına göre ekstrakte edilen kollajen örneklerinin absorpsiyon değeri 230 nm olarak bulunmuştur. Denatürasyon sıcaklıklarının sazan pul ASC' de yaklaşık 32,9 °C ve PSC' de ise yaklaşık 29,0 °C olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar kollajen stabilitesinin önceki çalışmalarda çevre vücut sıcaklıkları ile ilgili olduğu fakat mevcut çalışmalar ile hidroksiprolin içeriğinin kollajen stabilitesinin korunmasında önemli olduğu vurgulanmıştır.

Kothai ve Premlatha (2018) lokal marketlerden pul atıklarını toplamışlar, kollajen ektrakte etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Ekstrakte kollajen örnekleri UV-VIS, FTIR ve SDS-PAGE teknikleri ile tip I kollajen olarak değerlendirilmiştir. UV-VIS sonuçlarına göre örnekler maksimum absorpsiyonu 231 nm'de göstermişlerdir. Pul atıklarından ekstrakte edilen kollajen örneklerinin medikal, farmasötik, biyomedikal, gıda endüstrisi, kozmetik gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Kedi balığı (*Clarias gariepnus*) atıklarından kollajen ekstraksiyonun ve fizikokimyasal özelliklerinin belirlendiği çalışmada 0,5 M asetik asit ve sonrasında 2,6 M NaCl kullanılmıştır (Ismail ve ark., 2012) Ekstrakte kollajen örneklerinde nem içeriği, verim, pH, protein içeriği, renk, koku ve termal stabilite analizleri gerçekleştirilmiştir. Verim %16,4 olarak bulunmuş ve pozitif kollajen niteliğindeki kedi balığı atıklarının da potansiyel bir kollajen kaynağı olduğu bildirilmiştir. Kar beyazı renkte, kristal yapıda ve hafif tekstürdeki kollajen örneklerinde protein %5,97, nem %0,46 ve pH

4,75 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar, duyusal analizlere göre kollajen örneklerinin hafif balıksı kokuya sahip olduklarını, DSC analizleri sonucunda kollajen örnekleri termal stabilitelerinin iyi olduğu ve yüksek denatürasyon sıcaklıkları ile memeli kollajenleri ile benzer özellik gösterdikleri bildirilmiştir.

Zelechowska ve ark. (2010) Atlantik morinası (*Gadus morhua*) omurgasından kollajen ekstrakte etmişler ve bazı özelliklerini araştırmışlardır. Kollajen ekstraksiyonunda, kollajen olmayan proteinler 0,1 M NaOH solüsyonu kullanılarak ayrılmış ve demineralizasyon işlemi 0,1 M HCl solüsyonu ile yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi 4 °C'de, 1:4 ten 1:8 katı/solüsyon oranı kullanılarak 24,48 ila 72 saat arasında gerçekleştirilmiştir. Kollajen karakterizasyonu çözünürlük, hidroksiprolin içeriği, denatürasyon sıcaklığı ve SDS-PAGE analizleri ile yapılmıştır. Atlantik morinası (*Gadus morhua*) omurgasından ekstrakte edilen kollajen örneklerinde hidroksiprolin içeriği kuru ağırlıkta %6,4 olarak bulunmuştur. Denatürasyon sıcaklığının yaklaşık 14,4°C olduğu ve bu sonucun soğuk su balıkları için karakteristik bir değer olduğu bildirilmiştir.

Chanos chanos kemiklerinden asitte çözünür kollajen eldesinde, CH_3COOH konsantrasyonu ve ekstraksiyon sürelerine bağlı olarak verim ve hidroksiprolin içeriklerinde meydana gelen değişimler baz alınarak ekstraksiyon optimizasyonu amaçlanmıştır (Wahyu ve Widjanarko, 2018). Ekstraksiyonun bağımsız değişkeni olan ekstraksiyon süresi ve asetik asit konsantrasyonu, bağımlı değişken olan verim ve hidroksiprolin içeriği ile araştırmada tepki yüzeyi metodolojisi (RSM) ve merkez kompozit tasarım (CCD) kullanılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre *Chanos chanos Forskal* kemiklerinden asitte çözünür kollajen ekstraksiyonunda optimal şartların

61,30 saat 0,66 M CH_3COOH konsantrasyonu olduğu bildirilmiştir. Kollajen verimi %0,73 ve hidroksiprolin içeriği %7,22 olarak bulunmuştur. FTIR, DSC ve amino asit analizleri sonuçlarına göre *Chanos chanos* kemiklerinden ekstrakte edilen asitte çözünür kollajenin alternatif bir kollajen kaynağı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kolyoz (*Scomber japonicus*)

Çalışmada kollajen eldesi için Adana'da balık pazarından temin edilen kolyoz balığı (Şekil 3.1) kullanılmıştır. Deri ve kemikleri kullanılan kolyoz balıklarının ortalama boyu ve ağırlığı 26,13±1,11 cm ve 145,55±22,17 gramdır.



Şekil 3.1. Kolyoz (*Scomber japonicus*)

Kolyoz balığının sistematiği;

Şube: Chordata
Sınıf: Actinopterygii
Takım: Perciformes
Familya: Scombridae
Tür: *Scomber japonicus* (Houttuyn, 1782)

Scombridae familyasına ait kolyoz balığı (*Scomber japonicus* Houttuyn, 1782) Atlas, Hindistan ve Pasifik Okyanusları'nın sıcak ve ılıman geçiş

bölgelerinde yaygın bir dağılım gösteren orta boylu bir türdür. Türkiye'de Batı Karadeniz, Akdeniz, Ege ve Marmara Denizinde görülmektedir. Büyüklüğü ortalama 15–25 cm olup maksimum 50 cm'ye ulaşmaktadır. Sürüler halinde yaşayan ve göç eden bu balığın yüzeyden itibaren 300 metreye kadar olan derinliklerde bir dağılım gösterdiği bilinmektedir (Cengiz ve ark., 2013).

3.1.2. Berlam (*Merluccius merluccius*)

Çalışmada kollajen eldesi için Adana'da balık pazarından temin edilen berlam balığı (Şekil 3.2) kullanılmıştır. Deri ve kemikleri kullanılan berlam balıklarının ortalama boyu ve ağırlığı 42,7±1,48 cm ve 649,82±10,03 gramdır.



Şekil 3.2. Berlam (*Merluccius merluccius*)

Berlam balığının sistematiği;

Şube: Chordata
Sınıf: Actinopterygii
Takım: Gadiformes
Familya: Merlucciidae
Tür: *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758)

Merluccidae familyasına ait berlam balığı (*Merluccius merluccius* Linnaeus, 1758), ılık denizlerin orta sularında yaşarlar. Ege, Marmara ve Akdeniz'de yaygın, olarak bulunurlar. Gündüzleri 80 - 300 m'ye varan derin sularda, gezinip geceleri avlanmak için kıyılara ve yüzeye yaklaşırlar. Mayıstan Ağustosa kadar sahillere yakında üremelerini yapar. Etinin lezzet ve kalitesi Mezgitle eştir. Taze olarak her mevsimde yendiği için ekonomik değeri yüksektir.

3.1.3. Kupes (*Boops boops*)

Mevcut çalışmada kollajen eldesi için Adana'da balık pazarından temin edilen kupes balığının (Şekil 3.3) derileri ve kemikleri kullanılmıştır. Kupes balıklarının ortalama boyu ve ağırlığı 31,83±1,26 cm ve 435,10±32,45 gramdır.



Şekil 3.3. Kupes (*Boops boops*)

Kupes balığının sistematiği;

Şube: Chordata

Sınıf: Actinopterygii

Takım: Perciformes

Familya: Sparidae

Tür: *Boops boops* (Linnaeus, 1758)

Kupes balığı (*Boops boops* Linnaeus, 1758), Sparidae familyasından ticari açıdan önemli bir balık türüdür. Akdeniz, Marmara ve Ege denizlerinde yaygın Karadeniz'de ise nadir olarak bulunan kıyıya yakın bölgelerde demersal veya semipelajik olarak yaşamaktadır. Doğu ve Batı Atlantik ile tüm Akdeniz kıyılarında kumlu, çamurlu, kayaklıklı çeşitli dip yapısına sahip yada posidonialarn bulunduğu yerlerde yaşayan demersal yada semipelajik bir türdür (Manaşırlı ve ark., 2006; Cengiz ve ark., 2013).

3.2. Metot

3.2.1. Deri ve Kemik Materyallerinin Hazırlanması

Çalışmada deri ve kemik materyalleri temini için kullanılan balık örnekleri Adana'da bulunan bir su ürünleri marketinden temin edilmiş ve strafor kutular içerisinde Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi laboratuvarına getirilmiştir. Laboratuvara getirilen örneklerin öncelikle soğuk zincir altında sırasıyla deri ve kemikleri ayrılmış, blender ile kıyılmış, saf su ile yıkanmış ve kollajen eldesi için hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.4 ve 3.5). Tüm hazırlık işlemleri, düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Balık Deri Atıkları

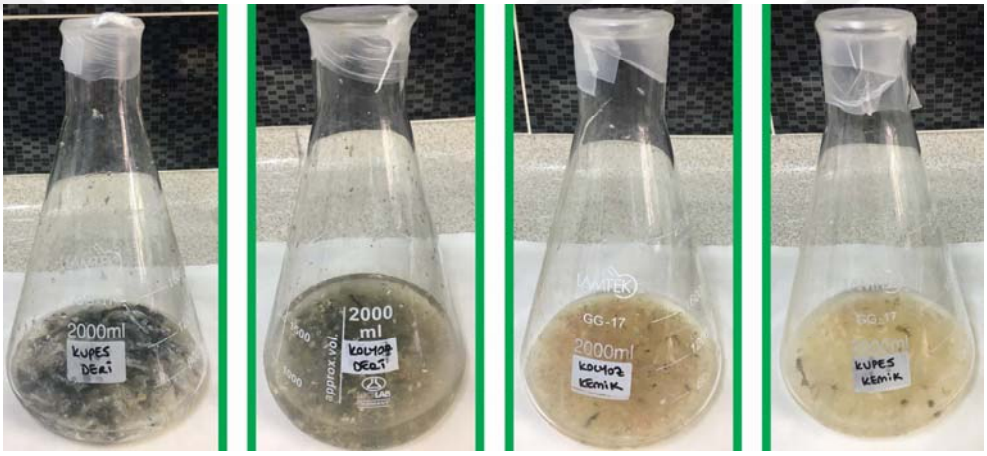


Şekil 3.5. Balık Kemik Atıkları

3.2.2. Farklı Balık Türlerinin Derilerinden ve Kemiklerinden Kollajen Eldesi

Kolyoz, berlam ve kupes deri ve kemiklerinden kollajen eldesinde Nagai ve Suzuki (2000b)'nin yöntemi modifikasyon yapılarak kullanılmıştır.

Ön işlemler sonrası ilk aşama olarak kollajen olmayan proteinlerin derilerden ve kemiklerden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu amaçla deri ve kemik örnekleri 0,1 M NaOH çözeltisinde 3 gün süre ile buzdolabı ortamında (+4°C) bekletilmiştir (Şekil 3.6). Çözeltiler her 24 saatte bir yenilenmiştir. 3. günün sonunda örnekler nötr pH elde edilinceye kadar saf su ile yıkanmıştır.



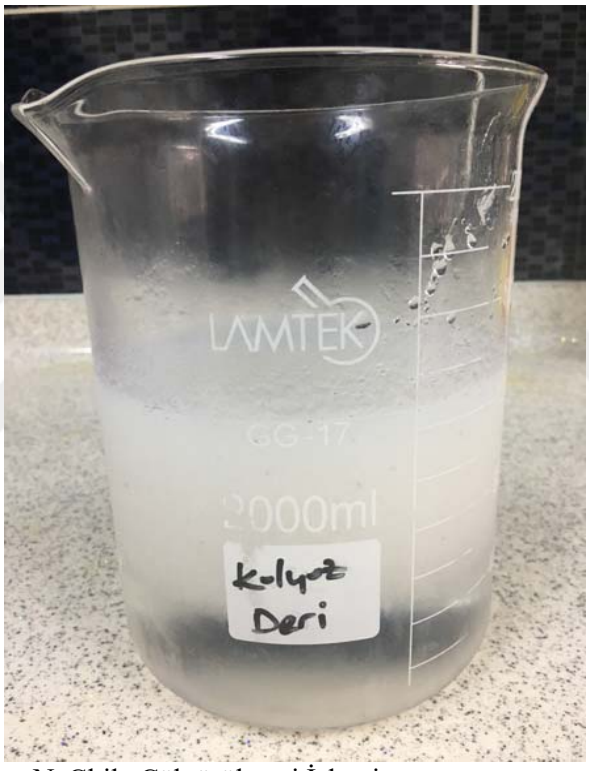
Şekil 3.6. Deri ve Kemik Örneklerinden Kollajen Olmayan Proteinlerin Uzaklaştırılması

Deri örneklerinden farklı olarak kalsiyumun uzaklaştırılması amacı ile kemik örnekleri, 0,5 M Na_2EDTA çözeltisinde 5 gün süre ile buzdolabı ortamında (+4°C) bekletilmiş ve çözelti her 24 saatte bir yenilenmiştir.

Deri ve kemik örneklerinden kollajen eldesi için diğer bir aşama yağların uzaklaştırılması işlemidir. Bu amaçla örnekler 1:10 (g deri/ml çözelti) oranında %10'luk butil alkol içerisinde 3 gün süre ile buzdolabı ortamında (+4°C) bekletilmiş ve çözelti 24 saatte bir yenilenmiştir.

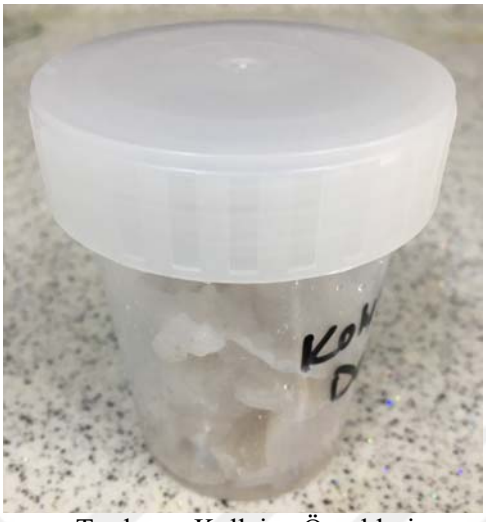
Daha sonra örneklerden kollajenin ekstraksiyonu için 0,5 M asetik asit çözeltisinde 3 gün süre ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Çözelti 24 saat aralıklarla değiştirilerek süzüntü ayrı bir kapta biriktirilmiştir.

Birleştirilen ekstraktlar tuz ile çöktürme işlemine tabi tutulmuştur. Bunun için final konsantrasyonu 2,5 M olan NaCl eklenerek ekstrakt içerisinde bulunan kollajenlerin çöktürülmesi sağlanmıştır (Şekil 3.7).



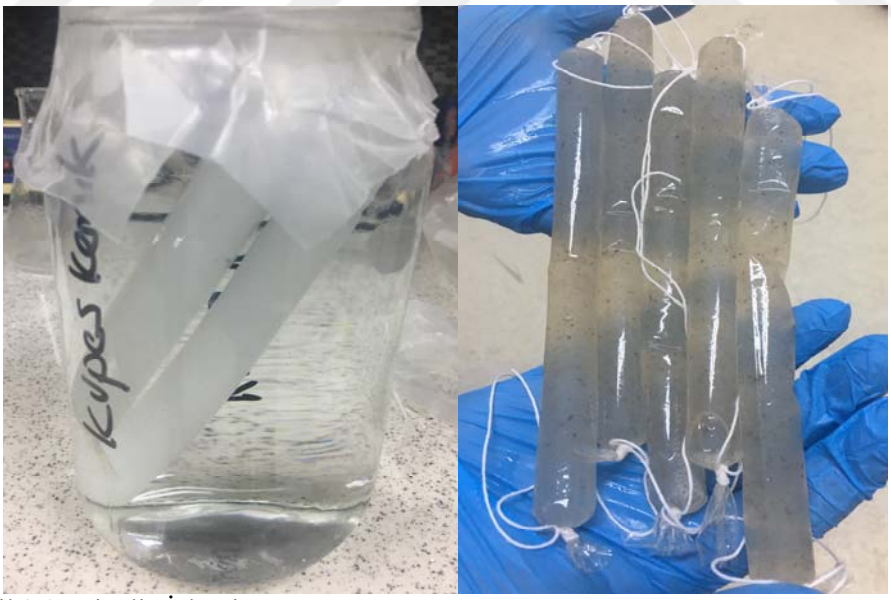
Şekil 3.7. Ekstraktların NaCl ile Çöktürülmesi İşlemi

Çöktürülen kollajen örnekleri 10.000 rpm'de 1 saat süre ile +4°C'de santrifüj edilmiş ve kollajen örnekleri toplanmıştır (Şekil 3.8).



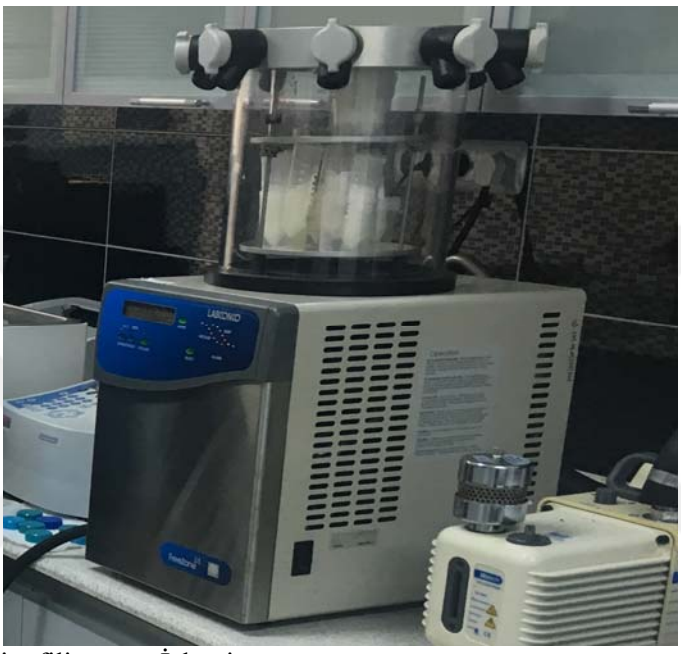
Şekil 3.8. Santrifüj Sonrası Toplanan Kollajen Örnekleri

Çökelti halinde olan kollajen örnekleri 0,5 M asetik asit içerisinde çözüldükten sonra önce 0,1 M asetik asite karşı daha sonra ise distile suya karşı diyaliz gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Diyaliz İşlemi

Diyaliz işlemi gerçekleştirildikten sonra elde edilen kollajen jelleri liyofilizasyon cihazı (LabconcoFreezone 2,5) ile dondurularak kurutulmuştur (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Liyofilizasyon İşlemi

Liyofilizasyon sonrası son ürün Şekil 3.11'de sunulmuştur.



Şekil 3.11. Liyofilizasyon Sonrası Kollajen Örnekleri

3.2.3. Elde Edilen Kollajenlerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu

3.2.3.1. Verim

Farklı balık türlerinin deri ve kemikleri kullanılarak kollajen elde edilmesi kapsamında kimyasal muameleye tabi tutulan deri ve kemik materyallerinin kuru halde öncesi-sonrası tartımları 0,1 mg duyarlı hassas terazi ile tartılmak suretiyle ağırlık değişimleri belirlenmiştir. Kayıt edilen ağırlık değişimleri aşağıdaki formüle göre hesaplanarak %kollajen verimi elde edilmiştir.

$$\%Verim = \frac{Son\ Tartım}{İlk\ Tartım} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.3.2. Protein, Nem ve Kül Analizleri

Protein analizi AOAC (1990) yöntemine göre yapılmıştır. Örnekler Kjeldahl tüplerine aktarılmış, bu tüplerin üzerine 1'er adet katalizör tableti, 6 ml H_2SO_4 ve 1 ml H_2O_2 eklenmiştir. Yakma ünitesinde 420ºC'de örnekler yeşil-sarı saydam bir renk alıncaya kadar yakılmış ve oda ısısında soğumaya alınmıştır. Tüplerin üzerine 20 ml saf su, 40 ml %40'lık NaOH ve 20 ml %4'lük borik asit ilave edilmiştir. Diğer taraftan bir erlen içerisine 3 damla metil kırmızısı eklenmiş ve distilasyona geçilmiştir. Erlende 100 ml sıvı toplanıncaya kadar distilasyona devam edilmiş ve elde edilen distilat 0,1 N HCl ile titre edilmiştir.

