



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**GIDA ATIKLARINDAN KOLAJEN
EKSTRAKSİYONU VE KİTOSAN,
POLİHİDROKSİALKANOAT
KOMPOZİTLERİNİN HAZIRLANMASI**

AYZİN ODABAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Özkan DANIŞ

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Emrah ÇAKMAKÇI

İSTANBUL, 2020



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



GIDA ATIKLARINDAN KOLAJEN EKSTRAKSİYONU VE KİTOSAN, POLİHİDROKSİALKANOAT KOMPOZİTLERİNİN HAZIRLANMASI

AYZİN ODABAŞ

520616005

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Özkan DANIŞ

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Emrah ÇAKMAKÇI

İSTANBUL, 2020

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

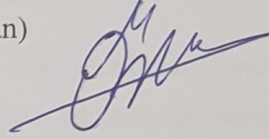
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Ayzin ODABAŞ'ın "Gıda Atıklarından Kolajen Ektraksiyonu ve Kitosan, Polihidroksialkanoat Kompozitlerinin Hazırlanması" başlıklı tez çalışması, 28 Şubat 2020 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

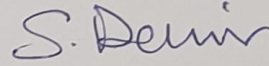
Doç. Dr. Özkan DANIŞ (Danışman)

Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi



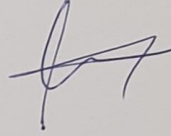
Doç. Dr. Serap DEMİR (Üye)

Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi



Dr. Öğretim Üyesi Aslı BEYLER-ÇİĞİL (Üye)

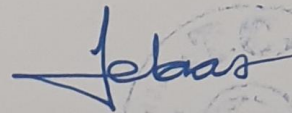
Amasya Üniversitesi Teknik Bilimler MYO



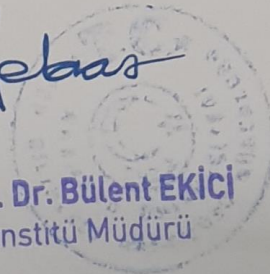
ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 04.03.2020 tarih ve 2020/08-02 sayılı kararı ile Ayzin ODABAŞ'ın Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Prof. Dr. Bülent EKİCİ
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü zorlukta bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimleri ile her zaman yanımda olan, sorduğum hiçbir soruyu cevapsız bırakmayan, bir akademik çalışmanın nasıl yapılması gerektiği konusunda tüm pozitifliği ve yardımseverliği ile her zaman bana yol gösteren çok değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Özkan DANIŞ'a, Sayın Doç. Dr. Emrah ÇAKMAKÇI'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli hocam Biyokimya Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşe OGAN'a,

Yüksek lisans tez çalışmamda bana çok yardımcı olan Sayın Ece İskit ve Duygu Aktaş'a,

Hayatım boyunca her türlü desteği ile her zaman yanımda olan, tüm başarılarımda her zaman yanımda olacaklarını bildiğim canım aileme, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SEMBOLLER	vi
KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Genel Bilgiler.....	3
1.2.1. Deniz Ürünleri ve Karides	3
1.2.2. Biyopolimerler	5
1.2.3. Kitin ve kitosan	6
1.2.4. Kolajen.....	7
1.2.5. Polihidroksialkanoatlar	10
1.2.6. Elektrospindleme	11
2. MATERYAL VE METOT	13
2.1. Araştırma Yöntemi	13
2.2. Ekipman.....	14
2.3. Kullanılan Kimyasallar	15
2.4. Karides Atıklarının Temizlenmesi ve Ön Hazırlığı.....	15
2.5. Kolajen Ekstraksiyonu.....	15
2.5.1. Kolajen Olmayan Proteinlerin Uzaklaştırılması	15
2.5.2. Minerallerin Uzaklaştırılması	15
2.5.3. Yağların Uzaklaştırılması	16
2.5.4. Kolajen Ekstraksiyonu	16

2.5.5. Kolajen Presipitasyonu ve Diyaliz.....	16
2.5.6. Kolajen Karakterizasyonu.....	17
2.6. Kitin Ekstraksiyonu ve Kitosan eldesi.....	18
2.6.1. Kitin Ekstraksiyonu	18
2.6.2. Kitosan Hazırlanması.....	18
2.6.3. Kitosanın Karakterizasyonu.....	18
2.7.Elektrospinleme	19
2.8. Malzeme ve Materyal Karakterizasyonu	20
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	20
3.1 Karides atıklarının temizlenmesi, önhazırlık ve kolajen ekstraksiyonu	20
3.2 Kolajen Karakterizasyonu	21
3.3 Kitin ekstraksiyonu ve kitosan eldesi	22
3.4 Elektrospinleme ve Karakterizasyon	22
4. SONUÇLAR	28
5. KAYNAKLAR.....	29
ÖZGEÇMİŞ	36

ÖZET

GIDA ATIKLARINDAN KOLAJEN EKSTRAKSİYONU VE KİTOSAN, POLİHİDROKSİALKANOAT KOMPOZİTLERİNİN HAZIRLANMASI

Kolajen, hayvansal kaynaklı büyük bir yapısal proteindir. Yüksek biyoyararlanım ve biyobozunum özellikleri nedeni ile kolajen, kozmetik, deri, gıda ve eczacılık endüstrisi gibi birçok alanın yanı sıra doku mühendisliği gibi farklı biyomedikal ve farmasötik alanlarda çok sayıda uygulama alanına sahip bir biyopolimer haline gelmiştir. Kitin, dünyada selülozdan sonra en yaygın olarak bulunan ikinci doğal polisakkarittir ve omurgasızlarda, kabuklu deniz canlılarında bulunur. Kitinin alkali deasetilasyonu ile üretilen kitosan antimikrobiyal özellikleri nedeniyle biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılan önemli bir biyopolimerdir. Polihidroksialkanoatlar, mikroorganizmalar tarafından üretilen biyolojik polyesterlerdir. Biyoyuymululukları ve diğer önemli özellikleri nedeniyle PHA'lar biyomedikal uygulamalarda kullanılabilecek en uygun biyomateryallerden biri olarak gösterilmektedirler.

Bu çalışmada, bir gıda atığı olan ve içerisinde yüksek miktarda kolajen ve kitin barındıran karides kabuğu atıklarından demineralizasyon ve asit ekstraksiyonu yöntemleri kullanılarak kolajen ve kitin izole edilmiştir. Elde edilen kolajen SDS-PAGE analizi ile karakterize edilmiş ve ağırlıklı olarak Tip I kolajen içerdiği gösterilmiştir. Ekstrakte edilen kitinin deasetilasyonu ile kitosan üretilmiş ve elde edilen kitosanın asetilasyon yüzdesi belirlenmiştir. Karides kabuğundan elde edilen kolajen, kitin, kitosan, bir PHA olan Poli (3-hidroksibütirik asit -co- 3-hidroksivalerik asit (PHBV) kullanılarak kompozit materyaller oluşturulmuş ve elde edilen materyaller FT-IR ve SEM analizleri ile karakterize edilmişlerdir.

Çalışma sonucunda karides kabuğu atıklarından kolajen, kitin ve kitosanın yüksek verimle elde edilmesi gerçekleştirilmiş ve elde edilen materyaller kullanılarak üretilen elektrospinlenmiş materyallerin nanolif özelliğe sahip oldukları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar karides kabuğu atıklarının yüksek değerli biyopolimer materyallerin üretimi için önemli bir kaynak olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle üretilen kolajen/kitosan/PHBV kompozit nanomateryallerinin çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılma potansiyeline sahip olduğu ön görülmektedir.

ABSTRACT

EXTRACTION OF COLLAGEN FROM FOOD WASTE AND THE PREPARATION OF CHITOSAN, POLYHYDROXYALKANOATE COMPOSITES

Collagen is a large structural protein made from animal. Due to its bioavailability and biodegradability, collagen has become a biopolymer with a wide range of applications in different biomedical and pharmaceutical fields, including various biomedical and pharmaceutical industries. Chitin is the second most common natural polysaccharide found after cellulose in the world and is found in invertebrates, shellfish. Chitosan, an important biopolymer, is produced by the alkaline deacetylation of chitin and because of its antimicrobial activity widely used in biomedical applications. Polyhydroxyalkanoates are biological polyesters produced by microorganisms. Because of their biocompatibility and other important properties, PHAs are shown as one of the most suitable biomaterials to be used in biomedical applications.

In this study, collagen and chitin were isolated from shrimp shell waste, which contains high amounts of collagen and chitin, using demineralization and acid extraction methods. The resulting collagen was characterized by SDS-PAGE analysis and was shown to contain predominantly Type I collagen. Chitosan was produced by deacetylation of the extracted chitin and the acetylation percentage was determined. Using collagen, chitin, chitosan, and a PHA, Poly (3-hydroxybutyric acid -co- 3-hydroxivaleric acid (PHBV), composite materials have produced by electrospinning and the obtained materials were characterized by FT-IR and SEM analysis.

As a result of the study, high yield of collagen, chitin and chitosan was obtained from shrimp shell waste and the electrospun mats produced using the materials obtained have been found to have nanofiber properties. It is suggested that especially collagen/chitin/PHBV composite nanomaterials have the potential to be used in various biomedical applications.

SEMBOLLER

% :Yüzde

dk :Dakika

μ L :Mikrolitre

μ m :Mikrometre

mM :Milimolar

g :Gram

mg :Miligram

kDa :Kilo Dalton

m :Metre

mL :Mililitre

M :Molar

$^{\circ}$ C :Derece Santigrat

V :Voltaj

v :Hacim

w :Ağırlık

W :Watt

α :Alfa

β :Beta

θ :Teta

KISALTMALAR

AcOH	: Asetik asit
FTIR	: Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
HFIP	: Hekzafloroizopropanol
Nm	: Nanometre
pH	: Power of Hydrogen
PHA	: Polihidroksialkanoat
PHB	: Polihidroksibütirat
PHBV	: Poli (3-hidroksibütirik asit -co- 3-hidroksivalerik asit)
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TEMED	: Tetrametiletildiamin
T _g	: Cam Geçiş Sıcaklığı
T _m	: Erime Sıcaklığı
W/V	: Hacim Başına Ağırlık

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1.1. <i>Penaeus kerathurus</i> gösterimi.....	4
Şekil 1.2. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları.....	6
Şekil 1.3. Kitinden kitosan oluşumu reaksiyonu.....	7
Şekil 1.4. Kolajenin yapısı.....	8
Şekil 1.5. Kolajenin üçlü sarmal yapısına genel bakış.....	9
Şekil 1.6. PHA'ların kimyasal yapısı ve adlandırma.....	11
Şekil 1.7. Basit elektrospindleme gösterimi.....	12
Şekil 2.1. Tez metodunun şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.2. Kullanılan elektrospindleme cihazı.....	19
Şekil 3.1. Karides kabuğu atıklarının ön hazırlık öncesi ve sonrası görüntüsü.....	20
Şekil 3.2. <i>Penaeus kerathurus</i> atıklarından elde edilen SDS-PAGE görüntüsü.....	21
Şekil 3.3 Karides kabuğu atıklarından elde edilen A- Kitin, B- Kitosan görüntüsü.....	22
Şekil 3.4. Kolajen/Kitosan/PHBV nanofiber mat görüntüsü.....	23
Şekil 3.5. Kolajen/kitosan/PHBVkompozit materyaline ait SEM görüntüleri.....	23
Şekil 3.6. Kolajen/kitin/PHBVkompozit materyaline ait SEM görüntüleri.....	24
Şekil 3.7. A-Kitin, B-Kitosan, C-Kolajen ve D-PHBV'ye ait FTIR spektrumları.....	25
Şekil 3.8. Kolajen/Kitosan/PHBV kompozit materyaline ait FTIR spektrumu.....	25
Şekil 3.9. Kolajen/Kitin/PHBV kompozit materyaline ait FTIR spektrumu.....	26
Şekil 3.10. Kolajen/Kitosan/PHBV nanofiberine ait temas açısı görüntüleri.....	27

TABLO LİSTESİ

SAYFA

Tablo 1.1. Türkiye’de avlanan kabuklu deniz ürünlerinin miktarı.....3

Tablo 1.2. Çeşitli kolajen tipleri ve vücuttaki dağılımları.....9



1. GİRİŞ

1.1 Giriş ve Amaç

Polimerler, monomer adı verilen kısa yapı birimlerinin uzun zincirler oluşturmak üzere birbirlerine bağlandığı makromoleküller olarak tanımlanmaktadır. Polimerler hem sentetik olarak petrol yan ürünlerinden üretilirler hem de canlı yapısında protein ve DNA gibi biyopolimerler olarak bulunabilirler. Biyopolimerler, organizmaların büyüme döngüleri sırasında normal koşullar altında oluşan doğal polimerlerdir. Çeşitli organizmaların karmaşık metabolik aktiviteleri, biyopolimerlerin oluşumuyla sonuçlanır (Rao ve ark., 2014). Plastikler gibi sentetik polimerler günlük yaşamımızın neredeyse tümüne entegre olmuşlardır ve bilişim teknolojileri, taşıma, tekstil ve inşaat gibi sanayilerde vazgeçilmez yapı elemanları haline gelmişlerdir (Richard ve ark., 2009). Bununla birlikte nüfus ve sentetik plastik kullanımındaki aşırı artış önemli çevre ve sağlık sorunlarının ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Rao ve ark., 2014). Bunun yanı sıra, nüfus artışının bir diğer olumsuz etkisi çok yüksek miktarda gıda atığının doğaya çöp olarak bırakılması olarak gerçekleşmiştir. Bu nedenle, bu atık gıda ürünlerinden yararlı biyomoleküllerin geri kazanılması ve bu biyomoleküllerden üretilen biyoplastiklerin, sentetik plastiklerin yerine kullanılmalarının sağlanması, çevre kirliliğinin azaltılmasında büyük önem kazanmıştır. Bunun aynı zamanda gelecek nesiller için daha sürdürülebilir kaynak üretimine de olanak sağlayacağı düşünülmektedir (Yücel ve ark., 2006, Castilho ve ark., 2009). Bu nedenle araştırmacılar, biyolojik olarak bozunmayan sentetik polimerlerin yerine kolajen, kitin, polihidroksialkanoatlar (PHA) ve polilaktik asit gibi biyolojik olarak bozunabilir biyopolimerler üzerine odaklanmışlardır (Steinbüchel ve ark., 2005, Reddy ve ark., 2019).

Deniz ürünleri şirketleri tarafından dünya çapında büyük miktarlarda yengeç ve karides kabuğu atık olarak çevreye bırakılmaktadır. Bu kabukların yüksek miktarlarda kolajen ve kitin içerdikleri bilindiğinden, bu atıklardan bu biyopolimerlerin geri kazanımı önemli bir araştırma alanı olarak ortaya çıkmıştır (S. Lim ve ark., 2003).

