



**İSKENDERUN TEKNİK**

ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Servet Ahmet DOĞDU

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

**DOKTORA  
TEZİ**

**İSTİLAÇI DENİZ TÜRLERİNDEN  
BİYOMATERYAL ELDESİ VE  
BİYOMEDİKAL ENDÜSTRİSİNDEKİ  
POTANSİYEL KULLANIMI**

**Servet Ahmet DOĞDU**

SU ÜRÜNLERİ  
ANABİLİM DALI

EKİM 2021

EKİM 2021





**İSTİLACI DENİZ TÜRLERİNDEN BİYOMATERYAL ELDESİ VE  
BİYOMEDİKAL ENDÜSTRİSİNDEKİ POTANSİYEL KULLANIMI**

**Servet Ahmet DOĞDU**

**DOKTORA TEZİ  
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

**İSKENDERUN TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**EKİM 2021**

# İSTİLACI DENİZ TÜRLERİNDEN BİYOMATERYAL ELDESİ VE BİYOMEDİKAL ENDÜSTRİSİNDEKİ POTANSİYEL KULLANIMI

(Doktora Tezi)

Servet Ahmet DOĞDU

İSKENDERUN TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ ENSTİTÜSÜ

Ekim 2021

## ÖZET

Tez çalışması kapsamında, İskenderun Körfezi'nde ticari trol örneklemeleri ve donanımlı dalgıçlar ile ülkemiz sularından istilacı türler olarak kabul edilen beş balon balığı türü *Lagocephalus sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis*, *Sphoeroides pachygaster* ve *Torquigener flavimaculosus*, istilacı lesepsiyen yengeç *Charybdis longicollis* ve uzun dikenli denizkestanesi *Diadema setosum*'un örneklemeleri yapılmıştır.

Örnekleme yapılan bu türlerin biyomedikal endüstrisinde kullanım alanları belirlenerek ekonomiye kazandırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda *L. sceleratus*'un dışından hidroksiapatit elde edilmiştir. Elde edilen hidroksiapatitin elemental kompozisyonunun ana yapısı %52 kalsiyum ve %39 fosfat, %2,5 manganez, %1,5 magnezyum, %1 titanyum, %0,8 vanadyum ve %3,2 diğer elementlerden oluşmaktadır. Hidroksiapatitin Ca/P oranı ise 1,32 olarak bulunmuştur. Yapılan XRD analizi sonuçlarına göre, *L. sceleratus* dışından elde edilen hidroksiapatitin insan dişleriyle uyumlu olduğunu ortaya çıkarılmıştır. *L. sceleratus* derisinden asitte çözünür kolajen yöntemi kullanılarak kolajen ve jelatin ekstrakte edilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen kolajen oranı %50,9, jelatin miktarı ise %20.63 olarak bulunmuştur. Elde edilen kolajenin nem, protein ve aminoasit içeriği analizleri yapılmıştır. Tez çalışması kapsamında örnekleme yapılan balon balığı türlerinden (*Lagocephalus sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis* ve *T. flavimaculosus*) alınan yumuşak dokuların (kas, solungaç, karaciğer ve beyin) ve dişlerin ağır metal birikimi analizleri ICP-MS kullanılarak incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda diş ve beyin dokusundaki metal birikimleri benzerlik göstermiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda ilk defa balık dişinin çevresel indikatör olarak kullanılabilceği ortaya çıkarılmıştır. Tez çalışması kapsamında örnekleme yapılan *L. sceleratus*, *T. flavimaculosus* ve *S. pachygaster* türlerinin kas, yüzgeç, deri ve iskeletinden doku örnekleri alınmış ve standart fenol kloroform yöntemi ufak modifikasyonlar ile kullanılarak mtDNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Türlerin dokularından edilen mtDNA, Cyt b gen bölgesi kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Elde edilen 18 sekans için Genbank'tan MZ 512179-MZ 512196 kodlarıyla erişim numaraları alınmıştır. Tez çalışması kapsamında örnekleme yapılan lesepsiyen yengeç *C. longicollis* kabuklarından kitin ve kitosan ekstrakte edilmiştir. Kabuklardan ekstrakte edilen kitin oranı %25,78 olarak hesaplanmıştır. Ekstre edilen kitinden üretilen kitosan verimi ise %80,23 olarak tespit edildi. Yapılan FTIR ve XRD analizleri sonucunda elde edilen kitinin yapısında proteinlerin yanı sıra amino-polisakkarit alfa kitin içeren bir yapı gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında örnekleme yapılan *D. setosum*'un kabuğunun karakterizasyonu FTIR ve XRD yöntemiyle ortaya çıkarılmıştır. XRD analizi sonuçlarındaki yansımaların  $Ca_5MgC_6O_{18}$  kimyasal formülüne sahip kalsit ile %91,  $Mg_4O_4$  kimyasal formülüne periklaz ile %9 oranında örtüştüğü tespit edilmiştir.

Ülkemiz sularında dağılım gösteren istilacı yabancı türler kendi sularımızdaki yerli türler üzerinde baskı kurarak hem ekolojik hemde ekonomik yönde negatif sonuçlar doğurmuştur. Bu türlerin insanlar tarafından tüketilmemesi ekosistemde sayılarının giderek artmasına ve baskın hale gelmesine neden olmaktadır. Bu tez çalışması sayesinde türlerin hangi alanlarda ve nasıl kullanılacağı ortaya çıkarılmış ve başarılı bir şekilde ürünler elde ederek ekonomiye kazandırılması sağlanmıştır. Bu tez çalışması sonucunda, istilacı yabancı türler ile mücadele yöntemi olarak en güvenilir yolunun bu türlerin ekonomiye kazandırılması olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK 2211-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı), Yükseköğretim Kurulu (100/2000 YÖK Doktora Bursu Programı) ve İskenderun Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (2019LTB-01) tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Hidroksiapatit, biyomateryal, biyomedikal, kitin, kitosan, DNA barkodlama

Sayfa Adedi : 100

Danışman : Prof. Dr. Cemal TURAN

# OBTAINING BIOMATERIAL FROM INVASIVE MARINE SPECIES AND ITS POTENTIAL USAGE IN BIOMEDICAL INDUSTRY

(Ph. D. Thesis)

Servet Ahmet DOĞDU

ISKENDERUN TECHNICAL UNIVERSITY  
INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

October 2021

## ABSTRACT

In this study, five pufferfish species *Lagocephalus sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis*, *Sphoeroides pachygaster* and *Torquigener flavimaculosus*, invasive lessepsian crab *Charybdis longicollis* and long-spiny sea urchin *Diadema setosum* were sampled by commercial trawling and scuba dives in Gulf of İskenderun.

It is aimed to determine the usage areas of these sampled species in the biomedical industry and to bring them into the economy. In this context, hydroxyapatite was obtained from the teeth of *L. sceleratus*. The elemental composition of the obtained hydroxyapatite consists of 52% calcium and 39% phosphate, 2,5% manganese, 1,5% magnesium, 1% titanium, 0,8% vanadium and 3,2% other elements. The Ca/P ratio of hydroxyapatite was found to be 1,32. According to the results of the XRD analysis, it was revealed that the hydroxyapatite obtained from the *L. sceleratus* tooth was compatible with human teeth. Collagen and gelatin were extracted from *L. sceleratus* skin using the acid soluble collagen method. The rate of collagen obtained within the scope of the study was 50,9%, and the amount of gelatin was found to be 20,63%. Moisture, protein and amino acid content analyzes of the obtained collagen were made. ICP-MS was used for heavy metal accumulation analysis of soft tissues (muscle, gill, liver and brain) and teeth from pufferfish species (*Lagocephalus sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis* ve *T. flavimaculosus*) sampled within the scope of the thesis study. According to the results obtained, metal deposits in tooth and brain tissue were similar. As a result of the studies, it was revealed for the first time that fish teeth can be used as an environmental indicator. Tissue samples were taken from the muscle, fin, skin and skeleton of *L. sceleratus*, *T. flavimaculosus* and *S. pachygaster* species, which were sampled within the scope of the thesis study, and mtDNA extraction was completed by using the standard phenol-chloroform method with minor modifications. The mtDNA obtained from the tissues of the species was amplified by Polymerase Chain Reaction using the Cyt b gene region. Accession numbers were obtained from Genbank with codes MZ 512179-MZ 512196 for the 18 sequences obtained. Chitin and chitosan were extracted from the shells of the Lessepsian crab *C. longicollis*, which were sampled within the scope of the thesis study. The rate of chitin extracted from the shells was calculated as 25,78%. The yield of chitosan produced from the extracted chitin was determined as 80.23%. As a result of FTIR and XRD analyzes, amino-polysaccharide alpha chitin containing structure was obtained as well as proteins. The characterization of the shell of *D. setosum*, which was sampled within the scope of the study, as revealed by FTIR and XRD methods. It shows that the reflections in the XRD analysis results overlap 91% with calcite with the chemical formula  $\text{Ca}_5\text{MgC}_6\text{O}_{18}$  and 9% with periclase chemical formula  $\text{Mg}_4\text{O}_4$ .

Invasive alien species distributed in our country's waters have exerted pressure on native species in our waters, resulting in negative ecological and economic consequences. The fact that these species are not consumed by humans causes their numbers to increase and become dominant in the ecosystem. This thesis was revealed the areas and usage methods of this species in marine biotechnology applications and obtained economically valuable end products. This study was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK-2211/C National PhD Scholarship Program for Priority Areas), Council of Higher Education (100/2000 PhD scholarship program) and Iskenderun Technical University Scientific Research Projects Coordinatorship (2019LTB-01).

Key Words : Hydroxyapatite, biomaterial, biomedical, chitin, chitosan, DNA barcoding

Page Number : 100

Supervisor : Prof. Dr. Cemal TURAN



## TEŞEKKÜR

Bilim dünyasına girdiğim ilk günden bu yana bana desteklerini esirgemeyen, hayat tecrübesi ve bilgi birikimini karşılıksız aktaran, sabırla bana doğru yolu gösteren, tez konumun belirlenmesinde, tez çalışmalarımın yürütülmesinde ve tezimin yazım aşamalarında bana her türlü desteği sağlayan çok kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Cemal TURAN'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde, doğru analizlerin yapılmasında ve tez yazım aşamasında kıymetli bilgilerini ve değerli vaktini esirgemeyen rektörümüz değerli hocam sayın Prof. Dr. Tolga DEPCI'ye saygıyla teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın tamamlanmasında ve tez yazım aşamasında değerli katkıları olan ve bilgi birikimini paylaşmaktan çekinmeyen sayın Prof. Dr. Deniz AYAS'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın yürütülmesi sırasında yardım ve katkılarından ötürü sayın Dr. Öğr. Üyesi Mevlüt GÜRLEK'e teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın başından sonuna kadar uzanan bu zorlu yolda sürekli yanımda olan ve maddi manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyerek bugünlere gelmemi sağlayan annem Semiye DOĞDU, babam Adnan DOĞDU ve abim Serter DOĞDU'ya sonsuz minnetlerimi sunarım.

Doktora tezim boyunca sürekli yanımda olan ve destekleyen değerli eşim Ayşe ASLANTEKİN DOĞDU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesinde maddi katkılarından dolayı 100/2000 YÖK Doktora Bursu, TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı (2019/1) ve İskenderun Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (2019LTP01) teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	8
2.1. Hidroksiapatit ile İlgili Çalışmalar.....	8
2.2. Dokuların Çevresel İndikatör Olarak Kullanılması ile İlgili Çalışmalar.....	11
2.3. Kolajen ve Jelatin ile İlgili Çalışmalar.....	13
2.4. Kitin ve Kitosan ile İlgili Çalışmalar.....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. <i>Lagocephalus sceleratus</i> 'un biyolojik özellikleri.....	20
3.1.2. <i>Charybdis longicollis</i> 'un biyolojik özellikleri.....	24
3.1.3. <i>Diadema setosum</i> 'un biyolojik özellikleri.....	25
3.2. Örneklerinin Toplanması ve Hazırlanması.....	28
3.2.1. <i>Lagocephalus sceleratus</i> örneklerinin analizler için hazırlanması.....	28
3.2.2. <i>Charybdis longicollis</i> örneklerinin analizler için hazırlanması.....	30
3.2.3. <i>Diadema setosum</i> örneklerinin analizler için hazırlanması.....	31

3.3. Yöntem.....	31
3.3.1. <i>Lagocephalus sceleratus</i> dişinin biyomedikal alanında hidroksiapatit olarak kullanımı.....	31
3.3.2. Balon balığı dişlerinin çevresel indikatör olarak kullanımı.....	37
3.3.3. DNA dizileme yöntemi kullanılarak balon balığı türlerinin doğrulanması ve izlenmesi.....	39
3.3.4. <i>Charybdis longicollis</i> 'in biyomedikal alanında kullanımı.....	43
3.3.5. <i>Diadema setosum</i> 'un biyomedikal alanında kullanımı.....	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	46
4.1. Balon Balıklarının Biyomedikal Alanında Kullanımı.....	46
4.1.1. <i>Lagocephalus sceleratus</i> dişinin biyomedikal alanında hidroksiapatit (HA) olarak kullanımı.....	46
4.1.2. <i>L. sceleratus</i> derisinden kolajen ve jelatin ekstraksiyonu.....	51
4.1.3. Balon balığı dişlerinin çevresel indikatör olarak kullanımı.....	54
4.1.4. DNA dizileme yöntemi kullanılarak balon balığı türlerinin doğrulanması ve izlenmesi.....	57
4.2. <i>Charybdis longicollis</i> 'in Biyomedikal Alanında Kullanımı.....	64
4.3. <i>Diadema setosum</i> 'un Biyomedikal Alanında Kullanımı.....	66
5. TARTIŞMA.....	68
5.1. Balon Balıklarının Biyomedikal Alanında Kullanımı.....	68
5.1.1. <i>Lagocephalus sceleratus</i> dişinin biyomedikal alanında hidroksiapatit (HA) olarak kullanımı.....	68
5.1.2. <i>L. sceleratus</i> Derisinden kolajen ve jelatin ekstraksiyonu.....	71
5.1.3. Balon balığı dişlerinin çevresel indikatör olarak kullanımı.....	73
5.1.4. DNA dizileme yöntemi kullanılarak balon balığı türlerinin doğrulanması ve izlenmesi.....	77
5.2. <i>Charybdis longicollis</i> 'in Biyomedikal Alanında Kullanımı.....	78

5.3. <i>Diadema setosum</i> 'un Biyomedikal Alanında Kullanımı.....	79
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	80
KAYNAKLAR.....	85
DİZİN.....	99



**ÇİZELGELERİN LİSTESİ**

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 4.1. <i>L. scelaratus</i> ' dan elde edilen HA örneklerinin elementel kompozisyonu... 46	46
Çizelge 4.2. Balon balıkları dokularındaki metallerin karşılaştırılması..... 54	54
Çizelge 4.3. Haplotip sayısı ve türler arasındaki dağılımı..... 59	59
Çizelge 4.4. Tespit edilen haplotiplerin değişken nükleotid pozisyonları..... 60	60
Çizelge 4.5. Tür içi genetik çeşitlilik ve türler arasındaki genetik uzaklık..... 62	62



## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Benekli balon balığının Akdeniz'deki dağılımı.....	22
Şekil 3.2. Tetradosin molekülünün kimyasal yapısı.....	23
Şekil 3.3. <i>Charybdis (Goniohellenus) longicollis</i> 'in Akdeniz'deki dağılımı.....	25
Şekil 3.4. <i>Diadema setosum</i> 'un Akdeniz'deki dağılımı.....	27
Şekil 3.5. Kitin ve Kitosan Ekstraksiyonunun Şematik Gösterimi.....	43
Şekil 4.1. <i>L. sceleratus</i> dişlerinden elde edilen HA'nın X-ışını kırınım desenleri.....	48
Şekil 4.2. Geliştirilmiş ürün grubu ve kontrol grubunun elastik modül (Er) ve sertlik testi (H) sonuçları.....	50
Şekil 4.3. <i>L. sceleratus</i> derisinden ekstrakte edilen kolajenin aminoasit içeriği .....	52
Şekil 4.4. SDS-PAGE jel görüntüsü .....	53
Şekil 4.5. Metallere göre dokuların karşılaştırılması.....	56
Şekil 4.6. <i>L. sceleratus</i> 'un kas, yüzgeç, deri ve kemik dokusundan elde edilen mtDNA'nın agoroz jel üzerindeki görüntüsü.....	57
Şekil 4.7. <i>L. sceleratus</i> 'un kas, yüzgeç, deri ve kemik dokusundan elde edilen mtDNA'nın Cyt b gen bölgesi PZR analizinin agoroz jel üzerindeki görüntüsü.....	58
Şekil 4.8. Haplotipler arasındaki ilişkinin MST metoduyla görünümü.....	.61
Şekil 4.9. GenBank örnek referansları ile Cyt b dizilerine dayalı komşu kalıtım ağacı..	63
Şekil 4.10. GenBank örnek ile birlikte Cyt b dizilerine dayalı Maksimum Parsimony ağacı.....	64
Şekil 4.11. <i>C. longicollis</i> 'ten elde edilen kitinin 4000–400 cm <sup>-1</sup> spektrum aralığındaki FTIR görüntüsü.....	65
Şekil 4.12. <i>C. longicollis</i> kabuklarından elde edilen kitinin X-ışını kırınım desenleri...	66
Şekil 4.13. <i>D. setosum</i> kabuğunun 4000–400 cm <sup>-1</sup> spektrum aralığındaki FTIR görüntüsü.....	66
Şekil 4.14. <i>D. setosum</i> kabuğunun X-ışını kırınım desenleri.....	67

## RESİMLERİN LİSTESİ

	Sayfa
Resim 3.1. <i>Lagocephalus sceleratus</i> 'un genel görünümü.....	21
Resim 3.2. <i>Charybdis (Goniohellenus) longicollis</i> 'in genel görünümü.....	24
Resim 3.3. <i>Diadema setosum</i> 'un genel görünümü.....	26
Resim 3.4. Arazi çalışmaları kapsamında İskenderun Körfezi'nde yapılan trol operasyonu.....	28
Resim 3.5. a: <i>Lagocephalus sceleratus</i> için yapılan diş çıkarma işlemi, b: çıkarılan dişlerin temizlenmesi, c: elde edilen <i>L. sceleratus</i> diş.....	29
Resim 3.6. a: <i>L. sceleratus</i> 'un çıkarılmış derisi, b: küçük parçalara ayrılan (1x1 cm <sup>2</sup> ) <i>L. sceleratus</i> derisi.....	30
Resim 3.7. a: <i>C. longicollis</i> genel görünümü, b: kabukların ve kolların temizlenmesi, c: kurutulmuş kabuklar ve kollar.....	30
Resim 3.8. a: Kurutulmuş <i>D. setosum</i> kabuğunun üstten görünümü b: altan görünümü..	31
Resim 3.9. <i>Lagocephalus sceleratus</i> dişinden elde edilen hidroksiapatit.....	32
Resim 3.10. Ağır metal birikimi analizi için örnekleme yapılan balon balığı türleri (a: <i>Lagocephalus sceleratus</i> , b: <i>L. suezensis</i> , c: <i>L. spadiceus</i> , d: <i>Torquigener flavimaculosus</i> ).....	38
Resim 3.11. DNA dizi analizi sonucu elde edilen Cyt B gen bölgesinin parça kromotografisinden bir örnek.....	42
Resim 4.1. <i>L. sceleratus</i> 'tan elde edilen HA'nın 150X büyütülmüş SEM görüntüsü....	49
Resim 4.2. a) <i>Lagocephalus sceleratus</i> dişlerin görünümü, b) toz haline getirilmiş diş, c) çürük insan azı dişleri, d) balon balığı diş tozu ile dolgu yapılmış insan azı dişi.....	51



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>Al</b>	Alüminyum
<b>As</b>	Arsenik
<b>C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>O<sub>20</sub>N<sub>4</sub></b>	Kitin kimyasal fomülü
<b>Ca</b>	Kalsiyum
<b>Cd</b>	Kadmiyum
<b>cm</b>	Santimetre
<b>cm<sup>2</sup></b>	Santimetre kare
<b>Co</b>	Kobalt
<b>cP</b>	sentipoze
<b>Cr</b>	Krom
<b>Cu</b>	Bakır
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Ultra saf ve steril su
<b>Fe</b>	Demir
<b>g</b>	Gram
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Su kimyasal formülü
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen Peroksit
<b>HCl</b>	Hidroklorik Asit
<b>K</b>	Potasyum
<b>Mg</b>	Magnezyum
<b>ml</b>	Mililitre
<b>Mo</b>	Molibden
<b>Na</b>	Sodyum
<b>NaCl</b>	Sodyum Klorür
<b>NaOH</b>	Sodyum hidroksit
<b>ng</b>	Nanogram
<b>Ni</b>	Nikel
<b>nm</b>	Nanometre
<b>°C</b>	Derece santigrat
<b>P</b>	Fosfat
<b>Pb</b>	Kurşun
<b>pg</b>	Pikogram
<b>ppb</b>	Milyarda bir
<b>ppm</b>	Milyonda bir
<b>rpm</b>	Dakikadaki devir sayısı
<b>Se</b>	Selenyum
<b>Sr</b>	Stronsiyum
<b>Zn</b>	Çinko
<b>α</b>	Alfa
<b>β</b>	Beta
<b>γ</b>	Gama
<b>μ</b>	Mikron
<b>μg</b>	Mikrogram

**Kısaltmalar**

**ASC**  
**AZT**  
**Cyt b**  
**DNA**  
**FTIR**  
**HA**  
**HIV**  
**HPLC**  
**ICP-MS**  
**LC-MS-MS**  
**MST**  
**mtDNA**  
**PMT**  
**PSC**  
**PZR**  
**RF**  
**RNase**  
**SDS**  
**SEM**  
**TEMED**  
**TGA**  
**TTX**  
**UV**  
**XRD**

**Açıklamalar**

Asitte çözümlenür kolajen  
Zidovudin hastalığı  
Sitokrom B gen bölgesi  
Deoksiribo nükleik asit  
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi  
Hidroksiapatit  
İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü  
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi  
Endüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma Kütle Spektrometresi  
Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi  
Minimum Örtün Ağaç  
Mitokondriyal DNA  
Mekanik Stabilizasyon Plenti  
Pepsin çözümlenür kolajen  
Polimeraz zincir reaksiyonu  
Radyo frekansı  
Ribonükleaz  
Sodyum dodesil sülfat  
Taramalı elektron mikroskopu  
Tetrametiletildiamin  
Termogravimetri  
Tetrodotoksin  
Ultraviyole  
X ışını kristalografisi

## 1. GİRİŞ

Biyoteknoloji, endüstriyel üretimde canlı organizmaların ve biyolojik süreçlerin kullanılması ile biyoloji, kimya ve teknik bilimlerin birleştiği noktada ortaya çıkan disiplinler arası bir alandır. Bu nedenle biyoteknoloji, çeşitli değerli maddelerin ve ürünlerin üretimi ve işlenmesi için canlılardan veya canlılardan elde edilen yan ürünleri inceleyen doğal ve teknik bilimlerin bir bütünüdür (Kenney, 1986). Biyoteknolojik uygulamalar genellikle ilaç, kimya, kozmetik, gıda, tarım, bilişim endüstrileri gibi pek çok alanda kullanılmaktadır.

