



TAVUK STERNUMUNDAN ENZİMATİK HİDROLİZASYON İLE GLİKOZAMİNOGLİKAN (GAG) ÜRETİMİ VE İŞLEM PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU

ÇiŖe Karaman¹, Seher Kumcuoğlu^{2*}, Sibel Kaya Bayram³, Ŗebnem Tavman²

¹Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliđi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliđi Bölümü, İzmir, Türkiye

³Abalođlu Lezita Gıda San. A.Ŗ. İzmir, Türkiye

GeliŖ / *Received*: 27.01.2022; Kabul / *Accepted*: 27.06.2022; Online baskı / *Published online*: 11.08.2022

Karaman, Ç., Kumcuoğlu, S., Kaya-Bayram, S., Tavman, Ŗ. (2022). Tavuk sternumundan enzimatik hidrolizasyon ile glikozaminoglikan (GAG) üretimi ve işlem parametrelerinin optimizasyonu. GIDA (2022) 47 (4) 650-662 doi: 10.15237/gida.GD22017

Karaman, Ç., Kumcuoğlu, S., Kaya-Bayram, S., Tavman, Ŗ. (2022). Production of glycosaminoglycan (GAG) from chicken sternum by enzymatic hydrolysis and optimization of process parameters. GIDA (2022) 47 (4) 650-662 doi: 10.15237/gida.GD22017

ÖZ

Bu çalışmada tavuk sternumundan enzimatik hidrolizasyon yöntemiyle sülfatlanmış glikozaminoglikan (GAG) ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve optimum enzimatik hidrolizasyon işlem koşulu belirlenmiştir. İşlem koşullarının optimizasyonu için Yanıt Yüzey Yöntemi kullanılmıştır. Enzim miktarı, pH değeri, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi olarak seçilen dört parametrenin GAG verimi üzerindeki etkilerini açıklamak için Merkezi Kompozit Tasarımıyla oluşturulan deneme deseni uygulanmıştır. En yüksek GAG verimine en kısa ekstraksiyon süresi ve en az enzim miktarı ile ulaşmak hedeflenmiştir. Ekstraksiyon işlemi için en uygun işlem koşulları %0.6 enzim miktarı, 6.99 pH değeri, 62.96°C ekstraksiyon sıcaklığı ve 10.79 saat ekstraksiyon süresi olarak bulunmuştur. Bu koşullarda, ekstraksiyon verim değerinin %26.07 olması öngörölmüş ve deneysel olarak da doğrulanması sağlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Tavuk sternumu, glikozaminoglikan, GAG, enzimatik ekstraksiyon, optimizasyon

PRODUCTION OF GLYCOSAMINOGLYCAN (GAG) FROM CHICKEN STERNUM BY ENZYMATIC HYDROLYSIS AND OPTIMIZATION OF PROCESS PARAMETERS

ABSTRACT

In this study, sulfated glycosaminoglycan (GAG) extraction was performed from chicken sternum by enzymatic hydrolysis method and optimum enzymatic hydrolysis process conditions were determined. Response Surface Method was used for the optimization of the process conditions. In order to determine the effects of the selected four parameters as enzyme amount, pH value, extraction temperature and time on GAG yield, a trial design created with Central Composite Design was applied. It is aimed to reach the highest GAG efficiency in the shortest time and by

* Yazışmalardan sorumlu yazar/ *Corresponding Author*

✉: seher.kumcuoglu@ege.edu.tr

☎: (+90) 232 311 3023

☎: (+90) 232 311 4831

ÇiŖe Karaman; ORCID no: 0000-0002-6733-3796

Seher Kumcuoğlu; ORCID no: 0000-0002-3663-2881

Sibel Kaya Bayram; ORCID no: 0000-0001-9273-9854

Ŗebnem Tavman; ORCID I no D: 0000-0002-3069-1709

using the least amount of enzyme. The most suitable process conditions for the extraction process were found to be 0.6% enzyme amount, 6.99 pH value, 62.96°C extraction temperature and 10.79 hours extraction time. Under these conditions, the extraction yield value was predicted to be 26.07% and it was confirmed experimentally.

Keywords: Chicken sternum, glycosaminoglycan, GAG, enzymatic extraction, optimization

GİRİŞ

Ekstrasellüler matriks, hücreler arası boşlukları dolduran ve hücreleri birbirine bağlayan, çoğu protein, hormon, proteoglikan ve büyüme faktörlerini içeren kompleks ve dinamik bir yapıdan oluşmaktadır (Uslu ve Eltas, 2015). Çok hücreli hayvan dokularında hücre dışında bulunan ekstrasellüler matriks, hücreye oksijen ve besin difüzyonu sağlanmasında gözenekli bir yol sağlamaktadır. Hücre dışı matriks, fibröz proteinler ve heteropolisakkaritlerin bir arada bulunduğu ağ şeklinde bir jel yapıdan oluşmaktadır. Fibröz proteinler (kolajen, elastin, fibrinojen) kıkırdak, tendon, deri gibi bağ dokularının hücrelerarası boşluklarında glikozaminoglikanlardan oluşan jel yapısı içerisinde gömülü vaziyette bulunmaktadır (Ötleş vd., 2015). Glikozaminoglikan çözeltilerinin mukoz ve iplikli bir yapı özelliğine sahip olduğundan dolayı yüksek viskozite ve elastikiyete sahip olduğu bilinmektedir (Köksel, 2017).

Glikozaminoglikanlar genellikle dallanmamış bir heteropolisakkarit olarak bilinmektedir. Çekirdek proteinine kovalent olarak bağlanan heteropolisakkarit zincirlerinden doğal olarak oluşan bir makromoleküllerdir. Dallanmış makromolekülün tamamı proteoglikan olarak adlandırılmakta ve bu yapı tüp fırçası benzeri bir konfigürasyona sahiptir. Başka bir deyişle proteoglikanı oluşturan bu polisakkarit zincirlerine GAG'da denilmektedir. Bu yapının yaklaşık olarak molekül ağırlığı 10^3 kDa'dır (Alexander vd., 1996; Coulson vd., 2015). Doğrusal bir polisakkarit olan glikozaminoglikanlar disakkarit bileşimine ve sülfatlanma derecelerine göre adlandırılmaktadır (Scharnweber vd., 2015). Glikozaminoglikanlar sülfatlanmış ve sülfatlanmamış olarak iki temel sınıfa ayrılmaktadır. Kondroitin sülfat, dermatan sülfat, keratan sülfat, heparin ve heparan sülfat sülfatlanmış glikozaminoglikanlar hyalüronik asit ise sülfatlanmamış glikozaminoglikan olarak