Kolajen hayvansal dokularda en bol bulunan proteindir ve kolajen fibrillerinin çapraz bağlı tekrarlayan birikimini içeren bir biyopolimerdir (Muyonga ve ark., 2004). Literatürde farklı kaynaklardan izole edilmiş en az 27 farklı türde kolajenin varlığı bildirilmiştir (Friess, 1998, Benjakul ve ark., 2012). Kolajen hayvanlarda farklı dokularda bulunur ve kemiklerin, kas

dokularının ısıl kararlılığı ve mekanik dayanımı için hayati öneme sahiptir. Canlı hayatındaki vazgeçilmez öneminin yanı sıra üstün biyolojik, biyoyararlanım ve biyobozunum özellikleri ile kolajen, kozmetik, deri, gıda, biyomedikal ve eczacılık endüstrisi gibi birçok alanın yanı sıra doku mühendisliği de dahil olmak üzere farklı biyomedikal uygulamalarda geleneksel olarak kullanılan bir biyopolimer haline gelmiştir (A. Gaspar ve ark., 2011, Liu ve ark., 2012).

Kitin, dünyada selülozdan sonra en yaygın olarak bulunan ikinci doğal polisakkarittir; omurgasızlarda - kabuklu deniz canlılarının kabukları veya böcek kütikülleri olarak - aynı zamanda bazı mantar zarflarında, yeşil alglerin hücre duvarlarında ve mayalarda bulunur (Croisier ve Jérôme, 2013). Glukozamin ve N-asetilglukozamin monomerlerinden oluşan kitosan ise, kitinin alkali N-deasetilasyonu ile üretilen katyonik bir biyopolimerdir (Rampino ve ark., 2013).

Her ne kadar kolajen ve kitosan biyoyumluluk ve biyobozunum gibi üstün özelliklere sahip olsa da mekanik özelliklerinin düşük olması çeşitli endüstrilerde sentetik plastiklerin yerine kullanılmalarını önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Bu nedenle kolajen ve kitosan gibi biyopolimerler genellikle tek başlarına değil, polihidroksialkanoatlar (PHA'lar) gibi daha üstün mekanik özelliklere sahip biyopolimerler ile kompozitler halinde kullanılırlar (Danış ve ark., 2019).

Polihidroksialkanoatlar, mikroorganizmalar tarafından hücre içi karbon ve enerji kaynakları olarak üretilen doğrusal alifatik biyolojik polyesterlerdir. Biyoyumlulukları, düşük antijenik potansiyelleri ve diğer üstün özellikleri nedeniyle PHA'lar biyomedikal uygulamalarda kullanılabilecek en uygun biyomateryallerden biri olarak tanımlanmışlardır. Bu polyesterler, monomer bileşimleri değiştirilerek kontrol edilebilen çok çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir (Masaeli ve ark., 2013; Arcos-Hernández ve ark., 2013). Biyolojik olarak parçalanabilen ve biyoyumlu bir biyopolimer olan PHA'lar, biyomedikal alanda diğer biyopolimerler ile kompozitler oluşturmak için kullanılırlar (Quillaguamán et al., 2010). Poli(3-hidroksibütirat) (PHB) ve poli(3-hidroksibütirat-3-hidroksivalerat) (PHBV), araştırmacılar ve endüstri tarafından biyomedikal uygulamalar için en yaygın olarak kullanılan PHA'lardır (Tan ve ark., 2014).

Bu çalışmada, bir gıda atığı olan ve içerisinde yüksek miktarda kitin ve kolajen barındıran karides kabuğu atıklarından demineralizasyon ve asit ekstraksiyonu yöntemleri kullanılarak kolajen ve kitin izole edilmiştir. Daha sonra ekstrakte edilen kitinin deasetilasyonu ile kitosan elde edilmiştir. Elde edilen kolajen ve kitosanın karakterizasyonları gerçekleştirildikten sonra

kolajen, kitosan ve PHBV nanofiberlerinden oluşan kompozit nanomatlar elektrospinning yöntemi ile üretilmiştir. Elde edilen nanofiber matların karakterizasyonu FT-IR ve SEM analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar karides kabuğu gibi deniz atıklarının üstün biyoyararlanım, biyoyum ve biyobozunum özelliklerine sahip değerli kolajen/kitosan/PHBV nanomateryallerinin üretimi için eşsiz kaynaklar olduklarını ortaya koymaktadır.

1.2. Genel Bilgiler

1.2.1 Deniz Ürünleri ve Karides

Başlıca balık ve kabuklu deniz hayvanlarından oluşan deniz ürünleri insan tüketimine uygun kabul edilmiş bir gıda olarak tanımlanmaktadır ve dünya çapında önemli bir protein kaynağıdır (Basurco ve ark., 2014). Karides kabukları başta olmak üzere deniz ürünlerinin tüketilmesinden açığa çıkan atıklar, toplam deniz ürünü kütlelerinin yaklaşık %40'ını oluşturur ve bozulma hızları yavaş olduğu için son zamanlarda büyük bir çevresel sorun olarak kabul edilmektedirler (Kjartansson ve ark., 2006).

Balık işleme tesislerinde üretim sırasında önemli oranda atık meydana gelmektedir. Toplam işlenen deniz ürünü ağırlığının % 60'ından fazlasının atık olarak atıldığı bilinmektedir (Chalamaiah ve ark., 2012). Bu işlenmiş deniz ürünlerinin % 45'lik kısmını karides, açığa çıkan atıkların çoğunluğunu da (%50-70) karides kabukları oluşturmaktadır (Dotto ve ark., 2017). Su ürünleri yetiştiriciliğinin hızlı bir şekilde büyümesinin, insan tüketimi için potansiyele sahip olan ürünlerin büyük miktarlarda birikmesiyle sonuçlanacağı tahmin edilmektedir (Je ve ark., 2007). 2018 TÜİK verilerine göre (Tablo 1.1) Türkiye'de avlanan kabuklu deniz ürünlerinin toplam miktarı 4570,4 tondur.

Tablo 1.1. Türkiye'de avlanan kabuklu deniz ürünlerinin miktarı (TÜİK 2018)

Ülkemizde avlanan kabuklu deniz ürünlerinin miktarı (Ton)	2018
Istakoz - Common lobster	4,7
Jumbo karides - Green tiger prawn	758,8
Erkek karides - Speckled shrimp	46
Kırmızı karides - Giant gamba prawn	299
Karabiga karides - Caramote prawn	219,4
Pembe (Çimçim) karides - Deep water rose prawn	3212,9
Mavi yengeç - Blue crab	10,5
TOPLAM	4551,3

Bu veriler ülkemizde de deniz ürünlerinin işlenmesi sırasında ortaya çıkan atıkların önemli bir çevre sorunu olduğunu ortaya koymaktadır. Deniz ürünlerinin işlenmesi sırasında açığa çıkan atıklar genellikle açık denizlere veya çöp depolama alanlarına atılmakta ve bu da önemli bir çevre kirliliğine neden olmaktadır. Üretilen bu atıklardan yüksek değerli ürünlerin üretilmesi hem çevre kirliliğinin azaltılmasına yardımcı olacak hem de ekonomiye katkı sağlayacaktır (Caruso 2016). Kabuklu hayvan atıklarında en yüksek miktarda bulunan önemli doğal ürünlerin başında bir polisakkarit olan kitin gelmektedir.

Crustacea ve *Mollusca* ailesi kitin ve kitosanın elde edilebildiği en önemli deniz canlılarını içermektedir. *Crustacea* grubundaki karideslerin kabukları kitin açısından en zengin kaynaklardan biri olmalarıyla bilinir. Mevsimine ve türüne bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte *Crustacea* kabukları % 30-40 oranında protein, % 30-50 oranında kalsiyum karbonat ve % 20-30 oranında kitin içermektedir (Johnson ve ark., 1982). Bunun yanında kabuklu canlıların kabuklarında küçük bir oranda Sodyum, Potasyum, Magnezyum ve Sülfür gibi mineraller de bulunur (Tolaimate ve ark., 2003).

Çalışmamızda kabuklarından faydalandığımız *P. kerathurus*, *Penaeidae* ailesinde yer alan ve Akdeniz diyetinin önemli bir bölümünü içeren diğer yenilebilir kabuklulardan (ıstakoz ve yengeç gibi) daha büyük miktarlarda tüketilen ticari olarak popüler bir karides türüdür (Şekil 1.1). Bu kabukluların coğrafi dağılımı tüm Akdeniz'e kadar yayılmıştır, habitatları alt çamurlu kumdur ve batimetrik ölçümler sonucu bulunma aralıklarının 0 ila 75 m arasında değiştiği, nadiren 90 m'ye ulaştığı belirlenmiştir (Gonides ve ark., 2001).



Şekil 1.1 *Penaeus kerathurus* gösterimi (Morsli ve ark., 2015).

Ülkemizde Akdeniz Karidesi olarak da bilinen *Penaeus kerathurus*, Marmara, Ege ve Akdeniz'in kıyı bölgelerine dağılmış ve ticari olarak Türkiye'deki kıyı balıkçılığındaki en önemli karides türlerinden biridir. Aynı zamanda İzmir Körfezi'ndeki balık ağı kullanan balıkçılar için hedef türdür (Turkmen, Yilmazerli ve ark., 2006). Ülkemizde ağırlıklı olarak avlanan bu karides türü, çeşitli işletmelerde kabukları uzaklaştırılarak genellikle karides eti halinde piyasaya sürülür ve bu esnada kabukları atık olarak atılır. Bu nedenle bu atıklardan ekonomik değere sahip yan ürünlerin üretilmesi önemli bir araştırma alanı olarak ortaya çıkmıştır.

1.2.2. Biyopolimerler

Polimerler farklı monomerlerin kovalent bağlarla bağlanmasıyla meydana gelen makromoleküller yapılarıdır. Çoğunlukla petrol bazlı kaynaklardan sentezlenen plastik ve benzeri polimerler günümüzde hayatın her alanına yayılmış ve vazgeçilmesi mümkün olmayan bir ihtiyaç haline gelmişlerdir. Bununla birlikte doğada kendiliğinden parçalanmaları çok uzun süreler aldığı için bu plastiklerin aşırı kullanımı ciddi bir ekolojik tehlike olarak ortaya çıkmıştır (Rao ve ark., 2014). Çeşitli işlemlerle üretilen katı ve sıvı atıklar çevreyi kolayca etkileyebilir ve ekosisteme zarar verebilmektedir. Bu atıklar kirliliği azaltmak ve aynı zamanda alternatif enerji kaynaklarına dönüştürmek için işlenebilir (Morgan-Sagastume ve ark., 2014). Bu nedenle bu petrol kaynaklı polimerlerin yerine biyopolimerlerin kullanımı son yıllarda önemli bir hale gelmiştir.

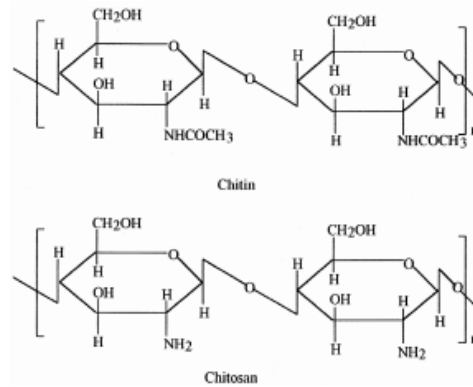
Biyopolimer terimi, doğal kaynaklı polimerleri ve bunun yanı sıra zamanda kimyasal ve biyolojik yöntemlerle polimerize edilmiş yüksek moleküler kütleli doğal bileşiklerini içerir. (K. Sudesh ve ark., 2008). Biyopolimerler, organizmaların büyüme döngüleri sırasında normal koşullar altında oluşan doğal polimerlerdir. Çeşitli organizmaların karmaşık metabolik aktiviteleri, biyopolimerlerin oluşumuyla sonuçlanır. Biyopolimerlerin bir avantajı, biyolojik olarak yüksek oranda parçalanabilir olmalarıdır (Rao ve ark., 2014). Biyopolimerler genellikle biyolojik olarak bozunabilir de, bozundukları oran büyük ölçüde farklılık gösterir. Polihidroksibutirat (PHB) gibi bazı biyopolimerler doğal ortamda aylar içinde bozulurken, diğerleri yıllar alabilir. Biyopolimerlerin bozunma hızı, malzemenin yapısına, kristallikliğine ve çevresel koşullara bağlıdır. Poliizoprenoidler gibi biyolojik olarak çözünemeyen bazı biyopolimerler sağlık sorunlarına ve çevrenin kirlenmesine neden olabilir. Bu biyopolimerler, farklı sağlık koşullarına neden olabilir ve zor biyolojik olarak bozunabilir yapıları nedeniyle faunayı ve florayı etkileyebilir (Rao ve diğerleri, 2014). Dolayısıyla, plastiklerin çevresel etkilerini azaltmak için geleneksel petrol temelli polimerlerin yerine polihidroksialkanoatlar

(PHA), polisakkaritler, polilaktit ve alifatik polyesterler gibi biyopolimerler konulmaktadır (Castilho ve ark., 2009). PHA'lar karakteristik biyobozunurluk, sürdürülebilirlik ve çevre dostu özellikleri nedeniyle daha umut vericidir (Reddy ve ark., 2019). Bu nedenle araştırmacılar, biyolojik olarak bozunmayan polimerlerin yerine PHA, polilaktik asit, selüloz, kitosan ve kolajen gibi biyolojik olarak bozunabilir biyopolimerler üretmeye odaklanmışlardır (Steinbüchel, 2005).

1.2.3 Kitin ve Kitosan

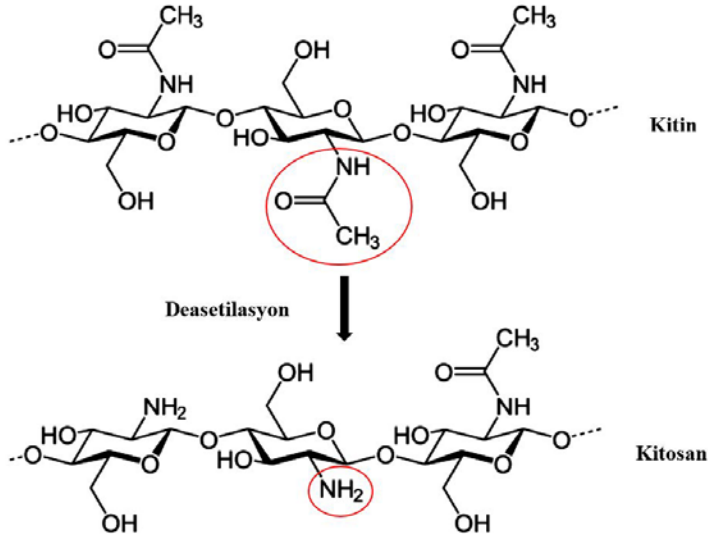
Kitin, dünyada selülozdan sonra en yaygın olarak bulunan ikinci doğal polisakkarittir; omurgasızlarda - kabuklu deniz kabukları veya böcek kütükülleri olarak - aynı zamanda bazı mantar zarflarında, yeşil yosun hücre duvarlarında ve mayalarda bulunur (Croisier and Jérôme, 2013, Varshosaz ve ark., 2007). Kitin, yapısındaki mikrofibrillerin yönelimine dayanarak α , β ve γ olmak üzere 3 form halinde bulunur (Rudall ve ark., 1963). α kitin doğada en fazla bulunan ve antiparalel zincirlerden oluşan formdur. Kabuklu canlıların dış iskeletlerinde, yumuşakçaların ve böceklerin kabuklarında bulunmaktadır (Gardner, Blackwell ve ark., 1975). Doğada nadir olarak bulunan β kitin, paralel zincirler içerir ve mürekkep balığının uzantılarında bulunmaktadır (Herth, Barthlott ve ark., 1979). γ kitin ise paralel ve antiparalel zincirlerin bir karışımından oluşur ve böcek kozalarında bulunmaktadır (Rudall, Kenchington ve ark., 1973).