Örneklerdeki ham protein oranı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Ham Protein Oranı}(\%) = \frac{0{,}1 \text{ X } 14 \text{ X } 6{,}25 \text{ X } 100 \text{ X (Örneğin sarf.-kör sarf./ö.m.)}}{1000} \quad (3.2)$$

Nem ve ham kül analizleri AOAC (1990) yöntemine göre yapılmıştır. Örnekler etüvde kurutulup desikatörde soğutulduktan sonra darası alınan porselen krozelere, yaklaşık 0,5g tartılarak konmuştur. Porselen krozeler etüve yerleştirilmiş ve 103ºC'de yaklaşık 4 saat süreyle sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuştur.

Daha sonra örnekler desikatöre alınmış ve oda sıcaklığına geldikten sonra 0,1 mg duyarlı hassas terazide tartılmıştır.

Ham kül tayini için örnekler yakma fırınına yerleştirilmiş ve 550ºC'de sabit ağırlığa gelinceye kadar yakılmış ve desikatörde soğutulduktan sonra tartılmıştır. Analiz sonucunda örneklerin kuru madde ve ham kül oranları %olarak aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

$$\text{Kuru madde (\%)} = \frac{(\text{Dara} + \text{Kuru madde}) - \text{Dara} \times 100}{\text{Örnek miktarı}} \quad (3.3)$$

$$\text{Ham kül (\%)} = \frac{(\text{Dara} + \text{Ham kül}) - \text{Dara} \times 100}{\text{Örnek miktarı}} \quad (3.4)$$

3.2.3.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi

Kızılötesi (IR) Spektroskopisi temel olarak kızılötesi ışığın incelenen madde tarafından soğurulmasına dayanmaktadır. Soğurulma, moleküldeki bağların titreşimi ve dönüşleri için gerekli miktarda dalga enerjisinin, cihaz tarafından elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinden gönderilmesiyle gerçekleşir. Ön hazırlık aşamasında 2 mg kollajen 100 mg potasyum bromür (KBr) içerisinde çözdürülmüştür. Kollajen örneklerinin FTIR analizleri JASCO ATR Pro One Model 6700 FT/IR spektrometresinde (JASCO International Co., Ltd. Hachioji, Tokyo, Japonya), 4000 ila 600 cm^{-1}'den 4 cm^{-1} veri toplama hızında gerçekleştirilmiştir. Spektral verilerin analizi, Spectra Manager TM II çapraz platform yazılım programı (JASCO) kullanılarak yapılmıştır.

3.2.3.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

SEM'de görüntülenecek numunelerin yüzeyi Altın-Paladyum (Au/Pd) ile kaplanarak (yaklaşık 2Å/saniye) iletken hale getirilmiştir. Daha sonra Quanta 650 model, FEI (Columbus, Ohio, ABD) taramalı elektron mikroskobu cihazı ile yüksek vakum altında farklı kV değerlerinde 200-2000x büyütme aralığında görüntüleme yapılmıştır.

3.2.3.5. X-Işını Kırınım Difraktometresi (XRD) Analizi

X-Işını Kırınım yöntemi (XRD), her bir kristalin fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak, X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanmaktadır. X-ışını kırınım ölçümleri 5-45° tarama aralığında Cu-Ka (λ=1.54) radyasyonu olan bir X-ışını difraksiyonu (XRD; PANalytical X'Pert High Score Empyrean, 45kV, 40mA) kullanılarak 0,5° dk^{-1} tarama hızında ve 0,02° adım aralığında belirlenmiştir.

3.2.3.6. Ultraviyole ve Görünür Işık (UV-Vis) Absorpsiyon Spektroskopi Analizi

Kollajen örneklerinin UV spektrumları, Cary 100 UV-Vis Spektrofotometresi (Agilent Technologies) kullanılarak elde edilmiştir. Örnekler 0,5 M asetik asit içerisinde 0,2 mg/mL'lik konsantrasyonda çözdürülmüş. Dalga boyu 200–400 nm'ye aralığında 0,5 M asetik asite karşı okuma yapılmıştır.

3.2.3.7. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Kollajen örneklerinin diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi, Kittiphattanabawon ve ark. (2005) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Liyofilize edilmiş kollajen örnekleri, katı/sıvı oranı 1:40 (a/h) oranında 0,05 M asetik asit ile jel haline getirildikten sonra 2 gün 4°C'de bekletilmiştir. Mettler Toledo, Model DSC 3, (Schwerzenbach, İsviçre) cihazında ölçüm yapılmıştır. Jel haline getirilen numuneler (5-10 mg), alüminyum kap içerisine tartılmıştır. Tarama, 10°C sıcaklık

aralığında, 1°C/dakika artan oranda gerçekleştirilmiştir. Soğutma ortamı olarak sıvı azot kullanılmıştır. Referans olarak boş bir alüminyum kap kullanılmış ve sıcaklık indiyum termogram kullanılarak kalibre edilmiştir. Maksimum geçiş sıcaklığı (Tm) ve toplam denatürasyon entalpi (ΔH) DSC termogramından hesaplanmıştır.

3.2.3.8. Amino Asit Analizi

Kollajen örnekleri 110°C'de 24 saat 6 N HC1 içerisinde vakumda hidrolize edilmiştir. Amino asit analizi Shimadzu model Nexera-X2 HPLC cihazı ile yapılmıştır. Türevlendirilmiş 2 mikrolitre örnek Shimadzu shim-pack XR-ODS II kolonuna enjekte edilmiştir. Kolon fırın sıcaklığı 40°C dir. Kullanılan mobil fazlar (A) su içinde 1mM K_2HPO_4, KH_2PO_4 çözeltisi, (B) (45/40/15: Asetonitril/Metanol/Su)'dur. Amino asitler standartların alıkonma zamanları ve pik alanlarına göre tanımlanmış ve hesaplanmıştır.

3.2.4. İstatistiksel Analizler

Farklı balık türlerinin deri ve kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin protein, nem, kül ve amino asit analiz sonuçları istatik değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Bu amaçla SPSS Statics 22 paket programı kullanılarak Duncan karşılaştırma testi yapılmış ve gruplar arası farklılıklar tespit edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kupes, Kolyoz, Berlam Deri ve Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Verim ve Besin Kompozisyonu

Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin verim ve besin kompozisyonu Çizelge 4.1'de gösterilmişir.

Çizelge 4.1. Kupes, Kolyoz ve Berlam Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Verim ve Besin Kompozisyonu

	Verim %	Protein %	Nem %	Kül %
Kupes	9,32	91,00±0,28^{a}	6,01±0,01^{c}	0,67±0,02^{b}
Kolyoz	4,08	91,05±0,21^{a}	5,33±0,02^{b}	0,59±0,02^{a}
Berlam	6,60	93,60±0,14^{b}	5,24±0,01^{a}	0,56±0,05^{a}

±Standart sapmayı göstermektedir. Aynı sütunda gösterilen farklı harfler gruplar arasında $p<0,05$ düzeyinde istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin verimleri sırasıyla %9,32, %4,08 ve %6,60 olarak bulunmuştur. Tan ve ark. (2018) kollajenin birçok balık türünden %2'den %51,4'e değişen verimlerde başarı ile izole edildiğini bildirmişlerdir. Kuru ağırlık baz alındığında çeşitli balık türü derilerinden ekstrakte edilen asitte çözünür kollajen verimi; *Nibea japonica*'da %15, 35 (Tang ve ark, 2018), *Thunnus orientali*'de %5,4 (Tanaka ve ark, 2018), *Misgurnus anguillicaudatus*'da %22,42 (Wang ve ark, 2018), *Scomberomorus guttutas*'da % 14,5 (Gharagheshlagh ve ark, 2018), *Lates calcarifer*'de %8 ve *Pagrus auratus*'da %7,5 (Anand ve ark., 2013), Malezya kedi

balığı türünde %18,11 (Kiew and Mashitah, 2013) ve sazan derilerinde %41,3 (Duan ve ark., 2009) olarak mevcut çalışma sonuçlarından yüksek bulunmuştur.

Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin protein değerleri sırası ile %91, %91,05 ve %93,6 olarak bulunmuştur. Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin nem değerleri ise sırası ile %6,01, %5,33 ve %5,24 olarak bulunurken kül değerleri sırası ile %0,67, %0,59 ve %0,56 olarak bulunmuştur.

Senaratne ve ark. (2006) *Lagocephalus gloveri* türü derilerinden ekstrakte ettikleri kollajen örneklerinde ham protein değerini %90,30 ve ham kül değerini %8,4 olarak bulmuşlardır. Kuru ağırlık baz alındığında kanal kedi balığı derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin protein değeri %81,21 ve kül değeri ise %1,88 olarak bulunmuştur (Tan ve Chang, 2018).

Mevcut çalışma sonuçlarına benzer olarak, *Priacanthus tayenus* türü derilerinden ekstrakte edilen asitte çözünür kollajen örnekleri protein, nem ve kül değerlerinin sırası ile %94, %7,06 ve %0,68 olarak bulunduğu bildirilmiştir (Kittiphattanabawon ve ark., 2005). Wang ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada ise *Sebastes mentella* türü derileriden estrakte ettikleri kollajen örneklerinin protein ve kül değerlerini sırası ile %90,6 ve %0,9 olarak bulmuşlardır. *Thunnus alalunga*, *Scoliodon sarrakowah* ve *Labeo rohita* türleri derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin biyokimyasal karakterizasyonunun yapıldığı çalışmada ise protein nem ve kül değerleri sırası ile *Thunnus alalunga*'da %91,08, %7,53, %0,74, *Scoliodon sarrakowah*'da %88,8, %9,13, %0,76 ve *Labeo rohita*'da %89,94, %8,78 ve %0,43 olarak bulunmuştur (Hema ve ark, 2013).

Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin verim ve besin kompozisyonu ise Çizelge 4.2'de gösterilmişir.

Çizelge 4.2. Kupes, Kolyoz ve Berlam Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Verim ve Besin Kompozisyonu

	Verim %	Protein %	Nem %	Kül %
Kupes	0,78	87,35±0,21^{a}	9,13±0,01^{b}	0,89±0,01^{a}
Kolyoz	2,15	88,35±0,07^{b}	9,26±0,02^{c}	0,98±0,01^{b}
Berlam	0,34	90,20±0,14^{c}	8,83±0,02^{a}	0,91±0,02^{a}

±Standart sapmayı göstermektedir. Aynı sütunda gösterilen farklı harfler gruplar arasında $p<0,05$ düzeyinde istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin verimleri sırasıyla %0,78, %2,15 ve %0,34 olarak bulunmuştur. Duan ve ark. (2009) yaptıkları benzer çalışmada sazan deri, pul ve kemiklerinden asitte çözünür kollajen esktrakte etmişler ve kemikte kollajen verimini %1,06 olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Gökkuşağı alabalığı deri ve kemiklerinden asitte çözünür kollajen ekstraksiyonunun yapıldığı farklı bir çalışmada ise kemikte kollajen veriminin %1,12 olduğu bildirilmiştir (Tabarestani ve ark., 2012). Kittiphattanabawon ve ark. (2005) *Priacanthus tayenus* türü kemiklerinden ekstrakte edilen asitte çözünür kollajen örneklerinde verimin %1,59 olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışma kapsamında kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin protein değerleri sırası ile %87,35, %88,35 ve %90,20 olarak bulunmuştur. Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin nem değerleri ise sırası ile %9,13, %9,26 ve %8,83 olarak bulunurken kül değerleri sırası ile %0,89, %0,98 ve %0,91 olarak bulunmuştur. Mevcut çalışma sonuçlarına benzer olarak; Tabarestani ve ark. (2012) gökkuşağı alabalığı deri ve kemiklerinden asitte çözünür kollajen elde etmişler ve kemikten

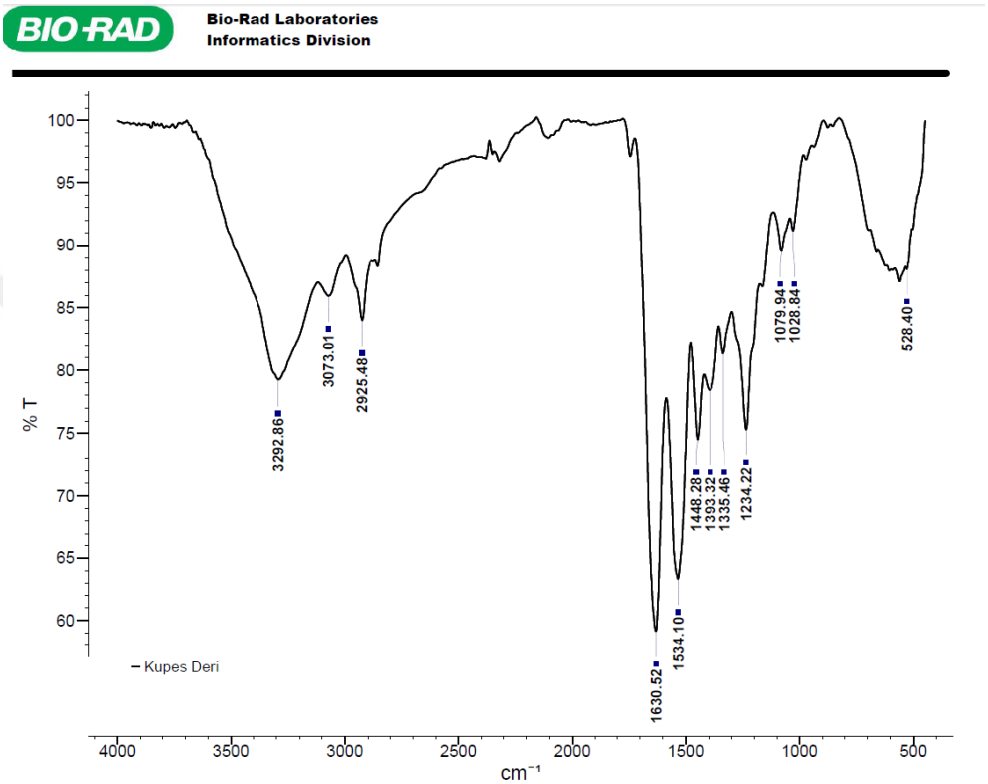
elde ettikleri kollajen örneklerinde protein, nem ve kül değerlerini sırasıyla %89,60, %8,67 ve %0,83 olarak bulmuşlardır. *Priacanthus tayenus* türü kemiklerinden ekstrakte edilen asitte çözünür kollajen örnekleri protein, nem ve kül değerlerinin sırası ile %84,20, %11,57 ve %0,88 olarak bulunduğu bildirilmiştir (Kittiphattanabawon ve ark., 2005). Sonuç olarak, literatürde yapılan çalışmaların verileri ile mevcut çalışmadaki kupes, kolyoz, berlam türlerinin deri ve kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin verim ve besin bileşen verileri karşılaştırıldığında sonuçların paralellik gösterdiği görülmektedir.

Kupes, kolyoz ve berlam deri ve kemiklerinden elde edilen kollajenlerin verim değerleri genel olarak değerlendirildiğinde, her üç balık türününde kemiklerinden elde edilen kollajenlerin verim ve protein değerleri deriden elde edilenlere göre çok daha düşük bulunmuştur. En düşük verim berlam kemiğinde (%0,34) tespit edilirken en yüksek verim kupes derisinde (%9,32) tespit edilmiştir. En düşük protein değeri kolyoz kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinde (%88,35) bulunurken, en yüksek protein değeri berlam derilerinden elde edilen kollajenlerde (%93,60) bulunmuştur. Her üç balığın deri ve kemiklerinden elde edilen kollajenlerin nem ve kül içerikleri ise verim ve protein değerlerinin aksine deri örneklerinde daha düşük bulunmuştur. En düşük nem (%5,24) ve kül (%0,56) değeri berlam derilerinden elde edilen kollajende bulunurken, en yüksek nem (%9,26) ve kül (%0,98) değeri kolyoz kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinde tespit edilmiştir ($p<0,05$).

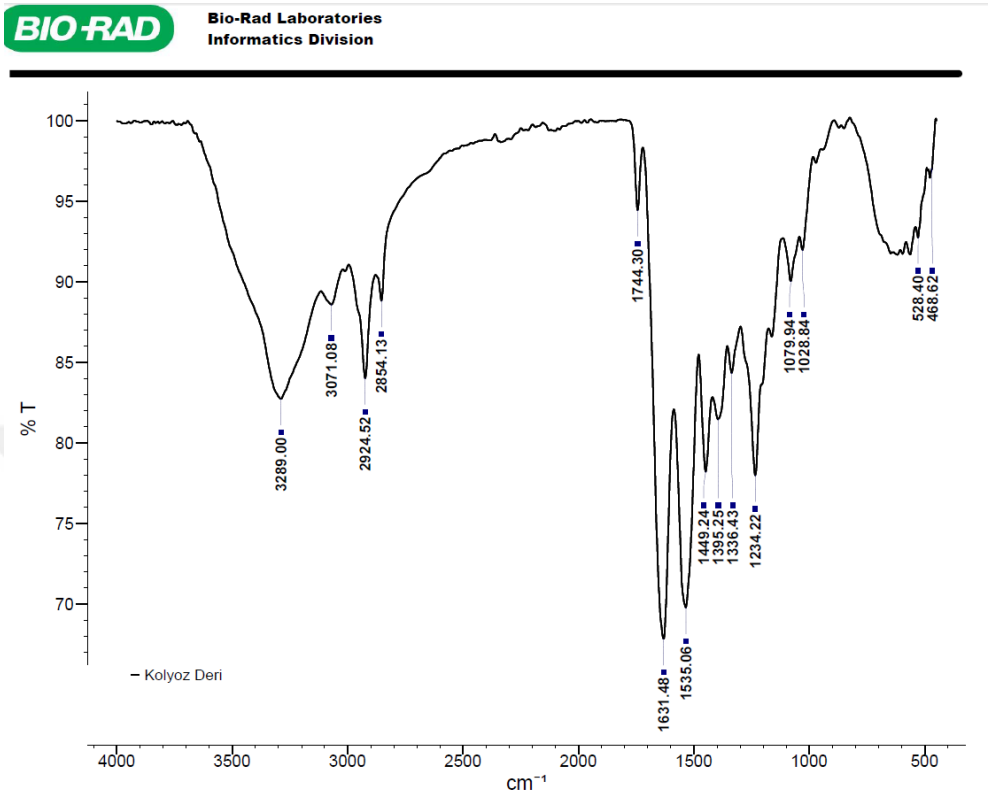
4.2. Kupes, Kolyoz, Berlam Deri ve Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi Sonuçları

FTIR spektroskopisi, proteinlerin ikincil yapısını belirlemek için yararlı olabilecek moleküler yapı hakkında benzersiz bilgi sağlayabilmektedir (Petibois ve ark., 2006). Mevcut çalışmada fonksiyonel grupların gözlemlenmesi ve proteinlerin ikincil yapılarının belirlenmesi amacı ile FTIR analizinden yararlanılmıştır.