bilinmektedir. Kondroitin sülfat kıkırdak, tendon ve aort damarı duvarında; dermatan sülfat kalp kapakçıklarında ve kan damarlarında; keratan sülfat kornea, kıkırdak, kemik, saç, tırnakta bulunmaktadır (Ötleş vd., 2015). Çekirdek proteinine bağlı olarak bulunan kondroitin sülfat, eklem kıkırdağındaki proteoglikanlarda bulunmaktadır (Garnjanagoonchorn vd., 2007). Kondroitin sülfat, art arda gelen N-asetil-D-galaktozamin ve D-glukuronik asit birimlerin oluşmaktadır. Sülfatlanma konumuna bağlı olarak kondroitin-4-sülfat ve kondroitin-6-sülfat olarak ikiye ayrılmaktadır. Kondroitin-4-sülfat yapısında 4 nolu karbon atomu sülfat grubu taşırken, kondroitin-6-sülfat yapısında ise 6 nolu karbon atomu sülfat grubu taşımaktadır (Lohmander vd., 1980). Kondroitin sülfat; kollajen fibril bütünlüğü, hücre içi sinyal iletimi, hücre tanıma, akson oluşumu sırasında hücre yönlendirme, ekstrasellüler matriks bileşeninin glikoprotein yüzeyine bağlanması gibi birçok biyolojik fonksiyona sahiptir (Gilbert vd., 2004). Kondroitin sülfat, tek başına, glikozamin veya diğer bileşenler ile kombinasyon halinde, Avrupa ve ABD'de bir nutrasötik olarak kullanılmaktadır (Volpi, 2009). Glukozamin, eklemlerde oluşan hasarın etkisini azaltan bir amino monosakkarit olarak bilinirken; kondroitin sülfat artrit, arteriyoskleroz (damar sertleşmesi) ve kanser gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Kozakçıoğlu, 2009; Theocharis vd., 2006). Ayrıca glikozaminoglikanların antikoagülan, hipolipidemik, antitümör, antiviral gibi vücudun bağışıklığını destekleyici birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Cui vd., 2012).

Köpek balığı, sığır eti, karides ve domuz daha önceden glikozaminoglikan eldesi için potansiyel bir hammadde kaynağı olarak kullanılmaktayken sonrasında bu kaynakların pahalı olması, alerjik reaksiyonlara sebep olması ve tüketiminin yaygın olarak tercih edilmemesi gibi bazı sorunlar ortaya çıkmıştır. Ticari olarak GAG ekstraksiyonunda

kullanılan yüksek hammadde maliyetinden dolayı farklı GAG kaynaklarına ihtiyacın arttığı görülmektedir. Bu sebeple yapılan çalışmalar sonucunda tavuk ayağı kıkırdığı potansiyel bir GAG kaynağı olarak belirlenmiştir (Widyaningsih vd., 2017).

Gıda endüstrisinde et sektöründe kesim sonrası ortaya çıkan atıklar, çevresel kirliliğe sebep olmakta ve oluşan bu atıkların değerli ürünlere dönüştürülmesi için yeni yöntemler geliştirilmesi gerekmektedir (Martone vd., 2005). Mezbaha ve kümes hayvancılığı kesiminden kaynaklanan atıklar, kıkırdak kaynakları olarak değerlendirilebilmektedir. Kıkırdak, ise temel olarak glikozaminoglikanlar ve kollajenlerden oluşmaktadır (Garnjanagoonchorn vd., 2007; Vázquez vd., 2013). Tavuk kesimhaneye atıklarından biri göğüs kafesi kemiği (sternum), ekstrasellüler matris bileşenlerince zengin olan bir atık olarak bilinmektedir.

Kondroitin sülfat genel olarak alkali yöntem ile, enzimatik yöntem ile ve ultrasonik yöntem ile üç farklı şekilde ekstrakte edilmektedir (He vd., 2014). Alkali ortamda enzimatik hidroliz, kıkırdakta ve bağ dokuda yaygın olarak kondroitin sülfat eldesi için en yaygın yöntem olarak kabul edilmektedir. Alkaliler, kondroitin sülfat ile çekirdek proteini arasındaki kovalent bağları parçalayabilmektedir. Papain, alkalaz, tripsin ve pepsin gibi enzimler ise genellikle kıkırdaktan kondroitin sülfat salınımında proteini hidrolize etmek için seçilmektedir (Wang vd., 2019). Endüstriyel uygulamalarda sığır ve domuz soluk borusu, köpekbalığı yüzgeci gibi hammaddelerden kondroitin sülfat izolasyonu için gerçekleştirilen dört temel işlem basamağı mevcuttur. Hammaddenin kimyasal maddeler ile hidrolizi, proteoglikan çekirdeğinin parçalanması, proteinlerin seçici olarak ortadan kaldırılması, kondroitin sülfat izolasyonu ve saflaştırılması bilinen temel işlem basamaklarıdır (Shi vd., 2014; Vázquez vd., 2013).

Bu çalışmada tavuk sternumundan enzimatik hidrolizasyon yöntemi ile glikozaminoglikan ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Yanıt Yüzey Yöntemi ile enzimatik ekstraksiyon

parametrelerinin GAG verimi üzerine olan etkisinin belirlenmesi ve ekstraksiyon koşullarının optimize edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Bu çalışmada, GAG üretiminde materyal olarak Abalıoğlu Lezita Gıda Sanayi A.Ş., İzmir' den temin edilen tavuk sternumu kullanılmıştır. Tavuk sternumu kuterde (K+G Wetter, Almanya) 750 rpm başlangıç dönüş hızından 4400 rpm bitiş dönüş hızına kademeli olarak artacak şekilde beşinci devirde boyutu 1 cm x 1 cm x 0.5 cm olacak şekilde parçalanmıştır. Ardından boyutları küçültülen tavuk sternumu porsiyonlara ayrılmış ve ekstraksiyon uygulamasına kadar -18°C sıcaklıktaki soğuk depoda polietilen poşet içerisinde vakumlanarak muhafaza edilmiştir. Her üretim periyodunda aynı partiden hammadde kullanımı gerçekleştirilmiştir. GAG ekstraksiyonunda kullanılan papain (EC 3.4.22.2; 30000 units/mg) enzimi ve gerekli kimyasal maddeler Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

YÖNTEM

Hammadde Bileşim Analizi

Çalışma kapsamında hammadde olarak kullanılan tavuk sternumunun kimyasal kompozisyonunu belirlemek amacıyla nem (AOAC 950.468), kül (AOAC 920.153), yağ (AOAC 960.39) ve protein (AOAC 983.19) analizleri gerçekleştirilmiştir. Toplam karbonhidrat içeriği, toplam ağırlıktan (100g) protein, yağ ve kül miktarı ile nem içeriği arasındaki farkın hesaplanmasıyla tespit edilmiştir (Vázquez vd., 2016).