Bununla birlikte kitin yapısı gereği birçok çözücü içerisinde çözünmemektedir ve bu da kitinin farklı endüstrilerde kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle kitin yapısında bulunan N-asetilglukozaminin deasetilasyonu gibi çeşitli kimyasal modifikasyonlarla kitin ürünlerinin çözünürlüğünün artması sağlanmaktadır (Peter, 2005). Kitinin deasetilasyon derecesi % 50 civarına geldiğinde sulu asidik çözeltiye çözünebilir hale geçer ve bu yapı kitosan olarak isimlendirilir (Rinaudo, 2006). Kitin ve kitosan yapıları Şekil 1.2'de verilmiştir.



Şekil 1.2. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları (Kumar ve ark., 2000)

Kitosan, karides ve yengeç gibi kabukluların dış iskeletinde yaygın olarak bulunan bir biyopolimer olan kitinin alkalın N-deasetilasyonu ile üretilen katyonik bir polimerdir. Kitosanın yapısı glukozamin ve N asetilglukozaminden oluşur (Rampino ve ark., 2013). Kitin ve kitosan arasındaki en büyük fark çözünürlüklerinden kaynaklanmaktadır. Kitosanın sahip olduğu zincirdeki amino grupları, asit etkisiyle protonasyona uğrayarak çoklu katyonik alanlar oluşturmaktadır. Buna bağlı olarak hem polarizasyon hem elektrostatik itme derecesi çözünürlük ile doğru orantılı olarak artmaktadır (Mourya ve ark., 2008). Kitinin deasetilasyonu sonucu kitosan oluşma reaksiyonu Şekil 1.3’de verilmiştir.

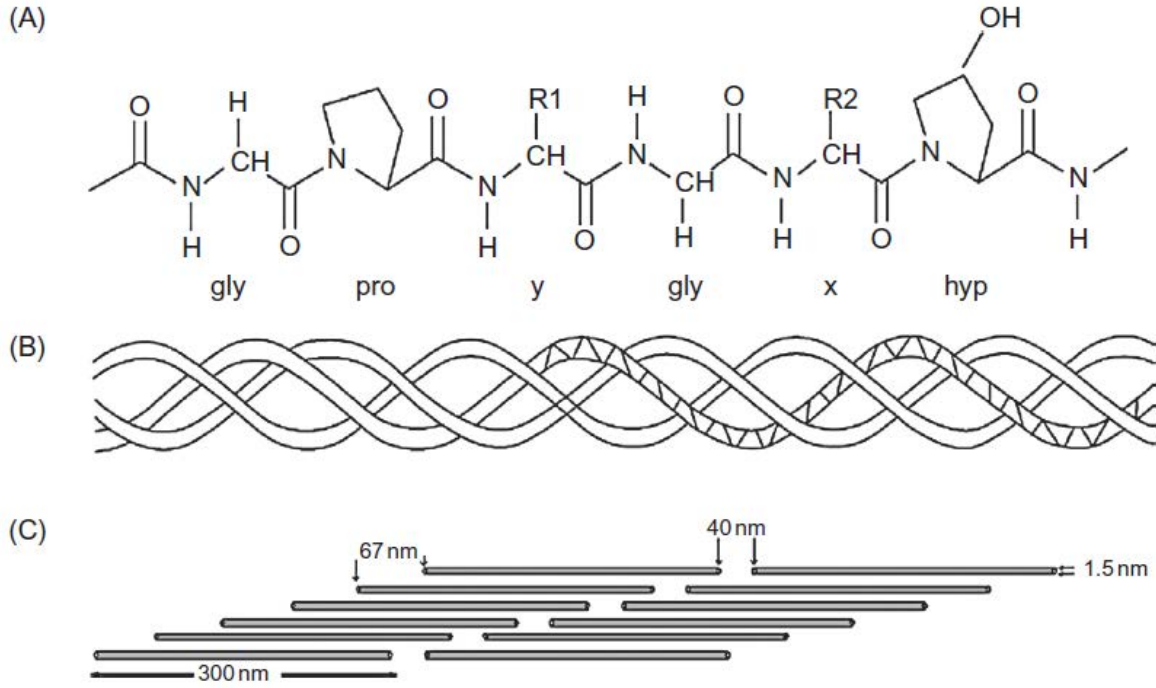


Şekil 1.3. Kitinin deasetilasyonu sonucu kitosan oluşumu reaksiyonu (Ramya ve ark.,2014)

Kitin ve kitosanın birçok alanda muazzam uygulamalara sahip olduğu bilinmektedir (Sini ve ark., 2005). Gıda endüstrisinde, tıbbi alanlarda, kimya endüstrilerinde, tekstilde, atık su arıtma tesislerinde vb. yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Muzzarelli ve ark., 1996). Kitosan; düşük toksisite, biyouyumluluk ve biyobozunurluk gibi birçok benzersiz özelliğe sahiptir (El-Shafei ve ark., 2008). Antimikrobiyal ve düşük toksisite, biyobozunurluk ve biyouyumluluk özellikleri kitosanın gıda, tarım, tıp, eczacılık ve tekstil alanlarında ortaya çıkan uygulamalarını kolaylaştırmaktadır (Y. Gao ve ark., 2008).

1.2.4 Kolajen

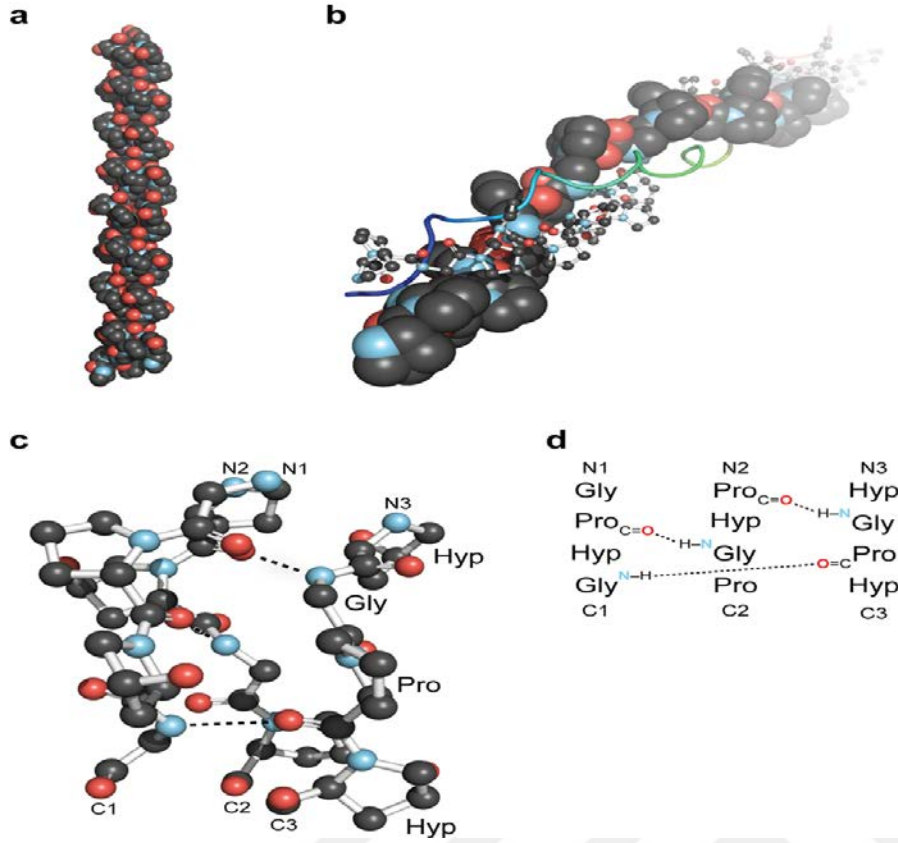
Hayvanlarda en fazla miktarda bulunan protein olan kolajen, kolajen fibrilleri oluşturmak için çapraz bağlı tekrarlayan kolajen monomerlerinin birikimini içeren bir biyopolimerdir (Muyonga ve ark., 2004). Farklı kaynaklardan izole edilmiş 13’ten fazla farklı türde kolajen vardır (Friess, 1998). Temel kolajen yapısı Şekil 4’de verilmiştir.



Şekil 1.4. Kolajenin yapısı. Amino asit dizisi (A), üçlü heliks yapı (B) ve heliks yapıların bir araya gelmesiyle oluşmuş zigzag yapı (C) Gly, glisin; pro, prolin; hyp, hidroksiprolin olarak ifade edilmiştir (Khor, 2014).

Kolajen hayvanlarda farklı dokularda bulunur ve kemiklerin, kas dokularının ısıl stabilitesi ve mekanik dayanımı için hayati öneme sahiptir. Ayrıca ticari olarak kozmetik, deri, gıda, biyomedikal ve eczacılık endüstrisi, doku mühendisliği gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılan önemli bir biyopolimerdir (Liu ve ark., 2012).

Canlı yapısında 13'ten fazla farklı kolajen türü bulunduğu bildirilmiştir. Bu kolajenler, hayvan vücudundaki çeşitli bağ dokusu tipleri üzerinde farklı ve önemli işlevlere sahiptirler. Tip I kolajen çoğunlukla cilt, kemik ve tendon bölgelerinde bulunur. Tip II kolajen çoğunlukla kıkırdakta bulunurken, Tip III kolajen Tip I kolajenin yaygın olduğu bölgelerde az miktarda bulunur (Friess ve ark., 1998). Kolajen molekülünün üç boyutlu yapısı Şekil 1.5'te, çeşitli kolajen tipleri ve organizmadaki dağılımları Tablo 1.2'de verilmiştir.



Şekil 1.5. Kolajenin üçlü sarmal yapısına genel bakış. (a) Kolajen üçlü sarmalının yüksek çözünürlüklü kristal yapısı. (b) Yapıdaki bir dönüşün bilye ve çubuk ile temsil edilmesi (c) b segmentindeki Hidrojen bağı (Shoulders and Raines, 2009).

Tablo 1.2. Çeşitli kolajen tipleri ve vücuttaki dağılımları (Benjakul ve ark., 2012)

Tip	Peptit Zinciri	Moleküler Bileşimi	Bulunduğu Yerler
I	$\alpha 1, \alpha 2$	$[\alpha 1(I)2 \alpha 2(I)]$	Deri, tendon, kemik, kas
II	$\alpha 1$	$[\alpha 1(II)]3$	Omurlar arası disk, kıkırdak
III	$\alpha 1$	$[\alpha 1(II)]3$	Fetal deri, kardiyovasküler damar, uterus, sinovyal sıvı, iç organ, kas
IV	$\alpha 1, \alpha 2$	$[\alpha 1(IV)]3$	Bazal membran, böbrek glomerüller, lens kapsül
V	AA, αB , αC	$[\alpha B2\alpha A$ ya da $(\alpha B)3$ + $(\alpha A)3$ ya da $(\alpha C)3$	Plasental membran, kardiyovasküler sistem, akciğer, kas

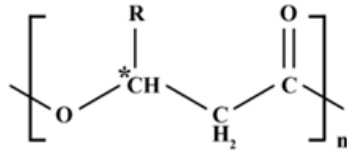
Kolajen günümüzde yaygın olarak büyükbaş ve küçükbaş hayvanlar gibi karasal hayvan kaynaklarından elde edilir. Bu kaynaklardan yüksek miktarda atık meydana geldiği için kolajenin elde edilmesi ekonomik ve kolay olmakla birlikte elde edilen kolajenin denatürasyon sıcaklıkları yüksektir ve bu karasal hayvan kaynakları birçok dini ve etnik grup tarafından kullanılmaya uygun değildir (Easterbrook ve Maddern, 2008). Domuzdan elde edilen kolajenlerin yasaklanması nedeniyle kolajen kaynağı Müslüman toplumlar için önemlidir. Hindular ise dini inançları nedeniyle inek temelli ürünler tüketmemektedirler (Sadowska ve ark., 2003). Bunun yanı sıra bulaşıcı spongiformensefalopatiler, deli dana hastalığı, ayak ve ağız hastalığı gibi hastalıkların ortaya çıkışı ile bu hastalıkları taşıyabilen hayvanlardan elde edilmiş kolajenin tüketicide şüphe ile karşılanmasına yol açmıştır. Bu gereksinimler, alternatif kolajen kaynaklarını geliştirme ihtiyacını beraberinde getirmiştir. Yüksek kullanılabilirliği, hastalık bulaşma riskinin düşük olması, yüksek kolajen verimi ve dini engel olmaması nedeniyle, deniz ürünleri potansiyel alternatif kolajen kaynakları olarak kabul edilmiştir (Liu ve ark., 2007). Bu nedenle, karasal hayvan kolajen kaynaklarını değiştirmek için su hayvanlarının (tatlı su veya deniz balıkları ve yumuşakçalar dahil) kullanımı üzerine araştırmalar giderek daha fazla ilgi çeker hale gelmiştir (Huang ve ark., 2016). Bu kaynakların kolajen üretimi için kullanılması aynı zamanda bu atıklardan kaynaklanan çevre kirliliğinin azaltılmasına da yardımcı olmaktadır (Chen ve ark., 2016).

1.2.5. Polihidroksialkanoatlar

Polihidroksialkanoatlar (PHAlar) ilk olarak Fransız bilim adamı Lemoigne tarafından 1925 yılında *Bacillus megaterium*'dan elde edilmiştir. İlk olarak elde edilen ve tanımlanan PHA, poli (3-hidroksibutirat) (PHB) olmuştur (Chee ve diğ. 2010). Polihidroksialkanoatlar, N, P, S, O veya Mg gibi besin elementlerinin sınırlı olduğu ve aşırı karbon kaynağının mevcut olduğu şartlarda birçok mikrobiyal tür tarafından indirgeyici güç, depolama bileşiği veya karbon ya da enerji kaynağı olarak biriktirilen hidroksialkonatların polyesterleridir (Chua ve ark., 2003). Fizikokimyasal özellikleri petrokimyasal plastiklere benzer olan bu polyesterler mikroorganizmalardaki depo granüllerinde intraselüler olarak biriktirilirler (Gürtekin, 2008). Tam biyobozunurlukları ve geleneksel petrol bazlı plastiklerle benzer özellikleri nedeniyle, PHAlar, büyük bir pazar potansiyeline sahip en umut verici biyoplastiklerden biri olarak kabul edilmektedir (Salehizadeh ve Loosdrecht, 2004).

PHAların biyoyumlulukları, düşük antijenik potansiyelleri ve diğer üstün özellikleri bu bileşikler biyomühendislikte kullanılabilecek en uygun biyomateryallerden biri haline getirmiştir. Bu polyesterler, monomer bileşimlerini değiştirerek kontrol edilebilecek çok çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir (Masaeli ve ark., 2013; Arcos-Hernández ve ark., 2013). PHAlar, monomerlerindeki karbon atom sayısına bağlı olarak 3 sınıfa ayrılmaktadır. Kısa zincirli PHAlar 3 ila 5 karbon atomu içermektedir. Orta zincirli PHAlar 6 ila 14 karbon atomu içermektedir. Uzun zincirli PHAlar 15 veya daha fazla karbon atomu içermektedir (Khanna ve ark., 2005). PHAların isimlendirilmeleri Şekil 1.6’da verilmiştir.

