

Deriden Kollajen ve Jelatinin Saflaştırılması ve Elde Edilen Protein Materyallerinin Karakterizasyonu

Purification of Collagen and Gelatin from Hides and Characterization of Obtained Proteinic Materials

Urana Dandar, Meruyert Koizhaiganova, Gülzinat Yeldiyar, Onur Yılmaz, Buğra Ocak, Özcan Sarı

SUMMARY

In the present study acetic acid soluble collagen was purified by isolation from young calf skins by using pepsin as enzyme. In addition, gelatin was also purified from the skins by using alkaline enzyme procedures. The structural characterization of collagen and gelatin samples was performed by FTIR and molecular weight of the purified collagen was also determined by SDS PAGE method. Collagenic materials in powder form were prepared by freeze drying of collagen solution and spray drying of gelatin solution. Collagenic films were also prepared from the solutions after crosslinking by glutardialdehyde. FTIR and SDS PAGE analyses verified the helix structure of obtained collagen. Table Top Scanning electron microscopical (Table Top SEM) studies performed on powder collagen samples for assessing the morphology exhibited a fibrillar network with a porous structure. The collagenic materials obtained from young calf skins were considered to be proper for use in biomedical, cosmetic, pharmaceutical applications etc. after carrying out necessary toxicological tests.

Keywords: collagen, gelatin, protein purification, leather, protein characterization

ÖZET

Bu çalışmada genç dana derilerinden pepsin enzimi kullanarak asetik asitte çözünür kollajen izole edilerek saflaştırılması yapılmıştır. Kollajen haricinde dana derilerinden alkali enzimatik yöntemle jelatin eldesi de gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan kollajen ve jelatin örneklerinde yapı karakterizasyonu için FTIR tayini yapılmış, kollajen örneğinde ilave olarak molekül ağırlığı tespiti için SDS PAGE analizi de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kollajen ve jelatin çözeltilerinden liyofilizatör ve sprey kurutucu ile toz formda, glutardialdehit ile çapraz bağlanma suretiyle de film olarak kollajen bazlı materyaller elde edilmiştir. FTIR ve SDS PAGE sonuçları elde edilen kollajen çözeltisi içerisinde heliks yapının varlığını doğrulamıştır. Toz formdaki kollajen örneğinde morfolojik yapılarının belirlenmesi amacıyla Masa Üstü Taramalı Elektron Mikroskopu (Table Top SEM) kullanılmış ve poröz bir ağ yapısının olduğu ortaya konmuştur. Genç dana derilerinden izole edilen kollajen ve jelatin bazlı materyallerin gerekli toksikolojik analizlerinin yapılmasının ardından biyomedikal, kozmetik, eczacılık vb. birçok alanda kullanıma uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kollajen, Jelatin, Protein saflaştırma, Deri, Protein karakterizasyonu

Giriş

İnsan ve hayvan vücudunun en yaygın proteini olan kollajen günümüzde giderek artan bir öneme sahiptir. Çeşitli hayvansal kaynaklardan izole edilerek saflaştırılan kollajen preparatları özellikle tıp, fotoğrafçılık, kozmetik ve biyomedikal malzeme üretimi gibi alanlarda yaygın bir kullanım alanına sahiptirler^{1, 2,19}. Günümüzde de bu konudaki araştırmalar yoğun olarak devam etmekte ve bu ürünlerden faydalanma olanaklarının artırılmasına yönelik kollajen içerikli yeni ürün ve malzemelerin geliştirilmesi konusunda çalışmalar sürdürülmektedir.

Omurgalı bir hayvanın dokularında bulunan tüm kollajenin yaklaşık % 40'ı derisinde yer almaktadır. Hayvan derisi gelişimi, fizyolojik görevi ve kimyasal yapısı farklı olan üç ayrı tabakadan meydana gelmektedir. Epidermis ve hipodermis tabakaları uzaklaştırıldığında geriye asıl tabaka olan dermis tabakası kalmaktadır. Dermis tabakası kollajen ve elastik liflerin ağlarından kurulan kompakt yapıli düzensiz bağ dokudur.

Deri yapısında yer alan lifli proteinler arasında kollajen oranı % 98'i bulmaktadır^{2,6,7}. Dermis içerisinde lifli proteinlerin yanında şekilsiz proteinler, karbonhidrat ve lipid bileşikleri v.b. maddeler de bulunmaktadır. Ancak bunların oranı kollajene oranla çok daha azdır. Bu nedenle kollajen saflaştırılma denemelerinde kollajen proteini dışındaki diğer tüm maddeler mümkün olduğunca uzaklaştırılmaktadırlar. Bugün ticari olarak birçok alanda kullanılan kollajen büyük ölçüde çeşitli hayvan derilerinden (dana, domuz, tavuk, balık vb.) ve hayvanların kıkırdak, bağırsak gibi vücut dokularından saflaştırılarak elde edilmektedir.