Enzimatik Hidrolizasyon

Enzimatik hidrolizasyon çalışmasında Le Vien vd. (2017) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek glikozaminoglikan ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. GAG ekstraksiyonu için kullanılan tavuk sternumu temizlemek amacıyla su ile yıkanmış ve ardından boyut küçültmesi amacıyla parçalanmıştır. Ön işlemler sonrasında tavuk sternumuna 1:10 (w/v) katı çözügen oranına göre fosfat tamponu eklenmiştir. Gerçekleştirilen ön denemeler sonucunda

belirlenen ekstraksiyon işlem parametreleri göz önünde bulundurularak çözeltiye papain enzimi eklenmiş ve karışım çalkalamalı su banyosu (WSB-30, Dahian, Kore) içerisinde deneme planında yer alan koşullarda ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Ekstraksiyon işleminin sonunda papain enziminin inaktivasyonu için örnek 100°C'deki kaynayan suda 10 dakika bekletilerek ısı işlem uygulanması sağlanmıştır. Enzim inaktivasyonunun ardından örnek karışımı soğutulmuş ve proteinlerin çöktürülmesi amacıyla, 4°C'de bir gece boyunca 1:10 katı çözgen oranında hazırlanan %10'luk TCA (v/v) çözeltisi ile karıştırılarak bekletilmiştir. İşlem sonunda santrifüj işlemiyle (9000 rpm, 4°C, 30 dakika) (Universal 320R Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Almanya) çöktürülen alt faz uzaklaştırılmış, üst faz ise 1:2 (v/v) oranında eklenen %95'lik (v/v) etanol ile 1 gece boyunca karıştırılarak çöktürülmüştür. Elde edilen çökelti 9000 rpm'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Santrifüj sonrasında toplanan alt fazlar saf suda 1:20 (w/v) oranda çözdürülerek 48 saat boyunca saf suya karşı 3.5 kDa'luk diyaliz membran (Thermo Fisher SnakeSkin™, 3.5 K MWCO, 16 mm) içerisinde diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemi sonunda örnekler liyofilizatör (Martin Christ Alpha 1-2 LD plus, Osterode am Harz, Almanya) kullanılarak -56°C'de 48 saat liyofilize edilmiştir. Liyofilize GAG örnekleri analiz edilinceye kadar -18°C'de saklanmıştır.

Sülfatlı Glikozaminoglikan Analizi ile GAG Veriminin Belirlenmesi

Ekstraksiyonu gerçekleştirilen GAG örneklerinin kondroitin sülfat içeriği dimetilmetilen mavisi (DMMB) yöntemi ile kondroitin-4-sülfat standardı kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. İlk olarak, Whattman® 3MM filtre kâğıdı kullanarak DMMB reaktifi hazırlanmıştır (pH=3.0). Boya çözeltisi 1 litre su içinde 3.04 g glisin, 1.6 g NaCl ve 95 ml 0.1M asetik asit içerecek şekilde hazırlanmış bunun içinde 16 mg DMMB boya kullanılmıştır. Standart çözelti (kondroitin-4-sülfat) (500 µg/ml su) olacak şekilde hazırlanmıştır, daha sonra su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. 96 kuyulu mikropilaya içine her numuneden pipet ile 20 µl çekilmiştir. Ardından 200 µl DMMB eklenerek 5 saniye çalkalanmıştır.

Daha sonra 525 nm dalga boyunda plaka okuyucu (UV/VIS Multi well Spektrofotometre/Thermo Scientific Multiskan GO) kullanarak absorpsiyon değeri ölçülmüştür (Farndale vd., 1986).

Standart eğrinin çizilmesi için 1 mg kondroitin sülfat standardı (Sigma C9819) 5 mL saf suda çözdürülmüştür. Hazırlanan bu stok çözeltiden 0-70 ppm konsantrasyon aralığında kondroitin sülfat çözeltileri hazırlanmıştır. Örneklerin analizinde ise; liyofilize GAG örnekleri saf suda 5mg/50mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Analiz için 20 µL örnek alınarak 200 µl DMMB boyası ilave edilmiştir. Oluşan rengin absorpsiyon değeri 525 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Tavuk sternumundan elde edilen glikozaminoglikana ait verim Eşitlik (1) kullanılarak elde edilmiştir.

$$GAG \text{ verimi } (\%) = \frac{\text{Liyofilize ürünün } g \text{ GAG içeriği}}{\text{Hammaddenin kuru temelde } g \text{ ağırlığı}} \times 100 \quad (1)$$

Deneyel Tasarım ve Yanıt Yüzey Yöntemi ile Enzimatik Hidrolizasyon Koşullarının Optimizasyonu

İşlem koşullarının optimizasyonu dört faktörlü Merkezi Tümeleşik Tasarım yöntemi kullanılarak Design Expert v.7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Bu beş düzey; +1 ve -1 ile ifade edilen faktöriyel noktalar, +α ve -α ile ifade edilen eksenel noktalar, 0 olarak ifade edilen merkez noktalarından oluşmaktadır.

Optimizasyon çalışmasında bağımsız işlem değişkenleri olarak enzim miktarı (%0.6-%1.2 aralığı), fosfat tamponu pH değeri (6.5-7.5 aralığı), ekstraksiyon sıcaklığı (60°C-70°C) ve süresi (10-20 saat aralığı); yanıt olarak GAG verimi seçilmiştir. Bağımsız işlem değişkenleri ve yanıt arasındaki ilişkiyi ifade eden matematiksel modeller çoklu lineer regresyon analizi gerçekleştirilerek oluşturulmuş ve yanıt için uygun model belirlenmiştir. İşlem değişkenlerinin her bir yanıt üzerindeki etkisi ve optimizasyon için seçilecek en uygun model varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen yanıtların

regresyon analizi için Eşitlik (2)'de verilen model kullanılmıştır.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \dots + e \quad (2)$$

Belirtilen matematiksel modelde Y yanıt değişkenini, β_0 ve β_i sırasıyla sabit ve lineer

katsayıyı temsil etmektedir. β_{ij} değişkenler arasındaki katsayıyı, k faktör sayısını ve e rastgele hatayı temsil etmektedir (Leong vd., 2013).

Çizelge 1'de tavuk sternumdan GAG eldesi için belirlenen bağımsız değişkenler ve kodlanmış seviyeleri gösterilmiştir.

Çizelge 1. GAG ekstraksiyonu için bağımsız değişkenlerin deneysel aralığı ve kodlanmış seviyeleri
Table 1. The experimental range and coded levels of the independent variables for GAG extraction

Bağımsız Değişkenler <i>Independent Variables</i>	Kodlanmış Sembol <i>Coded Symbol</i>	Kodlanmış Seviyeler <i>Coded Levels</i>				
		-2	-1	0	1	2
Enzim Miktarı (%ow/w _{protein}) <i>Enzyme Amount (%ow/w_{protein})</i>	X ₁	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5
pH	X ₂	6.0	6.50	7.0	7.5 0	8.0
Ekstraksiyon Sıcaklığı (°C) <i>Extraction Temperature (°C)</i>	X ₃	55	60	65	70	75
Ekstraksiyon Süresi (saat) <i>Extraction Time (hour)</i>	X ₄	5	10	15	20	25

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 ve Design Expert 7.0 paket programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tahminlenen değerler ile deneysel veriler arasında fark olup olmadığını tek örnek t-testi kullanılarak, uygulanan regresyon analizi, istatistiksel analizler, izohips grafikleri, yanıt yüzey grafikleri ve optimizasyon işlemleri

Design Expert 7.0 (Stat-Ease Inc., ABD) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Hammadde Bileşim Analizi

Tavuk sternumunun kimyasal bileşimi Çizelge 2'de belirtilmiştir.