Biyolojik olarak parçalanabilen ve biyoyumlu bir biyopolimer olarak PHA’lar, diğer proteinlerle birlikte sağlıkla ilgili diğer tedaviler arasında yara iyileşmesinde kullanılabilen kompozitler oluşturmak için kullanılırlar (Quillaguamán et al., 2010). Çeşitli PHA türleri arasında PHB ve poli (3-hidroksibütirat-3-hidroksiparat) (PHBV), araştırmacılar ve endüstriler tarafından biyomedikal uygulamalar için yaygın olarak kullanılmaktadır (Tan ve ark., 2014).



R grubu	Karbon No	PHA biyopolimeri adı
Metil	C ₄	Poli(3-hidroksibütirat)
Etil	C ₅	Poli(3-hidroksivalerat)
Propil	C ₆	Poli(3-hidroksihegzanat)
Bütil	C ₇	Poli(3-hidroksiheptanat)
Pentil	C ₈	Poli(3-hidroksioktanat)
Hegzil	C ₉	Poli(3-hidroksinonanat)
Heptil	C ₁₀	Poli(3-hidroksidekanat)
Oktil	C ₁₁	Poli(3-hidroksiundekanat)
Nonil	C ₁₂	Poli(3-hidroksidodekanat)
Desil	C ₁₃	Poli(3-hidroksitridekanat)
Undesil	C ₁₄	Poli(3-hidroksitetradekanat)
Dodesil	C ₁₅	Poli(3-hidroksipentadekanat)
Tridesil	C ₁₆	Poli(3-hidroksihegzadekanat)

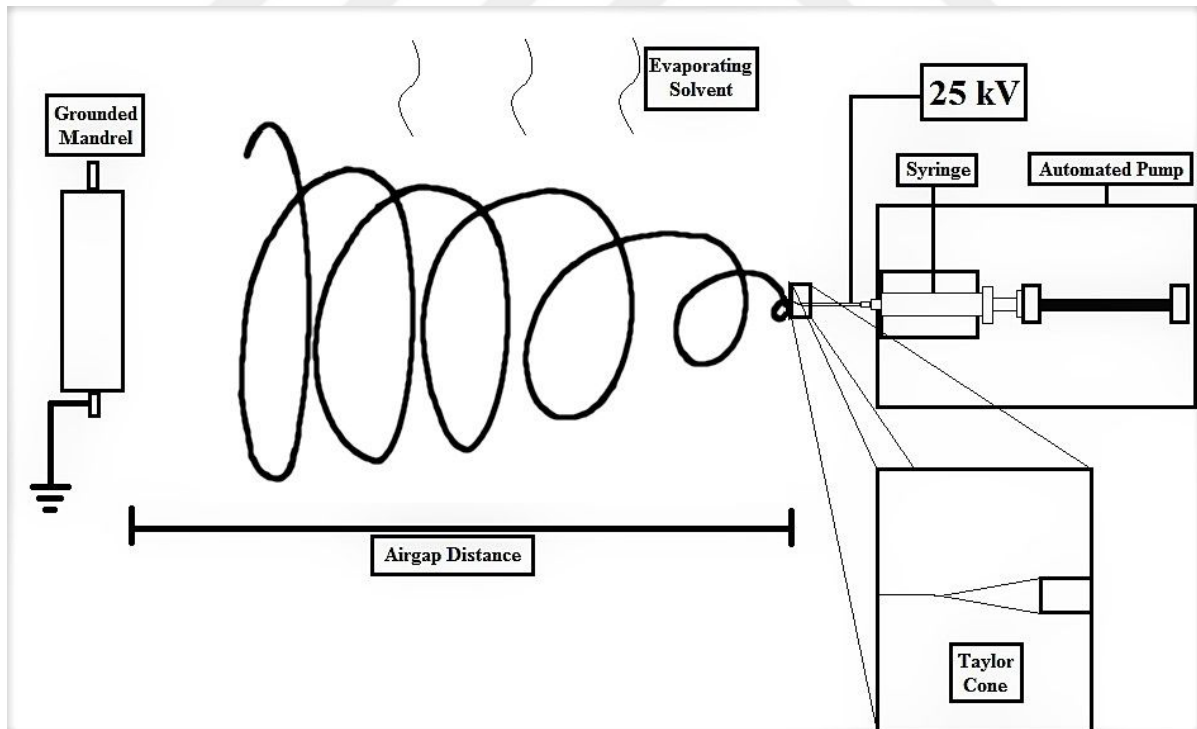
Şekil 1.6. PHA’ların kimyasal yapısı ve bazı adlandırmaları (Lu ve ark., 2009).

PHA üzerine yapılan araştırmalar sağlık hizmetlerini olumlu yönde etkileyen çeşitli tıbbi malzemelerin; dikişler, doku onarım ve rejenerasyon cihazları, eklem kıkırdak onarım cihazları, sinir kılavuzları, kemik iliği iskeleleri vb. üretimini mümkün kılmıştır. (Chen ve Wu, 2005, Koller ve ark., 2010). PHA’lar insanların günlük yaşamlarında daha fazla kabul görmektedir. Kişisel hijyen ürünleri ambalajı, tek kullanımlık sofras paspasları olarak kullanılmaktadırlar ve ayrıca biyolojik olarak parçalanabilen geleneksel plastik torbaların yerini almıştır (Chen, 2010).

Avantajlarına rağmen, PHA üretimi ucuz ve kolayca temin edilebilen petrokimyasal plastiklerle karşılaştırıldığında maliyetlidir (Anterrieu ve ark., 2014).

1.2.6. Elektrospindleme

Nanomateriyaller, çok küçük ölçekte üretilen ve kullanılan kimyasal maddeler veya malzemelerdir. Nanoteknoloji uygulamalarıyla pek çok farklı alanda çok daha kuvvetli ve hafif materyallerin üretilmeleri mümkün olmuştur. Elektrospindleme özellikle biyosensörler, doku mühendisliği ve enzim immobilizasyonu gibi uygulamalar için nanoteknolojide nanomateriyallerin üretilmesinde kullanılan yöntemlerden biridir. Elektrospindleme işlemi bir iğnenin ucundaki polimer çözeltisi damlacığı ile toplayıcı plaka arasında bir elektrik alanı oluşturmak üzere yüksek voltajın kullanılmasını içerir. Voltaj kaynağının bir elektrotu çözeltiye yerleştirilir ve diğeri bir elektrik kuvveti yaratacak şekilde toplayıcıya bağlanır. Voltajdaki artış, elektrik alanını artırır ve iğnenin ucunda polimer çözeltisinin birikmesine neden olur. Elektrostatik kuvvet damlacığın yüzey gerilimini aştığında, sürekli bir polimer çözeltisi jeti iğne ucundan toplayıcıya doğru püskürtülür. Bu esnada çözelti buharlaşır ve toplayıcının yüzeyinde dokunmamış bir katı lif mat oluşur (Balguid ve ark., 2009). Elektrospindleme yöntemi Şekil 1.7’de gösterilmiştir.



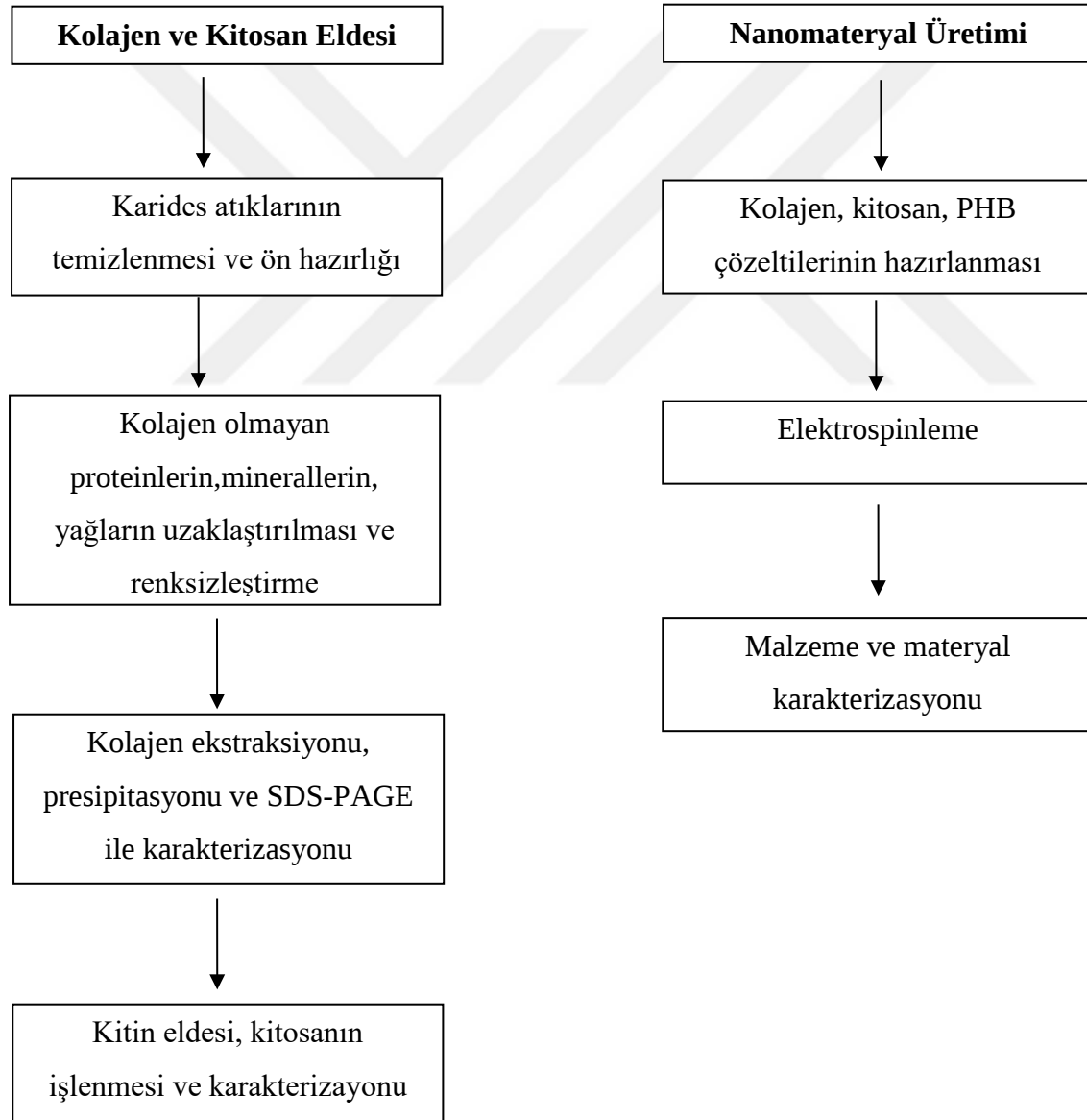
Şekil 1.7. Basit Elektrospindleme gösterimi (Feltz ve ark., 2017).

Elektrospinning teknolojisi ile hazırlanan fiberler, neredeyse dairesel kesitlere, pürüzsüz yüzeylere ve birkaç nanometreden birkaç mikrometreye kadar çaplara sahiptirler (Zhang ve ark., 2005). Bu fiberler ilaç taşınması, tıbbi implantlar, diş restorasyonu için nanokompozitler, biyoaktif ajanların korunması, biyosensörler, doku mühendisliği, yara örtüsü ve koruyucu giysiler için büyük uygulanabilirlik alanlarına sahiptir (Zhang ve ark., 2005, Inai ve ark., 2005, Huang ve ark., 2003).

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Araştırma Yöntemi

Çalışmamızda kullandığımız araştırma yönteminin bir özeti Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Metodun şematik gösterimi

2.2. Ekipman

-20 °C Buzdolabı	: Regal (Türkiye)
4 °C Buzdolabı	: Regal (Türkiye)
-86 °C Diferansiyel Dondurucu	: Thermo Electron Corp., Forma ULT (ABD)
Santrifüj	: Sigma Laboratory Centrifuges, 3k30 (Almanya)
Taramalı kalorimetre	: Pyris Diamond DSC Perkin Elmer (ABD)
Distile su cihazı	: Millipore, Rios-DI UV (ABD)
Elektroforez güç kaynağı	: Apelex, PS9009 TX (Fransa)
Electroforez sistemi	: Bio-Rad, Mini Protean Tetra Cell (ABD)
Electrospinning cihazı	: Inovenso, NE3 (Türkiye)
FTIR	: PerkinElmer spectrum 100 ATR-FTIR. (ABD)
İnkübatör	: Nüve, EN 055 (Türkiye)
Manyetik karıştırıcı	: Chiltren, HS 31 (İngiltere)
Orbital çalkalayıcı	: IKA-Werke, OS 10 B (Almanya)
pHmetre	: Toledo Mettler,S20 SevenEasy (İsviçre)
Pipet	: Toledo Mettler,Rainin (ABD)
SEM	: Philips XL30 ESEM-FEG/EDAX (Hollanda)
Spektrofotometre	: Thermo Scientific, Helios Zeta UV-VIS (ABD)
Tansiyometre	: Kruss Easy Drop DSA-2 (Almanya)
Vortex cihazı	: Fisons, Whirl mixer (İngiltere)
Su banyosu	: Clifton Digital Shaker Bath, 0-100 °c (İngiltere)
Tartım / Hassas Terazı	: Sartorius Analytic, A200S ± 0,0001 (Almanya)

2.3. Kimyasallar

Sodyum hidroksit, sodyum klorür, n-bütanol, asetik asit, disodyum etilendiamintetraasetat, (Na₂EDTA), metanol, asetonitril, hidrojen peroksit, sülfürik asit, hidroklorik asit, sodyumtiyosülfat, 1,1,1,3,3,3-hekzafloroizopropanol, akrilamid, bisakrilamid, TEMED, Tris-Baz, sodyumdodesil sülfat, PHBV. Tüm kimyasallar analitik saflıktadır ve daha fazla saflaştırılmadan kullanılmıştır.

2.4. Karides Atıklarının Temizlenmesi ve Ön Hazırlığı

Karides atıkları Group Sagun Tekirdağ balık işleme fabrikasından dondurulmuş şekilde temin edilmiştir. Bütün denemeler çalışma boyunca ısıya bağlı kolajen fragmentasyonun önüne geçilebilmesi için 4 °C’de soğuk odada 150 devir/dakika orbital karıştırıcıda gerçekleştirilmiştir.

Karides atıkları önce bol soğuk su ile birkaç kez yıkanarak gözle görülen partiküllerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra küçük parçalara bölünerek çalışma gerçekleştirilene kadar -80 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

2.5. Kolajen Ekstraksiyonu

Karides kabuklarından kolajenin uzaklaştırılması ve karakterizasyonu Nagai ve Suzuki’ye göre bazı ufak değişiklikler ile gerçekleştirildi (Nagai ve Suzuki, 2000)

2.5.1. Kolajen Olmayan Proteinlerin Uzaklaştırılması

Karides kabuğundaki kolajen olmayan proteinlerin uzaklaştırılabilmesi için karides kabuklarından 400g tartılarak üzerlerine 1250 mL 0,1 M NaOH çözeltisi eklendi. Karışım orbital çalkalayıcıda 150 rpm dönüş hızında 4 °C’de 24 saat boyunca karıştırıldı. Sürenin sonunda çözelti süzüldü ve işlem tekrar 1250 mL 0,1 M NaOH çözeltisi ile tekrarlandı.