Dünyanın % 70'ini kaplayan okyanuslar ve denizler, yerkürede bulunan su kaynaklarının yaklaşık %97'sini içermektedir. Bu alanlar yeryüzündeki toplam biyoçeşitliliğin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Zengin kaynakları ele alındığında denizel ekosistemler karasal ekosistemlerle karşılaştırıldığında daha zengin biyoaktif kaynağıdır. Bu yüzden son yıllarda denizel biyotada yapılan çalışmalar hızlı bir gelişim göstermektedir (Bollinger, Thies, Katzke ve Jaeger, 2018). Denizel ekosistemde yaşayan canlılardan ya da bu canlılardan doğal ürünlerden teknoloji, enerji veya hizmet üretilmesi “denizel biyoteknoloji” olarak tanımlanmaktadır (Querellou, Cadoret, Allen ve Collén, 2010).

Nispeten yeni bir yaklaşım olan denizel biyoteknoloji 1950'li yıllarda *Tethya crypta* süngerinde antiviral ilaç keşfi ile başlamıştır (Bergmann ve Feeney, 1951). Daha sonraki en önemli gelişme ise 2000'li yılların başlarında HIV tedavisinde bağışıklık güçlendirici olarak kullanılan Zidovudin (AZT) ve antiviral Asiklovir keşfedilmesiyle tekrar önem kazanmıştır (Newman ve Cragg, 2004; Leary, Vierros, Hamon, Arico ve Monagle, 2009; Querellou ve diğerleri, 2010). Deniz kaynaklı sağlıklı gıdaların sürdürülebilir üretiminin sağlanması ve insan sağlığı için yararlanılacak biyomateryallerin elde edilmesi, endüstriyel kullanım amaçlı enzimlerin, biyopolimerlerin ve pek çok farklı amaç için kullanılacak çeşitli biyolojik materyallerin üretimi, denizel biyoteknolojinin yaygın kullanım alanlarıdır. Deniz veya tatlı su kaynaklarından biyomateryallerin eldesi ve bunlardan proteinlerin, enzimlerin ve ikincil metabolitlerin çıkartılmasını sağlayabilecek teknolojileri geliştirmek, gıda, kozmetik ve sağlık sektörlerinde yeni ticari ürünler, polimerler, enzimler ve biyolojik materyaller gibi işletilebilir ürünlerin geliştirilmesi önem büyük arz etmektedir (Hossain ve Jahan, 2021).

Son yıllarda denizel ekosistemler biyoaktif bileşikler bakımında zengin bir kaynak olarak tanımlanmaktadır. Birçok yararlı ve etkili maddenin deniz canlılarının dokularında bulunduğu ve bu canlılara has ürünler olduğu bilinmektedir (Özkaya, Erdoğan ve Altunok, 2013). Bununla beraber bu canlılardan elde edilen birçok ürün o canlılar ile endobiyotik ya da epibiyotik ilişki içinde olan mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Deniz kaynaklı ikincil metabolitlerin sahip olduğu anti-tümör, antiproliferatif, fotoprotektif, antibiyotik ve antimetabolik gibi özellikler sayesinde kimya endüstrisi için her geçen gün daha fazla ilgi çekici hale gelmektedir (Cragg ve Newman, 2013).

Biyomateryaller, tedavi etme, güçlendirme, onarma veya teşhis amaçlı tıbbi bir amaç için biyolojik sistemlerle etkileşime girmek üzere tasarlanmış maddelerdir. Biyomalzemeler canlı dokularla temas içinde olduğu için onları doğru bir araç haline getiren benzersiz özelliklere sahip kaynaklardır. Günümüzde biyomateryal bilimi tıp, doku mühendisliği, biyokimya ve fizik gibi alanlarla işbirliği çalışan ve gelecek vaat eden bir alan olarak tanımlanmaktadır (Güven, 2010).

Biyomateryaller, yaşam beklentisini arttırmak için vücudun sorunlu kısmı ile bütünleşerek hasarlı dokuyu restore eder, onarır veya değiştirir (Pu'ad, Koshy, Abdullah, Idris ve Lee, 2019). Biyomateryaller dört gruba ayrılırlar. Bunlar; metaller, seramikler, polimerler ve kompozitlerdir (Arjunan, Baroutaji, Robinson, Praveen, Pollard ve Wang, 2021). Biyomateryaller, biyouyumluluk, stabilize edilebilirlik, işlevsellik ve üretilebilirlik olarak dört özelliğe sahip olmalıdır (Doğdu, Turan, Depci ve Ayas, 2021). Biyomateryallerin, uyumlu olması, toksik olmaması, stabil olması, yeterli mekanik kuvvete sahip olması, uyum gösterebilmesi, büyük miktarlarda işlenebilme ve fabrikasyon kolaylığı göstermesi, ekonomik açıdan sürdürülebilir olması istenmektedir (Özalp ve Özdemir, 1997). Son yıllarda geliştirilen biyomateryaller genellikle, ortopedik uygulamalarda eklem protezi ve kemik yenileme materyali olarak, yüz ve çene cerrahisinde, diş implantlarında, yapay kalp parçalarında, kalp kapakçığında, sonda, bel kemiği enstrümantasyonlarında, metal parçalarda, vidalarda, delikli vidalarda, vida pullarında, çivilerde, fiksator tellerinde, kalça plaklarında, anatomik plaklarda, açılı plaklarda ve vücuda yerleştirilebilir cihazlarda da kullanım alanı bulmaktadır (Tüylek, 2017).

Denizel biyomateryaller, önemli uygulamaları olan ve yeni ortaya çıkan bir araştırma alanıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ve çeşitli uygulamalar ile deniz kaynaklı biyomateryallere büyük önem verilmeye başlanmıştır (Gómez-Guillén, Giménez, López-Caballero ve Montero, 2011; Kim ve Venkatesan, 2013; Yu, Tang, Gohil ve Laurencin, 2015; Doğdu, Turan ve Ayas, 2019). Yapılan çalışmaların etkisiyle denizel biyomateryaller tüketicileri de çeken güçlü bir pazar konumu kazanmıştır (Kim ve Venkatesan, 2013). Küresel pazarda biyomateryallerin 2008'de 25,6 milyar dolar olan piyasa 2015'de 64,7 milyar dolara ulaşmış ve 2027'de 315,9 milyar dolara ulaşması beklenmektedir.

Deniz canlıları, kitin, kitosan, kolajen, karajenan, fukoidan ve aljinat gibi polisakkaritlerden oluşur. Bunlar biyolojik ve biyomedikal uygulamalarda önemli bir rol oynamaktadır (Kim ve Venkatesan, 2013).

Deniz canlılarının kemiksi yapılarında bulunan doğal bir biyopolimer olan kitin; dünyada selülozdan sonra en yaygın olarak bulunan biyopolimerdir. Kitin doğada genellikle, deniz yosunları, tek hücreliler, sölenler, molluskalar, eklem bacaklılar, bakteriler, mantarlar, böcekler ve bazı bitkilerde bulunur. Ticari kitin/kitosan üretiminde kullanılan en zengin kaynaklar ise; yengeç, karides, ıstakoz ve kerevit kabuklarıdır (Vázquez, Rodríguez-Amado, Montemayor, Fraguas, González ve Murado ve diğerleri, 2013). Dünyada yıllık kitin üretiminin yıllık yaklaşık 15 450 tondur. Bunun 5 768 tonu karides, 4 017 tonu deniz kabuklularından, 3 296 tonu mantarlardan ve 2 369 tonu istiridyelerden karşılanmaktadır (Wang, Shih, Liang ve Wang, 2002).

Kitinin en önemli türevi olan kitosan, birçok formda kullanılabilir ve ticari olarak elde edilir. Kitosan, doğal yapıda bir polisakkarit ve katyonik özelliği olan polimerdir. Diğer polimerlerle karşılaştırıldığında biyolojik olarak hiç bir toksik etkisi yoktur, düşük bir bağışıklık tepkisi oluşturur ve daha ucuz elde edilir. Kitosan, asetik asit, formik asit gibi seyreltik asitlerde çözünür. Asit ortamda amino gruplarının protonasyona uğraması sonucunda ise suda çözünebilir (Kurita, 2001; Berger ve diğerleri, 2014). Kitosanın kullanım alanları genel olarak; cerrahi malzemelerde dezenfektanlar olarak üretimi, tohum büyümesi ve çimlenmesinde, haşerelere karşı tohumlar üzerine koruyucu olarak, gıdaların bozulmasını önlemek için koruyucu malzemelerin üretimi, antifungal malzeme olarak taze ürün saklama yeteneğini geliştirmek için, cilt yanıkları tedavisinde, kan kolesterolünün azaltılma, enzimlerin stabilitesinde ve proteinlerin analizinde, çimlenme ve verim artışı sağlamakta,

bitkiler de köklenme ve kuru ağırlığının artırması, lif ve elyaf üretimi, kozmetik malzemelerde, petrol ürünleri ve nükleer malzemelerin rafine edilmesi, anti-alerjik ilaçlar üretiminde, su ve atık-su arıtma sistemlerinde, petrol ile kirlenmiş suyun arıtılması, radyoaktif ve organik bileşiklerde, pestisitleri içeren endüstriyel atık suların arıtılması, metil civa asetat, asetaldehit, arsenik ve petrolde klor bileşikler arıtılması olarak sıralanabilir.

Kitin çoğu çözücülerde çözülmez ve kitosan ise pH 6,5'dan daha düşük pH değerlerinde organik asidik çözeltiler içinde çözülebilir buna karşın kitosan, kitosan nanopartiküllere dönüştürüldüğünde çözülme özelliğine sahip olacaktır. Trimetil nanokitosan suda çözünmeyen ilaçlar için kullanılmaktadır. Bu nanopartiküller biyoyararlılık ve düşük toksisite özelliğine sahiptir. Kitosan nanopartiküller, kitosan solüsyonunun gibi tripolifosfat ve polianyon dahil sürekli karıştırma koşulu altında oluşur. Bu nanopartiküller sonra toplanır ve hedef özgül ilaç uygulamalarında ve gen terapisinde kullanılmaktadır (Guerra-Sanchez, Vega-Pérez, Velazquez-Del Valle ve Hernandez-Lauzardo, 2009; Cardoso, Lins, Dos Santos, Silva, ve Campos-Takaki, 2012; Stamford, Stamford-Arnaud, Cavalcante, Macedo ve Campos-Takaki, 2013; Chatterjee ve Guha 2014).

Kolajen, çok çeşitli endüstriyel uygulamalara sahip olduğu için en yararlı biyomalzemelerden biri olarak kabul edilir (Schmidt ve diğerleri, 2016). Hayvan derisi ve kemiğinin bağ dokusunun önemli bir temel proteini olan kolajen toplam proteinlerin yaklaşık %30'unu oluşturur (Ogawa, Moody, Portier, Bell, Schexnayder ve Losso, 2003; Zhang, Li, Ding, Liu ve Li, 2013; Doğdu ve diğerleri, 2019). İnek ve domuz gibi karada yaşayan hayvanların derilerinden izole edilen kolajen gıda, kozmetik, biyomedikal ve ilaç endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Li ve diğerleri, 2013). İlaçlar, proteinler ve genler için bir araç olarak kullanılmasının yanı sıra insan cildi, kan damarları ve bağlar için bir ikame olarak da kullanılır (Gómez-Guillén ve diğerleri, 2011). Ancak karasal kaynaklar, bulaşıcı süngerimsi ensefalopati (TSE), ayak ve ağız hastalığı (FMD) ve kuş gribi gibi birçok hastalığı taşıdığı için artık tercih edilmemektedir. Bu nedenlerden dolayı yeni kolajen kaynaklarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Doğdu ve diğerleri, 2019). Son yıllarda yapılan araştırmalar özellikle denizel yan ürünlerin kolajen ekstraksiyonu için alternatif kaynaklara odaklanmıştır (Nagai, Yamashita, Taniguchi, Kanamori ve Suzuki, 2001; Ogawa ve diğerleri, 2003; Sadowska, Kołodziejaska ve Niecikowska, 2003; Muyonga, Cole ve Duodu, 2004; Senaratne, Park ve Kim, 2006; Sionkowska ve diğerleri, 2006; Hwang, Mizuta, Yokoyama ve Yoshinaka, 2007; Zhang, Liu, Li, Shi, Miao ve Wu, 2007; Wang, An, Xin,

Zhao ve Hu, 2007; Bae, Osatomi, Yoshida, Osako, Yamaguchi ve Hara, 2008; Kittiphattanabawon, Benjakul, Visessanguan, Kishimura ve Shahidi, 2010; Tang, Chen, Su, Weng, Osako ve Tanaka, 2015; Meng ve diğ erleri, 2019; Sousa ve diğ erleri, 2020).

En önemli biyopolimerlerden biri olan jelatin, gıda ve ilaç endüstrisinde fonksiyonel ve teknolojik özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Rohman, Windarsih, Erwanto ve Zakaria, 2020). Gıda endüstrisinde jelatin; şekerlemelerde temel olarak ç iğ nenebilirlik, tekstür ve köpük stabilizasyonunu ve düşük yağ iç erikli ürünlerde sürülebilir kremsi yapı için, süt ürünlerinde stabilizasyon ve tekstür sağlamak için, fırınlanmış ürünlerde emülsifikasyon, jelleş me ve stabilizasyonu ile et ürünlerinde su bağ lamayı geliştirmek için kullanılmaktadır (Haug ve Draget, 2011). İ laç endüstrisinde jelatin, sert ve yumuş ak kapsüllerin üretiminde de yaygın olarak kullanılır (Gullapalli ve Mazzitelli, 2017). Jelatinin, düşük kalorili olması nedeniyle protein miktarı düşük olan gıda maddelerindeki protein seviyesini arttırmak için kullanımı önerilmektedir ve vücut geliştirici gıdalarda özellikle faydalı bulunmuştur. Ayrıca, jelatin diyabet hastaları için formüle edilen gıdalarda karbonhidrat seviyesini azaltmak için de kullanılmaktadır (Karim ve Bhat, 2009). Denizel canlılardan elde edilen kolajen/jelatin, memeli kaynaklara göre daha iyi bir alternatif olarak vurgulanmaktadır (Doğ du ve diğ erleri, 2019). Özellikle daha düşük erime noktası ve ağı zda daha hızlı dağı lma gibi kalite özellikleri ile ön plana çı kmaktadır. Buna rağmen, balık jelatini üretimi halen baş langıç seviyesindedir ve dünya yıllık jelatin üretiminin yaklaşık %1,5'ine katkıda bulunmaktadır. Ülkemizin yıllık 5 000 ton jelatin ihtiyacının hepsi ithal olarak karşı lanmaktadır (Gündüz, Öztürk, Hamzacebi ve Akpınar, 2018).

Hidroksiapatit (HA) ve kalsiyum fosfat seramik malzemeler, doğal kemik ile yakın benzerlikleri nedeniyle implant malzemeleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Biyomalzemeler, canlı dokularla temas içinde oldukları için biyolojik kaynaklı seramik malzemeler sentetik malzemelere göre çok daha fazla tercih edilmektedir (Lee, Choi, Yoon, Kim ve Park, 2013; Srivastava, Srivastava, Srivastava ve Chandra, 2015). Kimyasal ve yapısal açıdan bakıldığında, formülü  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH_2)$  olan HA, kemiklerin ve dişlerin inorganik kısmına en çok benzeyen malzemedir. Son yıllarda yapılan çalış malarda, hem yoğun hem de gözenekli yapıda olan HA'nın, mükemmel biyoaktivite, osteokondüktivite ve osteoindüktivite gösterdiği için ortopedik ve dental uygulamalarda implant materyalleri olarak kullanılmış tır (Best, Porter, Thian ve Huang, 2008; Boutinguiza, Pou, Comesaña, Lusquiños, De Carlos ve León, 2012; Venkatesan ve Kim, 2014; Doğ du ve diğ erleri, 2021).



Canlılardan elde edilen kemiksi yapıların tür tayininde fenotipik özellik bulunmadığında ya da morfolojik açıdan benzerlik gösterdiğinde, moleküler genetik teknikler ile DNA dizileri çok sayıda karakteristik özellik sağladıklarından dolayı çözümleyici olarak kullanılırlar (Turan, Gürlek, Ergüden, Uyan, Karan ve Doğdu, 2017a). Bu amaçla bir canlıya ait DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) teknikleri ile çoğaltılarak bir sekans dizilenmesi ile tanımlanmasını sağlayan taksonomik bir yöntem olan DNA barkodlama ile canlıların sınıflandırılması, tartışmalı durumda olan türlerin tanımlanmasında kullanılmaktadır (Hebert, Penton, Burns, Janzen ve Hallwachs, 2004; Yatkın ve Güz, 2018).

1869 yılında Suveyş Kanalı'nın açılmasından itibaren Hint-Pasifik kökenli (lesepsiye) ve Atlantik-Akdeniz kökenli türlerin, Kızıldeniz'den ve Atlantik Okyanusu'ndan Akdeniz ekosistemine göçlerinin sürekli devam ettiği görülmektedir. Türkiye sularına giren lesepsiye türler ülkemiz sularındaki yerli türler üzerinde baskı kurarak ekolojik ve ekonomik yönde negatif sonuçlar doğurmaktadır (Turan, Gürlek, Özeren ve Doğdu, 2017b). Akdeniz ekosistemine giriş yapan lesepsiye türler, yerli türlerin değerlendirmede ekolojik nişleri değerlendirilmesi, kolay popülasyon oluşturmaları ve ikili rekabette yerli türler üzerinde baskın olması bu göçün sürekli olacağına bir göstergesi olarak yorumlanmaktadır (Ergüden ve Doğdu, 2020). Süreç halen yabancı türlerin yerli türler üzerinde baskısı şeklinde yaşanırken, yerli türlerin bulunduğu alanlarda baskın hale geçen yabancı türlerin yerini yeni gelen yabancı türlerin alması da beklenen bir durumdur. Bölgede biyoçeşitlilik üzerine sürdürülen çalışmalar bahsedilen bu değişikliğin sadece birkaç yıl içerisinde yaşanabildiğini göstermektedir (Gürlek, Ergüden, Doğdu ve Turan, 2016). Bu nedenlerden dolayı ülkemizin yerli türlerine üzerinde baskı kuran türlerle mücadele etmenin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Bu türlerle mücadele etmenin en kolay ve işlevsel yolu, türlerin ekonomiye kazandırılmasıdır (Zenetos ve diğerleri, 2012).

Bu çalışma kapsamında, ülkemiz sularından istilacı türler olarak kabul edilen beş balon balığı türü *Lagocephalus sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis*, *Sphoeroides pachygaster* ve *Torquigener flavimaculosus*, istilacı lesepsiye yengeç *Charybdis longicollis* ve uzun dikenli denizkestanesi *Diadema setosum*'un biyomedikal endüstrisinde kullanım alanları belirlenerek ekonomiye kazandırılması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında ülkemiz sularında popülasyon oluşturan başlıca istilacı deniz türlerinin seçilmesinin en önemli nedenlerinin başında, seçilen türlerin ekonomik olarak hiçbir

getirisinin olmaması ve sürdürülebilir populasyonlarının varlığıdır. Tez çalışması kapsamında seçilen türler denizel ekosisteme verdikleri zararların yanı sıra balıkçılık sektörüne ciddi ekonomik zararlar sebep olmaktadır. Bu tez çalışması ile türlerin hangi alanlarda ve nasıl kullanılacağı ortaya çıkarılması ve bu türlerden ürünler elde ederek ekonomiye kazandırılması amaçlanmıştır. Böylelikle seçilen istilacı deniz türlerinin ülkemize ekonomik girdisinin sağlanması hedeflenmiştir.



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Hidroksiapatit ile İlgili Çalışmalar

Ozawa ve Suzuki (2004) *Pagrus major*'un atık kemiklerinden izole ettikleri HA'nın Ca/P oranının kalsiyum eksikliğinden dolayı tespit edememişlerdir. Ancak, elde edilen HA'nın biyolojik ve çevresel olarak uyumlu malzemeler için ekonomik bir seramik olduğunu ve balık kökenli hidroksiapatitin potansiyel bir seramik kaynağı olduğunu bildirmişlerdir.

Lee, Lee ve Yoon (2007) mürekkep balığı kemiğinden HA ekstrakte ettikleri çalışmalarında Ca/P oranlarını 1,38 ile 1,82 arasında bulmuşlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre bildirilen Ca/P aralığında orana sahip HA malzemeleri biyomedikal alanında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Bahrololoom, Javidi, Javadpour ve Ma (2009) sığır uyluk kemiği, koyun uyluk kemiği, koyun kafatası yassı kemiğinden HA ekstrakte ederek karşılaştırdıkları çalışmalarında Ca/P oranlarını 1,46-2,01 aralığında bulmuşlar ve bu aralıkta bulunan HA'lerin ortopedik ve diş uygulamalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Huang, Hsiao ve Chai (2011) *Oreochromis sp.* pullarından HA ekstrakte ettikleri çalışmalarında Ca/P oranını 1,78 olarak bulmuşlardır. Elde edilen sonuçlar ışığında balık pullarından elde edilen HA'nın maliyetli ve çevre dostu bir hidroksiapatit kaynağı olduğunu ve tıbbi uygulamalarda kullanılabileceğini bildirmiştir.

Venkatesan, Qian, Ryu, Thomas ve Kim (2011) *Thunnus obesus* kemiğinden alkalın metoduyla HA ekstraksiyonu yaptıkları çalışmalarında Ca/P oranını 1,76 olarak bildirmişlerdir. Elde edilen HA'nın sadece biyomedikal uygulamalarda değil aynı zamanda çevresel indikatör olarak da kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Boutinguiza, Pou, Comesaña, Lusquiños, De Carlos ve León (2012) *Xiphias gladius* ve *Thunnus thynnus*'dan HA ekstrakte ettikleri çalışmalarında Ca/P oranlarını sırasıyla 1,87 ve 1,86 olarak bulmuşlardır. Elde edilen HA'nın yüksek Ca/P oranından dolayı kemik iyileşmelerinde kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Kongsri, Janpradit, Buapa, Techawongstien ve Chanthai (2013) *Tilapia nilotica* balığının pulundan ekstrakte ettikleri HA'nın Ca/P değerini 1,63 olarak bildirmişlerdir. Balıklardan elde edilen HA'nın sentetik HA göre ekonomik ve daha yararlı olduğunu bildirmişlerdir.

Piccirillo, Pullar, Costa, Santos-Silva, Pintado ve Castro (2015) yaptıkları çalışmada morina balığı kemiklerinden HA ekstrakte etmiş ve elde edilen HA'nın biyomedikal endüstrisinde kullanılabilir performansta olduğunu bildirmişlerdir.

Mondal, Mondal, Mondal ve Mandal (2016) *Labio rohita* ve *Catla catla* balıklarının pullarından HA ekstrakte ettikleri çalışmalarında Ca/P oranlarını 1,70-1,73 aralığında bulduklarını bildirmişlerdir. Elde ettikleri HA'nın sitotoksik etkisinin olmadığını ve memeli hücre hatları için doğal bir bağlanma afinitesine sahip olduğunu, ayrıca balık pulundan elde edilen HA'nın yakın gelecekte doku mühendisliği uygulamaları için alternatif bir biyomateryal kaynağı olarak kullanılacağını bildirmişlerdir.

