



**Glukozaminoglikan (GAG) İçeren Kolajen Nanoliflerinin (KGN)
Elektro Eğirme İşlemi ile Elde Edilmesi ve Gıda Matriksinde
Kullanımının Araştırılması**

Program Kodu:1001

Proje No:119O491

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. ŞEBNEM TAVMAN

Araştırmacı(lar)

Doç. Dr. SEHER KUMCUOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi BURCU KAPLAN TÜRKÖZ

Danışman(lar)

Prof. Dr. MURAT KAZANCI

Prof. Dr. AYŞEGÜL KETENCİ

Bursiyer(ler)

BAHAR BAKAR

ÖZGE ATA

ŞUBAT 2023

ANKARA



**Glukozaminoglikan (GAG) İçeren Kolajen Nanoliflerinin
(KGN) Elektro Eğirme İşlemi ile Elde Edilmesi ve Gıda
Matriksinde Kullanımının Araştırılması**

Program Kodu: 1001

Proje No: 119O491

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Şebnem TAVMAN

Araştırmacılar:

Doç. Dr. Burcu KAPLAN TÜRKÖZ
Doç. Dr. Seher KUMCUOĞLU

Danışmanlar:

Prof. Dr. Murat KAZANCI
Prof. Dr. Ayşegül KETENCİ

Bursiyerler:

Özge ATA
Bahar BAKAR

ŞUBAT 2023
İZMİR



ÖNSÖZ

“Glukozaminoglikan (GAG) içeren Kolajen Nanoliflerinin (KGN) Elektro Eğirme İşlemi ile Elde Edilmesi ve Gıda Matrisinde Kullanımının Araştırılması” başlıklı bu proje, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında ilk olarak, kuzu ayaklarından kolajen ve GAG ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işleminin ardından kolajen örnekleri saflaştırma amacıyla diyaliz edilmiş ve ardından liyofilize edilerek oda koşullarında saklanmıştır. Kondroitin sülfat (CS) GAG örneklerinden anyon değişimi ile saflaştırılmış ve saf CS örnekleri liyofilize edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında, kolajen ve kondroitin sülfat moleküllerini içeren nanolif üretimi gerçekleştirilmiş ve nanolif üretimi için ideal koşullar belirlenmiştir. Çalışmanın üçüncü aşamasında, ideal koşullarda elde edilen nanolifler UV uygulaması ile çapraz bağlanmıştır.

Çalışmanın son aşamasında ise, çapraz bağlanmış nanolifler, granola barlara eklenerek fonksiyonel bir ürün geliştirilmiştir. Bu proje ile fonksiyonel gıda alanındaki çalışmalara yeni bir ürün kazandırılmıştır. 119O491 no’lu projenin gerçekleşmesindeki maddi desteklerinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu TÜBİTAK’a teşekkür ederiz.



İÇİNDEKİLER TABLOSU

ÖNSÖZ	iii
Tablo Listesi	vi
Şekiller Listesi	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. Gereç	14
3.2. Yöntem	14
3.2.1. Ekstraksiyon Aşaması	15
3.2.2. Elektro-Eğirme Yöntemi ile Nanolif Üretimi	21
3.2.3. Nanoliflerin çapraz bağlanması	23
3.2.4. Fonksiyonel gıda üretimi	24
3.3. Analizler	28
3.3.1. Kimyasal Bileşen Analizleri	28
3.3.2. Sodyum Dodesil Sülfat Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	30
3.3.3. Native Jel elektroforezi	30
3.3.4. Moleküler Ağırlık Dağılımının Belirlenmesi	31
3.3.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) Analizi	31
3.3.6. Kondroitin Sülfat Analizi (DMMB)	31
3.3.7. Kolajen Analizi	32
3.3.8. Aminoasit Analizi	32

3.3.9. Akış özelliklerinin belirlenmesi	33
3.3.10. Elektriksel iletkenlik ölçümü	33
3.3.11. SEM Analizi	33
3.3.12. İn Vitro Sitotoksosite Testi	33
3.3.13. Duyusal Analiz	33
3.3.14. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	35
4.1. Kolajen Karakterizasyonu	35
4.1.1. Kolajen Analizi Sonuçları	36
4.1.2. Kolajen FTIR Analizi Sonuçları	36
4.1.3. Sodyum Dodesil Sülfat Jel Elektforezi (SDS-PAGE)	37
4.1.4. Moleküler Ağırlık Dağılımının Belirlenmesi	39
4.1.5. Aminoasit Analizi	41
4.2. GAG Karakterizasyonu	42
4.2.1. FTIR Analizi	42
4.2.2. GAG Analizi	43
4.2.3. Moleküler ağırlığın belirlenmesi	44
4.3. Elektro-eğirme İşlemi ile Nanolif Eldesi ve Karakterizasyonu	44
4.3.1. İdeal koşullarda elde edilen nanoliflerin çapraz bağlanması	51
4.4. Fonksiyonel Gıda Üretimi	55
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
6. KAYNAKLAR	63

Tablo Listesi

Tablo 2.1 Ekstrasellüler Matriks Bileşenleri.....	3
Tablo 2.2 Elektro eğirme çalışmaları.....	11
Tablo 3.1. Elektro eğirme işlem koşulları.....	22
Tablo 3.2. Toplam canlı sayımı sonuçları	25
Tablo 3.3 Stok in vitro sindirim sıvılarının içerikleri.....	26
Tablo 3.4 Native poliakrilamid jel içeriği.....	30
Tablo 4.1 Kuzu ayaklarının yaş temelde kimyasal bileşimi.....	35
Tablo 4.2 Kuzu ayağı moleküler ağırlık dağılımının literatürle kıyaslanması.....	41
Tablo 4.3 Kuzu kolajeni aminoasit içeriği.....	41
Tablo 4.4 Elektro-eğirme işlem koşulları	45
Tablo 4.6 Kontrol nanolif ve çapraz bağlanmış nanolif örneklerinin ninhidrin deneyi sonrası absorbans değerleri.....	53
Tablo 4.7 Sindirim sıvılarının kolajen analizi sonuçları.....	55
Tablo 4.8. Sindirim sıvılarının GAG analizi sonuçları.....	55
Tablo 4.9. KGN içeren granola barın bileşim analizi sonuçları.....	57
Tablo 4.10. Üçgen test sonuçları.....	58
Tablo 4.11. Depolama çalışmaları özet tablo.....	58

Şekiller Listesi

Şekil 2.1. Glukozaminoglikanların sınıflandırılması	5
Şekil 2.2. Kondroitin 4- Sülfat ve Kondroitin 6- Sülfat Yapısı	6
Şekil 2.3. Nanoliflerin kullanım alanları	7
Şekil 2.4. Elektro-eğirme sırasında yüklü damlacık üzerine etkiyen kuvvetler	8
Şekil 2.5. Çözelti konsantrasyonunun artışına bağlı olarak malzeme yapısının değişimi. 8	
Şekil 2.6. Elektro-püskürtme ve Elektro-eğirme uygulamalarında etkili işlem parametreler.....	9
Şekil 2.7. Elektro eğirme sırasında uygulanan voltaj ve ortalama lif çapı arasındaki ilişki.....	10
Şekil 2.8. Elektro eğirme sırasında iğne ucu-kollektör arası mesafe ve ortalama lif çapı arasındaki ilişki.	11
Şekil 3.1. Proje Akış Şeması	14
Şekil 3.2. Kuzu ayaklarının 0.05 M Tris-HCL ile parçalandıktan sonra santrifüj işlemi öncesi ve sonrası görüntüleri	15
Şekil 3.3. Kolajen ekstraksiyonu akım şeması	16
Şekil 3.4. Diyaliz aşamasında örnekler (a), Liyofilize kolajen örneği (b)	17
Şekil 3.5. Kuzu tendonlarına uygulanan ön işlemlerin akım şeması	18
Şekil 3.6. Ön işlemleri tamamlanmış kuzu tendonları.....	18
Şekil 3.7. Ekstraksiyon öncesi ve sonrası örnek karışımları	19
Şekil 3.8. CS iyon kromatografi saflaştırmasındaki fraksiyonlara ait absorbands değerleri: kromatogram (280 nm) ve DMMB analizi (525 nm).....	20
Şekil 3.9. GAG ekstraktından CS anyon değişim saflaştırma sonucu fraksiyonların SDS PAGE analizi	21
Şekil 3.10. Elektro-eğirme sistemi ve toplanan nanolifler	22
Şekil 3.11. UV kabin (Fisher Scientific UV Darkroom CN-6, Amerika) ve UV işlemi uygulanan nanolif	23
Şekil 3.12. Hazırlanan granola barlar (A: pişirme işlemi uygulanmamış, B: pişirme işlemi uygulanmış).....	24
Şekil 3.13. Ambalajlanan granola barlar	28
Şekil 4.1. Kolajen standart eğrisi.....	36
Şekil 4.2. Kuzu kolajeni örneği ve kolajen standardına ait FTIR spektrumları	37
Şekil 4.3. Kolajen standardı ve kuzu kolajeninin SDS-PAGE bantları	38
Şekil 4.4. 5mg/mL konsantrasyondaki sulu kolajen çözeltisi	39
Şekil 4.5. Moleküler ağırlık için yapılan jel elektroforez sonuçları	40

Şekil 4.6. Saf CS örneği ve kondroitin sülfat standardına ait FTIR spektrumları.....	42
Şekil 4.7. GAG ekstraktı ve kondroitin sülfat standardına ait FTIR spektrumları	43
Şekil 4.8. CS standart eğrisi.....	43
Şekil 4.9. Saf CS örneğine ait moleküler ağırlık dağılımı grafiği	44
Şekil 4.10. Nanoliflerin (90:10 kolajen-kondroitin sülfat) SEM görüntüleri	46
Şekil 4.11. Toplanan nanolifler.....	46
Şekil 4.12. Kuru lifin stereo mikroskop görüntüsü (a), boyanmış lifin görüntüsü (b).....	47
Şekil 4.13. Nanoliflerin (95:5 kolajen-kondroitin sülfat) SEM görüntüleri	47
Şekil 4.14. Nanoliflerin (95:5 kolajen-kondroitin sülfat) SEM görüntüleri	48
Şekil 4.15. %15 (w/v) konsantrasyondaki çözeltinin 25°C'deki kayma gerilimi-kayma hızı grafiği	50
Şekil 4.16. İdeal koşullarda elde edilen nanolife (95:5 kolajen-kondroitin sülfat) ait SDS-PAGE görüntüsü	50
Şekil 4.17. Çapraz bağlanmış (15 dk) ve bağlanmamış nanoliflerin FTIR spektrumları (Kolajen için karakteristik bantlar: Amide A, B ve Amide I, II, III; kondroitin sülfat için karakteristik bant: C-O-S).....	51
Şekil 4.18. (1) Liyofilize kolajen: kondroitin sülfat (95:5); (2) kolajen:kondroitin sülfat (95:5) nanolif; (3) 15 dk UV ışık ile çapraz bağlanmış nanolif SDS-PAGE görüntüsü.....	52
Şekil 4.19. Çapraz bağlanmış ve bağlanmamış nanoliflerin FTIR spektrumları.....	52
Şekil 4.20. (1) 25 dk UV uygulanmış nanolif; (2) 35 dk UV uygulanmış nanolif; (M) Marker; (3) UV uygulanmamış nanolif; (4) 45 dk UV uygulanmış nanolif SDS-PAGE görüntüsü	53
Şekil 4.21. 30 dk UV uygulanmış nanoliflerin SEM analizi sonucu.....	54
Şekil 4.22. %10'luk jel sonuçları	54
Şekil 4.23. %12'lik jel sonuçları.....	55
Şekil 4.24. Sindirim sıvılarının kolajen analizi sonuçları.....	56
Şekil 4.25. Sindirim sıvılarının GAG analizi sonuçları.....	57
Şekil 4.26. Hazırlanan granola barlarla gerçekleştirilen üçgen test formu.....	59

ÖZET

Kolajen ve glukozaminoglikanlar (GAG), bağ dokusu hücreleri tarafından sentezlenen ekstraselüler matriksin (ESM) önemli bir kısmını oluşturan iki temel bileşendir. Özel bir amino asit bileşimine sahip olmasıyla diğer proteinlerden ayrılan kolajen, memelilerde en bol bulunan proteindir. Bağ doku hücrelerini saran uzun, doğrusal ve tekrar eden disakkarit birimlerden oluşan GAG'ların yapısında kıkırdak koruyucu ajan olarak bilinen kondroitin sülfat (CS) bulunmaktadır. Kolajen ve GAG moleküllerinin bir arada sağlık üzerine sinerjistik etki gösterdikleri bilinmektedir. Son yıllarda yaygınlaşan ve birçok kullanım alanı bulunan elektro-eğirme işlemi ile nano veya mikro ölçekli nanolifler elde edilebilmektedir. İşlem ve örnek hazırlama koşulları elektro eğirme işlemi ile elde edilen nanoliflerin boyutlarını ve homojenliğini etkilemektedir. Kolajen nanolifleri, genellikle doku mühendisliği ve biyomedikal alanlarında yapı iskelesi ya da doku iyileştirici malzeme olarak kullanılmaktadır.

Gerçekleştirilen çalışma başlıca dört aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada, kuzu ayaklarından kolajen ekstraksiyonu ve GAG ekstraksiyonu, ardından saflaştırma işlemiyle CS (CS içeriği %88) ve Tip 1 kolajen (kolajen içeriği %87) elde edilmiştir. İkinci aşamada, farklı işlem ve örnek koşulları kullanılarak elektro eğirme uygulamaları yapılmıştır. Nanolif eldesi için ideal çözelti parametreleri: örnek konsantrasyonu: %15 (w/v), kolajen:kondroitin sülfat oranı: 95:5 (w/w), asetik asit konsantrasyonu %65 (v/v) olarak belirlenmiştir. İdeal işlem parametreleri ise: voltaj: 26 kV, akış hızı: 0.8 ml/h ve iğne ucu-kolektör arası mesafe: 15 cm olarak belirlenmiştir. Üçüncü aşamada, ideal koşulda üretilen kolajen içinde GAG nanolifleri (KGN), kolajen stabilizasyonunun artırılması amacıyla UV ışığında (254 nm) 30 dk süreyle çapraz bağlanmıştır. Projenin son aşamasında ise, kolajen-GAG temelli nanolifler ilk kez bir gıda matriksi içinde kullanılmış ve mikrobiyolojik açıdan güvenilir, kabul edilebilir duyuşal özelliklere sahip fonksiyonel bir ürün geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: kolajen, GAG, kondroitin sülfat, elektro-eğirme, nanolif, fonksiyonel gıda

ABSTRACT

Collagen and glycosaminoglycans (GAG) are two major components of the extracellular matrix (ESM) synthesized by connective tissue cells. Collagen is the most abundant protein in mammals and differs from other proteins with its special amino acid composition. Chondroitin sulfate (CS), known as cartilage protective agent is found in the structure of GAGs consisting of long, linear and repetitive disaccharide units surrounding the connective tissue cells. Collagen and GAG molecules are known to have a synergistic effect on health. Nano or micro fibers can be obtained by electro spinning process, which has become widespread in recent years and has many uses. Process and sample preparation conditions affect the size and homogeneity of the nanofibers obtained by the electro spinning process. Collagen nanofibers are generally used as scaffolding or tissue healing materials in tissue engineering and biomedical fields.

The study consists of four main stages. In the first step, CS (CS content 88%) and Type I collagen (87% collagen content) were obtained by extraction of collagen from lamb's feet and GAG extraction followed by purification. In the second stage, electrospinning applications were made using different process and sample conditions. Ideal solution parameters for nanofiber production: sample concentration: 15% (w/v), collagen:chondroitin sulfate ratio: 95:5 (w/w), acetic acid concentration was determined as 65% (v/v). The ideal process parameters are: voltage: 26 kV, flow rate: 0.8 ml/h and distance between needle tip and collector: 15 cm. In the third step, GAG nanofibers (KGN) in collagen produced under ideal conditions were cross-linked in UV light (254 nm) for 30 min in order to increase collagen stabilization. In the final phase of the project, collagen-GAG-based nanofibers were used for the first time in a food matrix and a functional product with microbiologically safe and acceptable sensory properties was developed.

Keywords: collagen, GAG, chondroitin sulfate, electrospinning, nanofiber, functional food



1. GİRİŞ

İnsan vücudunun dokuları, vücut süreçlerini, performanslarını ve yara iyileşmelerini kontrol eden ve aynı zamanda uygun yapısal bileşenler sağlayan spesifik hücreler ve ekstraselüler matriksten (ESM) oluşur (Pezeshki-Modaress vd., 2015). Ekstraselüler matriks (ESM), hücreler arası boşlukları dolduran ve hücreleri birbirine bağlayan, birçok protein, hormon, proteoglikan ve büyüme faktörlerini içeren, hücrelerin özel fonksiyonları gerçekleştirebilmesi için hücre içi sinyalleme yolları ile etkileşimlerini sağlayan, kompleks ve dinamik bir yapıdır (Uslu ve Eltas, 2015). Sıklıkla bağ doku olarak adlandırılan ESM, kıkırdak ve kemikte fazla miktarda bulunmaktadır. Kolajen ve glukozaminoglikanlar ESM matriksinin önemli bir kısmını oluşturan iki temel ekstraselüler bileşendir.

Kolajen, deri, kemik, kıkırdak ve tendon gibi farklı bağ dokularda bulunan ve memelilerde toplam proteinin yaklaşık %30'unu içeren lifli bir proteindir. Bağ dokuda son derece önemli yapısal bir protein olan kolajen molekülü, genellikle ağsı veya lifsi yapıdadır (Yang ve Shu, 2014). ESM'nin önemli bir kısmını oluşturan kolajen biyolojik yapılardaki bağlayıcı rolü nedeniyle birçok canlı organizmada en çok bulunan moleküllerden biridir. Kolajen molekülünün ana görevi omurgalıları yapısal ve mekaniksel özellikler sağlamaktır (Ferraro vd., 2017). Kolajen moleülleri, 360 kDa'lık bir molar kütle ile yaklaşık 280 nm uzunluğundadır (Silva ve Penna, 2012). Kolajendeki amino asit dizilimlerine göre sınıflandırılan en az 20 farklı kolajen tipi vardır. Ancak vücuttaki kolajenlerin %80-90'ı tip 1, tip 2 ve tip 3 grubuna aittir. Tip I kolajen insan vücudunda en çok bulunan ve en dayanıklı olan kolajen tipidir. Başlıca deride, tendonlarda, kemikte, ligamentlerde ve bağ dokusunda bulunmaktadır (Krishnamoorthi vd., 2017). Tip II kolajen kıkırdak dokusunun başlıca kolajenidir. Kıkırdaktaki toplam protein içeriğinin %90-95'ini oluşturur (Jeevithan vd., 2015). Etki mekanizması itibariyle, osteoartrit/romatoid artrit gibi eklem hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Tip III kolajen genellikle tip I kolajenle beraber bulunur. Cilde elastikiyetini ve sıkılığını verir.

Glukozaminoglikanlar (GAG), kolajen moleüllerine ek olarak hücre dışı matrikste en çok bulunan yapısal bileşenlerdir (Lee vd., 2016). Uzun, doğrusal ve tekrar eden disakkarit birimlerden oluşan glukozaminoglikanlar, negatif yüklü polisakkaritlerdir. GAG zincirleri, dokuya mekaniksel destek vermekle beraber aynı zamanda suda çözünebilir molekülün hızlı difüzyonunu ve hücre göçünü sağlamaktadır (Üçgül vd., 2018). GAG'lar sülfatlanmış ve sülfatlanmamış olmak üzere olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Eklem kıkırdağındaki proteoglikanlarda en çok bulunan glukozaminoglikan olan kondroitin sülfat (CS), hayvansal dokunun temel yapı maddeleri arasında yer almaktadır. Başlıca işlevleri arasında eklem sıvısında ve kıkırdakta yıkıcı enzimleri inhibe etmek, GAG havuzunu çoğaltmak ve

elastikiyeti sağlamak yer almaktadır (Akgün ve Öğüt, 2002). Kıkırdak koruyucu ajan olarak da bilinen CS, osteoartrit tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Elektro eğirme işlemi, bir enjektörün iğne ucu ile bir metal toplayıcı arasında yüksek voltaj kullanarak nano veya mikro ölçekli liflerin üretilmesini ifade etmektedir (Leidy ve Ximena, 2019). Çok yönlülüğü nedeniyle son yıllarda popülerliği artan elektro-eğirme işlemi çeşitli uygulamalarda (örneğin, tıp, eczacılık, tekstil, doku mühendisliği, gıda endüstrisi) kullanılmaktadır. Elektro eğirme işlemiyle elde edilen nanoliflerin dayanıklılığının az olduğu farklı çalışmalarda bildirilmiştir (Huang vd., 2012; Jeong ve Park, 2014; Banner vd., 2018). Nieuwland vd. (2013) bir gıda ürünündeki lif çözünürlüğünü azaltmak için çapraz-bağlama önermiştir. Çapraz bağlama işlemi fiziksel, kimyasal veya enzimatik muamelelerle yapılmaktadır. Proteinlerin çapraz bağlanmasında kullanılan kimyasal maddeler arasında glutaraldehit, gliseraldehit, formaldehit ve glioksal yer almaktadır. Ancak bu ajanların gıdalardaki kullanımı sınırlıdır (Chambi ve Grosso, 2006). Enzimle çapraz bağlama işleminde transglutaminaz yaygın olarak kullanılmaktadır (Kuraishi vd.,2007). UV ve γ -ışınlama gibi fiziksel çapraz bağlama yöntemleri gıda endüstrisi için daha uygundur (Ouattara vd., 2002; Cao vd., 2007; Bhat ve Karim, 2014; Shahbazi vd., 2016).

Bu proje kapsamında, kuzu ayaklarından ve tendonlarından yüksek saflıkta kondroitin sülfat ve Tip 1 kolajen elde edilmiş ve nanolif eldesinde kullanılmıştır. Elektro-eğirme işlemiyle büyük kolajen molekülleri küçülerek kolay sindirilebilir ve emilebilir bir yapı kazanmıştır. UV ile çapraz bağlama işleminden sonra kolajen-GAG nanolifleri model gıda olarak belirlenen granola barlara eklenmiştir. Bu çalışmayla birlikte, kolajen-GAG temelli nanolifler ilk kez bir gıda matriksi içinde kullanılmış ve mikrobiyolojik açıdan güvenilir, kabul edilebilir duyuşal özelliklere sahip fonksiyonel bir ürün geliştirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Hücre dışı matriks olarak da bilinen ESM molekülüleri temel olarak su, polisakkaritler ve proteinlerden oluşmasına rağmen, doku gelişimi sırasında meydana gelen farklı hücreler arasındaki dinamik etkileşimler sonucu özel bir kompozisyona sahip olmaktadır (Frantz vd., 2010). Özellikle kemik ve kıkırdakta fazla miktarda bulunan ESM bileşenleri, glukozaminoglikanlar ve fibröz proteinler olmak üzere 2 sınıfta incelenmektedir. Tablo 2.1’de ESM bileşenleri görülmektedir. Kolajen ve glukozaminoglikanlar ESM matriksinin önemli bir kısmını oluşturan iki temel ekstraselüler bileşendir.

Tablo 2.1 Ekstraselüler Matriks Bileşenleri

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

2.1. Kolajen

Kolajen molekülüleri, sarmal yapıda üç polipeptit zincirinden oluşmaktadır. Polipeptit alt birimler olan α -zincirler, kolajen molekülünün üçlü sarmal (heliks) yapısını oluşturmaktadır. İki α zinciri, β -peptit zinciri olarak bilinen bir peptit zincir dimerine dönüşürken, üç α zinciri, γ -peptit zinciri (tropokolajen molekülü) olarak bilinen peptit zincir trimerine dönüşür (Yang and Shu, 2014). Kolajen proteini, özel bir amino asit bileşimine sahiptir ve bu özelliğiyle diğer proteinlerden ayrılır. Kolajen yapısında on dokuz farklı amino asit bulunur ve ortalama olarak kolajendeki toplam amino asitlerin %57’ sini glisin, prolin ve hidroksiprolin oluşturur (Li ve Wu, 2018). Kolajen proteinin sağlığa faydalı birçok etkisi vardır. Literatürde kolajenin, antioksidan, anti-inflamatuar, antihipertansif, antiosteoporotik, antitümör etkileri bildirilmiştir (Ferraro vd., 2016). Kolajen ve kolajen türevleri (jelatin, kolajen hidrolizatı ve kolajen peptitler) genel olarak güvenli (GRAS) gıda ürünleri olarak kabul edilmektedir. Yüksek protein içeriği ve su emme kapasitesi, jel oluşumu ve emülsiyonları oluşturma-stabilize etme gibi

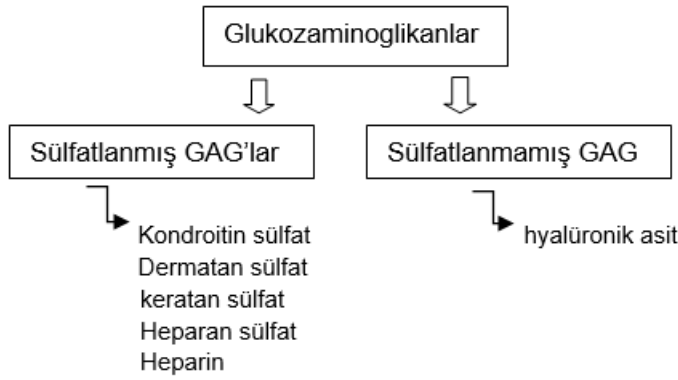
fonksiyonel özellikleri nedeniyle gıda endüstrisinde kolajen ve türevlerine büyük bir talep vardır (Schmidt vd., 2016).

Deri, kemik gibi kolajence zengin maddelerden sıcak su ile ekstrakte edilen kolajen, jelatin olarak da bilinmektedir. Jelatinin enzimatik veya asidik hidroliz yoluyla daha ileri derecede parçalanması sonucunda ise suda çözünür formdaki kolajen peptit olarak da bilinen kolajen hidrolizati elde edilmektedir. Kolajen hidrolizatının antioksidan, anti-inflamatuar, antihipertansif, antiosteoporotik, antitümör gibi sağlığa faydalı birçok etkisi bulunmaktadır (Song ve Li, 2017). Kolajen, jelatin ve kolajen hidrolizati genel olarak güvenli (GRAS) gıda ürünleri olarak kabul edilmektedir (Moskowitz, 2000). Kolajenin, çeşitli endüstriyel uygulamalara sahip olması kullanışlı biyomateryallerden biri olarak kabul görmesini sağlamaktadır (Lafarga ve Hayes, 2014). Yüksek protein içeriği ve su emme kapasitesi, jel oluşumu ve emülsiyonları oluşturma-stabilize etme gibi fonksiyonel özellikleri nedeniyle gıda endüstrisinde kolajen ve jelatine büyük bir talep vardır (Schmidt vd., 2016). Bununla beraber, yenilenebilir, parçalanabilir, biyo-uyumlu ve yapısının ayarlanabilir olması kolajen proteinin sahip olduğu avantajlardandır. Bu nedenle, sağlık ürünlerinde, gıdalarda, kozmetikte, tıbbi malzemelerde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Yang ve Shu, 2014). Kolajen hidrolizati ve jelatin, kolajen ile aynı amino asit içeriğine sahip olmasına rağmen farklı özelliklere sahiptir. Kolajen hidrolizati (2-6 kDa), kolajen ve jelatine kıyasla çok daha kısa amino asit zincirlerinden oluştuğu için biyoyararlanımı daha fazladır ve kan dolaşımında daha iyi emilir (Song ve Li, 2017).

Molar kütlelerin, yapının, bileşimin dağılımı ve kolajenin fonksiyonel özellikleri, elde edildiği hammaddenin işlem koşullarına ve ekstraksiyon sürecinde kullanılan enzimin özelliklerine bağlıdır. Bu nedenle, kolajeni yüksek verim ve kalitede elde etmek için hammaddeye en uygun ekstraksiyon sürecinin belirlenmesi gereklidir (Schmidt vd., 2016). Kolajen ekstraksiyonu için en sık kullanılan hammaddeler, deri veya postlar, kemikler, tendonlar ve kıkırdaklardır (Gómez-Guillén vd., 2011). Ticari kolajenlerin birçoğu, özellikle sığır ve domuz gibi memeli hayvanların yan ürünlerinden elde edilmektedir (Arumugam vd., 2018). Ancak, sığırlarda görülen deli dana hastalığı (BSE), ayak-ağız hastalığı (FMD) ve inanca dayalı kısıtlamalar gibi problemler, araştırmacıları kolajen için farklı hammaddeler arayışına yönlendirmiştir. Kolajen ekstraksiyonunda kullanılan hammaddelerin genelde deri, kemik, ayak ve pul gibi insan tüketimi amacıyla kullanılmayan hayvansal yan ürünlerden oluştuğu gözlenmiştir. Bu yan ürünlerin kullanılarak katma değeri yüksek olan kolajen üretilmesi, hayvansal atıkların da verimli bir şekilde değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.

2.2. Glukozaminoglikanlar

Çekirdek proteindeki GAG zincirleri, asetillenmiş amino şeker parçaları (N-asetil-galaktozamin veya N-asetil-glukozamin) ve ağırlıklı olarak üronik asit (D-glukronik asit veya L-iduronik asit) içeren tekrarlayan disakkarit birimlerinden oluşmaktadır (Schaefer and Schaefer, 2010). GAG'lar sülfatlanmış (Kondroitin sülfat, Dermatan sülfat, Keratan sülfat, Heparin ve Heparan sülfat) ve sülfatlanmamış (Hyalüronik asit) olmak üzere olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 2.1).

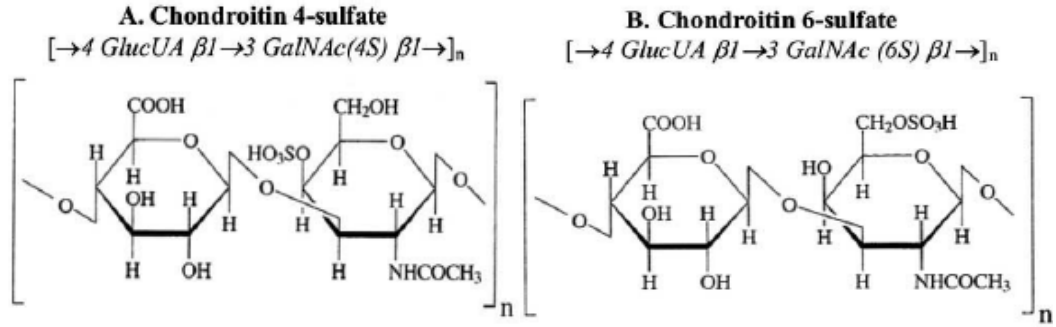


Şekil 2.1 Glukozaminoglikanların sınıflandırılması

GAG'lar, proteoglikanlar olarak adlandırılan spesifik bir çekirdek proteinine kovalent olarak bağlanırlar. GAG'ların işlevleri genel olarak şu şekildedir:

- Hyalüronik asit (HA): Cildin bağ dokusu, göbek kordonu ve eklemlerdeki sinoviyal sıvı olmak üzere vücudun genelinde doğal olarak HA, kolajen liflerinin oluşumuna katkı sağlama, doku onarımı ve elastikiyetin korunması gibi işlevlere sahiptir (Papakonstantinou vd., 2012).
- Keratan sülfat (KS): En heterojen GAG olarak bilinen keratan sülfat, korneanın esas glukozaminoglikanı olarak tanımlanmaktadır. Korneanın gelişimi ve dokunun saydamlığının korunmasında önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir (Kitayama vd., 2007).
- Dermatan sülfat (DS): Deride, tendonlarda, kan damarlarında ve kıkırdakta bulunan DS, yaraların iyileşmesinde önemli bir işleve sahiptir (Trowbridge ve Gallo, 2002).
- Heparin ve Heparan sülfat: Heparan sülfatın modifiye edilmiş şekli olan heparin, iyi bilinen bir antikoagülan (kanın pıhtılaşmasını önleyen bir madde) ilaçtır (Wardrop ve Keeling, 2008).

- Kondroitin sülfat (CS): Kondroitin sülfat, dönüşümlü bağlarla birbirine bağlı bir D-glukuronik asit ve N-asetil-D-galaktozamin-4/6-sülfat tortusundan oluşmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Kondroitin 4- Sülfat ve Kondroitin 6- Sülfat Yapısı (Nakano, 2010)

Kıkırdaklı dokuların ana kaynağı olan CS, GAG'ların %20-80' nini oluşturur ve önemli birçok fizyolojik işleve sahiptir (Almarza ve Athanasiou, 2004). Hidrofilik olan CS molekülleri kıkırdaktaki yüksek su içeriğinden sorumludurlar. Literatürde, kondroitin sülfatın ağrıyı hafifletebileceği ve osteoartrit hastalarının fonksiyonel durumunu iyileştirebileceği ve memeli enzimleriyle üretilen kondroitin sülfat oligosakkaritlerinin pro-inflamatuvar, antikoagülan, antitrombotik potansiyele sahip olabileceği bildirilmiştir (Wang vd., 2016; Sundaresan vd., 2018; Nogueira vd., 2019). Tıp, biyoteknoloji, eczacılık, tekstil ve kozmetik gibi farklı alanlarda yaygın olarak kullanılan CS, gıda endüstrisinde fonksiyonel gıda veya diyet takviyeleri olarak kullanılmaktadır (Nakano vd., 2010). Kolajen ve CS içeren gıda takviyeleri eklem rahatsızlıkları için nutrasötik destek olarak kullanılmaktadır.