İşlem bittikten sonra tekrar süzülen karides kabukları nötral pH elde edilinceye kadar saf su ile yıkandı.

2.5.2. Minerallerin Uzaklaştırılması

Karides kabuklarındaki kalsiyum ve benzeri minerallerin uzaklaştırılması için kolajen olmayan

proteinleri uzaklaştırılmış olan karides kabukları 2 L, 0,5M Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ile orbital çalkalayıcıda 150 rpm dönüş hızında 4 °C’de 24 saat boyunca karıştırıldı. İşlem sonunda süzülen karides kabukları minerallerin tamamen uzaklaşmasını sağlamak amacıyla tekrar 2 L 0,5 M EDTA (pH 8) ile muamele edildi ve daha sonra süzülerek nötral pH’ya gelene kadar saf su ile yıkandı.

2.5.3. Yağların Uzaklaştırılması

Karides kabuklarında bulunan yağlar ve yağlı materyallerin uzaklaştırılması için atıklar 500 mL %10 n-bütanol çözeltisi ile orbital çalkalayıcıda 150 rpm dönüş hızında 4 °C’de 24 saat boyunca muamele edildi. Bu işlemin sonunda karides atıkları tekrar 500 ml %10 n-bütanol ile belirtilen şartlarda karıştırıldı ve süzüldü. Atıklar saf su ile yakandı.

2.5.4. Kolajen Ekstraksiyonu

Ön temizleme ve hazırlama aşamalarından geçen karides kabuğu atıkları 40 °C sıcaklıkta etüvde 2 saat boyunca kurutuldu ve tartıldı. Daha sonra karides kabuğu atıkları 600 mL 0,5 M asetik asit (1:10) ile 4 °C’de 24 saat boyunca kolajen ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Sürenin sonunda karışım süzüldü ve kolajenin tamamen alınabilmesi için karides atıkları bir kez daha 600 mL 0,5 M asetik asit ile muamale edildi. Süzme işleminin ardından elde edilen sıvılar birleştirildi ve 15000 g’de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin sonunda elde edilen sıvılar kolajen presipitasyonu için kullanıldı. Süzme işleminin sonunda elde edilen katılar ise kitin eldesi için kullanılmak üzere 80°C sıcaklıkta 12 saat boyunca kurutuldu, öğütüldü ve tartıldı.

2.5.5. Kolajen Presipitasyonu ve Diyaliz

Kolajen ekstraksiyonu sırasında santrifüj sonucunda elde edilen sıvıların hacmi ölçüldü ve toplam konsantrasyon 0,9 M olacak şekilde katı NaCl sürekli karıştırma altında 4 °C’de yavaş yavaş ilave edildi. Karışım 12 saat boyunca orbital çalkalayıcıda 150 rpm dönüş hızında 4 °C’de karıştırıldı ve daha sonra karışım 15000 g’de 30 dakika santrifüjlendi. Elde edilen kolajen çöktürücü yeniden mümkün olduğu kadar az miktarda 0,5 M asetik asit içerisinde çözündü ve tuzların uzaklaştırılması için diyaliz işlemine tabi tutuldu.

Diyaliz işleminin gerçekleştirileceği diyaliz membranı 3 saat boyunca akan musluk suyu altında yıkandı. Daha sonra sırasıyla %0,3 Na₂SO₃ (a/h) ile 80°C’de 1 dakika, 60°C sıcaklıktaki saf

suda 2 dakika, %0.2 M H₂SO₄ (a/a) ile birkaç saniye muamele edilen diyaliz membranı saf su ile yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi. Kolajen çözeltisi diyaliz membranına dolduruldu ve her 4 saatte bir diyaliz çözeltisi değiştirilerek önce 0.5 M asetik asit (24 saat), sonra 0,1 M asetik asit (24 saat) ve en son olarak saf suya karşı (24 saat) 4 °C sıcaklıkta ve sürekli olarak karıştırılarak diyaliz edildi.

Diyaliz işlemi sonunda diyaliz membranı açıldı, diyalizat cam bir petri kabına alınarak liyofilize edildi. Liyofilizasyon sonucu elde edilen kolajen tartıldı ve kullanımına kadar -80 °C derin dondurucuda saklandı.

2.5.6 Kolajen Karakterizasyonu

Karides kabuğundan elde edilen kolajen örneğinin karakterizasyonu SDS-PAGE ile belirlendi (Laemmli, 1970). Bu amaçla %4 sıralama jeli (3 mL %29,2 akrilamid/ %0,8 bisakrilamid, 2,5 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 200 µL %10 SDS, 15 mL destile su, 70µL amonyumperoksidosülfat, 20 µL TEMED) ve %8 ayırma jeli (26 mL %29,2 akrilamid/ %0,8 bisakrilamid, 16,25 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 650 µL %10 SDS, 21,64 mL destile su, 350µL amonyumperoksidosülfat, 70 µL TEMED) üreticinin talimatlarına göre hazırlandı ve jel kasetlerinin içine döküldü.

Jelin hazırlanmasından sonra kolajen örneği 200 µL 0,5 M asetik asit içerisinde çözüldü ve üzerine 200 µL PAGE yükleme tamponu (1 mL 1M Tris-HCl (pH 6,8), 1,6 mL gliserin, 0,2 mL %10 SDS, 0,4 mL %25 DTT, 8 mL destile su, eser miktarda bromfenol mavisi) eklendi. Kaynar su banyosunda 4 dakika boyunca örnekler denatüre edildi ve her bir kuyuya 35 µg protein gelecek şekilde kuyulara tatbik edildi. Ayrıca ilk kuyuya geniş aralıklı protein elektroforez marker çözeltisi konuldu. Elektroforez haznesine yürütme tamponunun (%0,3 Tris-Baz, %1,5 glisin, %0,01 SDS) ilave edilmesinden sonra önce 30 dakika boyunca jel başına maksimum akım 20 mA, sonrasında ise jel başına maksimum akım 30 mA olacak şekilde elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

Elektroforez işleminin sonunda jel çıkarıldı, saf suyla yıkandı ve fiksasyon çözeltisi (%50 metanol, %10 asetik asit) ile 12 saat süreyle fikse edildi. Daha sonra jel 24 saat boyunca koloidal Coomasie boya çözeltisi ile muamele edildi. Sürenin sonunda boya çıkarma çözeltisi (%10 asetik asit) ile 24 saat boyunca fazla boya çıkarıldı ve jeller görüntülendi.

2.6. Kitin Ekstraksiyonu ve Kitosan eldesi

Karides kabuğu atıklarından kitinin eldesi ve elde edilen kitinden kitosanın üretilmesi Benhabiles ve diğerlerine göre bazı değişiklikler ile gerçekleştirilmiştir (Benhabiles ve ark., 2012).

2.6.1. Kitin Ekstraksiyonu

Bölüm 2.5.4’de kolajen ekstraksiyonu sonucu geride kalan karides kabuğu atıkları kitinin elde edilmesinde kullanıldı. Bu amaçla kurutulmuş ve öğütülmüş olan karides kabuğu atıkları NaOH ile pH’sı 10’a ayarlanmış olan 200 mL %4 H₂O₂ (a/h) çözeltisi ile 24 saat boyunca muamele edilerek renksizleştirildi. İşlem sonrasında, nötral pH elde edilene kadar saf su ile yıkanan, süzülen ve kurutulan karides kabukları 1.25 N HCl ile oda sıcaklığında 24 saat boyunca daha ileri demineralize edildi. Elde edilen karışım süzüldü, çökelti saf su ile yıkandı ve 160°C’de 4 saat boyunca kurutularak kitin elde edildi. Elde edilen kitin tartıldı ve kitosan üretimi için kullanıldı.

2.6.2. Kitosan Hazırlanması

Kitosan kitinin alkali ortamda deasetilasyonu ile elde edildi. Bu amaçla 4 g ince öğütülmüş kitin 200 mL %50 NaOH çözeltisi ile 12 saat boyunca 70°C sıcaklıkta sürekli karıştırılarak muamele edildi. Süre sonunda oluşan beyaz renkli katı madde vakum altında filtrasyon ile süzüldü ve nötral pH elde edilinceye kadar saf su ile yıkandı ve daha sonra safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla %80 (a/h) etanol ile yıkanan çökelti 60°C sıcaklıkta 4 saat kurutuldu ve elde edilen kitosan kullanımına kadar oda sıcaklığında kapalı bir kap içinde muhafaza edildi.

2.6.3. Kitosanın Karakterizasyonu

Elde edilen kitosanın deasetilasyon derecesi asit-baz titrasyonu metodu ile belirlendi. Bu amaçla 0,1 g kitosan 30 ml 0.1 M HCl çözeltisinde çözüldü ve metil oranj varlığında 0.1 M NaOH ile titre edildi. Deasetilasyon derecesi C₁ ve V₁ HCl konsantrasyonu ve hacmi, C₂ ve V₂ ise NaOH konsantrasyonu ve hacmi, m ise kitosanın ağırlığı olmak üzere;

$DD = (C_1 V_1 - C_2 V_2) / m \times 0,0994 \times 0,016$ formülüne göre hesaplandı.

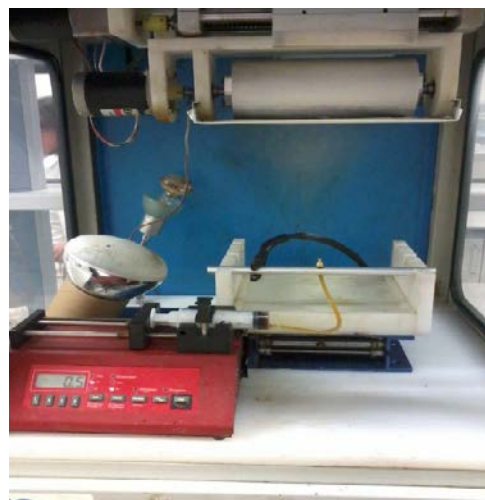
2.7. Elektrospinleme

Elektrospinleme işleminin gerçekleştirilmesi için kolajen, kitin, kitosan ve PHBV % 4 konstanstrasyonda ayrı ayrı 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-izopropanol içinde 24 saat boyunca karıştırılarak çözüldü. Daha sonra çözeltiler oda sıcaklığında karıştırıldı.

Daha sonra kolajen/kitin/PHBV matlarının hazırlanması için PHBV, kitin ve kolajen çözeltilerinin her birinden 5 mL alınarak 15 mL hacminde çözelti hazırlandı ve karıştırıldı. Eş zamanlı olarak PHBV/Kitosan/Kolajen matlarının hazırlanması için PHBV, kitosan ve kitin çözeltilerinden 5 mL alınarak 15 mL çözelti hazırlandı. Elektrospin işlemi Nano FMG NE100 elektrospin cihazında gerçekleştirildi.

Önce kolajen/PHBV/kitin çözeltisinin elektrospini için, 15 cm'lik bir mesafede 20 ila 25 kV arasında bir voltaj güç kaynağına ve saatte 0.5 ml'lik bir pompalama / akış hızına bağlı bir metal iğneye 15 ml % 4 kolajen/PHBV/kitin çözeltisi verildi. Liflerin çapını azaltmak için düşük akış hızı saatte 0.5 mL olarak seçildi. Uygulanan voltajın yardımıyla, toplayıcıya (alüminyum folyo) doğru bir sıvı jeti çıkarıldı ve bir materyal oluşturuldu.

Daha sonra kolajen/kitosan/PHBV çözeltisi için aynı koşullar altında elektrospin işlemi gerçekleştirildi. Kolajen/kitosan/PHBVçözeltisinin viskozitesi daha düşük olduğu için akış hızı saatte 1.0 mL olarak seçildi. Toplayıcıya (alüminyum folyo) doğru bir sıvı jeti çıkarıldı ve nanofiber ağ oluşturuldu. Elde edilen nanofiber mat dikkatli bir şekilde toplayıcıdan ayrıldı ve SEM yöntemi ile analiz edildi.



Şekil 2.2.Kullanılan elektrospin cihazı

2.8. Malzeme ve Materyal Karakterizasyonu

Hazırlanan nano lifli yapı iskelelerinin morfolojisi SEM (Philips XL30 ESEM FEG / EDAX) kullanılarak incelenmiştir. Numuneler analizden önce altın ile kaplanmıştır. ATR – FT-IR ölçümü için bir FT-IR spektrometresi (Perkin Elmer Spectrum100 ATR-FTIR) kullanılmıştır.

Nanofiber matların temas açıları (θ), bir şırınga kullanılarak damlaların oluşturulduğu damla test yöntemi ile ölçülmüştür. Ölçümler, 3-5 μ l damıtılmış su kullanılarak yapılmıştır. Numune için en az üç ölçüm yapılmış ve ortalamaları alınmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Karides atıklarının temizlenmesi, ön hazırlık ve kolajen ekstraksiyonu

Karides atıklarının işlenmeden önceki ve sonraki görüntüleri Şekil 3.1’de verildi. Hazırlık aşamasında karides kabuklarında gözle görünen safsızlıklar uzaklaştırıldı ve daha sonra Bölüm 2.5.1-3’de anlatılan aşamalarla karides kabuklarındaki kolajen olmayan proteinlerin, minerallerin ve yağların uzaklaştırılması gerçekleştirildi. 400 g ham ıslak karides kabuğu ile başlanan çalışmada bu aşamaların sonucunda kolajen ekstraksiyonuna hazır kuru karides kabuğu atığı 67 g olarak belirlendi. Örnekler deniz ürünü işleme fabrikasından temin edildiğinden ve bu işletmede temizleme makinesi yardımıyla atıkların oluşturulduğu göz önüne alındığında bu kayıpların normal olduğu düşünülmektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda atıklarda benzeri kayıplarla karşılaşıldığı belirlenmiştir (Ki ve ark., 2014).



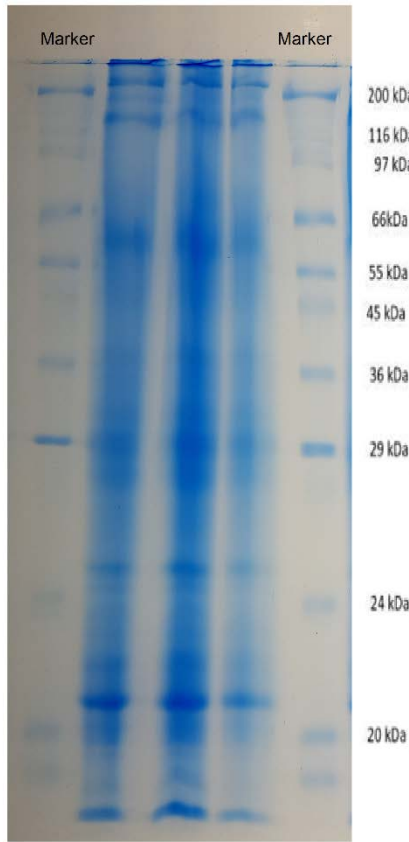
Şekil 3.1. Karides kabuğu atıklarının ön hazırlık öncesi ve sonrası görüntüsü

Kolajen ekstraksiyonu asetik asit kullanılarak Bölüm 2.5.4’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi ve elde edilen kolajen diyaliz yöntemiyle tuzundan uzaklaştırılarak liyofilizasyon yöntemi ile katı halde elde edildi. Elde edilen kolajen miktarı 1,34 g olarak belirlendir. Karides kabukları

türden türe farklılık göstermekle birlikte yaklaşık olarak %25 protein, %20 kitin ve %50 kalsiyum karbonattan oluşurlar. Bu proteinin sadece %60 kadarı kolajenden oluşmuştur. Karides kabuklarından jelatin hazırlanmasının optimizasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada jelatin verimi %15-20 olarak belirlenmiştir (Ki ve diğ. 2014). Bizim çalışmamızdaki kolajen verimimiz bu çalışmayla benzerlik göstermektedir.