Muhammad ve diğerleri (2016) sazan balıkları pullarından ekstrakte ettikleri HA'nın Ca/P oranını 1,60 olarak bulmuşlardır. Elde edilen HA'nın biyomedikal alanında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Pon-On, Suntornsaratoon, Charoenphandhu, Thongbunchoo, Krishnamra ve Tang (2016) *Probarbus jullieni* kemiğinden elde ettikleri HA'nın fiziko-kimyasal, biyoaktivite ve biyolojik özelliklerini inceledikleri çalışmalarında Ca/P oranını 1,65 olarak bildirmişlerdir. Sentetik HA ile ekstrakte ettikleri HA'yı karşılaştırdıklarında doğal HA'nın kemik doku mühendisliği çalışmalarında daha iyi bir potansiyeli olduğunu bildirmişlerdir.

Sunil ve Jagannatham (2016) *Roho labio*'nun kemiklerinden yaptıkları HA ekstrakte çalışmasında Ca/P oranını 1,63 olarak tespit etmişler ve elde edilen HA'nın biyomedikal endüstrisinde geni bir yelpazede kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Alparslan, Baygar ve Baygar (2017) *Dicentrarchus labrax* ve *Sparus aurata* pullarını karıştırarak izole ettikleri HA çalışmasında Ca/P oranını 1,70 olarak bulmuşlardır. Su ürünleri işleyen işletmelerin yan ürünü olan bu balık pulların, yüksek kaliteli HA elde etmek için ekonomik ve erişilebilir bir hammadde olarak kabul edilebileceği sonucuna vardıklarını bildirmişlerdir.

Pal, Paul, Choudhury, Balla, Das ve Sinha (2017) *Later calcarifer* balığının kemiklerinden ekstrakte ettikleri HA'nın Ca/P oranını 1,62 olarak bildirmişlerdir. Bu oranın stokiyometrik HA'e yakın olduğunu ve ortopedik implant ve doku mühendisliği uygulamaları için kullanılabilceğini bildirmişlerdir.

Biazar ve diğerleri (2020) *Caspian kutum* kemiklerinden HA ekstraksiyonu gerçekleştirmiş ve Ca/P oranını 1,82 olarak bulmuşlardır. Ekstrakte edilen HA'nın ekonomik bir kaynak olduğunu ve kemik ikameleri içermesi nedeniyle sentetik HA bir alternatifi olarak kullanılabilceğini bildirmişlerdir.

Da Cruz ve diğerleri (2020) *Oreochromis niloticus* balığının kemiğinden HA ekstraksiyonu yaptıkları çalışmalarında Ca/P oranını 1,66 olarak bulmuşlardır. Elde edilen HA'nın düşük maliyetli bir hammadde olduğunu, ortopedi ve diş hekimliğinde kemik rekonstrüksiyonunda ve yeni biyomalzemelerin geliştirilmesi için kompozit üretiminde kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir.

Hasan, Ghazali ve Mohtar (2020) *Amblygaster sirm* kemiklerinden gerçekleştirdikleri HA ekstraksiyonu sonucunda Ca/P oranını 1,67 olarak bulmuşlardır. HA ekstraksiyonunda verimliliği yüksek olan balık kemiklerinin herhangi bir pazar için ticarileştirilebileceğini ve birçok uygulama için potansiyel bir biyomateryal olarak kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir.

Latif ve diğerleri (2020) *Thunnus thynnus* balığından HA ekstrakte ettikleri çalışmalarında Ca/P oranını 1,60 olarak bulmuşlardır. Elde edilen bu HA'nın içerdiği Ca, Mg, Sr, Na, K ve Zn elementleri sayesinde biyoyumluluğunun yüksek bir malzeme olduğunu ve biyomedikal uygulamalar için faydalı bir ürün olduğunu bildirmişlerdir.

Permatasari, Wati, Anggraini, Almukarramah ve Yusuf (2020) *Chanos chanos* ve *Clarias batrachus* kemiklerinden gerçekleştirdikleri HA ekstraksiyonu sonucunda Ca/P oranlarını *C. chanos* için 1,66 *C. batrachus* için 1,68 olarak tespit etmişlerdir.

Sathiyavimal ve diğerleri (2020) *Lethrinus lentjan* balığının kemiklerinden HA ekstraksiyon çalışmasında Ca/P oranını 2,33 olarak bulmuşlardır. Elde edilen HA'nın biyo-görüntüleme

ve kemik dokusu mühendisliği uygulamalarında kullanılabilir biyoyumlu bir malzeme olduğunu bildirmişlerdir.

Surya, Nithin, Sundaramanickam ve Sathish (2020) *Sardinella longiceps* kemiklerinden HA ekstraksiyonu yaptıkları çalışmalarında Ca/P oranını 1,67 olarak tespit etmişlerdir. Ekstrakte ettikleri HA'nın biyomedikal uygulamalar için toksik olmayan, etkili ve biyoyumlu bir kemik grefti olduğunu bildirmişlerdir.

Wijedasa, Broas, Daso ve Banerjee (2020) *Salmo salar* ve *Lutjanus campechanus* kemiklerinden HA ekstraksiyonu yaptıkları çalışmalarında Ca/P oranını sırasıyla 1,56 ve 1,62 arasında bulmuşlardır. Yaptıkları analizler sonucunda elde ettikleri HA'nın periodontal doku rejenerasyonunda kullanılabilir umut verici niteliklere sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Liu ve diğerleri (2021) *Carassius carassius* pulundan HA ekstrakte ettikleri çalışmalarında Ca/P oranını 1,78 olarak bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda elde ettikleri HA'nın çevresel ve ekonomik bir kaynak olduğu sonucuna varmışlardır.

Purwaningrum, Riyanti, Said, Hariani ve Handayani (2021) *Lutjanus campechanus* kemiklerinden HA ekstraksiyonu yaptıkları çalışmalarında Ca/P oranını 1,67 olarak tespit etmişlerdir. Elde edilen HA'nın yüksek adsorpsiyon kapasitesi ile biyomalzeme olarak kullanılabilirliğini bildirmişlerdir.

## **2.2. Dokuların Çevresel İndikatör Olarak Kullanılması ile İlgili Çalışmalar**

Appleton, Lee, Kapusta, Damek ve Cooke (2000) *Clethrionomys glareolus* dişlerinden ağır metal içeriği analizi yaptıkları çalışmalarında kurşun, kadmiyum, çinko, bakır ve stronsiyuma içeriklerini tespit etmişlerdir. Memeliler grubunda olan kırmızı sırtlı fare örnekleri üzerinde yapılan bu çalışma sonucunda endüstriyel emisyonlardan kaynaklanan yüksek kirlilik seviyelerinin, dişlerde ortaya çıkan yüksek ağır metal konsantrasyonlarıyla ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca küçük memelilerin dişlerinin, ağır metaller tarafından kirletilen çevreler için hassas ve güvenilir bir indikatör olduğunu bildirmişlerdir.

ve Chmielnicka (2000) 1990-1997 yılları arasında yüksek kurşun ve kadmiyum kirliliğine maruz kalan Polonya'nın Katoviçe bölgesinde yaşayan insanların saç, diş ve tırnak örnekleri ile yaptıkları çalışmalarında, ağır metal birikimi insanların yaşlarına göre değiştiğini ve elde edilen saç, diş ve tırnak örnekleri sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir.

Asaduzzaman ve diğerleri (2017) 50 ayrı çeşitli etnik köken, yaş, cinsiyet, meslek, beslenme alışkanlığı, ikamet yeri vb. diş hastalarından topladıkları dişlerin ağır metal içeriği analizlerini yapmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre endüstriyel emisyonlar ve şehirleşmeden kaynaklanan kirliliği yansıtan dişdeki yüksek konsantrasyona sahip ağır metal seviyelerinin bir indikatör olarak kullanılabilmesinin ve dişlerin kirlilik hakkında kronolojik bilgi verebileceğini bildirmişlerdir.

Eken, Aydın, Turan ve Uyan (2017) Antalya Körfezi'nde yakalanan *Lagocephalus sceleratus* örneklerinin kas ve derisi üzerinde yaptıkları ağır metal çalışmalarında, çinko, kurşun, bakır, demir ve manganez içerdiğini tespit etmişlerdir. Kas dokularının deriye göre daha iyi bir indikatör olduğunu bildirmişlerdir.

Karunanidhi, Rajendran, Pandurangan ve Arumugam (2017) güney Hindistan'da tüketilen *Takifugu oblongus*, *Lagocephalus guentheri*, *Arothron hispidus*, *Arothron immaculatus* ve *Chelonodon patoca*'nın farklı organlardaki (deri, doku, karaciğer, böbrek, solungaç, bağırsak ve yumurtalık) ağır metal konsantrasyonu incelemişlerdir. Çalışılan türlerin tüm dokularında kurşun, kadmiyum, çinko ve bakır tespit etmişlerdir. Analiz sonuçlarına göre ağır metal konsantrasyonları tüm iç organlarda kas dokularına göre çok yüksek bulmuşlardır.

Eken, Turan, Aydın ve Karan (2018) *Lagocephalus suezensis* türünün kas ve derisindeki ağır metal birikimini inceledikleri çalışmalarında, analiz yapılan kas ve deri örneklerinde kadmiyum, bakır, kurşun, kobalt, krom, demir, nikel ve çinko elementlerini tespit etmişlerdir. Çalıştıkları organlar karşılaştırıldığında kas dokusunda daha fazla ağır metal birikimine rastlamışlardır.

Ayas ve Kosker (2018) çalışmalarında Mersin Körfezi'nde yakalanan farklı yaş gruplarındaki *Lagocephalus sceleratus* örneklerinin kas ve karaciğer dokularındaki ağır metal düzeylerini araştırmışlardır. Araştırılan örneklerde yüksek miktarda kadmiyum,



kurşun, krom ve arsenik tespit etmişlerdir. Ayrıca yaptıkları çalışmada balon balıklarının yaşlarının artmasıyla birlikte hem kas hem de karaciğer dokularında belirlenen ağır metal düzeylerinin arttığı gözlemlenmiştir.

Kosker ve diğerleri (2018) Mersin Körfezi'nde yakalanan *Lagocephalus sceleratus* kas örnekleri ile yağ asidi profili, mineral ve ağır metal seviyelerini araştırmışlardır. Elde edilen ağır metal sonuçlarına göre balon balığı kas örneklerinde yüksek miktarda kurşun ve bakır metallerini tespit etmişlerdir.

Kosker, Ozogul, Ayas, Durmus ve Ucar (2019) ülkemizde dağım gösteren balon balığı türleri *Lagocephalus sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis* ve *Torquigener flavimaculosus*'un kas ve karaciğer dokuları üzerinde ağır metal birikimi analizi yapmışlar ve elde edilen sonuçlara göre kas ve ciğer dokularında yüksek miktarda kurşun, kadmiyum ve krom elementlerini tespit etmişlerdir.

### 2.3. Kolajen ve Jelatin ile İlgili Çalışmalar

Nagai, Araki ve Suzuki (2002) *Takifugu rubripes* dersinden asitte çözünür kolajen (ASC) ve pepsin çözünür kolajen (PSC) yöntemiyle kolajen ekstraksiyonu yapmışlar ve iki yöntemi karşılaştırmışlardır. Çalışmada ASC ve PSC verimliliğini sırasıyla %10,7 ve %44,7 olarak bulmuşlardır. Elde edilen sonuçlar ışığında *T. rubripes* dersinde elde edilene kolajenin alternatif bir kaynak olma potansiyeline sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Senaratne ve diğerleri (2005) *Lagocephalus gloveri*'nin derisinden kolajen ekstraksiyonu yaptıkları çalışmalarında kolajen oranını %54,3 olarak tespit etmişlerdir. Yaptıkları analizler sonucunda, elde ettikleri kolajenin endüstriyel amaçlar için sığır ve domuzlardan elde edilen kolajene alternatif kaynak olduğunu bildirmişlerdir.

Nalananon (2006) *Priacanthus tayenus* derisinden ASC ve PSC yöntemiyle kolajen elde ettikleri çalışmalarında ASC verimliliğini %19,76, PSC verimliliğini ise %13,03 olarak tespit etmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda PSC yöntemiyle kolajen ekstraksiyonu çalışmalarında elde edilen kolajenin düşük moleküler ağırlık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Liu, Li ve Guo (2007) *Ictalurus punctatus* derisinden ASC ve PSC yöntemiyle kolajen elde ettikleri çalışmalarında ASC verimliliğini %25,8, PSC verimliliğini ise %38,4 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca elde edilen kolajenlerin %23'den fazla glisin içerdiğini bildirmişlerdir.

Yan ve diğeleri (2008) alaska mezgiti *Theragra chalcogramma* derisinden Tip 1 kolajen elde ettikleri çalışmalarında glisin oranını %19,71 olarak bildirmişlerdir. Analizler sonucunda elde edilen kolajenin sığır veya domuz derisinden elde edilen kolajenlerden farklı aminoasit bileşimine ve termal stabiliteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Tsukamoto, Yokoyama, Suzuki, Mizuta, Yoshinaka ve Akahane (2013) kaplan balon balığı *Takifugu rubripes*'in kas, deri, kemik, sindirim sistemi, solungaç, yüzgeç, hepatopankreas ve hava kesesinden asetik asit yöntemiyle kolajen ekstrakte etmişlerdir. Kullanılan dokular içerisinde en yüksek kolajen deride (%19,97±3,21'i), en düşük ise hepatopankreas'ta (%0,42±0,07'si) tespit etmişlerdir. Diğer dokuların kolajen içeriklerini %0,95±0,07 (kas), %9,55±0,39 (kemik), %2,78±0,45 (sindirim sistemi), %2,71±0,32 (solungaç), %4,29±0,37 (yüzgeç) ve %5,41±0,78 (hava kesesi) olduğunu bildirmişlerdir.

Sionkowska, Kozłowska, Skorupska ve Michalska (2015) yaptıkları çalışmada *Brama australis* derisinden %1,5 verimlilikle kolajen elde etmişlerdir. Çalıştıkları türden elde edilen Tip 1 kolajenin verimliliğinin düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Iswariya, Velswamy ve Uma (2018) *Lagocephalus inermis* derisinden kolajen ekstrakte çalışması yapmış ve ASC verimliliğini %43,1 ve PSC verimliliğini %56,6 olarak tespit etmişlerdir. Elde edilen kolajenin yüksek verimi ve mükemmel biyo-uyumluluğunun umut verici bir biyomateryal olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Chen ve diğeleri (2019) yaptıkları çalışmada *Takifugu flavidus* derisinden kolajen ekstrakte etmişlerdir. Elde edilen Tip 1 kolajenin verimliliğini %67,3 olarak bulmuşlardır. Elde edilen kolajenin içerdiğinde yüksek oranda glisin ve prolin aminoasitlerinin bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Lin ve diğeleri (2019) büyük gözlü tuna balığı *Thunnus obesus* derisinden kolajen ekstrakte ettikleri çalışmalarında kolajen oranını %17,17 olarak tespit etmişlerdir. Elde ettikleri Tip 1

kolajenin iyi bir potansiyele sahip olduğunu ve kozmetik ve biyomedikal alanlarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Abdel-Aal (2020) *Oreochromis niloticus* derisinden ASC ve PSC yöntemiyle kolajen ekstraksiyonu yapmışlar ve iki yöntemi karşılaştırmışlardır. Sonuçlar, ASC ve PSC verimliliğini sırasıyla %4,30 ve %1,84 olduğunu göstermiştir. Elde edilen kolajenlerin aminoasit içeriğinde glisin ve alenin oranlarının yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda deriden kolajen ekstraksiyonunun ASC yönteminin daha verimli olduğunu bildirmişlerdir.

Baehaki, Widiastuti, Nainggolan ve Gofar (2020) *Channa striat* derisinden asetik asit, hidroklorik asit ve sitrik asit ile kolajen ekstrakte ettikleri çalışmalarında kolajen verimliliğini asetik asitte %84,07, hidroklorik asitte %43,03 ve sitrik asitte %3,25 olarak tespit etmişlerdir. Elde edilen bu sonuçlar asetik asit deriden kolajen elde etme çalışmalarında daha yüksek verimlilikle kullanıldığını göstermektedir.

Sousa ve diğeleri (2020) *Gadus morhua* derisinden kolajen ekstrakte ettikleri çalışmalarında kolajen oranını  $13,8 \pm 0,013$  bulmuşlar ve elde ettikleri kolajenin Tip 1 olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen kolajenin yüksek verimli olmasından dolayı biyomedikal, kozmetik ve farmasötik alanlarda kullanılabilirliğini ortaya çıkarmışlardır.

Song, Liu, Sun, Li ve Hou (2021) *Oreochromis niloticus* ASC ve PSC yöntemiyle kolajen elde ettikleri çalışmalarında ASC verimliliğini %8,14, PSC verimliliğini ise %7,60 olarak tespit etmişlerdir. Analizler sonucu *O. niloticus*'dan elde edilen kolajenin verimliliğinin düşük olduğunu bildirmişlerdir.

#### **2.4. Kitin ve Kitosan ile İlgili Çalışmalar**

Nacz, Synowiecki ve Sikorski (1981) tarafından kimyasal metot ile yeşil yengeçlerin (*Carcinus maenas*) kitin içeriklerinin tespiti ile ilgili araştırma olduğunu ve bu çalışmada kitin içeriğinin %12,6 ile %14,5 arasında değiştiğini bildirmiştir.

Shahidi ve Naczk (1989), kabuklularda kitin içeriğinin türe, beslenme durumuna, mevsime ve coğrafik şartlara göre değişmekle birlikte yengeç ve karideslerin kuru kabuk ağırlığının %17-32 oranında kitin içerdiğini bildirmişlerdir.

Calvo, Remuñan-López, Vila-Jato ve Alonso (1997) gerçekleştirdikleri kitosan sentez çalışmasında, kitosan nanopartikülü oluşturmuş ve kontrollü salımındaki etkilerini incelemişlerdir. Parçacıkların oluşumu, kitosanın tripolifosfat gibi bir çapraz bağlayıcı ajan ile iyonik etkileşmesine dayanmaktadır. Meydana gelen kitosan nanopartikülü 250-1000 nm aralığındadır. Kitosan nanopartiküller, farklı derişimlerde hazırlanan asetik asit çözeltileri içerisinde çözdürülmüştür. Araştırmacılar minimum parçacık boyutuna en düşük derişim değerlerinde çalışarak ulaşmışlardır.

Zheng ve Zhu (2003) çalışmalarında iyonik jelleşme tekniği ile kitosan nanopartikülü sentezi gerçekleştirmişlerdir. Elden edilen parçacıkların boyut aralığı 90-220 nm' dir. pH, kitosan/çapraz bağlayıcı oranı ve deasetilasyon derecesi gibi parametrelerin parçacık büyüklüğü üzerine etkisini incelenmiştir.

Lu, Weng ve Zhang (2004) kitinin asit hidroliziyle kitin kıl-kristalleri hazırlamışlardır. Kıl kristallerinin ortalama boyutları 500 nm uzunluk ve 50 nm çap olarak gözlemlenmiştir. Kitin kıl kristallerini soya protein izolatu termoplastiklerine katmış ve kıl kristalleri sadece matriksin gerilme özelliklerini değil, aynı zamanda suya karşı direncini de oldukça geliştirmiştir.

Nadarajah (2005), istakoz kabuklarından geleneksel metot ile elde edilen kitosanın viskozitesi 8 cP, deasetilasyon derecesi %83,06, nem %2,19, kül %0,35 ve azot %7,35 olarak bulunurken, dekolorizasyon aşaması uygulanmadığında viskozitenin yükseldiği (48 cP) ve diğer parametrelerin fazla değişmediğini belirtmektedir. Aynı çalışmada yazar, kuru ağırlık esas alınarak %10-55 oranlarında kitin ihtiva eden organizmaların kitin bakımından zengin türler olduğunu belirtmiştir.

Crespo, Martínez, Hernández ve Yusty (2006), yüksek performanslı sıvı kromatografi metodu ile kar yengecinde (*Chionoecetes opilio*) kitin içeriğini %5,36±2,1 olarak tespit etmiştir.

Nessa, Masum, Asaduzzaman, Roy, Hossain ve Jahan (2010) atık karides kabuğundan kitin ve kitosan elde ettikleri çalışmalarında kitin verimini %20, kitosan verimini ise %16,4-19,6 oranında bulmuşlardır. Çalışmada özellikle N-deasetilasyon derecesinin kullanılan kabuk çeşidine göre değiştiğini bildirmişlerdir.

Limam, Selmi, Sadok ve El Abed (2011) pembe karides *Parapenaeus longirostris* ve mantis karidesi *Squilla mantis* kabuğundan kitin ve kitosan elde ettikleri çalışmalarında *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri kullanarak ürünlerin antimikrobiyal ve antifungal özellikleri ortaya çıkarmışlardır. Yaptıkları analizler sonucunda iki türden yüksek antibakteriyel ve antifungal aktivitelere kitin ve kitosanın üretilebileceğini ortaya çıkarmışlardır.

Wang ve diğerleri (2013) Antarktika krili *Euphausia superba* kabuğundan kitin ekstrakte etmiş ve elde edilen kitinin kristal yapısı ve termal özelliklerini karakterize etmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda Antarktika kril kitininin  $\alpha$ -polimorfuna karşılık geldiğini, küçük, kararlı ve tek biçimli mikro kristallerden oluştuğunu saptamışlardır. Ayrıca kitinin N-deasetilasyon derecesi  $11,28 \pm 0,86$  olarak bulmuşlardır.

Kumari, Paul, Jayan, Sasikumar ve Cherian (2014) rohu balığı *Labeo rohita* pulundan kitin ve kitosan ekstrakte ettikleri çalışmalarında fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile yapılan analizlerde balık pullarının kitin ve kitosan için uygun bir hammadde kaynağı olduğunu ve kitosan makro moleküllerindeki tüm fonksiyonel gruplar netleştiğini bildirmiştir.

Paul, Jayan, Sasikumar ve Cherian (2014) *Fenneropenaeus indicus* kabuklarından kitin ve kitosan izole ettikleri çalışmalarında kitosan verimi %57,69 olarak bulmuşlardır. Yapılan analizler sonucunda elde edilen kitin ve kitosanın insan patojenlerine karşı mükemmel bir antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu nedenle *F. indicus*'tan elde edilen kitin ve kitosanın ilaç endüstrisi, gıda ambalajı, su arıtma, ilaç teslimatı gibi çeşitli alanlarda kullanılabilirliğini bildirmişlerdir.

Kaya, Baran ve Karaarslan (2015) yengeç, kerevit ve karides kabuklarından geliştirdikleri yeni bir metotla kitin ekstrakte etmişlerdir. Çalışma sonucunda kitin verimini yengeç kabuğunda %13,4, kerevit kabuğunda %15,3 ve karides kabuğunda %14,8 olarak

etmişlerdir. Termogravimetri (TGA), FTIR, X ışını kristalografisi (XRD) ve elementel analizinden elde ettikleri verilere dayanarak ortaya çıkardıkları yeni kitin ekstraksiyon yönteminin geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında daha kısa işlem süresi ve daha ekonomik olması bu yöntemi daha avantajlı hale getirdiğini bildirmişlerdir.

Bölgen, Demir, Öfkeli ve Ceylan (2016) yaptıkları çalışmada mavi yengeç *Callinectes sapidus* kabuklarından kimyasal izolasyon yöntemiyle kitin ve kitosan izole etmişlerdir. Çıkarılan kitinden üretilen kitosanın verimini %77,78 olarak hesaplamışlardır. Elde edilen kitosanın yüksek verimliliği ile biyomedikal uygulamalarda doku mühendisliği iskele olarak kullanılması potansiyelinin olduğunu bildirmişlerdir.