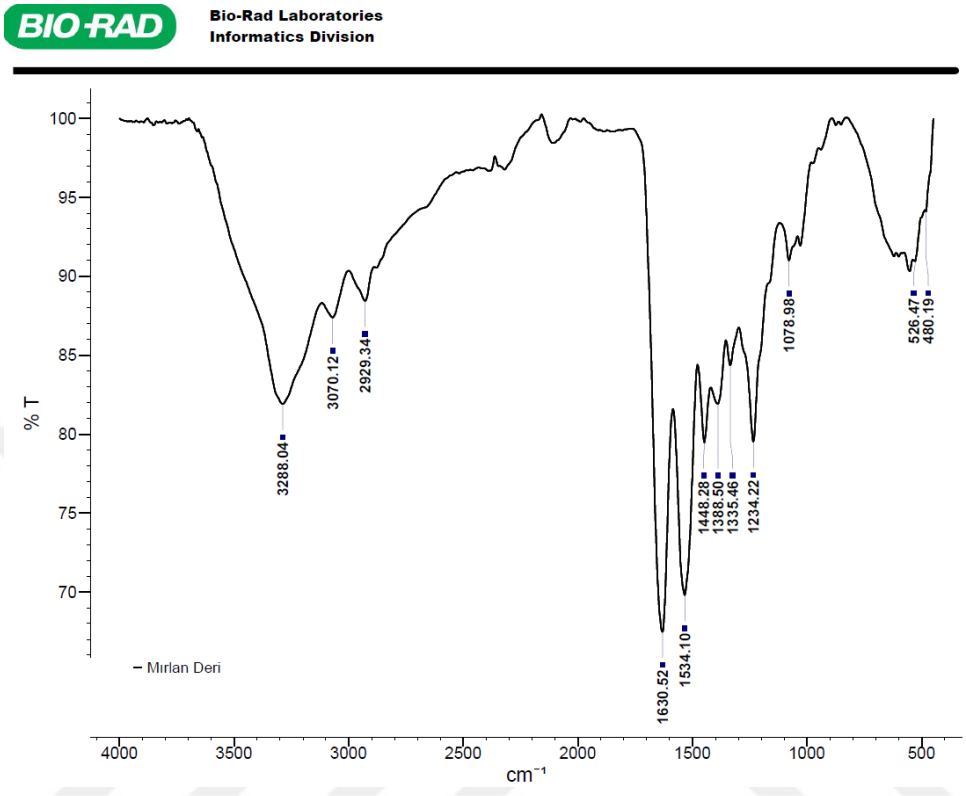
Mevcut çalışmada, kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin FTIR spektrumları Şekil 4.1-3'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Kupes Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumu



Şekil 4.2. Kolyoz Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumu



Şekil 4.3. Berlam Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumu

Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin FTIR spektrum detayları Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Kupes, Kolyoz ve Berlam Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumlarında Gözlenen Fonksiyonel Gruplar ve Bunların Karakteristik Dalga Sayıları

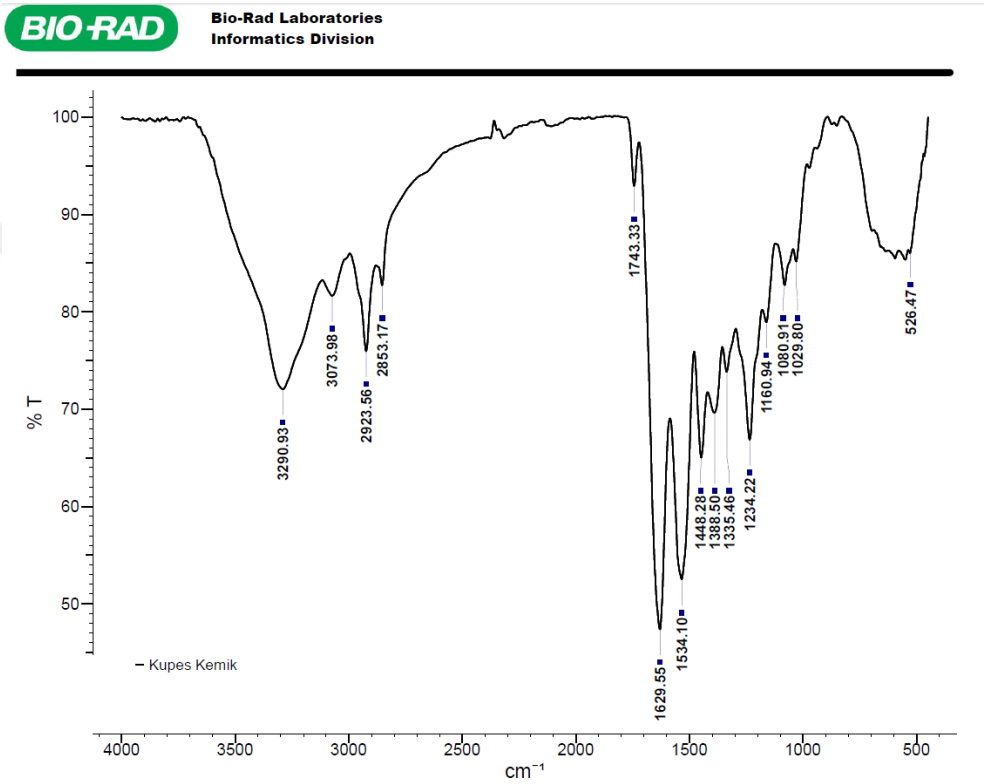
Bölge	Dalga Boyu Pikleri (cm^{-1})			Fonksiyonel Grup
	Kupes Deri	Kolyoz Deri	Berlam Deri	
Amid A	3292	3289	3288	N-H gerilim titreşimi
Amid B	2925	2854	2929	CH_2 asimetrik gerilimi
Amid I	1630	1631	1630	C=O /COO- hidrojen bağı gerilimi
Amid II	1534	1535	1534	N-H bağı gerilimi
Amid III	1234	1234	1234	N-H bağı C-N gerilimi

Örneklerin FTIR analiz sonuçları birbirlerine çok yakın bulunmuş, Amid III bandı tüm örneklerde aynı sonucu vermiştir. Kollajen için karakteristik absorpsiyon pikleri Amid A, Amid B, Amid I, Amid II ve Amid III' dür. Amid A bandı genellikle N-H gerilme titreşimi ile ilgilidir. Serbest bir N-H gerilme titreşimi 3400-3440 cm^{-1} aralığında meydana gelir. Bir peptidin N-H grubu bir hidrojen bağı içerdiğinde, band görünümü genellikle 3.300 cm^{-1} gibi düşük dalga boylarına kaydırılır (Doyle ve ark., 1975). Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin Amid A bandı sırasıyla 3292 cm^{-1}, 3289 cm^{-1}, 3288 cm^{-1} olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar N-H gerilme titreşimlerinin hidrojen bağı içerdiklerini göstermektedir. Amid B bandı, alkenil C-H' nin asimetrik gerilme titreşimini ve ayrıca $NH3^{+}$'ü temsil etmektedir ve 2850-2950 cm^{-1} dalga boyunda

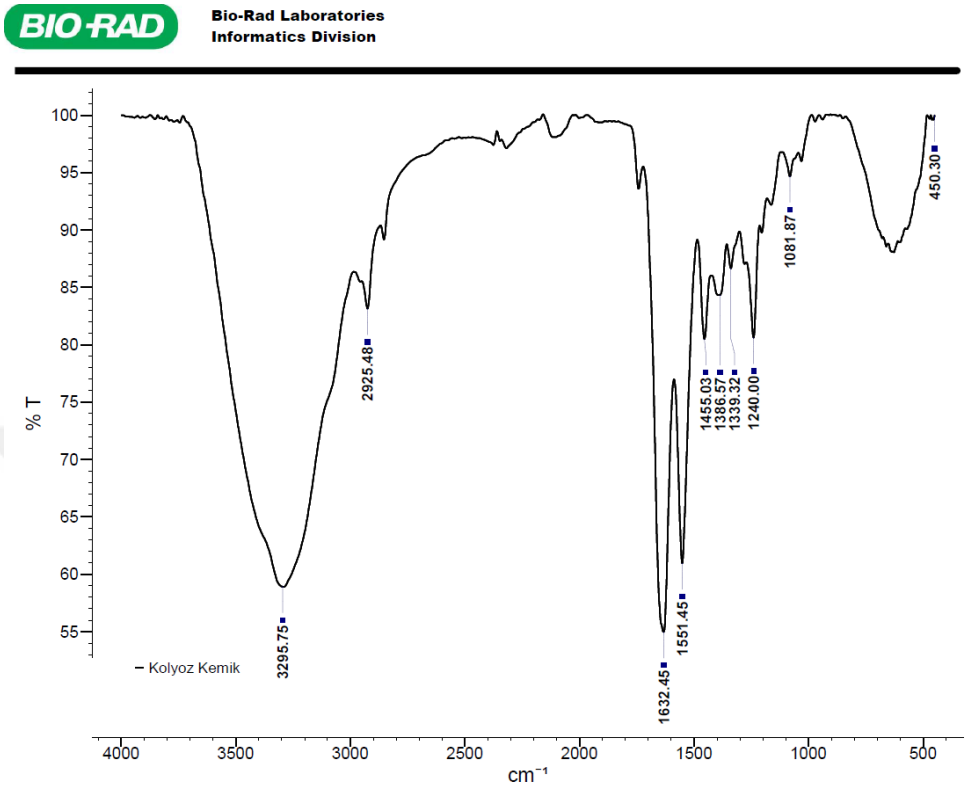
gözlenmiştir (Lee ve ark., 2016). Çalışmadaki mevcut sonuçlara göre kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin Amid B bandı sırasıyla 2925 cm^{-1}, 2854 cm^{-1}, 2929 cm^{-1} olarak bulunmuştur. Amid I, II ve III bölgelerinin bir polipeptitin şekli ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir. Polipeptitlerdeki karbonil gruplarının gerilme titreşimleriyle ilişkili olan 1600-1700 cm^{-1} dalga boyunda bulunan Amid I bandı, bir proteinin ikincil yapısını belirlemede en önemli faktör olarak kabul edilmektedir (Pati ve ark., 2010; Liu ve ark., 2014b). Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin Amid I bandı sırasıyla 1630 cm^{-1}, 1631 cm^{-1} ve 1630 cm^{-1} olarak bulunmuştur. 1550-1600 cm^{-1} aralığında normal bir absorpsiyon değerine sahip olan Amid II bandı, esas olarak C-N gerilme titreşimleriyle birleştirilmiş N-H bağı ile ilişkilidir ve daha düşük dalga boylarına kayma, hidrojen bağı oluşumunu göstermektedir. Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin Amid II band sonuçları referans değerleri arasında bulunmuş olup sırasıyla 1535 cm^{-1}, 1535 cm^{-1}, 1534 cm^{-1} olarak ölçülmüştür. Amid III bandı C-N gerilme titreşimi ile N-H bağı ile ilgilidir ve kollajenin üçlü sarmal yapısını göstermektedir (Woo ve ark., 2008). Amid III bandı kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde aynı (1234 cm^{-1}) bulunmuştur. Çalışmada elde edilen sonuçlar ekstrakte edilen kollajen örneklerinin üçlü sarmal yapıya sahip olduklarını desteklemektedir.

Literatürde bulunan benzer çalışmalara göre, *Misgurnus anguillicudatus* türü derilerden ekstrakte edilen asitte çözünür kollajen örneklerinin Amid A, Amid B, Amid I, Amid II ve Amid III değerlerinin sırasıyla 3323 cm^{-1}, 2928 cm^{-1}, 1658 cm^{-1}, 1548 cm^{-1} ve 1238 cm^{-1} olarak bulunduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2018). Deniz ve tatlı su alabalık derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde de benzer sonuçlara rastlanmıştır. Çalışmada Amid A bandı sırasıyla 3328 cm^{-1}, 3332 cm^{-1}, Amid B bandı sırasıyla 2890 cm^{-1}, 2898 cm^{-1}, Amid I bandı sırasıyla 1674 cm^{-1}, 1696 cm^{-1}, Amid II bandı sırasıyla 1546 cm^{-1}, 1554 cm^{-1} ve Amid III bandı sırasıyla 1210 cm^{-1}, 1214 cm^{-1} olarak bulunmuştur (Lee ve ark., 2016).

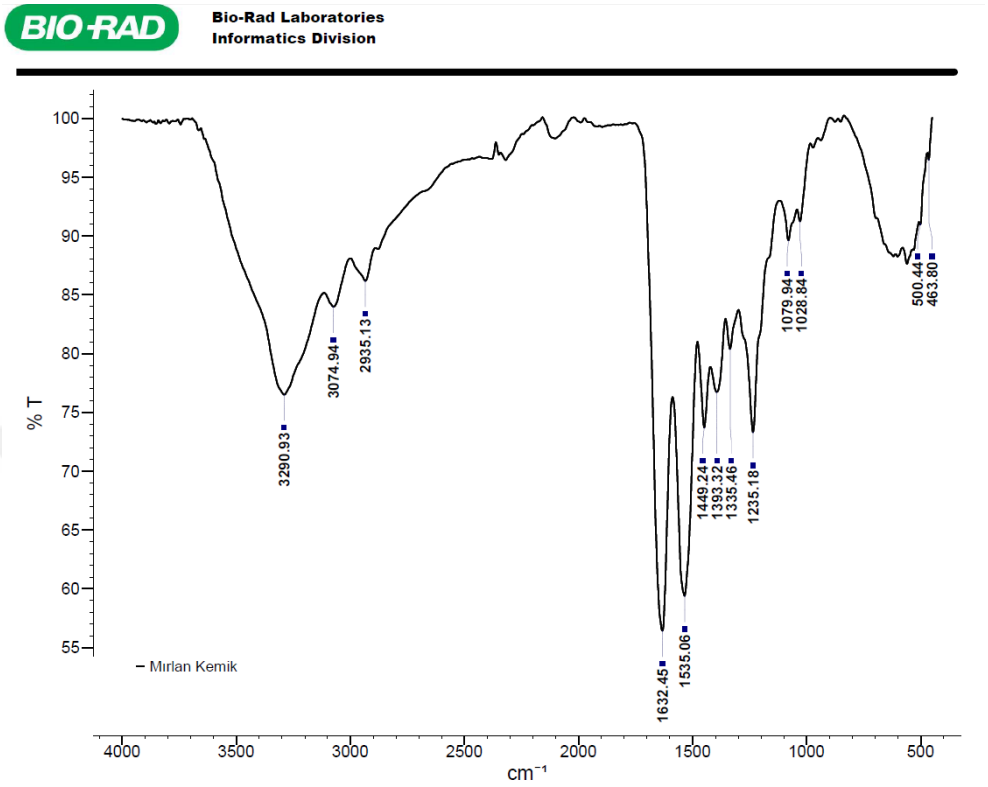
Mevcut çalışmada kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin FTIR analizi sonuçları da birbirine çok yakın bulunmuş olup spektrumlar Şekil 4.4-6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Kupes Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumu



Şekil 4.5. Kolyoz Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumu



Şekil 4.6. Berlam Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumu

Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin FTIR spektrum detayları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kupes, Kolyoz Ve Berlam Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin FTIR Spektrumlarında Gözlenen Fonksiyonel Gruplar ve Bunların Karakteristik Dalga Sayıları

Bölge	Çalışmadaki Dalga Boyu Pikleri (cm^{-1})			Fonksiyonel Grup
	Kupes Kemik	Kolyoz Kemik	Berlam Kemik	
Amid A	3290	3295	3290	N-H gerilim titreşimi
Amid B	2923	2925	2935	CH_2 asimetrik gerilimi
Amid I	1629	1632	1632	C=O /COO- hidrojen bağı gerilimi
Amid II	1534	1551	1535	N-H bağı gerilimi
Amid III	1234	1240	1235	N-H bağı C-N gerilimi

Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin FTIR analizi sonuçlarına göre; Amid A bandı sırasıyla 3290 cm^{-1}, 3295 cm^{-1}, 3290 cm^{-1}, Amid B bandı sırasıyla 2923 cm^{-1}, 2925 cm^{-1}, 2935 cm^{-1}, Amid I bandı sırasıyla 1629 cm^{-1}, 1632 cm^{-1}, 1632 cm^{-1}, Amid II bandı sırasıyla 1534 cm^{-1}, 1551 cm^{-1}, 1535 cm^{-1} ve Amid III bandı sırasıyla 1234 cm^{-1}, 1240 cm^{-1} ve 1235 cm^{-1} olarak bulunmuştur. Mevcut tez konusu ile ilgili yapılan önceki çalışmalar incelendiğinde benzer sonuçlara rastlanmıştır. Wang ve ark. (2008) *Sebastes mentella* türü deri, pul ve kemiklerinden kollajen ekstrakte etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Çalışmanın FTIR analizi sonuçlarındaki çok küçük farklılıkların kollajen örneklerinin ikincil yapısındaki bazı farklılıkları gösterdiği bildirilmiştir. Kollajen örneklerinin üçlü sarmal yapısı, örneklerin gösterdikleri 1240 cm^{-1} ve 1454 cm^{-1} arasında değişen (Amid III) absorpsiyon

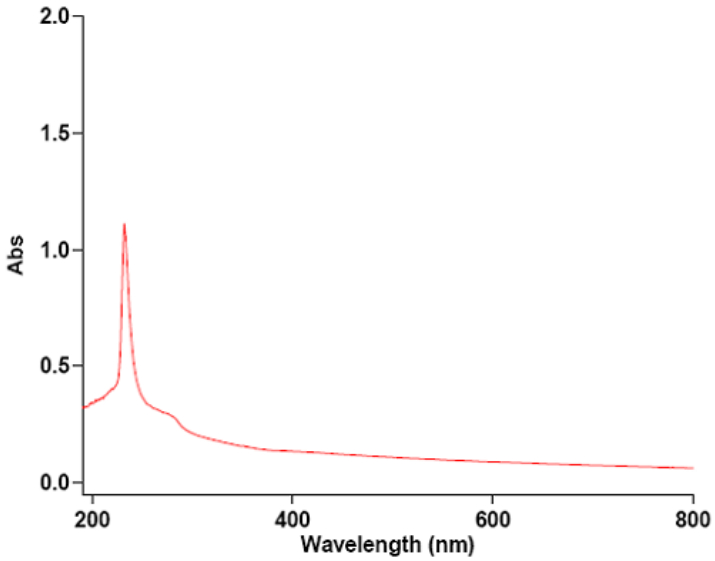
değerleri ile konfirme edilmiştir. Amid A bandı deri, pul ve kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde sırasıyla 3425 cm^{-1}, 3296 cm^{-1} ve 3300 cm^{-1} olarak bulunmuştur. Yapılan farklı bir çalışmada *Magalaspis cordyla* ve *Otolithes ruber* kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin FTIR analizi sonuçlarına göre standart tip I kollajen ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2012). Amid I bandı 1650 cm^{-1}, Amid II bandı 1530 cm^{-1} ve Amid III bandı 1240 cm^{-1} absorpsiyon değerleri ile mevcut çalışmadaki sonuçlar ile benzer bulunmuştur. Balık kemiklerinden kollajen ekstraksiyonun yapıldığı farklı çalışmalarda da benzer sonuçlara rastlanmıştır ve mevcut çalışma sonuçları ile örtüşmektedir (Li-li ve ark., 2011; Kumar ve ark., 2012; Li ve ark., 2013).

4.3. Kupes, Kolyoz, Berlam Deri ve Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Ultraviyole ve Görünür Işık (UV-Vis) Absorpsiyon Spektroskopi Analizi Sonuçları

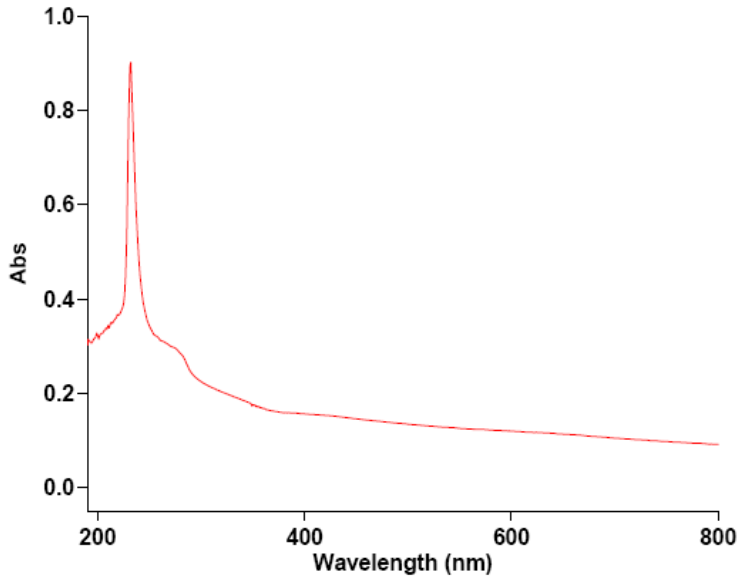
Ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis) absorpsiyon spektroskopisi bir ışın demetinin bir örnekten geçtikten veya bir örnek tarafından yansıtıldıktan sonra ışının azalmasının ölçülmesidir. Işının şiddetinin azalması absorpsiyonun arttığını gösterir. Örneğin derişimi, belirli bir dalga boyundaki absorpsiyonunu ölçerek bulunur. UV-Vis spektroskopisi genellikle çözeltideki moleküller veya inorganik iyon ve komplekslerin ölçümünde kullanılır. Bir başka amaçla Uv-Visible spektrofotometre 190-900 nanometre arasındaki renkli anorganik kompleksler ve organik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif belirlenmesinde kullanılır. Genellikle protein molekülleri, UV ışığını absorbe eden 3 farklı bölgeye sahiptir, bunlar: (1) 250 ~ 280 nm aralığında, aromatik seri kalıntısı absorpsiyonu; (2) 210-250 nm aralığında, bazı hidrojen bağı ya da diğer yapı ve sarmalların etkileşimi ile aromatik ve diğer kalıntıların absorpsiyonu gibi birçok faktörden dolayı absorpsiyon; (3) 210 nm'nin altındaki peptit bağı ve birçok yapı faktörü nedeniyle absorpsiyondur (Li-li ve ark., 2011). Kollajeni karakterize etmenin temel ve basit

yolunun örneği 200-400 nm dalga boyu aralığında taramanın olduğu ve kollajenin maksimum absorbansı 230 nm' de verdiği bildirilmiştir (Piez, 1965).