Endüstride geniş çapta kullanılma olanağı bulan jelatin, hayvansal dokulardan yararlanarak elde edilmektedir. Kollajenin saflaştırılması ve ayrıca alkali ya da asitli ortamlarda çözündürülmesi ile saf jelatin elde edilmektedir. Elde edilen saf jelatin, renksiz, kokusuz ve saydam bir madde olup özellikle gıda, ilaç, sağlık, ambalaj, doku mühendisliği vb. bir çok alanların yanında fotoğraf ve sinema filmlerinin yapımında da kullanılmaktadır^{13,17}.

Kollajenin saflaştırılması jelatin eldesinden daha komplikedir. Çünkü jelatinde sıcaklık ile birlikte alkali veya asit koşullarında kollajenin üçlü heliks yapısı bozundurulur ve ekstre edilir ve elde edilen yapı daha düşük moleköl ağırlıklı ve düzensizdir. Kollajenin saflaştırılmasında üçlü heliks yapı mümkün olduğunca muhafaza edilmeye çalışılır.

şılmaktadır. Uzun yıllardır baş dokularının ve özellikle tendonların seyreltik asit çözeltilerinde şişme gösterdiği bilinmektedir²⁶. Nageotte (1927), seyreltik asetik asit çözeltisinde genç fare kuyruğundaki tendondan kollajenin çözünür hale geçtiğini gözlemlemiştir. Diğer bazı Fransız bilim adamlarıyla birlikte dokularda bulunan fibrillerin viskoz kollajen çözeltilerinden nötral pH'larda yapılan diyalizle veya nötr tuz ilavesiyle çökme gösterdiğini ispatlamışlardır^{3,5,10,15}. Ardından yapılan X-ışını difraksiyonu çalışmalarıyla asitte ekstre edilen kollajenin doğal ve denatüre olmamış formda olduğu da kanıtlanmıştır²⁴. Ardından bu konudaki çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmiş günümüze kadar gelinmiştir. Değişik tiplerdeki kollajenin değişik doku ve kollajen yapıli materyallerden ekstraksiyonu ve bunların değerlendirilmesine yönelik çalışmalar halen devam etmektedir.

Mevcut çalışmada deri sanayi açısından büyük önem taşıyan ve ham deri koryumunun % 98'ini oluşturan kollajen proteini ham deriden izole edilerek saflaştırılmıştır. Çalışmada ayrıca jelatin eldesi de gerçekleştirilmiş olup, elde edilen proteinli materyallerin karakterizasyonu yapılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Kollajen saflaştırılmasında kollajen içerikli materyal olarak kireçlik aşamasına getirilmiş genç dana yarma derisi kullanılmıştır.

Kollajen eldesi için: Asetik asit (C.Erba), Sodyum klorür (Merck), Pepsin enzimi (Sigma), SDS-PAGE analizinde Coomassie Brilliant Blue R-250 (Applichem), Etanol (C.Erba), Fosforik asit (Merck), Tris-CI (Sigma), Bromfenol Blue (Sigma), Süktroz (Sigma), SDS (Applichem), 2-merkaptoetanol (Sigma), Akrilamid (Applichem), Bisakrilamid (Applichem), TEMED (Applichem) ve Amonyum persülfat (Applichem), Gümüş Nitrat (Merck), Kollajen ve jelatin örneklerinden film hazırlanmasında: Polietilenglikol (PEG-600-Riedel-de Haen), gliserin (Merck) ve glutardialdehit (Merck) analitik saflıklarda kullanılmıştır.

Yöntem

Deri İşlentisi

Saflaştırma işleminde kullanılacak, bir deri fabrikasından temin edilen kireçli halde dana yarma derisine, kireç giderme-sama ve yağ giderme işlemleri yapılmış ve yapıdaki kollajen

dışındaki safsızlıklar (yağ, suda çözünür proteinler vb) uzaklaştırılmıştır (Çizelge 1).