GAG kaynaklarından kıkırdakta en yaygın olarak bulunan kondroitin sülfat ticari olarak sığır kıkırdağı, sığır nefes borusu ve köpekbalığı yüzgeci gibi çeşitli kaynaklardan temin edilmektedir (Rani vd., 2017). CS genellikle sığır veya köpek balığı kıkırdağından elde edilmektedir. Ancak sığırlarda görülen deli dana hastalığının potansiyel bir risk olduğu bilinmektedir. CS'ye olan talebin gelecekte de artmaya devam etmesi durumunda, köpekbalığı kıkırdağı kaynağından eldesinde kısıtlar olacağı düşünülmektedir (Nakano vd., 2012). Yüksek hammadde maliyeti ve GAG'lara olan taleple birlikte, ticari olarak farklı GAG kaynaklarına ihtiyaç artmaktadır.

Glukozaminoglikanlar, genellikle papain veya pronaz gibi hücre dışı (eksojen) bir enzim aracılığıyla ekstrakte edilmektedir (Raghuraman, 2013). Widyaningsih vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, tavuk ayağı kıkırdağından CS ve glukozamin (GS) eldesi için farklı ekstraksiyon yöntemleri değerlendirilmiştir. Örnekler 37°C'de 7 ve 17 saat boyunca asetik asit ile 100°C'de 2 ve 2.5 saat kaynar su ile; 65°C'de 24 ve 48 saat papain ile ekstrakte

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

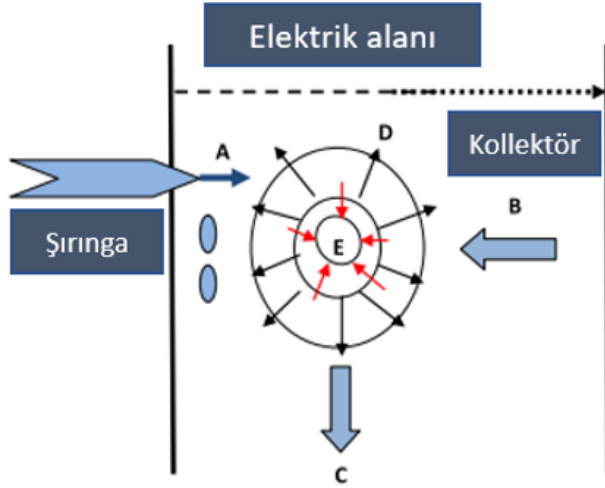
2.3. Elektro-Eğirme

Elektro-püskürtme/eğirme, elektromekanik ve hidrodinamik kuvvetler aracılığıyla sıvıların atomizasyonunun gerçekleştirildiği ve nano ila mikro ölçekli liflerin ve parçacıkların üretimi için kullanılan bir yöntemdir. 1934 yılında Formhals tarafından, elektrostatik kuvvetler kullanılmak suretiyle polimerlerden filament lif üretilmesi işleminin patenti alınmış ve kullanılan bu yöntem "elektrospinning" olarak tanımlanmıştır (Formhals, 1934). Elektro-püskürtme/eğirme yöntemi son yıllarda nanoteknoloji alanı başta olmak üzere çok çeşitli uygulama alanları bulmuştur (Şekil 2.3).



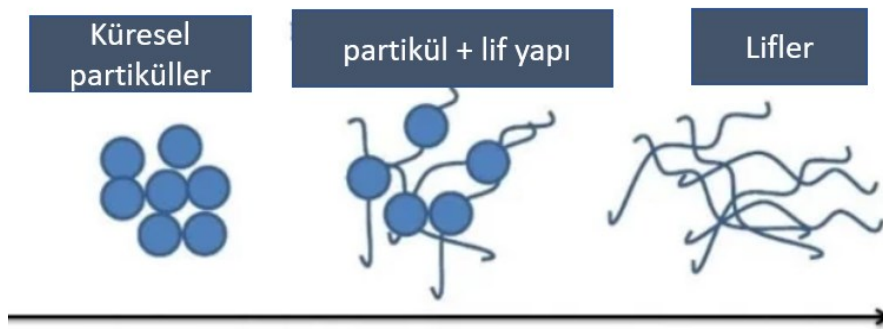
Şekil 2.3 Nanoliflerin kullanım alanları (Sunar ve Hasçıçek, 2017)

Elektro-eğirme sırasında bir polimer jetinin oluşumu esas olarak elektriksel kuvvet (Coulomb kuvveti), elektrik alan kuvveti, viskoelastik kuvvet ve yüzey gerilimi kuvvetleri tarafından yönetilir (Lim vd., 2019). Şekil 2.4’de elektro-eğirme sırasında yüklü damlacık üzerine etkiyen kuvvetler görülmektedir. Hava direnci ve yerçekimi (FG) kuvvetleri gibi diğer kuvvetler ise liflerin ultra ince yapısı nedeniyle bu faktörlere kıyasla daha az belirgindir.



Şekil 2.4 Elektro-eğirme sırasında yüklü damlacık üzerine etkiyen kuvvetler (A): Elektrostatik Kuvvet, (B): Sürükleme kuvveti, (C): Yerçekimi, (D): Coulomb kuvveti, (E): Yüzey gerilimi & viskoelastik kuvvet

Polimer çözeltisinin konsantrasyonu, elde edilen malzemenin yapısını belirler. Daha düşük çözelti konsantrasyonlarında küresel parçacıklar gözlenirken, konsantrasyon kritik bir değere yaklaştığında lif yapısı gözlenmeye başlar (Şekil 2.5) (Bock vd., 2012).



Şekil 2.5 Çözelti konsantrasyonunun artışına bağlı olarak malzeme yapısının değişimi

Sıvı özellikleri, özellikle elektriksel iletkenlik, viskozite ve yüzey gerilimi, çözeltinin elektro-püskürtülebilirliğini/eğrilebilirliğini belirleyen faktörlerdir (Rutledge and Fridrikh, 2007). Bu parametreler değiştirilerek farklı morfolojilere sahip lifler üretmek mümkündür. Şekil 2.6'da elektro-püskürtme ve elektro-eğirme uygulamalarında etkili işlem parametreleri görülmektedir.

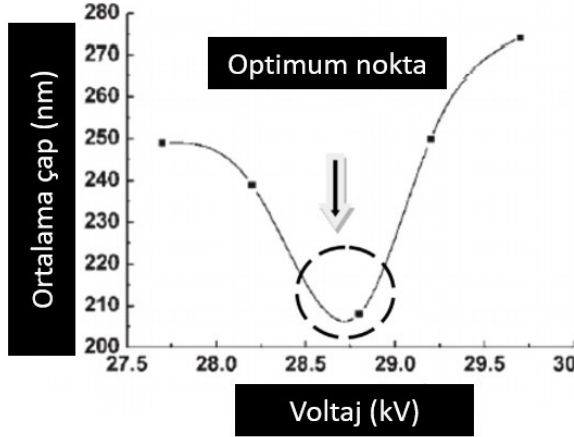
Çözelti Parametreleri	Ekipman Parametreleri	Ortam parametreleri
• Polimerin Viskozitesi/Konsantrasyonu • Elektriksel iletkenlik • Polimerin moleküler ağırlığı • Elastikiyet • Yüzey gerilimi • Çözelti Seçimi	• Uygulanan voltaj • İğne çapı • Hacimsel besleme hızı • <u>Kollektörün</u> (Toplayıcı yüzey) mesafesi	• Sıcaklık • Nem • Basınç • Hava hızı

Şekil 2.6 Elektro-püskürtme ve Elektro-eğirme uygulamalarında etkili işlem parametreleri

Lif çapını ve morfolojisini etkileyen ana parametrelerden biri polimer çözeltisinin doğasıdır (Teo ve Ramakrishna, 2006). Başlıca çözelti parametreleri: polimer konsantrasyonu, polimerin moleküler ağırlığı, yüzey gerilimi ve elektriksel iletkenlik olarak incelenebilir. Elektro-eğirme sırasında lif oluşumunu kolaylaştırmak için belirli bir minimum polimer konsantrasyonu gereklidir. Bu kritik değer altında voltaj uygulanması, esas olarak Rayleigh kararsızlığı (kılcal dalga kırılması) nedeniyle elektro-püskürtme ve boncuk oluşumu ile sonuçlanır (Ghorani ve Tucker, 2015). Demir, Yılğör, Yılğör ve Erman (2002), hem elektro-eğirme sürecini hem de sonuçta ortaya çıkan lif özelliklerini etkileyen çözelti özellikleri arasında viskozite, çözelti konsantrasyonu ve sıcaklığın baskın faktörler olduğunu bildirmiştir.

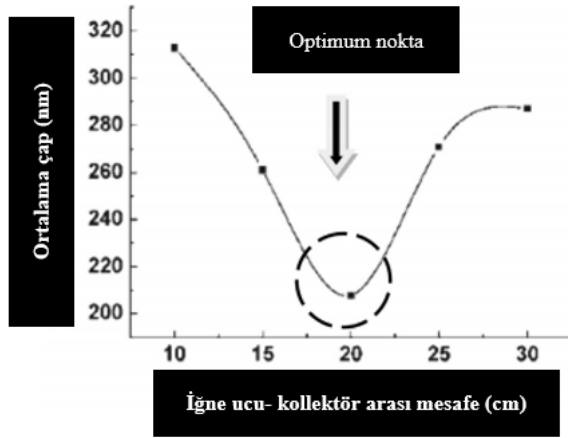
Elektro-püskürtme/eğirme işlemini etkileyen diğer önemli ekipman parametreleri voltaj, iğne ile kollektör arası mesafe (uçtan kollektöre olan mesafe), çözeltinin akış hızı ve iğne çapıdır.

- **Voltaj:** Çözeltinin besleme hızına bağlı olarak, kararlı bir Taylor konisinin oluşması için genel olarak, 6 kV'dan daha yüksek bir voltaj değeri gerekmektedir (Taylor, 1964). Lin vd. (2008), ortalama lif çapının, uygulanan voltajdaki bir ilk artıştan sonra minimum bir değere ulaştığını ve daha sonra uygulanan voltaj arttıkça lif çapının da arttığını bildirmiştir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Elektro eğirme sırasında uygulanan voltaj ve ortalama lif çapı arasındaki ilişki

- Akış hızı: Polimer çözeltisi akış hızı, elektro-eğirme için gerekli olan çözelti miktarını belirler (Rutledge vd., 2001). Elektro-eğirme için uygun çözelti akış hızının kritik değeri Taylor konisinin kararlı olduğu değerdir. Akış hızı bu kritik değeri geçtiğinde lif çapı ve boncuk oluşumu da artar. Zhang vd. (2005), morfolojik yapının değişen akış hızıyla çok az değiştiğini ve çalışılan süreç parametrelerinden en az önemli etkisi olduğunu bildirmiştir.
- İğne çapı: İğne çapı arttıkça yüzey geriliminin etkileri sonucu, iğne ucunda tıkanmalar meydana gelebilir. İğne iç çapının azalması, üretilen liflerin çapı ve boncuk oluşumunu da azaltır (Ghorani ve Tucker, 2015). Ancak, deliğin çapı çok küçükse, çözeltinin yüzey gerilimine bağlı olarak polimer damlasının oluşması zor olabilir.
- İğne ucu- kollektör (toplama plakası) arası mesafe: Polimer jetin uzaması Taylor konisinin oluştuğu iğne ucu ile kollektör arasında gerçekleşir. İğne ucu ile kollektör arasındaki mesafe liflerin havada kalma süresi ve elektrik alanının büyüklüğünü etkilemektedir. İğne ucu ile kollektör arasındaki mesafe arttıkça liflerin havada kalma süresi artarken elektrik alanın şiddeti azalmaktadır. Mesafenin çok küçük olduğu durumlarda ise iğne ucu ile kollektör arasında oluşan elektrik alan kuvvetine bağlı olarak boncuksu yapı oluşumu gözlenebilir. Şekil 2.8'de de görüldüğü gibi mesafe sıfırdan kademeli olarak artırıldığında, ortalama lif çapı önce minimum bir değere ulaşır, ardından tekrar artış gösterir.



Şekil 2.8 Elektro eğirme sırasında iğne ucu-kollektör arası mesafe ve ortalama lif çapı arasındaki ilişki (Ghorani ve Tucker, 2015).

Elektro-püskürtme/eğirme işlemini etkileyen diğer parametre ise ortam parametreleridir. Ortam parametrelerinin, özellikle nem ve sıcaklığın, lif morfolojisini ve elektro-eğirme işleminin verimliliğini etkilediği düşünülmektedir. Bunun nedeni, çözeltinin buharlaşması ile sıcaklık arasında olduğu kadar çözeltinin iletkenliği ile sıcaklık arasında da doğrudan bir ilişki bulunmasıdır (Bhardwaj ve Kundu, 2010). Ayrıca, polimer çözeltisinin polimer viskozitesi ve yüzey gerilimi sıcaklıktan etkilenir. Nem miktarının artması oluşan gözeneklerin boyutunun ve derinliğinin artmasına sebep olmaktadır. De Vrieze vd. (2009), ortalama lif çapının nemden etkilendiğini ancak eğilimlerin genelleştirilemediğini bildirmiştir. Düşük basınçlı ortamlarda gerçekleştirilen elektro-eğirme istenilen bir işlem değildir. Çünkü iğne ucundaki çözelti düşük basınçta işlem gerçekleştirilemeden kollektör üzerine düşer (Ramakrishna vd., 2005).

2.4. Elektro-eğirme uygulamaları

Kolajen nanolifleriyle ilgili yapılan farklı çalışmalar literatürde mevcuttur, ancak kolajen ve GAG moleküllerinin birlikte nanolif olarak elde edildiği çalışmaların sayısı oldukça kısıtlıdır. Tablo 2.2'de elektro eğirme ile elde edilen kolajen ve kolajen-GAG nanolif çalışmaları görülmektedir.

Tablo 2.2 Elektro eğirme çalışmaları

Kaynak	Proses Koşulları	Kullanılan çözügen	Kullanım Yeri	Kaynak
Dana derisi-Tip 1 kolajen	mesafe = 15-20 cm uygulanan voltaj = 19-21 kV akış hızı= 80 µl/dk	1,1,1,3,3,3-hekzaflorür-2-propanol (HFP)	Doku mühendisliği-yapı iskelesi	Yang vd. (2008)

Sığır derisi- Tip I kolajen	mesafe= 15 cm uygulanan voltaj= 20-22 kV akış hızı= 0.2-0.5 µL/dk	HFP 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE) Fosfat tampon tuz çözeltisi / etanol Asetik asit / etanol	Biyomedikal-pansuman malzemesi	Bürck vd. (2013)
Balık derisi- Tip 1 kolajen	mesafe = 10 cm uygulanan voltaj= 20 kV	Asetik asit	Biyomedikal-hücre bağlantısı	Sizeland vd. (2018)
Dana derisi ve plasenta- Tip I ve tip III	mesafe= 10-12 cm uygulanan voltaj= 15-30 kV akış hızı= 0- 25 mL/h	HFP	Doku mühendisliği-yapı iskelesi	Matthews vd. (2002)
Sığır derisi- Tip I kolajen	Mesafe= 15 cm Uygulanan voltaj= 16 kV Akış hızı= 0.5 µL/dk	HFP Asetik asit	Biyomedikal-yapı iskelesi	Kazancı (2014)
Dana derisi- Tip I kolajen Kondroitin-6-sülfat	mesafe= 15 cm uygulanan voltaj= 15 kV akış hızı= 1.0 mL/h	TFE/su	Doku mühendisliği-yapı iskelesi	Zhong vd. (2007)
Sığır derisi jelatini- Tip B Kondroitin sülfat- Tip A	mesafe= 10 cm uygulanan voltaj= 15-25 kV akış hızı= 0,6-1.0 mL/h	TFE/su	Doku mühendisliği-yapı iskelesi	Pezeshki-Modaress vd. (2015)

Tablo 2.2’de de görüldüğü gibi kolajen ve kolajen-GAG nanoliflerin elektro eğrilmesinde genellikle çevre ve insan sağlığı açısından toksik etki gösteren HFP ve TFE kullanılmıştır. Biyomedikal uygulamalar için bu sert çözgenlerin uygulanabileceği belirtilmiştir (Nieuwland vd., 2013). Ancak, gıda uygulamaları için bu kimyasalların kullanımı sakıncalıdır.

Hofman vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, farklı formdaki kolajenlerin (doğal üçlü sarmal yapıda kolajen, denatüre kolajen ve atelokolajen, jelatin) lif oluşumuna etkisi incelenmiştir. Düşük moleküler ağırlıklı jelatin (<100 kDa) ve atelokolajenin lif oluşturmada, denatüre kolajenin başarılı şekilde lif oluşturduğu görülmüştür. Doğal üçlü sarmal yapıda kolajenin lif oluşturmada için gerekli asetik asit konsantrasyonunun (%20-%40) aralığında olması gerektiği belirtilmiştir. SDS-PAGE elektroforez sonuçları, artan asetik asit konsantrasyonu ve muamele süresine bağlı olarak, elektro eğirme sırasında hidrojen bağlarının koparıldığı ve moleküllerin gittikçe küçüldüğünü göstermiştir. Wongsasulak vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada, selüloz asetat ve yumurta akı karışımından yenilebilir nanolifli ince filmler üretilmiştir. Elde edilen nanoliflerin, nutrasötiklerin ve ilaçların in vivo kontrollü salımına ilişkin yeni işlevler sağlayabileceği belirtilmiştir. Aceituno-Medina vd. (2013) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada, amarant ve pullulan karışımından

gıdada kullanılabilir nanolifler elde edilmiştir. Fonksiyonel gıda uygulamaları açısından önemli olan bu çalışmada, nanoliflerin, biyoaktif bileşenlerin nanoenkapsülasyonunda kullanılabileceği bildirilmiştir. Fathi vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada, E vitamini içeren dekstran nanolifleri elde edilmiş ve peynire eklenmiştir. Nanolif içeren peynirlerin duyusal özellikleri kabul edilebilir bulunmuştur. Daha da önemlisi, E vitamininin nanolif içerisinde kapsanmış olması biyoyararlılığını arttırmıştır. Neo vd. (2013), farklı oranlarda gallik asidi, elektro-eğirme ile zein nanoliflerine başarılı bir şekilde kapsüllemiştir. Gallik asit kapsüllü zein nanoliflerinin uygulanabilirliği potansiyel olarak aktif bir gıda ambalaj malzemesi olarak değerlendirilmiş ve nanoliflerin 60 gün sonra termal ve kimyasal olarak stabil kaldığı ve bakteri ve maya hücrelerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Veleirinho ve Lopes-da-Silva (2009) tarafından yapılan çalışmada, elma suyunun filtrasyonunda kullanılmak amacıyla, elektro-eğirme yöntemi kullanılarak ortalama lif çapı 420 nm ve ortalama kalınlığı 0.2 mm olan poli(etilen tereftalat) nanolif membranlar üretilmiştir. Çalışma sonucunda poli(PEF) nanolif membran kullanımının, geleneksel filtre yardımcılara göre daha hızlı, basit, ekonomik ve verimli bir filtrasyon ortamı olduğu bildirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

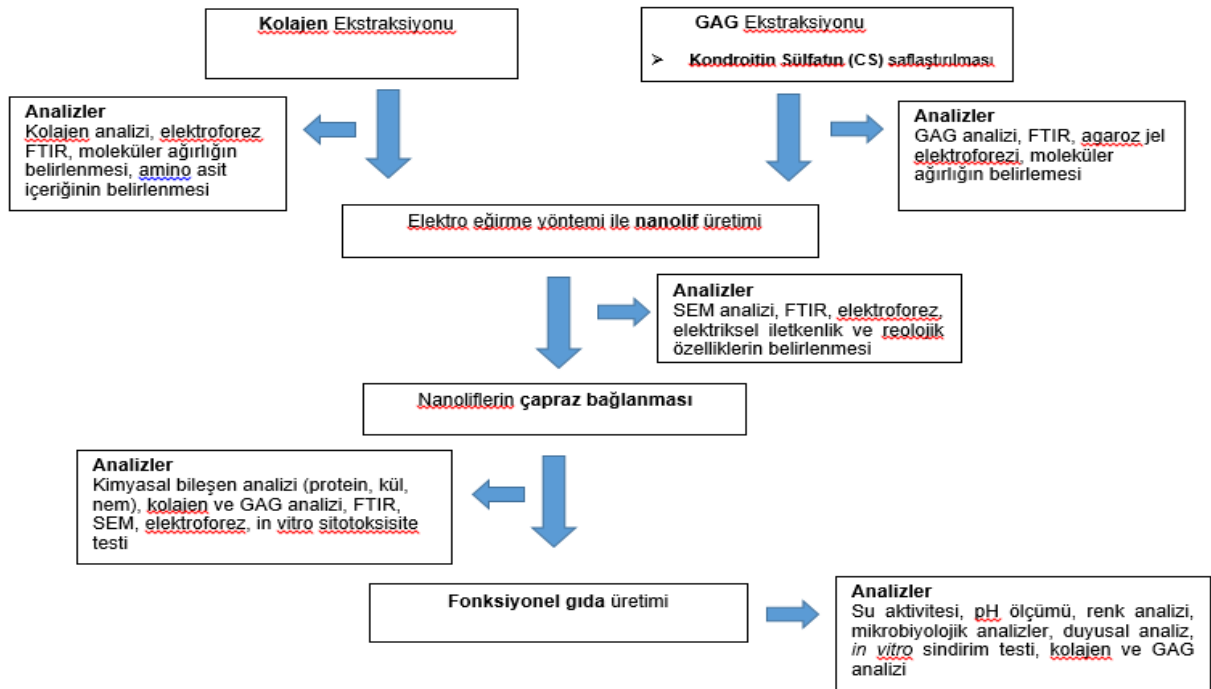
3.1. Gereç

Projemizde kolajen ve GAG üretimi için hammadde olarak kuzu ayakları kullanılmıştır. Kuzu ayakları İzmir'deki yerel bir kasaptan temin edilmiştir. Kuzu ayakları kirletici maddeleri temizlenmesi amacıyla yıkandıktan sonra boyut küçültmesi amacıyla endüstriyel öğütme makinesinde öğütülmüştür. Boyutları küçültülen kuzu ayakları paketlenip kullanıma kadar -18°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm enzimler ve kimyasallar analitik saflıkta olup SIGMA-ALDRICH firmasından temin edilmiştir. Kolajen analizi için kullanılan Total Collagen Assay Kit (Colorimetric, K218, ABD) Biovision firmasından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

Projemiz başlıca 4 aşamadan meydana gelmektedir (Şekil 3.1):

1. Ekstraksiyon aşaması (Kuzu ayaklarından kolajen ve GAG ekstraksiyonu)
2. Farklı işlem ve örnek koşullarında elektro-eğirme uygulamaları ve nanolif eldesi için ideal koşulların belirlenmesi
3. Nanoliflerin çapraz bağlanması
4. Nanoliflerin model gıda olarak belirlenen granola barlara eklenerek fonksiyonel bir ürün geliştirilmesi

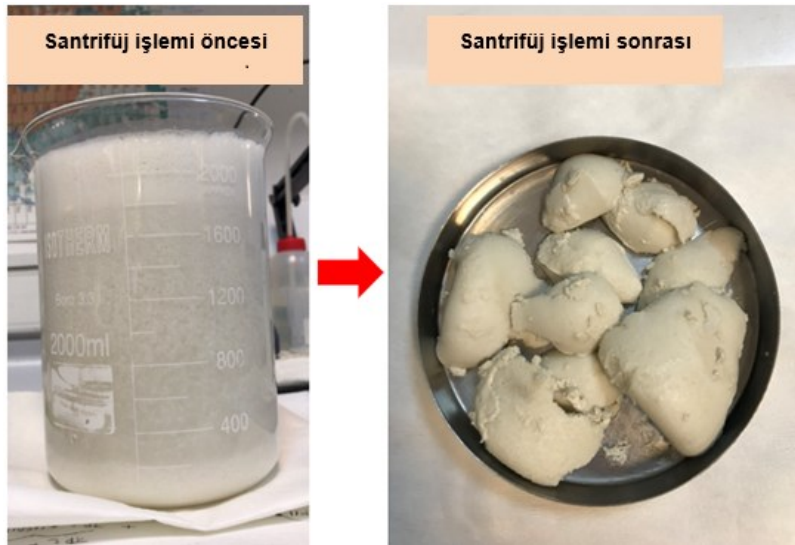


Şekil 3.1 Proje Akış Şeması

3.2.1. Ekstraksiyon Aşaması

Bu bölümde, kolajen ve GAG eldesi için gerçekleştirilen çalışmalar detaylı şekilde açıklanmıştır.

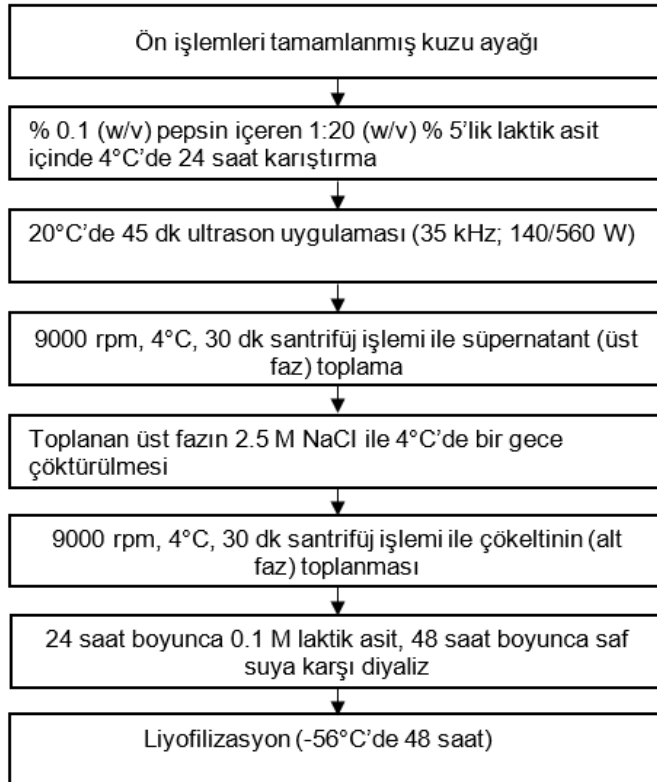
a) Kolajen Ekstraksiyonu: Kolajen ekstraksiyonu öncesi kuzu ayaklarına bazı ön işlemler uygulanmıştır. İlk olarak, kuzu ayakları 1:20 (w/v) oranında 0.15 M NaCl içeren 0.05 M Tris-HCL (pH 7.5) ile 50 dk boyunca Waring Commercial marka blender içinde parçalanmıştır. Parçalama işlemi aşırı ısınmayı önlemek amacıyla kesikli (toplam 6 saat olacak şekilde) olarak yapılmıştır. Daha sonra, santrifüj (Universal 320R, Hettich Zentrifugen, Almanya) işlemi uygulanarak (9000 rpm, 4°C, 25 dk.) üst faz (süpernatant) uzaklaştırılmıştır. Şekil 3.2’de kuzu ayaklarının parçalandıktan sonra santrifüj işlemi öncesi ve sonrası görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.2 Kuzu ayaklarının 0.05 M Tris-HCL ile parçalandıktan sonra santrifüj işlemi öncesi ve sonrası görüntüleri

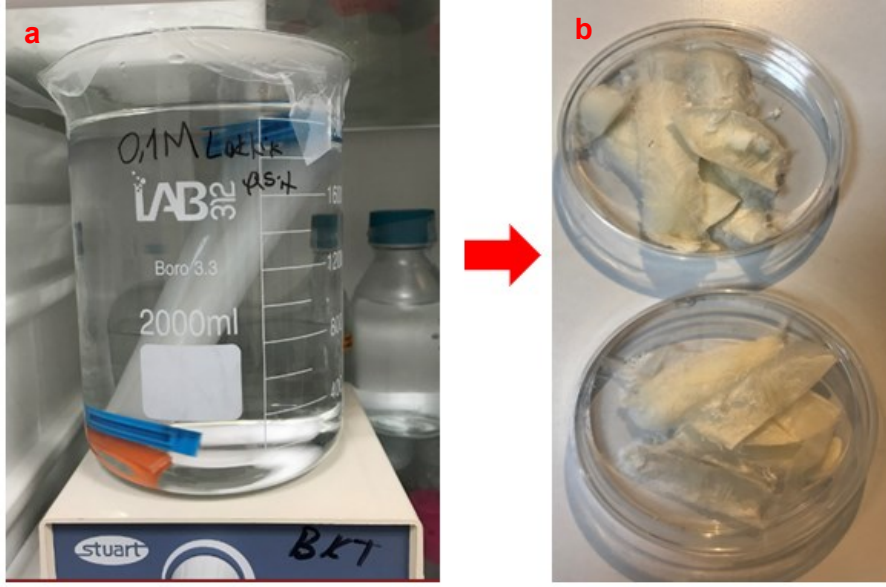
Parçalama işleminden sonra santrifüj işlemi ile alınan alt fazlar, yağın uzaklaştırılması amacıyla 1:10 (w/v) oranda %50’lik (v/v) etanolde 3 saat bekletilmiştir. Yağ uzaklaştırma sonucu karışım santrifüj (9000 rpm, 4°C, 20 dk.) edilmiş ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Yağdan arındırılmış alt faz, kolajen olmayan proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla 1:10 (w/v) oranda 0.1 M NaOH içinde 4°C’de 1 gece bekletilmiştir. Daha sonra, santrifüj işlemi (9000 rpm, 4°C, 25 dk.) uygulanarak üst faz uzaklaştırılmıştır. Toplanan alt fazlar kalsiyum tuzlarının uzaklaştırılması için 0.5 M EDTA-2Na ile 4°C’de gece boyunca karıştırılmıştır. Dekalsifikasyon işleminin sonunda karışım santrifüj (9000 rpm, 4°C, 30dk.) edilmiş ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Elde edilen alt faz, ekstraksiyon işlemine kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Ön işlemleri tamamlanmış kuzu ayaklarından kolajen eldesi Şekil 3.3'de verilen yönteme göre yapılmıştır. Literatür taramasının güncellenmesi ve yapılan ön denemeler sonucu, proje önerisinde verilen ekstraksiyon yöntemi revize edilmiştir (Chen vd., 2016; Zou vd., 2017; Noorzai vd., 2019). Bu kapsamda 6 saat olan klasik ekstraksiyon süresi, ürün veriminin artması için 24 saate çıkarılmıştır. Ön işlemler sonrası, örnekler, %0.1 pepsin (w/v) içeren 1:20 (w/v) oranında %5'lik laktik asit içinde 4°C'de 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Ardından 20°C'de 45 dakika ultrason destekli ekstraksiyon (hız: 35 kHz; güç: 140/560 W) gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonunda örnek karışımı 9000 rpm'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant (üst faz) kısmı alınmıştır. Alınan üst faz 1 gece boyunca 2.5 M NaCl ile çöktürülmüştür. En son çökelti (alt faz), 9000 rpm'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Toplanan alt fazlar %5'lik laktik asitte 1:100 (w/v) oranda çözündürülerek 24 saat boyunca 0.1 M laktik asite, 48 saat boyunca saf suya karşı diyaliz torbası içinde (Sigma- Aldrich, 33 mm, Moleküler ağırlık eşiği (MWCO)-14 kDa) diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemi sonunda örnekler -56°C'de 48 saat liyofilize edilmiştir. Liyofilize kolajen örnekleri analiz edilinceye kadar oda koşullarında bulunan desikatör içinde saklanmıştır.