Kaya ve diğerleri (2016) yapıları çalışma ile mavi yengeç *Callinectes sapidus* kabuğundan klasik kimyasal yöntem kullanılarak kitin ve kitosan izole etmişlerdir. Kitin içeriğini %12,1, kitosan içeriğini ise %76 olarak tespit etmişlerdir. Çalışma kapsamında *C. sapidus*' dan elde edilen kitosanın insan ve balık patojenik mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Al Shaqsi, Al Hoqani, Hossain ve Al Sibani (2020) *Portunidae segnis* kabuğundan klasik kimyasal yöntemle kitin izolasyonu yapmışlardır. Kitin içeriğini ortalama %25, kitosan içeriğini ise ortalama %75 olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Bernabé ve diğerleri (2020) yaptıkları çalışma ile *Aegla cholchol* kabuklarından kitin ve kitosan izolasyonunu sağlamış ve bunların *Candida spp.* mayalarına karşı antifungal aktivitelerini incelemişlerdir. Kitin içeriğini verimliliğini %9,6 olarak bulmuşlardır. Analizler sonucunda *A. cholchol*'den elde edilen kitinin *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, ve *Candida glabrata* mayalarına karşı yüksek antifungal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak *Aegla cholchol* kabuklarından elde edilen kitinin bulaşıcı hastalıkların önlenmesi için potansiyel uygulamalarda bulunulabileceğini bildirmişlerdir.

Huang, Bi, Pang, Sun, Feng ve Chen (2020) dünyada en çok avlanan yengeç olan at yengeci *Portunus trituberculatus* atık kabuklarından kitosan izolasyonu gerçekleştirmiş ve ortalama %79,86 oranında verim elde etmişlerdir. Yaptıkları analizler sonucunda elde edilen kitosanın mükemmel özelliklere sahip tıbbi sınıf kitosan olduğunu ve endüstriyel üretim için uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Narudin, Mahadi, Kusrini ve Usman (2020) amur yengeci *Scylla serrata* kabuklarından kitin ve kitosan izolasyonu gerçekleştirmişler ve kitinde %16,8, kitosanda %84,7'lik verimlilik elde etmişlerdir. Elde ettikleri kitin ve kitosanda kristallik oranlarını sırasıyla %60,1 ve %73,8 olarak saptamışlardır.





### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Tez çalışmasında beş balon balığı türü *Lagocephalus sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis*, *Sphoeroides pachygaster* ve *Torquigener flavimaculosus*, istilacı lesepsiye yengeç *Charybdis longicollis* ve uzun dikenli denizkestanesi *Diadema setosum* türleri kullanılmıştır.

##### 3.1.1. *Lagocephalus sceleratus*'un biyolojik özellikleri

###### Türün Sistematikteki Yeri ve Ayırt Edici Özellikleri

*Lagocephalus sceleratus* (Gmelin 1789)

ALEM: Animalia

ŞUBE: Chordata

SINIF: Vertebrata

ÜST SINIF: Pisces

SINIF: Actinopterygii

TAKIM: Tetraodontiformes

FAMİLYA: Tetraodontidae

CİNS: Lagocephalus

TÜR: *Lagocephalus sceleratus* (Benekli Balon Balığı)

Vücutları uzun ve ince fuziform şeklinde olup, yanlardan basıktır. Sırtı gri renktedir ve üzerinde düzensiz dağılım gösteren siyah benekler bulunur (Bkz. Resim 3.1). Vücudunun lateral bölgesinde ağızdan kuyruğa kadar uzanan gümüş renkli bant bulunur. Karın bölgesi beyazdır ve pürüklü bir yapıya sahiptir. Göz ve ağız arasında gümüş renkte bir leke bulunur. Pektoral yüzgeç başlangıcı siyah renktir. Dorsal ve anal yüzgeçler simetrik olup kısa tabanlıdır. Kuyruk yüzgecinin şekli yarım ay biçimindedir. Pektoral yüzgeç geniş başlangıça sahiptir ve yuvarlak kenarlıdır, önünde tek bir solungaç açıklığı bulunmaktadır. Vücutları pullarla kaplı değildir. Pul yerine karın ve sırt bölgelerinde küçük spiküller bulunmaktadır. Pelvik yüzgeçleri yoktur (Turan, Ozturk, Erguden, Gurlek, Yaglioglu ve Uygur, 2007; Boustany, El Indary ve Nader, 2015).

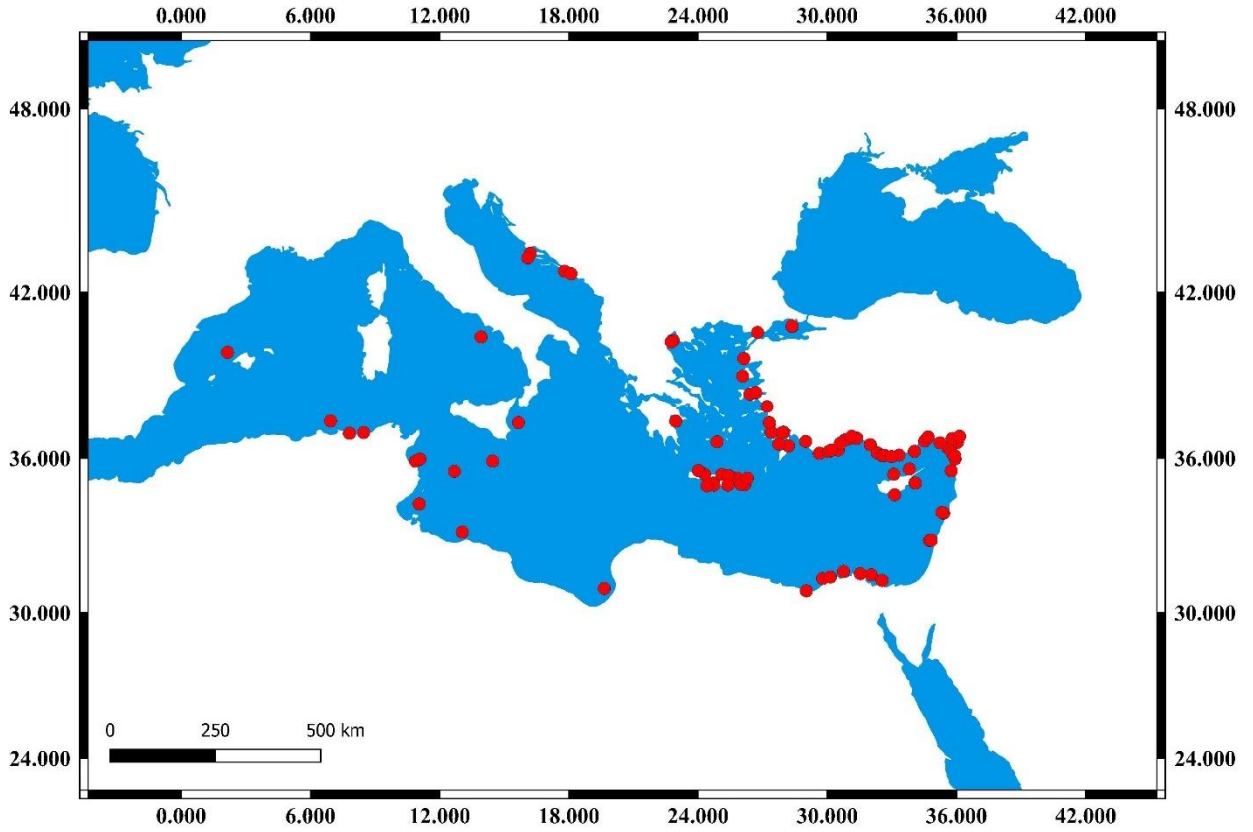


Resim 3.1. *Lagocephalus sceleratus*'un genel görünümü

*L. sceleratus* türü tüm balon balıklarında olduğu gibi karşılaştıkları tehlike anında su yutarak vücudunu şişirmektedirler. Bu özellikleri onları iri gösterir ve yutulmalarını zorlaştırarak tehlikelerden korunmalarını sağlar (Khalaf, Saad, Jemaa, Sabour, Lteif ve Lelli, 2014). Bildirilen maksimum uzunluk 110 cm'dir. Genel olarak 40 cm uzunluğunda bulunurlar (Froese ve Pauly, 2021). Dört parçadan oluşan diş yapıları mevcuttur ve dişleri keskin ve sağlam yapıdadır (Doğdu ve diğerleri, 2021).

#### Dağılımı ve Beslenme Alışkanlıkları

Hint-Pasifik kökenli olan *L. sceleratus* tropik sularda yaşar ve Süveyş Kanalı'nın açılması ve iklim değişikliği etkisiyle Akdeniz'in ısınması sonucunda Kızıldeniz'den Akdeniz'e yayılım göstermiştir (Bkz. Şekil 3.1).



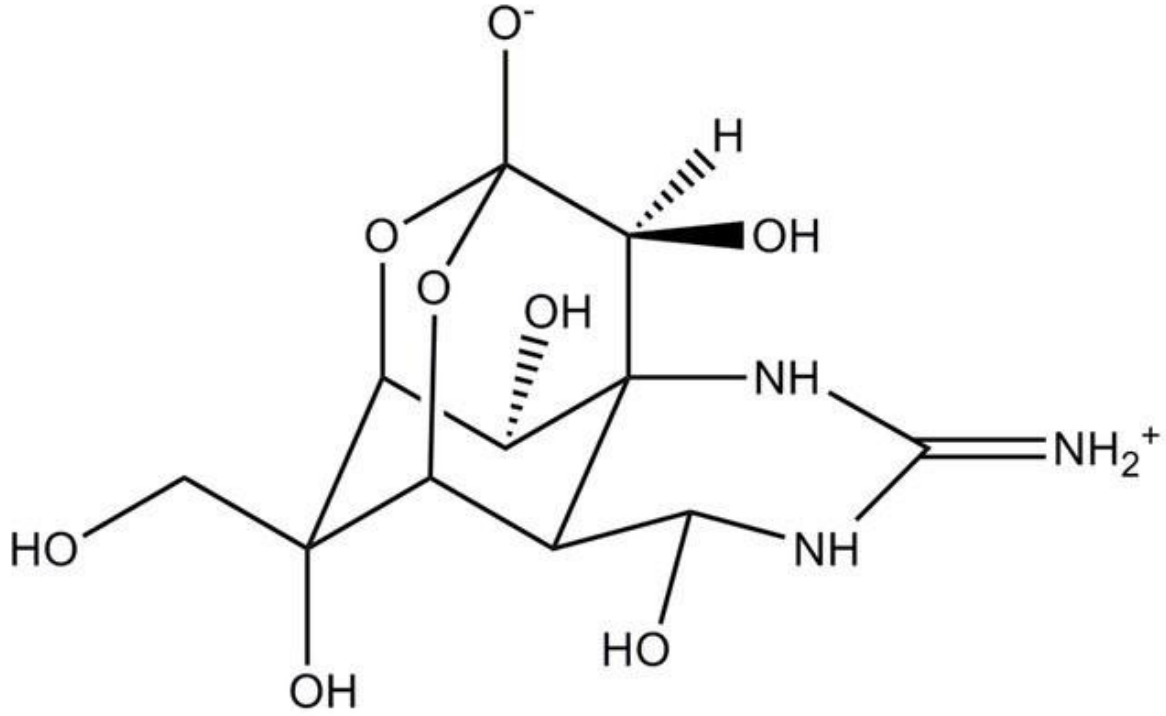
Şekil 3.1. Benekli balon balığının Akdeniz'deki dağılımı

250 metre derinliğe kadar dağılımını gösteren benekli balon balıkları genellikle 100 m derinlikte kumlu deniz diplerinde yaşarlar (Yağlıoğlu, Turan, Erguden ve Gurlek, 2011). Besin kompozisyonu genellikle karides ve yengeç gibi kabuklulardır. Ayrıca, kendi türlerine ait bireyler de dâhil olmak üzere balıklar, kalamar ve sübye gibi türler oluşturur (Froese ve Pauly, 2021). Dişlerinin yapısından dolayı sert kabuklu deniz canlılarını kolayca yiyebilirler. *L. sceleratus* beslenme alışkanlıkları ve balıkçılığa verdikleri zararlardan dolayı, Avrupa Yabancı Tür Bilgi Ağı (European Alien Species Information Network) tarafından istilacı yabancı tür olarak ilan edilmiştir (Carvalho ve diğerleri, 2019).

#### Tetrodotoksin Durumu

Moleküler formülü  $C_{11}H_{17}O_8N_3$  olan Tetrodotoksin (TTX), bilinen en güçlü denizel nörotoksindir. Üç azot, bir pirimidin halkası içeren bir adet guadinyum grubu ve 6 hidroksil grubundan oluşur (Bkz. Şekil 3.2). Sıcaklığa karşı dirençli bir zehirli maddedir. TTX canlının vücuduna girdiğinde, voltaj kapılı sodyum kanallarına bağlanarak oraya kenetlenir

ve sinir ağını bozar ve bu durum felç ve ölüme sebebiyet verebilmektedir (Kosker ve diğerleri, 2019).



Şekil 3.2. Tetrodoksın molekülünün kimyasal yapısı (Lago ve diğerleri, 2015)

1909 yılında Dr. Tahora tarafından ilk olarak kirpi balığının gonadında TTX keşfedilmiştir. Sinanürden 1000 kat daha güçlü olduğu tespit edilen bu toksinin sadece deniz canlılarında değil karasal canlılar olan; kurbağalar, saylangozlar, solucanlar ve semender gibi canlılarda da bulunmaktadır (Akbor, Kunter, Erçetin, Elagöz ve Çiçek, 2020). Vücutlarında bulundukları TTX nedeniyle balon balığı türlerinin ülkemizde karaya çıkarılması ve satılması yasaklanmıştır.

### 3.1.2. *Charybdis longicollis*'un biyolojik özellikleri

#### Türün Sistematikteki Yeri ve Ayırt Edici Özellikleri

*Charybdis (Goniohellenus) longicollis* Leene, 1938

ALEM: Animalia

ŞUBE: Arthropoda

SINIF: Crustacea

ÜST SINIF: Multicrustacea

SINIF: Malacostraca

TAKIM: Decapoda

FAMİLYA: Portunidae

CİNS: *Charybdis*

TÜR: *Charybdis (Goniohellenus) longicollis* (Lesepsiye Yengeç)

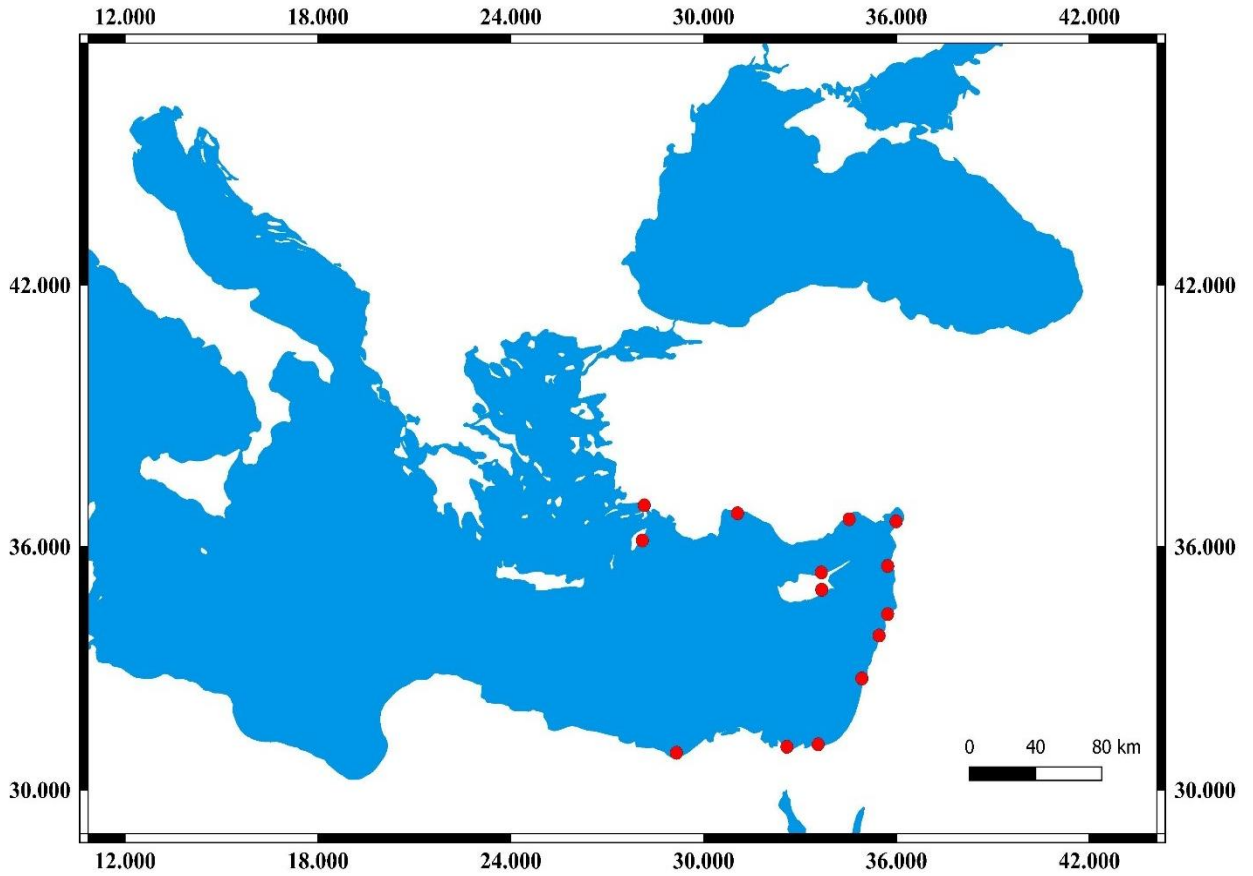
*C. longicollis* karapaskı yoğun ve ince tüylerle kaplıdır. Dışbükeydir ve altıgen şeklindedir. Karapaskı kahverengi-krem renklidir. Pripodlarının son çifti yüzme bacaklarıdır. Kelipedin iç kısmı beyaz-sarı renktedir (Frogli, 2012) (Bkz. Resim 3.2).



Resim 3.2. *Charybdis (Goniohellenus) longicollis*'in genel görünümü

#### Dağılımı ve Beslenme Alışkanlıkları

Hint-Pasifik kökenli olan *C. longicollis* Basra körfezi, Kızıldeniz ve Doğu Akdeniz'de dağılım göstermektedir. Süveyş kanalının açıklamasıyla Akdeniz'e giriş yapmış ve 1961 yılında Antalya ve Mersin kıyılarından rapor edilmiştir (Holthuis, 1961). Daha sonra İsrail, Mısır, Kıbrıs ve Yunanistan'dan da kaydı yapılmıştır (Bkz. Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *Charybdis (Goniohellenus) longicollis*'in Akdeniz'deki dağılımı

*Charybdis longicollis* çamurlu veya ince kumlu yüzeyler üzerinde 8 m ile 200 m arasındaki tüm derinliklerde yaygın olarak bulunur. Yumuşakçalar, kabuklular ve balıklar gibi yavaş hareket eden veya sabit avlarla beslenmeyi tercih eden bentoplajik bir türdür.

### 3.1.3. *Diadema setosum*'un biyolojik özellikleri

#### Türün Sistematikteki Yeri ve Ayırt Edici Özellikleri

*Diadema setosum* (Leske, 1778)

ALEM: Animalia

ŞUBE: Echinodermata

SINIF: Echinozoa

ÜST SINIF: Echinoidea

SINIF: Euechinoidea

TAKIM: Diadematoida

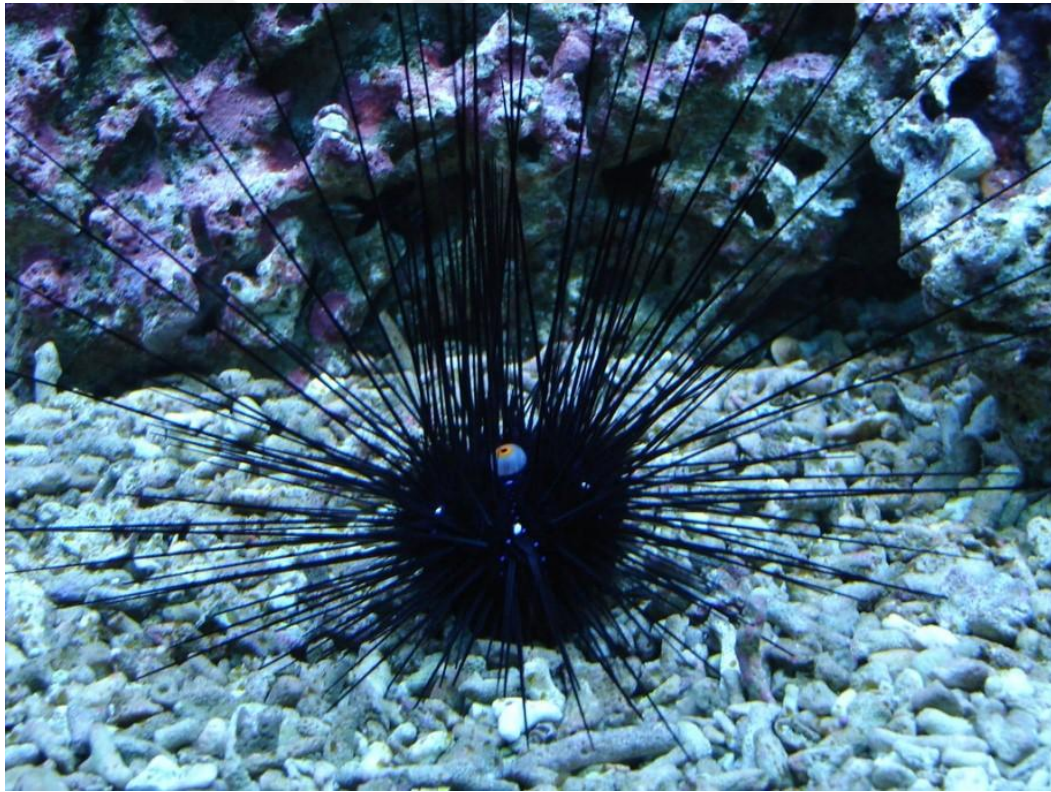
FAMİLYA: Diadematidae



CİNS: *Diadema*

TÜR: *Diadema setosum* (Uzun Dikenli Deniz Kestanesi)

Gövde çapı 8-10 cm'yi bulabilen *Diadema setosum* gövdelerinde radiola adı verilen dikenler bulunur bu dikenler hareketlidir. Genellikle kısa dikenler bulunsa da diken uzunluğu 30 cm'ye ulaşabilir. Gövdenin altında kalan dikenleri çok kısa ve gelişmemiştir. Dikenler arasında bulunan kıskaçlar, derinin temizlenmesine, küçük avların yakalanmasına ve savunmaya yardım ederler. Genellikle siyah ya da koyu mavi renkte bulunurlar. Gövdelerinin ortasında soğanımsı turuncu-mavi bir kese bulunmaktadır (Yokes ve Galil, 2006). Bu metabolizma atıklarını boşalttıkları anal açıklıktır (Bkz. Resim 3.3). Uzun dikenlerinin varlığından dolayı düşmanı az gibi görünse de, insan, balık, yengeç, denizyıldızı ve fok gibi canlılar tarafından sıklıkla tüketilmektedir.