Kollajen Eldesi

İşlenen deriler yaklaşık 0.5x1.0 cm olacak şekilde parçalara kesilerek saflaştırmada kullanılmışlardır. 60 g yağ

Jelatin Eldesi

0.5x1.0 cm boyutlarında genç dana derisinden kesilmiş deri parçaları bilinen miktarda tartılarak olası kirliliklerin uzaklaştırılması için önce deiyonize su ile yıkanmıştır. Daha sonra 8 saat süre ile oda sıcaklığında % 0.01 pepsin enzimi ile (kuru ağırlık üzerinden) muamele edilmiştir. Bu süre

İşlem	Miktar (%)	Ürün	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	
Yıkama	200	Su	25		
	0.5	Kireç Giderici		20	
Kireç Giderme	150	Su	25		
	1	Kireç Giderici			
	2	Amonyum sülfat		60	
	0.5	HCOOH		20	pH 8.0-8.2
					Süz
Sama	100	Su	35		
	0.5	Asidik Enzim		30	
Yıkama	150	Su	25	10	Süz
Yağ Giderme	10	Yağ giderici		60	
Yıkama	+ 250	Su	30	15	
	+ 4	Tuz			X 2
					Süz

Çizelge 1. Kireç Giderme Sama ve Yağ Giderme işlenti reçetesi

deri 0.04 g pepsin (kuru ağırlık üzerinden) içeren 1 litre 0.5 M asetik asitte 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Elde edilen kıvamlı çözeltiler 10.000 rpm'de 15 dakika çözünmeyen kısımların uzaklaştırılması için santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Supernatanta 3 M NaCl olacak şekilde tuz eklenmiştir. Bu çözelti bir gece yavaşça karıştırılmıştır. Tuzla çökelme işleminden sonra çözelti 30 dakika 12.000 rpm ile santrifüjlenmiştir. Çökelek santrifüj tüplerinden 0.5 M asetik asit ile çözündürülerek alınmış ve 0.7 M olacak şekilde NaCl eklenmiştir. Elde edilen çözelti tekrar 12.000 rpm' de 30 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur.

Asetik asitte çözündürme ve tuzda çöktürme olarak tamamlanan saflaştırma işlemleri sonunda elde edilen çökelek etanol ile santrifüj tüplerinden toplanmış ve vakumlu filtrede NaCl uzaklaşınca kadar etanol ile yıkanmıştır. Süzünü suundaki NaCl gümüş nitrat indikatörüyle kontrol edilmiş ve yıkama işlemi süzünüde hiç Cl iyonu kalmayınca kadar devam ettirilmiştir. Yıkamalar sonunda elde edilen saf kollajen 0.1 M asetik asitte çözündürülerek +4°C' de buzdolabında saklanmıştır. Saflaştırılan kollajen örneğinin bir kısmı -40°C' de liyofilize edilerek kurutulmuş, bir kısmı ise film hazırlamada kullanılmıştır.

sonunda sıcaklık 70°C'a ayarlanarak kullanılan deri ağırlığı üzerinden %8 oranında MgO ilave edilmiştir. Reaksiyonun tamamlanması için üç saat karıştırma ve ısıtma işlemine devam edilmiştir. İşlem sonunda elde edilen jelatin çözeltisi Whatman No:1 kağıdından vakum ile filtre edilmiştir.

Elde edilen jelatin çözeltisinin bir kısmı sprey kurutma cihazı kullanılarak 145-150°C ortam sıcaklığında maksimum kompresör basıncı ile 25-30 ml/dk akış hızı ile kurutulmuştur. Kurutularak toz şekline getirilen örnekler ilgili test ve analizleri yapılabilmek için ağız hava almayacak şekilde sıkıca kapatılmış şişelerde oda sıcaklığında saklanmıştır^{9,18}. Jelatin çözeltisinin bir kısmı ise petri kaplarına dökülerek film hazırlamada kullanılmıştır.

Kollajen ve Jelatin Çözeltisinden Film Hazırlanması

Kollajen çözeltisinden film elde etmede iki farklı plastikleştirici kullanılmıştır. Örneklerin bir kısmı kollajen çözeltisinin kuru madde ağırlığı üzerinden %40 olacak şekilde PEG 600 ile karıştırılmış, bir kısmı ise kuru madde ağırlığı üzerinden %20 PEG 600 ve %20 gliserin ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

Film eldesi için kullanılan çözeltiler, su banyosunda 20 °C'de yaklaşık 5 dakika kadar homojen hale gelinceye kadar karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım 6.0 cm çaplı plastik petri kaplarına dökülmüştür. Petriler, oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra etüvde 30°C'de kurutularak film oluşturulmuş ve, 23°C, % 50 ± 5 bağıl neme sahip olan iklimik odada koşullandırılmışlardır.