Şekil 3.3 Kolajen ekstraksiyonu akım şeması

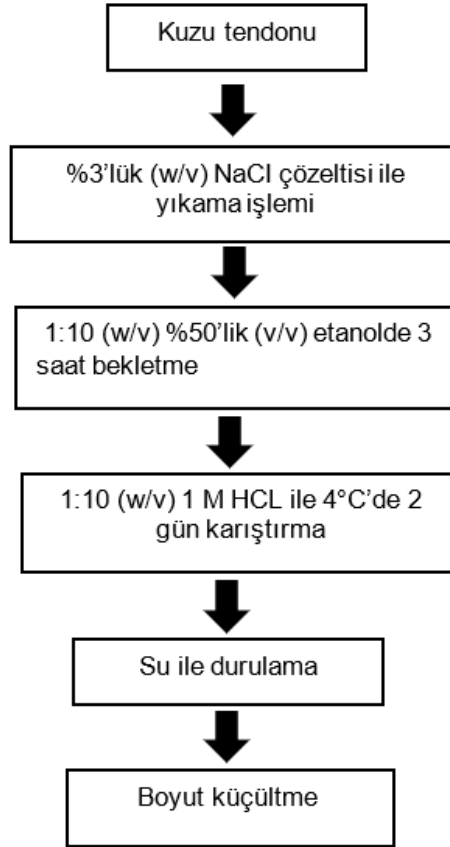
Diyaliz aşamasındaki kolajen örnekleri ve liyofilize kolajen örneğinin görüntüsü Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4 Diyaliz aşamasında örnekler (a), Liyofilize kolajen örneği (b)

b) GAG ekstraksiyonu: GAG ekstraksiyonu için kuzu ayaklarının kıkırdak ve kemikçe zengin tendon kısımları seçilmiş ve ayıklanmıştır. Ayıklanan tendonlar kirletici maddelerin ve safsızlıkların temizlenmesi amacıyla önce bol su ile ardından %3'lük (w/v) NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır. GAG ekstraksiyonu öncesi tendonlara uygulanan ön işlemler Şekil 3.5'de verilen akım şemasında görülmektedir. Boyutu küçültülen tendonlar ekstraksiyon işlemine kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.6).

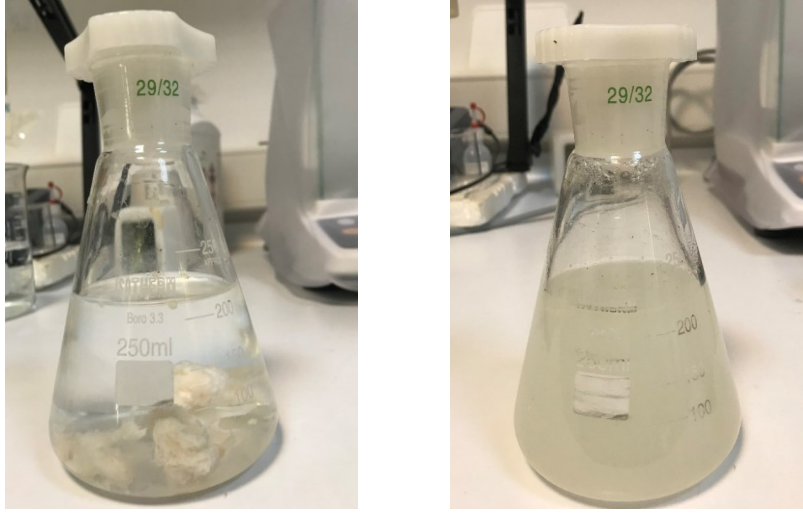
GAG ekstraksiyonu aşamasında uygulanan ön işlemler, yapılan ön denemeler ve literatür taramasının güncellenmesi sonucu revize edilmiştir (Nakano vd., 2012; Le Vien vd., 2017). Ön işlemler sonrası tendonlara 1:10 (w/v) oranda fosfat tamponu (pH 7.4) ve papain (1 mg / 1 gr örnek) eklenmiş ve karışım 65°C'deki çalkalamalı su banyosu içinde 24 saat karışmaya bırakılmıştır. Ardından 65°C'de 45 dakika ultrason destekli ekstraksiyon (hız: 35 kHz; güç: 140/560 W) gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işleminin sonunda papain enzimi 90°C'de 10 dakika inaktive edilmiştir. Ekstraksiyon öncesi ve ekstraksiyon sonrası karışımların görüntüsü Şekil 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.5 Kuzu tendonlarına uygulanan ön işlemlerin akım şeması



Şekil 3.6 Ön işlemleri tamamlanmış kuzu tendonları

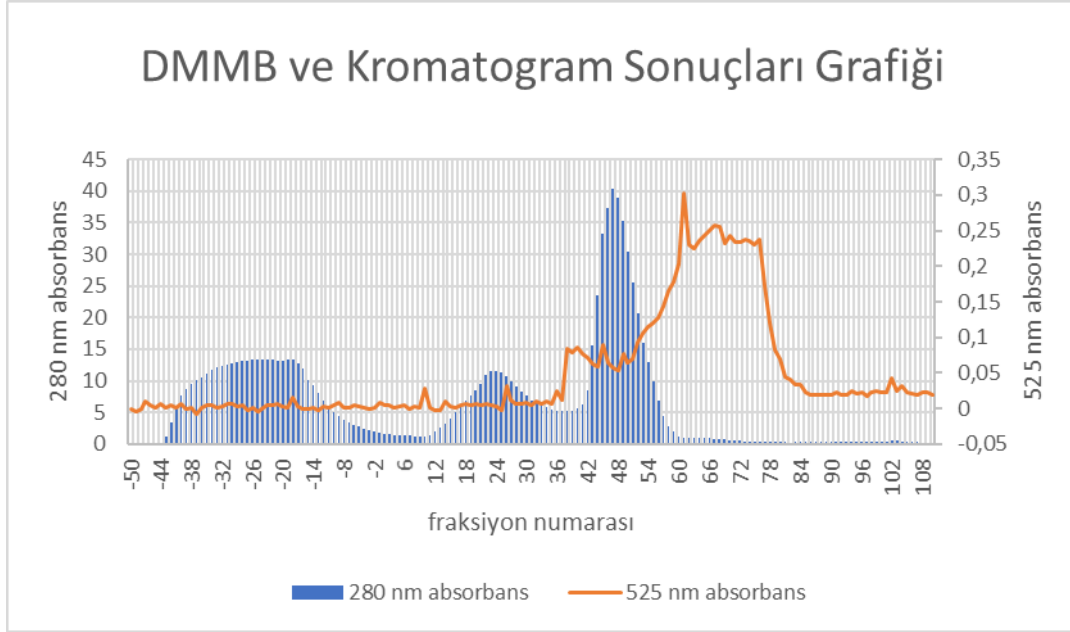


Şekil 3.7 Ekstraksiyon öncesi ve sonrası örnek karışımları

Enzim inaktivasyonunu takiben örnek karışımı proteinlerin çöktürülmesi amacıyla, 4°C'de gece boyunca %10'luk TCA ile karıştırılmıştır. İşlem sonunda santrifüj işlemiyle (9000 rpm, 4°C, 30 dakika) alt faz (çökelti) uzaklaştırılmış, üst faz ise %80'lik (v/v) etanol ile 1/2 oranda gece boyunca çöktürülmüştür. En son çökelti (alt faz), 9000 rpm'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Toplanan alt fazlar saf suda çözündürülerek 48 saat boyunca saf suya karşı 3.5 kDa'lık diyaliz membran (Thermo Fisher SnakeSkin™, 3.5 K MWCO, 16 mm) içinde diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemi sonunda örnekler -56°C'de 48 saat liyofilize edilmiştir. Liyofilize GAG örnekleri analiz edilinceye kadar oda koşullarında bulunan desikatör içinde saklanmıştır.

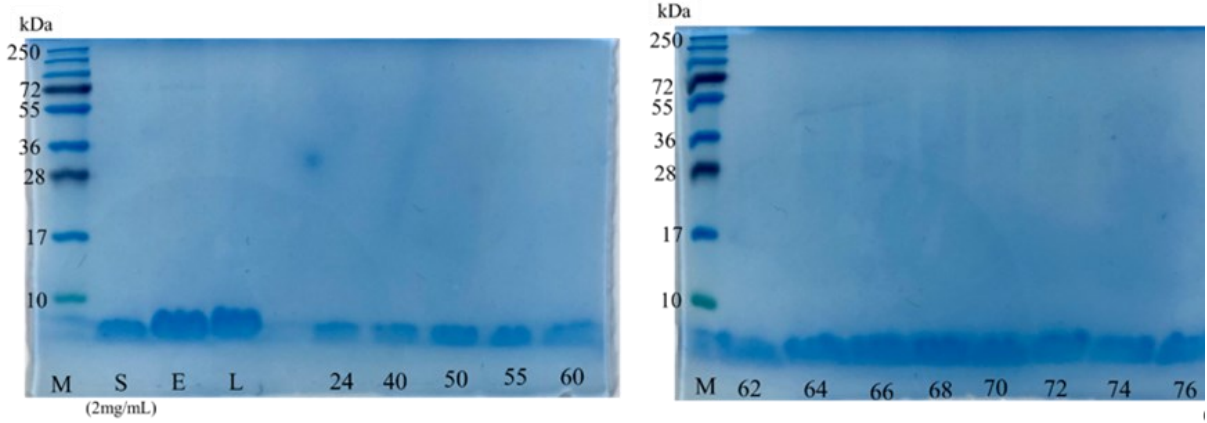
Kondroitin Sülfat (CS) Saflaştırılması

GAG ekstraktlarından CS fraksiyonunu ayırmak için anyon değişim kromatografisi yapılmıştır. Liyofilize GAG ekstraktları 1 mg/mL konsantrasyonda tampon A (20 mM Tris pH 8.0) içinde 50 mL olarak hazırlanmıştır. Örnek kolona verilmeden önce ilk olarak santrifüj (5500 rpm, 4°C, 10 dk) edilmiş, daha sonra 0.45 µm filtreden geçirilmiştir. Filtre edilen örnek, GE AKTA Prime Plus Sıvı Kromatografi Sistemine (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) DEAE sefaroze FF kolonu (HiPrep™ DEAE FF 16/10) kullanılarak verilmiştir. CS elüsyonu için lineer gradyan (0-1 M NaCl, 0.02 M Tris HCl pH 8.0) yapılmış ve 2 mL'lik fraksiyonlar toplanmıştır (Nogueira vd., 2019). Uygun fraksiyon aralığının belirlenmesi için DMMB analizi ve SDS-PAGE analizleri yapılmıştır. DMMB analizinin sonuçları (525 nm) ve kromatogram absorbans değerleri (280 nm) aynı grafik üzerinde Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.8 CS iyon kromatografi saflaştırmasındaki fraksiyonlara ait absorbans değerleri: kromatogram (280 nm) ve DMMB analizi (525 nm)

Şekil 3.8’de gösterilen -50 ile -27 numaralı fraksiyon aralığı kolon akıntısını; -26 ile -1 numaralı fraksiyonlar ise yıkamaları göstermektedir. 1-108 numaralı fraksiyonlar ise elüsyonlara ait değerlerdir. DMMB analizi sonuçları göz önüne alınarak 60-76 numaralı fraksiyon aralığındaki elüsyonlar seçilmiştir. Bu fraksiyon aralığında kolonda 280 nm’de absorbans veren bir maddenin bulunmaması başka protein kontaminasyonunun olmadığını göstermektedir. Şekil 3.9’da seçilen fraksiyon aralığındaki örnekler ait jel sonucu görülmektedir. Proje önerisinde kondroitin sülfatın agaroz elektroforez ile de analiz edileceği belirtilmişti, ancak jelin boyanması/boyanın çıkartılması (stain/destain) işlemlerinin verimli olmaması sonucu jel görüntüleri iyi elde edilememiştir. Literatürde, CS örneklerinin SDS-PAGE analizi ile de görüntülendiği görülmüş (Sundaresan vd., 2018), bu yüzden fraksiyonlar bu yöntemle görüntülenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. SDS-PAGE sonucuna göre, fraksiyonlarda başka bant görülmemesi CS fraksiyonlarının saf olduğunu göstermektedir. Belirlenen fraksiyon aralığındaki örnekler birleştirilerek, fazla tuzun uzaklaştırılması amacıyla 1 gün boyunca suya karşı 3.5 kDa’lık diyaliz membran (Thermo Fisher SnakeSkin™, 3.5 K MWCO, 16 mm) içinde diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası elde edilen saf CS çözeltisi, darası alınmış tüplerde -56°C’de 48 saat liyofilize edilmiştir. Liyofilize saf CS örnekleri analiz edilinceye kadar oda koşullarında bulunan desikatör içinde saklanmıştır.



Şekil 3.9 GAG ekstraktından CS anyon değişim saflaştırma sonucu fraksiyonların SDS PAGE analizi (%15'lik poliakrilamid jel, 85V 15dk – 110V). M: Prestained protein ladder, S: CS standart (2mg/mL) E: GAG ekstraktı (1mg/mL), L: kolona verilen örnek. Fraksiyonlar, 24-76

3.2.2. Elektro-Eğirme Yöntemi ile Nanolif Üretimi

Bu bölümde elektro-eğirme yöntemiyle kolajen içinde GAG nanolifleri (KGN) eldesine yönelik yapılan çalışmalar detaylı şekilde açıklanmıştır.

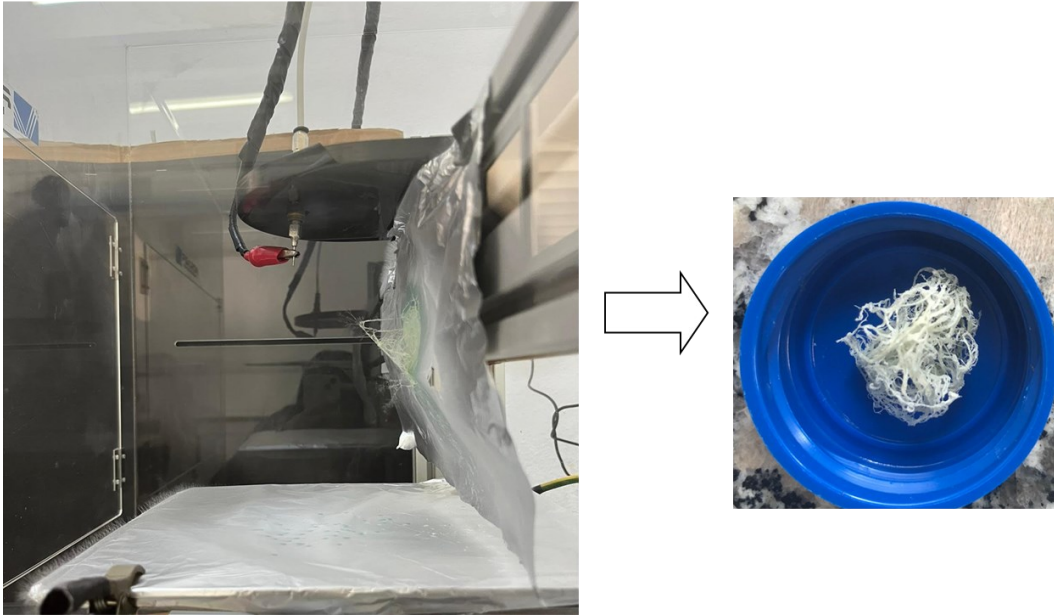
1.) Örnek hazırlama: Örnek hazırlama koşulları, Pezeshki-Modaress vd. (2015) ve Sizeland vd. (2018) çalışmaları göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. Proje önerisinde, nanolif üretimi için, liyofilize kolajen ve saf CS örneklerinin %20'lik (v/v) asetik asit içinde üç farklı oranda (95:5, 90:10, 85:15) ve üç farklı katı:sıvı oranında (%10, %15, %20 (w/v)) hazırlanacağı ifade edilmişti. Denemelerde kullanılan çözeltiler öncelikle proje önerisinde yazılan %20'lik (v/v) asetik asit çözeltisi kullanılarak %10 (w/v) katı:sıvı oranında hazırlanmış ancak uygun konsantrasyon değerine ulaşılamaması nedeniyle lif oluşumu gözlenmemiştir. Yapılan çalışmalarda boncuklu yapıların azaltılması ve daha homojen/pürüzsüz bir lif yapısı elde etmek için polimer çözeltisinin konsantrasyonunun artırılması önerilmiştir (Katti vd., 2004; Law vd., 2007). Bu yüzden B planında da verilen şekilde asetik asidin konsantrasyonu önce %50'ye (v/v) daha sonra %60 ve %65'e çıkarılarak denemeler gerçekleştirilmiştir. Denemelerle ilgili SEM görüntüleri Bulgular-Tartışma kısmında detaylı olarak verilmiş ve tartışılmıştır.

2.) Elektro-eğirme uygulaması: Elektro eğirme işlemi için ağırlıkça 95:5 ve 90:10 kolajen: kondroitin sülfat içeren çözeltiler ilk olarak %15 (w/v) örnek konsantrasyonunda %60 (v/v)'lık asetik asit kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler, 5,0 ml'lik bir şırınga içerisine konularak, oda sıcaklığında alüminyum folyo ile kaplanmış silindirik bir kolektör ile yatay bir sistem kullanılarak elektro eğirme işlemine tabi tutulmuştur (Şekil 3.10). Elektro-eğirme işlemi Tablo 3.1'de belirtilen işlem parametrelerinde gerçekleştirilmiştir. Elektro eğirme işlem

koşulları belirlenirken Pezeshki-Modaress vd. (2015), Sizeland vd. (2018) ve Leidy ve Ximena (2019) çalışmalarından yararlanılmıştır.

Tablo 3.1 Elektro eğirme işlem koşulları

voltaj	26 kV
akış hızı	0,8 ml/h
iğne ucu- kolektör arası mesafe	15 cm



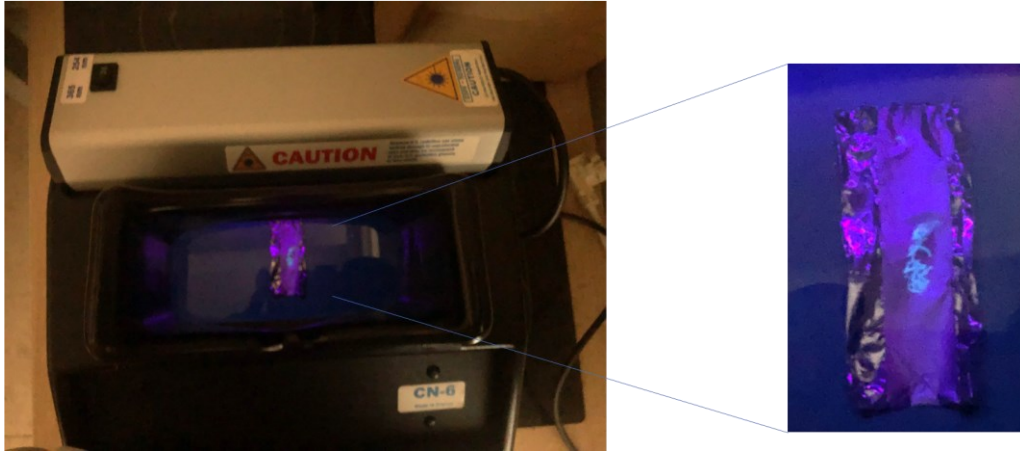
Şekil 3.10 Elektro-eğirme sistemi ve toplanan nanolifler

İlk olarak, 95:5 kolajen:kondroitin sülfat içeren çözeltiyle, Tablo 3.1’de belirtilen işlem parametrelerinde elektro-eğirme denemesi gerçekleştirildiğinde nanolif eldesi sağlanmış ancak ağsı yapılarla birlikte istenmeyen boncuk yapıların da fazla olduğu görülmüştür. Bu nedenle, nanoliflerdeki boncuklu yapıların azaltılması ve daha homojen/pürüzsüz bir lif yapısı elde etmek için denemelere B planımızda da belirtildiği gibi polimer çözeltisinin konsantrasyonu artırılarak devam edilmesine karar verilmiştir. %60 (v/v) olan asetik konsantrasyonu %65 (v/v)’e çıkarılarak denemelere devam edilmiştir. **95:5** kolajen: kondroitin sülfat oranında **%15 (w/v)** örnek konsantrasyonunda hazırlanan çözeltiyle deneme yapıldığında, istenen çapa sahip, boncuksu yapılar içermeyen nanolifler elde edilmiştir. 90:10 kolajen:kondroitin sülfat içeren çözeltiyle, yukarıda belirtilen aynı işlem parametrelerinde elektro-eğirme denemesi gerçekleştirildiğinde herhangi bir nanolif oluşumu gözlenmemiştir. %15 (w/v) örnek konsantrasyonu üzerindeki konsantrasyonlarda deneme yapıldığında ise çözelti viskozitesinin yükselmesinden dolayı iğne ucunda tıkanmalar meydana gelmiştir. Bu

yüzden denemelere işlem parametreleri revize edilerek (akış hızı 0.6 mL/h-1 mL/h, voltaj 25-28 kV) devam edilmiş ancak yine de nanolif oluşumu gözlenmemiştir. Çözeltideki kolajen oranının 95'den 90'a düştüğünde lif oluşumu gözlenmediğinden dolayı örnek kaybı yaşanmaması için 85:15 kolajen-kondroitin sülfat oranı denemesinin yapılmamasına karar verilmiştir.

3.2.3. Nanoliflerin çapraz bağlanması

İdeal koşulda elde edilen nanoliflerin yapısının korunmasının sağlanması için proje önerisinde belirtildiği gibi 254 nm dalga boyunda UV ışığı ile 15 dakika çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.11). Çapraz bağlama işleminin etkinliği yapılan analiz sonuçları göz önüne alınarak değerlendirilmiş ve Bulgular-Tartışma kısmında detaylı olarak tartışılmıştır.



Şekil 3.11 UV kabin (Fisher Scientific UV Darkroom CN-6, Amerika) ve UV işlemi uygulanan nanolif

15 dk çapraz bağlanmış nanolif örnekleriyle çapraz bağlanmamış nanolif örnekleri arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Bu yüzden B planımızda belirtildiği gibi çapraz bağlama süresi arttırılarak 25, 35 ve 45 dk denemeler gerçekleştirilmiştir. Elektroforez ve FTIR analizi sonuçlarına göre, 25, 35 ve 45 dk UV uygulaması yapılmış nanolif örnekleriyle UV uygulanmamış nanolif örneği arasında önemli bir farklılık tespit edilememiştir. Yapılan çalışmalarda, uzun süreli UV maruziyetinin, kolajen moleküllerinin denatürasyonuna yol açabileceği bildirilmiştir (Drobotova vd., 2021; Davidenko vd., 2016). Bu yüzden 45 dk üzerindeki sürelerde deneme yapılmamasına karar verilmiştir. Yapılan güncel literatür araştırması sonrası, çapraz bağlama işlemi Torres-Giner vd. (2009) ve Davidenko vd. (2016) çalışmalarında öne sürülen raporlar temelinde, nanoliflerin iki yüzüne (ön ve arka) ayrı ayrı 15'er dakika olacak şekilde toplam 30 dk UV uygulaması yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Çapraz bağlama işleminin etkinliği, FTIR ve elektroforez sonuçlarıyla tespit edilemediği için, spektrofotometrik bir yöntem olan ninhidrin deneyi sonuçlarına göre belirlenmiştir (Yan vd., 2010). Analiz temel olarak, örneklerdeki serbest amin gruplarının ninhidrin çözeltisiyle tepkimesi sonucu mavi renk oluşturması prensibine dayanmaktadır. Analiz için, kontrol nanolif (UV uygulaması yok) ve çapraz bağlanmış nanolif örnekleri 0.01 M HCl içinde çözündürülmüş (2 mg/mL konsantrasyon) ve üzerine 1 mL ninhidrin çözeltisi eklenerek 100°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon işlemi sonrası, örnekler oda koşullarında soğutulmuştur. Ardından örneklerde oluşan renklerin absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda spektrofotometre (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, Germany) kullanılarak belirlenmiştir. Spektrofotometrenin okuma aralığında ölçüm alınabilmesi için örnekler okuma yapılmadan önce alkolle seyreltilmiştir. Standart eğrinin oluşturulmasında farklı konsantrasyonlarda (0, 0.5, 0.75 ve 1.0 mg/mL) glisin çözeltisi hazırlanmış ve yukarıda belirtilen işlem basamakları izlenerek absorbans değerleri okunmuştur.

3.2.4. Fonksiyonel gıda üretimi

Bu bölümde fonksiyonel gıda üretimine yönelik yapılan çalışmalar anlatılmıştır.

1.) Granola barların hazırlanması: Granola barlar ağırlıkça %50 kuru üzüm, %25 kuru kayısı, %10 yulaf unu ve %15 yulaf ezmesi içerecek şekilde çiğ (pişirme yok) ve pişmiş (130°C'de 15 dakika) şekilde hazırlanmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Hazırlanan granola barlar (A: pişirme işlemi uygulanmamış, B: pişirme işlemi uygulanmış)

Çiğ ve pişirilerek hazırlanmış granola barların toplam canlı sayımı yapılmış ve pişirme uygulanmış granola bar örneğinin mikrobiyal yükü, çiğ örneğe göre anlamlı derecede az bulunmuştur ($P<0.05$). Mikrobiyoloji sonuçları Tablo 3.2'de verilmiştir. Elde edilen nanolif miktarının çok düşük olmasından dolayı, toplam canlı sayımı sonuçları da göz önüne

alınarak depolama analizlerine sadece pişirilerek hazırlanmış granola barlarla devam edilmesine karar verilmiştir.

Tablo 3.2. Toplam canlı sayımı sonuçları

Örnek	Mikrobiyal yük
Çiğ olarak hazırlanan granola bar	$1,2 \times 10^3$ CFU/g
Piştirme işlemi uygulanarak hazırlanan granola bar	$1,5 \times 10^2$ CFU/g

2.) İn vitro sindirim denemeleri: İn vitro sindirim deneyleri için 3 farklı granola bar hazırlanmıştır:

- KGN ya da liyofilize kolajen-kondroitin sülfat (CS) içermeyen boş granola bar
- KGN içeren granola bar (20 mg nanolif/ 2 gr granola bar)
- Liyofilize kolajen- CS içeren granola bar (19 mg liyofilize kolajen+1 mg CS / 2 gr granola bar)

Hazırlanan granola barlar daha sonra 130°C'de 15 dakika pişirilmiştir. İn vitro sindirim deneylerine başlamadan önce sindirim analizlerinde kullanılacak pepsin ve pankreatin enzim miktarlarının doğru şekilde hesaplanması için enzim aktivitesi deneyleri yapılmıştır:

- Pepsin enzimi aktivite tayini: Pepsin enzim aktivitesi analiz prensibi, hemoglobin+H₂O karışımının pepsin ile muamele edildiğinde trikloroasetik asit (TCA)'de çözünür tirozin peptitleri üretmesine dayanmaktadır. Stok pepsin çözeltisi 1mg/mL olacak şekilde 10 mM Tris tamponu, 150 mM NaCl (pH 6.5) içinde hazırlanmıştır. Daha sonra stok pepsin çözeltisinden 10 mM HCl ile seyreltme yapılarak 10,15 ve 20 µg/mL pepsin çözeltileri hazırlanmıştır. Analizde kullanılacak hemoglobin çözeltisi %2 (w/v) (pH 2) olacak şekilde saf suda hazırlanmıştır. 400 µl test ve kör örneği 2 mL hemoglobin çözeltisiyle karıştırılmış ve 37°C çalkalamalı inkübatörde 10 dk bekletilmiştir. Ardından örnekler reaksiyonun durdurulması için 4 mL %5 (w/v) TCA ile karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 6000g'de santrifüj edilmiş ve berrak üst fazlar alınarak kuvars küvet içinde 280 nm'de absorbans okunmuştur. Aktivite hesabı aşağıdaki formül kullanılarak her bir pepsin çözeltisi için ayrı ayrı hesaplanmış ve ortalama alınarak aktivite belirlenmiştir.

$$\text{Units/mg: } [(A_{280\text{Test}} - A_{280\text{Kör}}) \times 1000] / 10 \times X$$

A₂₈₀: absorbans değeri

10: inkübasyon süresi

X: kuvars küvetteki pepsin konsantrasyonu (mg/mL)

1000: deney sabiti (37°C'de pH 2'de 1 U enzim 1 dakikada 280 nm absorbands değerinde 0,001'lik değişime yol açmaktadır)

Pepsin enziminin (Sigma 107185) aktivitesi 4190±224 U/mg olarak belirlenmiştir.

• Tripsin enzim aktivite tayini: Deney için ilk olarak enzim ve substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Enzim çözeltisi: 15 µg/mL konsantrasyonda pankreatin çözeltisi 1 mM HCl içinde hazırlanmıştır. Substrat çözeltisi: 10 mM TAME, ultra saf su içinde hazırlanmıştır. 0,3 mL substrat çözeltisi, 2,6 mL 46 mM Tris-HCl tamponu (pH 8.1) ile 25°C'de 3-4 dk ters-düz edilerek karıştırılmıştır. Ardından, karışıma 100 µL enzim çözeltisi eklenmiştir ve 247 nm'de 10'ar saniye aralıklarla 10 dakika boyunca okunan absorbands değerleri kaydedilmiştir. Dakika olarak süreye karşılık absorbands grafiği çizilerek eğim değeri hesaplanmıştır:

$$\text{Units/mg} = (\text{eğim}_{\text{enzim}} - \text{eğim}_{\text{kör}}) * 1000 * 3 / (540 * X)$$

540: TAME'nin 247 nm'deki molar extinction katsayısı

3: reaksiyon karışımının hacmi (mL) (Tris-HCl+TAME+tripsin)

X: en son reaksiyon karışımındaki (kuartz küvetteki) mg pankreatin miktarı

Pankreatin enziminin (Sigma P3292) tripsin aktivitesi aktivitesi 5,185±1,571 U/mg olarak belirlenmiştir. Enzimlerin aktivitesi belirlendikten sonra hazırlanan barlara INFOGEST in vitro sindirim protokolü uygulanmıştır (Brodkorb vd., 2019; Minekus vd., 2014). İlk olarak, sindirim benzeri sıvıların hazırlanmış ve ardından in vitro sindirim gerçekleştirilmiştir. Sindirim sırasında ağız, mide ve bağırsaktan alınan örnekler SDS-PAGE ile incelenmiştir. Sindirim benzeri sıvıları; ağız sıvısı benzeri (SSF; Simulated Saliva Fluid), mide sıvısı benzeri (SGF; Simulated Gastric Fluid) ve ince bağırsak sıvısı benzeri (SIF; Simulated Intestinal Fluid) Brodkorb vd. (2019) verilen reçeteye göre hazırlanmış (Tablo 3.3), alikotlanarak -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.3 Stok in vitro sindirim sıvılarının içerikleri

Kullanılan çözeltiler	stok	1.25X SSF (mL / 400 mL)	1.25X SGF (mL / 400 mL)	1.25X SIF (mL / 400 mL)
KCl (0.5M)		15.1	6.9	6.8
KH ₂ PO ₄ (0.5M)		3.7	0.9	0.8
NaHCO ₃ (1M)		6.8	12.5	42.5
NaCl (2M)		-	11.8	9.6

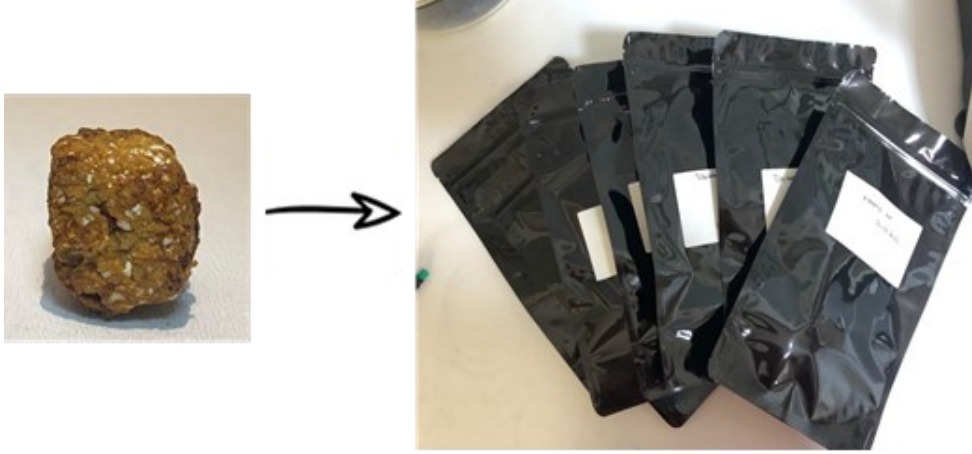
MgCl ₂ (0,15M)	0.5	0.4	1.1
(NH ₄) ₂ CO ₃ (0,5M)	0.06	0.5	-
3M veya 6M HCl veya 1M NaOH	↓ pH 7.0 'ye ayarlanır ve son hacime tamamlanır	↓ pH 3.0 'e ayarlanır ve son hacime tamamlanır	↓ pH 7.0 'ye ayarlanır ve son hacime tamamlanır

Ağız sindirimi simülasyonu: 2 gr bar örneği üzerine başlangıçta 2 mL su ve 4 mL SSF koyulup spatül ile olabildiğince küçük parçalara ayrılarak, hafif derecede vortex yapılmıştır. Ardından, 25 µL CaCl₂ eklenerek pH 7'ye getirilmiştir. Son hacim 10 mL'ye tamamlanarak 37°C'de 2 dk inkübe edilmiştir.

Mide sindirimi simülasyonu: 10 mL ağız sindirim simülasyon sıvısı üzerine 8 mL SGF eklenerek pH 3.0'a ayarlanmıştır. Ardından, karışıma 5 µL CaCl₂ ve 1 mL pepsin çözeltisi eklenmiştir. pH 3'e getirilerek son hacim 20 mL'ye tamamlanmıştır. Mide simülasyonu için son karışım 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Mide sindirimi sonrası pH 7.0'a getirilerek pepsin inaktive edilmiştir. Daha sonra hafif derecede vorteks yapılarak 1 mL örnek analizler için ayrılmıştır.