Çizelge 2. Hammaddeye ait kimyasal bileşim analiz sonuçları
Table 2. Chemical composition analysis results of raw material

Kimyasal Bileşim* <i>Chemical Composition</i>	Tavuk Sternumu (%) <i>Chicken Sternum (%)</i>
Nem (<i>Moisture</i>)	81.01±0.43
Protein (<i>Protein</i>)	12.64±0.36
Yağ (<i>Fat</i>)	0.42±0.05
Karbonhidrat (<i>Carbohydrate</i>)	4.18±0.52
Kül (<i>Ash</i>)	1.75±0.01

*Yaş temel **Wet basis*

Yapılan bir çalışmada kıkırdak matriksinin genel olarak %10-25 kolajen, %5-15 proteoglikan %70-80 sudan oluştuğu belirtilmiştir (Horkay, 2012). Akram ve Zhang (2020) tarafından tavuk sternal kıkırdagından kolajen ekstraksiyonu üzerine gerçekleştirilen çalışmada kıkırdak

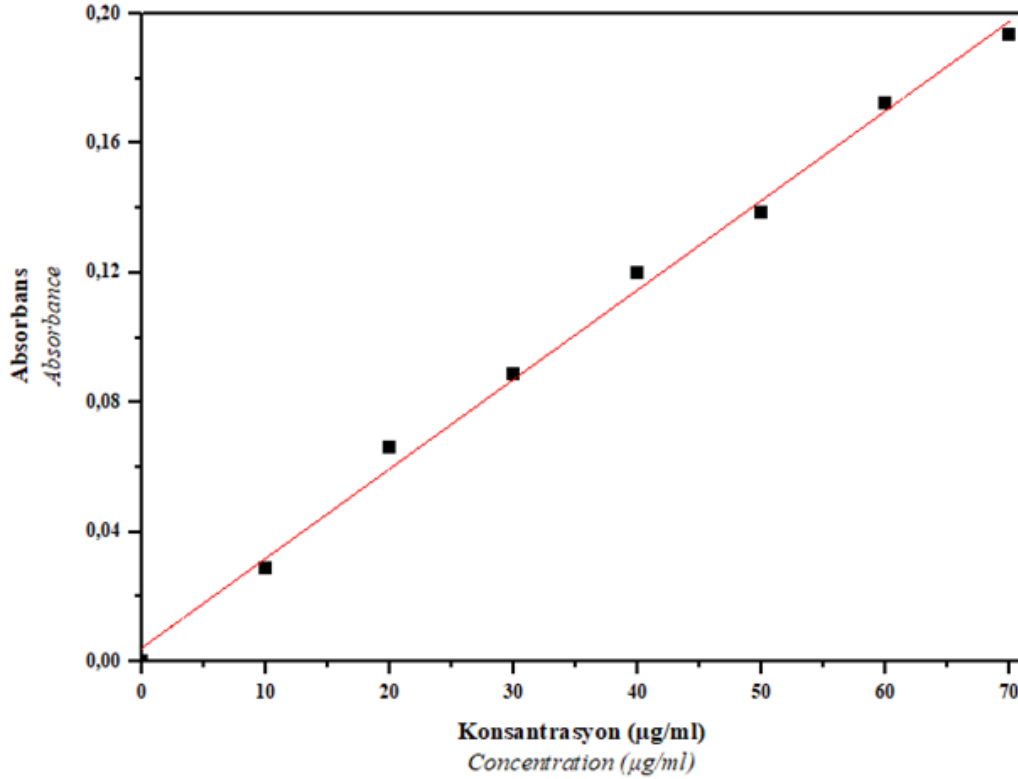
dokusunun bileşiminin %74.32 nem, %0.17 yağ, %2.30 kül, %12.7 protein ve %10.51 karbonhidrat içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Tavuk sternumunun kimyasal bileşimi literatürde yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında sonuçların benzer olduğu tespit edilmiştir.

Sülfatlı Glikozaminoglikan Analizi ile GAG İçeriğinin Belirlenmesi

Şekil 1'de kondroitin-4-sülfat standardına ait standart eğri verilmiştir. Örneklerin içerdiği kondroitin-4-sülfat konsantrasyonu miktarı

Eşitlik (3) ($R^2=0.9957$) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$y = 0.0028x + 0.004 \quad (3)$$



Şekil 1. Kondroitin-4-sülfat standart eğrisi
Figure 1. Chondroitin-4-sulfate standard curve

Örneklerin içerdiği glikozaminoglikan konsantrasyonu belirlendikten sonra Eşitlik 1 kullanılarak ekstraksiyon verim değerleri hesaplanmıştır.

Deneyel Tasarım ve Yanıt Yüzey Yöntemi ile Enzimatik Hidrolizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Ekstraksiyon işlem koşullarının belirlenmesi için Merkezi Tümlşik Tasarım kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmasında işlem değişkenleri olarak enzim miktarı (%0.6 - %1.2 aralığı), fosfat tamponu pH değeri (6.5 - 7.5 aralığı) ekstraksiyon sıcaklığı (60°C - 70°C aralığı) ve süresi (10 - 20 saat aralığı) belirlenmiştir. Yanıt

olarak ise GAG verimi seçilmiştir. İşlem değişkenlerinin her bir yanıt üzerindeki etkisi ve optimizasyon için seçilecek en uygun model, varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir.

Tavuk sternumundan glikozaminoglikan ekstraksiyonuna ait olan deneme planı ve bu plana göre gerçekleştirilen denemelere ait deneysel sonuçlar Çizelge 3'de belirtilmiştir. Belirtilen deneme planında sırasıyla X₁: enzim miktarı (%w/w_{protein}), X₂: pH, X₃: ekstraksiyon sıcaklığı (°C), X₄: ekstraksiyon süresi değişkenler olarak; GAG verimi yanıt olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3. Kodlanmış değerlerde CCRD planı ve gözlemlenen yanıt
 Table 3. CCRD plan in coded value and observed response