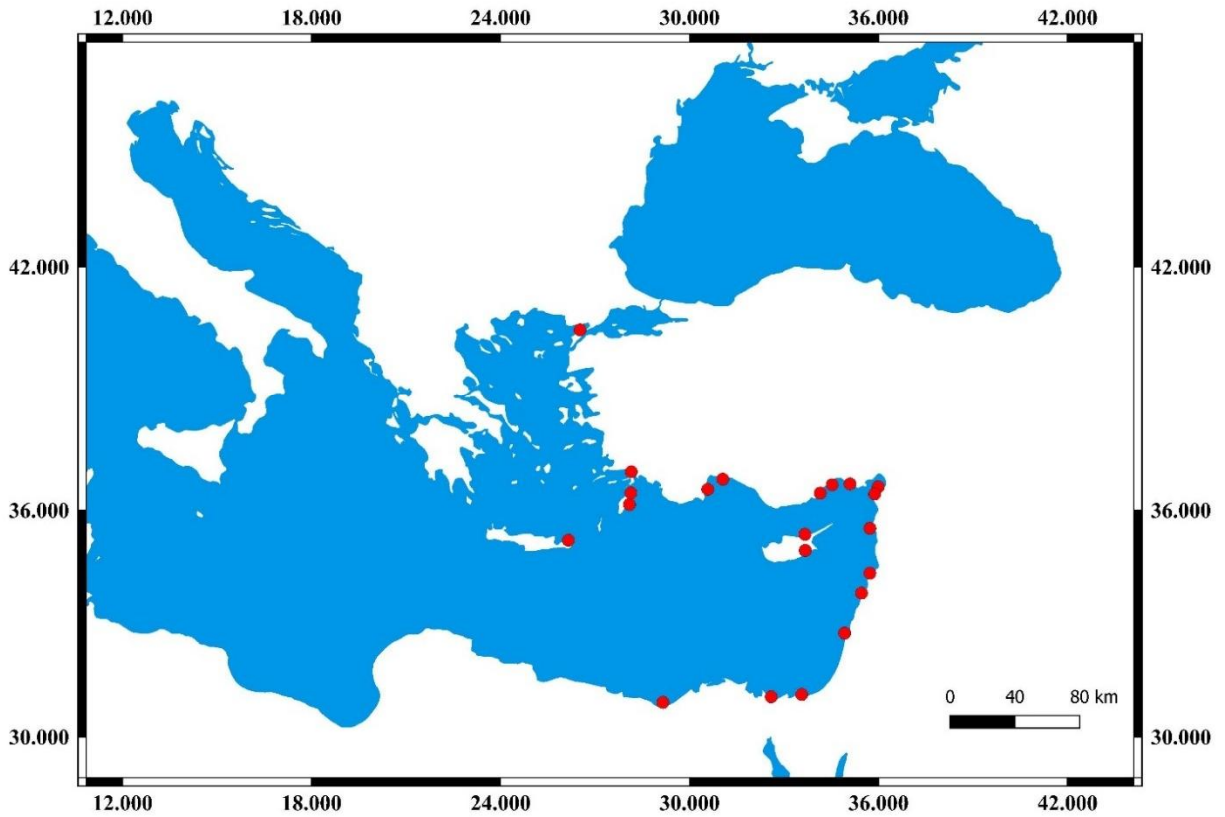


Resim 3.3. *Diadema setosum*'un genel görünümü

Uzun ve ince dikenleriyle insanlar üzerinde ağırlı yaralara sebep olabilir. Dikenleri kırılındır, dokuya battığında veya ette kaldığında zehir saçmaya başlar. Dokuya yayılan zehir; kızarıklık, şişlik ve akut ağrıya neden olabilir (Turan, Erguden ve Uygur, 2011). Bununla birlikte kırıldığı zaman diken parçalarının dokudan çıkarılması zordur. İyileşme süreci birkaç hafta sürebilir.

### Dağılımı ve Beslenme Alışkanlıkları

*D. setosum* indo-pasifik kökenlidir. Afrika, Japonya, Avustralya ve Kızıldeniz kıyılarında dağılım göstermektedir. Ülkemiz denizlerinde ilk defa 2006 yılında Antalya-Kaş bölgesinde, ikinci kaydı ise 2011 yılında İskenderun Körfezi'nden yapılmıştır (Bkz. Şekil 3.4) (Yokeş ve Galil, 2006; Turan ve diğerleri, 2011). Diken ve dişlerini kullanarak kayaları oyarlar ve içine yerleşirler. Bu sayede dalga hareketlerinden korunurlar ve büyüdükçe buldukları oyukları aynı ölçüde büyütürler. Resifler ve sığ kayalık habitatlar etrafında genellikle 1-6 m derinlik aralıklarında yaşarlar. Bazen düz ve geniş kumluk alanlarda da bulunabilirler. Gündüzleri yarıklarda gizlenirken geceleri buldukları yerden birkaç metre uzaklaşarak resiflerde bulunan alg türleriyle beslenirler.



Şekil 3.3. *Diadema setosum*'un Akdeniz'deki dağılımı

Uzun dikenli denizkestanesi, Avrupa'da Fransa, Yunanistan ve İtalya'da, Güney Amerika'da Şili'de ve Uzak Doğu ülkelerinde tüketiminin son derece yaygındır. Ülkemizde çok tanınmasa da tatil bölgelerinde bulunan restoranlarda meze olarak servis edilmektedir. Tüketildiğinde sindirim sistemini rahatlatıcı etkisinin olduğu bilinen *D. setosum*'un iki



günlük yaşam süresi mevcuttur (Turan ve diğeri, 2011). Bu nedenle yakalandıktan sonra kısa sürede tüketilmesi önerilmektedir.

### 3.2. Örneklerinin Toplanması ve Hazırlanması

Tez çalışması kapsamında seçilen türlerden benekli balon balığı *Lagocephalus sceleratus* ve istilacı lesepsiye yengeç *Charybdis longicollis* İskenderun Körfezi'nde yapılan trol avcılığı ile örnekleme yapılmıştır (Bkz. Resim 3.4). Uzun dikenli denizkestanesi *Diadema setosum* için Arsuz ve Samandağ sahillerinde donanımlı dalışlar (tüplü dalış) yapılarak elle toplanmıştır.

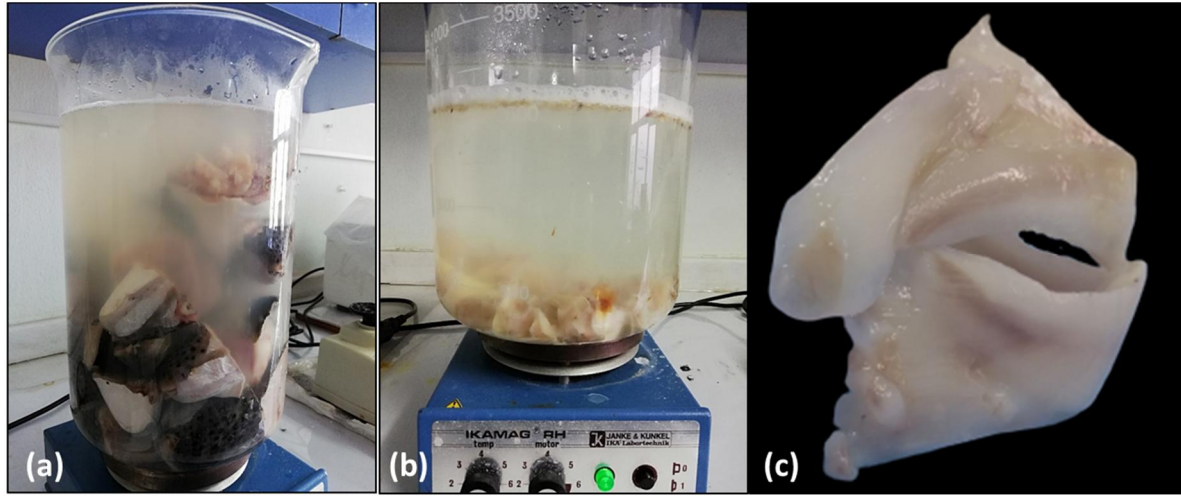


Resim 3.4. Arazi çalışmaları kapsamında İskenderun Körfezi'nde yapılan trol operasyonu

#### 3.2.1. *Lagocephalus sceleratus* örneklerinin analizler için hazırlanması

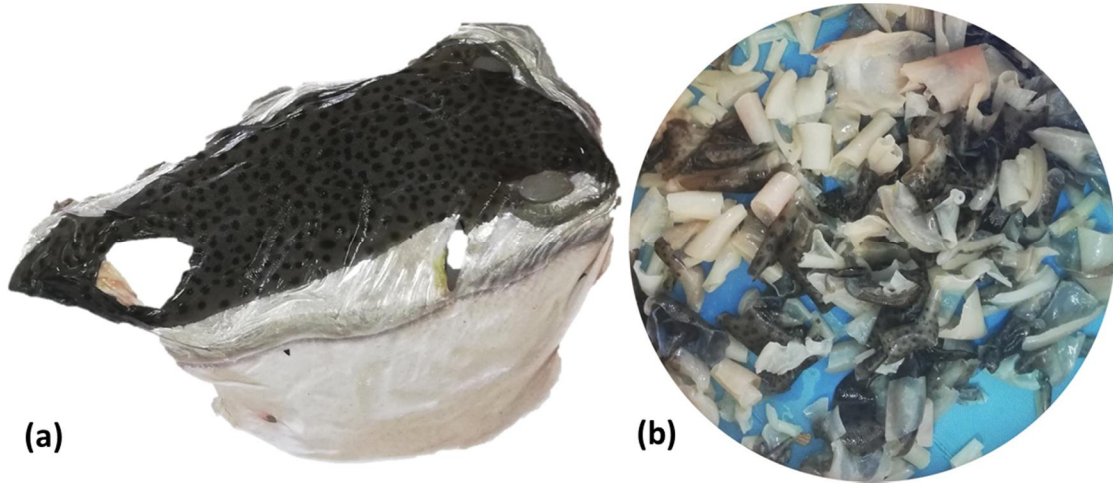
Yakalanan *L. sceleratus* örnekleri İskenderun Teknik Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Moleküler Ekoloji ve Balıkçılık Genetiği Laboratuvarına getirilerek tür tayini yapılmış, boyları ve ağırlıkları alındıktan sonra fotoğraflanarak DNA analizleri için kas dokusu örneği alınıp eppendorf tüplere koyulmuş ve tüplerin içerisine %95'lik etil alkolde eklenerek +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında örnekleme yapılan *L. sceleratus*'un kemiksi yapı olarak dişleri kullanılmış olup balon balıklarının dişlerini çıkarma işlemi için balıkların kafaları kesilerek 5 L'lik behere koyulmuş ve 100°C'de kaynatılarak dişlerin etten ayrılması sağlanmıştır. Diş üzerinde kalan et dokular saf su ile yıkanarak temizlenmiştir (Bkz. Resim 3.5). Temizlenen dişler hidroksihepatit ekstraksiyonundan önce -21°C'de muhafaza edilmek üzere derin dondurucuya kaldırılmıştır.



Resim 3.5. a: *Lagocephalus sceleratus* için yapılan diş çıkarma işlemi, b: çıkarılan dişlerin temizlenmesi, c: elde edilen *L. sceleratus* dişi

Tez çalışması kapsamında dişleri kullanılan *L. sceleratus*'un ayrıca derisi lanset yardımı ile çıkarıldı ve soğuk saf su ile yıkandı. Çıkarılan deriler neşter kullanılarak küçük parçalara (1 x 1 cm<sup>2</sup>) ayrıldı (Bkz. Resim 3.6). Hazırlanan tüm numuneler, kolajen ekstraksiyonundan önce -21°C'de muhafaza edilmek üzere derin dondurucuya kaldırılmıştır.



Resim 3.6. a: *L. sceleratus*'un çıkarılmış derisi, b: küçük parçalara ayrılan (1x1 cm<sup>2</sup>) *L. sceleratus* derisi

### 3.2.2. *Charybdis longicollis* örneklerinin analizler için hazırlanması

Tez çalışması kapsamında örnekleme yapılan *C. longicollis*'in karapaks ve kolları kullanılmıştır. Karapaks ve kolları etlerinden arındırabilmek için 5 L'lik behere koyulmuş ve 100°C'de kaynatılarak ayrıştırma sağlanmıştır. Kabuklar üzerinde kalan et dokular saf su ile yıkanarak temizlenmiştir. Temizlenen kabuklar gün ışığında kurutulmuştur (Bkz. Resim 3.7). Kurutulmuş örnekler kitin ve kitosan ekstraksiyonuna kadar -21°C'de muhafaza edilmiştir.

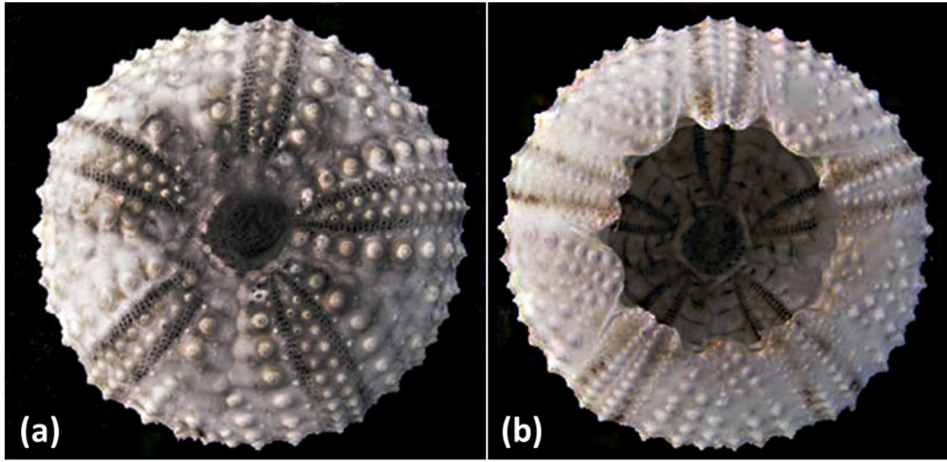


Resim 3.7. a: *C. longicollis* genel görünümü, b: kabukların ve kolların temizlenmesi, c: kurutulmuş kabuklar ve kollar



### 3.2.3. *Diadema setosum* örneklerinin analizler için hazırlanması

Tez çalışması kapsamında örnekleme yapılan *D. setosum*'un kabukları kullanılmıştır. Üzerindeki dikenler el ile temizlendikten sonra kabuk içleri saf su ile yıkanılarak organik materyalden arındırılmıştır. Saf su ile temizlenen kabuklar gün ışığında kurutulmuştur (Bkz. Resim 3.8). Kurutulan örnekler yapılacak karakterizasyon analizlerine kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.



Resim 3.8. a: Kurutulmuş *D. setosum* kabuğunun üstten görünümü b: altan görünümü

## 3.3. Yöntem

### 3.3.1. *Lagocephalus sceleratus* dişinin biyomedikal alanında hidroksiapatit olarak kullanımı

Kimyasal yapısında ana elementi kalsiyum olan kemiklerden veya biyokütleden hidroksiapatit (HA), biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere sentezlenebilir (Yücel, Sezer, Birhanlı, Ekinci, Yalman ve Depci, 2016; Boaventura, Peres, Gil, Gil, Oréface ve Luz, 2020). HA ve kalsiyum fosfat seramik malzemeleri, mükemmel biyoaktivite, osteokondüktivite ve osteoindüktiviteye sahip oldukları için implant ve kaplama materyalleri olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Best ve diğerleri, 2008; Venkatesan ve diğerleri, 2015).

Tez çalışması kapsamında örnekleme yapılan ve temizlenen *L. sceleratus* dişlerinden HA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Bu kapsamda dişler steril kaplarda %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrojen

Peroksit) solüsyonunda 0,75 ml/dk hızla karıştırılarak 1 saat bekletildi. Solüsyon süzöldükten sonra dişlerdeki yumuşak doku ve kan kalıntıları bir fırça yardımı ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu kullanılarak temizlendi. Temizlenen diş örnekleri saf su ile yıkandı ve inkübatörde 105°C'de 24 saat bekletildi. Kurutulan dişler bilyeli parçalayıcı yardımı ile öğütölerek toz haline getirildi. Elde edilen toz formdaki dişler steril plastik kaplarda %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu ile birkaç kez yıkandıktan ve süzöldükten sonra 105°C'de bir gece inkübatörde kurutularak ekstraksiyon tamamlandı (Bkz. Resim 3.9).



Resim 3.9. *Lagocephalus sceleratus* dişinden elde edilen hidroksiapatit

### Elementel kompozisyon analizi

Tez çalışmasının kapsamında elde edilen hidroksiapatitin element kompozisyonu analizleri için Endüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS, Agilent, 7500ce Modeli) kullanıldı. ICP-MS çalışma koşulları aşağıdaki gibidir: radyo frekansı (RF) (W), 1500; plazma gaz akış hızı (L dk<sup>-1</sup>), 15; yardımcı gaz akış hızı (L min<sup>-1</sup>), 1; taşıyıcı gaz akış hızı (L min<sup>-1</sup>), 1.1; püskürtme odası T (°C), 2; numune derinliği (mm), 8,6; numune giriş akış hızı (ml/min<sup>-1</sup>), 1; nebulizatör pompası (rps), 0.1; ekstraksiyon merceği (V), 1.5. Örneklerdeki elementler (Co, Cu, Zn, Fe, Mo, Ni, Se, Al, Cd, Pb, As, Cr) µg metal g<sup>-1</sup> kuru ağırlık olarak tespit edildi. Metal analizlerinin belirlenmesi için yüksek saflıkta çoklu standart (Charleston, SC 29423) kullanıldı. Kalibrasyon eğrileri için standart çözeltiler, elementlerin seyreltilmesiyle hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltiler metaller için 1-50 ppb (0.001 ila 0.050 mg/L) aralığında kurşun, kadmiyum, arsenik, nikel, alüminyum, molibden, kobalt ve krom içeriği ile bakır, demir ve eser elementler için 1-50 ppm (1 ila 50 mg/L) aralığında çinko. Analizler ICP/MS’de argon gazı kullanılarak yapılacaktır. Ölçülecek ağır metallerin ve elementlerin önce farklı konsantrasyonlarda standartları hazırlanarak daha sonra ICP-MS’de ölçülmüştür. ICP/MS analizleri Mersin Üniversitesi, İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

### Tetrodotoksin (TTX) analizi

*L. sceleratus*'dan elde edilen hidroksiapatitin TTX miktarının ölçülmesi için sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC/MS-MS) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) üniteleri birlikte çalıştırılarak yapılmıştır. Bu analiz Mersin Üniversitesi, İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. LC/MS-MS ve HPLC ünitelerinin birlikte çalıştırılarak yapı aydınlatması ve miktar tayininde kullanılan bir cihazdır. LC-MS/MS tekniğinde HPLC cihazı sayesinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan örnek moleküller kütle detektörü ile analiz edilmektedir. Küçük bileşiklerden büyük proteinlerin tayinine kadar, polar iyonik, termal kararsız ve uçucu olmayan bileşiklerin analizleri yüksek hassasiyetle ve hızlı bir şekilde yapılabilir. LC-MS/MS çok düşük konsantrasyonlarda (ng/pg) maddenin miktar tayininin yapılabilmesini mümkün kılan önemli bir analiz yöntemidir.

Tez çalışması kapsamında hidroksiapatitin TTX miktarının ölçülmesi için uygulanan prosedür şu şekildedir: TTX varlığının kontrolü için 1 g hidroksiapatit numunesi, %1 asetik asit içeren 3 ml metanol solüsyonuna ilave edildi. Daha sonra plastik kaptaki çözelti ultrasonik banyoya yerleştirildi. 15 dakika oda sıcaklığında tutulan numuneler santrifüj edildikten sonra (4500 rpm, 4°C, 20 dakika) süpernatant fazı ayrıldı ve kalıntıya tekrar %1 asetik asit içeren 3 ml metanol ilave edildi. İkinci santrifüjlemenin adımından sonra elde edilen süpernatant, daha önce ayrılan süpernatant ile birleştirildi ve nihai çözelti, 7 ml'ye tamamlandı. Nihai çözelti, karıştırıcı ile homojenleştirildi ve daha sonra 1 mL çözelti, bir vakum manifoldu yardımıyla 6 ml metanol ve 6 ml su ile koşullandırılmış bir C<sub>18</sub> kartuşundan (3 ml / 500 mg; Supelco-57012) geçirildi. Numune geçtikten sonra kartuştan 10 ml metanol geçirildi. Nihai çözelti, metanol ile 12 ml'den yapıldı ve bir karıştırıcı ile homojenleştirildi. Daha sonra buharlaştırmalı bir evaporatör kullanılarak 1 ml metanol içinde çözülen kalıntı (0.45 µ membran filtrelerle süzülükten sonra) analiz için flakonlara aktarıldı (Silva, Azevedo, Rodriguez, Alfonso, Botana ve Vasconcelos, 2012). Son olarak örneklerdeki TTX varlığı, Agilent 1200 HPLC sisteminde birleştirildi ve Agilent 6460 üçlü dört kutuplu kütle spektrometresinden oluşan LC-MS-MS sistemi ile araştırıldı.

#### X-Işını kırınım yöntemi (XRD)

X-ışını kırınımı (XRD) yöntemi, parçadaki kalıntı gerilme seviyesini belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir tahribatsız kırınım yöntemidir. XRD yöntemi sayesinde kafes düzlemleri arasında meydana gelen bu mesafe değişimleri ölçülebilmektedir (Dronavalli, 2004). Numune üzerinde seçilen bir bölge X-ışınları ile tekrarlı olarak taranmaktadır. Kristal düzlemler yüzeye nüfuz eden X ışınlarının çoğunu Bragg Kanunu'na göre kırılmaktadır. Kırılan ışının açısal konumu Bragg Kanunu kullanılarak paralel atom düzlemleri arasındaki mesafeyi hesaplamak için kullanılmaktadır. Yöntem, mikro ve makro kalıntı gerilmeleri tahribatsız olarak belirleyebilen tek yöntemdir. Milimetre seviyesinde yüksek uzaysal çözünürlüğe ve mikron seviyesinde nüfuziyet çözünürlüğüne sahiptir (Fewster, Andrew, Holý ve Barmak, 2005).

Tez çalışması kapsamında ekstrakte edilen hidroksiapatit XRD analizi ile yüksek hassasiyet ve çözünürlükte kristal yapı analizleri yapıldı. XRD desenleri, Cu Ka (40 kV, 15 mA,  $\lambda=1.54050 \text{ \AA}$ ) radyasyonlu Rigaku Miniflex 600 Difraktometre ile kaydedildi. Tarama 10 derece < 20 < 70 derece (0,01 derece ve 0,05 derecelik adımlarla ve 1 derece/dk hızında)

arasında gerçekleştirilmiştir. XRD analizleri İskenderun Teknik Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (İSTE-BTM)'nde gerçekleştirilmiştir.