3.2. Kolajen Karakterizasyonu

Kolajen karakterizasyonu SDS-PAGE yöntemiyle gerçekleştirildi ve elde edilen SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 3.2’de verildi.

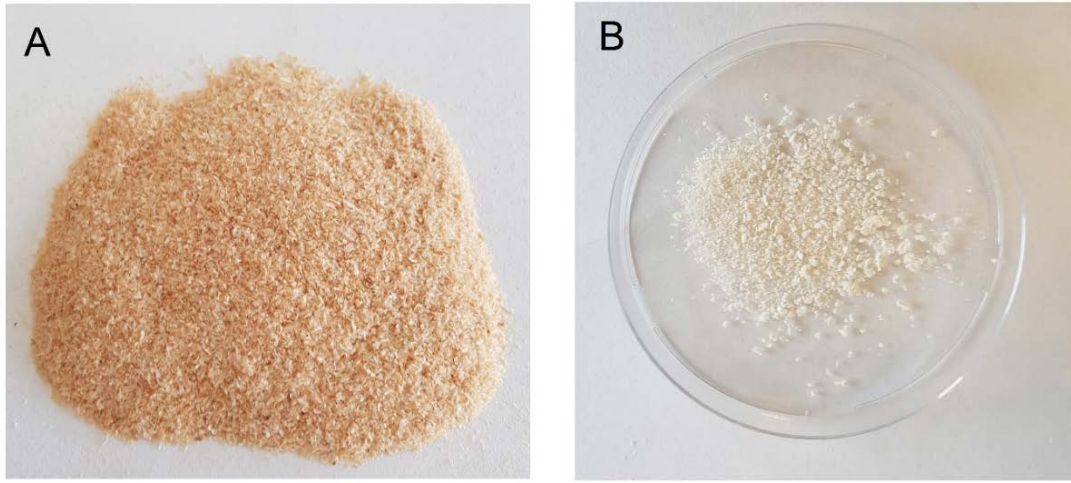


Şekil 3.2. *Penaeus kerathurus* atıklarından elde edilen SDS-PAGE görüntüsü

Elektroforez görüntüsü incelendiğinde en üstte Tip I kolajene ait karakteristik protein bantları gözükmemektedir. Bununla birlikte kolajende fragmentasyonların meydana geldiği ve daha küçük molekül ağırlıklı bantların olduğu görülmektedir. Mantis Karidesi ile yapılan bir yayında bu karides örneklerinden asit çözünür kolajen saflaştırılmış ve SDS-PAGE yöntemi ile karakterize edilmiştir. Elde edilen SDS-PAGE grafiği bizim çalışmamıza benzer daha düşük molekül ağırlıklı bantları içermektedir (Jose ve ark., 2014). Bu sonuçları ışığında bu bantların karides kolajenine özgü olduğu ileri sürülebilir.

3.3. Kitin ekstraksiyonu ve kitosan eldesi

Karides kabuğu atıklarından kitin ve kitosan eldesi Bölüm 2.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Kolajen ekstraksiyonu sonrasında elde edilen kuru karides kabuğu artıkları 60.4 g olarak tartıldı. İşlemler sonrasında elde edilen kitin miktarı 48,7 g olarak belirlendi. Bu kitinden alınan 4g'lık bir örnek kullanılarak gerçekleştirilen kitosan eldesi işlemleri sonrasında elde edilen kitosan 1.27 g olarak tartıldı. Karides kabuğu atıklarından elde edilen kitin ve kitosanın görüntüsü Şekil 3.3.'de verilmiştir.



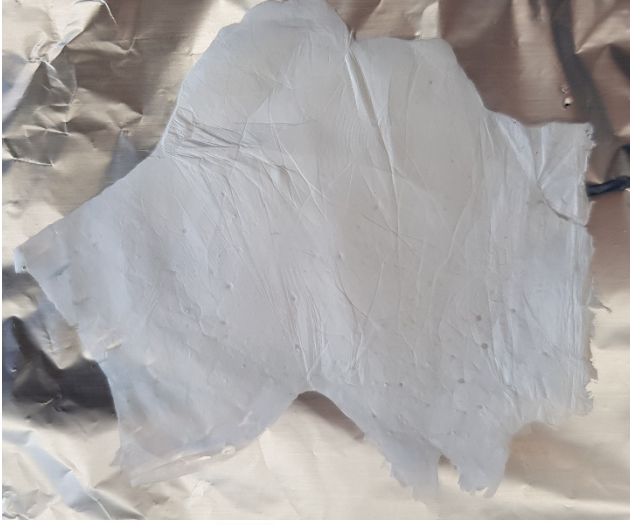
Şekil 3.3. Karides kabuğu atıklarından elde edilen A- Kitin, B- Kitosan görüntüsü.

Literatürde farklı türlerde karides kabuklarından kitin ve kitosan eldesine ait yayınlar incelendiğinde kitin ve kitosan veriminin çalışmamızda elde edilen değerlerle karşılaştırılabilir olduğu belirlenmiştir (Khanafari ve ark., 2008, Kandile ve ark., 2018).

Elde edilen kitosanın asetilasyonu asit baz titrasyonu ile gerçekleştirildi ve elde edilen kitosanın deasetilasyon yüzdesi % 89.14 olarak belirlendi. Bu sonuç benzeri yayınlarla karşılaştırıldığında kitin deasetilasyonunun başarıyla gerçekleştirildiği görülmüştür (Khanafari ve ark., 2008, Kandile ve ark., 2018).

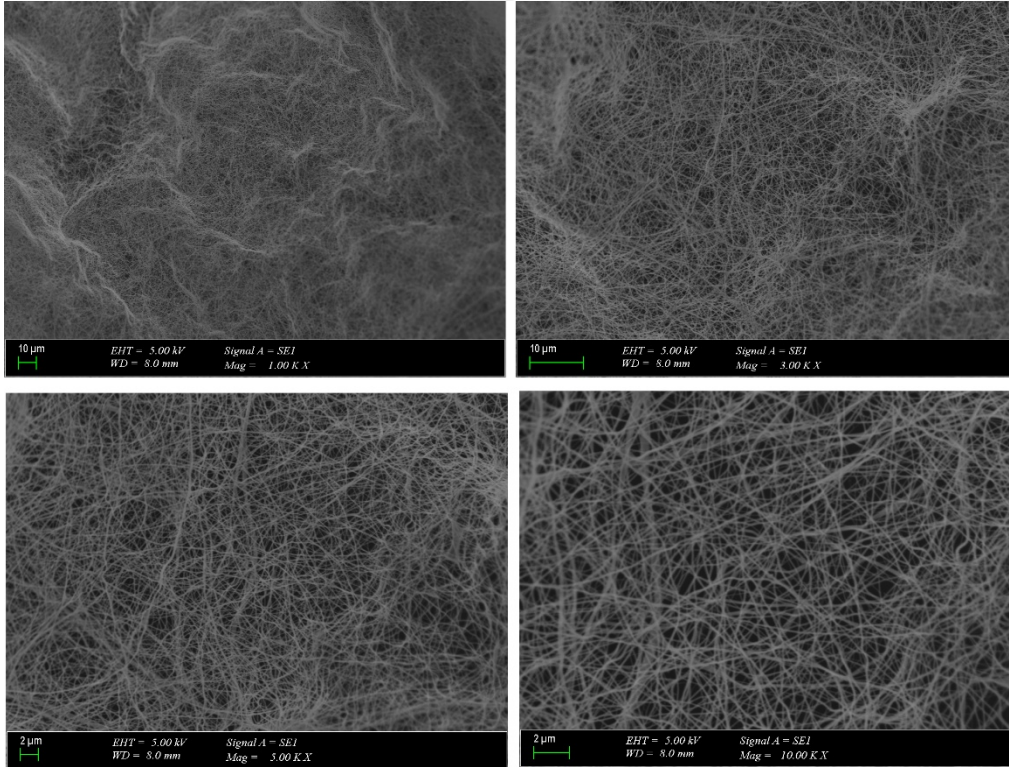
3.4. Elektrospindleme ve Karakterizasyon

Karides kabukları atıklarından elde edilen kolajen, kitin ve kitosan ve bunun yanı sıra ticari olarak satın alınmış PHBV kullanılarak elektrospindleme yoluyla materyal üretimi Bölüm 2.7'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kolajen/Kitosan/PHBV kompozit materyalin görüntüsü Şekil 3.4'de verildi.

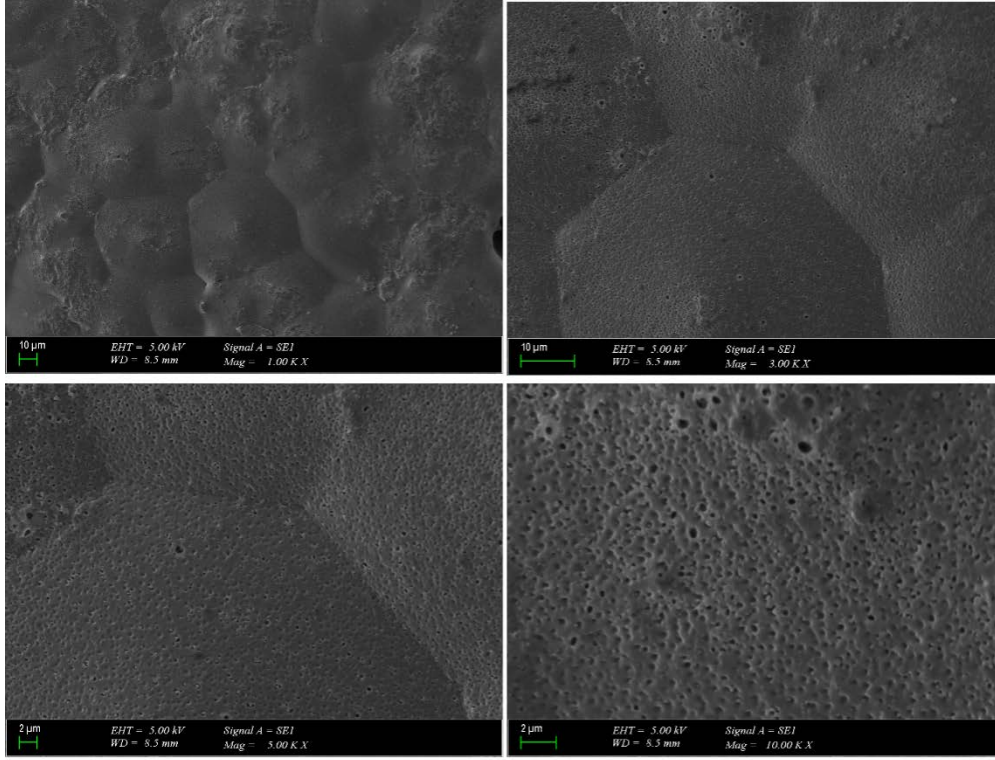


Şekil 3.4. Kolajen/Kitosan/PHBV nanofiber mat görüntüsü

Elektrospindleme ile elde edilen kolajen/kitosan/PHBV ve kolajen/kitin/PHBV materyalleri Bölüm 2.8.2’de anlatıldığı gibi SEM, FTIR ve temas açıları ile karakterize edildi. Kolajen/kitosan/PHBV ve kolajen/kitin/PHBV materyallerine ait SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 3.5 ve 3.6’da verilmiştir.



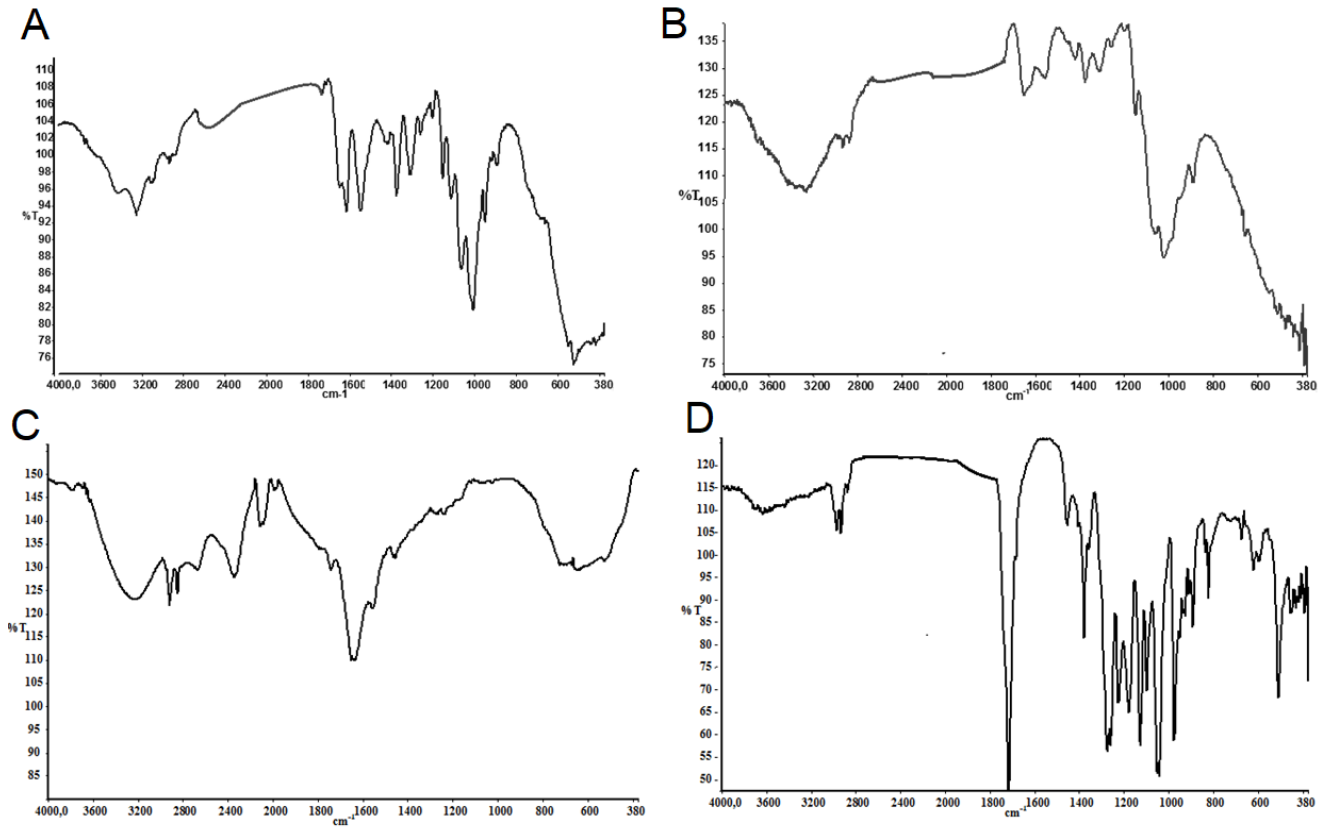
Şekil 3.5. Kolajen/kitosan/PHBV kompozit materyaline ait SEM görüntüleri