Deney No <i>Trial No</i>	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	GAG verimi (%) <i>GAG yield (%)</i>
1	1	1	1	1	15.86
2	0	0	0	0	26.59
3	0	0	0	0	28.50
4	1	-1	-1	1	12.18
5	1	1	1	-1	20.05
6	1	1	-1	1	14.55
7	-1	-1	-1	-1	22.19
8	1	-1	1	-1	11.00
9	0	2	0	0	16.63
10	-1	1	1	1	13.38
11	-1	1	-1	-1	20.72
12	-1	-1	1	-1	12.82
13	0	0	0	-2	12.39
14	0	0	-2	0	17.93
15	-1	1	1	-1	17.01
16	-1	1	-1	1	13.66
17	0	0	0	0	28.15
18	1	1	-1	-1	11.05
19	-1	-1	1	1	11.55
20	0	0	0	0	28.66
21	1	-1	-1	-1	10.42
22	0	0	0	0	27.83
23	0	-2	0	0	11.76
24	1	-1	1	1	10.77
25	-1	-1	-1	1	18.03
26	0	0	0	2	11.00
27	2	0	0	0	13.54
28	0	0	2	0	13.20
29	-2	0	0	0	21.62
30	0	0	0	0	27.26

X₁: Enzim Miktarı (%ow/w_{protein}), X₂: pH, X₃: Ekstraksiyon Sıcaklığı (°C), X₄: Ekstraksiyon Süresi (saat)
 X₁: Enzyme Amount (%ow/w_{protein}), X₂: pH, X₃: Extraction Temperature (°C), X₄: Extraction Time (hour)

Her bir faktörün yanıt üzerindeki lineer, interaksiyon ve kuadratik etkilerinin istatistiksel olarak önemliliği F ve P-değerleri değerlendirilerek belirlenmiştir. GAG verimi tahminlenmesi için model uyumluluğu aşağıda belirtildiği gibi ikinci dereceden polinomiyal denklem Eşitlik (4) ile açıklanmıştır.

$$GAG\ verimi\ (\%) = +27.83 - 1.65X_1 + 1.13X_2 - 0.83X_3 - 0.75X_4 + 1.06X_1X_2 + 1.83X_1X_3 + 1.06X_1X_4 + 1.44X_2X_3 - 0.47X_2X_4 - 0.21X_3X_4 - 2.57X_1^2 - 3.42X_2^2 - 3.08X_3^2 - 4.04X_4^2 \quad (4)$$

Elde edilen kuadratik modelin deneysel verilerle istatistiksel uyumunu incelendiğinde modelin varyasyonun büyük bir kısmını açıkladığı görülmektedir (R²> 0.97). Aynı zamanda R² ile Düzeltilmiş-R² değeri arasındaki farkın %2'nin altında olması (birbirlerine yakın olması) modelin istatistiksel olarak önemsiz terimleri içermediğini göstermektedir. Bir regresyon modelinin daha sonra yapılacak gözlemler için bir tahminleme modeli olarak kullanılabilmesi için ise yeterli tahminleme ve PRESS istatistiği değerleri önem taşımaktadır. Yeterli tahminleme değerinin 4'den

büyük olması gerekmektedir (Myers ve Montgomery, 1995). Varyasyon katsayısı (C.V. %) deneysel verilerdeki kalıntı varyasyonun ortalamaya bağlı bir ölçüsüdür. Büyük varyasyon katsayısı değerleri, verilerin ortalamadan çok fazla saptıklarını, küçük varyasyon katsayısı değerleri ise verilerin hemen hemen ortalamaya aynı değere sahip olduğunu göstermektedir (Lazic, 2004). Varyasyon katsayısı, CV= %8.02, gerçekleştirilecek deneylerin tahmin

edilebilirliğinin ve güvenilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. İkinci dereceden regresyon modelinin ANOVA analiz sonuçları incelendiğinde (Çizelge 4) modele ait Fisher F testi düşük istatistik değerine sahip [$(P_{\text{model}} > F) = 0.0001$] olduğundan kuadratik model uyum eksikliği göstermemiş ve regresyon %95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Çizelge 4. Kuadratik model için belirlenen varyans analiz tablosu (ANOVA)

Table 4. Analysis of variance table for quadratic model (ANOVA)

Kaynak <i>Source</i>	Kareler Toplamı <i>Sum of Squares</i>	SD <i>DF</i>	Karelerin ortalaması <i>Mean Square</i>	F Değeri <i>F Value</i>	P-Değeri <i>P-Value</i>
Model <i>Model</i>	1114.55	14	79.61	41.11	< 0.0001
Kalıntı <i>Residual</i>	29.05	15	1.94		
Uyum Eksikliği <i>Lack of Fit</i>	25.93	10	2.59	4.16	0.0647
Saf Hata <i>Pure Error</i>	3.12	5	0.62		
Toplam <i>Total</i>	1143.60	29			

$R^2 = 0.9746$, Düzeltilmiş $R^2 = 0.9509$, Varyasyon Katsayısı (%) = 8.02, SD: Serbestlik Derecesi $R^2 = 0.9746$, *Adjusted R^2 = 0.9509*, *Coefficient of Variation (%) = 8.02*, *DF: Degrees of Freedom*

Her bir faktörün yanıt üzerindeki lineer, interaksiyon ve kuadratik etkilerinin istatistiksel olarak önemliliği Çizelge 5'de listelenen T ve P-değerleri göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. En küçük kareler uyumu ve parametre tahminleri incelendiğinde Çizelge 5'te yer alan X_2X_4 ve X_3X_4 interaksiyon etki değerleri haricinde, diğer lineer, kuadratik ve interaksiyon etki değerleri anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$).

Şekil 2'de GAG verimini tahmin etmede kullanılan yanıt yüzey grafiklerini görülmektedir.

Tavuk sternumundan farklı hidrolizasyon koşullarında elde edilen glikozaminoglikan ekstraktının verim değerlerinin sonuçları Çizelge 3'te belirtilmiştir. Ekstraksiyon verim değerleri %10.42 ile %28.66 arasında değişmektedir. Ekstraksiyon verimi değerlerine ait regresyon katsayıları ve parametre tahminleri çizelgesi (Çizelge 5) incelendiğinde, enzim miktarı, pH, sıcaklık ve süre değişkenlerinin yanıt üzerine etkisi anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$).

3 boyutlu yanıt yüzey izohips eğrileri incelendiğinde artan pH değerinde enzim miktarının %0.8 seviyesine kadar artırılması GAG verim değerini optimum noktaya ulaştırırken enzim miktarında artışın devam etmesi ile verim değerinde azalma gözlemlenmiştir. Enzim miktarı ve pH değeri sabit tutulup ekstraksiyon sıcaklık değeri artırıldığında ise GAG veriminin azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum enzimin çalıştığı optimum sıcaklık koşulunun 65°C civarında olduğu ile ilişkilendirilmektedir Enzim miktarı ve sıcaklık değerinin yüksek seviyelere artırılmasının GAG verimi üzerinde negatif bir etkide bulunduğu görülmektedir. GAG ekstraksiyonunda optimum pH değerinin 7 civarında olduğu artan pH değerinin verimi azalttığı izohips eğrilerinden anlaşılmaktadır. Garnjanagoonchorn vd. (2007) timsah, köpekbalığı, vatoz ve tavuk omurgası kullanarak enzimatik yöntem ile kondroitin sülfat ekstraksiyonu gerçekleştirmiştir. 100 g kurutulmuş örnekte kondroitin-4 sülfat

miktarının 11.55 ile 14.84 g aralığında değiştiğini belirlemiştir. Luo vd. (2002) tavuk omurga kıkırdığı kullanarak yaptığı çalışmada yaklaşık olarak %30.8 verim ile kondroitin sülfat eldesi gerçekleştirmiştir. Srichamroen vd. (2013) hammadde olarak etlik piliç kıkırdığı kullanarak doku otolizi ile kondroitin sülfat-peptit eldesi gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda 100 g kuru

kıkırdak dokudan 20 g'dan fazla kondroitin sülfat-peptit elde edilmiştir ve izole edilen kondroitin sülfat-peptit bileşiminin %82.5'ini kondroitin-4-sülfatın oluşturduğu tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında tavuk sternumundan elde edilen glikozaminoglikan verimi literatürde belirtilen verim değerlerine benzerlik göstermektedir.