Bağırsak sindirimi simülasyonu: Mide sindirimi sonrası, sindirim tüpüne 11 mL SSF eklenerek pH 7.0'ye ayarlanmıştır. Ardından, karışıma sırasıyla 2.5 mL safra süspansiyonu, 40 µL CaCl₂ ve 5 mL pankreatin eklenmiştir. Son hacim 40 mL'ye tamamlanarak 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitince örnek vortekslenmiş ve falkona 10 mL örnek ayrılmıştır. Sindirimin durdurulması için ayrılan örnek üzerine 0.5 mL 0.1 M pefabloc eklenmiş ve karışım 4°C- 5000 g'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz (sindirilebilen moleküller) alınarak analizler için ayrılmıştır.

3.) Depolama çalışmaları: İn vitro sindirim denemelerinin tamamlanmasının ardından, nanolif içeren granola barlar hazırlanarak depolama analizlerine geçilmiştir. Depolama çalışmaları, Ağustos-Ocak aylarını kapsayan süre aralığında gerçekleştirilmiştir. KGN içeren granola barlar hazırlandıktan sonra 130°C'de 15 dakika pişirilmiştir. Pişmiş granola barlar oda koşullarında soğumaya bırakılmış ve ardından her pakette 3 adet granola bar olacak şekilde ambalajlanmıştır (Şekil 3.13). Ambalajlanan granola barlar 20°C- %55 relatif rutubet koşullarına ayarlanan iklimlendirme kabiniinde (HPP 750 Memmert, Almanya) 6 ay süreyle depolamaya bırakılmıştır.



Şekil 3.13 Ambalajlanan granola barlar

Depolama analizi olarak su aktivitesi, pH ölçümü, renk analizi ve toplam canlı sayımı yapılmıştır.

- Su aktivitesi değerlerinin belirlenmesinde ± 0.001 hassasiyete sahip su aktivitesi ölçüm cihazı (Testo AG 400, Almanya) kullanılmıştır.
- Granola barlar pH ölçümü için 1/10 oranında saf su ile seyreltilmiş ve bir pH metre (WTW Inolab pH7110) kullanılarak pH değerleri 3 tekrarlı olacak şekilde ölçülmüştür.
- Renk değerleri (L^* , a^* , b^*) Minolta Colour Reader (CR-400 Japan) kullanılarak ölçülmüştür.
- Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri (TMAB) sayımı: TMAB sayımı için TEMPO AC (BioMerieux, Ref. 411113) ticari test kitleri kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlar hazırlandıktan sonra aerobik bakteri sayımı amacıyla TEMPO AC (BioMerieux, Ref. 411113) test kitlerine ekim yapılmış ve dolum yapılan kartlar 37°C 'de 48 sa. inkübasyona bırakılmıştır.
- Salmonella spp. aranması: Salmonella analizi için ticari test kitleri kullanılmıştır. Depolamanın 0. günü hazırlanan granola barlardan rastgele bir örnek seçilerek analiz yapılmıştır. Örneğe ön zenginleştirme amacıyla, tamponlanmış peptonlu su ve Salmonella Supplement (BioMerieux, Ref. 42650) eklenmiş ve 41.5°C 'de 24 sa. inkübasyona bırakılmıştır.

3.3. Analizler

3.3.1. Kimyasal Bileşen Analizleri

Nanolif içeren granola barlara kimyasal bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla nem, protein, yağ ve kül analizleri yapılmıştır.

- Kül tayini: Kül tayini Metod AOAC 920.153'e göre gerçekleştirilecektir. Ön yakması tamamlanan örnekler, sabit tartıma getirilmiş krozedde 550°C 'de açık gri kül elde edene kadar

yakılmıştır. Ardından, desikatörde soğutulduktan sonra tartılarak küldeki yüzde miktarı hesaplanmıştır.

Hesaplama: % Kül= [kül ağırlığı (g) / örnek ağırlığı (g)] x 100

- Protein Analizi: Kjeldahl metodu ile gerçekleştirilmiştir (Kjeldahl, 1883). 1 gram örnek tartılarak Kjeldahl balonuna konduktan sonra üzerine 10 g katalizör eklenmiştir. Daha sonra yaklaşık 25 ml derişik H_2SO_4 yavaşça ilave edilmiş ve Kjeldahl balonu yakma setine yerleştirilmiştir. Örnek, ilk 15 dakika 200-250°C'de, daha sonra 350-400°C'de siyah nokta kalmayıncaya kadar yakılmıştır. Yakma işleminden sonra yaş yakma tüpleri oda sıcaklığında soğutulmuştur. Daha sonra, üzerine 25 ml saf su ilave edilerek destilasyon cihazına yerleştirilmiştir. Bir erlene 50 ml borik asit çözeltisi koyularak adaptörün ağzı erlenin dibine degecek şekilde yoğunlaştırıcının altına yerleştirilmiştir. Borik asit çözeltisi mavi-yeşil renk aldığıında destilasyon işlemi sona erdirilmiştir. Ardından erlen içindeki çözelti 0.1 N HCl ile pembe renk gözleninceye kadar titre edilmiştir. Bulunan % azot miktarı 6.25 faktörü ile çarpılarak protein miktarı hesaplanacaktır.

Hesaplama: % azot= $[0,014 \times 0.1 \times V \times 100] / m$

V= Titrasyonda harcanan HCl çözeltisinin mL hacmi

0.1 = Ayarı yapılan hidroklorik asit çözeltisinin normalite cinsinden derişimi

m= Alınan örneğin g ağırlığı

- Yağ Tayini: Yağ tayini, çözgen ekstraksiyon sistemiyle Soxhlet metodu kullanılarak yapılmıştır (Uylaşer ve Başoğlu, 2011). İlk olarak örnek 105°C'de etüvde nemin uzaklaştırılması amacıyla 1-2 saat kurutulmuştur. Ardından, kaba süzgeç kağıdı üzerine yaklaşık 10 gram örnek tartılarak ekstraktöre yerleştirilmiştir. Analizde kullanılacak balonlar etüvde sabit tartıma getirildikten sonra desikatöre soğutularak tartım yapılmış ve daraları kaydedilmiştir. Balona ve gövdeye yaklaşık 1.5 sifon yapacak kadar hekzan ilave edilmiştir. Balon, ekstraktör ve geri soğutucu birbirine bağlanarak, su banyosu üzerine yerleştirilmiş ve yaklaşık 6 saat ekstrakte edilmiştir. Daha sonra balonun içerisindeki hekzan rotary evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Balonun son ağırlığı kaydedildikten sonra içindeki yağ miktarı % yağ olarak formülden hesaplanmıştır.

Hesaplama: % Yağ Miktarı= $[100 \times (M_2 - M_1) / M_0]$

M_0 : Deney numunesinin kütlesi, g

M_1 : Ekstraksiyon balonunun darası, g

M_2 : Ekstraksiyondan sonra yağ ve balonun birlikte kütlesi, g

- Nem Analizi: Nem analizi AOAC 950.46 B (a) referans alınarak yapılmıştır. İlk olarak, tartım kabı etüvde ısıtılarak sabit tartıma getirilmiştir. Daha sonra örnek, tartım kabına alınıp etüvde 105-110°C'de sabit tartıma gelene kadar ısıtılmıştır. Ardından, desikatörde soğutularak tartılmıştır. Tartım farkı bulunarak örneğin nem yüzdesi hesaplanmıştır.

Hesaplama: %Nem = [nem ağırlığı (g) / örnek ağırlığı (g)] x 100

3.3.2. Sodyum Dodesil Sülfat Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE)

Kolajen örneğinin tahmini molekül ağırlığının belirlenmesinde, kolajen ve kondroitin sülfat örneklerinin saflıklarının belirlenmesinde ve in vitro sindirim sonrası örneklerin protein dağılımını görmek için Biorad Protean Tetrad sistemi ile SDS-poliakrilamid jel elektrofözezi yapılmıştır (Laemmli 1970). Örneklerin aynı hizaya gelmelerini sağlayan jel kısmı %5'lik, örneklerin boylarına göre ayrılmasını sağlayan ayırma jeli kısmı ise kolajen için %10'luk, kondroitin sülfat için %15'lik poliakrilamid jel olarak laboratuvarımızda hazırlanmıştır. Analiz için alınan örnekler, %1 (w/v) SDS ve 0.1 M NaCl içeren 0.1 M Tris-HCL (pH 6.8) içerisinde %0.2 (w/v) oranında çözölürölerek yükleme çözöltesi ile karıştırılmış arından 95°C'de 10dk inkübe edilmiş ve oda sıcaklığına geldiğinde 20 µL olarak kuyulara yüklenmiştir. Örnekler, 85 voltta 15-20 dakika, ardından 120 voltta yaklaşık 2 saat elektrik alan altında yürütölmüştür. Elektrofözeze sonrası jel, Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyanmış ve görüntölenmiştir. Örneklerin tahmini molekül ağırlıkları belirlenirken markerdan (ABM, G623) yararlanılmıştır.

3.3.3. Native Jel elektrofözezi

Native jel elektrofözezinde örneğe denatüre edici bir koşul uygulanmadan doğal yapısının tespit edilmesi sağlanır. Bu işlem nanoliflere ve çapraz bağlama işlemi uygulanmış nanoliflere uygulanmıştır. Poliakril amid jel laboratuvarımızda; toplama jeli %3'lük, ayırma jeli %8'lik olarak Tablo 3.4'e göre hazırlanmıştır. Örnek hazırlığında 1 mg nanolif, 100µL 20mM Tris pH 8.0 tamponu ile üç saat karıştırılmış ve ardından jel yükleme boyası (6X; 0,2g bromofenol, 6mL %50 gliserol, 4mL su) ile karıştırılmıştır. Örnekler jele 20µL, protein marker (ABM, G623) 5uL olarak yüklenmiştir. Yürütme tamponu 6.04g Tris ve 28.8g Glisinin 2L'de çözölmesiyle elde edilmiştir. Elektrofözeze 80mV'ta iki saat süreyle gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4 Native poliakrilamid jel içeriği

Toplama jeli (%8)		Ayırma Jeli (%3)	
Su	4750 uL	Su	3950 uL
1.5M Tris pH 8.9	2500 uL	0.5M Tris pH 6.8	500 uL
%30 akrilamid/bisakrilamid 29:1	2670 uL	%30 akrilamid/bisakrilamid 29:1	510 uL
%10 APS	75 uL	%10 APS	37.5 uL
TEMED	5 uL	TEMED	2.5 uL

3.3.4. Moleküler Ağırlık Dağılımının Belirlenmesi

Kolajen örneğinin moleküler ağırlık dağılımı ve indeksi analizinin hizmet alımı yoluyla TÜBİTAK- Marmara Araştırma Merkezi'nde yapılması planlanmıştır. Analizin sadece suda çözünen örneklerle yapılabilmesi nedeniyle bu analiz gerçekleştirilememiştir. Daha sonra farklı kurumlarla (Yıldız Teknik Üniversitesi Polimer Kompozit Laboratuvarı, Osmangazi Üniversitesi Polimer Araştırma Laboratuvarı ve ODTÜ Polimer Analiz Laboratuvarı) yapılan görüşmeler sonucu jel geçirgenlik kromatografi (GPC) analizinin, tetrahidrofuran (THF) çözgeninde çözünebilen örneklerde yapılabildiği geri dönüşü alınmıştır. Ancak yapılan denemeler sonucunda kolajen örneğinin THF'de de çözünme göstermediği görülmüştür. Kolajen sonuç olarak su ve THF'de çözünmemekte, asidik çözgenler kullanılarak çözülebilmektedir. Asidik çözgenlerde çözülen kolajenin analizi, asidin cihazlara zarar verme ihtimali nedeniyle yapılamamıştır. Bu nedenle, örneklerin moleküler ağırlık dağılımları SDS-PAGE analizi sonuçları ile değerlendirilmiştir.

Saflaştırılan kondroitin sülfat örneği suda çözünen bir molekül olduğu için GPC analizinde bir sorun yaşanmamıştır. Analiz öncesi örnekler PBS (phosphate buffer saline) tamponu içeren ultra saf su içinde çözdürülerek 0.45 µm gözenek çaplı naylon filtreden geçirilmiştir. Örneğin moleküler ağırlığı, refraktif indeks detektörü ve PL-aquagel-OH 8 µm kolonundan oluşan bir Agilent 1260 jel geçirgenlik kromatografi (GPC) sistemi kullanılarak TÜBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi tarafından hizmet alımı yoluyla belirlenmiştir.

3.3.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) Analizi

Liyofilize kolajen ve kondroitin sülfat örnekleri ile KGN ve çapraz bağlanmış KGN'lerin kızılötesi spektrumları, Spectrum Two™ FTIR spektrometre (Perkin Elmer Inc., Norwalk, CT, USA) cihazı kullanılarak 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında absorpsiyon modunda ölçülmüştür. Analiz hizmet alımı yoluyla Ege Üniversitesi-Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (MATAL) gerçekleştirilmiştir.

3.3.6. Kondroitin Sülfat Analizi (DMMB)

Saflaştırılan CS örneğinin ve in vitro sindirim sonrası örneklerin kondroitin sülfat miktarını belirlemek için dimetilmetilen mavisi (DMMB) deneyi yapılmıştır (Farndale vd., 1986). Standart eğrinin çizilmesi için 1 mg kondroitin sülfat standardı (Sigma C9819) 5 mL saf suda çözdürülmüştür. Hazırlanan bu stok çözeltiden 0-130 ppm konsantrasyonlarda kondroitin sülfat çözeltileri hazırlanmıştır. Analiz aşamasında hazırlanan stok çözeltiden farklı hacimlerde standart örneği alınarak saf su ile son hacim 20 µL olacak şekilde ayarlanmıştır. Ardından renk reaksiyonu için 200 µL DMMB boyası standartlara eklenmiştir. Örneklerin CS içeriğini belirlemek için ise, saf CS örnekleri saf suda 0,5 mg/mL konsantrasyonda

çözdürülmüştür. Analiz işlemi için 2 µL örnek alınarak üzerine 18 µL saf su eklenmiş ve 200 µl DMMB boyasıyla karıştırılmıştır. Oluşan rengin absorbans değeri 525 nm dalga boyunda plaka okuyucu (UV/VIS Multi well Spektrofotometre/ Thermo Scientific Multiskan GO) kullanılarak ölçülmüştür.

3.3.7. Kolajen Analizi

Örneklerin kolajen miktarının belirlenmesi amacıyla kolajen analizi yapılmıştır. Kolajen miktarı Total Collagen Assay Kit (BioVision K218) kullanılarak belirlenmiştir. Analizin prensibi hidroksiprolinin açığa çıkması için örneğin asit ile hidrolizi ve hidroksiprolinin DMAB boyası ile verdiği reaksiyon sonucu oluşan rengin 560 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanmaktadır. Örneklerin kolajen içeriğinin saptanması için Tip 1 kolajen standardı (Sigma C9879) kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur. Analiz hidroliz ve reaksiyon aşamalarından oluşmaktadır.

Hidroliz Aşaması: 12 mg Tip 1 kolajen standardı üzerine 6 mL 12 M HCL eklenerek 1 gece bekletilmiştir. Ardından 250 µl standart çekilerek üzerine 250 µl saf su eklenmiştir ve 120°C'de 3 saat hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Hidroliz işlemi sonrasında, reaksiyon aşamasına geçmeden önce standardın oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.

Reaksiyon aşaması: Standart çözeltisinden 3'er tekrar olacak şekilde 2, 4, 6, 8 ve 10 µl çekilerek, 96 kuyulu plakaya aktarılmış ve 70°C'deki vakumlu etüvde 1 saat buharlaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Buharlaştırma işlemini takiben, her bir kuyuya 100 µl kloramin T reagent ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir kuyuya 100 µl DMAB reagent eklenmiş ve 60°C'de 90 dk reaksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşan renklerin absorbans değerleri 560 nm dalga boyunda plaka okuyucu (UV/VIS Multi well Spektrofotometre/ Thermo Scientific Multiskan GO) kullanılarak belirlenmiştir.

3.3.8. Aminoasit Analizi

Kolajen örneğinin aminoasit analizi, hizmet alımı yoluyla Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi'nde (ARGEFAR) gerçekleştirilmiştir. ARGEFAR tarafından kullanılan standart karışımda Hidroksiprolin, Asparajin, Glutamin ve Triptofan bulunmadığı için bu amino asitler örnekte bulunsan bile tespit edilememektedir. Ayrıca kolajen örneğinde Glisin piki çok yüksek olduğu için hemen arkasından gelen treonin pikinden hesaplama yapılamamıştır. Deneyin detaylı yöntemi ve elde edilen kromatogram EK-1 ve EK-2 olarak raporun sonunda verilmiştir.

3.3.9. Akış özelliklerinin belirlenmesi

Elektro-eğirme için hazırlanan kolajen-GAG çözeltisinin akış özellikleri, eş merkezli silindir probu (prob çapı 27.99 mm, uzunluğu: 42.07 mm, ölçüm kabı çapı: 30 mm) kullanılarak TA DHR-3 Reometrede (TA Instruments, ABD) 25°C'de 0-200 s⁻¹ kayma hızı aralığında Herschel Bulkley, Casson, Power Law ve Bingham modelleri ile test edilerek belirlenmiştir.

3.3.10. Elektriksel iletkenlik ölçümü

Elektro-eğirme için hazırlanan kolajen-GAG çözeltisinin elektriksel iletkenliği 0-2000 pS/m ve 0-35°C aralığında çalışabilen iletkenlik ölçer (Mettler Toledo Multiparameter) ile oda sıcaklığı koşullarında ölçülmüştür.

3.3.11. SEM Analizi

Nanoliflerin morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu (ThermoFisher, QUANTA FEG 250, ABD) kullanılarak hizmetini yoluyla Ege Üniversitesi-Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (MATAL) belirlenmiştir. Analiz öncesinde örnekler altın ile kaplanmıştır.

3.3.12. İn Vitro Sitotoksikite Testi

Granola barlara katılacak olan nanoliflerin sitotoksik etkisinin olup olmadığını göstermek amacıyla in vitro sitotoksikite testi yapılmıştır. Hücre canlılığı, MTT indirgenme testi kullanılarak hizmetini yoluyla Ege Üniversitesi-Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (MATAL) değerlendirilmiştir. Analiz için örnekler, ilk olarak serum içermeyen Dulbecco's MEM High Glucose besi ortamı içerisinde 0,1 g/mL konsantrasyonda olacak şekilde 37°C±0,1'de 24 saat süre ile ekstrakte edilmiştir. Sitotoksikite testi L-929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu mikrolakalar üzerine 1x10⁵ hücre/mL konsantrasyonda ekilen hücreler üzerine 24 saat süresince uygulanan materyal ekstraktının (37°C'de %5 CO₂'li ve %95 nemli ortamda) sitotoksik etkisi MTT testi ile spektrofotometrede (570 nm) absorbanslar okunarak değerlendirilmiştir.

3.3.13. Duyusal Analiz

Hazırlanan granola barlar arasında tespit edilebilir bir fark olup olmadığının belirlenmesi amacıyla üçgen test ASTM E1885-04 yöntemi kullanılmıştır. Duyusal analiz toplam 24 panelist ile 2 gruba ayrılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.14. İstatistiksel Analiz

Analiz sonuçları SPSS (SPSS 11.0, Chicago, IL, ABD) istatistik programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Örnekler arası önemli düzeyde farklılık bulunduğunda ($P < 0.05$) çoklu karşılaştırma için DUNCAN testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Temizlenen ve öğütülen kuzu ayaklarının kimyasal bileşen analizi sonucu Tablo 4.1’de görülmektedir.

Tablo 4.1 Kuzu ayaklarının yaş temelinde kimyasal bileşimi

Kuzu ayağı	
Nem (%)	%45 ± 4,06
Protein ^a (%)	%21.86 ± 1.42
Kül (%)	%16.72 ± 3.04
Yağ (%)	%9.44 ± 1.73
Karbonhidrat ^b	%6.98

a; faktör 6.25; b; 100 g’daki hammaddede yaş temelinde ortalama nem, protein, kül ve yağ değerlerinin çıkartılarak hesaplanmasıyla bulunmuştur.

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, kuzu ayaklarının bileşimine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Kuzu ayağının protein içeriğinin fazla olması kolajen ekstraksiyonu için alternatif hammadde olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Kolajen kaynağı olarak değerlendirilen tavuk ayağı ve balık derisi ile kıyaslandığında, kuzu ayağı protein içeriğinin (%21.86), tavuk ayağı protein içeriğinden (%17.42, Liu vd., 2001) fazla olduğu, balık derisi (*Osteochilus vittatus*) protein içeriği (%21.80, Anto vd., 2018) ile benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Kuzu ayaklarının kül içeriğinin yüksek olmasının yüksek oranda kemik kalıntısı içermesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yağ içeriğinin fazla olması nedeniyle de ekstraksiyon işlemi öncesinde proje önerisinde belirtildiği gibi yağ uzaklaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

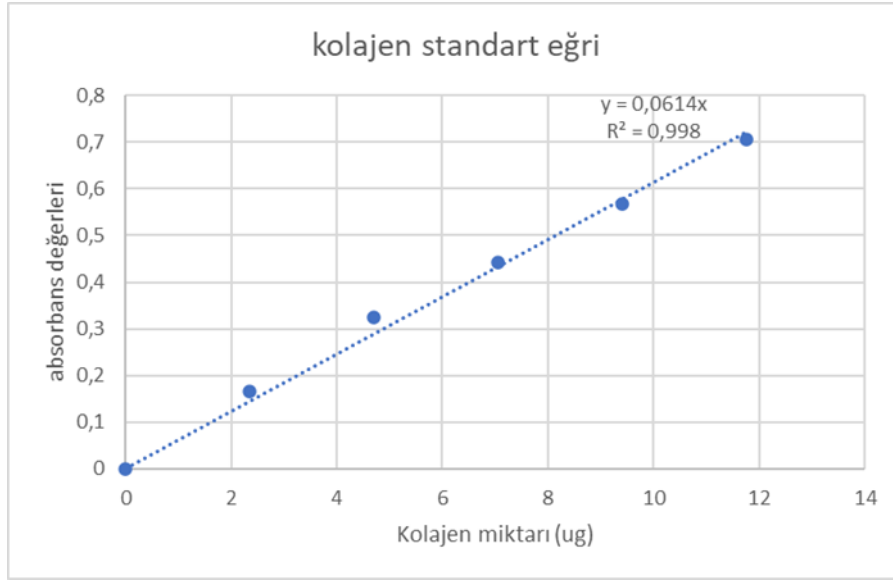
Kuzu ayaklarının karbonhidrat içeriği yaklaşık %6.98 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca dayanarak kuzu ayaklarının alternatif GAG kaynağı olarak değerlendirilebileceği öngörülmektedir. Et endüstrisinde, kıkırdak, kemik, deri ve tendon dokularını içeren bağ dokuları nispeten katma değeri düşük olan yan ürünler sayılmaktadır (Nakano vd., 2010). Dolayısıyla bu yan ürünlerden katma değeri yüksek ürünlerin elde edilmesi endüstri için oldukça önemlidir. Kuzu ayaklarının kimyasal bileşim analiz sonucu, katma değeri yüksek ürünlerin (Kolajen ve GAG) eldesi için uygun bir hammadde olduğunu göstermiştir.

4.1. Kolajen Karakterizasyonu

Proje kapsamında yapılan üretimler sonucu elde edilen liyofilize kolajen örneklerinin karakterizasyon analizlerine yönelik sonuçlar bu kısımda tartışılmıştır.

4.1.1. Kolajen Analizi Sonuçları

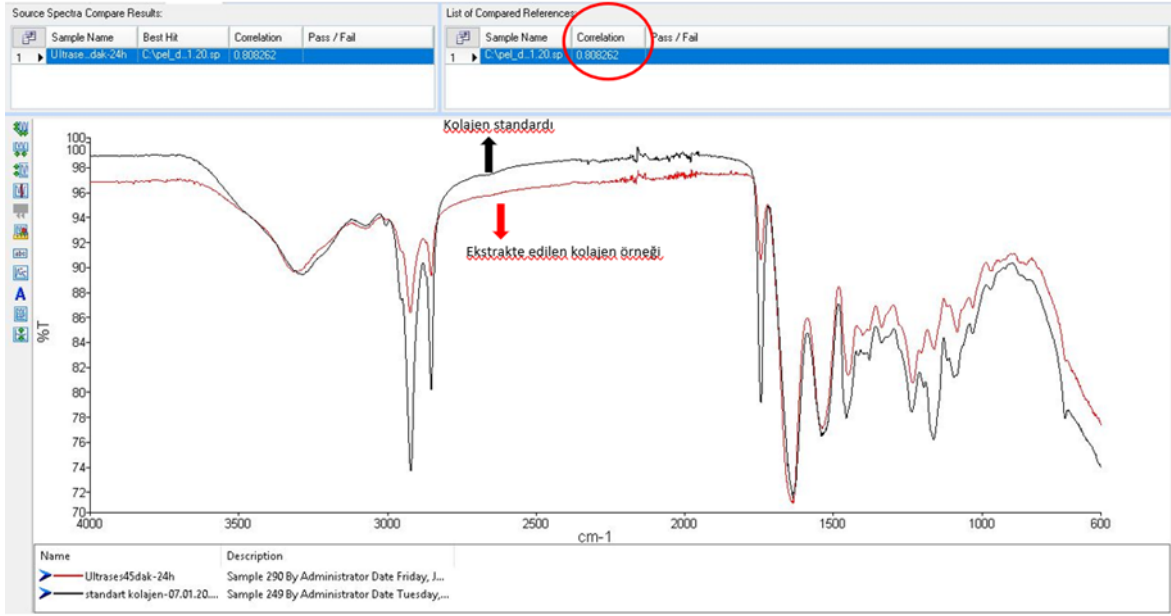
Şekil 4.1’de kolajen standart eğrisi verilmiştir. Örneklerin kolajen miktarı, $y=0.0614x$ denklemi ($R^2 = 0.998$) kullanılarak hesaplanmıştır. Kolajen analizi sonucunda örneklerin kolajen miktarı 873,3 mg/g (kolajen miktarı /liyofilize ürün miktarı) olarak hesaplanmıştır. Cheng ve ark. (2009) tavuk ayağı kolajen içeriğini 516,9 mg/g olarak, Ali ve ark. (2018) altın sazan derisi kolajen içeriğini 512,65 mg/g olarak bildirmişlerdir. Sonuçların literatüre göre daha yüksek olması, kuzu ayaklarından kolajenin etkili bir şekilde ekstrakte edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.1 Kolajen standart eğrisi

4.1.2. Kolajen FTIR Analizi Sonuçları

Kuzu kolajeni örneğine karşı kolajen standardının karşılaştırılmalı FTIR analiz sonucu için korelasyon değeri 0.8082 bulunmuş ve Şekil 4.2’deki grafik üzerinde gösterilmiştir. FTIR spektrumu incelendiğinde karakteristik olan amit A, amit B, amit I, amit II ve amit III bantları görülmüştür.



Şekil 4.2 Kuzu kolajeni örneği ve kolajen standardına ait FTIR spektrumları

Amit A bandı, genellikle N-H germe titreşiminden kaynaklanır ve 3400- 3440 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında meydana gelir (Riaz vd., 2018). Amit B bandı, asimetrik CH₂ gerilmesi ve –CH₂ alkil zincirinden kaynaklanan emilim ile ilgilidir. Amit I, II ve III bantlarının, kolajende bulunan moleküler düzenin derecesinden sorumlu olduğu ve sırasıyla C=O gerilmesi, N-H bükülmesi ve C-N gerilmesi sonucu meydana gelen üçlü sarmal yapının oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir (Muyonga vd., 2004). Kuzu ayağından elde edilen kolajen örneğinin, literatürdeki diğer kolajen örnekleri ile benzer FTIR spektrumları sergilediği görülmüştür (Hashim vd., 2014; Krishnamoorthi vd., 2017).

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

Tip 1 kolajen standardı (Sigma C9879) ve kuzu kolajeninin protein dağılımlarını gösteren SDS-PAGE bantları ve alt birim bileşenleri Şekil 4.3'de görülmektedir.

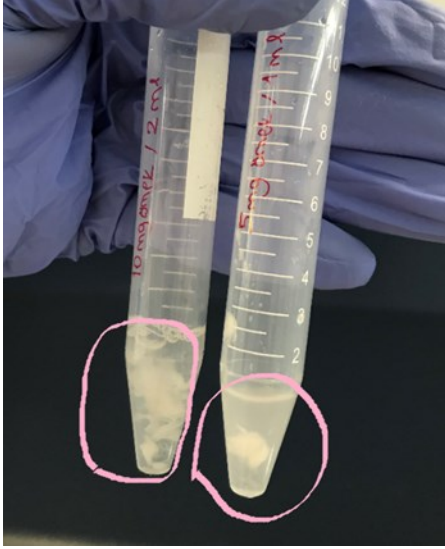


Şekil 4.3. Kolajen standardı ve kuzu kolajenin SDS-PAGE bantları

Tip I kolajen, iki özdeş $\alpha 1$ (I) zincirinden ve bir $\alpha 2$ zincirinden oluşur. İki α zinciri, β -peptit zinciri olarak bilinen bir peptit zincir dimerine dönüşürken, üç α zinciri, γ -peptit zinciri (tropokolajen molekülü) olarak bilinen peptit zincir trimerine dönüşür (Yang and Shu, 2014). Kuzu kolajenin $\alpha 1$, $\alpha 2$, β ve γ zincirlerinden oluştuğu ve Tip 1 kolajen standardıyla benzer zincir modellerine sahip olduğu görülmüştür. 200 kDa üzerindeki moleküler ağırlığa sahip β (α - zincirlerinin dimerleri) ve γ (α - zincirlerinin trimerleri) zincirlerinin varlığı, kuzu ayağı kolajenin yüksek çapraz bağlara sahip olduğunu göstermektedir (Shoulders and Raines, 2009). Tip I kolajenin [$\alpha 1(I)$] $_2$ $\alpha 2(I)$] kuzu ayağı kolajenin ana bileşeni olduğu elektroforez sonuçları ile desteklenmiştir. Protein jel elektroforez sonuçlarında kolajen ile ilgili olmayan başka bir protein bandı görülmemiş olması örneğin >%90 saflıkta olduğunu kanıtlamaya yeterlidir. Standart örnekte de bulunan ve çok az miktarda jelin en altında görülen düşük molekül ağırlıklı bantların da kolajen hidrolizi sonucu açığa çıkan kolajen fraksiyonları olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak örnekler protein bakımından yüksek saflıkta kolajen içermektedir.

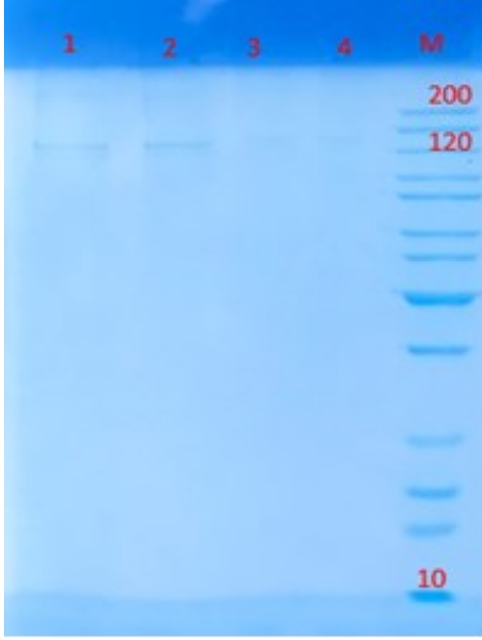
4.1.4. Moleküler Ağırlık Dağılımının Belirlenmesi

Moleküler ağırlık analizi için TÜBİTAK-MAM ile yapılan görüşmeler sonucu analizin gerçekleştirilebilmesi için örneklerin suda çözünmesi ve 0.45 µm filtreden geçebilmesi gerektiği bildirilmiştir. Analizin gerçekleştirileceği konsantrasyonda denemeler yapılmıştır. Kolajen örnekleri 5mg/mL ve 10mg/2 mL olacak şekilde aynı konsantrasyonda hazırlanmış ve oda koşullarında 1 gece karışmaya bırakılmıştır. Şekil 4.4'de hazırlanan örnekler görülmektedir.