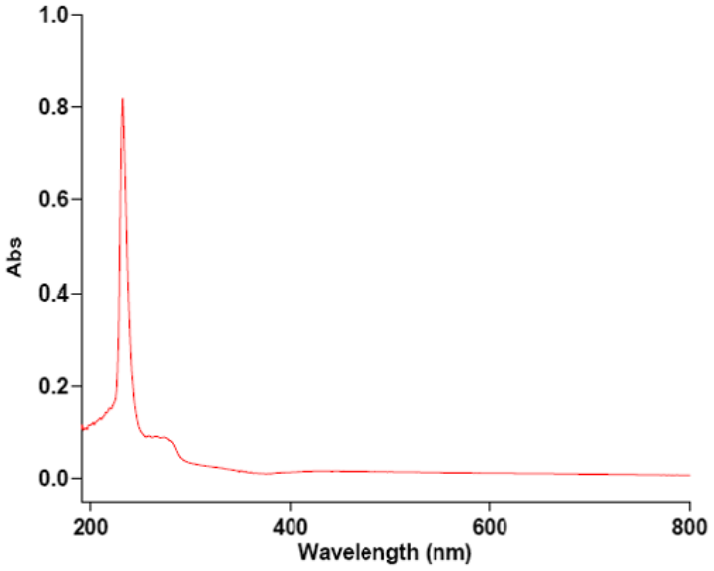
Mevcut çalışmada 190-800 nm aralığında tarama yapılmış, bu sonuca çok yakın sonuçlar elde edilmiş ve kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin maksimum absorbansı 232 nm'de verdiği sonuçlarına ulaşılmıştır. Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin UV-Vis sonuçları sırasıyla Şekil 4.7-4.9'da sunulmuştur.



Şekil 4.7. Kupes Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin UV-Vis Spektrumu

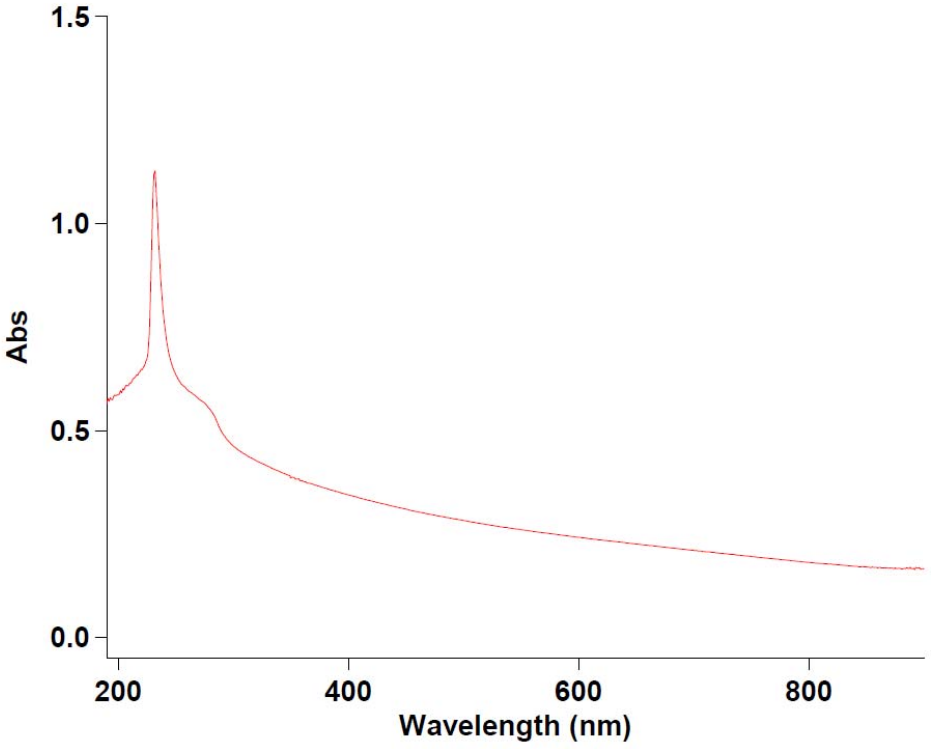


Şekil 4.8. Kolyoz Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin UV-Vis Spektrumu

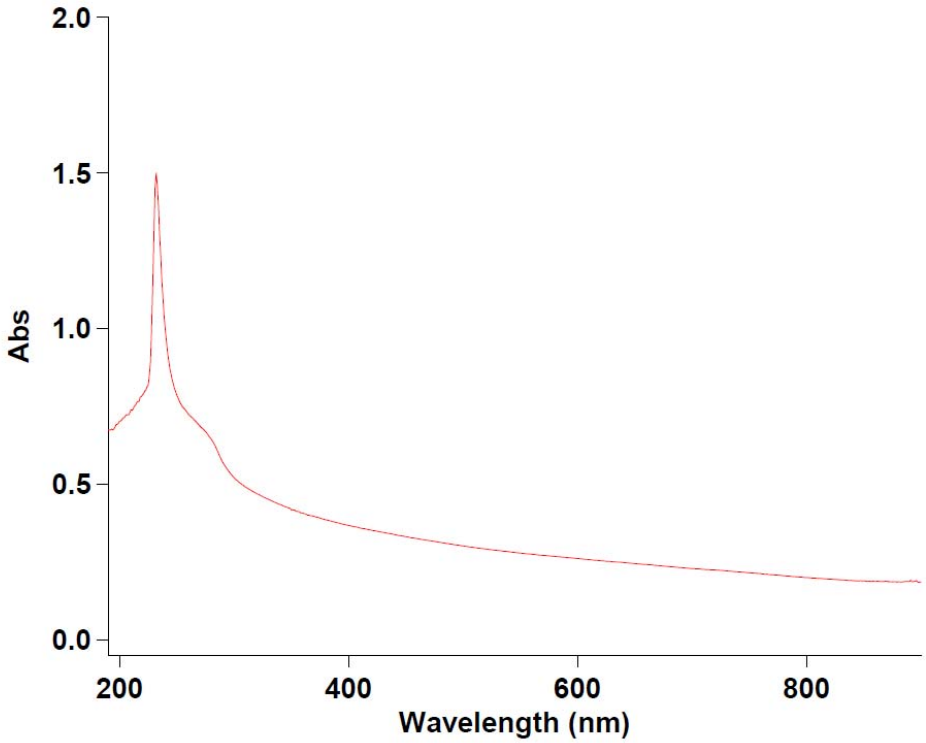


Şekil 4.9. Berlam Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin UV-Vis Spektrumu

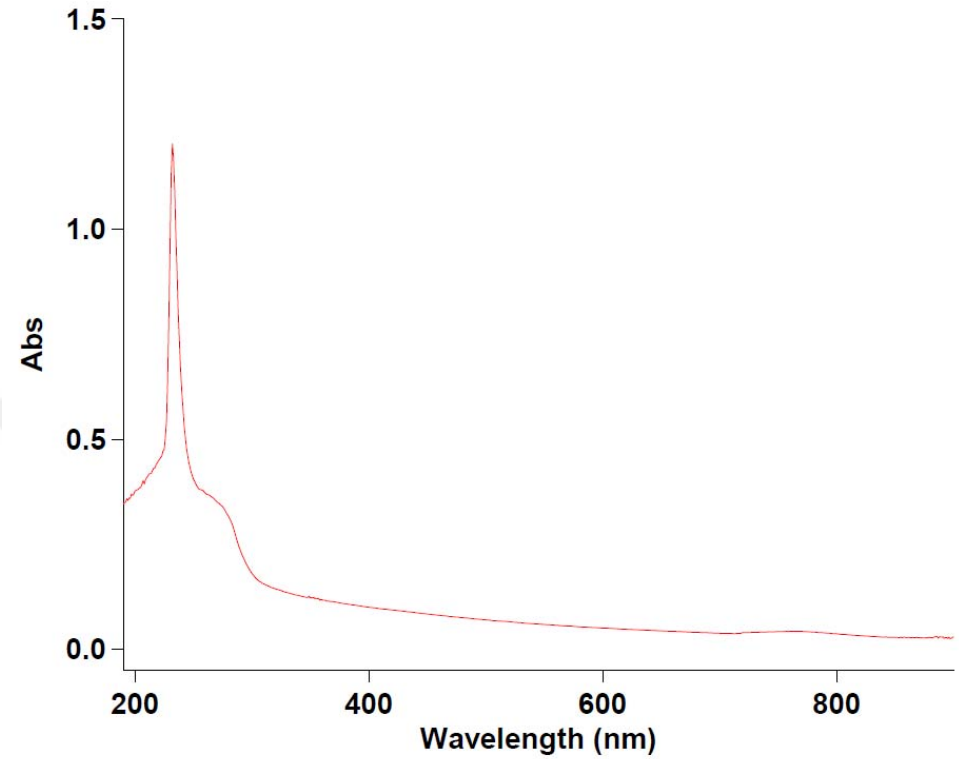
Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin UV-Vis sonuçları ise sırasıyla Şekil 4.10-4.12'da sunulmuştur.



Şekil 4.10. Kupes Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin UV-Vis Spektrumu



Şekil 4.11. Kolyoz Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin UV-Vis Spektrumu



Şekil 4.12. Berlam Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin UV-Vis Spektrumu

Mevcut çalışmadakine benzer olarak yapılan önceki çalışmalarda da benzer sonuçların alındığı gözlenmektedir. Anand ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada *Lates calcarifer* ve *Pagrus auratus* türleri derilerinden kollajen ekstrakte etmişler ve UV-Vis ölçümlerinde maksimum absorbans değerlerini sırasıyla 236 ve 239 nm olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar alaska mezgiti ve kedi balığı derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin UV-Vis maksimum absorbans değerlerinin sırasıyla 232 ve 230 nm olarak kendi çalışmalarındaki sonuçlar ile tutarlı bulunduğunu ve *Lates calcarifer* ve *Pagrus auratus* türleri derilerinden elde ettikleri kollajen örneklerinin yüksek saflıkta olduğunu bildirmişlerdir. Mevcut çalışma sonuçlarındaki maksimum absorbans değerlerinin 232 nm'de bulunması

ekstrakte edilen kollajen örneklerinin de yüksek saflıkta olduklarını kanıtlamaktadır. Literatürde yapılan benzer çalışmalarda; *Parastromateus niger* türü derilerinden elde edilen kollajen örneklerinin 220 nm'de absorpsiyon gösterdiği, düşük dalga boyundaki absorpsiyon değerinin kollajenin polipeptit zincirlerindeki C=O, -COOH, $CONH_2$ gruplarından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Mahboob ve ark., 2014). Tanaka ve ark. (2018) *Thunnus orientalis* derilerinden ekstrakte ettikleri kollajen örneklerinin UV-Vis değerinin 238 nm olduğunu, Yu ve ark. (2018) *Nibea japonicus* derilerinden ekstrakte ettikleri kollajen örneklerinin 230 nm'de tek absorpsiyon piki verdiğini bildirmişlerdir.

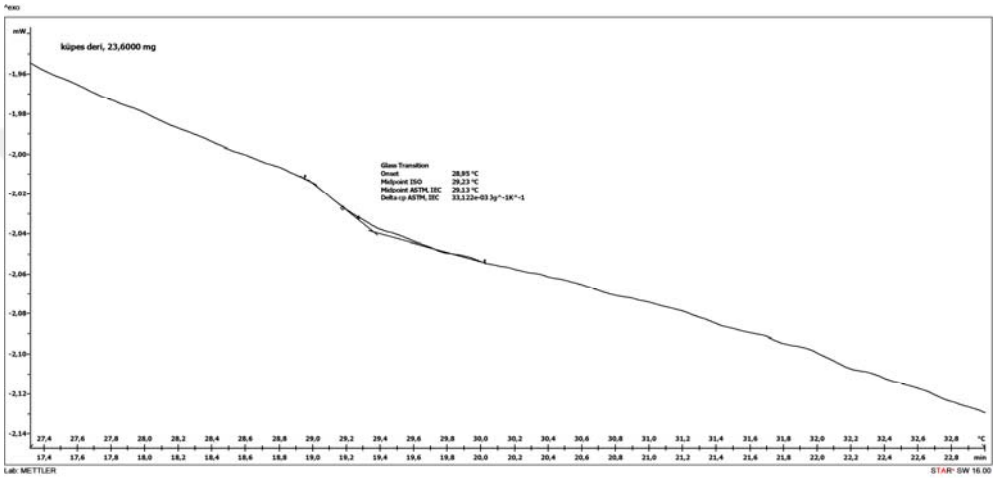
Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin maksimum absorbansı ise 232 nm olarak bulunmuştur. Wang ve ark. (2013) *Gadus makrocephalus* kemiklerinden asitte çözünür kollajen ekstrakte etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Araştırmacılar çalışmanın UV-Vis sonuçlarına göre maksimum absorbansın 230 nm'de görüldüğünü ve bu karakteristik pik ile elde ettikleri kollajenin yüksek saflıkta olduğunu bildirmişlerdir. Benzer sonuçlar 230 nm ile *Magalaspis cordyla* ve *Otolithes ruber* kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinde (Kumar ve ark., 2012), 234 nm ile yılan balığı kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinde (Li-li ve ark., 2011) bulunmuştur.

4.4. Kupes, Kolyoz, Berlam Deri ve Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi Sonuçları

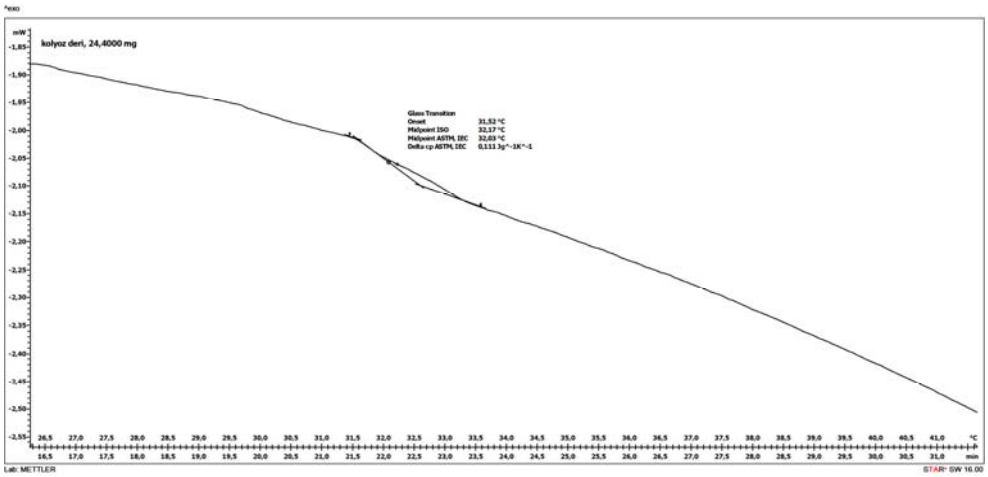
Diferansiyel taramalı kalorimetre, materyaller ısıtma sırasında fiziksel ve kimyasal değişikliklere maruz kaldıklarından dolayı bunların termal davranışlarını incelemek için kullanılmaktadır. Bu teknik, belirli bir madde kütlesinin sıcaklığını 1 derece kelvin kadar yükseltmek için gereken ısı miktarı olarak tanımlanan ısı kapasitesini ölçer. Polimerlerde, kristalleşme ve erime gibi fiziksel işlemlerle ilişkili termodinamik fonksiyonlardaki (entropi, entalpi ve serbest enerji) değişiklikleri hesaplamak için ısı kapasitesi ölçümleri kullanılabilir (Flandin ve ark. 1984). Diferansiyel taramalı kalorimetrenin (DSC), denatürasyon gerçekleştiğinde

önemli derecede ısı emilimi olması nedeni ile kollajenin termal denatürasyonunu incelemek için en iyi tekniklerden biri olduğu kanıtlanmıştır (Liu ve ark., 2014a).

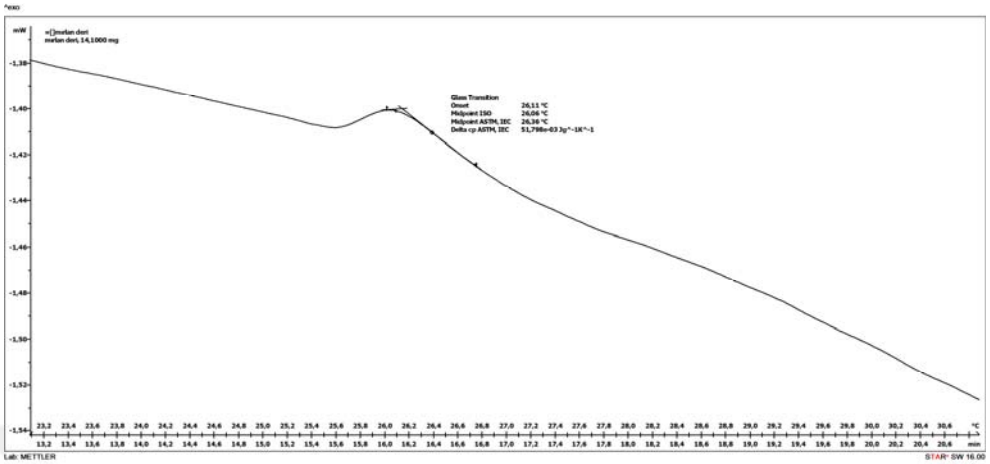
Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerine ait diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) sonuçları sırasıyla Şekil 4.13-4.15'da sunulmuştur.