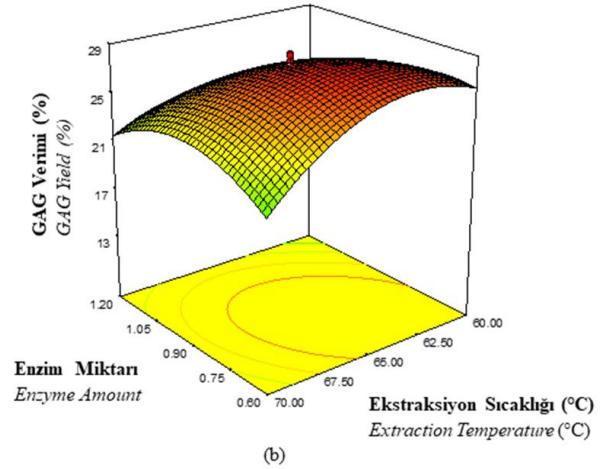
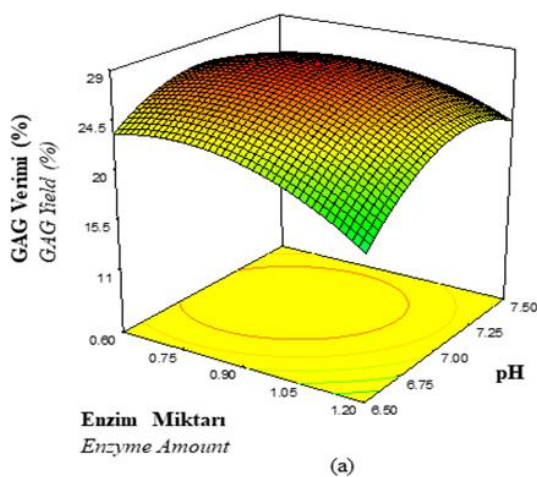
Çizelge 5. En küçük kareler uyumu ve parametre tahminleri (regresyon katsayılarının önemi)

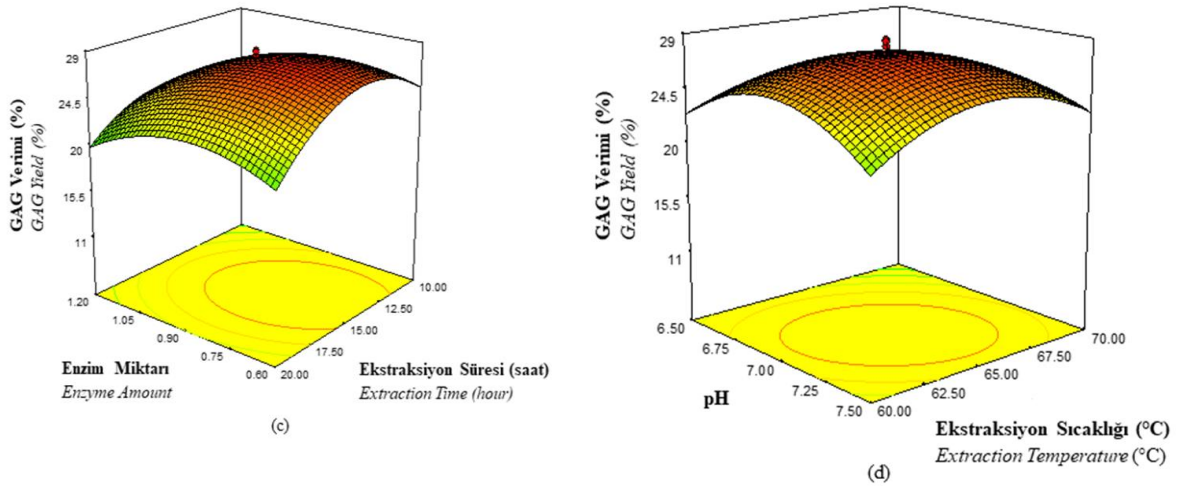
Table 5. The least-squares fit and parameter estimates (significance of regression coefficients)

Model Terimi <i>Model Term</i>	Tahminlenen Değer <i>Parameter Estimate</i>	Hesaplanmış T-değeri <i>Computed T-Value</i>	P-değeri <i>P-Value</i>
Kesim Noktası	27.83	48.82	-
X ₁	-1.65	-5.89	< 0.0001
X ₂	1.13	4.03	0.0012
X ₃	-0.83	-2.96	0.0109
X ₄	-0.75	-2.68	0.0183
X ₁ X ₂	1.06	3.03	0.0082
X ₁ X ₃	1.83	5.23	< 0.0001
X ₁ X ₄	1.06	3.03	0.0082
X ₂ X ₃	1.44	4.11	0.0009
X ₂ X ₄	-0.47	-1.34	0.2000
X ₃ X ₄	-0.21	-0.60	0.5535
X ₁ ²	-2.57	-9.52	< 0.0001
X ₂ ²	-3.42	-12.67	< 0.0001
X ₃ ²	-3.08	-11.41	< 0.0001
X ₄ ²	-4.04	-14.96	< 0.0001

X₁: Enzim Miktarı (%ow/w_{protein}), X₂: pH, X₃: Ekstraksiyon Sıcaklığı (°C), X₄: Ekstraksiyon Süresi (saat)

X₁: Enzyme Amount (%ow/w_{protein}), X₂: pH, X₃: Extraction Temperature (°C), X₄: Extraction Time (hour)





Şekil 2. GAG ekstraksiyonunda kullanılan bağımsız değişken etkileşimlerinin GAG verimi (%) üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu yanıt yüzey izohips eğrileri. (a) enzim miktarı ve pH, (b) enzim miktarı ve ekstraksiyon sıcaklığı, (c) enzim miktarı ve ekstraksiyon süresi, (d) pH ve ekstraksiyon sıcaklığı

Figure 2. 3D response surface isobands curves showing the effect of independent variable interactions used in GAG extraction on GAG yield (%). (a) enzyme amount and pH, (b) enzyme amount and extraction temperature, (c) enzyme amount and extraction time, (d) pH and extraction temperature