#### Elastik modül (Er) ve sertlik (H) analizi

Tez çalışması kapsamında *L. sceleratus*'un dışından elde edilen hidroksiapatit nanoindenter testi ile test edilerek makro ve mikro sertlik ve esneklik durumları incelenmiştir. Nanoindenter testi kompozit dolgu malzemeleri mekanik özelliklerini belirlemek için kullanılır. Bu yöntem, numunelerin test sonrası gözlemlenmesine izin veren bir yerinde taramalı prob mikroskobu (SPM) görüntüleme tesisi içerir. Prob, aynı parçanın farklı araçlarla algılanması veya SEM ve nanoindenter gibi iki ayrı aracı bir araya getirerek karmaşık durumu ortadan kaldırarak girinti ve görüntü için kullanılır (Bischel, Vanlandingham, Eduljee, Gillespie ve Schultz, 2000; Constantinides, Kalcioglu, McFarland, Smith ve Van Vliet, 2003; Mondal, Shah ve Marks, 2007). Elde edilen HA için test ünitelerinde kompozit dolgu maddesi olarak Alpha-Dent® Self Cure Hibrit Kompozit Kitleri kullanılmış ve analizler için yedi adet numune seti oluşturulmuştur. Nanoindenter testi Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Teknoloji ve Araştırma Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

#### Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), katı numunelerin yüzeyinde çeşitli sinyaller üretmek için yüksek enerjili elektronlardan oluşan odaklanmış bir kiriş demeti kullanır. Elektron-numune etkileşimlerinden elde edilen sinyaller, dış morfoloji (doku), kimyasal bileşim ve numuneyi oluşturan kristal yapı ve oryantasyon da dahil olmak üzere numune hakkında bilgi edinilmesini sağlamaktadır.

Tez çalışma kapsamında elde edilen hidroksiapatit örnekleri yüzeylerinde birden fazla alan seçilmiş ve bu seçilen bir alanlar üzerinden veriler toplanmıştır ve bu özelliklerde mekânsal varyasyonları gösteren 2 boyutlu bir görüntü oluşturulmuştur. Genişliği yaklaşık 1 cm ile 5 mikron, 20X ile 30.000X aralığında büyütme ve 50 ile 100 nm'lik mekânsal çözünürlük ayarları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında örnekleme yapılan ve toz haline getirilen ürünlerin SEM ile yüzey görüntüleme analizi yapılmıştır.



SEM analizleri Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Teknoloji ve Araştırma Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

#### L. sceleratus derisinden kolajen/jelatin ekstraksiyonu

Küçük parçalara ayrılan *L. sceleratus* derisinden kolajen ve jelatin ekstraksiyonu için Nagai ve Suzuki, (2000) ile Li ve diğerleri (2013)' nin yayınladığı Asitte Çözünür Kolajen (ASC) yöntemi ufak modifikasyonlarla kullanılarak ekstrakte edildi. Proteinleri uzaklaştırmak için deriye gr başına 4 ml olacak şekilde 0,1 M NaOH eklendi ve karıştırıcıda 24 saat +4°C'de muamele edildi. Sürenin sonunda karışım süzüldü ve işlem tekrarlandı. İşlem tamamlandıktan sonra deriler süzüldü ve pH nötr olana kadar saf su ile yıkandı. Deride bulunan yağları ve yağlı mineraller uzaklaştırmak için 1 L %10'luk n-butanol çözeltisi ile +4°C'de 24 saat karıştırıldı ve sürenin sonunda süzüldü. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Temizleme aşamasında sonra deriler 1 L 0,5 M 1:10 oranındaki Asetik Asit ile +4°C'de 24 saat muamele edildi. Karışım süzüldü ve süzülen sıvı ayrı bir beherde biriktirildi. İşlem bir kez daha tekrarlandı ve iki sıvı birleştirildi. Elde edilen sıvı 2,6 M'lik NaCl'ile çöktürüldü ve 15000 rpm'de santrafüj edildi. Kolajen çökeltisi az miktarda 0,5 M asetik asit içerisinde çözdürüldü ve tuzların uzaklaştırılması için diyaliz işlemine tabi tutuldu.

#### Nem, protein içerikleri ve aminoasit analizleri

Tüm kolajen örneklerinin nem, kül, yağ, protein içerikleri ve aminoasit analizleri Antoine, Wei, Littell ve Marshall (1999)'ne göre belirlendi. Analizde HPLC kolonu, bir koruma kolonu olmadan kullanıldı. 5 µL akış hücresi ile donatılmış bir Spectroflow 980 programlanabilir floresan detektörü, 330 nm'de bir eksitasyon monokromatör ayarı ve 418 nm'lik bir emisyon kesme filtresi ile kullanıldı. Diğer detektör ayarları için, 0,1 PMT sinyali, %10 sıfır ofseti, 1,0 s tepki (yükselme süresi birimleri) ve 10<sup>-3</sup> A tam ölçekli çıkış aralığıdır. Veri analizi, SAS genel doğrusal modeller prosedürü kullanıldı.

#### SDS-PAGE analizi

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), 10 KD'den küçük olmayan bağıl moleküler kütleye sahip proteinleri ayırmak için kullanılır. *L. sceleratus* derisinden elde edilen kolajenin karakterizasyonu için Laemmli'nin (1970) SDS yöntemi

modifiye edilerek kullanıldı. Elektroforetik modeller, %10 ayırıcı jel ve %5 sıralama jeli kullanılarak ölçülmüştür. %10'luk jel için (toplam 5 ml): 2 ml ddH<sub>2</sub>O, 1,67 ml 30% Akrilamid, 1,25 ml 1,5 M Tris (pH 8.8), 25 µl 20 % SDS, 25 µl 10% Amonyum Per sülfat ve 2.5 µl TEMED eklendi. Polimerizasyonu önlemek için TEMED ekledikten hızlı bir şekilde iyice karıştırıldı ve jel solüsyonunu 1 ml pipet kullanarak cam plakalar arasındaki döküm haznesine aktarıldı. %10'luk polimeriz jel polimerize olduktan sonra %5 yükleme jeli hazırlandı. Sıralama jeli için (toplam 3 ml): 2,088 ml ddH<sub>2</sub>O, 0,506 ml 30% Akrilamid, 0,375 ml 1 M Tris (pH 6.8), 15 µl 20 % SDS, 15 µl 10 % Amonyum Persülfat ve 1,5 µl TEMED içerir. Cam plakalar arası saf su ile temizlenip tamamen kurutulduktan sonra jele 1,5 µl TEMED eklendi. Hızlı bir şekilde karıştırıldıktan sonra 1 ml pipet kullanarak cam plakalar arasındaki döküm haznesine aktarıldı ve tarak yerleştirildi. Jel hazırlandıktan sonra yükleme tamponu hazırlandı. Yükleme tamponu için: 1000 ml saf suyun içine, 30 gr Tris 144 gr glisin ve 10 gr SDS karıştırıcı yardımıyla çözdürüldü. Proteinlerin moleküler ağırlığını tahmin etmek için yüksek moleküler ağırlıklı protein işaretleyicisi olarak dana derisinden elde edilen tip I kolajen (CSC) (Sigma Aldrich) kullanıldı. Diğer kuyulara örnekler yüklendi ve 30 dk 30 mA'da yürütüldü. SDS-PAGE elektroforezi bittikten sonra jel cam plakalardan dikkatlice çıkarıldı ve saf su ile yıkandı. Daha sonra jel gümüş nitrat ile boyandı.

#### Tetrodotoksin (TTX) durumu

TTX ekstraksiyonu, küçük bir değişiklikle Yotsu ve diğerleri (1987) yöntemine göre yapıldı. Buharlaştırma işlemi, bir buharlaştırıcı kullanılarak gerçekleştirildi ve 1 ml metanol içinde çözülen tortu, analiz için şişelere aktarıldı. Bir Agilent 1200 HPLC sistemine bağlı bir Agilent 6460 üçlü dört kutuplu kütle spektrometresinden oluşan LC-MS-MS sistemi kullanıldı. Veriler varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuş ve Duncan'ın Çoklu Aralık Testi (Steel ve Torrie, 1980) kullanılarak ortalama karşılaştırmalar yapılmıştır. İkili karşılaştırma için T-testi kullanıldı. İstatistiksel analiz, Statistical Package for Social Sciences SPSS (Pallant, 2010) kullanılarak yapıldı.

### 3.3.2. Balon balığı dişlerinin çevresel indikatör olarak kullanımı

Tez çalışması kapsamında örnekleme yapılan balon balıkları *Lagocephalus sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis* ve *Torquigener flavimaculosus* örneklerinden diş, kas, beyin, karaciğer ve solungaç dokusu örnekleri alınarak karşılaştırmalı olarak ağır metal birikimi analizi yapılmıştır (Bkz. Resim 3.10).



Resim 3.10. Ağır metal birikimi analizi için örnekleme yapılan balon balığı türleri (a: *Lagocephalus sceleratus*, b: *L. suezensis*, c: *L. spadiceus*, d: *Torquigener flavimaculosus*)

#### Örneklerin hazırlanması

Metal analizi için kullanılan yumuşak dokular (kas, solungaç, karaciğer ve beyin) (0.05 g kuru ağırlık) sabit ağırlığa ulaşmak için 105 °C'de kurutuldu ve daha sonra nitrik asit (1 ml, Merck) ve perklorik asit (0,5 ml, Merck) ile çözülene kadar 150°C'ye ayarlanmış bir sıcak plaka üzerinde konsantre edildi.

Dişler steril plastik kaplarda %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu ile 1 saat yıkandı ve daha sonra yumuşak dokular ve kan dokusu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu kullanılarak temizlendi. Oda sıcaklığında kurutulan dişler bilyeli öğütücü yardımı ile toz haline getirildi. Toz haline getirilen dişler, steril plastik kaplarda %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu ile birkaç kez yıkandıktan sonra süzüldü. Toz haline getirilmiş dişler tartıldı (0.08 ila 0.10 g) ve plastik bir kaşık kullanılarak cam tüplere yerleştirildi. Daha sonra numunelere HCl (2 ml, Merck, Hidroklorik asit dumanlı %37), HNO<sub>3</sub> (6 ml, Merck, Nitrik asit %65) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 ml, Merck, Hidrojen peroksit %30) ilave edildi ve tüm dokular çözülene kadar 150°C'ye ayarlanmış sıcak plaka üzerinde bekletildi.

#### Ağır metal birikimi analizi

Hazırlanan yumuşak dokuların (kas, solungaç, karaciğer ve beyin) ve dişlerin ağır metal birikimi analizleri için Endüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) kullanıldı. Analiz kapsamında ICP-MS'in çalışma koşulları şu şekildedir: radyo frekansı (RF) (W), 1500; plazma gaz akış hızı (L dk<sup>-1</sup>), 15; yardımcı gaz akış hızı (L min<sup>-1</sup>), 1; taşıyıcı gaz akış hızı (L min<sup>-1</sup>), 1,1; püskürtme odası T (°C), 2; numune derinliği (mm), 8,6; numune giriş akış hızı (ml min<sup>-1</sup>), 1; nebulizatör pompası (rps), 0,1; ekstraksiyon merceği (V), 1,5. Örneklerdeki elementler metal g<sup>-1</sup> kuru ağırlık olarak tespit edildi. Metal analizlerinin belirlenmesi için Yüksek Safılıkta Çoklu Standart kullanıldı. Kalibrasyon eğrileri için standart çözeltiler, elementlerin seyreltilmesiyle hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltiler metaller için 1-50 ppb (0.001 ila 0.050 mg/L) aralığında kurşun, kadmiyum, arsenik, nikel, alüminyum, molibden, kobalt ve krom içeriği ile bakır, demir ve eser elementler için 1-50 ppm (1 ila 50 mg/L) aralığında çinko kullanıldı. Analizler argon gazı kullanılarak yapılmıştır. Ölçülecek ağır metallerin ve elementlerin önce farklı konsantrasyonlarda standartları hazırlanarak daha sonra ICP-MS'de ölçülmüştür. ICP/MS analizleri Mersin Üniversitesi, İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır.

### **3.3.3. DNA dizileme yöntemi kullanılarak balon balığı türlerinin doğrulanması ve izlenmesi**

#### Örneklerin hazırlanması

Tez çalışması kapsamında yapılan arazi çalışmalarında *L. sceleratus*, *Torquigener flavimaculosus* ve *Sphoeroides pachygaster* türlerinin kas, yüzgeç, deri ve kemik doku

örnekleri alınmış ve etiketlenerek vida kapaklı tüpler içerisinde %95'lik ethanolde +4 °C'de muhafaza edilmek üzere buzdolabında saklanmıştır.

### mtDNA ekstraksiyonu

mtDNA'nın elde edilmesinde Blin ve Stafford (1976) tarafından verilen standart fenol kloroform yöntemi ufak değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Örneklerden elde edilen dokulardan yaklaşık 50 mg alınarak eppendorf tüplere aktarılmış ve üzerlerine sırasıyla 300 µl CTAB, 50 µl Proteinase K ve 30 µl RNase ilave edilip sterilize edilmiş cam çubuklar yardımıyla homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler vortexlenerek 37,5°C'ye ayarlanan inkübatörde 24 saat bekletilmiştir. İnkübatörden çıkarılan örnekler vortekslenildikten sonra örneklerin üzerine 380 µl fenol kloroform isoamil alkol (25:24:1) eklendi ve 49 rpm'de 15 dakika boyunca dikey karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra örnekler santrifüje alınarak 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan örneklerin üst katmanları alınarak yeni eppendorf tüplere aktarıldı ve örneklerin üzerlerine 380 µl kloroform isoamil alkol (24:1) ilave edilerek 49 rpm'de 15 dakika boyunca dikey karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra örnekler santrifüje alınarak 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan örneklerin üst katmanları alınarak yeni eppendorf tüplere aktarıldı ve örneklerin üzerlerine 1000 µl soğuk ethanol (%100) eklenip -21°C'de 24 saat bekletildi. Derin dondurucudan çıkarılan örnekler 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra tüplerin içerisinde oluşan peletlere dikkat edilerek içerindeki ethanol (%100) boşaltıldı ve peletlerin üzerine 1000 µl soğuk etanol (%70) eklenerek 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra eppendorf tüplerdeki ethanol boşaltılmış ve oluşan peletleri kurunması için desikatörde yaklaşık 1 saat vakumlanarak kurutuldu. Kuruyan peletlerin üzerine 100 µl ultra saf su eklenerek ekstraksiyon tamamlandı.

### DNA'nın kalite tayini

DNA örneklerinin kalitesinin tespiti %0,7'lik agaroz jelde gözlemlendi. Bunun için 0,175 g agaroz, 50 ml 1x TBE ile karıştırılıp mikrodalga fırında saydamlaşana kadar bekletildi. Saydamlaşan jel üzerine 1,5 µl Ethidium Bromür eklenerek soğutulan jel elektroforez küveti içerisine dökülerek soğumaya bırakıldı. Jel soğuduktan sonra, içerisinde seyreltilmiş 1x TBE tamponu bulunan elektroforez tankına koyuldu ve 6 µl DNA örneğine 4 µl'lik yükleme tamponu çözeltisi karıştırılarak sırasıyla jeldeki kuyulara yerleştirildi. Elektrik akımının

gerçekleşmesi için, güç kaynağı 20 dk süre ile 50 mA'ya ayarlanmıştır. Elektroforetik göç tamamlandıktan sonra jel elektroforez tankından dikkatlice alınmış ve UV görüntüleme cihazında görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

### Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Türlerin kas, yüzgeç, deri ve kemik dokularından edilen mtDNA'nın biyometaryellerin genetik farklılığın derecesini belirlemek amacıyla mitokondriyal DNA (mtDNA) sitokrom b (Cyt b) gen bölgesi kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonundan sonra aşağıdaki universal primerler kullanarak PCR Metodu ile mtDNA Cyt B genleri çoğaltılmıştır (Saiki ve diğerleri, 1988).

**FishCytB-F:** 5'-CGA ACG TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT-3'

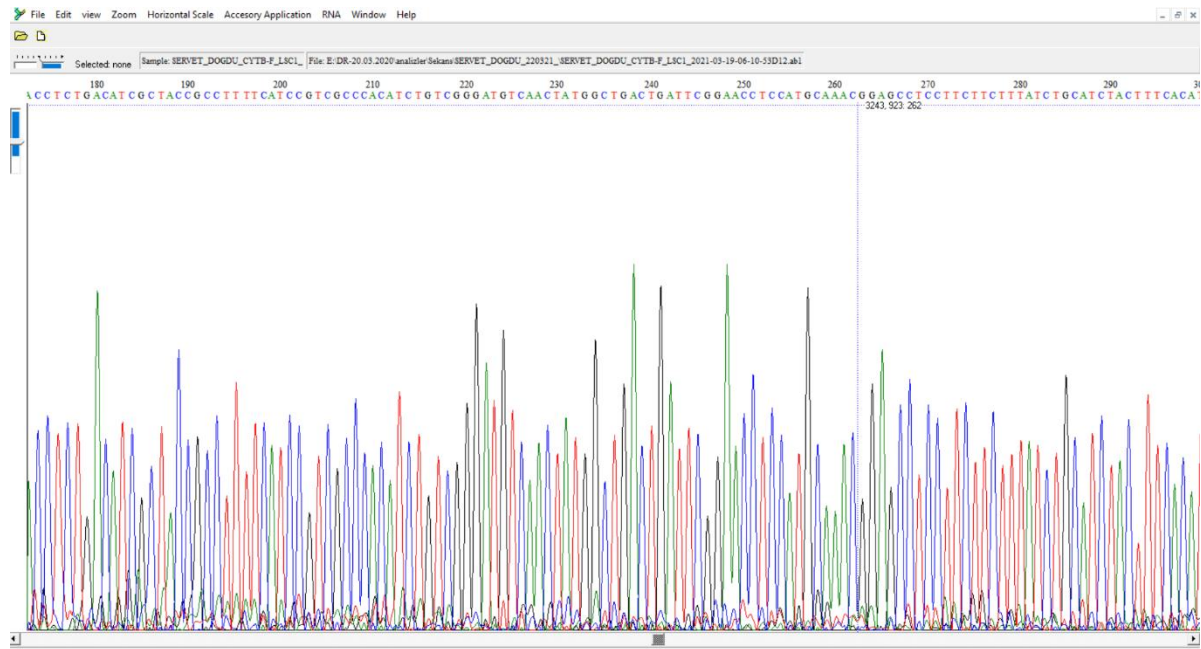
**FishCytB-R:** 5'-AAA CTG CAG CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC-3'

PZR protokolünde; 94°C'de 5 dakika denatürasyon (1 döngü) ve bunu takiben 94°C'de 1 dakika strand DNA denatürasyonu, 50°C'de 1 dakika primer bağlanma sıcaklığı, 72°C'de 1.5 28 dakika ilk uzama (40 döngü) ve 72°C'de 5 dakika (1 döngü) son uzama safhası izlenmiştir. PCR ürünleri 1.5 %'lik agaroz jel üzerinde kontrol edilmiştir.

### DNA dizi analizi (Sekans Analizi)

Genom sekansının belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntem Sanger-Coulson zincir sonlama metodudur. Bu yöntem tek seferde dizi analizi yapılamayacak kadar çok büyük olan DNA' lar önce küçük parçalara bölünür. Elde edilen her bir parça plazmite klonlanır. Klonlanan plazmitler tek tek dizilenir. Bu dizilerin biyoinformatik analizlerle bir araya getirilmesiyle uzun DNA parçasının dizisi elde edilir. Bu diziler kapiller jel elektroforezi kullanılarak okunur. Dizi analiz yönteminin hassasiyeti ve verdiği güvenilir sonuçlar bu yöntemin kullanımını oldukça yaygınlaştırmıştır. Artan analiz sayısı, uzun zaman ve yüksek iş gücü gerektirir. Bu gelişmeler sonucunda otomasyon kaçınılmaz olmuş ve otomatik DNA dizi analizleri uygulamaları yaygınlaşmıştır. Otomatik analizde de Sanger' in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği

elektroforez sistemi içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışığı kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA' nın bulunduğu jelmatris, monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA' ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır (Bkz. Şekil 3.14). DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (Sambrook, Fritsch ve Maniatis, 1989).



Resim 3.11. DNA dizi analizi sonucu elde edilen Cyt B gen bölgesinin parça kromotografisinden bir örnek

### Verilerin işlenmesi

Genetik verilerin analizlerde sekans dizelerinin karşılaştırılması için BioEdit, DNAsp ve MEGA X bilgisayar paket programları kullanılmıştır (Hall, Biosciences ve Carlsbad, 2011; Rozas ve diğerleri, 2017: Kumar, Stecher, Li, Knyaz ve Tamura, 2018).

### 3.3.4. *Charybdis longicollis*'in biyomedikal alanında kullanımı

#### Kitin ve kitosan ekstraksiyonu

Kurutulan ve -21°C'de muhafaza edilen *C. longicollis* örnekleri kas dokudan arındırılması için hafif tuzlu suda yıkandı. Yıkanan ve oda sıcaklığında kurutulmuş örnekler bilyeli parçalayıcı ile toz haline getirildi ve kitin ekstraksiyonu için 6 saat boyunca oda sıcaklığında 1,7 m HCl ile muamele edildi. Daha sonra 75°C'de 2,5 m NaOH ile karıştırıldı. Pigmentlerin ayrıştırılması için % 1'lik potasyum permanganat kullanıldı. Kitosan ekstraksiyonu için elde edilen kitin 121°C'de % 50NaOH ile 1 saat muamele edildi (Bkz. Şekil 3.5)



Şekil 3.4. Kitin ve Kitosan Ekstraksiyonunun Şematik Gösterimi

#### Verim analizi

Elde edilen kitin ve kitosanın verim analizi Bölgen ve diğerleri (2016)'nın verdiği formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Kitin Verimi (\%)} = [ \text{Elde Edilen Kitin (g)} / \text{Yengeç Kabuğu Ağırlığı (g)} ] * 100$$

$$\text{Kitosan Verimi (\%)} = [ \text{Elde Edilen Kitosan (g)} / \text{Elde Edilen Kitin (g)} ] * 100$$

#### Kül analizi

Elde edilen kitin içeriğindeki mineral miktarı gravimetrik olarak hesaplanmıştır. 1 g örnek porselen kroze içinde kül fırınına koyulmuş ve sıcaklık kademeli olarak artırılarak kül rengi



beyaza dönene kadar yakılmıştır (650°C). Porselenler soğutulduktan sonra ağırlıkları belirlenmiştir. İçerdiği mineral miktarının %'lik dilimi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Mineral Madde (\%)} = (M_2/M_1) * 100$$

M<sub>1</sub>: İlk Madde Miktarı, g

M<sub>2</sub>: Yanma sonucu oluşan kül miktarı, g

#### Su tutma kapasitesi analizi

Su tutma kapasitesi Bölgen ve diğerleri (2016)'nın aşağıda verdiği formüle göre hesaplanmıştır. Elde edilen kitosandan 1 g alınıp 100 ml saf su eklenerek yaklaşık 30 dk vortekslendikten sonra 5000 rpm'de 1 saat santrifüjlenmiştir.

$$\text{Su Tutma kapasitesi (\%)} = [ \text{Eklenen Su (g)} / \text{Kitin Ağırlığı (g)} ] * 100$$

#### Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Kitin ve kitosanın deasetilasyon derecesini belirlemek için FT-IR analizi yapıldı. Analizler doğrudan *C. longicollis*'den elde edilen kitin ve kitosan üzerinde gerçekleştirildi. Örnekler potasyum bromür peletlerinde %5 konsantrasyonunda hazırlandı. Örnekler, kristal hücreye yerleştirildi ve hücre FTIR spektrometresinin montajına sıkıştırıldı ve of 500–4500 cm<sup>-1</sup> spektrum dalga boyu aralığında tarandı.