Şekil 4.13. Kupes Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerine Ait Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Grafiği



Şekil 4.14. Kolyoz Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerine Ait Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Grafiği

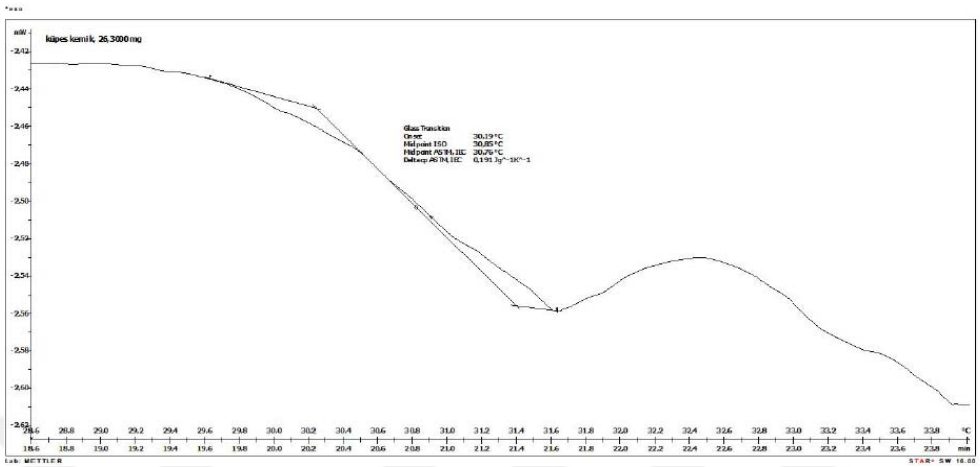


Şekil 4.15. Berlam Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerine Ait Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Grafiği

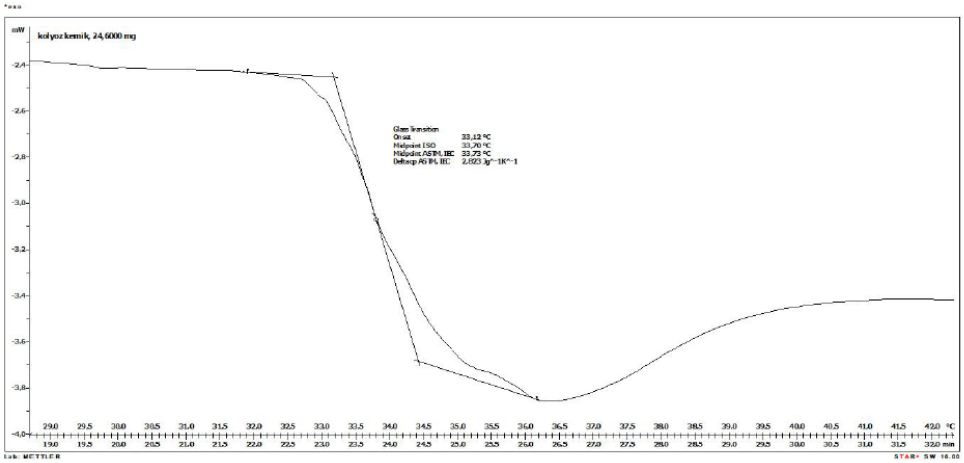
Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin denatürasyon sıcaklıkları sırasıyla 29,13ºC, 32,03ºC ve 26,36ºC olarak bulunmuştur. Çeşitli türlerden ekstrakte edilen kollajenler arasındaki maksimum sıcaklık farklılıklarının imino asit içeriği, prolin kalıntılarının hidroksilasyon derecesi, vücut sıcaklıkları ve çevresel sıcaklık ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (Nagai ve ark., 2008). Domuz ve sığır deri kollajenleri daha yüksek imino asit içeriğine sahip oldukları için (1000 amino asit kalıntısında sırasıyla 220 ve 215 kalıntı) balık derilerinden elde edilen kollajene göre daha yüksek sıcaklıklarda denatüre olurlar (Yan ve ark, 2008). Xu ve ark. (2017) yaptıkları çalışmanın diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) sonuçlarına göre; *Silurus meridionalis Chen* türü derilerinden ekstrakte ettikleri kollajen örnekleri ve Sigma marka sığır kollajeninde denatürasyon sıcaklıklarını sırasıyla 34,1 ºC ve 39,7 ºC olarak bulmuşlardır. Bu sonucun diğer birçok balık türü deri kollajeninden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Farklı ekstraksiyon sıcaklıkları ve süreleri kullanılarak nil tilapyası derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin denatürasyon sıcaklıkları 32,86 ºC, 33,12 ºC ve 32,83 ºC olarak bulunmuştur. Araştırmacılar elde ettikleri kollajen örnekleri denatürasyon sıcaklıklarının, sığır (37 ºC) ve domuz (37

ºC) gibi diğer kara hayvanları deri kollajeninden düşük olduğunu fakat birçok balık türü kollajeninden ise yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu farklılıkların hidroksiprolin içeriklerinden, vücut ve ortam sıcaklıkları farkından kaynaklanabileceğini vurgulamışlardır (Thuanthong ve ark., 2016). Yapılan benzer çalışmada *Clarias gariepinus*, *Salmo salar* ve *Gadus morhua* türü derilerinden elde edilen kollajen örneklerinin denatürasyon sıcaklıkları sırası ile 29,3ºC, 20,6ºC ve 15,2ºC olarak bulunmuştur ve sonuçların habitat sıcaklıkları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Tylingo ve ark, 2016). Litaratürde bulunan benzer çalışmalardaki DSC sonuçlarına göre kollajen örnekleri denatürasyon sıcaklıkları; kanal kedi balığı (*Ictalurus punctatus*) derisinde 36.12 ºC (Tan ve ark., 2018), *Probarbus jullieni* derisinde 36,28 ºC (Ali ve ark., 2018), *Chitala ornata* türü derisinde 36,28ºC (Kittiphattanabawon ve ark., 2015) olarak tespit edilmiştir. Mevcut çalışma diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) sonuçları da diğer balık türleri ile paralellik göstermektedir ve kupes, kolyoz ve berlam subtropik türler oldukları için ekstrakte edilen kollajenler de daha stabil özellik göstermektedir.

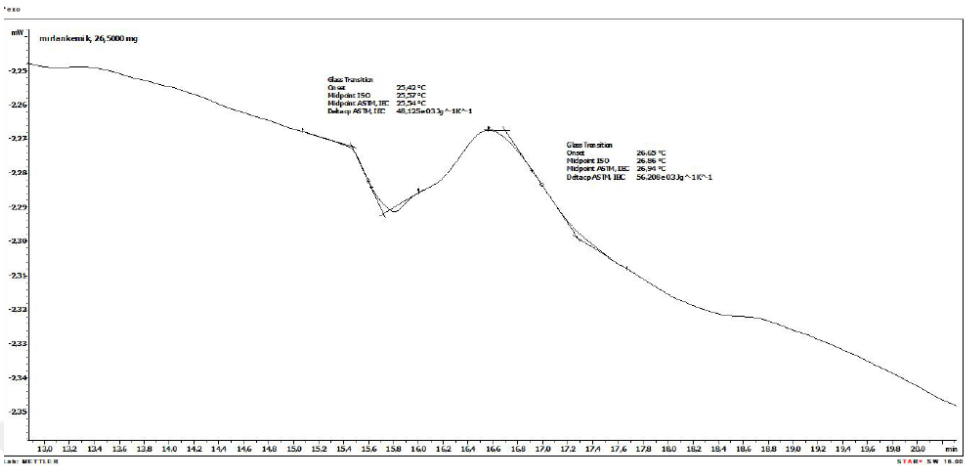
Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerine ait diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) sonuçları sırasıyla Şekil 4.16-4.18'de sunulmuştur.



Şekil 4.16. Kupes Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerine Ait Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Grafiği



Şekil 4.17. Kolyoz Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerine Ait Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Grafiği



Şekil 4.18. Berlam Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerine Ait Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Grafiği

Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin denatürasyon sıcaklıkları sırasıyla 30,76 ºC, 33,73 ºC ve 26,94 ºC olarak bulunmuştur. Yapılan benzer bir çalışmada *Priacanthus tayenus* türü deri ve kemiklerinden asitte çözünür kollajen elde edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Araştırmacılar çalışmanın DSC analizi sonuçlarına göre denatürasyon sıcaklığını deri ve kemik örneklerinde sırasıyla 28,68 ºC ve 30.80 ºC olarak bulduklarını bildirmişler ve imino asit içeriği ne kadar yüksek olursa kollajenin sarmal yapısının da bir o kadar kararlı olacağını vurgulamışlardır (Kittiphattanabawon ve ark., 2005).

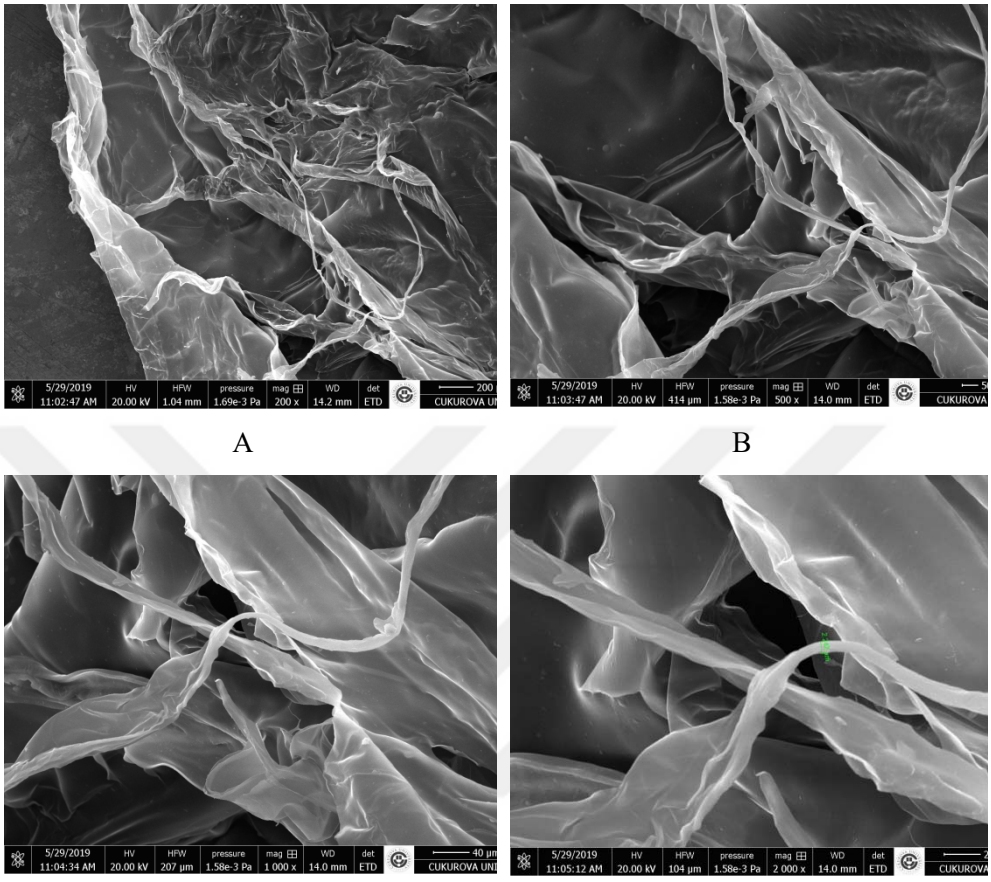
Kupes, kolyoz, berlam deri ve kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinin DSC sonuçları genel olarak incelendiğinde, 33,73 ºC ile en yüksek denatürasyon sıcaklığı kolyoz kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinde bulunmuştur.

4.5. Kupes, Kolyoz, Berlam Deri ve Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçları

Kolyoz, kupes ve berlam balıklarının deri ve kemiklerinden ekstrakte edilen asitte çözünür farklı kollajen örneklerine ait farklı boyutlardaki Taramalı

Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri sırasıyla Şekil 4.19-24'de gösterilmiştir. Çalışmada sırasıyla 200x, 500x, 1000x ve 2000x büyütmeler yapılarak görüntüler alınmıştır.

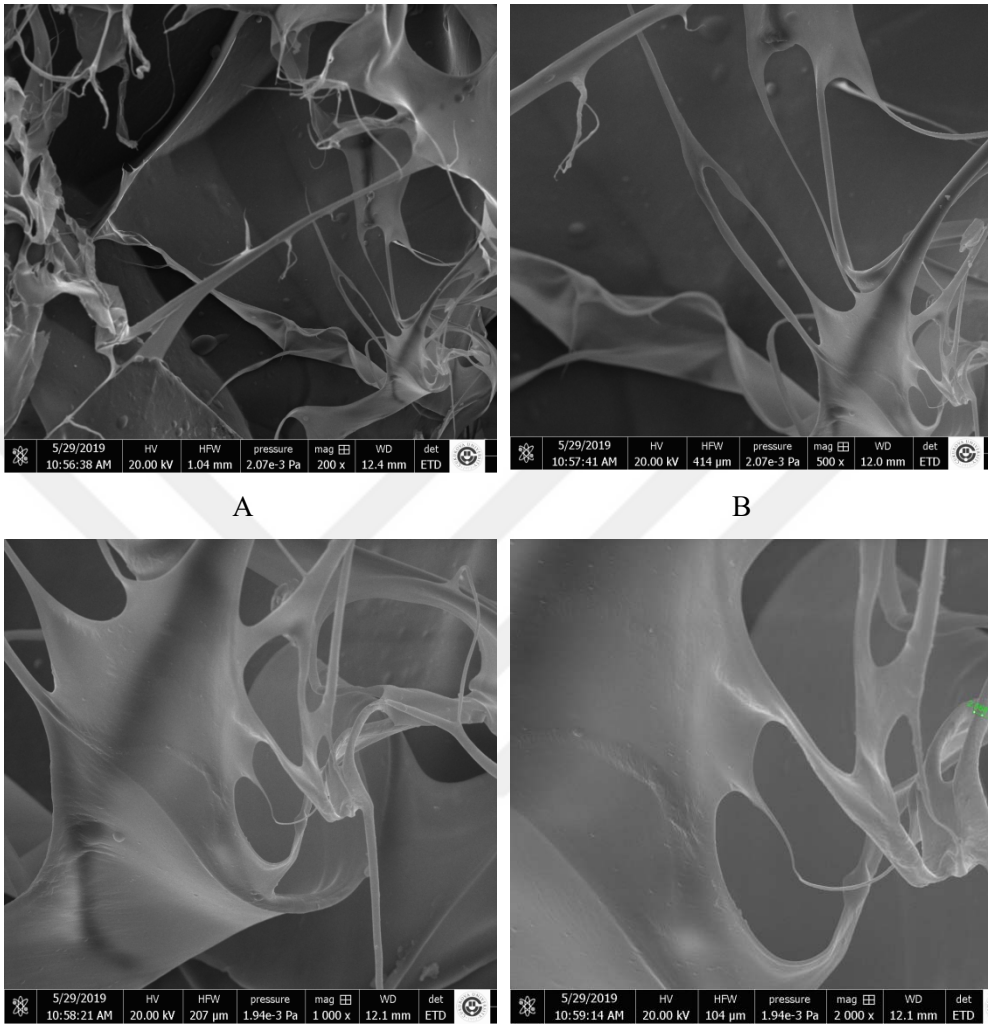
Taramalı elektron mikroskobu elektronları kullanarak numune yüzeyinden yüksek çözünürlüklü görüntü almaya yarayan sistemdir ve numune yüzeyinin üç boyutlu görüntülerinin elde edilmesinde kullanılmaktadır. Mevcut çalışma sonuçlarına göre, kollajenlerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile 2000x büyütmede elde edilen görüntülerinden hesaplanan lif kalınlığı ölçümlerinin bazıları şu şekildedir; kolyoz derilerinden elde edilen kollajen örneklerinde 2,24 µm ve 4,31 µm, kupes derilerinden elde edilen kollajen örneklerinde 2,56 µm ve 2,96 µm, berlam derilerinden elde edilen kollajen örneklerinde 0,87 µm ve 1,44 µm; kolyoz kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinde 5,92 µm, kupes kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinde 2,91 µm ve 3,44 µm ve berlam kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinde 1,77 µm, 5,21 µm ve 7,66 µm.



A B

C D

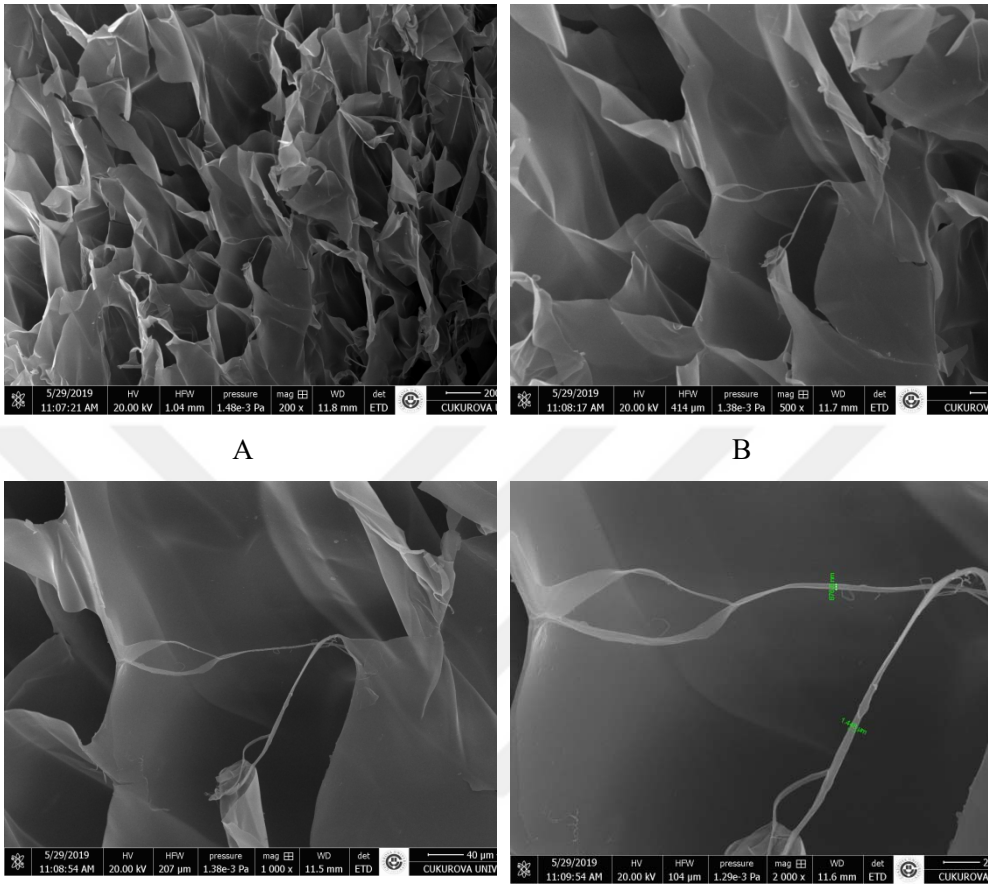
Şekil 4.19. Kolyoz Derilerinden Elde Edilen Kollajenin SEM Görüntüleri (A) 200x; (B) 500x; (C) 1000x; (D) 2000x



A B

C D

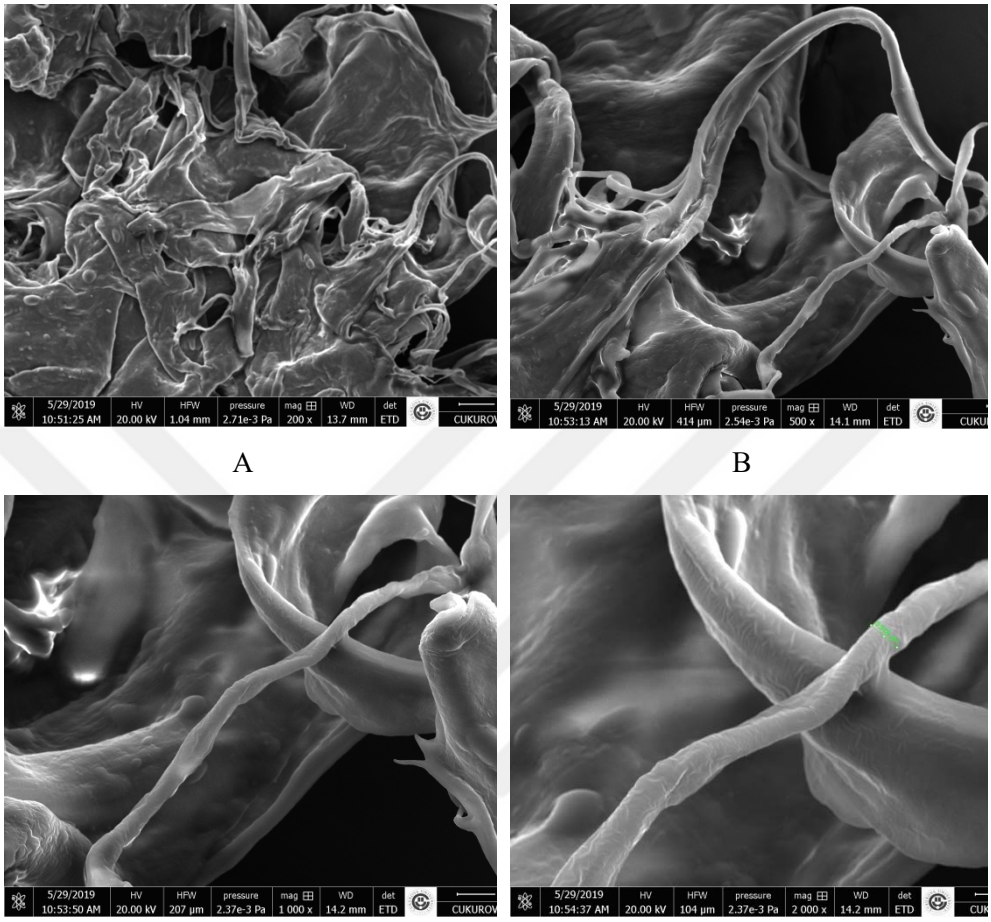
Şekil 4.20. Kupes Derilerinden Elde Edilen Kollajenin SEM Görüntüleri (A) 200x; (B) 500x; (C) 1000x; (D) 2000x