Optimum İşlem Koşulunun Belirlenmesi

Gerçekleştirilen istatistiksel testler sonucunda yanıt için belirlenen model “istenilirlik fonksiyonu” yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışılan deneysel bölge içerisinde enzim miktarı (%0.6- %1.2 aralığında) ve ekstraksiyon süresinin (10-20 saat aralığı) minimize edilmesi, pH (6.5-7.5) ile ekstraksiyon sıcaklığı (60°C-70°C) değerlerinin kodlanmış seviyeler aralığında bırakılması, GAG verimi değerinin ise maksimize edilmesi kriteri seçilerek optimum işlem koşulları bulunmuştur. Optimizasyon çalışması sonucunda optimum işlem parametreleri; %0.6 enzim miktarı, 6.99 fosfat tamponu pH değeri, 62.96°C ekstraksiyon sıcaklığı ve 10.79 saat ekstraksiyon süresi olarak tespit edilmiştir. Yanıt olarak öngörülen GAG

verim değeri 0.912 istenilebilirlik düzeyinde %26.07 olarak öngörülmüştür.

Doğrulama Analizleri

Modelden tahminlenen optimum işlem parametrelerinin deneysel olarak doğrulaması gerçekleştirilmiştir. Modele göre belirlenmiş optimum işlem koşullarında beş deneme gerçekleştirilmiştir. Doğrulama denemeleri ile modelden tahminlenen yanıt arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark olup olmadığı tek örnek t-testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar, deneysel GAG veriminin minimum %95 güven aralığı (%23.69) ile maksimum %95 güven aralığı (%26.64) sınırları dahilinde olduğunu göstermiştir (Çizelge 6).

Çizelge 6. Optimizasyon sonuçlarının deneysel olarak doğrulanması için belirlenen istatistiksel analiz sonuçları

Table 6. Statistical analysis results determined for experimental verification of the optimization results

Yanıt Response	Tahminlenen Değer Estimated Parameter	Deneysel Değer Experimental Value	OSH MSE	% Hata* % Error*
GAG verim (%) GAG yield (%)	26.07	25.58±0.46	0.207	1.92

OSH: Ortalama Standart Hata, *% Hata= (|Deneysel Değer-Tahminlenen Değer|/Deneysel Değer) x 100
MSE: Mean Standard Error, *% Error= (|Experimental Value-Parameter Estimate|/Experimental Value) x 100

Doğrulama denemeleri sonucunda sternumdan elde edilen GAG verimi modelden tahminlenen değere oldukça yakın olmakla beraber, istatistiksel olarak da aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$). Rani vd. (2017), 0.1 M sodyum asetat tamponu içerisinde papain enzimi kullanarak 65 °C'de, 24 saat ekstraksiyon süresiyle tavuk omurga kırıkdağından kondroitin sülfat ekstraksiyonu gerçekleştirmiştir. Yapılan bu çalışmada kondroitin sülfat ekstraksiyon verimi %15 olarak tespit edilmiştir. Le Vien vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada ise tavuk omurga kırıkdağından papain enzimi kullanılarak GAG ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve ekstraksiyon verimi %25.7 olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen çalışmaya ait optimum işlem koşulları; %0.85 enzim miktarı, 5.81 fosfat tamponu pH değeri, 53.34°C ekstraksiyon sıcaklığı ve 204 dakika ekstraksiyon süresi olarak tespit edilmiştir. Tavuk sternumundan GAG ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği bu çalışmada ise ekstraksiyon verimi %26.07 olarak bulunmuştur. Elde edilen verim değerinin ve optimum hidrolizasyon parametrelerinin literatürde verilen değerlerle kıyaslanabilir nitelikte olduğu görülmektedir.

SONUÇ

Tavuk kesimi sonrasında pek çok farklı atık ortaya çıkmaktadır ve oluşan bu atıkların değerlendirilmesi gerekmektedir. Gıda sektöründe oluşan bu atıklardan katma değeri yüksek bileşenlerin elde edilmesine yönelik araştırmalar son yıllarda giderek artmaktadır. Günümüzde kondroitin sülfat yaygın olarak artrit tedavisinde kullanılmaktadır. Sağlık üzerinde sergilediği pozitif etkilerinin yanı sıra kozmetik ve eczacılık sektöründe, biyo ve nanoteknolojik süreçlerdeki uygulamalarında kondroitin sülfata olan ilginin giderek arttığı bilinmektedir. Bu çalışmada tavuk kesimi sonrasında ortaya çıkan tavuk sternumundan enzimatik hidrolizasyon yöntemi ile papain enzimi kullanılarak glikozaminoglikan ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Optimum ekstraksiyon işlem parametreleri yanıt yüzey yöntemine göre belirlenmiştir. Ekstraksiyon işlem parametrelerinin GAG verimi üzerine etkisi ikinci dereceden polinomial model ile

açıklanmıştır. Belirlenen kriterlere göre optimum işlem koşuluna %0.6 enzim miktarında, 6.99 pH değerinde, 10.79 saat işlem süresinde ve 62.96°C sıcaklıkta, %26.07 verim ile ulaşılabilmektedir. Elde edilen optimum işlem parametrelerinin altında ya da üzerinde gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi çalışmalarının ekonomik olmayacağı ve zaman kaybına yol açabileceği düşünülmektedir. Gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmasında tavuk sternumunun potansiyel bir glikozaminoglikan kaynağı olacağı belirlenmiştir. Gelecek yıllarda GAG üzerinde daha spesifik çalışmaların yapılacağı ve çalışma sonucunda elde edilen verilerin yeni çalışmalara imkan sağlayabileceği düşünülmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarların başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

Seher KUMCUOĞLU ve Şebnem TAVMAN çalışma konusu belirleme, yöntem, makalenin yazımı ve danışmanlık kısımlarında katkı sağlamışlardır. Çiše KARAMAN analizlerin gerçekleştirilmesi, sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi, yorumlanması ve makalenin yazım aşamalarında görev almıştır. Sibel Kaya BAYRAM hammadde temininde ve bileşim analizlerinin gerçekleştirilmesi sırasında katkı sağlamıştır. Tüm yazarlar tarafından makalenin son hali okunmuş ve onaylanmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü [Proje No: FYL-2020-22497 ve FBG-2020-21468] tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Akram, A.N., Zhang, C. (2020). Extraction of collagen-II with pepsin and ultrasound treatment from chicken sternal cartilage; physicochemical and functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64(2020): 105053, doi: 10.1016/j.ultsonch. 2020.105053.