Şekil 3.6. Kolajen/kitin/PHBVkompozit materyaline ait SEM görüntüleri

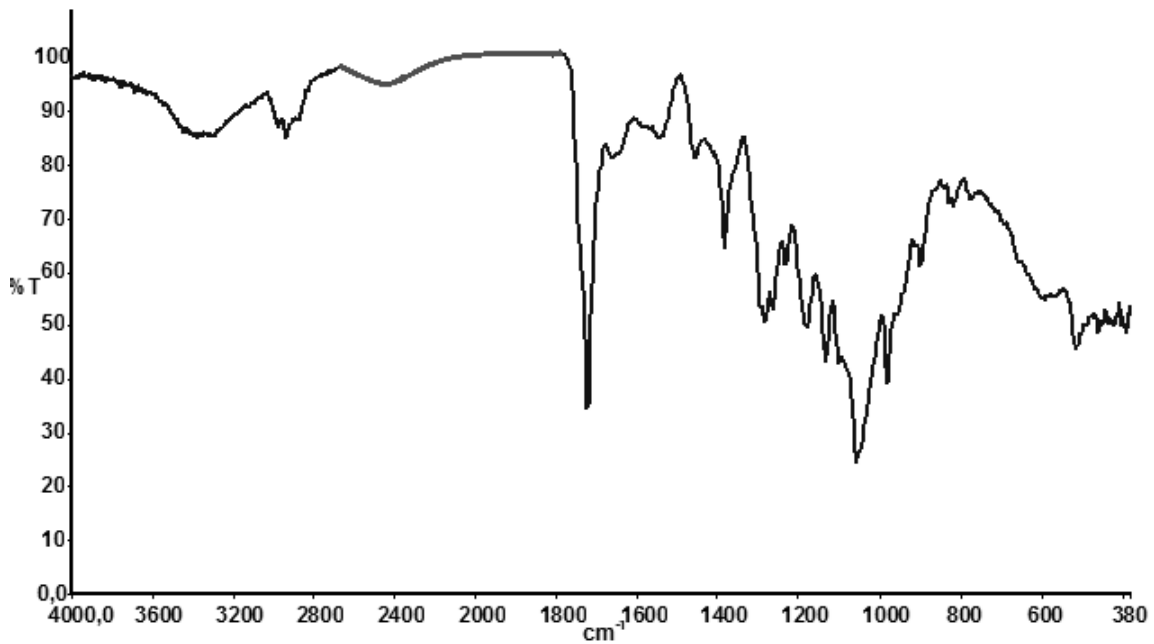
Literatürde elektrospınleme yöntemi kolajen, PHB ve kitosan gibi biyopolimerlerin kompozitlerinin oluşturulması için kullanılmıştır. Masaeli ve ark., (2013), farklı kompozisyonlardaki elektrospun PHB ve PHBV karışımlarının çeşitli özelliklerini araştırmış ve PHBnin kloroform/DMF (90:10) çözücü sisteminde spinlendiğinde, fiber çaplarının, elektrospınleme çözeltilerinin konsantrasyonuna bağlı olarak 1200-1500 nm aralığında olduğunu göstermiştir. PHB'nin yine aynı çözücü bileşiminden (kloroform / DMF) 2.4 mL / s akış hızında ve 15 kV voltajda spin edildiği başka bir çalışmada, fiber çapının 2 µm civarında olduğu bulunmuştur (Kampeeraappun, 2016). Bizim çalışmamızda ise kolajen/kitosan/PHB kompozit materyalinde fiber çapının 50-100 nm arasında olduğu belirlenmiştir. PHB ayrıca HFIP ile de elektrospınlenmiş ve 110 nm'ye kadar düşük çaplara sahip PHB liflerinin (koşullar: % 1 çözelti, akış hızı: 0.5 mL/s ve voltaj 0.7 kV/cm) hazırlanabileceği gösterilmiştir (Naveen, 2012).

Nanofiberlerin yapısal karakterizasyonu FTIR spektrumları kaydedilerek yapıldı ve sonuçlar ayrı ayrı PHBV, kolajen, kitosan ve kitine karşılık gelen spektrumlar ile karşılaştırıldı. Kitin, kitosan, kolajen ve PHBV'ye ait olan FTIR spektrumları Şekil 3.7'de verildi.

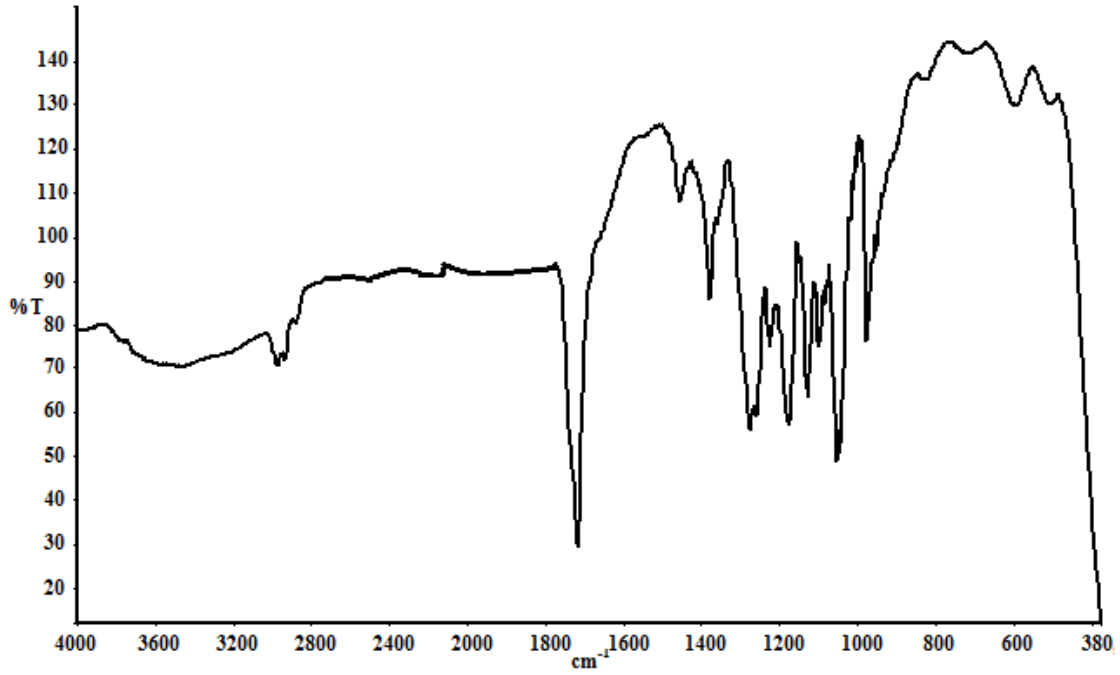


Şekil 3.7. A-Kitin, B-Kitosan, C-Kolajen ve D-PHBV'ye ait FTIR spektrumları

Kolajen/Kitosan/PHB ve Kolajen/Kitin/PHBV kompozit materyallerine ait FTIR görüntüleri sırasıyla Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.8. Kolajen/Kitosan/PHBV kompozit materyaline ait FTIR spektrumu

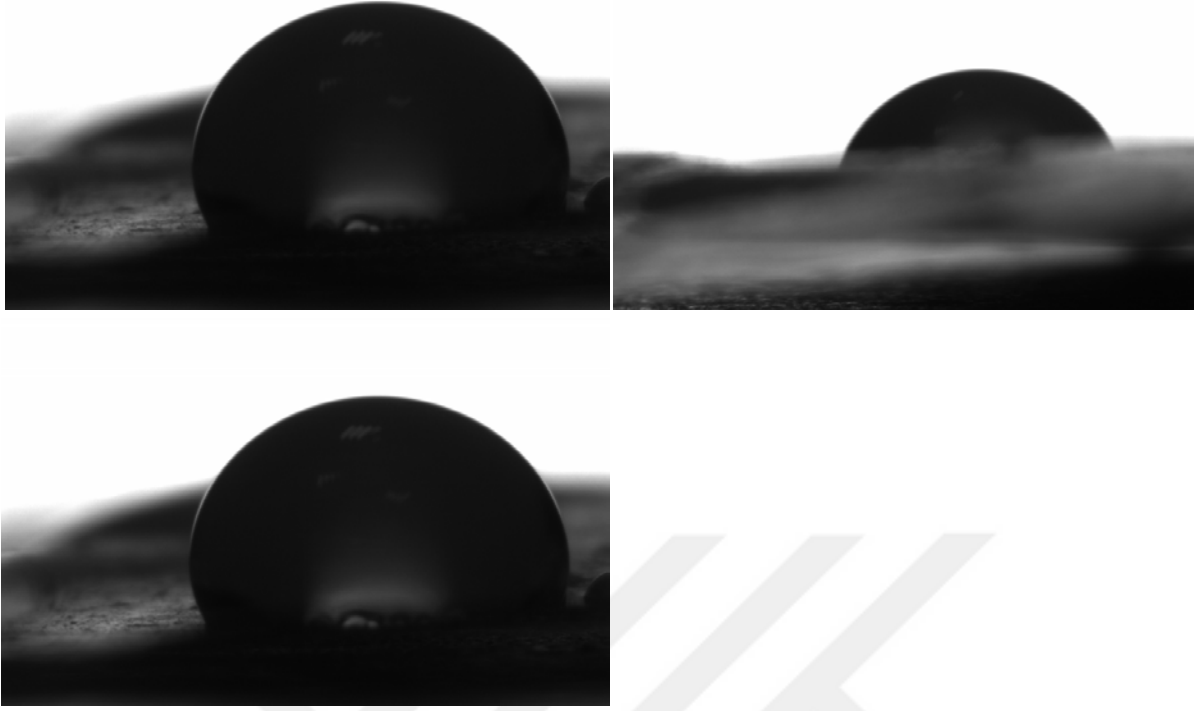


Şekil 3.9. Kolajen/Kitin/PHBV kompozit materyaline ait FTIR spektrumu

Kitosan, kolajen ve PHBV arasındaki etkileşim FTIR analizi ile incelenmiştir. Bu FTIR spektrumuna göre; 3367 cm^{-1} 'de görülen yayvan pik kolajen ve kitosandaki NH_2 gruplarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, yaklaşık 2970 ve 2875 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikler, poli(3-hidroksibutirik asit) içerisinde $-\text{CH}_2$ ve $-\text{CH}_3$ gruplarının C-H bantlarına karşılık gelmektedir. PHBV'nin karakteristik ester karbonil grubu 1720 cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. Yaklaşık 1660 cm^{-1} 'de görülen pik ise kitosan ve kolajenin amid ve karbonil piklerine karşılık gelmektedir.

Matların ıslanabilirliği, su temas açıları ölçülerek araştırılmıştır. Temas açısı görüntüleri Şekil 3.10'da verilmiştir.

PHB nanofiberlerin ortalama su temas açısı, 132° olarak bulunmuştur (Mottin ve ark., 2016). PHB temas açısının bu kadar yüksek bir değerde olmasının sebebi hidrofobik bir yapıya sahip olmasıdır. PHB, kolajen ve kitosan materyalleri ile bir araya geldiğinde ortalama 75° olmak üzere temas açısı düşüş göstermiştir. Kolajenin sahip olduğu amid ve hidroksil gruplarının yanında kitosanın da hidrofilik yapıda olması nedeniyle nanofiber hidrofilik hale gelmiştir.



Şekil 3.10. Kolajen/Kitosan/PHBV nanofiberine ait temas açısı görüntüleri (Temas açıları sırayla 71°, 73° ve 81°)

Ikejima ve ark., (1999) deasetilasyonun PHB'nin kristalleşme davranışı üzerindeki etkisini araştırmak için PHB/kitosan karışım filmleri hazırlamışlardır. PHB ve kitosan, karıştırılmadan önce HFIP (1,1,1,3,3,3-heksafloro-2-propanol) içinde ayrı ayrı çözülmüştür. Kitosan çözeltileri iyi homojenleştirildikten sonra, PHB çözeltisi ile karıştırılmıştır.

Cheung ve ark., (2002) kitosan ve PHBV kopolimerinin, kitosanda hidroksiller, aminler ve amidler gibi fonksiyonel grupların varlığından dolayı karışabilir olduklarını bildirmiştir. Bu PHBV/kitosan karışımının hazırlanması bir kurutma yöntemi içermiştir. Bu yöntemde, polimer ve kitosan HFIP içinde çözülmüştür. Kitosan çözeltisi tamamen çözündükten sonra PHBV kopolimer çözeltisi ilave edilmiştir. Bu karışımın ince bir filmi, HFIP'den asetik asit ile yavaş buharlaştırma ile dökülerek hazırlanmıştır. Karışımlar daha sonra vakum altında kurutulmuştur.

4. SONUÇLAR

İnsan popülasyonunun sürekli olarak artması yüksek miktarda atık açığa çıkması sorununu da beraberinde getirmiştir. Bu atıklar belli oranlarda geri dönüşüme tabi tutulsalar da büyük miktarda atık çöp toplama alanlarına ve derin denizlere dökülmektedir. Bu nedenle atıkların geri dönüşüme tabi tutulması veya atıklardan daha yüksek değere sahip ürünlerin elde edilmesi günümüzde çok önemli çalışma konuları olarak ortaya çıkmaktadır. Deniz ürünlerinin işlenmesi sonucu açığa çıkan atıklar kolajen ve kitin gibi biyoteknoloji, sağlık ve gıda alanlarında yüksek bir değere sahip olan bileşikler içermektedirler. Bu nedenle bu tez çalışmasında bir balık işleme tesisinden elde edilen karides kabuğu atıkları kolajen, kitin ve kitosan eldesi için bir kaynak olarak kullanılmıştır. Literatürde karides kabuklarından kolajen ve kitosan elde etmeye yönelik yayınlar mevcut olmasına rağmen bu tez çalışmasına bir ilk olarak aynı prosesle hem kolajen hem de kitinin eldesi başarılı olarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen kitin başarı ile yüksek bir deasetilasyon yüzdesine sahip kitosana dönüştürülmüştür. Elde edilen kolajenin SDS-PAGE elektroforez şablonları kullanılarak ağırlıklı olarak Tip I kolajenden oluştuğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar ülkemizde ticari olarak yüksek oranlarda üretilen ve dolayısıyla her yıl tonlarca atık ortaya çıkaran karides kabuklarının, biyoteknolojide önemli kullanım alanları bulunan kolajen ve kitosan için çok önemli bir kaynak olduğunu ortaya koymaktadır. Bu atıkların yeniden değerlendirilmesi ile sadece oluşan çöp miktarının azalması sağlanmayacak aynı zamanda önemli bir ticari değeri bulunan bu ürünlerin üretilmesi ile bölge ve ülke ekonomisine önemli katkılarının sağlanması mümkün olacaktır.