Deri, Saflaştırılmış Kollajen ve Jelatinde Yapılan Test ve Analizleri

Azot ve Deri Maddesi Tayini

Kollajen örneklerindeki protein miktarının saptanması amacı ile TS EN ISO 4044'e göre ²² hazırlanan deney numunelerinde toplam azot miktarı ve deri maddesi tayini TS 4134 standardı kullanılarak yapılmıştır ²⁰.

Azot tayini için VELP UK 6 Azot Tayin cihazı kullanılmıştır. Elde edilen % azot miktarı standartta belirtildiği üzere 5.62 faktörü ile çarpılarak protein miktarı hesaplanmıştır.

Diklormetanda Çözünen Maddelerin Tayini

Diklormetanda çözünen maddeler (yağ) tayini TS EN ISO 4048 standardına göre VELP SER 148 "Solvent Extractor" cihazı kullanılarak yapılmıştır ²¹.

Kuru Madde Tayini

Saflaştırılmış 10 g protein çözeltisi darası alınmış beher içerisine konmuş ve önce oda sıcaklığında 1 gün, ardından

yapılmıştır ⁸. SDS page için 200 µl örnek çözeltisi 100 µl örnek tamponuyla (1 M Tris-Cl -pH 6.8-, Bromfenol Blue, %60 sükröz , %20 SDS, 2-merkaptoetanol) karıştırılarak, kaynar su banyosunda 5 dakika inkübe edilmiş ve hazırlanan çözelti jele (1.5 M TRIS - Cl tamponu -pH:6.8-, bidistile su, %30 Akrilamid / %0.8 Bisakrilamid, %20 SDS, TEMED, %10 Amonyum persülfat) uygulanmıştır.

Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR)

Elde edilen kollajen ve jelatin örneklerinin yapı karakterizasyonu için ATR ekipmanlı Perkin Elmer Spectrum 100 Fourier Transform Infrared (FTIR) cihazı kullanılarak 4000-400 cm⁻¹ aralığındaki IR spektrum taraması gerçekleştirilmiş, sonuçlar FT-IR Spectrum Software (Perkin Elmer) yazılımında değerlendirilmiş ve literatürde verilen spektrumlarla karşılaştırılmıştır.

Masa Üstü Taramalı Elektron Mikroskobu (Table Top SEM)

Elde edilen saflaştırılmış kollajenin morfolojik özelliklerini belirlemek amacı ile masaüstü Masa Üstü Taramalı Elektron Mikroskobu (Table Top SEM) (Hitachi TM 1000) kullanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Deride Yapılan Analizlere Ait Bulgular

Deri örneklerinde yapılan azot ve deri maddesi tayini ile diklormetanda çözünen madde miktarları *Çizelge 2*'de verilmiştir. Kollajen saflaştırmada kullanılacak olan derilerin toplam deri maddesinin yaklaşık olarak %74.68 olduğu ve

Analiz	Min.	Mak.	Ortalama	Std.Sapma
Azot (% N)	12.88	13.59	13.29	0.30
Deri Maddesi (%)	72.37	76.38	74.68	1.70
Diklormetanda Çözülen Maddeler (%)	0.06	0.10	0.08	0.002

Çizelge 2. Dana derisine ait bazı analiz sonuçları

TS EN ISO 4684'de belirttiği gibi 102°C'de etüvde sabit tartıma gelene kadar bekletildikten sonra hassas terazide tartılarak kuru madde oranı hesaplanmıştır. ²³

Sodyum Dodesil Sülfat Poli-Akrilamid Jel Elektroferez (SDS PAGE) Analizi

% 4-10 jel ile Laemmli (Laemmli,1970) yöntemine göre

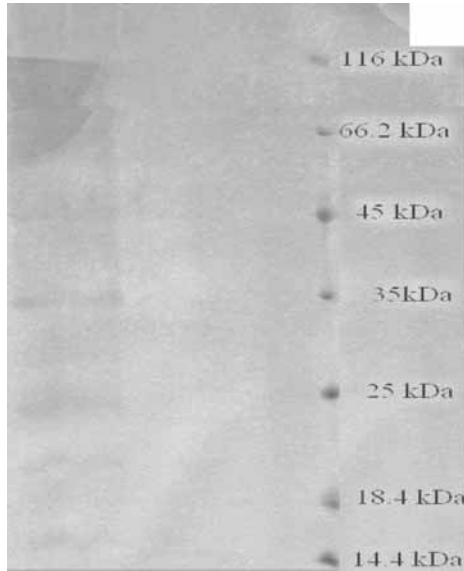
yağ içeriğinin ise %0.08 dolayında olduğu belirlenmiştir.