Şekil 4.4. 5mg/mL konsantrasyondaki sulu kolajen çözeltisi

Şekil 4.4'de de görüldüğü gibi örnekler suda çözünme göstermemiş ve 0.45 µm filtreden geçememiştir. Örneklerin çözünme probleminin çözülmesi için yapılan literatür taramasında, kolajenin düşük asetik asit konsantrasyonlarında çözünme gösterdiği görülmüştür (Jeevithan vd., 2015; Tan and Chang, 2018). Proteinlerin pH hafızası olduğundan dolayı verilen bilgiler ışığında kolajen örnekleri 0.1 M ve 0.5 M asetik asit kullanılarak 0.1 mg/mL ve 0.125 mg/mL konsantrasyonda tekrar hazırlanmış ve 1 gece karışmaya bırakılmıştır. Örneklerin suya göre daha iyi çözündüğü gözlenmiş ve partikül içermeyen bulanık bir süspansiyon elde edilmiştir. Daha sonra bu örnekler 0.45 µm filtreden geçirilmiştir. Filtre öncesi ve sonrası örneklerden jel örneği alınarak elektroforez analizi uygulanmıştır. Şekil 4.5'de jel sonuçları görülmektedir.



Şekil 4.5 Moleküler ağırlık için yapılan jel elektroforez sonuçları (1: 0.1 mg/mL konsantrasyonda 0.1 M asetik asit kullanılarak hazırlanan örnek; 2: 0.1 mg/mL konsantrasyonda 0.1 M asetik asit kullanılarak hazırlanan örneğin filtreden geçirilmiş hali; 3: 0.125 mg/mL konsantrasyonda 0.5 M asetik asit kullanılarak hazırlanan örnek; 4: 0.125 mg/mL konsantrasyonda 0.5 M asetik asit kullanılarak hazırlanan örneğin filtreden geçirilmiş hali; M: marker)

Şekil 4.5'deki sonuçlara göre; 0.1 mg/mL konsantrasyonda 0.1 M asetik asit kullanılarak hazırlanan örneğin çözünme gösterdiği ve kayıp olmadan filtreden geçtiği görülmektedir. 0.5 M asetik asitte çözünürlüğün daha düşük olduğu, bant yoğunluğunun daha az olmasından da anlaşılmaktadır. 0.1 M asetik asit kullanılarak 0.1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan örnek, filtreden geçirildikten sonra 48 saat liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen filtreden geçmiş örnek 5 mg/ml saf su konsantrasyonunda tekrar hazırlanmış ve 1 gece çözünme işlemi için karışmaya bırakılmıştır. Ancak çözünürlük kısmen artsa da, örnekler 0.45 μ m filtreden geçememiştir. Bu yüzden moleküler ağırlığın tahmin edilmesinde SDS-PAGE analizinden elde edilen sonuçlar kullanılmıştır. Kuzu ayağı kolajeni moleküler ağırlık dağılımının (α 1- MW ~120 kDa; α 2- MW ~110 kDa), literatürde kolajen kaynağı olarak bildirilen kuzu kemiği kolajeni (α 1- MW 110 kDa; α 2- MW 126 kDa) (Gao vd., 2017) ve sığır tendonu kolajeni (α 1- MW 120 kDa; α 2- MW 116 kDa) (Ran and Wang, 2014) moleküler ağırlık dağılımı ile benzerlik gösterdiği görülmüştür (Tablo 4.2). Elde edilen kolajenin moleküler ağırlık dağılımı SDS-PAGE analizinin sonuçları Tablo 4.2'de literatürle karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Buradan da görüleceği gibi aslında hedeflenen moleküler ağırlık dağılımı elde edilmiştir. Kolajenin %90'nın üzerinde saflıkla elde edilmesine dair başarı ölçütü hedefine de ulaşılmıştır.

Tablo 4.2 Kuzu ayağı moleküler ağırlık dağılımının literatürle kıyaslanması

Kolajen Kaynağı	$\alpha 1$ ve $\alpha 2$ zincirleri moleküler ağırlığı (kDa)
Kuzu ayağı kolajeni	$\alpha 1$ - ~120 kDa; $\alpha 2$ - ~110 kDa
Kuzu kemiği kolajeni (Gao vd., 2017)	$\alpha 1$ - 110 kDa; $\alpha 2$ - 126 kDa
Sığır tendonu kolajeni (Ran and Wang, 2014)	$\alpha 1$ - 120 kDa; $\alpha 2$ - 116 kDa

4.1.5. Aminoasit Analizi

Kuzu kolajen örneğinin aminoasit içeriği Tablo 4.3’de verilmiştir. Yapısında on dokuz farklı amino asit bulunduran kolajen, zorunlu amino asitlerden histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, tirozin ve valini içermektedir (Li and Wu, 2018).

Tablo 4.3 Kuzu kolajeni aminoasit içeriği

Aminoasit	Kolajen örneği Miktar (g/100 g)
Aspartik asit	3,352
Glutamik asit	3,736
Serin	0,511
Histidin	1,061
Glisin	31,990
Arjinin	8,733
Alanin	12,654
Tirozin	0,299
Valin	2,473
Metiyonin	0,834
Fenilalanin	2,486
İzolösin	1,312
Lizin	4,217
Lösin	3,714
Prolin	10,752

Kolajenin sarmal yapısı başlıca alanin, fenilalanin, asparajin, glutamin, histidin, lösin, metiyonin ve tirozinden oluşmaktadır. Sarmalın düzenli yapısı serin, treonin, prolin ve

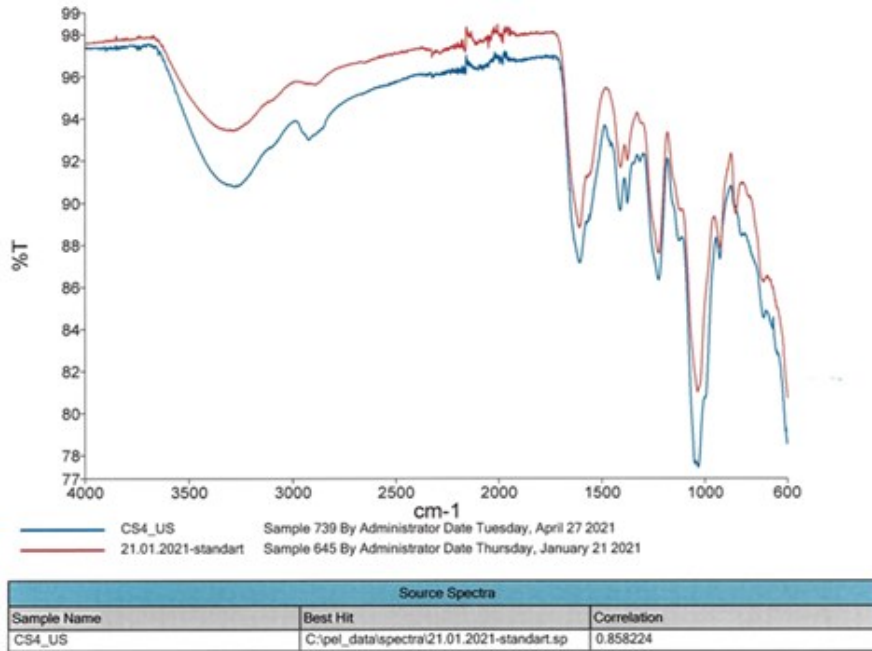
hidroksiprolin tarafından bozulur (Włodarczyk vd., 2017). Genel olarak, kolajendeki amino asit dizisi tekrarlayan tripeptit birimidir (Gly-X-Y). Gly, glisin, X sıklıkla prolin, Y ise hidroksiprolindir. Kuzu ayağı kolajeninde en bol bulunan amino asidin yaklaşık %36'yla glisin (31,99 g/100g), ardından %14'le alanin (12,654 g/100g) ve %12 ile prolin (10,752 g/100g) olduğu görülmüştür. Sonuçların literatürle uyumlu olduğu görülmüştür (Zeng vd., 2015).

4.2. GAG Karakterizasyonu

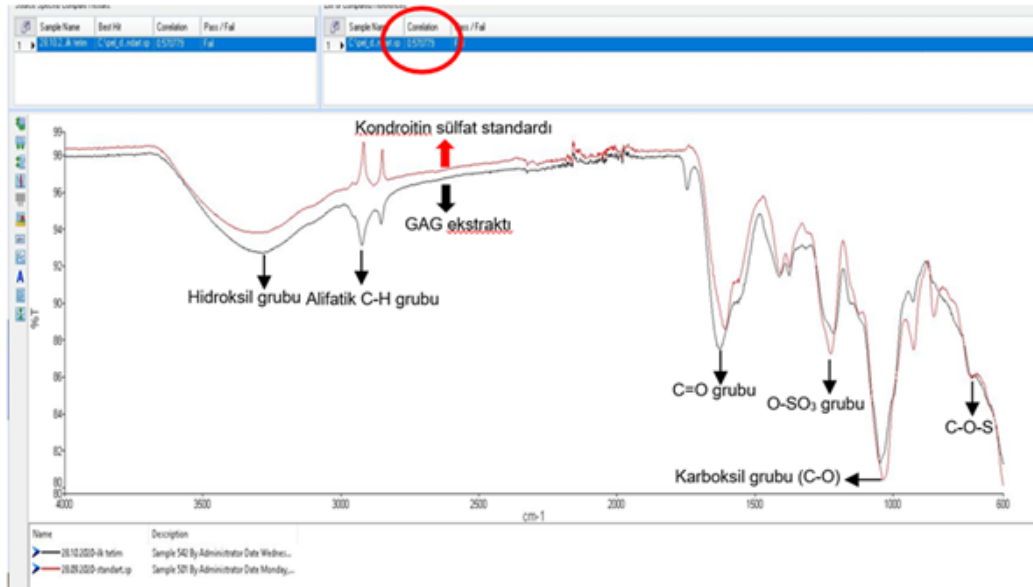
Kuzu tendonlarından ekstrakte edildikten sonra saflaştırılan ve liyofilize edilen kondroitin sülfat (CS) örneklerinin karakterizasyon analizlerine yönelik sonuçlar bu kısımda tartışılmıştır.

4.2.1. FTIR Analizi

Şekil 4.6'da kondroitin sülfat standardı (Sigma C9819) ile saf CS örneğinin karşılaştırılmalı FTIR analizi sonucu görülmektedir (korelasyon değeri 0.8582). Yaklaşık 1240-925 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki bantların, sakkarit halkası ve sülfat gruplarına ait karakteristik bantlar olabileceği belirtilmiştir (Zhao vd., 2013). Kondroitin sülfat standardı ve GAG ekstraktı için karakteristik C –O –S pikleri 854 cm^{-1} 'de gözlenmiştir (Sundaresan vd, 2018). Saflaştırma uygulanmamış GAG ve standart arasındaki korelasyon değeri olan 0.5707 (Şekil 4.7) ile karşılaştırıldığında kondroitin sülfatın başarılı bir şekilde saflaştırıldığı bu analizle de desteklenmiştir.



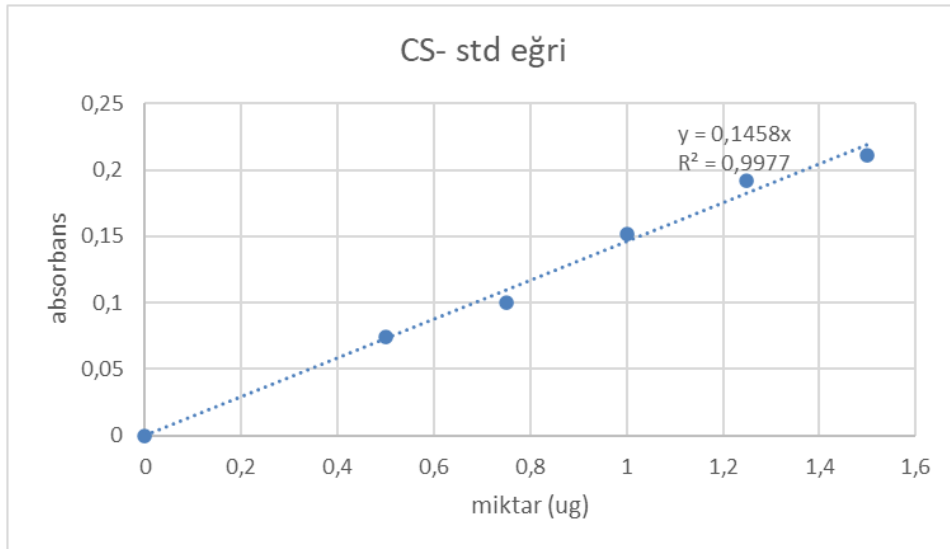
Şekil 4.6 Saf CS örneği ve kondroitin sülfat standardına ait FTIR spektrumları (Mavi ile gösterilen spektrum CS örneğine; kırmızı ile gösterilen spektrum ise kondroitin sülfat standardına aittir)



Şekil 4.7 GAG ekstraktı ve kondroitin sülfat standardına ait FTIR spektrumları

4.2.2. GAG Analizi

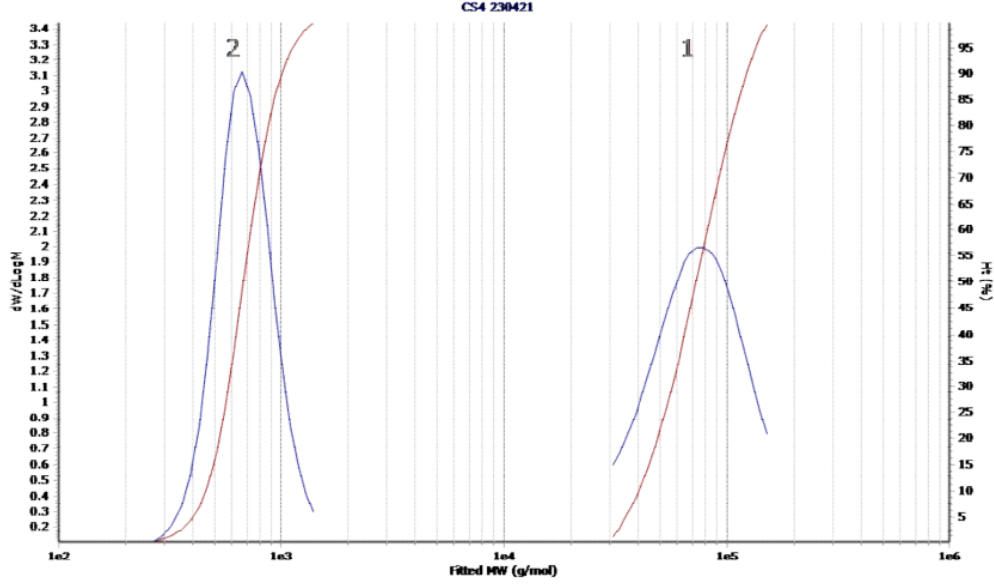
Şekil 4.8’de kondroitin sülfat standart eğri grafiği verilmiştir. Örneklerin kondroitin sülfat miktarı, $y=0.1458x$ denklemi ($R^2= 0.9977$) kullanılarak hesaplanmıştır. Saflaştırılan örneğin CS içeriği %88,47 olarak hesaplanmıştır. DMMB analizi sonuçları da kondroitin sülfatın yüksek saflığa sahip olduğunu göstermektedir. Bütün analizler (elektroforez (Şekil 3.9), FTIR (Şekil 4.6) ve DMMB analizi) proje önerisinde belirtilen İş paketi 5 başarı ölçütü olan CS saflığı>%50 değerinin karşılandığını göstermektedir.



Şekil 4.8 CS standart eğrisi

4.2.3. Moleküler ağırlığın belirlenmesi

Saf CS örneğinin moleküler ağırlık dağılımı grafiği Şekil 4.0'da görülmektedir. Deneyle ilgili detaylı analiz raporu Ek-3 olarak raporun sonunda verilmiştir.



Şekil 4.9 Saf CS örneğine ait moleküler ağırlık dağılımı grafiği

GPC analiz sonuçlarına göre, CS örneğine ait iki adet dağılım piki gözlenmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı olan birinci pike ait polimerlerin ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (Mw) 77299 (g/mol); sayıca ortalama molekül ağırlığı (Mn) 65764 g/mol; polidispersite indeksi (PID) ise 1,175 bulunmuştur. Düşük molekül ağırlığa sahip olan ikinci pike ait polimerlerin ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (Mw) 705 (g/mol), sayıca ortalama molekül ağırlığı (Mn) 642 g/mol; polidispersite indeksi (PID) ise 1,098 bulunmuştur. Polimer örneğindeki zincirlerin ağırlıkları birbirine yakın olduğunda Mw değeri Mn değerine yaklaşır, bu durumda ideal hal olan polidispersite indeksi değeri de 1'e yaklaşır. Polidispersite indeksi değerinin (Mw/Mn) düşük olması üretim kalitesini ve depolimerizasyon olmadığını göstermektedir (Volpi vd., 2021). Elde edilen GPC sonuçlarına göre saflaştırılan CS molekülünün 65 kDa (pik 1 Mn: 65764) molekül ağırlığına sahip olduğu gözlenmiştir. Literatürde, kullanılan CS kaynağına bağlı olarak ortalama molekül ağırlığının 5 ila 100 kDa arasında değiştiği bildirilmiştir (Zhao vd., 2013; Martel-Pelletier vd., 2015). Sonuçların literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

4.3. Elektro-eğirme işlemi ile Nanolif Eldesi ve Karakterizasyonu

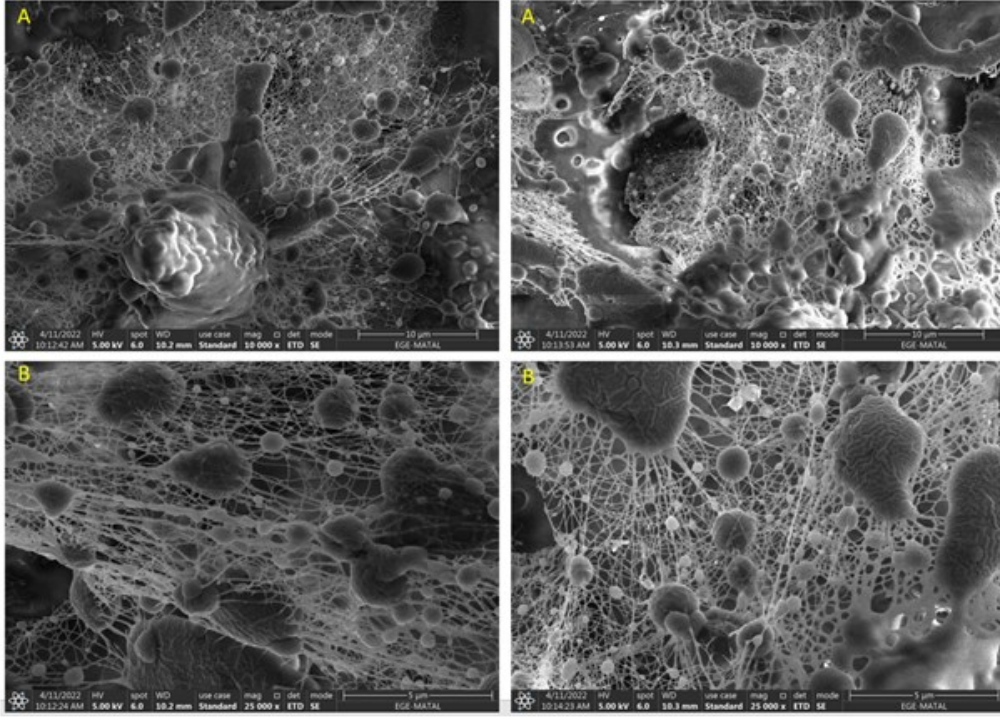
Bu bölümde elektro-eğirme işlemi ile nanolif eldesi ve karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmalar ve sonuçları tartışılmıştır.

Denemelerde kullanılan çözeltiler öncelikle proje önerisinde yazılan %20'lik (v/v) asetik asit çözeltisi kullanılarak hazırlanmış ancak uygun konsantrasyon değerine ulaşılamaması nedeniyle lif oluşumu gözlenmemiştir. Bu yüzden B planımızda da verilen şekilde asetik asidin konsantrasyonu %50'ye (v/v) çıkarılarak denemeler gerçekleştirilmiştir. Denemelere proje önerisinde verildiği gibi %10 (w/v) örnek konsantrasyonu ile başlanmıştır. Örnekler, oda sıcaklığı koşullarında %50 (v/v) asetik asit içerisinde hazırlanmış ve 1 gece çözünmeye bırakılmıştır. Hazırlanan çözelti 5 mL'lik şırıngaya çekildikten sonra elektro-egirme işlemine tabi tutulmuştur. Ancak %10 (w/v) konsantrasyonda hazırlanan örnekler Tablo 4.4'de verilen koşullarda herhangi bir nanolif oluşturmamıştır.

Tablo 4.4 Elektro-eğirme işlem koşulları

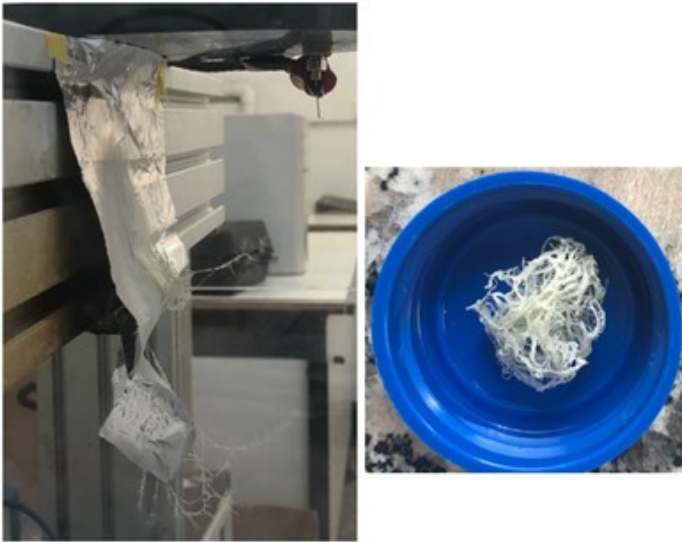
voltaj	25-27 kV aralığında
akış hızı	0,8-1 mL/h aralığında
iğne ucu- kolektör arası mesafe	15 cm

Bu kapsamda, daha sonrasında yapılan denemelerde proje önerisinde belirtildiği gibi ağırlıkça 95:5 ve 90:10 kolajen: kondroitin sülfat içeren çözeltiler %15 (w/v) örnek konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Elektro-eğirme işlemi 25 kV voltaj, 0.8 mL/h akış hızı ve 15 cm iğne ucu-kolektör arası mesafe işlem koşulları altında gerçekleştirilmiştir. 90:10 kolajen:kondroitin sülfat içeren çözelti, yukarıda belirtilen işlem parametrelerinde elektro-eğirme işlemine tabi tutulduğunda herhangi bir nanolif oluşumu gözlenmemiştir. İşlem parametreleri revize edilerek (akış hızı 0.6 mL/h-1 mL/h, voltaj 25-28 kV) yapılan denemelerde de nanolif toplanamamıştır. Alüminyum folyoya yapılan püskürtmeye ait SEM görüntüleri Şekil 4.10'da verilmiştir.



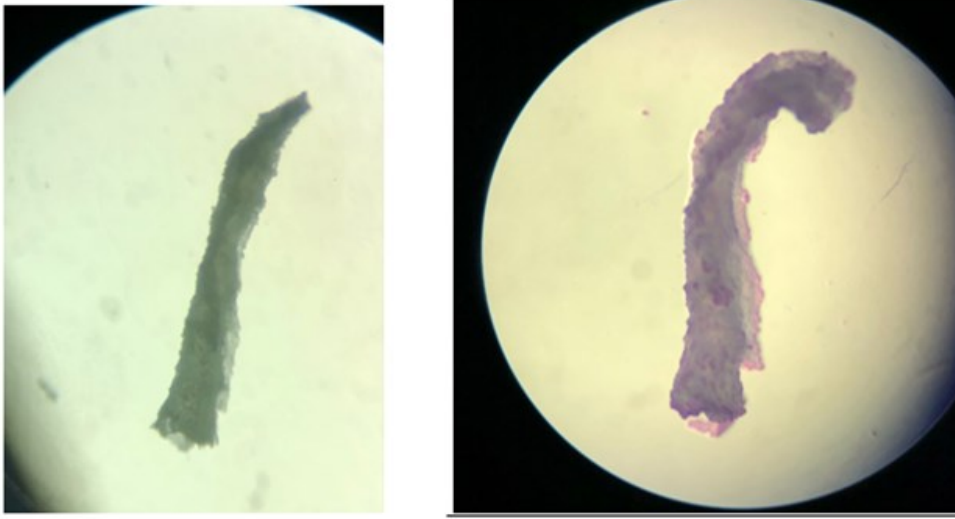
Şekil 4.10. Nanoliflerin (90:10 kolajen-kondroitin sülfat) SEM görüntüleri (A: 10 000x büyütme; B: 25 000x büyütme)

Şekil 4.10'da da görüldüğü üzere liflerin birbirine bağlandığı noktalarda boncuk yapılar dikkat çekmektedir. Bununla beraber homojen bir lif dağılımı da gözlenmemiştir. Çözelti içindeki kolajen: kondroitin sülfat oranı 95:5'e çıkarıldığında ise nanolif oluşumu gözlenmiş ve işlem sonunda nanolifler alüminyum folyo ile kaplanmış plakadan kolay bir şekilde toplanmıştır. Şekil 4.11'de elektro-eğirme sırasında oluşan liflerin görüntüsü verilmiştir.



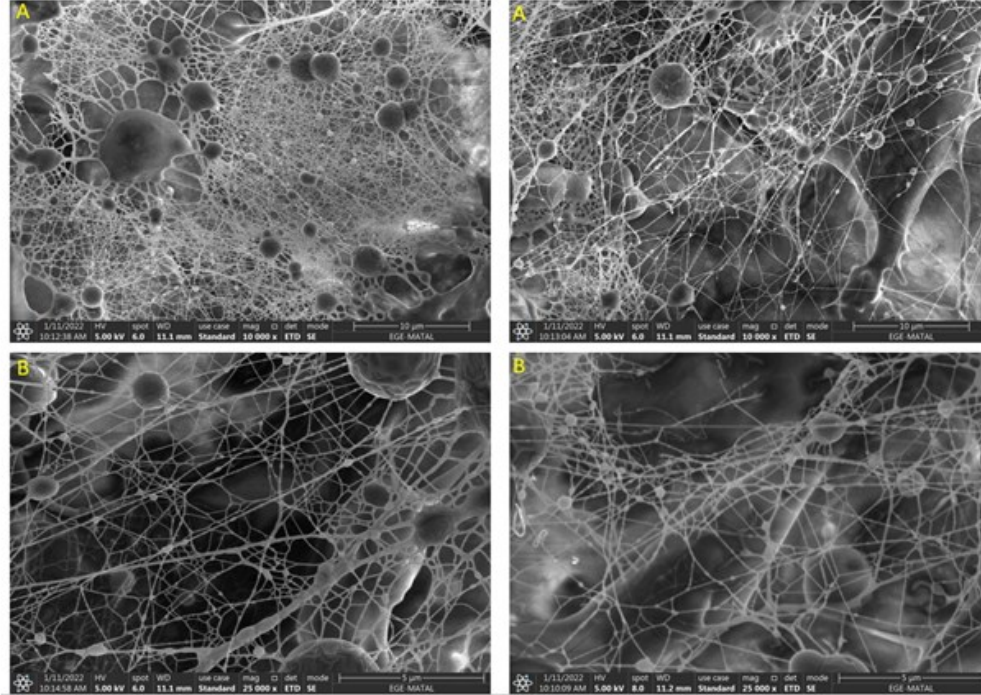
Şekil 4.11 Toplanan nanolifler

Nanoliflerin (95:5) stereo mikroskop altındaki görüntüsünü almak için, nanoliften bir parça alınıp üzerine 200 µl DMMB boyası eklenmiş ve pembe renk olduğu gözlenmiştir. Pembe renk, kolajenlere tutunan kondroitin sülfat (CS) varlığını göstermektedir (Şekil 4.12).



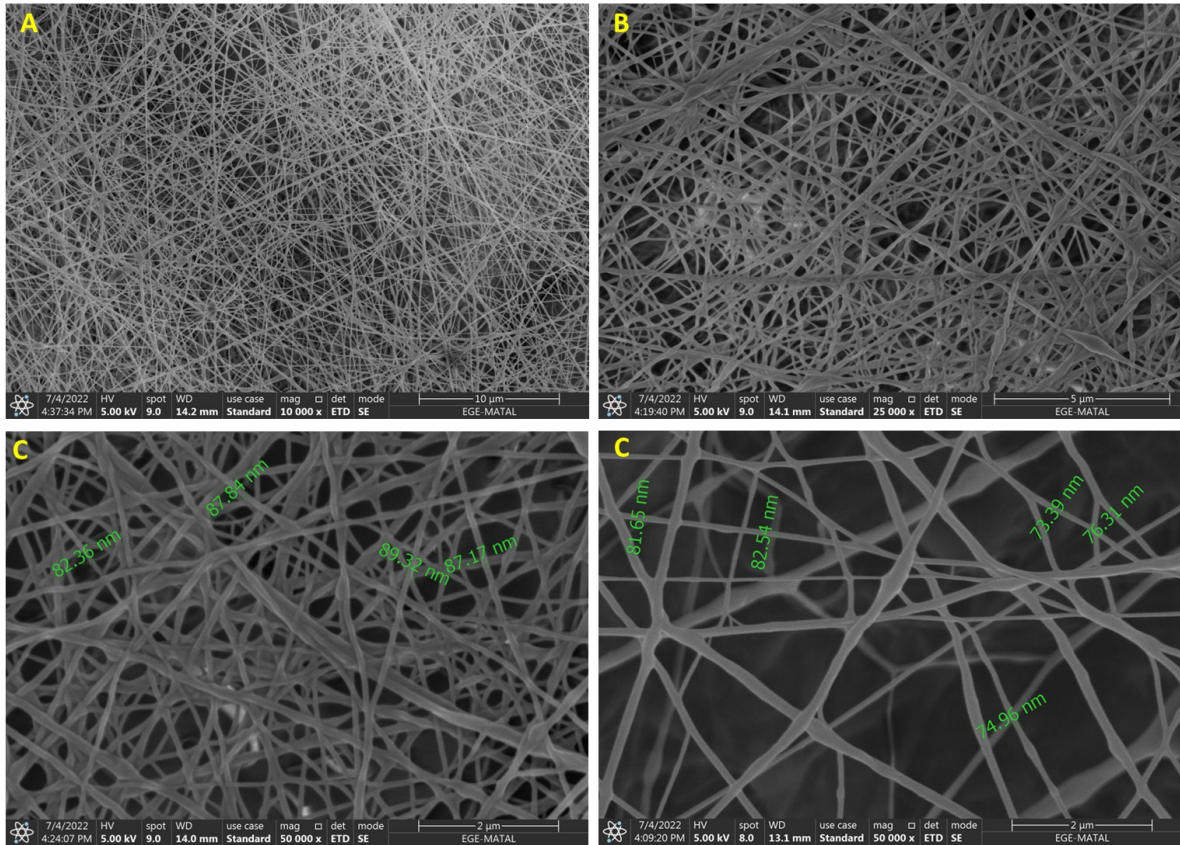
Şekil 4.12. Kuru lifin stereo mikroskop görüntüsü (a), boyanmış lifin görüntüsü (b)

Şekil 4.13’de nanoliflere (95:5) ait SEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.13 Nanoliflerin (95:5 kolajen-kondroitin sülfat) SEM görüntüleri (A: 10 000x büyütme; B: 25 000x büyütme)

Şekil 4.13'de de görüldüğü gibi ağsı yapılarla birlikte boncuk yapılar da görülmektedir. Bu durumun, nanolif eldesine kadar püskürme aşamasından eğirme aşamasına geçiş sürecinde örnekten plaka üzerine püsküren damlacıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek elektrik alanın elektro-eğirme jetinin kırılmasına yol açabileceği ve sürekli jet üretilmeme sonucu boncuklu lifler elde edilebileceği bildirilmiştir (Buttafoco vd., 2006). Yapılan çalışmalarda boncuklu yapıların azaltılması ve daha homojen/pürüzsüz bir lif yapısı elde etmek için polimer çözeltisinin konsantrasyonunun artırılması önerilmiştir (Katti vd., 2004; Law vd., 2007). Bu nedenle projemizin son dönemini kapsayan aralığında elektro-eğirme denemelerine %15 (w/v) örnek konsantrasyonunda 95:5 kolajen: kondroitin sülfat içeren çözeltiyle devam edilmiş ancak polimer çözeltisinin konsantrasyonunun artırılması için %60 (v/v) olan asetik asit konsantrasyonu %65'e çıkarılmıştır. Elektro-eğirme uygulaması bir önceki rapor döneminde belirtildiği şekilde; 26 kV voltaj, 0.8 mL/h akış hızı ve 15 cm iğne ucu-kolektör arası mesafe olarak uygulanmıştır. Bu koşullarda elde nanoliflere (95:5) ait SEM görüntüleri Şekil 4.14'de verilmiştir. Çözeltideki kolajen oranının 95'den 90'a düştüğünde lif oluşumu gözlenmediğinden dolayı örnek kaybı yaşanmaması için 85:15 kolajen-kondroitin sülfat oranı denemesinin yapılmamasına karar verilmiştir.