A B

C D

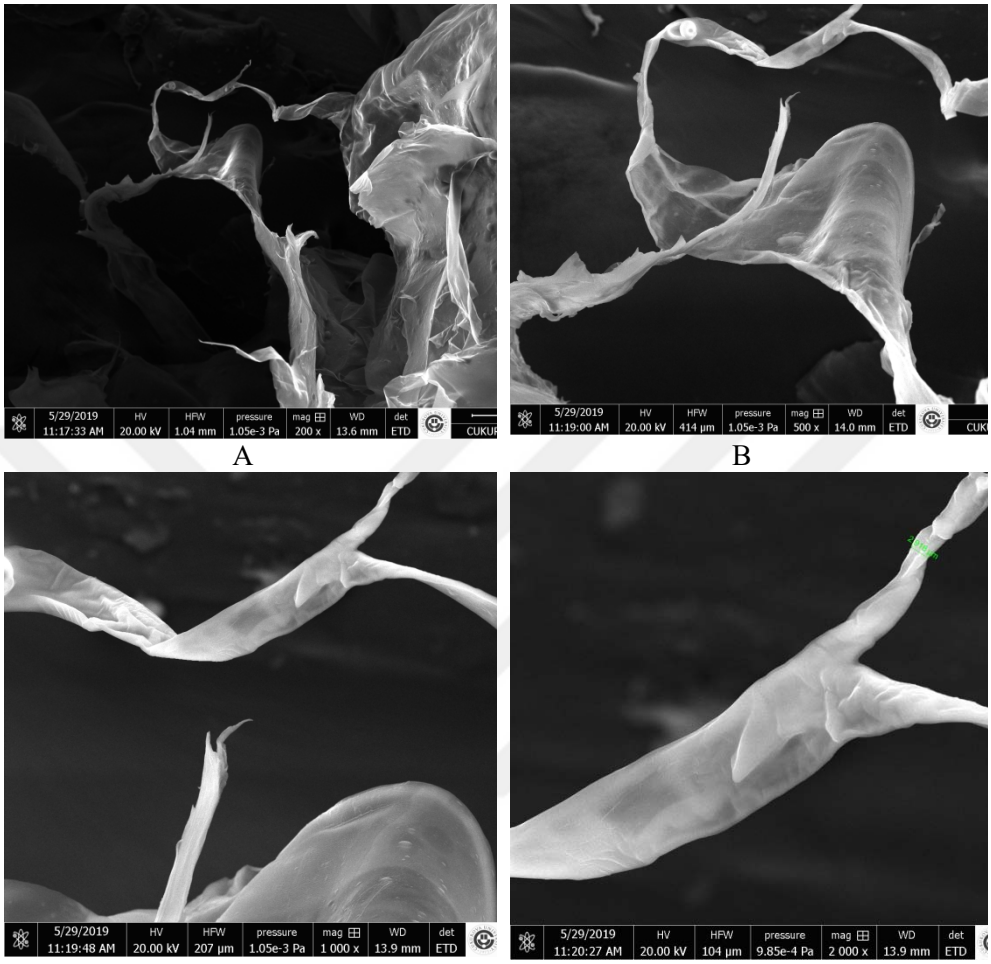
Şekil 4.21. Berlam Derilerinden Elde Edilen Kollajenin SEM Görüntüleri (A) 200x; (B) 500x; (C) 1000x; (D) 2000x



A B

C D

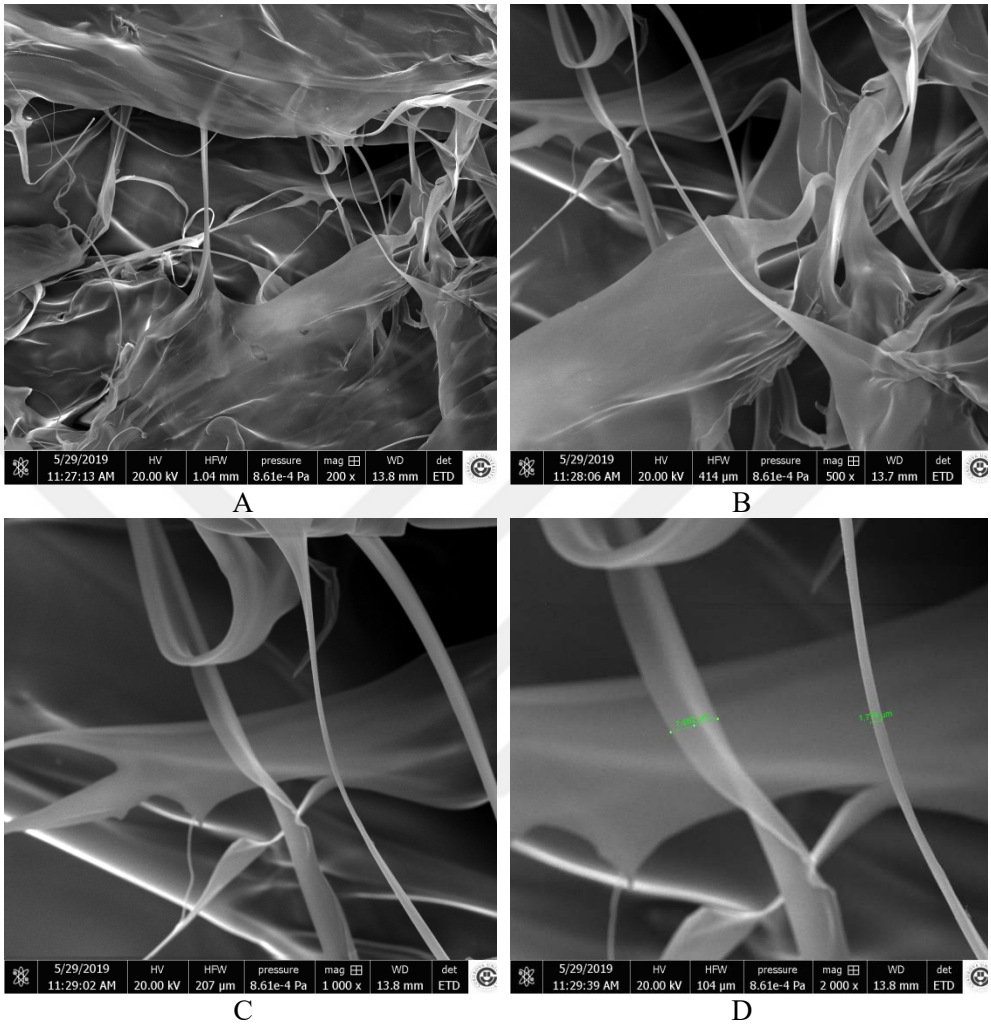
Şekil 4.22. Kolyoz Kemiklerinden Elde Edilen Kollajenin SEM Görüntüleri (A) 200x; (B) 500x; (C) 1000x; (D) 2000x



A B

C D

Şekil 4.23. Kupes Kemiklerinden Elde Edilen Kollajenin SEM Görüntüleri (A) 200x; (B) 500x; (C) 1000x; (D) 2000x



Şekil 4.24. Berlam Kemiklerinden Elde Edilen Kollajenin SEM Görüntüleri (A) 200x; (B) 500x; (C) 1000x; (D) 2000x

Liyofilize kollajen örnekleri incelendiğinde gözenekli ve süngerimsi bir yapıya sahip olduğu gözlenmektedir. Elde edilen SEM görüntüleri de bu gözenekli yapıyı destekler niteliktedir. Ayrıca görüntüler incelendiğinde kollajenin sahip olduğu fibriler yapı da açıkça görünmektedir. Dondurarak kurutma teknolojisi yani liyofilizasyon homojen gözeneklere sahip kollajen geliştirmek için kullanılan iyi bir yöntemdir. Fibriler ve tabaka benzeri film yapıları bağlanabilirliği ile kollajenin yeni doku oluşumu, hücre kültürü, büyüme, yaraların iyileşmesi ve gen

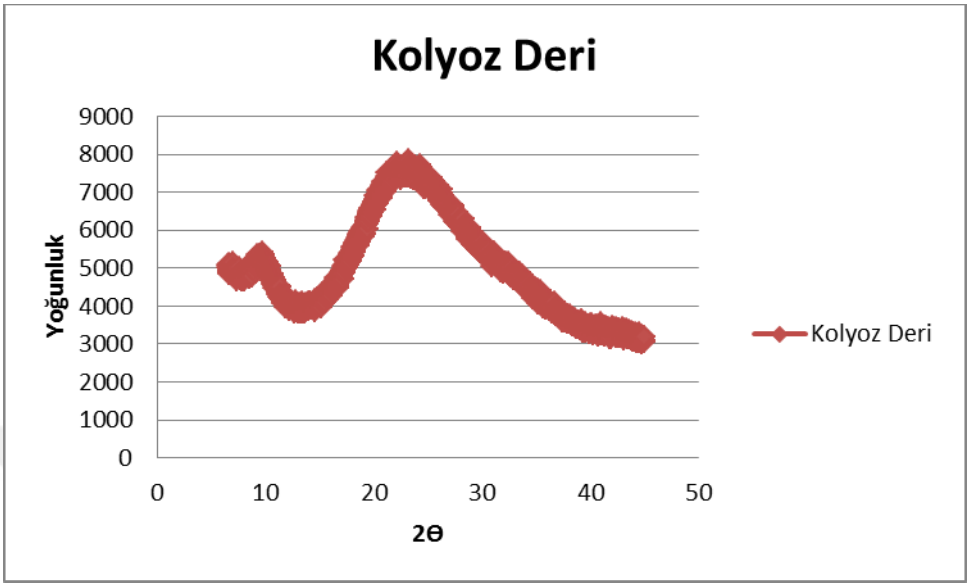
ekspresyonunda kullanılabilir olduğunu ortaya koymaktadır (Zhao ve ark., 2018; Abdollahi ve ark., 2018). Ramanathan ve ark. (2014) *Arothron stellatus* derilerinden asitte çözünür kollajen ekstrakte etmişler ve krakterizasyonunu yapmışlardır. Çalışmanın SEM sonuçlarına göre ekstrakte edilen kollajen örneklerinin katmanlı yapıya sahip olduğu ve bu katmanların ise birbirine geçmiş fibril sarmallarından oluştuğunu bildirmişlerdir. Kollajenin bu düzgün örgülü doğasının eksüdaların (sızan sıvı) yaradan emilmesini ve oksijen geçişine izin vererek yaranın kuru kalmasını sağlayabileceğini vurgulamışlardır.

4.6. Kupes, Kolyoz, Berlam Deri ve Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin X-Işını Kırınım Difraktometresi (XRD) Analizi Sonuçları

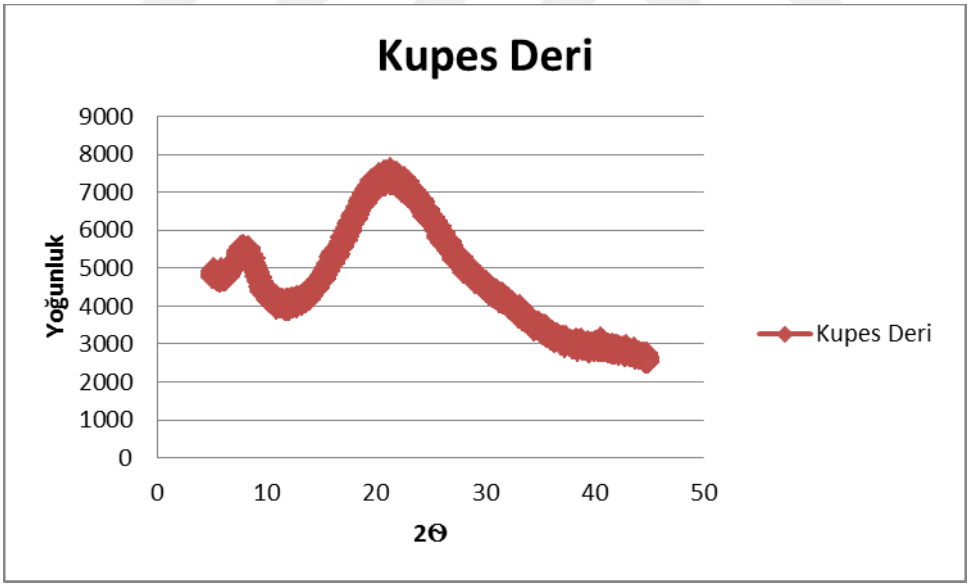
X-ışını kırınım yöntemi (XRD), her bir kristalin fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak, X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanmaktadır. XRD genellikle polimer kristal yapılarını analiz etmek için kullanılır. X-ışını kristalimsi parçacıkları karşıladığında kırınım meydana gelir ve kırılma tepe noktasının konumu ve yoğunluğu kristallerin yapısal özelliklerini yansıtabilir (Duan ve ark., 2018).

Kolyoz, kupes, berlam deri ve kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerine ait X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) görüntüleri sırasıyla Şekil 4.25-30'da sunulmuştur.

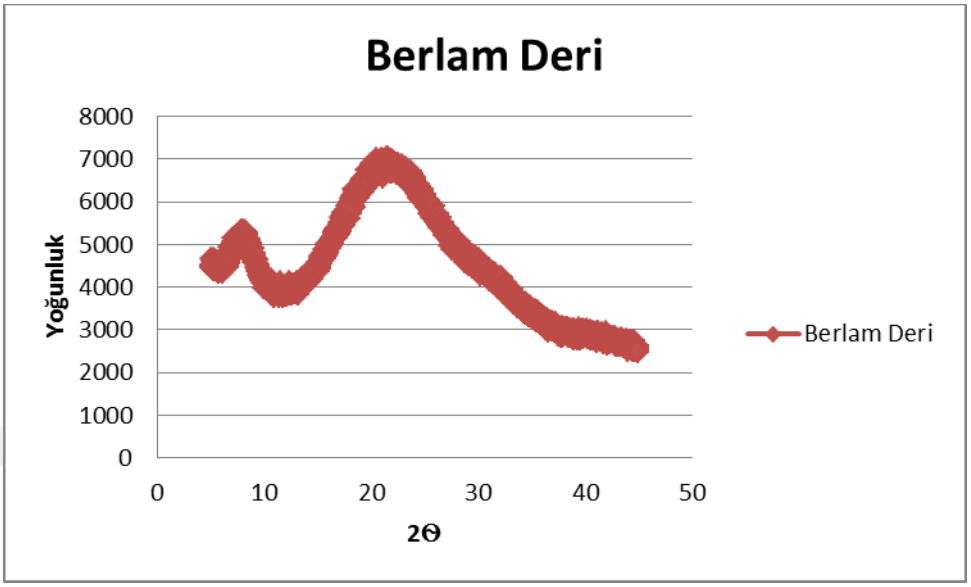
Çalışma kapsamında X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) analizine tabi tutulan kolyoz, kupes, berlam deri ve kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde belirgin bir şekilde iki ana karakteristik kristalinize pik olduğu görülmektedir. Mevcut çalışma sonuçlarına göre elde edilen kollajen örneklerinde birinci kristalizasyon piki; kolyoz deride 5,39º, kupes deride 5,81º, berlam deride 5,01º, kolyoz kemikte 6.60º, kupes kemikte 5,04º ve berlam kemikte 5,05º 2 Θ olarak bulunmuştur. Mevcut çalışma sonuçlarına göre elde edilen kollajen örneklerinde ikinci ve ana kristalizasyon piki; kolyoz deride 21,59 º, kupes deride 21,37º, berlam deride 21,58º, kolyoz kemikte 22,15º, kupes kemikte 23,89º ve berlam kemikte 22,78º 2 Θ olarak bulunmuştur.



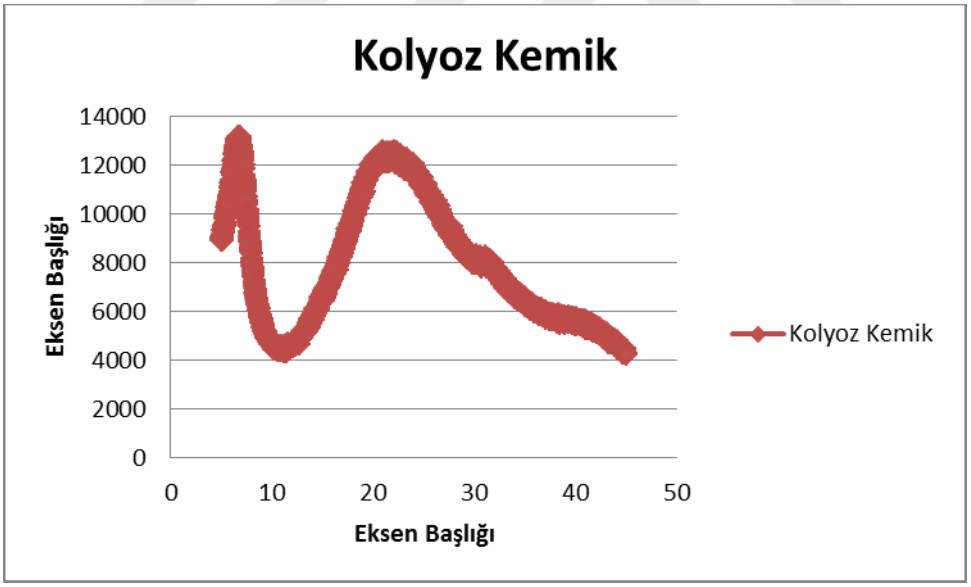
Şekil 4.25. Kolyoz derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) sonuçları



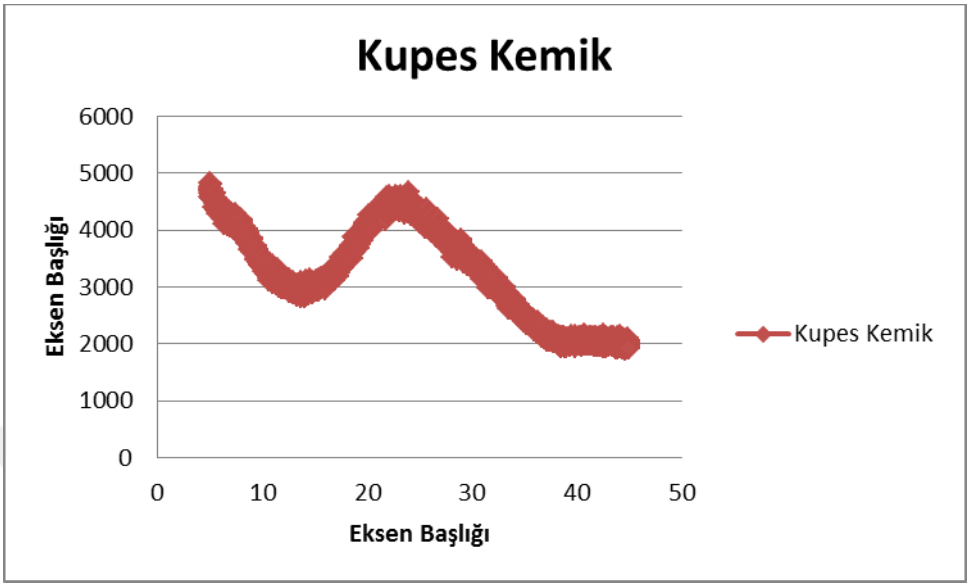
Şekil 4.26. Kupes derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) sonuçları



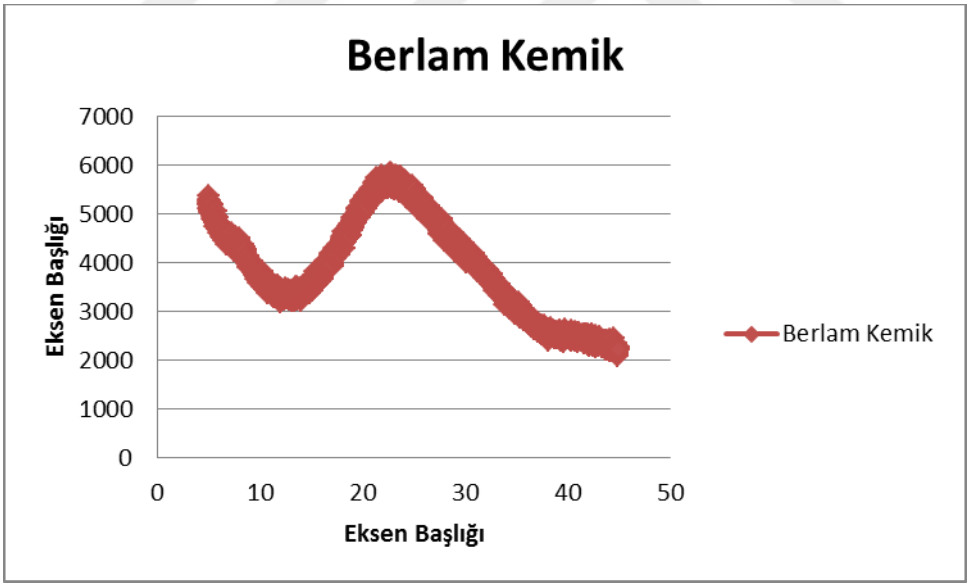
Şekil 4.27. Berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) sonuçları



Şekil 4.28. Kolyoz kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) sonuçları



Şekil 4.29. Kupes kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) sonuçları



Şekil 4.30. Berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) sonuçları

Duan ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada *Channa argus* türü derilerinden ekstrakte ettikleri kollajen örneklerinde iki ana kırınım noktası olduğunu ve sırasıyla 10-15º ve 25-30º 2Ɵ değerlerinin gözlemlendiğini, 3. pik değerinin ise 40-45º' te gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ilk kırınım noktasının moleküler zincirlerin uzaklığı ile ilişkilendirirken, ikinci kırınım noktasının kollajen liflerinin iç yapılarında dağınık yansıma göstermesinden kaynaklandığını vurgulamışlardır. Yapılan benzer bir çalışmada, *Arothron stellatus* türü derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde kırınımın 10-25º 2Ɵ değerleri arasında gözlemlendiği ve bu kırınım modelinin kollajen için karakteristik bir pik olduğu bildirilmiştir (Ramanathan ve ark., 2014). Zhang ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada elde ettikleri kollajen örneklerinin kırınım noktalarını 7,44º ve 19,78º 2Ɵ olarak bulmuşlar ve ikinci kırınım noktasının kollajen için karakteristik bir tepe noktası olduğunu bildirmişlerdir. Mevcut çalışma sonuçları yapılan önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir ve kollajen örneklerinde bulunması gereken kırınım noktasını taşımaktadır.