Alexander, H., Brunski, J.B., Cooper, S.L., Hench, L.L., Hergenrother, R.W., Hoffman, A.S., Yannas, I.V. (1996). Classes of materials

- used in medicine. In: Biomaterials Science, Ratner, B.D. (ed.), Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E, Academic Press, the UK, pp. 37-130.
- Coulson-Thomas, Y.M., Coulson-Thomas, V.J., Norton, A.L., Gesteira, T.F., Cavalheiro, R.P., Meneghetti, M.C.Z., Nader, H.B. (2015). The identification of proteoglycans and glycosaminoglycans in archaeological human bones and teeth. *PLoS ONE*, 10(6): e0131105, doi: 10.1371/journal.pone.0131105.
- Cui, Q., Li, G., Yuan, C. (2012). Optimization of glycosaminoglycan extraction on *Patinopecten yessoensis* waste. *Procedia Environmental Sciences*, 16 (2012): 131-137, doi: 10.1016/j.proenv.2012.10.018.
- Farndale, R.W., Buttle, D.J., Barrett, A.J. (1986). Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 883(2): 173-177.
- Garnjanagoonchorn, W., Wongekalak, L., Engkagul, A. (2007). Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5):465-471, doi: 10.1016/j.ccep.2006.05.019.
- Gilbert, M.E., Kirker, K.R., Gray, S.D., Ward, P.D., Szakacs, J.G., Prestwich, G.D., Orlandi, R.R. (2004). Chondroitin sulfate hydrogel and wound healing in rabbit maxillary sinus mucosa. *The Laryngoscope*, 114(8): 1406-1409, doi: 10.1097/00005537-200408000-00017.
- He, G., Yin, Y., Yan, X., Yu, Q. (2014). Optimisation extraction of chondroitin sulfate from fish bone by high intensity pulsed electric fields. *Food Chemistry*, 164 (2014): 205-210, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.032.
- Horkay, F. (2012). Interactions of cartilage extracellular matrix macromolecules. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 50(24): 1699-1705, doi: 10.1002/polb.23191.
- Kozakçioğlu, M. (2009). Osteoartrit ve Glukozamin/Osteoarthritis and Glucosamine. *Turkish Journal of Rheumatology*, 24(2):94.
- Köksel, H. (2017). Karbonhidratlar. *Gıda Kimyası*, Saldamlı, İ. (baş ed.), Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, Türkiye, s. 124-127.
- Lazic, Z. R. (2004). *Design of Experiment in Chemical Engineering*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 1-152p. ISBN: 978-3-527-31142-2.
- Le Vien, N.T., Nguyen, P.B., Cuong, L.D., An, T.T.T., Dao, D.T.A., (2017). Optimization of papain hydrolysis conditions for release of glycosaminoglycans from the chicken keel cartilage. *AIP Conference Proceedings 1878(1)*, September 2017, doi: 10.1063/1.5000177.
- Leong, W.C., Abdullah, M.Z., Khor, C.Y., (2013). Optimization of flexible printed circuit board electronics in the flow environment using response surface methodology. *Microelectronics Reliability*, 53(2013): 1996-2004, doi: 10.1016/j.microrel.2013.06.008.
- Lohmander, L.S., De Luca, S., Nilsson, B., Hascall, V.C., Caputo, C.B., Kimura, J.H., Heinegard, D. (1980). Oligosaccharides on proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. *Journal of Biological Chemistry*, 255(13): 6084-6091, doi: 10.1016/S0021-9258(18)43704-0.
- Luo, X.M., Fosmire, G.J., Leach Jr, R.M. (2002). Chicken keel cartilage as a source of chondroitin sulfate. *Poultry Science*, 81(7): 1086-1089, doi: 10.1093/ps/81.7.1086.
- Martone, C.B., Borla, O.P., Sánchez, J.J. (2005). Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Bioresource Technology*, 96(3): 383-387, doi: 10.1016/j.biortech.2004.04.008.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C. (1995). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*, John Wiley & Sons, New York, USA, 156-179p. ISBN:978-1-118-91601-8.
- Ötleş, S., Özdestand Ocak, Ö., Nakilcioğlu Taş, E., Kartal, C., Özyurt, H. (2015). *Gıda Kimyası*. Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, Türkiye, 115-116s.
- Rani, A., Baruah, R., Goyal, A. (2017). Physicochemical, antioxidant and biocompatible

- properties of chondroitin sulphate isolated from chicken keel bone for potential biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* 159: 11- 19, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.12.015.
- Scharnweber, D., Hübner, L., Rother, S., Hempel, U., Anderegg, U., Samsonov, S.A., Pisabarro, M.T., Hofbauer, L., Schnabelrauch, M., Franz, S., Simon J., Hintze, V. (2015). Glycosaminoglycan derivatives: promising candidates for the design of functional biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(9):1-10, doi: 10.1007/s10856-015-5563-7.
- Shi, Y.G., Meng, Y.C., Li, J.R., Chen, J., Liu, Y.H., Bai, X. (2014). Chondroitin sulfate: Extraction, purification, microbial and chemical synthesis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(10): 1445-1465, doi: 10.1002/jctb.4454.
- Srichamroen, A., Nakano, T., Pietrasik, Z., Ozimek, L., Betti, M. (2013). Chondroitin sulfate extraction from broiler chicken cartilage by tissue autolysis. *LWT-Food Science and Technology*, 50(2): 607-612, doi: 10.1016/j.lwt.2012.07.039.
- Theocharis, A.D., Tsolakis, I., Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K. (2006). Chondroitin sulfate as a key molecule in the development of atherosclerosis and cancer progression. *Advances in Pharmacology*, 53: 281-295, doi: 10.1016/S1054-3589(05)53013-8.
- Uslu, M.Ö., Eltas, Ş.D. (2015). Peridontal hastalıklarda MMP-8'in rolü. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 25: 80-85, doi:10.17567/dfd.75960.
- Vázquez, J.A., Blanco, M., Fraguas, J., Pastrana, L., Pérez-Martín, R. (2016). Optimisation of the extraction and purification of chondroitin sulphate from head by-products of Prionace glauca by environmental friendly processes. *Food Chemistry*, 198(2016): 28-35, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.087.
- Vázquez, J.A., Rodríguez-Amado, I., Montemayor, M.I., Fraguas, J., González, M.D.P., Murado, M.A. (2013). Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: Characteristics, applications and eco-friendly processes: A review. *Marine Drugs*, 11(3), 747-774, doi: 10.3390/md11030747.
- Volpi, N. (2009). Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(10): 1271-1280, doi: 10.1211/jpp.61.10.0002.
- Wang, X., Shen, Q., Zhang, C., Jia, W., Han, L., Yu, Q. (2019). Chicken leg bone as a source of chondroitin sulfate. *Carbohydrate Polymers*, 207:191-199, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.11.086.
- Widyaningsih, T.D., Rukmi, W.D., Sofia, E., Wijayanti, S.D., Wijayanti, N., Ersalia, R., Nangin, D. (2017). Extraction of glycosaminoglycans containing glucosamine and chondroitin sulfate from chicken claw cartilage. *Research Journal of Life Science*, 3(3): 181-189, doi: 10.21776/ub.rjls.2016.003.03.7.