Şekil 4.14. Nanoliflerin (95:5 kolajen-kondroitin sülfat) SEM görüntüleri (A: 10 000x büyütme; B: 25 000x büyütme; C: 50 000x büyütme)

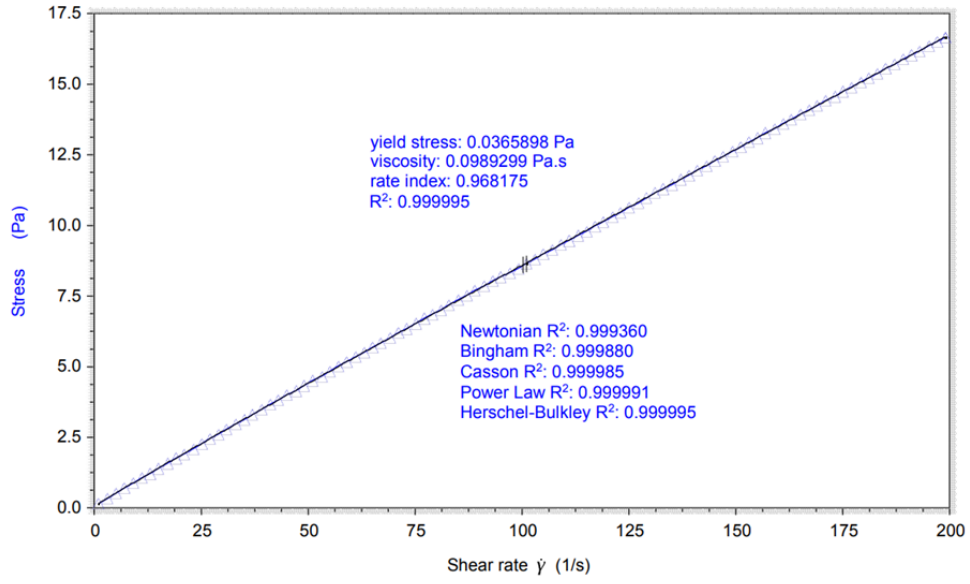
Elektro-eğirme uygulaması için hazırlanan 7 mL çözeltiden yaklaşık 63 mg nanolif (kolajen içeriği: %75,62±0,58; kondroitin sülfat içeriği: %4,026±0,03) elde edilmiştir. Elde edilen nanoliflerin (ortalama çap 82 ± 6 nm) literatürde belirtildiği şekilde birbirine bağlı rastgele dizilmiş liflerden oluştuğu görülmektedir (Zhong vd., 2007). Chen vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada ağırlıkça %20 jelatin çözeltisinden 20 kV altında eğrilen jelatin nanoliflerin, boncuk oluşumu olmaksızın ortalama 85 nm çapında bir çap sergilediği belirtilmiştir. Bununla beraber, elde edilen nanoliflerin literatürde bildirilen kolajen-GAG (~260 nm) (Zhong vd., 2007), jelatin-GAG (187-248 nm) (Pezeshki-Modaress vd., 2015) ve kolajen (150-200 nm) (Bürck vd., 2018) nanoliflerinden daha ince olduğu görülmüştür. Bu durumun çözelti konsantrasyonu ve çözücü tipinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Çözelti konsantrasyonunun, çözelti viskozitesini etkilediği için nanolif çapını belirleyen önemli bir faktör olduğu bilinmektedir (Zhong vd., 2005).

Proje önerimizde, 100-260 nm aralığında çapa sahip nanoliflerin eldesi hedeflenmişti. Ortalama 82 ± 6 nm çapa sahip, boncuk yapıların olmadığı nanolif eldesi başarıyla gerçekleştirilmiş ve ideal koşullar Tablo 4.5’de detaylı şekilde verilmiştir. Proje önerisinde verilmiş olan başarı ölçütünden daha düşük çapa sahip nanolif elde edilmesinin pozitif ya da negatif bir etkisi bulunmamaktadır. Yukarıda açıklandığı şekilde nanolif çapı çözelti özellikleri, proses ve ortam parametrelerine bağlı olarak değişebilmektedir.

Tablo 4.5 Kondroitin sülfat içeren kolajen nanoliflerinin (KGN) eldesi için belirlenen ideal koşullar

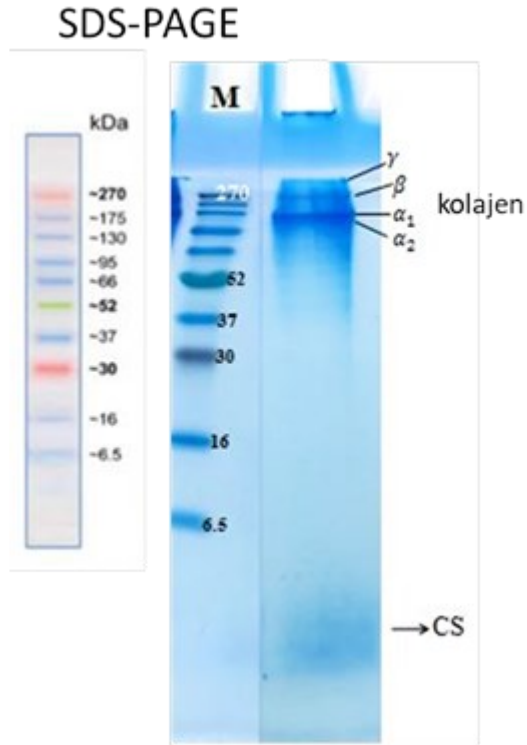
Çözelti Parametreleri	Elektro-Eğirme İşlem Parametreleri
Örnek Konsantrasyonu : %15 (w/v)	Voltaj: 26 kV
Kolajen: Kondroitin sülfat : 95:5 (w/w) oranı	Akış hızı: 0.8 mL/h
Asetik asit konsantrasyonu : %65 (v/v)	iğne ucu-kolektör arası mesafe: 15 cm
Elektriksel iletkenlik : 2527,347±17,464 (μ S/cm)	
Viskozite : 0,10011± 0,0016 Pa.s	

Şekil 4.15’de elektro-eğirme için hazırlanan çözeltiye ait kayma gerilimi-kayma hızı grafiği verilmiştir. Çözelti için en uygun modelin Herschel-Bulkley ($R^2 > 0.99$) olduğu belirlenmiştir. Viskozite değeri 0,10011± 0,0016 Pa.s olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.15 %15 (w/v) konsantrasyondaki çözeltinin 25°C'deki kayma gerilimi-kayma hızı grafiği

İdeal koşullarda elde edilen nanolife ait SDS-PAGE görüntüsü Şekil 4.16'da verilmiştir.

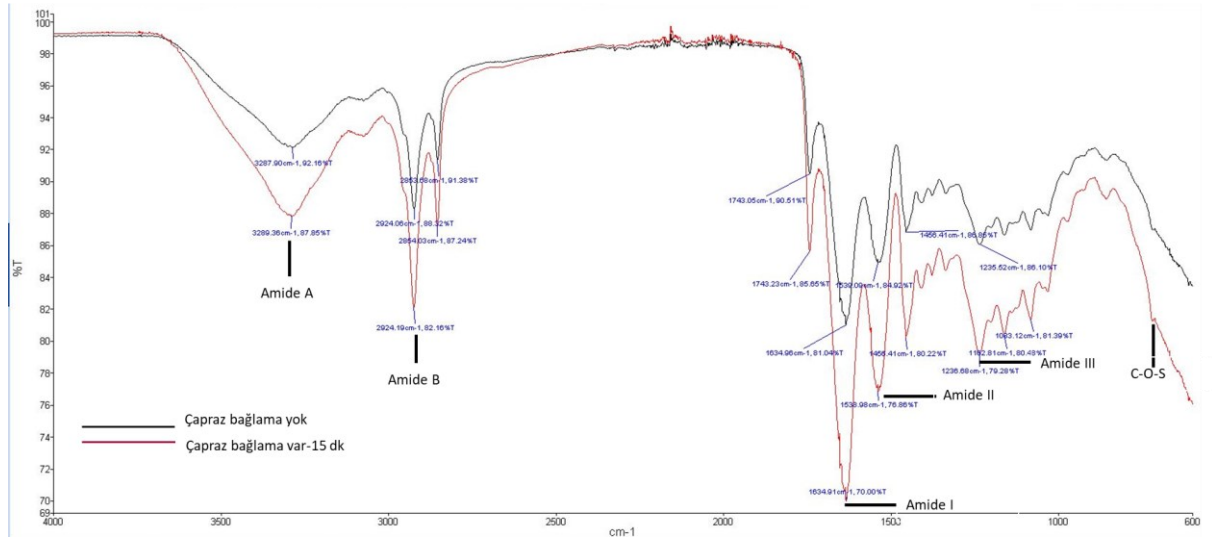


Şekil 4.16 İdeal koşullarda elde edilen nanolife (95:5 kolajen-kondroitin sülfat) ait SDS-PAGE görüntüsü

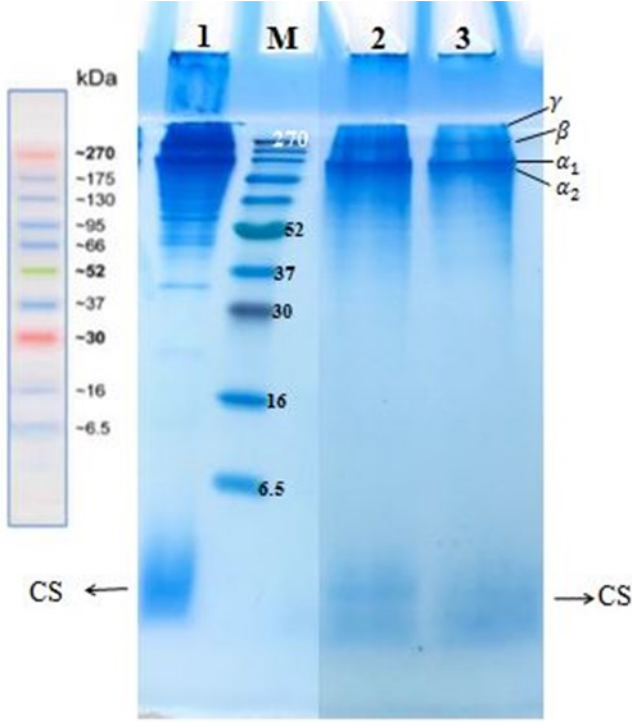
Burada, kolajene ait karakteristik bantlar (α , β ve γ) ve 6.5 kDa altında çıkan kondroitin sülfata ait sürüntü şeklindeki bantlar jelde görülmektedir. Böylece üretilen nanoliflerin, kolajen ve kondroitin sülfat yapılarını koruyarak içerdği sonucuna varılmıştır.

4.3.1. İdeal koşullarda elde edilen nanoliflerin çapraz bağlanması

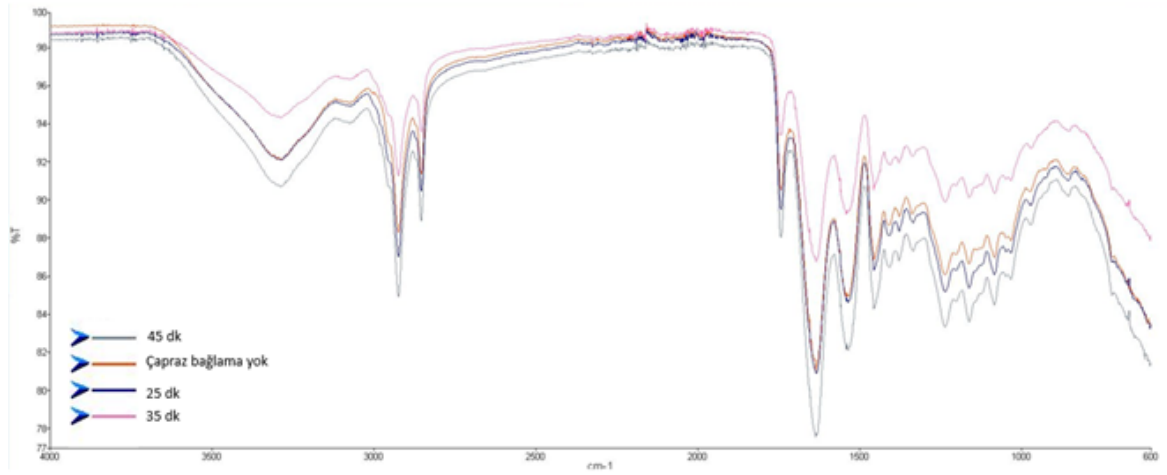
Proje önerimizde, ideal koşulda üretilen KGN'lerin çapraz bağlama işleminin 15 dk süreyle yapılacağı bildirilmiştir. Ancak, çapraz bağlama işleminin etkinliğini değerlendirmek için kullanılan native jel elektroforez ve FTIR analizleri sonucu 15 dk süreyle uygulanan çapraz bağlama işleminin, çapraz bağlama uygulanmamış kontrol grubuna göre herhangi bir farklılık göstermediği görülmüştür (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18). Bu kapsamda, 15 dakika üzerindeki sürelerde (25, 35 ve 45 dk) UV (254 nm) uygulanarak çapraz bağlama işlemi tekrar edilmiştir. Karşılaştırmalı FTIR ve elektroforez analizi sonuçları sırasıyla Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'da verilmiştir.



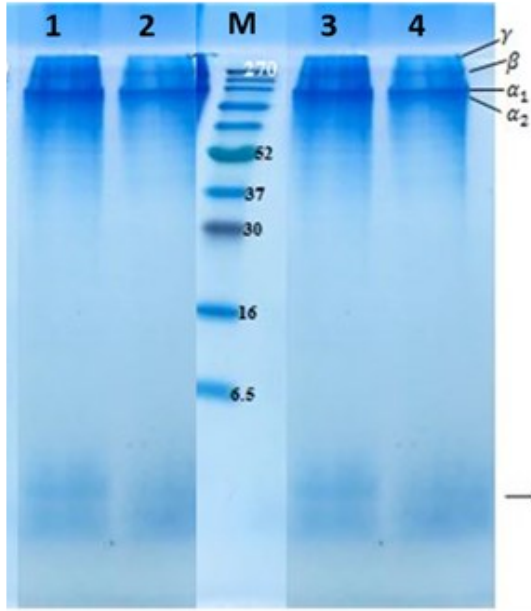
Şekil 4.17. Çapraz bağlanmış (15 dk) ve bağlanmamış nanoliflerin FTIR spektrumları (Kolajen için karakteristik bantlar: Amide A, B ve Amide I, II, III; kondroitin sülfat için karakteristik bant: C-O-S)



Şekil 4.18. (1) Liyofilize kolajen: kondroitin sülfat (95:5); (2) kolajen:kondroitin sülfat (95:5) nanolif; (3) 15 dk UV ışık ile çapraz bağlanmış nanolif SDS-PAGE görüntüsü



Şekil 4.19. Çapraz bağlanmış ve bağlanmamış nanoliflerin FTIR spektrumları



Şekil 4.20. (1) 25 dk UV uygulanmış nanolif; (2) 35 dk UV uygulanmış nanolif; (M) Marker; (3) UV uygulanmamış nanolif; (4) 45 dk UV uygulanmış nanolif SDS-PAGE görüntüsü

Elektroforez ve FTIR analizi sonuçlarına göre, 25, 35 ve 45 dk UV uygulaması yapılmış nanolif örnekleriyle UV uygulanmamış nanolif örneği arasında önemli bir farklılık tespit edilememiştir. Bu yüzden çapraz bağlama işleminin etkinliğinin, spektrofotometrik bir yöntem olan ninhidrin deneyi ile belirlenmesine karar verilmiştir (Yan vd., 2010). Sonuçlar Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Kontrol nanolif ve çapraz bağlanmış nanolif örneklerinin ninhidrin deneyi sonrası absorbens değerleri

Örnek grubu	Konsantrasyon	Absorbans değeri	Serbest amino grubu miktarı (mg)
Kontrol nanolif (UV uygulaması yok)	300 µl örnek + 700 µl alkol (seyreltme faktörü:3,33)	$0,469 \times 3,33 = 1,5633$	0,0176 mg
Çapraz bağlanmış nanolif	500 µl örnek + 500 µl alkol (seyreltme faktörü:2)	$0,389 \times 2 = 0,778$	0,0031 mg

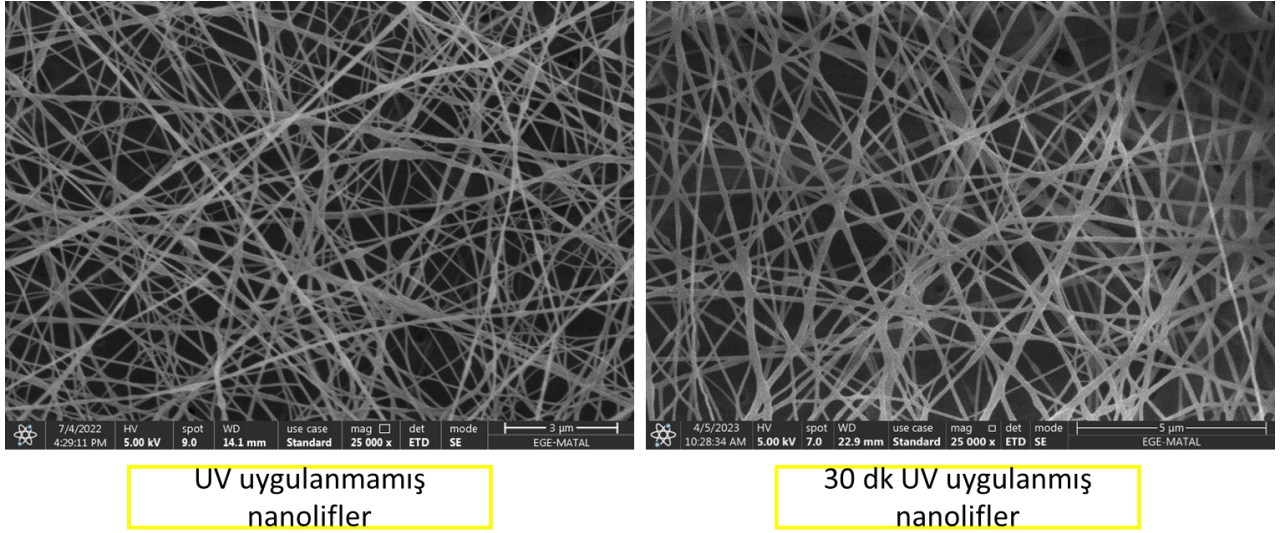
Tablo 4.6 incelendiğinde, UV uygulamasıyla çapraz bağlanmış nanolif örneklerinin, kontrol grubuna göre daha düşük absorbens değerine sahip olduğu görülmektedir. UV

uygulanmasıyla, serbest amin grubu konsantrasyonunun azalması çapraz bağlama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, çapraz bağlama işleminin etkinliğinin belirlenmesinde ninhidrin deneyinin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir (Yuan vd., 2007; Yan vd., 2010; Zhang vd., 2014). Proje önerisinde çapraz bağlama derecesinin belirlenmesiyle ilgili bir başarı ölçütü belirlenmemiştir. Ancak çapraz bağlama derecesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanabilmektedir:

$$\text{Çapraz bağlama derecesi (\%)} = \left(\frac{\text{Serbest amino gruplarının miktarı}_{\text{kontrol}} - \text{Serbest amino gruplarının miktarı}_{\text{çapraz bağlanmış}}}{\text{Serbest amino gruplarının miktarı}_{\text{kontrol}}} \right) \times 100$$

Serbest amino gruplarının miktarının belirlenmesinde kullanılan standart eğri glisin çözeltisi kullanılarak çizilmiş ve Ek-4te verilmiştir. Nanoliflerin çapraz bağlama derecesi %81,93 olarak belirlenmiştir.

UV uygulanmamış ve 30 dk UV uygulanmış nanoliflerin SEM görüntüleri Şekil 4.21'de verilmiştir. Çapraz bağlama işleminin (Şekil 4.14) liflerin morfolojisinde olumsuz bir değişim yaratmadığı görülmektedir.



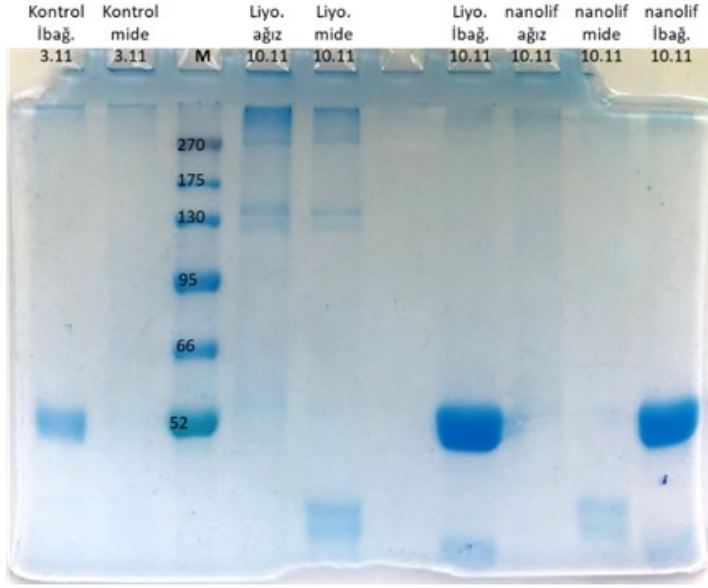
Şekil 4.21. UV uygulanmamış ve 30 dk UV uygulanmış nanoliflerin SEM görüntüleri

Protein içeriği, Dumas yöntemi ile protein analiz cihazı (FP 528 LECO, ABD) kullanılarak $86,93 \pm 0,67$ olarak belirlenmiştir. Nanolif veriminin düşük (7 mL çözeltiden ~63 mg nanolif eldesi) olmasından dolayı bileşim analizlerinden sadece protein analizi gerçekleştirilebilmiştir. Nanolifi oluşturan kolajen ve kondroitin sülfat moleküllerinin ön işlemler, ekstraksiyon ve saflaştırma aşamalarından sonra saflığı yüksek şekilde elde edildiği analizlerle gösterilmiştir. Dolayısıyla nanolif örneğinin yağ ve kül içeriğinin eser miktarda ($<1\%$) olduğu varsayılabilir. L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde yapılan hücre kültürü çalışmaları sonucu 30 dk UV uygulaması yapılarak çapraz bağlanan nanoliflerin sitotoksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır. Analizle ilgili detaylı rapor EK-sitotoksiste raporu olarak sunulmuştur.

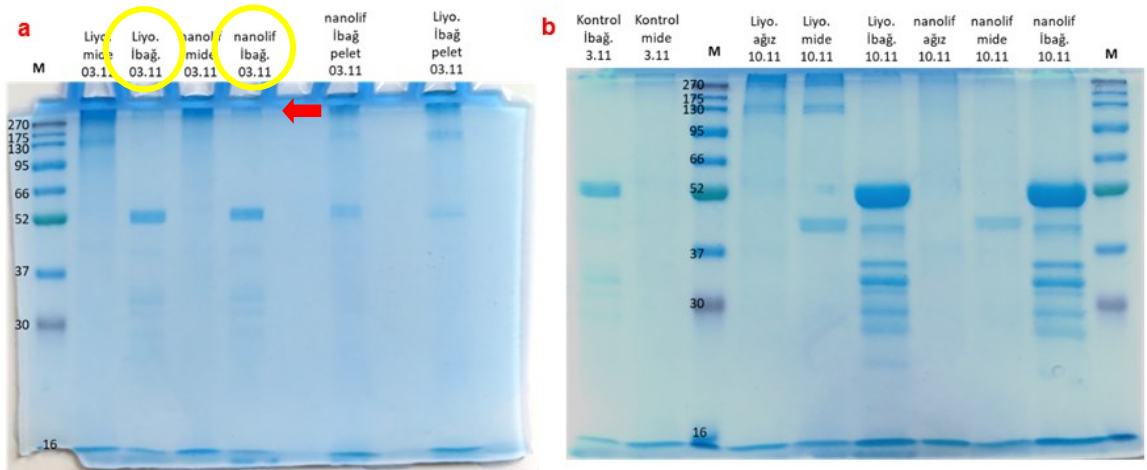
4.4. Fonksiyonel Gıda Üretimi

Bu bölümde hazırlanan granola barların in vitro sindirim sonuçları tartışılmıştır. Depolama boyunca yapılan analizlerin sonuçları değerlendirilmiştir.

İn vitro sindirim deneyi sırasında sindirim ortamlarından alınan üst fazların SDS-PAGE analiz sonuçları Şekil 4.22 ve Şekil 4.23’de verilmiştir.



Şekil 4.22 %10'luk jel sonuçları



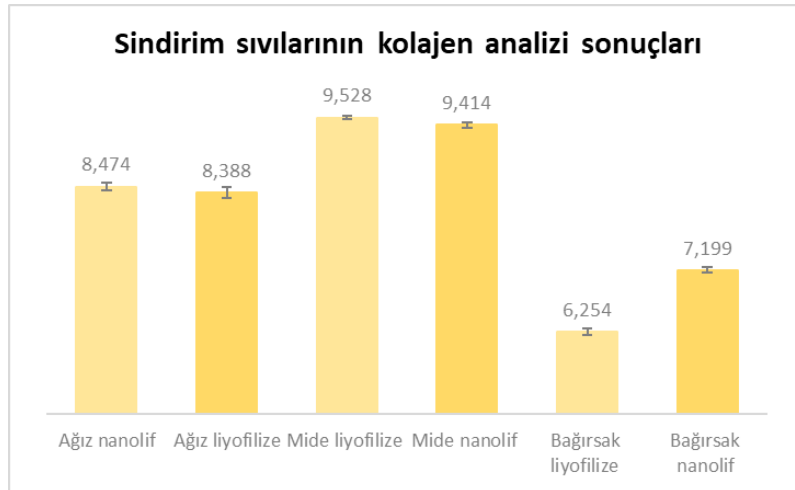
Şekil 4.23 %12'lik jel sonuçları

Kontrol örneklerinde (boş barlarda) beklenildiği üzere kolajenin karakteristik bantları ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β ve γ) gözlenmemiştir (Şekil 4.22). 03.11 kodlu örneklerin %12'lik jeline bakıldığında (Şekil 4.23-a) ise, ince bağırsak sonrası alınan örneklerde (sindirilebilen üst faz) nanolif içeren granola bardaki kolajen bandı yoğunluğunun liyofilize ürün içeren granola bara göre

nispeten daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuç ile nanolif içeren bar örneklerinde kolajenin biyoerişilebilirliğinin daha fazla olduğu söylenebilir. Sindirim sıvılarının karşılaştırmalı kolajen analizi sonuçları Tablo 4.7 ve Şekil 4.24'de verilmiştir. Ağız ortamındaki kolajen miktarlarının mide ortamındaki kolajen miktarlarından daha az bulunmasının sebebi, kolajenin ağız ortamında sindiriminin tam olarak başlamamasıdır. Dolayısıyla ağız sindirimi sonrası alınan üst fazda kolajen miktarının az olması beklenen bir durumdur. Jel görüntüleri ve kolajen analizi sonuçlarının uyumlu olduğu görülmektedir. Nanolif içeren barların bağırsaktaki kolajenin miktarı, liyofilize ürün içeren barlara göre daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 4.7 Sindirim sıvılarının kolajen analizi sonuçları

Sindirim ortamı	Ort. absorbans	Kolajen miktar (ug)
Ağız nanolif	0,520	8,474±0,06
Ağız liyofilize	0,515	8,388±0,08
Mide liyofilize	0,585	9,528±0,03
Mide nanolif	0,578	9,414±0,04
Bağırsak liyofilize	0,384	6,254±0,05
Bağırsak nanolif	0,442	7,199±0,04



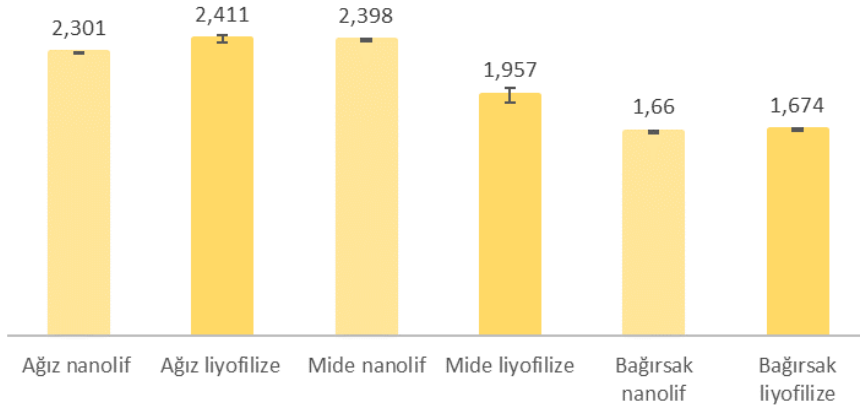
Şekil 4.24. Sindirim sıvılarının kolajen analizi sonuçları

Tablo 4.8 ve Şekil 4.25'de sindirim sıvılarının karşılaştırmalı GAG analizi sonuçları verilmiştir. Nanolif içeren barların mide ortamındaki kondroitin miktarı, liyofilize ürün içeren barlara göre yüksek bulunsun da bağırsak ortamındaki kondroitin sülfat miktarları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Tablo 4.8. Sindirim sıvılarının GAG analizi sonuçları

Sindirim ortamı	Absorbans	CS miktar (ug)
ağız nanolif	0,3355	2,301±0,004
ağız liyofilize	0,3515	2,411±0,03
Mide nanolif	0,3496	2,398±0,01
Mide liyofilize	0,2853	1,957±0,06
Bağırsak nanolif	0,242	1,660±0,01
Bağırsak liyofilize	0,244	1,674±0,01

Sindirim sıvılarının GAG analizi sonuçları



Şekil 4.25. Sindirim sıvılarının GAG analizi sonuçları

SDS-PAGE ve kolajen-kondroitin sülfat analizleri birlikte değerlendirildiğinde, nanolif içeren barların bağırsaktaki biyoerişilebilirliği liyofilize içeren barlara göre yüksek bulunmuştur. Projemizin başarı ölçütlerinde, KGN'lerin bağırsakta biyoerişilebilirliğinin kolajen için en az %70, kondroitin sülfat için %20 olması hedeflenmiştir. Tablo 4.7'de ağız ortamındaki kolajen miktarı 8,474 µg olarak saptanırken, bağırsakta bu oran 7,199 µg olarak saptanmıştır. Biyoerişilebilirlik oranı aşağıda verildiği şekilde hesaplanmıştır:

Biyoerişilebilirlik oranı (BO): (ağız sindirim ortamındaki µg miktar)* % BO = bağırsak sindirim ortamındaki µg miktar

Nanolif içeren barlarda, kolajen için biyoerişilebilirlik oranı **%85** olarak belirlenirken, CS için biyoerişilebilirlik oranı %72 olarak belirlenmiştir. Liyofilize içeren barlarda ise bu oran kolajen için **%75**, CS için %69 olarak belirlenmiştir. Nanolif içeren barların BO değerleri, liyofiize ürün içeren barlara göre daha yüksek bulunmuştur. Nanoliflerin ağırlıkça %95'ini kolajen moleküllerinin oluşturduğu göz önüne alındığında, CS biyoerişilebilirliği açısından

örnekler arasında anlamlı bir fark gözlenmese de kolajen molekülünün biyoerişilebilirliği açısından anlamlı bir farklılık gözlenmiştir.

Saadat vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, nar kabuğu ekstresinin enkapsülasyonu için elektro-eğirme işlemi uygulanmıştır. %20 (w/v) konsantrasyonda jelatin çözeltisi farklı konsantrasyonlarda nar kabuğu ekstratlarıyla karıştırılmış ve ardından elektro-eğirme işlemine tabi tutulmuştur. Mide ve bağırsak sindirimi sonunda kapsüllenmiş nanoliflerin toplam polifenol miktarı ve antioksidan aktivitesinin kapsüllenmemiş kontrol örneğine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Çalışma sonucunda, elektro-eğirme yöntemiyle kapsülleme işleminin, nar kabuğu ekstresindeki biyoaktif bileşiklerin biyoyararlanımını iyileştirebileceği gösterilmiştir. Kateşinin elektro-eğirme işlemiyle nanoliflere kapsüllenmesiyle ilgili yapılan bir çalışmada, toplam kateşinin yaklaşık %50 ve <%70'inin sırasıyla simüle edilmiş mide ve bağırsak sıvılarında salındığı bildirilmiştir. Kateşin içeren elektro-eğrilmiş nanoliflerin, gıdalarda veya ilaç sektöründe uygulanan hassas biyoaktif bileşiklerin oksidasyonunu önlemek için kullanılabileceği bildirilmiştir (Hoseyni vd., 2021). Fonseca vd. (2022), karvakrol için dağıtım taşıyıcıları olarak nişasta nanolifleri üretmiş ve bunun in vitro sindirim simülasyonunun değerlendirilmiştir. Nanolifler, karvakrolün çeşitli konsantrasyonlarda dahil edildiği bir nişasta çözeltisinin elektro-eğirilmesiyle üretilmiştir. Nişasta nanoliflerinin in vitro sindirime direnerek karvakrolü test edilen pH ve enzimatik koşullar altında salınmaktan koruduğu görülmüştür. Nişasta nanoliflerinin, nanometrik ölçeği ve yüksek yüzey-hacim alanı nedeniyle karvakrol koruması için umut verici bir matris olduğu bildirilmiştir. İn vitro sindirim sonuçlarımızın, literatürdeki farklı çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmektedir. Elektro-eğirme işlemiyle büyük kolajen molekülleri, nano boyuta getirilmiş ve kolay sindirilebilir bir yapı kazanmıştır. KGN eklenmiş barların, liyofilize ürün içeren barlara göre, biyoerişilebilirliğinin daha fazla olduğu, hedeflendiği şekilde gösterilmiştir.