4.7. Kupes, Kolyoz, Berlam Deri ve Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Amino Asit Analizi Sonuçları

Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin amino asit kompozisyonu Çizelge 4.5'de sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Kupes, Kolyoz ve Berlam Derilerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Amino Asit Kompozisyonu (g/100 g protein)

Amino Asit	Kupes Deri	Kolyoz Deri	Berlam Deri
Aspartik asit	4,79±0,11^{b}	3,68±0,32^{a}	7,59±0,14^{c}
Glutamik asit	8,17±0,84^{b}	5,67±0,36^{a}	13,21±0,92^{c}
Serin	4,63±0,72^{b}	3,32±0,20^{a}	6,48±0,01^{c}
Histidin	0,50±0,10^{a}	0,51±0,01^{a}	0,81±0,09^{b}
Glisin	24,39±1,80^{b}	20,82±1,65^{a}	37,20±0,64^{c}
Treonin	TE	TE	TE
Arjinin	6,55±0,13^{b}	4,98±0,56^{a}	10,73±0,89^{c}
Alanin	8,58±0,59^{b}	6,54±0,644^{a}	12,63±0,83^{c}
Tirozin	0,36±0,05^{b}	0,25±0,01^{a}	1,14±0,05^{c}
Sistin	TE	TE	TE
Valin	1,49±0,68^{b}	0,67±0,15^{a}	1,65±0,53^{b}
Metiyonin	0,89±0,20^{a}	0,72±0,07^{a}	1,19±0,64^{a}
Triptofan	0,36±0,01^{b}	0,19±0,03^{a}	0,68±0,02^{c}
Fenilalanin	3,66±0,77^{c}	2,04±0,14^{a}	3,10±0,05^{b}
Isolösin	0,17±0,04^{a}	0,24±0,03^{b}	0,63±0,04^{c}
Lösin	2,76±0,07^{b}	1,78±0,01^{a}	3,08±0,00^{c}
Lisin	3,63±0,34^{a}	2,52±0,18^{a}	6,04±0,69^{b}
Hidroksiprolin	5,66±0,70^{a}	6,36±0,98^{a}	7,49±0,15^{b}
Prolin	6,32±0,87^{a}	6,97±0,38^{a}	7,92±0,37^{b}

±Standart sapmayı göstermektedir. Aynı satırda gösterilen farklı harfler gruplar arasında $p<0,05$ düzeyinde istatistiksel farklılıkları göstermektedir. TE: Tespit Edilemedi.

Mevcut çalışma sonuçlarına göre; kupes, kolyoz ve berlam derilerinden esktrakte edilen kollajen örneklerinde glisin her üç örnekte de en yüksek miktarda bulunan amino asit olarak saptanmıştır. Genellikle glisin, N terminusundan ilk 14 amino asit kalıntısı ve C terminusundan ilk 10 amino asit kalıntısı hariç tüm

kollajen peptit zincirinin her üç kalıntısında ortaya çıkar ve yaklaşık toplam amino asit kalıntısının üçte birini oluşturur (Kittiphattanabawon ve ark, 2015; Ali ve ark., 2018). Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden esktrakte edilen kollajen örneklerinde glisin sırasıyla 24,39, 20,82 ve 37,20 g/100g protein olarak bulunmuştur. Glisin içeriği bakımından çalışma sonuçları değerlendirildiğinde kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örnekleri arasında istatistiki açıdan önemli farklılıklar tespit edilmiş ve en yüksek glisin içeriği berlam derisinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde bulunmuştur.

Literatürdeki benzer çalışmalara bakıldığında glisinin kollajen örneklerindeki en baskın amino asit olduğu ve *Magalaspis cordyla* ve *Otolithes ruber* türlerinde yaklaşık %30 olarak bulunduğu, 1000 amino asit kalıntısı içerisinde, *Sebastes mentella* türü derilerinden elde edilen kollajen örneklerinde 335 amino asit kalıntısı, *Scomberomorous niphonius* türü derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde 341,6 amino asit kalıntısı olarak bulunduğu, nil levreği derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde ise 21,1 ve 22,1 g/100g protein olduğu bildirilmiştir (Muyango ve ark., 2004; Wang ve ark., 2007; Kumar ve ark., 2012; Li ve ark., 2013).

Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde nispeten yüksek miktarlarda alanin, arjinin, glutamik asit, aspartik asit ve serin bulunurken treonin ve sistin tespit edilememiştir. Mevcut çalışmadakine benzer olarak Kiew ve Mashitah. (2013) hibrit karabalık türü derilerinden ekstrakte ettikleri kollajen örneklerinde de sistin tespit edememişler ve bunun elde ettikleri kollajen örneklerinin tip I kollajen varlığını vurguladığını bildirmişlerdir. *Lagocephalus gloveri* türü derilerinden kollajen ekstraksiyonu ve karakterizasyonunun yapıldığı çalışmanın amino asit analiz sonuçlarına göre de sistine rastlanmamıştır (Senaratne ve ark, 2006). Balık derilerinden kollajen ekstraksiyonunun yapıldığı birçok farklı çalışmada da kollajen örneklerinde sistine rastlanmadığı bildirilmiştir (Ogava ve ark., 2003; Bae ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2011; Huang ve ark., 2011; Iswariya ve ark., 2018).

İmino asit (prolin ve hidroksiprolin) değerleri açısından mevcut çalışma sonuçları incelendiğinde, kupes ve kolyoz derilerinden ekstrakte edilen kollajen örnekleri arasında istatistiki açıdan önemli faklılıklar bulunmazken, berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin imino asit içeriği istatistiki açıdan farklı ve yüksek bulunmuştur. Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde prolin içeriği sırası ile 6,32, 6,97, 7,92 g/100g olarak bulunurken, hidroksiprolin içeriği sırası ile 5,66, 6,36 ve 7,49 g/100g olarak bulunmuştur. Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde toplam imino asit içeriği sırası ile %11,98, %13,33 ve %15,41 olarak bulunmuştur.

Mevcut çalışma sonuçlarına benzer olarak Senaratne ve ark. (2006) *Lagocephalus gloveri* derlerinden ekstrakte ettikleri kollajen örneklerinde toplam imino asit değerini %17 olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Huang ve ark. (2011) imino asit (prolin ve hidroksiprolin) içeriğinin kollajenin yapısal bütünlüğü için önemli olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada balon balığı derilerinden kollajen elde etmişler ve asitte çözünür kollajen örneklerinde imino asit içeriğini %17,9 olarak bulmuşlardır. Bu imino asit içeriğinin diğer balık türleri ile benzerlik gösterdiğini fakat memeli kollajeninden daha düşük olduğunu bildirmişlerdir (Foegeding ve ark., 1996; Huang ve ark., 2011). Bu farklılığın sebebini ise hayvanların yaşadıkları habitat farklılığından kaynaklandığını vurgulamışlardır (Love ve ark., 1976; Huang ve ark., 2011). Bae ve ark. (2008) sıcak ortamda yaşayan balık türlerinden izole edilen kollajenlerin daha yüksek miktarda hidroksiproline sahip olduğu ve soğukta yaşayanlara göre daha yüksek termal stabilite sergilediklerini bildirmişlerdir. Bunun nedeni hidroksiprolinin, kollajen moleküllerinin üçlü sarmal yapısını sağlamlaştırması olarak açıklanmıştır (Senaratne ve ark., 2006).

Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin amino asit kompozisyonu Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Kupes, Kolyoz ve Berlam Kemiklerinden Ekstrakte Edilen Kollajen Örneklerinin Amino Asit Kompozisyonu (g/100 g protein)

Amino Asit	Kupes Kemik	Kolyoz Kemik	Berlam Kemik
Aspartik asit	3,72±0,28^{a}	5,03±0,44^{b}	6,67±0,12^{c}
Glutamik asit	7,68±0,74^{a}	7,82±0,49^{a}	9,85±0,32^{b}
Serin	3,86±0,89^{a}	4,55±0,28^{a}	6,27±0,28^{b}
Histidin	0,75±0,19^{a}	0,67±0,00^{a}	0,70±0,17^{a}
Glisin	24,39±3,80^{a}	31,59±4,02^{b}	32,13±3,32^{b}
Treonin	TE	TE	TE
Arjinin	6,03±1,21^{a}	6,60±0,72^{a}	8,79±0,57^{b}
Alanin	8,27±0,80^{a}	9,85±0,95^{b}	10,77±1,09^{c}
Tirozin	0,79±0,41^{b}	0,33±0,02^{a}	0,66±0,05^{b}
Sistin	TE	TE	TE
Valin	0,85±0,29^{a}	0,66±0,21^{a}	2,01±0,10^{b}
Metiyonin	0,65±0,00^{a}	0,81±0,04^{a}	1,08±0,64^{a}
Triptofan	0,21±0,00^{a}	0,30±0,02^{b}	TE
Fenilalanin	2,45±0,15^{a}	3,60±0,02^{c}	3,05±0,06^{b}
Isolösin	0,10±0,04^{a}	0,08±0,02^{a}	0,52±0,04^{b}
Lösin	2,22±0,08^{a}	2,46±0,00^{b}	3,00±0,28^{c}
Lisin	3,39±0,29^{a}	3,76±0,17^{b}	5,16±0,24^{c}
Hidroksiprolin	11,73±1,54^{c}	5,48±0,27^{a}	7,82±0,13^{b}
Prolin	13,74±0,90^{b}	6,02±0,96^{a}	14,40±1,11^{b}

±Standart sapmayı göstermektedir. Aynı satırda gösterilen farklı harfler gruplar arasında $p<0,05$ düzeyinde istatistiksel farklılıkları göstermektedir. TE: Tespit Edilemedi.

Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden esktrakte edilen kollajen örneklerinde deride olduğu gibi glisin, her üç örnekte de en yüksek miktarda bulunan amino asit olarak saptanmıştır. Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden esktrakte edilen kollajen örneklerinde glisin sırasıyla 24,39, 31,59 ve 32,13 g/100g

protein olarak bulunmuştur. Glisin içeriği bakımından çalışma sonuçları değerlendirildiğinde kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örnekleri arasında istatistiki açıdan önemli farklılık saptanmazken en düşük glisin miktarı kupes kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde tespit edilmiştir. Her üç örnek de nispeten yüksek miktarda alanin, glutamik asit ve arjinin içerirken, örneklerde treonin ve sistin tespit edilememiştir. Mevcut çalışma sonuçlarına benzer olarak, Kumar ve ark. (2012) *Magalaspis cordyla* ve *Otolithes ruber* türleri kemiklerinden kollajen eldesi ile ilgili yaptıkları çalışmada glisin miktarını her grupta yaklaşık %30 olarak bulduklarını ve en bol bulunan amino asitin glisin olduğunu ifade etmişlerdir. *Scomberomorous niphonius* türü deri ve kemiklerinden kollajen eldesi ve karakterizasyonunun yapıldığı çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş ve kollajen örneklerinde en baskın amino asit glisin (341.6-352.6 kalıntı/1000 kalıntı) olarak bulunmuştur (Li ve ark., 2013).

İmino asit (prolin ve hidroksiprolin) değerleri açısından mevcut çalışma sonuçları incelendiğinde, kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde toplam imino asit içeriği sırası ile %25,47, %11,5 ve %22,22 olarak bulunmuştur. Kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde prolin içeriği sırası ile 13,74, 6,02, 14,40 g/100g olarak bulunurken, hidroksiprolin içeriği sırası ile 11,73, 5,48 ve 7,82 g/100g olarak bulunmuştur.

İmino asit açısından benzer çalışmalara bakıldığında; Duan ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada sazan deri, pul ve kemiklerinden kollajen ekstrakte etmişler ve özelliklerini incelemişlerdir. Sazan kemiklerinden elde ettikleri kollajen örneklerinin toplam imino asit içeriğini %19,2 olarak bulmuşlardır. *Magalaspis cordyla* ve *Otolithes ruber* türleri kemiklerinden kollajen eldesinin yapıldığı çalışmada ise imino asit içeriğinin %15,5-16,9 arasında değiştiği bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2012). Wang ve ark. (2008) *Sebastes mentella* türü deri, pul ve kemiklerinden elde ettikleri kollajen örneklerinde toplam iminoasit içeriğinin SKC, SCC ve BOC'de sırası ile %16,5, %16 ve %16,3 olarak bulunduğunu, bu

değerlerin diğer türler ile karşılaştırıldığında tropikal balık türü kollajenlerinden düşük olduğu, soğuk su balık türü kollajenleri ile benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan farklı bir çalışmada *Scomberomorous niphonius* türü kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinin imino asit içeriği %17,8 olarak bulunmuştur (Li ve ark., 2013). *Pogonia cromis* ve *Archosargus probatocephalus* türü kemiklerinden izole edilen kollajen örneklerinden nispeten yüksek sonuçlar elde edilmiştir. *Pogonia cromis* türü kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinin imino asit içeriği %19,1 olarak bulunurken *Archosargus probatocephalus* türü kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinin imino asit içeriği ise %19,4 olarak bulunmuştur (Ogawa ve ark., 2004). Mevcut çalışma sonuçları ve literatürde yapılan çalışma sonuçları kıyaslandığında, kupes ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin imino asit içeriği nispeten yüksek bulunurken, kolyoz kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin imino asit içeriği daha düşük bulunmuştur.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada öncelikle ülkemizde değerlendirilmeden çöpe atılan balık işleme atıklarının çok değerli bir maddeye dönüştürülerek ekonomiye kazandırılması temel amacı oluşturmuştur. Diğer taraftan bu tür atık maddelerin çevreye verdiği zararın da önlenmesi sağlanacaktır.
- Mevcut çalışmada ülkemiz kıyılarından avlanan ve piyasaya sunulan kolyoz, kupes, berlam balıklarının deri ve kemik atıklarından asitte çözünür kollajen elde edilmiştir. Elde edilen 6 farklı kollajenin karakterizasyonları yapılarak karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, verim, protein, nem, ham kül tayini, ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi (UV-Vis), fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), X-Işını kırınım difraktometresi (XRD), taramalı elektron mikroskobu (SEM), diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ve amino asit analizleri gerçekleştirilmiştir.
- Kupes, kolyoz, berlam deri ve kemiklerinden elde edilen kollajenlerin verim değerleri genel olarak değerlendirildiğinde, her üç balık türününde kemiklerinden elde edilen kollajenlerin verim ve protein değerleri deriden elde edilenlere göre çok daha düşük bulunmuştur. En düşük verim berlam kemiğinde (%0,34) tespit edilirken en yüksek verim kupes derisinde (%9,32) tespit edilmiştir. En düşük protein değeri kolyoz kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinde (%88,35) bulunurken, en yüksek protein değeri berlam derilerinden elde edilen kollajenlerde (%93,60) bulunmuştur. Her üç balığın deri ve kemiklerinden elde edilen kollajenlerin nem ve kül içerikleri ise verim ve protein değerlerinin aksine deri örneklerinde daha düşük bulunmuştur. En düşük nem (%5,24) ve kül (0,56) değeri berlam derilerinden elde edilen kollajende bulunurken, en yüksek nem (%9,26) ve kül (%0,98) değeri kolyoz kemiklerinden elde edilen kollajen örneklerinde tespit edilmiştir.

- Mevcut çalışmada fonksiyonel grupların gözlemlenmesi ve proteinlerin ikincil yapılarının belirlemesi amacı ile FTIR analizinden yararlanılmıştır. Kollajen için karakteristik absorpsiyon pikleri Amid A, Amid B, Amid I, Amid II ve Amid III' tür. Polipeptitlerdeki karbonil gruplarının gerilme titreşimleriyle ilişkili olan 1600-1700 cm-1 dalga boyunda bulunan ve bir proteinin ikincil yapısını belirlemede en önemli faktör olarak kabul edilen Amid I bandı kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde sırası ile 1630 cm-1, 1631 cm-1 ve 1630 cm-1 olarak bulunurken kemik örneklerinde sırası ile 1629 cm-1, 1632 cm-1, 1632 cm-1 olarak bulunmuştur. Benzer şekilde Amid A, Amid B, Amid II ve Amid III absorpsiyon pikleri de tüm kollajen örneklerinde literatürdekiler ile benzer özellikte bulunmuştur. Kollajen örneklerinin üçlü sarmal yapısı, örneklerin gösterdikleri Amid III absorpsiyon değerleri ile konfirme edilmiştir.
- Mevcut çalışmanın ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis) absorpsiyon spektroskopisi sonuçlarına göre kupes, kolyoz, berlam deri ve kemiklerinden elde edilen kollajen örnekleri 232 nm' de maksimum absorbans göstermiştir. Bu karakteristik pik ile ekstrakte edilen kollajen örneklerinin yüksek saflıkta olduğu doğrulanmaktadır.
- Kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin denatürasyon sıcaklıkları sırasıyla 29,13 ºC, 32,03 ºC ve 35,01 ºC olarak bulunurken kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinin denatürasyon sıcaklıkları sırasıyla 30,76 ºC, 33,73 ºC ve 26,94 ºC olarak bulunmuştur. Mevcut çalışma diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) sonuçları diğer balık türleri ile paralellik göstermektedir ve kupes, kolyoz ve berlam subtropik türler oldukları için ekstrakte edilen kollajenler de daha stabil özellik göstermektedir.
- Liyofilizasyon sonrası kollajen örnekleri incelendiğinde gözenekli ve süngerimsi bir yapıya sahip oldukları gözlenmektedir. Elde edilen SEM

görüntüleri de bu gözenekli yapıyı destekler niteliktedir. Ayrıca görüntüler incelendiğinde kollajenin sahip olduğu fibriler yapı da açıkça görünmektedir. Kollajen örneklerinin sahip olduğu fibriler ve gözenekli yapı ile yeni doku oluşumu, hücre kültürü, büyüme, yaraların iyileşmesi ve gen ekspresyonunda kullanılabileceği düşülmektedir.

- Çalışma kapsamında X-ışını kırınım difraktometresi (XRD) analizine tabi tutulan kolyoz, kupes, berlam deri ve kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde belirgin bir şekilde iki ana karakteristik kristalize pik olduğu görülmektedir. Mevcut çalışma sonuçlarına göre elde edilen kollajen örneklerinde birinci kristalizasyon piki; kolyoz deride 5,39º, kupes deride 5,81º, berlam deride 5,01º, kolyoz kemikte 6.60º, kupes kemikte 5,04º ve berlam kemikte 5,05º 2 Θ olarak bulunmuştur. Mevcut çalışma sonuçlarına göre elde edilen kollajen örneklerinde ikinci ve ana kristalizasyon piki; kolyoz deride 21,59º, kupes deride 21,37º, berlam deride 21,58º, kolyoz kemikte 22,15º, kupes kemikte 23,89º ve berlam kemikte 22,78º 2 Θ olarak bulunmuştur.
- Mevcut çalışma amino asit analizi sonuçlarına göre; kupes, kolyoz, berlam deri ve kemiklerinden esktrakte edilen kollajen örneklerinde glisin her 6 örnekte de en yüksek miktarda bulunan amino asit olarak saptanmıştır. Kupes, kolyoz, berlam deri ve kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde nispeten yüksek miktarlarda alanin, arjinin, glutamik asit, aspartik asit ve serin bulunurken treonin ve sistin tespit edilememiştir. İmino asit (prolin ve hidroksiprolin) değerleri açısından mevcut çalışma sonuçları incelendiğinde, kupes, kolyoz ve berlam kemiklerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde toplam imino asit içeriği sırası ile %25,47, %11,5 ve %22,22 olarak bulunurken kupes, kolyoz ve berlam derilerinden ekstrakte edilen kollajen örneklerinde toplam imino asit içeriği sırası ile %11,98, %13,33 ve %15,41 olarak bulunmuştur.