#### X-ışını kırınım yöntemi (XRD) analizi

Tez çalışması kapsamında *C. longicollis*'den elde edilen kitin ve kitosanın yüksek hassasiyet ve çözünürlükte kristal yapı analizleri XRD ile yapıldı. XRD desenleri, Cu Ka (40 kV, 15 mA, λ=1,54050 Å) radyasyonlu Rigaku Miniflex 600 Difraktometre ile kaydedildi. Tarama 10 derece < 2θ < 70 derece (0,01 derece ve 0,05 derecelik adımlarla ve 1 derece/dk hızında) arasında gerçekleştirilmiştir. XRD analizleri İskenderun Teknik Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (İSTE-BTM)'nde gerçekleştirilmiştir.

### 3.3.5. *Diadema setosum* 'un biyomedikal alanında kullanımı

#### Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi, kızıl ötesi radyasyonun soğurma ile kimyasal bileşenlerin frekanslarının ölçülmesi ilkesine dayanır. FTIR analizi ile kimyasal bağların frekanslarındaki değişim ve soğurma özellikleri piklerin oluşmasını sağlar. Analizler doğrudan *D. setosum*'un toz haline getirilmiş kabuğun üzerinde gerçekleştirildi. Örnekler potasyum bromür peletlerinde %5 konsantrasyonunda hazırlandı. Örnekler, kristal hücreye yerleştirildi ve hücre FTIR spektrometresinin montajına sıkıştırıldı ve 400–4000 cm<sup>-1</sup> spektrum dalga boyu aralığında tarandı.

#### X-Işını Kırınım (XRD) Analizi

Tez çalışması kapsamında *D. setosum* 'un toz haline getirilen kabuklarının XRD analizi ile yapısı belirlendi. XRD desenleri, Cu Ka (40 kV, 15 mA,  $\lambda=1,54050 \text{ \AA}$ ) radyasyonlu Rigaku Miniflex 600 Difraktometre ile kaydedildi. Tarama 10 derece < 20 < 70 derece (0,01 derece ve 0,05 derecelik adımlarla ve 1 derece/dk hızında) arasında gerçekleştirilmiştir. XRD analizleri İskenderun Teknik Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (İSTE-BTM)'nde gerçekleştirilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Balon Balıklarının Biyomedikal Alanında Kullanımı

#### 4.1.1. *Lagocephalus sceleratus* dişinin biyomedikal alanında hidroksiapatit (HA) olarak kullanımı

##### Elementel kompozisyon analizi

Tez çalışması kapsamında *L. sceleratus* dişlerinden hidroksiapatit (HA) ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen HA'nın element kompozisyonunu belirlemek için sekiz örnek üzerinde ICP-MS analizi gerçekleştirildi. Örneklerden elde edilen elementel analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *L. scelaratus*'dan elde edilen HA örneklerinin elementel kompozisyonu ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dw).

Elementler	1	2	3	4	5	6	7	8
Na	5032,63	4994,90	5032,63	4992,51	5200,32	4799,01	5134,45	5411,15
Mg	2686,68	2644,93	2555,31	2711,27	2699,88	2645,76	2744,41	2519,55
P	85193,21	86141,47	81883,88	90045,75	83756,03	80457,99	89454,77	88341,43
K	1334,20	1373,09	1222,73	1423,23	1385,58	1300,99	1342,76	1338,35
Ca	112118,79	114054,09	113444,43	113763,11	113420,46	114111,23	113138,03	114000,34
Ti	832,89	841,88	829,04	844,87	828,75	877,35	827,77	849,55
V	4,24	3,48	4,00	3,88	4,21	3,89	4,66	3,77
Cr	10,45	10,99	10,55	11,34	10,77	10,89	10,04	11,12
Mn	15,99	16,70	16,99	17,06	16,99	15,70	15,91	16,00
Fe	75,71	66,57	77,81	67,47	70,11	68,46	74,41	70,77
Co	1,04	0,86	1,04	1,16	1,14	0,99	1,24	0,97
Ni	6,44	5,63	6,33	5,78	6,89	5,33	6,55	5,91
Cu	1,82	2,26	1,99	2,07	1,92	2,39	1,99	2,37
Zn	178,85	173,37	180,36	177,99	176,76	171,45	172,51	172,57
As	21,30	20,72	21,41	20,45	21,22	20,99	21,00	20,78

Analiz edilen HA örneklerinin elementel kompozisyonu ve metal oranları birbirine çok yakındı. Ortalama olarak HA'nın ana yapısı %52 kalsiyum ve %39 fosfat, %2,5 manganez, %1,5 magnezyum, %1 titanyum, %0,8 vanadyum ve %3,2 diğer elementlerden oluşmaktadır. Elde edilen HA'nın Ca/P oranı 1,32 olarak tespit edilmiştir.

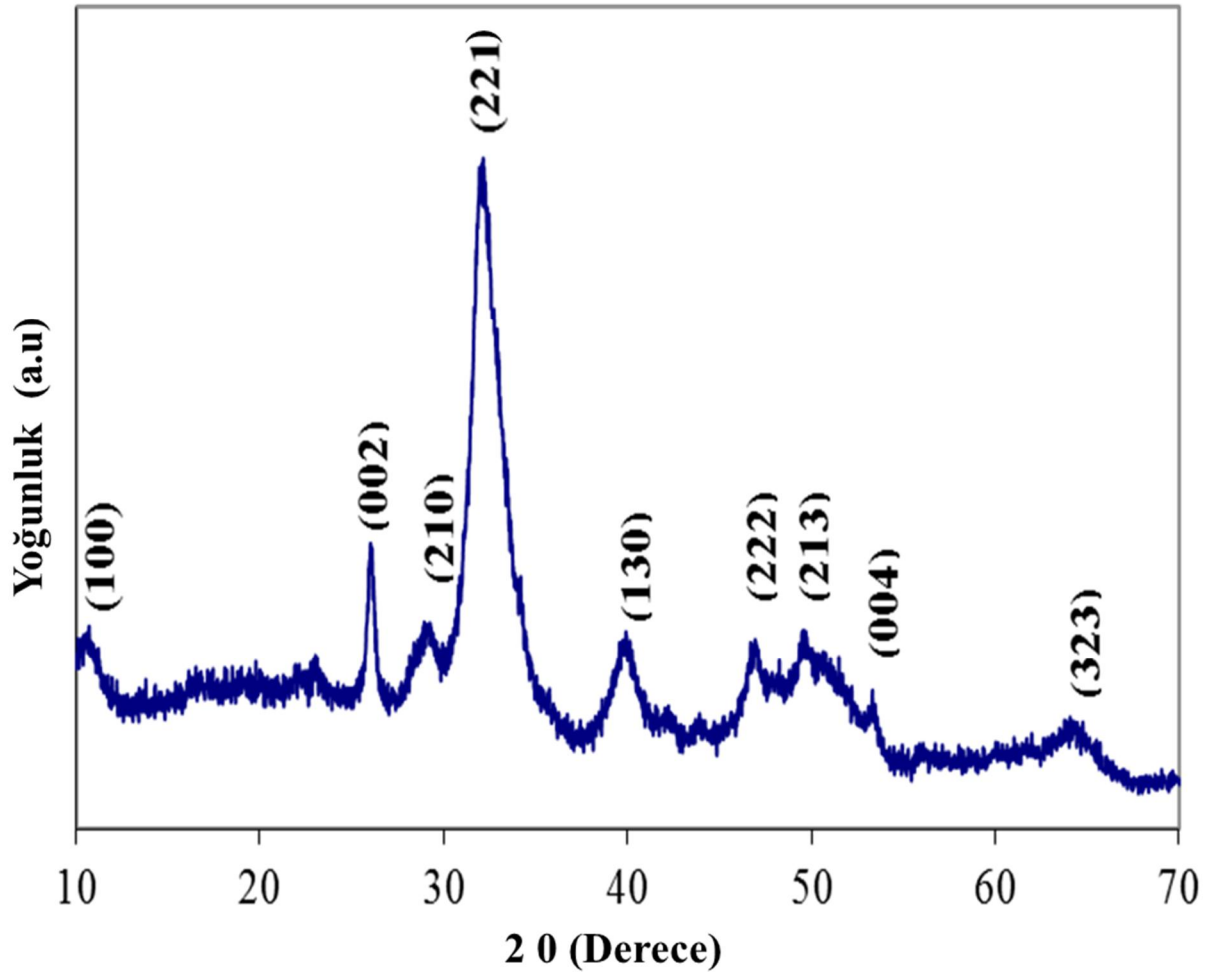
Ekstrakte edilen HA'nın yapısında bulunan elementlerin nano yapısı, genellikle osteoblast fonksiyonlarının artmasına neden olan iyi biyoaktivite ve osteokondüktivite ile ilişkilidir. Biyolojik apatitlerin insan hücre adezyonun metabolizmaya katkılarından dolayı önemli olan Na, Mg, K ve Sr elementler elde edilen HA'da yüksek seviyelerde tespit edildi.

#### Tetrodotoksin (TTX) analizi

Çalışma kapsamında *L. sceleratus* dişinden elde edilen HA'nın TTX miktarının ölçülmesi için LC/MS-MS ve HPLC üniteleri birlikte çalıştırılarak analiz edilmiştir. Mersin Üniversitesi, İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirilen bu analiz sonucunda ekstrakte edilen HA ürünlerinde, tespit edilebilen minimum miktar olan 0,1 µg/mg daha düşük TTX içerdiği saptanmıştır.

#### X-ışını kırınım yöntemi (XRD) analizi

İskenderun Teknik Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (İSTE-BTM)'nde gerçekleştirilen XRD analizi sonucuna göre tez çalışması kapsamında elde edilen HA'nın tüm yoğun yansımalarının  $Ca_5(PO_4)_3(OH)$  kimyasal formülüne sahip hidroksiapatiti gösterdiği tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.1).



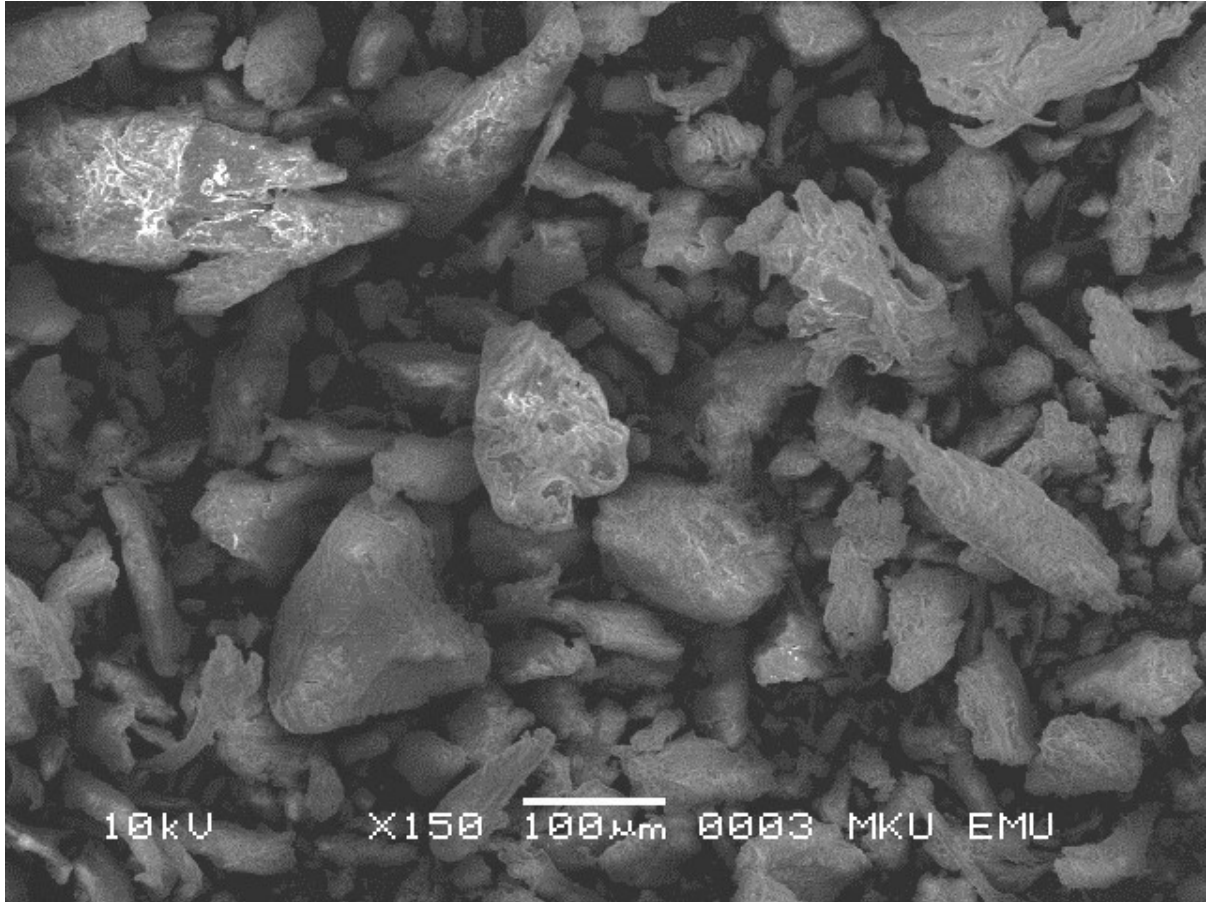
Şekil 4.1. *L. sceleratus* dişlerinden elde edilen HA'nın X-ışını kırınım desenleri

Elde edilen HA'nın XRD kırınım desenleri ICDD Kart No: 01-089-4405 olan verilerle mükemmel bir şekilde eşleşti. HA'nın hücre parametreleri şu şekilde bulundu:  $a = 9,451(1)$ ,  $b = 18,823(1)$  ve  $c = 6,926(2)$ , bunlar ICDD kartına verilen örneğe çok yakındır. XRD sonuçları, *L. sceleratus*'dan elde edilen HA'nın insan dişleriyle uyumlu olduğunu göstermiştir. XRD modellerinde görülen geniş yapı, organik bir matris ile biyolojik olarak mineralize edilmiş düşük kristalli hidroksiapatiti göstermektedir. Hidroksiapatitin ana bileşimi kalsiyum ve fosfattır. XRD analizi sonuçları, element analizinin sonuçlarını desteklemektedir.

#### Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Tez çalışma kapsamında elde edilen hidroksiapatit örnekleri yüzeylerinde yapılan SEM analizi sonucunda oval ve plaka şeklinde parçacıklar gözlemlendi (Bkz. Resim 4.1). Balon

balığı dişlerinin başlangıçta sarı olması yapısındaki kolajen ve diğer organik parçaların varlığını göstermektedir. Dişlerden ekstrakte edilen HA'nın beyaz renge dönüşmesi diş yapısındaki kolajen ve diğer organik kısımların kesin olarak dışlandığını gösterir.



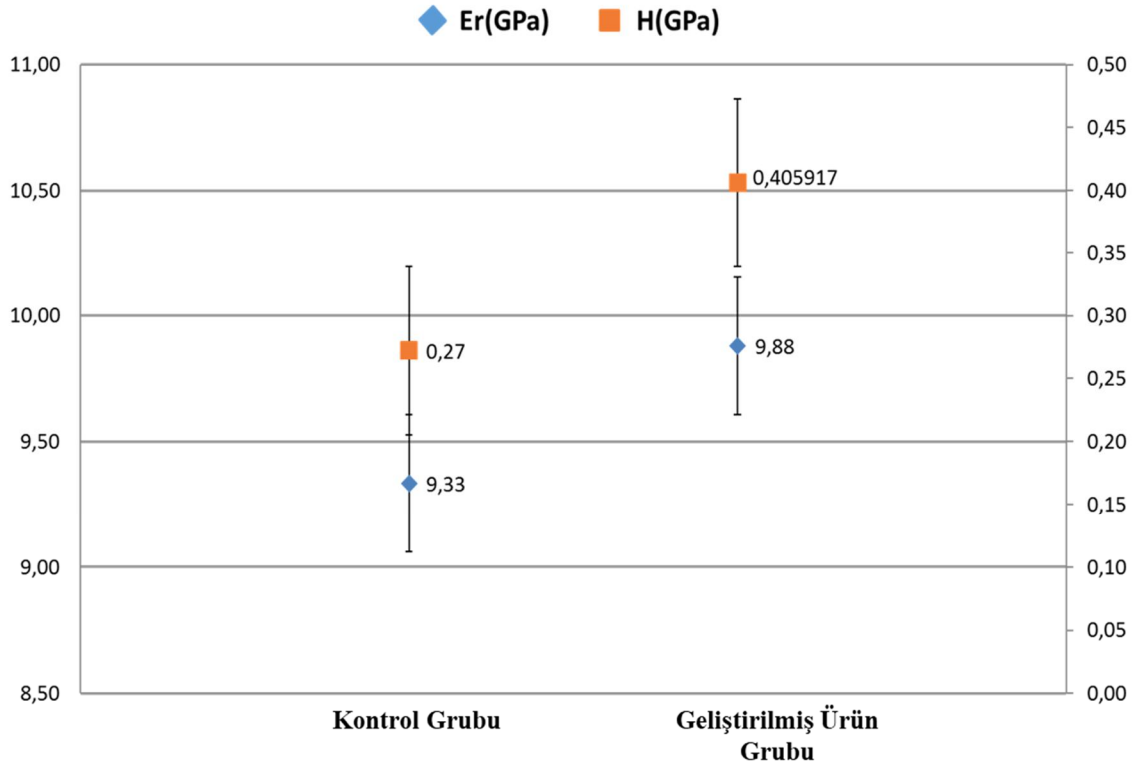
Resim 4.1. *L. sceleratus*'tan elde edilen HA'nın 150X büyütülmüş SEM görüntüsü

Kristallerin boyutu ve morfolojik yapısı HA'nın biyomekanik işleyişinde önemli bir rol oynamaktadır. Çünkü HA kristallerinin içindeki oryantasyonu dişlerin yüksek sertliğini desteklemektedir. Elde edilen HA'nın şekli, iyi biyoaktivite ve esneklik gibi önemli özellikler sağlayabildiğini göstermektedir.

#### Elastik modül (Er) ve sertlik (H) analizi

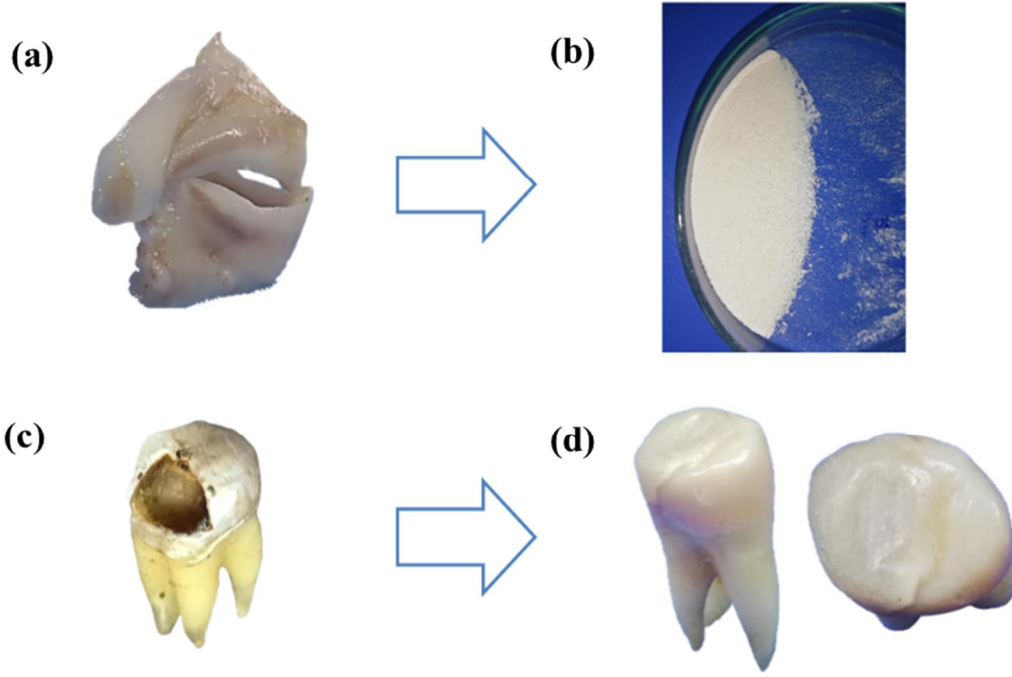
Elde edilen HA'nın makro ve mikro sertlik ve esneklik durumları Nanoindenter testi Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Teknoloji ve Araştırma Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Alpha-Dent® Self Cure Hibrit Kompozit kitleri ile *L. sceleratus*'dan ekstrakte edilen HA'nın birleşimiyle 7 grup oluşturulmuş ve toplam 14

numune hazırlanmıştır. Bunların 7'si kontrol grubu, 7'si geliştirilen ürün grubudur. Tüm numunelere 50 N yük altında toplam 5 girinti uygulanmıştır. Kontrol numunelerinin elastik modül (Er) ve sertlik testi (H) ortalama değerleri sırasıyla 9,33 ve 0,27 olarak bulunmuştur. Geliştirilmiş ürün grupları için ortalama Er ve H değerleri sırasıyla 9,88 ve 0,40 olarak tespit edilmiştir (Bkz.Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Geliştirilmiş ürün grubu ve kontrol grubunun elastik modül (Er) ve sertlik testi (H) sonuçları

Alpha-Dent® Self Cure Hibrit Kompozit kitleri ile *L. sceleratus*'dan ekstrakte edilen HA'nın birleşimiyle geliştirilen kompozit dolgu maddesi insan dişine uygulanmış ve daha iyi bir kompozit dolgu oluşturulmuştur (Bkz. Resim 4.2). Elde edilen sonuçlarda balon balığı dişinden elde edilen HA ile geliştirilen kompozit dolgunun diş dolgusunda kullanılan standart kompozit dolgudan daha sert ve elastik olduğu sonucuna varılmıştır. Herhangi bir insan kullanımından önce yapılması zorunlu olan testler yapıldıktan sonra *L. sceleratus* dişinden elde edilen HA, dolgu, implant, kemik tozu ve protez üretimi için doğal, orijinal ve alternatif bir ürün kaynağı sunmaktadır.