Kuru Madde Tayinine Ait Bulgular

Asetik asit ve enzim kullanılarak yapılan saflaştırma sonucunda elde edilen kollajen çözeltisinin % 1.05 oranında kuru madde içerdiği saptanmıştır. Jelatin çözeltilerinin ise katı madde içeriği yaklaşık %10 olarak bulunmuştur.

Sodyum Dodesil Sülfat Poli-Akrilamid Jel Elektroforezi (SDS-Page) Analizine Ait Bulgular

Şekil 1' de genç dana derilerinden elde edilen kollajen örneğinin sodyum dodesil sülfat poli-akrilamid jeli üzerindeki elektroforez desenleri görülmektedir. SDS PAGE yöntemiyle disülfür bağlarının kopması sonucu açığa çıkan polipeptid zincirlerinin molekül ağırlıklarına göre ayrımı yapılabilmektedir. Bu şekilde kollajen üçlü heliks yapısının açılması sonucu ortaya çıkan α ve β zincirlerinin molekül büyüklükleri sırasıyla 200 kDa ve 100kDa olarak bulunduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur ^{11, 27}. Şekil 1'de sağ tarafta standart protein belirteğine, sol tarafta ise saflaştırılmış kollajene ait SDS PAGE bantları görülmektedir. Protein belirteğinin molekül ağırlığı aralığının düşük kalması sebebiyle kollajene ait yüksek molekül ağırlıklı β bantı görülememektedir. Bunun dışında verilen aralıkta 100 KDa civarında α zincirlerine ait band yapıdaki kollajen varlığını göstermektedir. 35 KDa yakınlarında tespit edilen zayıf bandın ise saflaştırma işlemlerinin oda sıcaklığında yapılması sebebiyle kollajenin kısmi hidrolize uğraması sonucu oluşan düşük molekül ağırlıklı zincirlerin varlığından ileri gelebileceği düşünülmektedir.

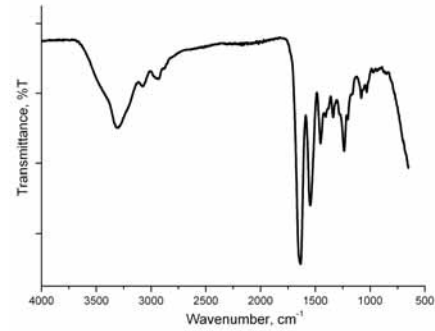


Şekil 1. Saflaştırılmış kollajenin SDS-PAGE analizi

FTIR analizine ait bulgular

Şekil 2'de asitte çözünür olarak elde edilmiş kollajene ait IR spektrumu verilmiştir. Elde edilen grafik bir çok araştırmacının elde ettiği asitte çözünür kollajene ait IR spekt-

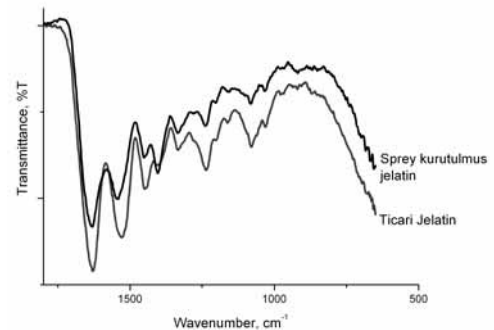
rumlarına oldukça yakındır ^{14, 25}. Genel olarak amid A bandı N-H gerilim frekanslarına bağlı olarak pik vermektedir. Serbest N-H gerilim titreşmesi 3400-3440 cm^{-1} aralığında ortaya çıksa da, N-H grubu hidrojen bağı içeren bir peptid zincirine bağlı olduğunda titreşim pozisyonu daha düşük frekanslar olan 3300 cm^{-1} civarına kaymaktadır ¹². Şekil 2'de elde edilen kollajene ait amid A bandı 3301 cm^{-1} , CH_2 gruplarının asimetrik gerilimine bağlı olarak ortaya çıkan amid β bandı ise 3074 cm^{-1} dolaylarında görülmektedir ¹⁴.



Şekil 2. Saflaştırılmış kollajene ait IR spektrumu

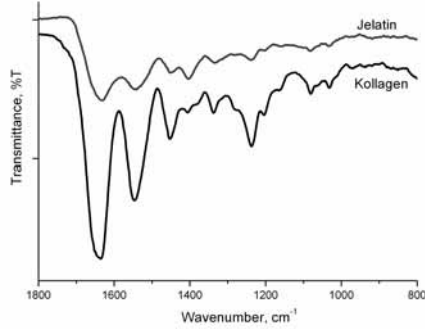
C=O absorpsiyonuna bağlı olarak ortaya çıkan amid I bandı 1635 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. 1238 cm^{-1} ile 1452 cm^{-1} arasındaki absorpsiyon bandları heliks yapının varlığına bağlı olarak ortaya çıkan bandlardır. Bu nedenle elde edilen kollajendeki heliks yapıların varlığı FTIR incelemesi sonucunda ortaya konmuştur.