Her ne kadar kolajen ve kitosan ham maddeler olarak değerli olsalar da bunların birleşimi ile oluşan kompozit materyaller özellikle yeni yara sargı bezlerinin geliştirilmesi ve deri greftlerinin oluşturulması gibi önemli biyomedikal alanlarda kullanım alanları bulabilmektedirler. Bu nedenle elektrospınleme yöntemi kullanılarak kolajen/kitin/PHBV ve kolajen/kitosan/PHBV kompozit materyalleri oluşturulmuş ve bu materyaller farklı yöntemlerle karakterize edilmiştir. Özellikle kolajen/kitosan/PHBV kompozit materyalinde nanoliflerin oluşumu gözlemlenmiş ve bu materyalin daha ileri *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla yeni yara sargılarının geliştirilmesi gibi uygulamalar için umut vadettiği düşünülmektedir.

5. KAYNAKLAR

Arcos-Hernández, M.V., Laycock, B., Donose, B.C., Pratt, S., Halley, P., Al-Luaibi, S., Werker, A., Lant, P.A., (2013). Physicochemical and mechanical properties of mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHBV). *European Polymer Journal*, 49, 904-913.

Anterrieu, S., Quadri, L., Geurkink, B., Dinkla, I., Bengtsson, S., Arcos-Hernandez, M., Alexandersson, T., Morgan-Sagastume, F., Karlsson, A., Hjort, M., Karabegovic, L., Magnusson, P., Johansson, P., Christensson, M., Werker, A. (2014). Integration of biopolymer production with process water treatment at a sugar factory. *New Biotechnology*, 31, 308-323.

Balguid, A., Mol, A., van Marion M.H., Bank, R.A., Bouten, C.V.C., Baaijens, F.P.T., (2009). Tailoring fiber diameter in electrospun poly(epsilon-caprolactone) scaffolds for optimal cellular infiltration in cardiovascular tissue engineering. *Tissue Engineering Part A*, 15, 437- 444.

Basurco, B., Carballo, J., Lem, A., (2014). Seafood in Mediterranean countries. International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies (CIHEAM), CIHEAM–MEDITERRA, 173-202.

Benjakul, S., Nalinanon, S., Shahidi, F., (2012). Fish Collagen. Food Biochemistry and Food Processing, Second Edition (Simpson, B. Ed), Blackwell Publishing, Oxford, 365-387.

Castilho, L.R., Mitchell, D.A., Freire, D.M.G., (2009). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 100, 5996–6009.

Chalamaiah M., Dinesh kumar B., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review, *FoodChem.* 135 (4), 3020–3038.

Chee, J., Yoga, S., Lau, N., Ling, S., Abed, R.M.M., (2010). Bacterially produced Polyhydroxyalkanoate (PHA) converting renewable resources into bioplastics. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Formatex research center, 1395–1404.

Chen, S., Chen, H., Xie, Q., Hong, B., Chen, J., Hua, F., Bai, K., He, J., Yi, R., Wu, H., (2016). Food Hydrocolloids Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*). *Food Hydrocolloids*, 52, 468–477.

- Chen GQ. (2010). Introduction of Bacterial Plastics PHA, PLA, PBS, PE, PTT, and PPP. In: *Volume 14: Plastics from Bacteria. Microbiology Monographs*, (Chen GQ Ed), pp. 1-16, Springer, Germany Berlin, Heidelberg.
- Chen G-Q., Wu, Q., (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 26: 6565–6578.
- Cheung, M.K., Wan, K.P.Y., Yu, P.H., (2002). Miscibility and Morphology of Chiral Semicrystalline Poly-(R)-(3-hydroxybutyrate)/Chitosan and Poly-(R)-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/Chitosan Blends Studied with DSC, ¹H T1, and T1CRAMPS. *J. Appl. Polym. Sci.*, 86, 1253-1258.
- Chua, A.S.M., Takabatake, H., Satoh, H., Mino, T., (2003). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal waste water: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Res.* 37 (15), 3602–3611.
- Croisier, F., Jérôme, C., (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur. Polym. J.* 49 (April (4)), 780–792.
- Danış, Ö., Ogan, A. and Birbir, M. (2018). Polyhydroxyalkanoates Production from Renewable and Waste Materials Using Extremophiles/Recombinant Microbes. *Extremophilic Microbial Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Biofuels, Value-Added Products, and Usable Power*. Springer International Publishing, pp. 207–227
- Dotto, G. L., Campana-Filho, S. P., (2017). *Frontiers in Biomaterials Volume 3: Chitosan Based Materials and Its Applications*, pp. 334.
- Easterbrook, C., Maddern, G., (2008). Porcine and bovine surgical products: Jewish, Muslim, and Hindu perspectives. *Arch. Surg.* 143 (4), 366–370.
- El-Shafei, A.M., Fouda, M.M.G., Knittel, D., Schollmeyer, E., (2008). Antibacterial activity of cationically modified cotton fabric with carboxymethyl chitosan. *Journal of Applied Polymer Science* 110, 1289–1296.
- Feltz, K.P., Kalaf, E.A.G., Chen, C., Martin, R.S., Sell, S.A., (2017). A review of electrospinning manipulation techniques to direct fiber deposition and maximize pore size, 2:46–61, 3.

- Friess, W., (1998). Collagen – biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*, 45, 113–136.
- Gao Y., Cranston, R., (2008). Recent advances in antimicrobial treatments of textiles, *Textile Research Journal* 78, 60–72.
- Gardner, K.H., Blackwell, J., (1975). Refinement of the structure of beta-chitin. *Biopolymers*, 14(8), 1581-1595.
- Gaspar, A., Moldovan, L., Constantin, D., Stanciuc, A.M., Sarbu Boeti, P.M., Efrimescu, I.C., (2011). Collagen-based scaffolds for skin tissue engineering, *J. Med. Life*. 4, 172–177.
- Gonides, A., Lumare, F., Scordella, G., Papaconstntinou, C., Kapiris, K., Zacharaki, P., (2001). Effects on physical and chemical quality of the sea bottom on the distribution of the shrimp *Penaeus kerathurus* in Western Greece. *Rapp. Comm. Int. Mer. Medit.*, pp. 36.
- Gurtekin, E., Sekerdag, N., (2008). Biyolojik parçalanabilir plastic Polihidroksialkanoatlar. Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü – Elazığ, Türkiye.
- Herth, W., Barthlott, W., (1979). The site of beta-chitin fibril formation in centric diatoms. I. Pores and fibril formation. *J Ultrastruct Res*, 68(1), 6-15.
- Huang, C.Y., Kuo, J.M., Wu, S.J., Tsai, H.T., (2016). Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis sp.*) by a novel extrusion-hydro-extraction process. *FoodChem*. 190, 997–1006.
- Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., Ramakrishna S., (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Sci.Technol*, 63, 2223.
- Ikejima, T., Yagi, K., Inoue, Y., (1999). Thermal properties and crystallization behavior of poly(3-hydroxybutyric acid) in blends with chitin and chitosan, *Macromol. Chem. Phys.*, 200, 413.
- Inai, R., Kotaki, M., Ramakrishna S., (2005). Structure and properties of electrospun PLLA single nanofibres. *Nanotechnology*, 16, 208.

Je, J.-Y., Qian Z.-J., Byun, H.-G., Kim S.-K., (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis, *Process. Biochem.* 42 (5), 840–846.

Johnson, E.L., Peninston, Q.P., (1982). Utilization of Shellfish Waste for Chitin and Chitosan Production, Westport, CT.

Kampeerappapun, P., (2016). The electrospun polyhydroxybutyrate fibers reinforced with cellulose nanocrystals: Morphology and properties. *Journal of applied polymer science*, DOI:10.1002, 43273.

Khanna, S., Srivastava, A.K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40, 607–619

Khor E., (2014). Chitin and Chitosan Relative to Collagen and Hyaluronan. Elsevier Ltd., Chapter 6.

Kjartansson, G.T., Zivanovic, S., Kristbergsson, K., Weiss, J., (2006). Sonication-assisted extraction of chitin from North Atlantic shrimps (*Pandalus borealis*). *J Agric Food Chem*, 54(16), 5894-5902.

Koller, M., Atlić, A., Dias, M., Reiterer, R., Brauneegg, G., (2010). Microbial PHA production from waste raw materials. *Volume 12: Plastics from bacteria. Microbiology monographs*, In: Chen G (Ed), pp. 85-119, Springer, Germany, Heidelberg.

Kumar, M.N.V.R., (2000). A review of chitin and chitosan applications effects of chitosan, calcium chloride, and pullulan coating treatments on antioxidant activity in pear. *Reactive & Functional Polymers*. 46: 1–27.

Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.

Lim, S.H., Hudson, S.M., (2003). Review of Chitosan and Its Derivatives as Antimicrobial Agents and Their Uses as Textile Chemicals. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Review* 43, 223–269.

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

Liu, D., Li, L., Joe, M., Regenstein, P. Zhou. (2012). Extraction and characterization of pepsin solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of big head carp(*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*, 133, 1441–1448.

Lu, J., Tappel, R.C., Nomura, C.T. (2009). Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews*, 49, 226–248.

Masaeli, E. M., M. Nasr-Esfahani, M. H., Sadri, S., Hilderink, J., Apeldoorn, A., Blitterswijk, C., Moroni, L. (2013). Fabrication, Characterization and Cellular Compatibility of Poly (Hydroxy Alkanoate) Composite Nanofibrous Scaffolds for Nerve Tissue Engineering. *PLOS ONE*, 8, 1-13.

Morgan-Sagastume, F., Valentino, F., Hjort, M., Cirne, D., Karabegovic, L., Gerardin, F., Johansson, P., Karlsson, A., Magnusson, P., Alexandersson, T., Bengtsson, S., Majone, M., Werker, A., (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production From Sludge and Municipal Wastewater Treatment, 177–184.

Morsli, S.M., Merad I., Khebbab, M.E.H., Soltan, N., (2015). Potential Hazards of a Chitin Synthesis Inhibitor Diflubenzuron in the Shrimp *Penaeus Kerathurus*: Biochemical Composition of the Hemolymph and Muscle during the Molt Cycle, *Advances in Environmental Biology*, 9(3), 518-525.

Mourya, V.K., Inamdar N.N., (2008). Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive & Functional Polymers*, 68, 1013-1051.

Mottin, A. C., Ayres, E., Oréfice, R. L., Câmara, J. J. D., (2016). What Changes in Poly (3-Hydroxybutyrate) (PHB) When Processed as Electrospun Nanofibers or Thermo Compression Molded Film, *Materials Research*, 19, 57-66.

Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., Duodu, K. G. (2004). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nileperch (*Latesniloticus*). *Food Chemistry*, 85, 81–89.

Muzzarelli RAA., (1996). *Advances in chitin science*; Jacques Andre; France, Vol. 1., 448-452.

Naveen N., (2012). Electrospinning of polymer fibers as potential scaffold for skin regeneration, PhD thesis, Anna University, Chennai 600 025, India.

Quillaguamán, J., Guzmán, H., Van-Thuoc, D., Hatti-Kaul, R. (2010). Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1687-1696.

Peter, M.G., (1995). Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 32(4), 629-640.

Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., Cesaro, A. (2013). Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1-2), 219-228.

Ramya, V.L., Sharma, R., Gireesh Babu, P., Patchala, S.R., Rather, A., Nandanpawar, P.C., Eswaran, S. (2014). Development of chitosan conjugated DNA vaccine against noda virus in *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of fish diseases*, 37(9), 815-824.

Rao, M. G., Bharathi, P., Akila, R. M. (2014). A Comprehensive Review on Biopolymers, *Scientific Reviews and Chemical Communications*, 4, 61–68.

Reddy, M.V., Mawatari, Y., Onodera, R., Nakamura, Y., Yajima, Y., Chang, Y.C., (2019). Bacterial conversion of waste into polyhydroxybutyrate (PHB): a new approach of bio-circular economy for treating waste and energy generation. *Bioresour. Technol. Reports* 7, 100246.

Richard T.C., Moore, C.J., vom Saal F.S., Swan, S.H. (2009). Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364, 2153–2166.

Rinaudo, M., (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 31(7), 603-632.

Roberts, G.A.F., (1992). Structure of chitin and chitosan. In *Chitin Chemistry*; Roberts, G.A.E., (Ed.), Palgrave Macmillan, London, UK, 85–91.

Rudall, K., (1963). The chitin/protein complexes of insect cuticles. Eds: J. W. L. Beament J. E. Treherne and V. B. Wigglesworth. *Advances in insect physiology*, Elsevier, Academic Press, 257-313.

Rudall, K., Kenchington, W., (1973). The chitin system. *Biological Reviews*, 48(4), 597-633.

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

Salehizadeh, H., Loosdrecht, M.C.M.V., (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.* 22 (3), 261–279.

Shoulders, M., Raines R. (2009). Collagen Structure and Stability. *Annual Reviews of Biochemistry*, 78, 929–958.

Sini TK, Santhosh S, Mathew PT., (2005). Study of the influence of processing parameters on the production of carboxymethyl chitin. *Polym J*, 46:3128–31.

Steinbüchel A., (2005). Non-biodegradable biopolymers from renewable resources: perspectives and impacts. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 607-613.

Sudesh, K., Iwata, T., (2008). Sustainability of Biobased and Biodegradable Plastics, *Clean* 36 (5-6), 433–442.

Tan, G.Y.A., Chen, C.L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razad, I.M.N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., Wang, J.Y., (2014). Start a research on biopolymerpolyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*, 6, 706-754.

Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., Alagui, A., (2003). Contribution to the Preparation of Chitins and Chitosans with Controlled Physico-Chemical Properties, *Polymer*, 44, 7939-7952.

Turkmen, G. And H. Yilmazerli, (2006). Some biological aspects of *Melicerthus kerathurus* (Forsk., 1775) (Decapoda, Penaeidae) inhabiting Izmir Bay (Aegean Sea), Turkey. *Crustaceana*, 79: 583-591.

Varshosaz, J., (2007). The promise of chitosan microspheres in drug delivery systems, *Expert Opinion on Drug Delivery* 4, 263–273.

Yucel, M., Altunkasa, F., Gucray, S., Uslu, C., Say, N.P., (2006). Adana’da çevre duyarlılığı düzeyinin ve geliştirme olanaklarının araştırılması. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, Antalya, Türkiye, 19, 217-228.

Zhang, Y. Z., Lim, C. T., Ramakrishna, S., Huang, Z. M. J., (2005). *Matter Sci-Mater M*, 16, 933.

Özgeçmiş

Ad Soyad : Ayzin ODABAŞ

Doğum Tarihi : 11.11.1993

E-posta : ayzinodabas@gmail.com

Eğitim

Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi – Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya (2017-)
Üniversite	Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (2011-2016)
Lise	Fatin Rüştü Zorlu Anadolu Lisesi (2008-2011)

Sunum

Poster Sunumu: Ayzin ODABAŞ, Emrah ÇAKMAKÇI, Özkan DANIŞ. Gıda atıklarından kollajen ekstraksiyonu ve kitosan, polihidroksialkanoat kompozitlerinin hazırlanması. 31, Ulusal Kimya Kongresi 10-13 Eylül 2019, İstanbul, Türkiye.