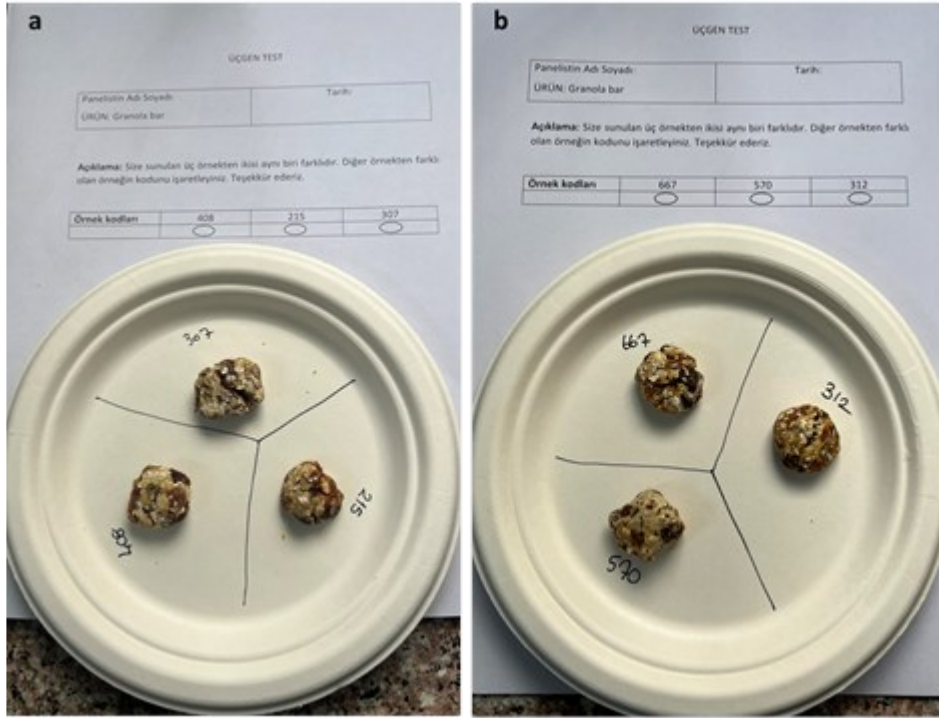
Nanolif içeren granola barların bileşim analizi sonuçları Tablo 4.9'da verilmiştir. Karbonhidrat içeriği; protein, nem, yağ ve kül miktarlarının toplamının yüzden çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. Proje kapsamında hazırlanan granola barların nem içeriği: %21.41, protein içeriği: %6.31, yağ içeriği: %1.05, kül içeriği: %1.69 ve karbonhidrat içeriği: %69.54 olarak bulunmuştur. Literatürde çeşitli formülasyonda hazırlanan barlara göre; protein içeriklerinin %5-%9 arası; yağ içeriklerinin %5-%17; kül içerikleri %1-%2; nem içeriklerinin ise %11-%27 aralığında değiştiği görülmektedir (Aigster vd., 2011; Chitkara vd., 2017; Omran, 2018; Moreira-Araújo vd., 2021). Sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur. Protein içeriği yüksek fonksiyonel bir ürün geliştirilmesi hedefine başarıyla ulaşılmıştır.

Tablo 4.9. KGN içeren granola barın bileşim analizi sonuçları

Bileşim Analizi Sonuçları Bar (% ağırlıkça)
--

% 21,41 ± 0,128 nem
% 6,31 ± 0,29 protein
% 1,05 ± 0,32 yağ
% 1,69 ± 0,106 kül
% 69,54 karbonhidrat

Hazırlanan granola barlar arasında tespit edilebilir bir fark olup olmadığının belirlenmesi için üçgen test ASTM E1885-04 yöntemi kullanılmıştır. Duyusal analiz toplam 24 panelist ile 2 gruba ayrılarak gerçekleştirilmiştir. İlk gruba 2 adet nanolif içeren bar ve 1 adet boş bar (nanolif içermeyen) sunulmuş ve farklı olan örneği seçmeleri istenmiştir. Şekil 4.26-a. İkinci gruba ise, 2 adet boş bar ve 1 adet nanolif içeren bar sunularak (Şekil 4.26-b) farklı olan örneği seçmeleri istenmiştir.



Şekil 4.26. Hazırlanan granola barlarla gerçekleştirilen üçgen test formu

Ek-2 $\alpha=0,05$ güven aralığında verilmiş olan çizelgede doğru cevap sayıları incelendiğinde, minimum 8 tane doğru cevap bulunması durumunda farklılık algılanmış olarak kabul edilmektedir. Bu durumda her iki bar için de doğru cevap sayısı 8'in altında kaldığından bu testler başarılı sayılmaktadır (Tablo 4.10). Boş bar ile nanolifli bar örnekleri arasındaki fark algılanmamıştır. Ağustos-Ocak ayları boyunca depolanan granola barların pH, aw, renk değerleri ve toplam canlı sayımı sonuçları Tablo 4.11'de özetlenmiştir.

Tablo 4.10. Üçgen test sonuçları

	Nanolifli Bar	Boş Bar
Doğru cevap	1	3
Yanlış cevap	11	9
Toplam	12	12

Tablo 4.11. Depolama çalışmaları özet tablo

Depolama tarihi	pH	a_w	KOB/g	log KOB/g	Renk değerleri
0. ay- Ağustos	4,249± 0,031	0,698±0,003	3,8 x 10 ² ± 0,70	2,575± 0,08	L* : 56,983±4,82 a* : 8,959±2,23 b* : 28,289±4,22
1. ay- Eylül	4,176± 0,010	0,6155±0,003	1,3 x 10 ² ± 0,56	2,113± 0,06	L* : 43,806±7,54 a* : 5,420±1,69 b* : 12,689±5,77
2. ay- Ekim	4,1937± 0,024	0,6153±0,007	1,1 x 10 ² ± 0,17	2,06± 0,03	L* : 50,976±8,20 a* : 7,755±3,34 b* : 25,641± 6,53
3. ay- Kasım	4,1230± 0,019	0,6590±0,001	5,3 x 10 ² ± 0,46	2,724± 0,05	L* : 43,760±11,59 a* : 7,571±1,73 b* : 19,965± 7,19
4. ay-Aralık	4,1350±0,007	0,6460 ±0,003	6,8 x 10 ² ± 0,33	2,832± 0,04	L* : 42,657±12,52 a* : 7,769±1,80 b* : 20,744± 8,97
5. ay-Ocak	4,3033±0,015	0,6038±0,002	7,3 x 10 ² ± 0,58	2,863± 0,06	L* : 41,035± 8,97 a* : 8,71±2,06 b* : 21,27±6,97

Granola barların renk analizi sonuçlarına bakıldığında, depolama sırasında L* ve b* değerlerinin 0. Ay kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş gösterdiği (sırasıyla 56,983'den 41,035'e ve 28,289'dan 21,27'ye; P<0,05); a* değerlerinin ise anlamlı bir değişim göstermediği görülmüştür (P>0.05). Bu sonuçlar, barların zamanla daha koyu ve daha az sarı hale geldiğini göstermektedir. L* değerlerindeki azalma, Maillard reaksiyonlarının başlamasından kaynaklı üründe kararmalar meydana gelmesi ile açıklanabilir (Lobato vd., 2012). Örneklerin pH değerlerinin 4.0-4.3 aralığında, a_w değerlerinin ise 0.60-0.70 aralığında değiştiği görülmektedir. Depolama sırasında a_w değerlerinde küçük artış ve azalışlar gözlenmiştir. Bu varyasyonların, iklimlendirme kabinindeki kontrol edilemeyen nem değişimlerinden ve granola barların heterojen, çok bileşenli yapısının getirdiği homojenlik probleminden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, tahıl barlarının genellikle 0,65'ten düşük bir a_w değerlerine sahip olacak şekilde formüle edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Lobato vd., 2012; Muniz vd., 2020). Sonuçların uyumlu olduğu görülmektedir.

Toplam canlı sayımı sonuçları, koloni oluşturan bakteri sayısı (KOB)/g ve log KOB/g olarak verilmiştir. 6 aylık depolama süresince barların log KOB/g değerleri arasında önemli

bir değışiklik gözlenmemiştir ($P>0.05$). Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğinde 1.6.4 başlığı altında “Tahıl ürünleri, insan tüketimine sunulan tahıl bazlı ürünler vb.” için mikrobiyolojik kriterler verilmiştir. Bu kapsamda koliform bakteriler için 102-103, maya ve küf için 103-104 KOB/g değerleri kabul edilebilir değerler olarak yer almaktadır. Depolama boyunca granola barların toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı <103 KOB/g olarak tespit edilmiş olup, mikrobiyolojik kriterlere uygun bulunmuştur. Benzer sonuçlar, hidrolize kolajen içeren tahıl barlarla yapılan bir çalışmada bildirilmiştir. Çalışmada, 6 aylık depolama sonucu test edilen örnekler için toplam mezofilik aerobik mikroorganizma sayısı <103 KOB/g olarak bildirilmiştir (Benjakul vd., 2019).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu proje kapsamında, elde edilen sonuç ve öneriler aşağıda maddeler halinde sunulmuştur:

- ✓ Kuzu ayaklarından yüksek saflıkta kolajen (kolajen içeriği %87) eldesi gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Kuzu tendonlarından kondroitin sülfat (CS içeriği %88) başarıyla saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.
- ✓ Çalışmamızda, materyal olarak kullanılan hayvansal yan ürünler değerlendirilerek katma değerli ürünlere dönüştürülmüş ve sürdürülebilir çevreye katkı sağlanmıştır.
- ✓ Boncuklu yapıların gözlenmediği '100-260 nm aralığında çapa sahip homojen yapıda nanolif eldesi' hedefine yönelik çalışmalar başarıyla tamamlanmıştır.
- ✓ Çalışmamız, kolajen içinde GAG nanoliflerinin endüstriyel seviyede üretimi ile ilgili yapılacak yeni çalışmalara örnek olacak bir nitelik taşımaktadır.
- ✓ İdeal koşulda üretilen KGN'lerin çapraz bağlama işlemi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlama işleminin etkin bir şekilde yapılması, nanoliflerin yapısının korunmasına doğrudan katkı sağlamaktadır. Bununla beraber, 30 dk UV uygulanmış nanoliflerin sitotoksik bir etki göstermemesi, nanolif eklenerek hazırlanan granola barların tüketimine dair soru işaretlerini gidermiştir.
- ✓ Çapraz bağlanmış KGN'lerin granola barlara eklenmesi ve depolama analizlerini kapsayan İP-9 çalışmaları başarıyla tamamlanmıştır. İn vitro sindirim deneyleri sonucunda, nanolif içeren barların sindirilebilirliği ve biyoerişilebilirliği özellikle kolajen açısından kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.
- ✓ Bu çalışmayla birlikte, kolajen-GAG temelli nanolifler ilk kez bir gıda matriksi içinde kullanılmış ve mikrobiyolojik açıdan güvenilir, kabul edilebilir duyuşal özelliklere sahip fonksiyonel bir ürün geliştirilmiştir. Geliştirdiğimiz bu fonksiyonel ürünün, özellikle eklem sağlığı alanında yapılacak çalışmalarda etki yaratması öngörülmektedir. Bununla birlikte, çalışmamız, nanoliflerin gıda sektöründe kullanımına yönelik Ar-Ge çalışmalarına da katkı sağlayacaktır.
- ✓ Kolajen ve kondroitin sülfat bileşenlerinin gıda matriksindeki sindirim davranışlarının detaylı şekilde incelenmesi ile birlikte literatüre yenilikçi bir çalışma kazandırılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Aigster, A., Duncan, S. E., Conforti, F. D., & Barbeau, W. E. (2011). Physicochemical properties and sensory attributes of resistant starch-supplemented granola bars and cereals. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 2159-2165.
2. Akgün, I., Öğüt, T. 2002. “ Oral Glukozamin ve Kondroitin Sülfatın Osteoartrit Tedavisindeki Yeri”, *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği*, 1(2), 66-70.
3. Ali, A. M. M., Kishimura, H., & Benjakul, S. (2018). Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus Jullieni*) as affected by ultrasonication. *Process Biochemistry*, 66(December 2017), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.003>
4. Almarza, A., & Athanasiou, K. (2004). Design characteristics for the tissue engineering of cartilaginous tissues. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(1), 2–17.
5. Arumugam, G. K. S., Sharma, D., Balakrishnan, R. M., Ettiyappan, J. B. P. 2018. “Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin”, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 9, 19-26.
6. Banner, J., Dautzenberg, M., Feldhans, T., Hofmann, J., Plümer, P., Ehrmann, A. 2018. “Water Resistance and Morphology of Electrospun Gelatine Blended with Citric Acid and Coconut Oil”, *Tekstilec*, 61(2), 129-135.
7. Benjakul, S., Pisuchpen, S., O'Brien, N., & Karnjanapratum, S. (2018). Effect of antioxidants and packing conditions on storage stability of cereal bar fortified with hydrolyzed collagen from seabass skin. *Italian Journal of Food Science*, 31(2), 347-366.
8. Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances*, 28(3), 325-347.
9. Bhat, R., Karim, A. A. 2014. “Towards producing novel fish gelatin films by combination treatments of ultraviolet radiation and sugars (ribose and lactose) as cross-linking agents”, *Journal of food science and technology*, 51(7), 1326-1333.
10. Bock, N., Dargaville, T. R., & Woodruff, M. A. (2012). Electrospinning of polymers with therapeutic molecules: state of the art. *Progress in polymer science*, 37(11), 1510-1551.
11. Brodtkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food

- digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.
12. Buttafoco, L., Kolkman, N. G., Engbers-Buijtenhuijs, P., Poot, A. A., Dijkstra, P. J., Vermes, I., & Feijen, J. (2006). Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 27(5), 724-734
 13. Bürck, J., Aras, O., Bertinetti, L., İlhan, C. A., Ermeýdan, M. A., Schneider, R., ... & Kazancı, M. (2018). Observation of triple helix motif on electrospun collagen nanofibers and its effect on the physical and structural properties. *Journal of Molecular Structure*, 1151, 73-80.
 14. Cao, N., Fu, Y., He, J. 2007. "Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid", *Food Hydrocolloids*, 21(4), 575-584.
 15. Chambi, H., Grosso, C. 2006. "Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase", *Food research international*, 39(4), 458-466.
 16. Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R. and Hong, B., 2016, Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*), *LWT-Food Science and Technology*, 66, 453-459.
 17. Chitkara, M. A. N. S. I., Kohli, R. A. J. N. I. T., Sandhu, I. S., Singh, D. I. D. A. R., & Sindhu, R. K. (2017). Development and nutritional, organoleptic, biochemical analysis of polyherbal (stevia, banana, cocoa butter, oats) energy bar. *Journal of Advances in Food Science & Technology*, 4(2), 62-66.
 18. Davidenko, N., Bax, D. V., Schuster, C. F., Farndale, R. W., Hamaia, S. W., Best, S. M., & Cameron, R. E. (2016). Optimisation of UV irradiation as a binding site conserving method for crosslinking collagen-based scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(1), 1-17.
 19. Demir, M. M., Yilgor, I., Yilgor, E. E. A., & Erman, B. (2002). Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer*, 43(11), 3303-3309.
 20. DROBOTĂ, M., BARBĂLATĂ-MÂNDRU, M., GRĂDINARU, L. M., & Alexa, I. (2021). EFFECT OF UV IRRADIATION ON SURFACE OF COLLAGEN FILM. *Rev. Roum. Chim*, 66(1), 81-85.
 21. Fathi, M., Martín, Á., McClements, D. J. 2014. "Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems", *Trends in Food Science & Technology*, 39(1), 18–39.
 22. Ferraro, V., Martinie, B.G., Sayd, T., Chambon, C., Anton, M., Lhoutellier, V.S. 2017. "Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential", *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 55–66.

23. Fonseca, L. M., Bona, N. P., Crizel, R. L., Pedra, N. S., Stefanello, F. M., Lim, L. T., ... & Zavareze, E. D. R. (2022). Electrospun Starch Nanofibers as a Delivery Carrier for Carvacrol as Anti-Glioma Agent. *Starch-Stärke*, 74(1-2), 2100115.
24. Formhals, A. Process and apparatus for preparing artificial threads. US Patent 1975504. 1934.
25. Frantz, C., Stewart, K. M. and Weaver, V. M., 2010, The extracellular matrix at a glance, *Journal of Cell Science*, 123(24): 4195-4200.
26. Gao, L. L., Wang, Z. Y., Li, Z., Zhang, C. X. and Zhang, D. Q., 2017, The characterization of acid and pepsin soluble collagen from ovine bones (Ujumuin sheep), *Journal of Integrative Agriculture*, 17(3): 704-711.
27. Ghorani, B., & Tucker, N. (2015). Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids*, 51, 227-240.
28. Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., Montero, M. P. 2011. "Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review", *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827.
29. Hashim, P., Ridzwan, M. M. and Bakar, J., 2014, Isolation and characterization of collagen from chicken feet, *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*, 8(3): 250-254.
30. Hofman, K., Tucker, N., Stanger, J., Staiger, M., Marshall, S., Hall, B. 2012. "Effects of the molecular format of collagen on characteristics of electrospun fibres", *Journal of Materials Science*, 47(3), 1148-1155.
31. Hoseyni, S. Z., Jafari, S. M., Tabarestani, H. S., Ghorbani, M., Assadpour, E., & Sabaghi, M. (2021). Release of catechin from Azivash gum-polyvinyl alcohol electrospun nanofibers in simulated food and digestion media. *Food Hydrocolloids*, 112, 106366.
32. Huang, C. H., Chi, C. Y., Chen, Y. S., Chen, K. Y., Chen, P. L., Yao, C. H. 2012. "Evaluation of proanthocyanidin-crosslinked electrospun gelatin nanofibers for drug delivering system", *Materials Science and Engineering: C*, 32(8), 2476-2483.
33. Jabeen, S., Javed, F., Hettiarachchy, N. S., Sahar, A., Sameen, A., Khan, M. R., ... & Aadil, R. M. (2022). Development of energy-rich protein bars and in vitro determination of angiotensin I-converting enzyme inhibitory antihypertensive activities. *Food Science & Nutrition*, 10(4), 1239-1247.
34. Jaworek, A., & Sobczyk, A. T. (2008). Electro spraying route to nanotechnology: an overview. *Journal of Electrostatics*, 66(3-4), 197-219.
35. Jeevithan, E., Jingyi, Z., Wang, N., He, L., Bao, B. And Wu, W., 2015, Physico-chemical, antioxidant and intestinal absorption properties of whale shark type-II

- collagen based on its solubility with acid and pepsin. *Process Biochemistry*, 50(3), 463-472.
36. Jeong, L., Park, W. 2014. "Preparation and characterization of gelatin nanofibers containing silver nanoparticles", *International journal of molecular sciences*, 15(4), 6857-6879.
 37. Katti, D. S., Robinson, K. W., Ko, F. K., & Laurencin, C. T. (2004). Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 70(2), 286-296.
 38. Kitayama, K., Hayashida, Y., Nishida, K., Akama, T. O. 2007. "Enzymes responsible for synthesis of corneal keratan sulfate glycosaminoglycans", *Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 30085-30096.
 39. Krishnamoorthi, J., Ramasamy, P., Shanmugam, V. And Shanmugam, A., 2017, Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831) from Puducherry coast. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 39-45.
 40. Kuraishi, C., Yamazaki, K., Susa, Y. 2001. "Transglutaminase: its utilization in the food industry", *Food Reviews International*, 17(2), 221-246.
 41. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
 42. Lafarga, T., Hayes, M. 2014. "Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients", *Meat Science*, 98(2), 227-239.
 43. Law, J. X., Liao, L. L., Saim, A., Yang, Y., & Idrus, R. (2017). Electrospun collagen nanofibers and their applications in skin tissue engineering. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 14(6), 699-718.
 44. Le Vien, N. T., Nguyen, P. B., Cuong, L. D., An, T. T. T. and Dao, D. T. A. (2017, September). Optimization of papain hydrolysis conditions for release of glycosaminoglycans from the chicken keel cartilage. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1878, No. 1, p. 020009). AIP Publishing LLC.
 45. Lee, D. H., Oh, J. H., Chung, J. H. 2016. "Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging", *Journal of Dermatological Science*, 83(3), 174-181.

46. Leidy, R., Ximena, Q. C. M. 2019. "Use of electrospinning technique to produce nanofibres for food industries: A perspective from regulations to characterisations", *Trends in Food Science & Technology*, 85, 92-106.
47. Li, P. and Wu, G., 2018, Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth, *Amino Acids*, 50(1): 29-38.
48. Lim, L. T., Mendes, A. C., & Chronakis, I. S. (2019). Electrospinning and electrospraying technologies for food applications. *Advances in food and nutrition research*, 88, 167-234.
49. Lin, Y., Yao, Y., Yang, X., Wei, N., Li, X., Gong, P., ... & Wu, D. (2008). Preparation of poly (ether sulfone) nanofibers by gas-jet/electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(2), 909-917.
50. Lobato, L. P., Iakmiu Camargo Pereira, A. E., Lazaretti, M. M., Barbosa, D. S., Carreira, C. M., Mandarino, J. M. G., & Grossmann, M. V. E. (2012). Snack bars with high soy protein and isoflavone content for use in diets to control dyslipidaemia. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(1), 49-58.
51. López-Rubio, A., & Lagaron, J. M. (2012). Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 200-206.
52. Martel-Pelletier, J., Farran, A., Montell, E., Vergés, J., & Pelletier, J. P., 2015, Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate. *Molecules*, 20(3), 4277-4289.
53. Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... & Dufour, C. 2014. "A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus", *Food & function*, 5(6), 1113-1124.
54. Moreira-Araújo, R. S. D. R., Sousa, I. G. M. D., Cavalcante, R. B. M., Morgano, M. A., & Araújo, M. A. D. M. (2021). Cereal bar enriched with cowpea bean whole flour, cashew nut, and raisin banana. *Revista Ciência Agronômica*, 52.
55. Moskowitz, R. W. 2000. "Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease", *Seminars in arthritis and rheumatism*, 30(2), 87-99.
56. Muniz, C. E. S., Santiago, Â. M., Gusmão, T. A. S., Oliveira, H. M. L., de Sousa Conrado, L., & de Gusmão, R. P. (2020). Solid-state fermentation for single-cell protein enrichment of guava and cashew by-products and inclusion on cereal bars. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101576.
57. 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

58. Nakano, T., Betti, M., & Pietrasik, Z. (2010). Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2(1), 61-74.y, 11, S61-S67.
59. Nakano, T., Pietrasik, Z., Ozimek, L. and Betti, M., 2012, Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate from broiler chicken biomass. *Process Biochemistry*, 47(12), 1909-1918.
60. Neo, Y. P., Swift, S., Ray, S., Gizdavic-Nikolaidis, M., Jin, J., & Perera, C. O. (2013). Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospunfibre mats as novel active packaging materials. *Food Chemistry*, 141(3), 3192–3200.
61. Nieuwland, M., Geerdink, P., Brier, P., Van Den Eijnden, P., Henket, J. T., Langelaan, M. L., ... & Martin, A. H. 2013. "Food-grade electrospinning of proteins", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 269-275.
62. Nogueira, A. V., Rossi, G. R., Iacomini, M., Sasaki, G. L., Trindade, E. S., & Cipriani, T. R. (2019). Viscera of fishes as raw material for extraction of glycosaminoglycans of pharmacological interest. *International journal of biological macromolecules*, 121, 239-248.
63. Noorzai, S., Verbeek, C. J. R., Lay, M. C. and Swan, J., 2019, Collagen extraction from various waste bovine hide sources. *Waste and Biomass Valorization*, 1-12
64. Omran, A. A. (2018). Enhancing the nutritional value of oat bars. *American Journal of Food Science and Technology*, 6(4), 151-160.
65. Ouattara, B., Canh, L. T., Vachon, C., Mateescu, M. A., Lacroix, M. 2002. "Use of γ -irradiation cross-linking to improve the water vapor permeability and the chemical stability of milk protein films", *Radiation Physics and Chemistry*, 63(3-6), 821-825.
66. Papakonstantinou, E., Roth, M., Karakiulakis, G. 2012. "Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging", *Dermato-Endocrinology*, 4(3), 253-258.
67. Pezeshki-Modaress, M., Mirzadeh, H., & Zandi, M. (2015). Gelatin–GAG electrospun nanofibrous scaffold for skin tissue engineering: fabrication and modeling of process parameters. *Materials Science and Engineering: C*, 48, 704-712.
68. Raghuraman, H., 2013. "Extraction of Sulfated Glycosaminoglycans from Mackerel and Herring Fish Waste", MSc Thesis, Dalhousie University, 156.
69. Ran, X. G. and Wang, L. Y., 2014, Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by- products, *Journal of the Science Food and Agriculture*, 94(3): 585-590.
70. Rani, A., Baruah, R. and Goyal, A., 2017, Physicochemical, antioxidant and biocompatible properties of chondroitin sulphate isolated from chicken keel bone for potential biomedical applications, *Carbohydrate polymers*, 159: 11-19.

71. Riaz, T., Zeeshan, R., Zarif, F., Ilyas, K., Muhammad, N., Safi, S. Z.,... and Rehman, I. U., 2018, FTIR analysis of natural and synthetic collagen, *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(9): 703-746.
72. Rutledge, G. C., & Fridrikh, S. V. (2007). Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1384–1391.
73. Rutledge, G. C., Li, Y., Fridrikh, S., Warner, S. B., Kalayci, V. E., & Patra, P. (2001). Electrostatic spinning and properties of ultrafine fibers. *National Textile Center Annual Report*: Nov, 2001, M01-D22.
74. Saadat, S., Emam-Djomeh, Z., & Askari, G. (2021). Antibacterial and antioxidant gelatin nanofiber scaffold containing ethanol extract of pomegranate peel: Design, characterization and in vitro assay. *Food and Bioprocess Technology*, 14(5), 935-944.
75. Schaefer, L. and Schaefer, R. M., 2010, Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules, *Cell and Tissue Research*, 339(1): 237-246
76. 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 Research Journal*, 23(3), 913-922.
77. Shahbazi, M., Ahmadi, S. J., Seif, A., Rajabzadeh, G. 2016. "Carboxymethyl cellulose film modification through surface photo-crosslinking and chemical crosslinking for food packaging applications", *Food Hydrocolloids*, 61, 378-389.
78. Shoulders, M. D. and Raines, R. T., 2009, Collagen structure and stability, *Annual review of Biochemistry*, 78: 929-958.
79. Silva, T. F., Penna, A. L. B. 2012. "Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais", *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 71(3), 530-539.
80. Sizeland, K. H., Hofman, K. A., Hallett, I. C., Martin, D. E., Potgieter, J., Kirby, N. M., Hawley, A., Mudie, S. T., Ryan, T. M., Haverkamp, R. G., Cumming, M. H. 2018. "Nanostructure of electrospun collagen: Do electrospun collagen fibers form native structures?", *Materialia*, 3, 90-96.
81. Song, H., Li, B. 2017. "Beneficial Effects of Collagen Hydrolysate: A Review on Recent Developments", *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 1(2), 1-4.
82. Sundaresan, G., Abraham, R. J., Appa Rao, V., Narendra Babu, R., Govind, V., & Meti, M. F. (2018). Established method of chondroitin sulphate extraction from buffalo (*Bubalus bubalis*) cartilages and its identification by FTIR. *Journal of food science and technology*, 55(9), 3439-3445.
83. Tan, Y., & Chang, S. K., 2018, Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Food chemistry*, 242, 147-155.

84. Teo, W. E., & Ramakrishna, S. (2006). A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*, 17(14), R89.
85. Torres-Giner, S., Gimeno-Alcaniz, J. V., Ocio, M. J., & Lagaron, J. M. (2009). Comparative performance of electrospun collagen nanofibers cross-linked by means of different methods. *ACS applied materials & interfaces*, 1(1), 218-223.
86. Trowbridge, J. M., Gallo, R. L. 2002. "Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan", *Glycobiology*, 12(9), 117R-125R.
87. Uslu, M. Ö., Eltas, Ş. D. 2015. " PERİODONTAL HASTALIKLARDA MMP-8'İN ROLÜ", *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, Ek 12, 80-85.
88. Üçgül, İ., Aras, S., Elibüyük, U. 2018. "EKSTRASELÜLER MATRİS YAPISI VE GÖREVLERİ", *Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering*, 23(1), 295-310.
89. Veleirinho, B., & Lopes-da-Silva, J. A. (2009). Application of electrospun poly (ethylene terephthalate) nanofiber mat to apple juice clarification. *Process Biochemistry*, 44(3), 353-356.
90. Volpi, N., Galeotti, F., Maccari, F., Capitani, F., & Mantovani, V., 2021, Structural definition of terrestrial chondroitin sulfate of various origin and repeatability of the production process. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 195, 113826.
91. Wang, J., Zhang, L., & Jin, Z. (2016). Separation and purification of low-molecular-weight chondroitin sulfates and their anti-oxidant properties. *Bangladesh Journal of Pharmacolog* .
92. Wardrop, D., Keeling, D. 2008. "The story of the discovery of heparin and warfarin", *British Journal of Haematology*, 141(6), 757–763.
93. Widyaningsih, T. D., Rukmi, W. D., Sofia, E., Wijayanti, S. D., Wijayanti, N., Ersalia, R., Rochmawati, N., Nangin, D. 2016. "Extraction of Glycosaminoglycans Containing Glucosamine and Chondroitin Sulfate from Chicken Claw Cartilage", *Research Journal of Life Science*, 3(3), 181-189.
94. Włodarczyk, M. G., Kubisz, L. and Włodarczyk, D., 2017, Amino acid composition in determination of collagen origin and assessment of physical factors effects, *International Journal of Biological Macromolecules*, 104: 987-991.
95. Wongsasulak, S., Patapeejumruswong, M., Weiss, J., Supaphol, P., Yoovidhya, T. 2010. "Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends", *Journal of Food Engineering*, 98(3), 370-376.
96. Yan, L. P., Wang, Y. J., Ren, L., Wu, G., Caridade, S. G., Fan, J. B., ... & Reis, R. L. (2010). Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular

- cartilage tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95(2), 465-475.
97. Yang, H. and Shu, Z., 2014, The extraction of collagen protein from pigskin, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(2): 683-687.
 98. Zamora-Gasga, V. M., Bello-Pérez, L. A., Ortiz-Basurto, R. I., Tovar, J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. 2014. "Granola bars prepared with Agave tequilana ingredients: Chemical composition and in vitro starch hydrolysis", *LWT-Food Science and Technology*, 56(2), 309-314.
 99. Zeng, S., Wu, W., Zhang, C., Yin, J. And Li, Z., 2015, August, Antioxidant activity of collagen hydrolysate obtained from tilapia scales in vitro and in vivo assays. In 3rd International Conference on Material, Mechanical and Manufacturing Engineering (IC3ME 2015). Atlantis Press.
 100. Zhang, C., Yuan, X., Wu, L., Han, Y., & Sheng, J. (2005). Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. *European polymer journal*, 41(3), 423-432.
 101. Zhao, T., Zhou, Y., Mao, G., Zou, Y., Zhao, J., Bai, S., ... and Wu, X., 2013, Extraction, purification and characterisation of chondroitin sulfate in Chinese sturgeon cartilage, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7): 1633-1640.
 102. Zhong, S. P., Teo, W. E., Zhu, X., Beuerman, R., Ramakrishna, S., & Yung, L. Y. L. (2007). Development of a novel collagen–GAG nanofibrous scaffold via electrospinning. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2), 262-266.
 103. Zhong, S., Teo, W. E., Zhu, X., Beuerman, R., Ramakrishna, S., & Yung, L. Y. L. (2005). Formation of collagen– glycosaminoglycan blended nanofibrous scaffolds and their biological properties. *Biomacromolecules*, 6(6), 2998-3004.
 104. Zou, Y., Xu, P., Li, P., Cai, P., Zhang, M., Sun, Z., ... and Wang, D., 2017, Effect of ultrasound pre-treatment on the characterization and properties of collagen extracted from soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). *LWT-Food Science and Technology*, 82, 72-81.