Şekil 3'de ise sprej kurutucu sonrası toz haline getirilmiş jelatin ile ticari bir toz jelatin örneğine ait IR spektrumu verilmektedir. Spektrumlar incelendiğinde üretilen jelatin ile ticari jelatin örneğinin IR spektrumunun birbirine çok yakın olduğu açıkça görülmektedir.



Şekil 3. Ticari jelatin ve sprej kurutulmuş jelatin örneklerine ait IR spektrumları

Elde edilen jelatin ile kollajen örneklerine ait IR spektrumlarının karşılaştırılması ise Şekil 4'de verilmiştir.

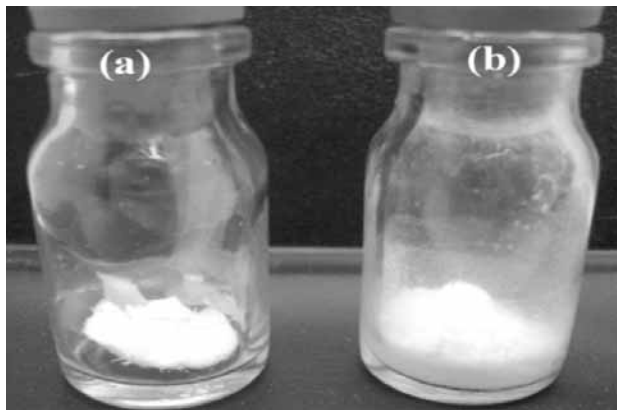


Şekil 4. Jelatin ve kollajen örneklerine ait IR spektrumları

Yüksek sıcaklıkla muamele edilerek elde edilen jelatin örneklerinde amid I (1635 cm^{-1}), amid II (1546 cm^{-1}) ve amid III (1238 cm^{-1}) bantlarına ait pik alanlarının önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Bu değişiklikler jelatin içerisindeki düzensiz yapının ve heliks yapıda yaşanan kayıpların bir göstergesi olarak kabul edilebilir^{4,14}. Bu değişim, kollajenin jelatine denatürasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır.

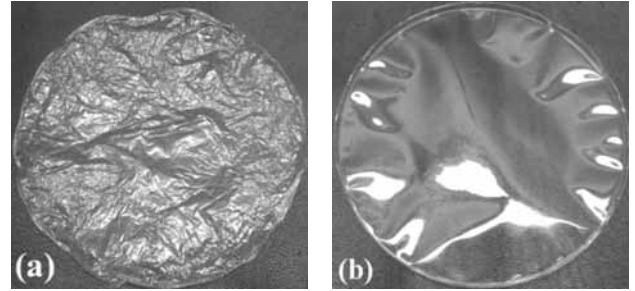
Saflaştırılmış Kollajen ve Jelatin Çözeltilerinden Elde Edilen Toz ve Film Örnekleri

Şekil 5'te liyofilize edilmiş kollajen ve sprey kurutulmuş jelatin örneklerine ait fotoğraflar görülmektedir. Örnekler yüksek beyazlıkta elde edilmiş olup toz formdaki ticari kollajen ve jelatin uygulamaları için uygun görünümde olduğu saptanmıştır.



Şekil 5. Liyofilize edilmiş kollajen (a) ve sprey kurutulmuş

Şekil 6'da kollajen ve jelatin çözeltilerinden petri kaplarına dökülerek elde edilmiş filmlere ait fotoğraflar görülmektedir. Yapılan denemelerde saflaştırılmış kollajenin tek başına verdiği filmin zayıf ve petri kabından ayrılabilir bir nitelikte

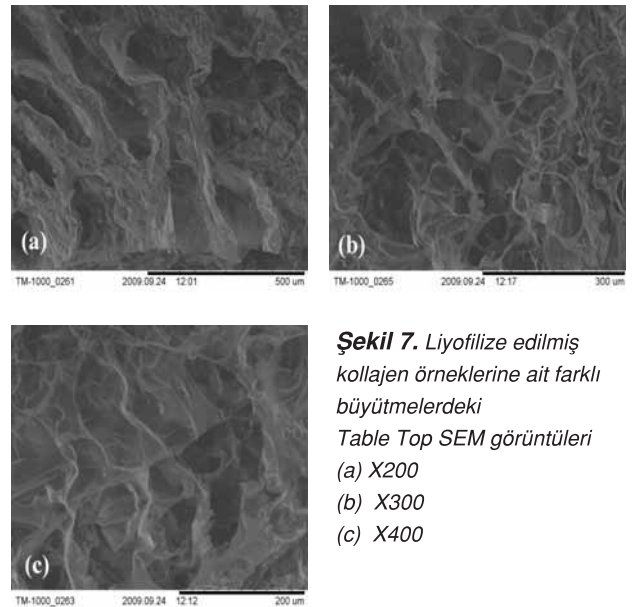


Şekil 6. Saflaştırılmış kollajen (a) ve jelatin (b) çözeltilerinden elde edilen filmler