- Mevcut çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, verim ve protein değerlerinin deri örneklerinde daha yüksek olduğu; toplam imino asit miktarlarının en yüksek kupes kemik örneklerinde bulunduğu; diğer analiz sonuçlarının ise örnekler arası paralellik gösterdiği görülmüştür.
- Kupes, kolyoz, ve berlam deri ve kemiklerinden elde edilen tüm kollajenlerin özelliklerinin literatürdeki kollajenlere uygun olduğu ve bunların piyasada satılan memeli kollajenlerine alternatif olarak sunulabileceği sonucuna varılmıştır.
- Sonuçta ülkemizde değerlendirilmeden çöpe atılan bu atıkların çok değerli bir biyoaktif maddeye çevrilerek kazanılması oldukça önem arz etmektedir.
- Bu çalışma diğer su ürünleri atıklarından kollajen eldesi ile ilgi çalışmalara ışık tutacaktır. Ülkemizde bu konuda çok sınırlı çalışma mevcuttur. Bu sayede hem bilimsel çalışmalar artacak, hem de su ürünleri işleme sektörüne atıklarını değerlendirmeleri konusunda çok öncü olacak bir çalışmadır.
- Helal ürün kapsmında yer alan su ürünleri ve yan ürünlerinden elde edilen kollajen, bu pazardaki fırsatları fark eden büyük medikal, gıda ve kozmetik firmaları tarafından memeli kollajenine göre tercih edilecektir.
- Kollajen; mükemmel bir biyouyumlu materyal olması, zayıf antijenisite göstermesi, yüksek düzeyde doğrudan hücreye bağlanabilme özelliği, yüksek derecede biyobozunur olması gibi özellikleri ile tıp, diş hekimliği, ilaç sanayi, gıda endüstrisi, fotoğrafçılık, kozmetik sanayi ve biyomedikal gibi birçok alanda kullanılabilecektir.

KAYNAKLAR

Abdollahi, M., Rezaei, M., Jafarpour, A., 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.

Aberoumand, A., 2011. Isolation of collagen from some fishes skins in Iran. Journal of agricultural technology, 7(3), 783-788.

Adams E., 1978. Invertebrate collagens. Marked differences from vertebrate collagens appear in only a few invertebrate groups. Science, 202, 591–598.

Ali, A.M.M., Benjakul, S., Prodpran, T., and Kishimura, H. 2018. Extraction and characterisation of collagen from the skin of golden carp (*Probarbus jullieni*), a processing by-product. Waste and Biomass Valorization, 9(5), 783-791.

AlizadehNodeh, M., Moradi, Z., and Nourani, M.R., 2014. Isolation and purification of collagen from the skin of black pomfret (*Parastromateus niger*) for tissue engineering purpose. Journal of Applied Tissue Engineering, 1(1), 18-21.

Anand, S., Kamath, S., Chuang, L., Kasapis, S., and Lopata, A.L., 2013. Biochemical and thermo-mechanical analysis of collagen from the skin of Asian Sea bass (*Lates calcarifer*) and Australasian Snapper (*Pagrus auratus*), an alternative for mammalian collagen. European Food Research and Technology, 236(5), 873-882.

Anonim, 2018. Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, Temmuz 2018, Ürün No:24.

AOAC, 1990. Official Methods of Analysis 15th. Ed. Association of the Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA.

Aykın, E., Erbaş, M., 2016. Farklı Kaynaklardan Üretilen Jelatinin Özellikleri ve Sağlık Üzerine Etkileri. Gıda, 41 (3), 179-186.

Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A., Hara, K., 2008. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. Food Chemistry, 108(1), 49-54.

Bailey A., 1968. The nature of collagen. Compr. Biochem. 26(B), 297–424. European Commission. Annual Economic Report of EU aquaculture sector 2016.

Berisio, R., Granata, V., Vitagliano L. and Zagari A., 2004. Imino Acids and Collagen Triple Helix Stability: Characterization of Collagen-Like Polypeptides Containing Hyp-Hyp-Gly Sequence Repeats. Journal of American Chemical Society, 126(37), 11402-11403.

Boran, G., 2011. Bir Gıda Katkısı Olarak Jelatin: Yapısı, Özellikleri, Üretimi, Kullanımı ve Kalitesi. Gıda, 36(2), 97-104.

Cengiz, Ö., Ayaz, A., Öztekin, A., Kumova, C., 2013. Gelibolu Yarımadası'nda (Kuzey Ege Denizi, Türkiye) Kupes Balığı (*Boops boops* Linnaeus, 1758) Avcılığında Kullanılan Multiflament Galsama Ağı Seçiciliğinin Boy-Çevre İlişkisi ile Belirlenmesi. Menba Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 1, 28-32.

Choudhury, G.S., Gogoi, B.K., 1995. High Moisture Extrusion: Possibilities and Prospects, Abstract No. B 3.3. CoFe Technical Program and Extended Abstracts. Nov 2-3, Chicago IL.

Choudhury, G.S., Bublitz, C.G., 1996. Electromagnetic method for detection of parasites in fish. Abstract No.10-2, IFT Annual Meeting Technical Program: Book of Abstracts, p. 19.

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), 937-957.

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, 702-706.

Duan, R., Zhang, J., Wu, J., and Wang, J., 2018. Preparation and Characterization of Collagens from the Skin of Northern Snakehead (*Channa argus*). Journal of the Polymer and Environment, 26, 867-872.

Eastoe, J, E., 1957. The Amino Acid Composition of Fish Collagen and Gelatin. The British Gelatin and Glue Research Association, 65, 363-368.

Flandin, F., Buffevant, C., and Herbage, D., 1984. A differential scanning calorimetry analysis of the age-related changes in the thermal stability of rat skin collagen. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 791(2), 205-211.

Foegeding, E. A., Lanier, T. C., Hultin, H.O., 1996. Collagen. Food Chemistry, 3, 902-906.

Gallop P.M., Paz M.A., 1975. Posttranslational protein modifications, with special attention to collagen and elastin. Physiol. Rev. 55(3), 418–487.

Gharagheshlagh, N.S., Nourani, M.R., Jamili, S., Fatemi, M.J., and Sharifi, A.M., 2018. Isolation and Characterization of acid-soluble Collagen from the Skin of Scomberomorus guttatus of Persian Gulf. Journal of Applied Tissue Engineering, 5(3), 1-12.

Gómez-Guillén, M.C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A., Montero, P., 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. Food Hydrocolloids, 16(1), 25-34.

Hema, G.S., Shyni, K., Mathew, S., Anandan, R., Ninan, G., Lakshmanan, P.T., 2013. A simple method for isolation of fish skin collagen-Biochemical characterization of skin collagen extracted from albacore tuna (*Thunnus alalunga*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*) and rohu (*Labeo rohita*).

Huang, Y., Shiau, C., Chen, H., Huang, B., 2011. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (Diodon holocanthus). Food Hydrocolloids, 25, 1507-1513.

Huong, L.T.T., Dzung, N.H., and Tuan, P.D., 2014. Extraction and Purification of Collagen From the Skins of Basa Fish (*Pangasius hypophthalmus*). Tap chi Khoa hoc va Cong nghe, 52(4,) 431-440.

Jeong, H.S., Venkatesan, J., and Kim, S.K., 2013. Isolation and characterization of collagen from marine fish (*Thunnus obesus*). Biotechnology and Bioprocess Engineering, 18(6), 1185-1191.

Joukar, H.S., and Salarzadeh, A., 2014. Comparison of collagen extracted from the skin and fin of long tail tuna *Thunnus tonggo*. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 8(7), 904-910.

Joukar, S.H., Kamrani, E., Salarzadeh, A., and Noukhbehzare, D., 2014. Isolation of Collagen from Fish Waste Material- Skin, Bones and Fins of *Thunnus tonggol*. Oceanography, 5(17), 9-9.

Ismail, N., Jabar, A., and Asyiraf, N., 2012. Extraction of collagen from catfish (*Clarias gariepnus*) waste and determination of its physico-chemical properties. Scientific Research Journal, 9(1), 29-42.

Iswariya, S., Velswamy, P., Uma, T. S. 2018. Isolation and characterization of biocompatible collagen from the skin of puffer fish (*Lagocephalus inermis*). Journal of Polymers and the Environment, 26(5), 2086-2095.

Kiew, P.L., and Mashitah, M.D., 2013. Isolation and characterization of collagen from the skin of Malaysian catfish (*Hybrid clarias* sp.). Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 56, 441-450.

Kim, S., Kim, Y., Byun, H., Nam, K., Joo, D., Shahidi, F., 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(4), 1984-1989.

Kim, S.K., Byun, H.G., Lee, E.H., 1994. Optimum extraction conditions of gelatin from fish skins and its physical properties. J. Korean Ind. Eng. Chem., 5, 547-559.

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

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Sinthusamran, S., and Kishimura, H., 2015. Characteristics of collagen from the skin of clown featherback (*Chitala ornata*). International Journal of Food Science & Technology, 50(9), 1972-1978.

Kothai, S., and Premlatha, S., 2018. Extraction and a Study on the Characterization of Collagen from Fish Scales. Journal of Chemistry and Chemical Science, 8(1), 10-15.

Kumar, N. S., Nazeer, R. A., and Jaiganesh, R., 2012. Wound healing properties of collagen from the bone of two marine fishes. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 18(3), 185-192.

Lee, J. K., Kang, S. I., Kim, Y. J., Kim, M. J., Heu, M. S., Choi, B. D., and Kim, J. S., 2016. Comparison of collagen characteristics of sea-and freshwater-rainbow trout skin. Food Science and Biotechnology, 25(1), 131-136.

Li, J., Wang, M., Qiao, Y., Tian, Y., Liu, J., Qin, S., and Wu, W., 2018. Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. Process Biochemistry, 74, 156-163.

Li, Z.R., Wang, B., Chi, C.F., Zhang, Q.H., Gong, Y.D., Tang, J.J., Luo, H.Y., and Ding, G. F., 2013. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorous niphonius*). Food Hydrocolloids, 31(1), 103-113.

Li-li, C., Li, Z., Hua, L., Huo-gen, H., and Shan, W., 2011. Extraction and characterization of collagen from the eel Bone. International Conference on New Technology of Agricultural (pp. 1051-1055). IEEE.

Liu, H. Y., Li, D., Guo, S.D., 2007. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctaus*). Food Chemistry, 101, 621-625.

Liu, W., Tian, Z., Li, C., and Li, G., 2014a. Thermal denaturation of fish collagen in solution: a calorimetric and kinetic analysis. Thermochimica Acta, 581, 32-40.

Liu, D., Zhou, P., Li, T., and Regenstein, J.M., 2014b. Comparison of acid-soluble collagens from the skins and scales of four carp species. Food Hydrocolloids, 41, 290-297.

Love, R, M., Yamaguchi, K., Creach, Y., Lavety, J., 1976. The connective tissues and collagens of cod during starvation. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 55(5), 487-492.

Mahboob, S., Haider, S., Sultana, S., Al-Ghanim, K., Al-Misned, F., Al-Balawi, H. A. K., and Ahmad, Z., 2014. Isolation and characterisation of collagen from the waste material of two important freshwater fish species. Journal of Animal and Plant Science, 24, 1802-1810.

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), 4296-4305.

Manaşırlı, M., Avşar, D., Yeldan, H., Çiçek, E., Özyurt, C.E., 2006. Babadıllimanı Koyundaki (Mersin) *Boops boops* (Linnaeus, 1758) Populasyonunun Bazı Biyolojik Özellikleri. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 23(1/3), 461-463.

Min, B.J., Oh, J.H., 2009. Antimicrobial activity of catfish gelatin coating containing origanum (*Thymus capitatus*) oil against gram-negative pathojenic bacteria. Food Microbiology and Safety, 74, 143-148.

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., 2000a. Isolation of collagen from fish waste material skin, bone and fins. Food Chemistry, 68, 277-281.

Nagai, T., and Suzuki, N., 2000b. Preparation and characterization of several fish bone collagens. Journal of Food Biochemistry, 24(5), 427-436.

Nagai, T., Yamashita, E., Taniguchi, K., Kanamori, N., and Suzuki, N., 2001. Isolation and Characterisation of Collagen from the Outer Skin Waste Material of Cuttlefish (*Sepia lycidas*). Food Chemistry, 72, 425-429.

Nagai, T., Araki, Y., and Suzuki, N., 2002. Collagen of The Skin of Ocellate Puffer Fish (*Takifugu rupripes*). Food Chemistry, 78, 173-177.

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.

Nagai, T., Suzuki, N., and Nagashima, T., 2008. Collagen from Common Minke Whale (*Balaenoptera acutorostrata*) Unesu. Food Chemistry, 111, 296–301.

Nagai, T., Suzuki, N., Tanoue, Y., Kai, N. and Nagashima, T., 2010. Characterization of Acid-Soluble Collagen from Skins of Surf Smelt (*Hypomesus pretiosus japonicas* Brevoort). Food and Nutrition Sciences, 1, 59-66.

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 Chemistry, 88(4), 495-501.

Palanivel, A., Prakash, M., Gunasekaran, G., and Rajesh, M., 2018. Isolation and characterization of acid-solubilized collagen from the skin of freshwater snakehead fish *Channa striatus.* World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 7(11), 1441-1451.

Park, C.H., Kim, H.J., Kang, K.T., Park, J.W., Kim, J.S., 2009. Fractionation and angiotensin Iconverting enzyme (ACE) inhibitory activity of gelatin hydrolysates from by-products of Alaska pollock surimi. Fisheries and Aquatic Science, 12(2), 79-85.

Pati, F., Adhikari, B., and Dhara, S., 2010. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. Bioresource Technology, 101, 3737-3742.

Petibois, C., and Déléris, G., 2006. Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. Trends in Biotechnology, 24(10), 455-462.

Piez, K, A., 1965. Characterization of collagen from codfish skin containing three different α chains. Biochemistry, 4(12), 2590-2596.

Raman, M., Gopakumar, K., 2018. Fish Collagen and its Applications in Food and Pharmaceutical Industry: A Review. EC Nutrition, 13, 752-767.

Ramanathan, G., Singaravelu, S., Raja, M.D., Sobhana, S.S., and Sivagnanam, U. T., 2014. Extraction and characterization of collagen from the skin of Arothron stellatus fish—A novel source of collagen for tissue engineering. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering, 4(3), 203-209.

Rodriguez, M, I, A., Barroso, R, L, G., Sanchez, M, L., 2017. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. Journal of Cosmetic Dermatology, 1-7.

Rosmawati, Abustam, E., Tawali, A.B., and Said, M.I., 2018. Chemical Composition, Amino Acid and Collagen Content of Snakehead (*Channa striata*) Fish Skin and Bone. Scientific Research Journal, 6(1), 1-4.

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

Schmidt, M, M., Dornelles, R, C, P., Mello, R, O., Kubota, E, H., Mazutti, M, A., Kempka, A, P., Demiate, I, M., 2016. Collagen Extraction Process. International Food Rasearch Journal, 23(3), 913-922.

Senaratne, L. S., Park, P. J., Kim, S. K. 2006. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. Bioresource Technology, 97(2), 191-197.

Shu, Y., Ren, H., Ao, R., Qi, W. C., and Zhang, Z.S., 2017. Comparison of physical and chemical characteristics of collagen from the skin of cod (*Gadus macrocephaius*). Genetics and Molecular Research, 16(2).

Tabarestani, H.S., Maghsoudlou, Y., Motamedzadegan, A., Mahoonak, A. R., and Rostamzad, H., 2012. Study on some properties of acid-soluble collagens isolated from fish skin and bones of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss)*. International Food Research Journal, 19(1), 251-257.

Tan, Y., and Chang, S.K.C., 2018. Isolation and Characterization of Collagen Extracted From Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Skin. Food Chemistry, 242, 147-155.

Tanaka, T., Takahashi, K., Tsubaki, K., Hirata, M., Yamamoto, K., Biswas, A., Moriyama, T., and Kawamura, Y., 2018. Isolation and characterization of acid-soluble bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) skin collagen. Fisheries and Aquatic Sciences, 21(7), 1-8.

Tang, Y., Jin, S., Li, X., Li, X., Hu, X., Chen, Y., Huang, F., Yang, Z., Yu, F., and Ding, G., 2018. Physicochemical properties and biocompatibility evaluation of collagen from the skin of giant croaker (*Nibea japonica*). Marine Drugs, 16(7), 222.

Thuanthong, M., Sirinupong, N., and Youravong, W., 2016. Triple helical structure of acid soluble collagen derived from Nile tilapia skin as affected by extraction temperature. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96(11), 3795-3800.

TÜİK, 2018. Türkiye İstatistik Kurumu, Su Ürünleri İstatistikleri. Ankara

Tylingo, R., Mania, S., Panek, A., Piątek, R., and Pawłowicz, R., 2016. Isolation and characterization of acid soluble collagen from the skin of african catfish (*Clarias gariepinus*), salmon (*Salmo salar*) and baltic cod (*Gadus morhua*). Journal of Biotechnology & Biomaterials, 6(2), 1-6.

Wahyu, Y.I., and Widjanarko, S.B., 2018. Extraction optimization and characterization of acid soluble collagen from milkfish scales (*Chanos chanos* Forskal). Carpathian Journal of Food Science and Technology, 10(1), 125-135.

Wang, L., An, X., Xin, Z., Zhao, L., and Hu, Q., 2007. Isolation and characterization of collagen from the skin of deep sea redfish (*Sebastes mentella)*. Journal of Food Science, 72(8), 450-455.

Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L., and Hu, Q., 2008. Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). Food Chemistry, 108(2), 616-623.

Wang, S., Hou, H., Hou, J., Tao, Y., Lu, Y., Yang, X., Li, B. 2013. Characterization of acid- soluble collagen from bone of pacific cod (*Gadus macrocephalus*). Journal of Aquatic Food Product Technology, 22(4), 407-420.

Wang, J., Pei, X., Liu, H., and Zhou, D., 2018. Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). International Journal of Biological Macromolecules, 106, 544-550.

Woo, J. W., Yu, S. J., Cho, S. M., Lee, Y. B., and Kim, S. B., 2008. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. Food Hydrocolloids, 22(5), 879-887.

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, 141-S153.

Yan, M., Li, B., Zhao, X., Ren, G., Zhuang, Y., Hou, H., Zhang, X., Chen, L., and Fan, Y., 2008. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). Food Chemistry, 107(4), 1581-1586.

Yu, F., Zong, C., Jin, S., Zheng, J., Chen, N., Huang, J., Chen, Y., Huang, F., Yang, Z., Tang, Y., and Ding, G., 2018. Optimization of extraction conditions and characterization of pepsin-solubilised collagen from skin of giant croaker (*Nibea japonica*). Marine Drugs, 16(1), 29.

Żelechowska, E., Sadowska, M., and Turk, M., 2010. Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Hydrocolloids, 24(4), 325-329.

Zhang, M., Liu, W., Li, G., 2009. Isolation and characterization of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). Food Chemistry, 115, 826-831.

Zhang, F., Wang, A., Li, Z., He, S., and Shao, L., 2011. Preparation and characterisation of collagen from freshwater fish scales. Food and Nutrition Sciences, 2, 818-823.

Zhao, W. H., Chi, C. F., Zhao, Y. Q., & Wang, B. 2018. Preparation, physicochemical and antioxidant properties of acid-and pepsin-soluble collagens from the swim bladders of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*). Marine Drugs, 16(5), 161.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 2004 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesine girerek 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılı Şubat ayında Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Avlama ve İşleme Teknolojisi Bölümünde başladığı Yüksek Lisans eğitimini 2012 yılında tamamalayarak aynı yıl Doktora eğitimine başladı.