EK-1 Amino Asit Analizi yöntem detayları

AMİNO ASİT ÇALIŞMASI

Cihaz	: Shimadzu Nexara XR HPLC Sistemi
Kolon	: Zorbax Eclipse AAA (15 cm x 4.6 mm x 3.5 µm)
Mobil Faz	: A) 40 mM NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (Su içinde) pH =7.8 5 N NaOH ile ayarlandı B) Asetonitril : MeOH : Su (45 : 45 : 10)
Akış Hızı	: 1.5 mL/dak
Kolon Sıcaklığı	: 40 °C
FLD Sinyal	: 0 – 23 dak Ex: 340 nm Em: 450 nm 23 – 36 dak Ex: 266 nm Em: 305 nm
Enjeksiyon Hacmi	: 9 µL
Gradient Programı	:

Dakika	Mobil Faz B (%)
0.00 – 2.85	0
2.85 – 27.00	57
27.00 – 28.50	100
28.50 – 34.50	100
34.50 – 36.00	0

ÖRNEK HAZIRLAMA

1) 0.1 g numune (homojenize edilmiş) tartıldı. Üzerine 5 mL 6 N HCl eklendi. Daha sonra sırasıyla 250 µL 2 mM Fenol ve 0.1 g Na₂SO₃ ilave edildi. 110 °C' lik etüvde 24 saat boyunca bekletildi. Bu süre sonunda numunenin pH' ı 5 N NaOH ile 6.7 – 7.3 aralığına ayarlandı. 4000 rpm' de 5 dak santrifüj edildi. Filtreden geçirilerek vialere alındı.

2) Türevlendirme prosedürü aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

EK-2 Amino Asit analizi Kromatogramı

30.12.2020 14:51:56 Page 1 / 2

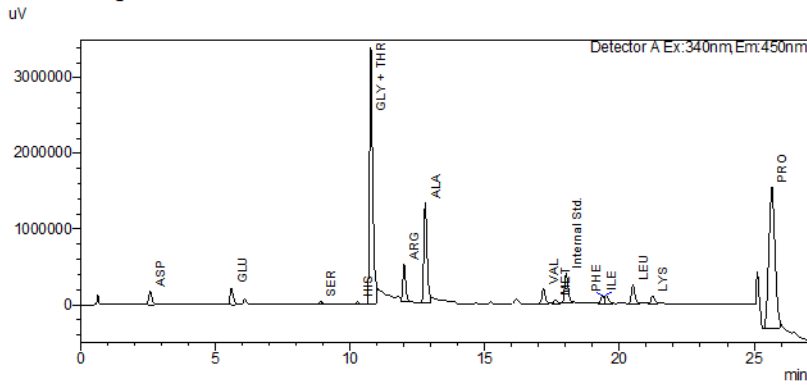


Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: kolajen	Sample Type	: Unknown
Sample ID	:		
Data Filename	: kolajen_06.lcd		
Method Filename	: Amino Asit - Orta Metot.lcm	Acquired by	: System Administrator
Batch Filename	: 201203.lcb	Processed by	: System Administrator
Vial #	: 1-15		
Injection Volume	: 9 uL		
Date Acquired	: 03.12.2020 16:01:31		
Date Processed	: 08.12.2020 15:18:59		

<Chromatogram>



lajen_06.lcd

EK-3 Moleküler Ağırlık Analizi Raporu

GPC/SEC Software Sample GPC Analysis Report

Generated by user at 12:46 PM on Monday, May 03, 2021



Agilent Technologies

Results

Analysed by
Comments

user at 12:36:00 PM on Monday, May 03, 2021

Molecular Weight Averages

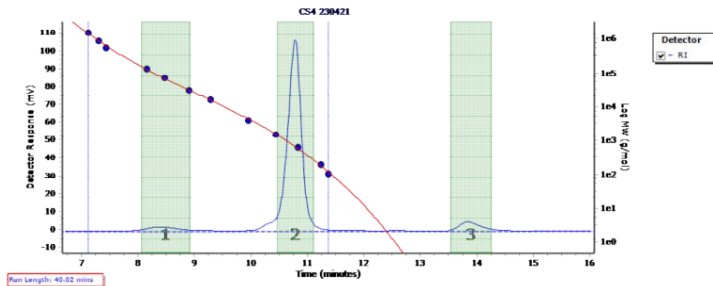
Peak	Mp	Mn	Mw	Mz	Mz+1	Mv	PD
Peak 1	78208	65764	77299	89174	99987	87487	1.175
Peak 2	666	642	705	770	837	760	1.098
Peak 3	0	0	0	0	0	0	0

Peak information

	Start (mins)	End (mins)
Baseline region 1	5.48	5.82
Baseline region 2	16.25	16.47
Peak 1	8.07	8.93
Peak 2	10.47	11.12
Peak 3	13.53	14.27

Peak	Trace	Peak Max RT (mins)	Peak Area (mV.s)	Peak Height (mV)
Peak 1	RI	8.42	83.494	2.304
Peak 2	RI	10.78	1806.049	106.649
Peak 3	RI	13.83	127.866	4.930

Chromatogram



Run Length: 40.00 mins

GPC/SEC Software Sample GPC Analysis Report

Generated by user at 12:46 PM on Monday, May 03, 2021

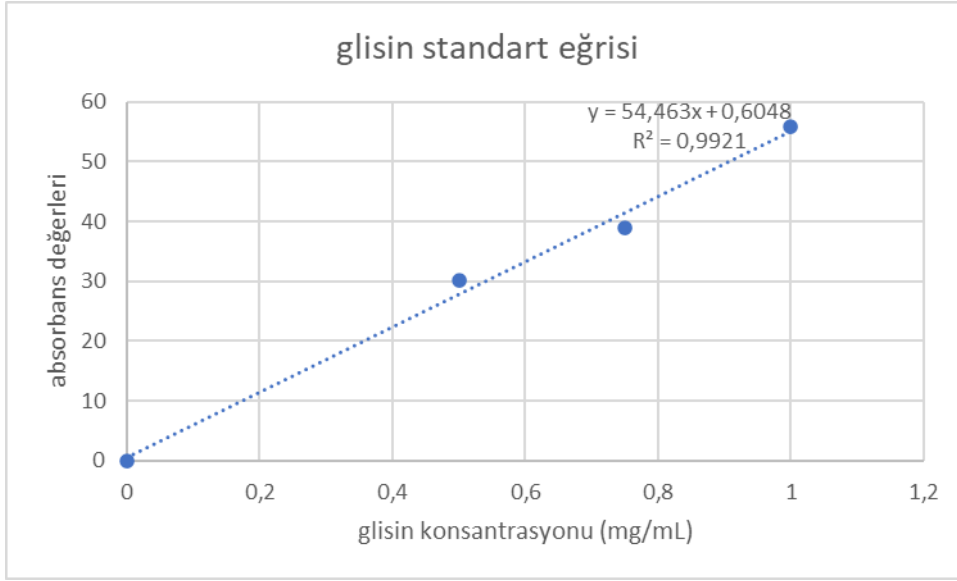


Agilent Technologies

Calibration Points

Point	Peak Max RT (mins)	MW	Log MW	Point in Use?	Percent Error
1	7.12	1522000	6.18	Yes	6.84
2	7.30	863500	5.94	Yes	-0.87
3	7.43	552000	5.74	Yes	-12.80
4	8.15	134300	5.13	Yes	5.02
5	8.47	71800	4.86	Yes	4.04
6	8.90	30310	4.48	Yes	-2.15
7	9.28	16100	4.21	Yes	4.16
8	9.95	3870	3.59	Yes	-11.36
9	10.43	1480	3.17	Yes	-2.03
10	10.83	610	2.79	Yes	8.36
11	11.23	194	2.29	Yes	8.12
12	11.37	106	2.03	Yes	-10.52

EK-4 Glisin standart eğri



KAYNAKLAR

1. Aigster, A., Duncan, S. E., Conforti, F. D., & Barbeau, W. E. (2011). Physicochemical properties and sensory attributes of resistant starch-supplemented granola bars and cereals. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 2159-2165.
2. Akgün, I., Öğüt, T. 2002. " Oral Glukozamin ve Kondroitin Sülfatın Osteoartrit Tedavisindeki Yeri", *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği*, 1(2), 66-70.
3. Ali, A. M. M., Kishimura, H., & Benjakul, S. (2018). Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus Jullieni*) as affected by ultrasonication. *Process Biochemistry*, 66(December 2017), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.003>
4. Almarza, A., & Athanasiou, K. (2004). Design characteristics for the tissue engineering of cartilaginous tissues. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(1), 2–17.
5. Arumugam, G. K. S., Sharma, D., Balakrishnan, R. M., Ettiyappan, J. B. P. 2018. "Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin", *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 9, 19-26.
6. Banner, J., Dautzenberg, M., Feldhans, T., Hofmann, J., Plümer, P., Ehrmann, A. 2018. "Water Resistance and Morphology of Electrospun Gelatine Blended with Citric Acid and Coconut Oil", *Tekstilec*, 61(2), 129-135.
7. Benjakul, S., Pisuchpen, S., O'Brien, N., & Karnjanapratum, S. (2018). Effect of antioxidants and packing conditions on storage stability of cereal bar fortified with hydrolyzed collagen from seabass skin. *Italian Journal of Food Science*, 31(2), 347-366.
8. Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances*, 28(3), 325-347.
9. Bhat, R., Karim, A. A. 2014. "Towards producing novel fish gelatin films by combination treatments of ultraviolet radiation and sugars (ribose and lactose) as cross-linking agents", *Journal of food science and technology*, 51(7), 1326-1333.
10. Bock, N., Dargaville, T. R., & Woodruff, M. A. (2012). Electrospaying of polymers with therapeutic molecules: state of the art. *Progress in polymer science*, 37(11), 1510-1551.
11. Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.
12. Buttafoco, L., Kolkman, N. G., Engbers-Buijtenhuijs, P., Poot, A. A., Dijkstra, P. J., Vermes, I., & Feijen, J. (2006). Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 27(5), 724-734
13. Bürck, J., Aras, O., Bertinetti, L., İlhan, C. A., Ermeydan, M. A., Schneider, R., ... & Kazanci, M. (2018). Observation of triple helix motif on electrospun collagen nanofibers and its effect on the physical and structural properties. *Journal of Molecular Structure*, 1151, 73-80.

14. Cao, N., Fu, Y., He, J. 2007. "Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid", *Food Hydrocolloids*, 21(4), 575-584.
15. Chambi, H., Grosso, C. 2006. "Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase", *Food research international*, 39(4), 458-466.
16. Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R. and Hong, B., 2016, Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*), *LWT-Food Science and Technology*, 66, 453-459.
17. Chitkara, M. A. N. S. I., Kohli, R. A. J. N. I. T., Sandhu, I. S., Singh, D. I. D. A. R., & Sindhu, R. K. (2017). Development and nutritional, organoleptic, biochemical analysis of polyherbal (stevia, banana, cocoa butter, oats) energy bar. *Journal of Advances in Food Science & Technology*, 4(2), 62-66.
18. Davidenko, N., Bax, D. V., Schuster, C. F., Farndale, R. W., Hamaia, S. W., Best, S. M., & Cameron, R. E. (2016). Optimisation of UV irradiation as a binding site conserving method for crosslinking collagen-based scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(1), 1-17.
19. Demir, M. M., Yilgor, I., Yilgor, E. E. A., & Erman, B. (2002). Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer*, 43(11), 3303-3309.
20. DROBOTĂ, M., BARBĂLATĂ-MÂNDRU, M., GRĂDINARU, L. M., & Alexa, I. (2021). EFFECT OF UV IRRADIATION ON SURFACE OF COLLAGEN FILM. *Rev. Roum. Chim*, 66(1), 81-85.
21. Fathi, M., Martín, Á., McClements, D. J. 2014. "Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems", *Trends in Food Science & Technology*, 39(1), 18–39.
22. Ferraro, V., Martinie, B.G., Sayd, T., Chambon, C., Anton, M., Lhoutellier, V.S. 2017. "Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential", *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 55–66.
23. Fonseca, L. M., Bona, N. P., Crizel, R. L., Pedra, N. S., Stefanello, F. M., Lim, L. T., ... & Zavareze, E. D. R. (2022). Electrospun Starch Nanofibers as a Delivery Carrier for Carvacrol as Anti-Glioma Agent. *Starch-Stärke*, 74(1-2), 2100115.
24. Formhals, A. Process and apparatus for preparing artificial threads. US Patent 1975504. 1934.
25. Frantz, C., Stewart, K. M. and Weaver, V. M., 2010, The extracellular matrix at a glance, *Journal of Cell Science*, 123(24): 4195-4200.
26. Gao, L. L., Wang, Z. Y., Li, Z., Zhang, C. X. and Zhang, D. Q., 2017, The characterization of acid and pepsin soluble collagen from ovine bones (*Ujumuqin* sheep), *Journal of Integrative Agriculture*, 17(3): 704-711.
27. Ghorani, B., & Tucker, N. (2015). Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids*, 51, 227-240.
28. Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., Montero, M. P. 2011. "Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review", *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827.

29. Hashim, P., Ridzwan, M. M. and Bakar, J., 2014, Isolation and characterization of collagen from chicken feet, *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*, 8(3): 250-254.
30. Hofman, K., Tucker, N., Stanger, J., Staiger, M., Marshall, S., Hall, B. 2012. "Effects of the molecular format of collagen on characteristics of electrospun fibres", *Journal of Materials Science*, 47(3), 1148-1155.
31. Hoseyni, S. Z., Jafari, S. M., Tabarestani, H. S., Ghorbani, M., Assadpour, E., & Sabaghi, M. (2021). Release of catechin from Azivash gum-polyvinyl alcohol electrospun nanofibers in simulated food and digestion media. *Food Hydrocolloids*, 112, 106366.
32. Huang, C. H., Chi, C. Y., Chen, Y. S., Chen, K. Y., Chen, P. L., Yao, C. H. 2012. "Evaluation of proanthocyanidin-crosslinked electrospun gelatin nanofibers for drug delivering system", *Materials Science and Engineering: C*, 32(8), 2476-2483.
33. Jabeen, S., Javed, F., Hettiarachchy, N. S., Sahar, A., Sameen, A., Khan, M. R., ... & Aadil, R. M. (2022). Development of energy-rich protein bars and in vitro determination of angiotensin I-converting enzyme inhibitory antihypertensive activities. *Food Science & Nutrition*, 10(4), 1239-1247.
34. Jaworek, A., & Sobczyk, A. T. (2008). Electrospraying route to nanotechnology: an overview. *Journal of Electrostatics*, 66(3-4), 197-219.
35. Jeevithan, E., Jingyi, Z., Wang, N., He, L., Bao, B. And Wu, W., 2015, Physico-chemical, antioxidant and intestinal absorption properties of whale shark type-II collagen based on its solubility with acid and pepsin. *Process Biochemistry*, 50(3), 463-472.
36. Jeong, L., Park, W. 2014. "Preparation and characterization of gelatin nanofibers containing silver nanoparticles", *International journal of molecular sciences*, 15(4), 6857-6879.
37. Katti, D. S., Robinson, K. W., Ko, F. K., & Laurencin, C. T. (2004). Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 70(2), 286-296.
38. Kitayama, K., Hayashida, Y., Nishida, K., Akama, T. O. 2007. "Enzymes responsible for synthesis of corneal keratan sulfate glycosaminoglycans", *Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 30085-30096.
39. Krishnamoorthi, J., Ramasamy, P., Shanmugam, V. And Shanmugam, A., 2017, Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of *Sepia pharaonis* (Ehrenberg, 1831) from Puducherry coast. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 39-45.
40. Kuraishi, C., Yamazaki, K., Susa, Y. 2001. "Transglutaminase: its utilization in the food industry", *Food Reviews International*, 17(2), 221-246.
41. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.

42. Lafarga, T., Hayes, M. 2014. "Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients", *Meat Science*, 98(2), 227-239.
43. Law, J. X., Liao, L. L., Saim, A., Yang, Y., & Idrus, R. (2017). Electrospun collagen nanofibers and their applications in skin tissue engineering. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 14(6), 699-718.
44. Le Vien, N. T., Nguyen, P. B., Cuong, L. D., An, T. T. T. and Dao, D. T. A. (2017, September). Optimization of papain hydrolysis conditions for release of glycosaminoglycans from the chicken keel cartilage. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1878, No. 1, p. 020009). AIP Publishing LLC.
45. Lee, D. H., Oh, J. H., Chung, J. H. 2016. "Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging", *Journal of Dermatological Science*, 83(3), 174-181.
46. Leidy, R., Ximena, Q. C. M. 2019. "Use of electrospinning technique to produce nanofibres for food industries: A perspective from regulations to characterisations", *Trends in Food Science & Technology*, 85, 92-106.
47. Li, P. and Wu, G., 2018, Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth, *Amino Acids*, 50(1): 29-38.
48. Lim, L. T., Mendes, A. C., & Chronakis, I. S. (2019). Electrospinning and electrospraying technologies for food applications. *Advances in food and nutrition research*, 88, 167-234.
49. Lin, Y., Yao, Y., Yang, X., Wei, N., Li, X., Gong, P., ... & Wu, D. (2008). Preparation of poly (ether sulfone) nanofibers by gas-jet/electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(2), 909-917.
50. Lobato, L. P., Iakmiu Camargo Pereira, A. E., Lazaretti, M. M., Barbosa, D. S., Carreira, C. M., Mandarino, J. M. G., & Grossmann, M. V. E. (2012). Snack bars with high soy protein and isoflavone content for use in diets to control dyslipidaemia. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(1), 49-58.
51. López-Rubio, A., & Lagaron, J. M. (2012). Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 200-206.
52. Martel-Pelletier, J., Farran, A., Montell, E., Vergés, J., & Pelletier, J. P., 2015, Discrepancies in composition and biological effects of different formulations of chondroitin sulfate. *Molecules*, 20(3), 4277-4289.
53. Minekus, M., Alving, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... & Dufour, C. 2014. "A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus", *Food & function*, 5(6), 1113-1124.
54. Moreira-Araújo, R. S. D. R., Sousa, I. G. M. D., Cavalcante, R. B. M., Morgano, M. A., & Araújo, M. A. D. M. (2021). Cereal bar enriched with cowpea bean whole flour, cashew nut, and raisin banana. *Revista Ciência Agronômica*, 52.
55. Moskowitz, R. W. 2000. "Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease", *Seminars in arthritis and rheumatism*, 30(2), 87-99.
56. Muniz, C. E. S., Santiago, Â. M., Gusmão, T. A. S., Oliveira, H. M. L., de Sousa Conrado, L., & de Gusmão, R. P. (2020). Solid-state fermentation for single-cell protein

enrichment of guava and cashew by-products and inclusion on cereal bars. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101576.

57. 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
58. Nakano, T., Betti, M., & Pietrasik, Z. (2010). Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2(1), 61-74.y, 11, S61-S67.
59. Nakano, T., Pietrasik, Z., Ozimek, L. and Betti, M., 2012, Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate from broiler chicken biomass. *Process Biochemistry*, 47(12), 1909-1918.
60. Neo, Y. P., Swift, S., Ray, S., Gizdavic-Nikolaidis, M., Jin, J., & Perera, C. O. (2013). Evaluation of gallic acid loaded zein sub-micron electrospunfibre mats as novel active packaging materials. *Food Chemistry*, 141(3), 3192–3200.
61. Nieuwland, M., Geerdink, P., Brier, P., Van Den Eijnden, P., Henket, J. T., Langelaan, M. L., ... & Martin, A. H. 2013. "Food-grade electrospinning of proteins", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 269-275.
62. Nogueira, A. V., Rossi, G. R., Iacomini, M., Sassaki, G. L., Trindade, E. S., & Cipriani, T. R. (2019). Viscera of fishes as raw material for extraction of glycosaminoglycans of pharmacological interest. *International journal of biological macromolecules*, 121, 239-248.
63. Noorzai, S., Verbeek, C. J. R., Lay, M. C. and Swan, J., 2019, Collagen extraction from various waste bovine hide sources. *Waste and Biomass Valorization*, 1-12
64. Omran, A. A. (2018). Enhancing the nutritional value of oat bars. *American Journal of Food Science and Technology*, 6(4), 151-160.
65. Ouattara, B., Canh, L. T., Vachon, C., Mateescu, M. A., Lacroix, M. 2002. "Use of γ -irradiation cross-linking to improve the water vapor permeability and the chemical stability of milk protein films", *Radiation Physics and Chemistry*, 63(3-6), 821-825.
66. Papakonstantinou, E., Roth, M., Karakiulakis, G. 2012. "Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging", *Dermato-Endocrinology*, 4(3), 253-258.
67. Pezeshki-Modaress, M., Mirzadeh, H., & Zandi, M. (2015). Gelatin–GAG electrospun nanofibrous scaffold for skin tissue engineering: fabrication and modeling of process parameters. *Materials Science and Engineering: C*, 48, 704-712.
68. Raghuraman, H., 2013. "Extraction of Sulfated Glycosaminoglycans from Mackerel and Herring Fish Waste", MSc Thesis, Dalhousie University, 156.
69. Ran, X. G. and Wang, L. Y., 2014, Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products, *Journal of the Science Food and Agriculture*, 94(3): 585-590.
70. Rani, A., Baruah, R. and Goyal, A., 2017, Physicochemical, antioxidant and biocompatible properties of chondroitin sulphate isolated from chicken keel bone for potential biomedical applications, *Carbohydrate polymers*, 159: 11-19.

71. Riaz, T., Zeeshan, R., Zarif, F., Ilyas, K., Muhammad, N., Safi, S. Z.,... and Rehman, I. U., 2018, FTIR analysis of natural and synthetic collagen, *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(9): 703-746.
72. Rutledge, G. C., & Fridrikh, S. V. (2007). Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1384–1391.
73. Rutledge, G. C., Li, Y., Fridrikh, S., Warner, S. B., Kalayci, V. E., & Patra, P. (2001). Electrostatic spinning and properties of ultrafine fibers. *National Textile Center Annual Report*: Nov, 2001, M01-D22.
74. Saadat, S., Emam-Djomeh, Z., & Askari, G. (2021). Antibacterial and antioxidant gelatin nanofiber scaffold containing ethanol extract of pomegranate peel: Design, characterization and in vitro assay. *Food and Bioprocess Technology*, 14(5), 935-944.
75. Schaefer, L. and Schaefer, R. M., 2010, Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules, *Cell and Tissue Research*, 339(1): 237-246
76. 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 Research Journal*, 23(3), 913-922.
77. Shahbazi, M., Ahmadi, S. J., Seif, A., Rajabzadeh, G. 2016. "Carboxymethyl cellulose film modification through surface photo-crosslinking and chemical crosslinking for food packaging applications", *Food Hydrocolloids*, 61, 378-389.
78. Shoulders, M. D. and Raines, R. T., 2009, Collagen structure and stability, *Annual review of Biochemistry*, 78: 929-958.
79. Silva, T. F., Penna, A. L. B. 2012. "Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais", *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 71(3), 530-539.
80. Sizeland, K. H., Hofman, K. A., Hallett, I. C., Martin, D. E., Potgieter, J., Kirby, N. M., Hawley, A., Mudie, S. T., Ryan, T. M., Haverkamp, R. G., Cumming, M. H. 2018. "Nanostructure of electrospun collagen: Do electrospun collagen fibers form native structures?", *Materialia*, 3, 90-96.
81. Song, H., Li, B. 2017. "Beneficial Effects of Collagen Hydrolysate: A Review on Recent Developments", *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 1(2), 1-4.
82. Sundaresan, G., Abraham, R. J., Appa Rao, V., Narendra Babu, R., Govind, V., & Meti, M. F. (2018). Established method of chondroitin sulphate extraction from buffalo (*Bubalus bubalis*) cartilages and its identification by FTIR. *Journal of food science and technology*, 55(9), 3439-3445.
83. Tan, Y., & Chang, S. K., 2018, Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Food chemistry*, 242, 147-155.
84. Teo, W. E., & Ramakrishna, S. (2006). A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*, 17(14), R89.
85. Torres-Giner, S., Gimeno-Alcaniz, J. V., Ocio, M. J., & Lagaron, J. M. (2009). Comparative performance of electrospun collagen nanofibers cross-linked by means of different methods. *ACS applied materials & interfaces*, 1(1), 218-223.
86. Trowbridge, J. M., Gallo, R. L. 2002. "Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan", *Glycobiology*, 12(9), 117R-125R.

87. Uslu, M. Ö., Eltas, Ş. D. 2015. " PERİODONTAL HASTALIKLARDA MMP-8'İN ROLÜ", Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, Ek 12, 80-85.
88. Üçgül, İ., Aras, S., Elibüyük, U. 2018. "EKSTRASELÜLER MATRİS YAPISI VE GÖREVLERİ", Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering, 23(1), 295-310.
89. Veleirinho, B., & Lopes-da-Silva, J. A. (2009). Application of electrospun poly (ethylene terephthalate) nanofiber mat to apple juice clarification. *Process Biochemistry*, 44(3), 353-356.
90. Volpi, N., Galeotti, F., Maccari, F., Capitani, F., & Mantovani, V., 2021, Structural definition of terrestrial chondroitin sulfate of various origin and repeatability of the production process. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 195, 113826.
91. Wang, J., Zhang, L., & Jin, Z. (2016). Separation and purification of low-molecular-weight chondroitin sulfates and their anti-oxidant properties. *Bangladesh Journal of Pharmacolog* .
92. Wardrop, D., Keeling, D. 2008. "The story of the discovery of heparin and warfarin", *British Journal of Haematology*, 141(6), 757–763.
93. Widyaningsih, T. D., Rukmi, W. D., Sofia, E., Wijayanti, S. D., Wijayanti, N., Ersalia, R., Rochmawati, N., Nangin, D. 2016. "Extraction of Glycosaminoglycans Containing Glucosamine and Chondroitin Sulfate from Chicken Claw Cartilage", *Research Journal of Life Science*, 3(3), 181-189.
94. Włodarczyk, M. G., Kubisz, L. and Włodarczyk, D., 2017, Amino acid composition in determination of collagen origin and assessment of physical factors effects, *International Journal of Biological Macromolecules*, 104: 987-991.
95. Wongsasulak, S., Patapeejumruswong, M., Weiss, J., Supaphol, P., Yoovidhya, T. 2010. "Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends", *Journal of Food Engineering*, 98(3), 370-376.
96. Yan, L. P., Wang, Y. J., Ren, L., Wu, G., Caridade, S. G., Fan, J. B., ... & Reis, R. L. (2010). Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95(2), 465-475.
97. Yang, H. and Shu, Z., 2014, The extraction of collagen protein from pigskin, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(2): 683-687.
98. Zamora-Gasga, V. M., Bello-Pérez, L. A., Ortiz-Basurto, R. I., Tovar, J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. 2014. "Granola bars prepared with Agave tequilana ingredients: Chemical composition and in vitro starch hydrolysis", *LWT-Food Science and Technology*, 56(2), 309-314.
99. Zeng, S., Wu, W., Zhang, C., Yin, J. And Li, Z., 2015, August, Antioxidant activity of collagen hydrolysate obtained from tilapia scales in vitro and in vivo assays. In 3rd International Conference on Material, Mechanical and Manufacturing Engineering (IC3ME 2015). Atlantis Press.
100. Zhang, C., Yuan, X., Wu, L., Han, Y., & Sheng, J. (2005). Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. *European polymer journal*, 41(3), 423-432.

101. Zhao, T., Zhou, Y., Mao, G., Zou, Y., Zhao, J., Bai, S., ... and Wu, X., 2013, Extraction, purification and characterisation of chondroitin sulfate in Chinese sturgeon cartilage, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7): 1633-1640.
102. Zhong, S. P., Teo, W. E., Zhu, X., Beuerman, R., Ramakrishna, S., & Yung, L. Y. L. (2007). Development of a novel collagen–GAG nanofibrous scaffold via electrospinning. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2), 262-266.
103. Zhong, S., Teo, W. E., Zhu, X., Beuerman, R., Ramakrishna, S., & Yung, L. Y. L. (2005). Formation of collagen– glycosaminoglycan blended nanofibrous scaffolds and their biological properties. *Biomacromolecules*, 6(6), 2998-3004.
104. Zou, Y., Xu, P., Li, P., Cai, P., Zhang, M., Sun, Z., ... and Wang, D., 2017, Effect of ultrasound pre-treatment on the characterization and properties of collagen extracted from soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). *LWT-Food Science and Technology*, 82, 72-81.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. ŞEBNEM TAVMAN
Proje No:	119O491
Proje Başlığı:	Glukozaminoglikan (GAG) İçeren Kolajen Nanoliflerinin (KGN) Elektro Eğirme İşlemi ile Elde Edilmesi ve Gıda Matrisinde Kullanımının Araştırılması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	30
Araştırmacılar:	BURCU KAPLAN TÜRKÖZ, SEHER KUMCUOĞLU
Danışmanlar:	MURAT KAZANCI, AYŞEGÜL KETENCİ
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	EGE Ü. MÜHENDİSLİK F. GIDA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/11/2019 - 01/12/2022
Onaylanan Bütçe:	829114.68
Harcanan Bütçe:	778957.45
Öz:	Kolajen ve glukozaminoglikanlar (GAG), bağ dokusu hücreleri tarafından sentezlenen ekstraselüler matriksin (ESM) önemli bir kısmını oluşturan iki temel bileşendir. Özel bir amino asit bileşimine sahip olmasıyla diğer proteinlerden ayrılan kolajen, memelilerde en bol bulunan proteindir. Bağ doku hücrelerini saran uzun, doğrusal ve tekrar eden disakkarit birimlerden oluşan GAG'ların yapısında kıkırdak koruyucu ajan olarak bilinen kondroitin sülfat (CS) bulunmaktadır. Kolajen ve GAG moleküllerinin bir arada sağlık üzerine sinerjistik etki gösterdikleri bilinmektedir. Son yıllarda yaygınlaşan ve birçok kullanım alanı bulunan elektro-eğirme işlemi ile nano veya mikro ölçekli nanolifler elde edilebilmektedir. İşlem ve örnek hazırlama koşulları elektro eğirme işlemi ile elde edilen nanoliflerin boyutlarını ve homojenliğini etkilemektedir. Kolajen nanolifleri, genellikle doku mühendisliği ve biyomedikal alanlarında yapı iskelesi ya da doku iyileştirici malzeme olarak kullanılmaktadır. Gerçekleştirilen çalışma başlıca dört aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada, kuzu ayaklarından kolajen ekstraksiyonu ve GAG ekstraksiyonu, ardından saflaştırma işlemiyle CS (CS içeriği %88) ve Tip 1 kolajen (kolajen içeriği %87) elde edilmiştir. İkinci aşamada, farklı işlem ve örnek koşulları kullanılarak elektro eğirme uygulamaları yapılmıştır. Nanolif eldesi için ideal çözelti parametreleri: örnek konsantrasyonu: %15 (w/v), kolajen:kondroitin sülfat oranı: 95:5 (w/w), asetik asit konsantrasyonu %65 (v/v) olarak belirlenmiştir. İdeal işlem parametreleri ise: voltaj: 26 kV, akış hızı: 0.8 ml/h ve iğne ucu-kolektör arası mesafe: 15 cm olarak belirlenmiştir. Üçüncü aşamada, ideal koşulda üretilen kolajen içinde GAG nanolifleri (KGN), kolajen stabilizasyonunun artırılması amacıyla UV ışığında (254 nm) 30 dk süreyle çapraz bağlanmıştır. Projenin son aşamasında ise, kolajen-GAG temelli nanolifler ilk kez bir gıda matrisi içinde kullanılmış ve mikrobiyolojik açıdan güvenilir, kabul edilebilir duyuşal özelliklere sahip fonksiyonel bir ürün geliştirilmiştir.

Abstract:	Collagen and glycosaminoglycans (GAG) are two major components of the extracellular matrix (ESM) synthesized by connective tissue cells. Collagen is the most abundant protein in mammals and differs from other proteins with its special amino acid composition. Chondroitin sulfate (CS), known as cartilage protective agent is found in the structure of GAGs consisting of long, linear and repetitive disaccharide units surrounding the connective tissue cells. Collagen and GAG molecules are known to have a synergistic effect on health. Nano or micro fibers can be obtained by electro spinning process, which has become widespread in recent years and has many uses. Process and sample preparation conditions affect the size and homogeneity of the nanofibers obtained by the electro spinning process. Collagen nanofibers are generally used as scaffolding or tissue healing materials in tissue engineering and biomedical fields. The study consists of four main stages. In the first step, CS (CS content 88%) and Type I collagen (87% collagen content) were obtained by extraction of collagen from lamb's feet and GAG extraction followed by purification. In the second stage, electrospinning applications were made using different process and sample conditions. Ideal solution parameters for nanofiber production: sample concentration: 15% (w/v), collagen:chondroitin sulfate ratio: 95:5 (w/w), acetic acid concentration was determined as 65% (v/v). The ideal process parameters are: voltage: 26 kV, flow rate: 0.8 ml/h and distance between needle tip and collector: 15 cm. In the third step, GAG nanofibers (KGN) in collagen produced under ideal conditions were cross-linked in UV light (254 nm) for 30 min in order to increase collagen stabilization. In the final phase of the project, collagen-GAG-based nanofibers were used for the first time in a food matrix and a functional product with microbiologically safe and acceptable sensory properties was developed.
Anahtar Kelimeler:	kolajen, GAG, kondroitin sülfat, elektroçigirme, nanolif, fonksiyonel gıda
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Evet