olmadığı gözlenmiştir. Bunun üzerine kollajen ve jelatin örnekleri % 0.2 glutardialdehit ile muamele edilerek çapraz bağlanmaya tabi tutulmuş ve Şekil 6'da görülen filmler elde edilmiştir. Gerek kollajen gerekse jelatine ait filmlerin şeffaf ve berrak bir görünüme sahip olduğu belirlenmiştir.

Masa Üstü Taramalı Elektron Mikroskobu Analizine Ait Bulgular

Liyofilize edilerek kurutulmuş kollajen örneklerine ait farklı büyütmelerde elde edilen Masa Üstü SEM görüntüleri Şekil 7'de verilmiştir. Masa Üstü SEM fotoğrafları ince-



Şekil 7. Liyofilize edilmiş kollajen örneklerine ait farklı büyütmelerdeki Table Top SEM görüntüleri
(a) X200
(b) X300
(c) X400

lendiğinde kollajen fibrillerinin poröz (gözenekli) bir ağ yapısına sahip olduğu görülmektedir. Ağ yapının genel olarak makro boyutlu gözeneklere sahip olduğu, ancak makro gözeneklerin yanında daha küçük çaplı gözeneklerin de olduğu gözlenmiştir.

Sonuç

Çalışmada genç dana derilerinden pepsin enzimi kullanarak asetik asitte çözünür kollajen ile jelatin ekstraksiyonu yapılmış ve saflaştırılmıştır. Örnekler üzerinde yapılan FTIR ve SDS PAGE analizleri kullanılan yöntemle saflaştırılmış kollajen ve jelatinin eldesini doğrulamıştır. Ancak kollajen örnekleri için oda sıcaklığında yapılan saflaştırma işlemlerinin kollajenin kısmi hidrolize uğramasına neden olduğu da saptanmıştır.

Örneklerden glutardialdehit ile yapılan çapraz bağlama işlemi sonrası elde edilen filmlerin düzgün, şeffaf ve berrak bir görünüme sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kollajen ve jelatin çözeltilerinden liyofilizasyon ve sprey kurutma ile toz formda ürün eldesi de gerçekleştirilmiş ve elde edilen toz ürünlerin yüksek beyazlıkta olduğu görülmüştür. Kollajen örneklerinin Table Top SEM'de incelenmesi sonucu elde edilen ürünün gözenekli bir fibriler ağ yapısına sahip olduğu belirlenmiştir.

Kollajen iyi bilinen bir protein olarak en kullanışlı biyomateryallerden birisidir. Toksik olmayan, biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir, hemostatik, biyoaktif bileşenlerle sinerjik etki gösteren, sentetik polimerlerle uyumlu olma ve birçok formda üretilme özellikleriyle çok çeşitli kullanım alanlarına sahip bir materyaldir. Bu nedenle çalışmada elde edilen değişik formlardaki (çözelti, film, toz) kollajen ve jelatin materyallerin gerek teknolojik olarak çok değerli materyaller olması, gerekse üretim maliyetlerinin yüksek olması sebebiyle deri üretim proseslerinde dolgu amaçlı olarak kullanıma uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak elde edilen kollajenik materyallerin gerekli toksikolojik testlerin yapılmasının ardından, kozmetik ve eczacılıkta biyoaktif madde; sargı ve yara bantlarında membran ve matriks formunda yanık, yaralar için kollajenik iyileştirici madde; implant, doku iyileşmesi vb amaçlı kompozit materyal üretiminde tekstil ve sentetik polimerlerin yanında katkı ve kaplama bileşeni gibi katma değeri yüksek materyal olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Bilgi:

Çalışmada kullanılan cihazlar 2007 DPT 001 no'lu projeden alınmıştır.

Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 06-MÜH-010 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Cheng, F.Y., Hsu, F.W., Chang, H.S., Lin, L.C and Sakata, R., Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowly feet, *Food Chemistry*, 2009, 111, pp.563-567.
2. Çelik, D., Kollajen ve polimer bazlı biyomateryal eldesi ve değerlendirilmesi üzerine bir araştırma, *Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 2004, İzmir.
3. Faure-Fremiet, E., Quelques proprietes du collagene soluble, 1933, *C.R. Soc. Biol.* 113, 715.
4. Friess, W.; Lee, G., Basic thermoanalytical studies of insoluble collagen matrices, *Biomaterials*, 1996, 17, 2289-2294; Muyonga, J.H.; Cole, C.G.B.; Duodu, K.G.; Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*), *Food Chemistry* 2004, 86: 325-332
5. Guyon, L., Sur les phenomenes qui se passent dans les solutions de collagene, aux limites d'action des acides et des sels neutres. *C.R. Acad. Sci.* 1933, 198, p. 975.
6. Harmancıoğlu, M. ve Dikmelik, Y., Ham deri Yapısı, Bileşimi, Özellikleri, 1993, Özen Ofset, İzmir.
7. Harmancıoğlu, M., Deri kimyası, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, Bornova, 1998, İzmir, s. 205.
8. Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227: 680-685.
9. Kılıç, E., Koyun Derisi Atıklarından Elde Edilen Jelatinin Eczacılıkta Yumuşak Kapsül Yapımında Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005, s.58.
10. Leptat, G., De la solubilisation en milieux acides varies de substance de collagene aux depens de divers tendons autres que ceux du rat. *C.R. Soc. Biol.* 1933, 112, p. 1256.
11. Li, G., Fukunaga, S., Takenouchi, K., Physicochemical properties of collagen isolated from calf limed splits. *J. Amer. Leather Chem. Ass.*, 2003, 98: 224-229.
12. Li, H.; Liu, B.L.; Gao, L.Z.; Chen, H.L., Studies on bullfrog skin collagen. *Food Chemistry*, 2004, 84: 65-69

-
13. Meyer, M., Mühlbach, R. And Harzer, D., Solubilisation of cattle hide collagen by thermo-mechanical treatment, *Polymer Degradation and Stability*, 2005,87: 137-142.
 14. Muyonga, J. H.; Cole, C. G. B.; Duodu, K.G., Characterization of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates nilotics*), *Food Chemistry*, 2004,85: 81-89
 15. Nageotte, J., Coagulation fibrillaire in vitro du collagene dissous dans un acide dilue, *C. R. Acad. Sci.*, 1927,184, p.115.
 16. Nageotte, J., Sur la consititution du caillot de collagene forme dans l'eau distillee, faiblement acidifiee: fibrilles, sol et gel. *C.R. Soc. Biol.* 1927, 96, p.464
 17. Sadowska, M., Kolodziejska, I. and Celina, N., Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*), *Food Chemistry*, 81: 257-262.
 18. Shelly, D.C., Cabeza, L.F. and Ortkiese, S.A., Operational regulatory and economic considerations for recovering a U.S.P.-grade gelatin from wet-blue wastes, *Journal of the American Leather Chemists Association*, 2000 ,95,(2) : 48-54.
 19. Sionkowska, A. and Wess, T., Mechanical properties of UV irradiated rat tail tendon (RTT) collagen, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2004,34 : 9-12.
 20. TSE, TS 4134, Azot ve Deri Maddesi Tayini-Titrimetrik Metot, *Türk Standartları Enstitüsü*, 1985,s. 6.
 21. TSE, TS EN ISO 4048, Serbest Yağ Asiti İçeriği ve Diklormetanda Çözünebilen Madde Tayini, *Türk Standartları Enstitüsü*, 2009 a, s.17.
 22. TSE, TS EN ISO 4044, Kimyasal Deney Numunelerinin Hazırlanması, *Türk Standartları Enstitüsü*, 2009b s. 13
 23. TSE, TS EN ISO 4684, Uçucu Madde İçeriğinin Tayini, *Türk Standartları Enstitüsü*, 2009.
 24. Wyckoff, R.W.G. and Corey, R.B., X-ray diffraction pattern from reprecipitated connective tissue. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1936,34, p.285.
 25. Yan, M.; Li, B.; Zhao, X.; Ren, G.; Zhuang, Y.; Hou, H.; Zhang, X.; Chen, L.; Fan, Y., Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*), *Food Chemistry*, 2008, 107: 1581-1586.
 26. Zacchariades, M.P.A., Des actions diverses des acides sur la substance conjonctive, *C.R.Soc. Biol.* 1990,52, p. 1127.
 27. Zhang, Z., Li, G., Shi, B., Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, 2006,90: 23-28.