Resim 4.2. a) *Lagocephalus sceleratus* dişlerin görünümü, b) toz haline getirilmiş diş, c) çürük insan azı dişleri, d) balon balığı diş tozu ile dolgu yapılmış insan azı dişi

#### 4.1.2. *L. sceleratus* derisinden kolajen ve jelatin ekstraksiyonu

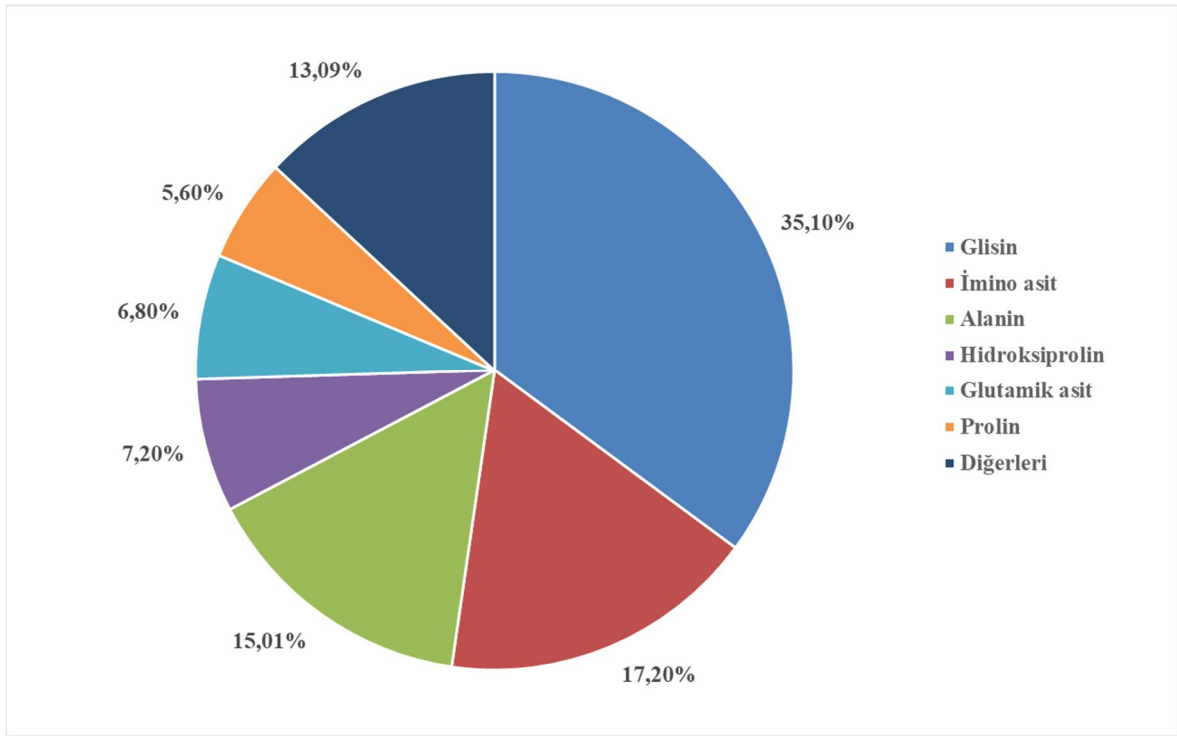
Parçalara ayrılarak (1x1 cm<sup>2</sup>) kolajen ve jelatin ekstraksiyonuna hazırlanan *L. sceleratus* derisi Asitte Çözünür Kolajen (ASC) yöntemi ufak modifikasyonlarla kullanılarak ekstrakte edildi. Gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda *L. sceleratus* derisinden elde edilen kolajen oranı %50,9, jelatin miktarı ise %20,63 olarak bulunmuştur.

#### Nem, protein içerikleri ve aminoasit analizleri

Çalışma kapsamında nem, protein içerikleri ve aminoasit analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kolajenin nem içeriği %75,1, protein içeriği %2,45 olarak tespit edilmiştir.

Ekstrakte edilen kolajenin aminoasit bileşimindeki glisin konsantrasyonu %35,1 olarak bulundu. Kolajende bulunan diğer aminoasitlerin diğer en yüksek içeriği imino asit (%17,2), alanin (%15,01), hidroksiprolin (%7,2), glutamik asit (%6,8) ve prolin (%5,6) olarak tespit edildi (Bkz. Şekil 4.3).

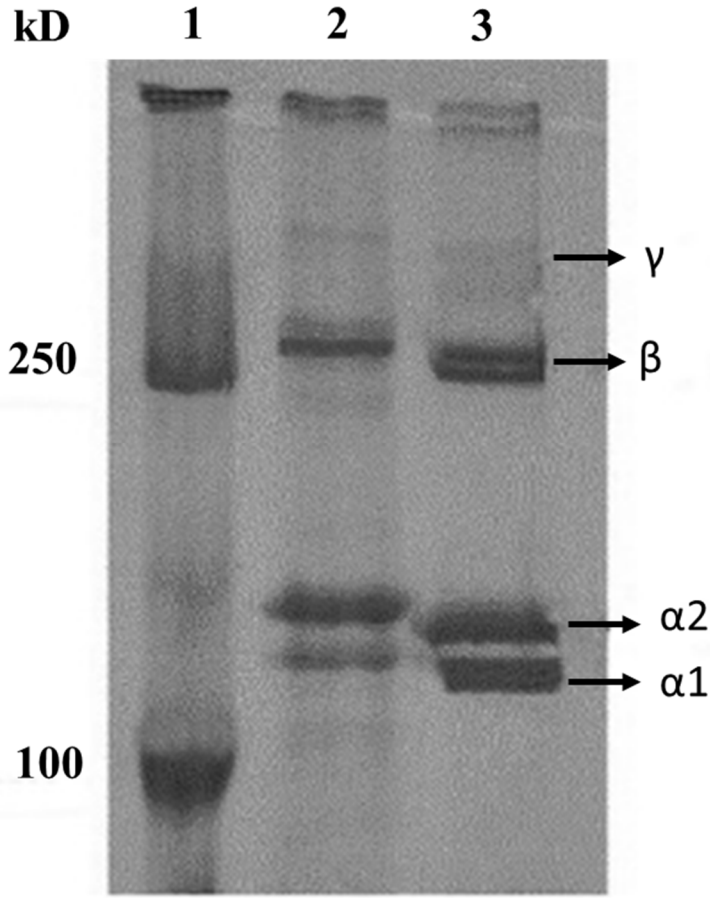




Şekil 4.3. *L. sceleratus* derisinden ekstrakte edilen kolajenin aminoasit içeriği

#### SDS-PAGE analizi

Laemmli'nin (1970) SDS-PAGE yönteminde ufak değişiklikler yapılarak analiz gerçekleştirildi. Ekstrakte edilen kolajen  $\alpha 1$  ve  $\alpha 2$  zincirlerinden oluştuğu ve  $\alpha 1$  zincirlerinin bant yoğunluğu,  $\alpha 2$  zincirlerinininkinden yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.4). *L. sceleratus* derisinden ekstrakte edilen kolajende yüksek moleküler ağırlıkta  $\beta$  bileşeni ve az miktarlarda  $\gamma$  bileşeni gözlemlendi.



Şekil 4.4. SDS-PAGE jel görüntüsü (1: Moleküler ağırlık işaretleyicisi, 2: Sigma Tip-1 kolajen, 3: *L. sceleratus* derisinden elde edilen kolajen)

#### Tetrodotoksin (TTX) durumu

Elde edilen kolajen ve jelatinin TTX durumları analiz etmek için Agilent 1200 HPLC sistemine bağlı bir Agilent 6460 üçlü dört kutuplu kütle spektrometresinden oluşan LC-MS-MS sistemi kullanıldı. Veriler varyans analizine (ANOVA) tabi tutuldu ve Duncan'ın Çoklu Aralık Testi (Steel ve Torrie, 1980) kullanılarak karşılaştırmalar yapıldı. İstatistiksel analizler için SPSS programı kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre ekstrakte edilen kolajen ve jelatinde TTX'e rastlanmadı.

### 4.1.3. Balon balığı dişlerinin çevresel indikatör olarak kullanımı

#### Ağır metal birikimi analizi

Tez çalışması kapsamında örnekleme yapılan balon balığı türlerinden (*Lagocephalus sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis* ve *T. flavimaculosus*) alınan yumuşak dokuların (kas, solungaç, karaciğer ve beyin) ve dişlerin ağır metal birikimi analizleri için Endüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre, Fe, Se, As, Zn, Cu, Cr, Al elementleri *L. sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis* ve *T. flavimaculosus* dokularında önemli düzeyde bulunurken ( $P < 0.05$ ), Co, Ni, Mo, Cd, Pb tüm dokularda tespit limitleri altında bulundu ( $P > 0.05$ ). Diş dokusunda Al ve Zn metalleri *L. spadiceus*'ta, Cr ve As metalleri ise *T. flavimaculosus*'ta diğer türlere göre daha yüksek bulundu (Bkz. Çizerge 4.2).

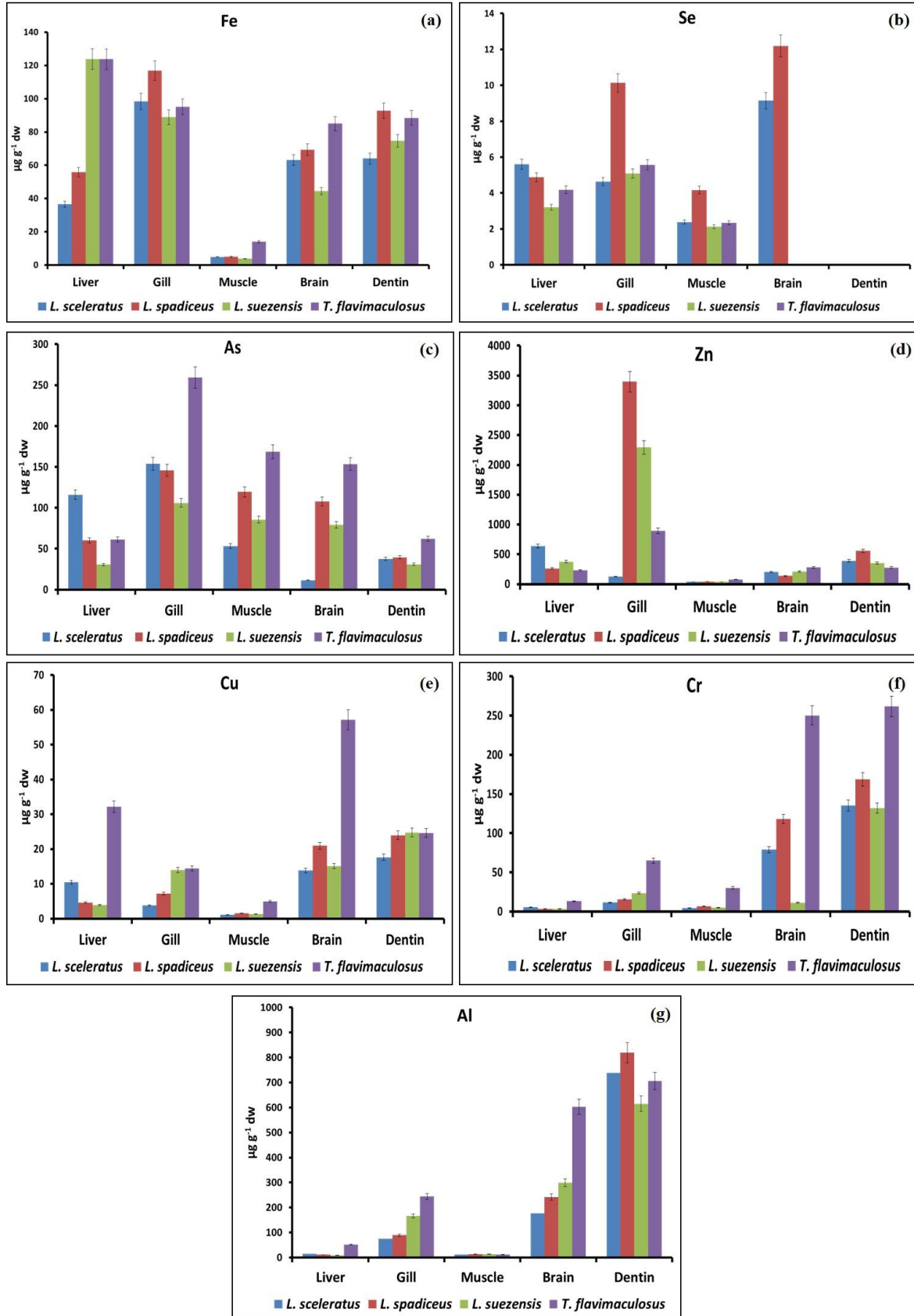
Çizelge 4.2. Balon balıkları dokularındaki metallerin karşılaştırılması

Doku	Metaller ( $\mu\text{g/g}^{-1}$ )	<i>L. sceleratus</i>	<i>L. spadiceus</i>	<i>L. suezensis</i>	<i>T. flavimaculosus</i>
Diş	Al	738,91	819,16	614,98	705,88
	Zn	390,18	557,82	352,6	277,49
	Cr	135,33	168,75	132,02	261,68
	Fe	64,06	92,75	74,73	88,45
	As	37,47	39,43	30,91	61,98
	Cu	17,66	23,99	24,74	24,67
	Se	0	0	0	0
Ciğer	Al	13,97	10,95	9,1	51,11
	Zn	634,83	263,18	377,36	229,35
	Cr	5,35	3,33	3,39	13,16
	Fe	36,62	55,78	123,81	123,74
	As	116,01	60,26	30,54	61,23
	Cu	10,5	4,65	3,95	32,2
	Se	5,6	4,87	3,2	4,18
Solungaç	Al	74,77	89,16	166,26	243,9
	Zn	125,57	3396	2292,4	893,66
	Cr	11,51	15,45	23,49	64,96
	Fe	98,48	116,96	88,93	95,13
	As	153,9	145,87	105,94	259,4
	Cu	3,79	7,21	14	14,48
	Se	4,64	10,13	5,09	5,57
Kas	Al	12,21	13,58	12,99	11,7
	Zn	36,48	42,66	36,94	73,92
	Cr	4,43	6,74	4,81	30,26
	Fe	4,92	4,98	3,77	14,09
	As	53,26	119,39	85,4	168,55
	Cu	1,11	1,54	1,37	4,99
	Se	2,38	4,16	2,12	2,34
Beyin	Al	738,91	819,16	614,98	705,88
	Zn	203,48	137,77	207	279,65
	Cr	78,84	117,95	11,28	250,39
	Fe	63,23	69,4	44,54	85,08
	As	11,42	107,76	79,16	153,57
	Cu	13,83	20,97	15,1	57,16
	Se	9,14	12,19	0	0

Diş ve yumuşak dokulardaki ağır metal düzeylerinin karşılaştırmaları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Diş dokusundaki metal seviyelerini beyin dokusuna benzer olduğu saptanmıştır. Alüminyum tüm dokularda birikime sahiptir. Karaciğer ve solungaç dokuları birbirleriyle aynı biyobirikim özelliklerini göstermiştir. Zn dokular arasında en yüksek birikime sahiptir ( $P < 0.05$ ).

Diş, karaciğer, solungaç, kas ve beyin dokularında elementlerin birikimi sırasıyla,  $Al > Zn > Cr > Fe > As > Cu$ ,  $Zn > Fe \geq As > Al > Cu > Cr \geq Se$ ,  $Zn > As \geq Fe \geq Al > Cr \geq Se \geq Cu$ ,  $As > Zn > Al \geq Fe \geq Cr \geq Se \geq Cu$ ,  $Al > Zn > Cr \geq Fe \geq Cu > As \geq Se$  şeklinde bulundu.

Dokularda incelenen her metalin birikim seviyeleri, Cr, Al ve Cu'nun diş ve beyin dokularında diğer dokulara göre daha fazla biriktiği Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Kas dokusu en düşük birikimi göstermesine rağmen, As ve Se, kas dokusunda incelenen diğer metallere göre daha yüksek konsantrasyonda olduğu ortaya çıkmıştır. Selenyum diş dokusunda tespit edilmemiştir. Cu, Cr ve As diğer türlere göre *T. flavimaculosus*'ta, Zn ve Se *L. spadiceus*'da daha yüksek bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.5).

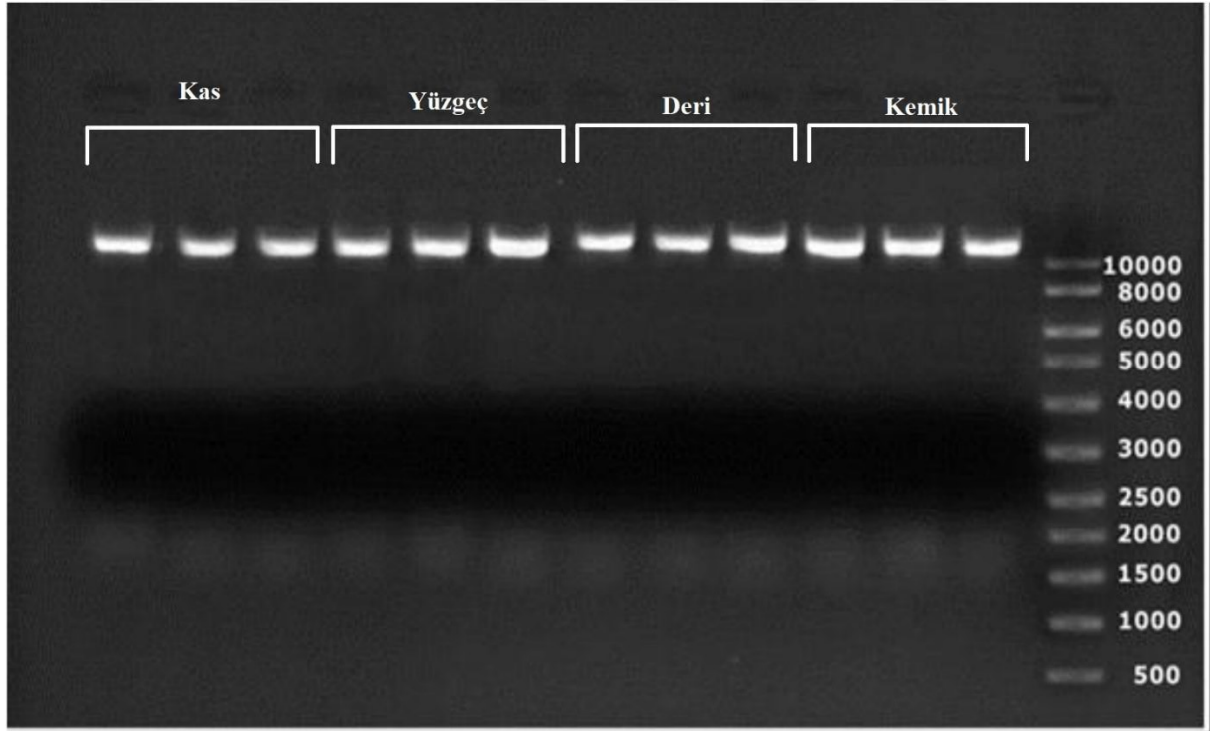


Şekil 4.5. Metallerle göre dokuların karşılaştırılması (a; Demir, b; Selenyum, c; Arsenik, d; Çinko, e; Bakır, f; Krom, g; Alüminyum)

#### 4.1.4. DNA dizileme yöntemi kullanılarak balon balığı türlerinin doğrulanması ve izlenmesi

##### mtDNA ekstraksiyonu

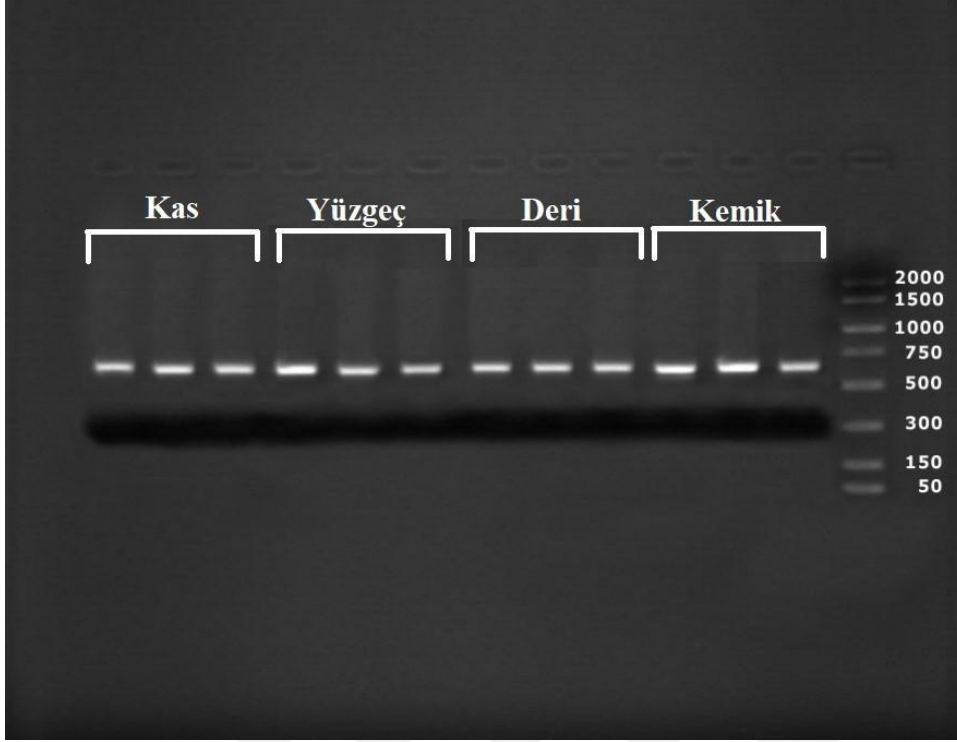
Tez çalışması kapsamında örnekleme yapılan *L. sceleratus*, *Sphoeroides pachygaster* ve *Torquigener flavimaculosus* türlerinin kas, yüzgeç, deri ve iskeletinden doku örnekleri alınmış ve Blin ve Stafford (1976) tarafından verilen standart fenol kloroform yöntemi ufak modifikasyonlar ile kullanılarak mtDNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Ekstrakte edilen DNA'lar % 7'lik agoroz jel üzerinde görüntülenmiştir (Bkz. Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. *L. sceleratus*'un kas, yüzgeç, deri ve kemik dokusundan elde edilen mtDNA'nın agoroz jel üzerindeki görüntüsü

##### Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Türlerin kas, yüzgeç, deri ve kemik dokularından edilen mtDNA sitokrom B (Cyt b) gen bölgesi kullanılarak PZR analizi yapılmış ve %1,5'lik agoroz jel üzerinde görüntülenmiştir (Bkz. Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *L. sceleratus*'un kas, yüzgeç, deri ve kemik dokusundan elde edilen mtDNA'nın Cyt b gen bölgesi PZR analizinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü

#### DNA dizi analizi (Sekanslama)

Analiz edilen 18 Cyt b sekansının uzunluğu 388 bç bulunmuştur. Bunun 122 bç değişken bölge ve 266 bç konservatif bölge ve 110 bç bilgilendirici bölge olarak tespit edilmiştir. Ortalama nükleotid bileşimi %28 timin (T), %30,7 sitozin (C), %24,8 adenin (A) ve %16,6 guanin (G) şeklinde bulunmuştur.

Analiz edilen 18 sekansta on iki haplotip bulundu ve ortak haplotip tespit edilmedi. Tespit edilen haplotiplerden Hap\_1-Hap\_6 *L. sceleratus*, Hap\_7 *S. pachygaster* ve Hap\_8-Hap\_12'nin *T. flavimaculosus*'a ait olduğu saptandı (Bkz. Çizelge 4.3). Çizelge 4.4'de verilen Cyt b geninden elde edilen haplotiplerin değişken nükleotid pozisyonları verilmiştir. Ortalama haplotip çeşitliliği 0,9346 olarak bulundu. Haplotiplerin birbiriyle olan ilişkisini DNAsp programı kullanılarak minimum örten ağaç (minimum spanning tree (MST)) metoduyla gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.8). Elde edilen 18 sekans için Genbank'tan MZ 512179-MZ 512196 kodlarıyla erişim numaraları alınmıştır.

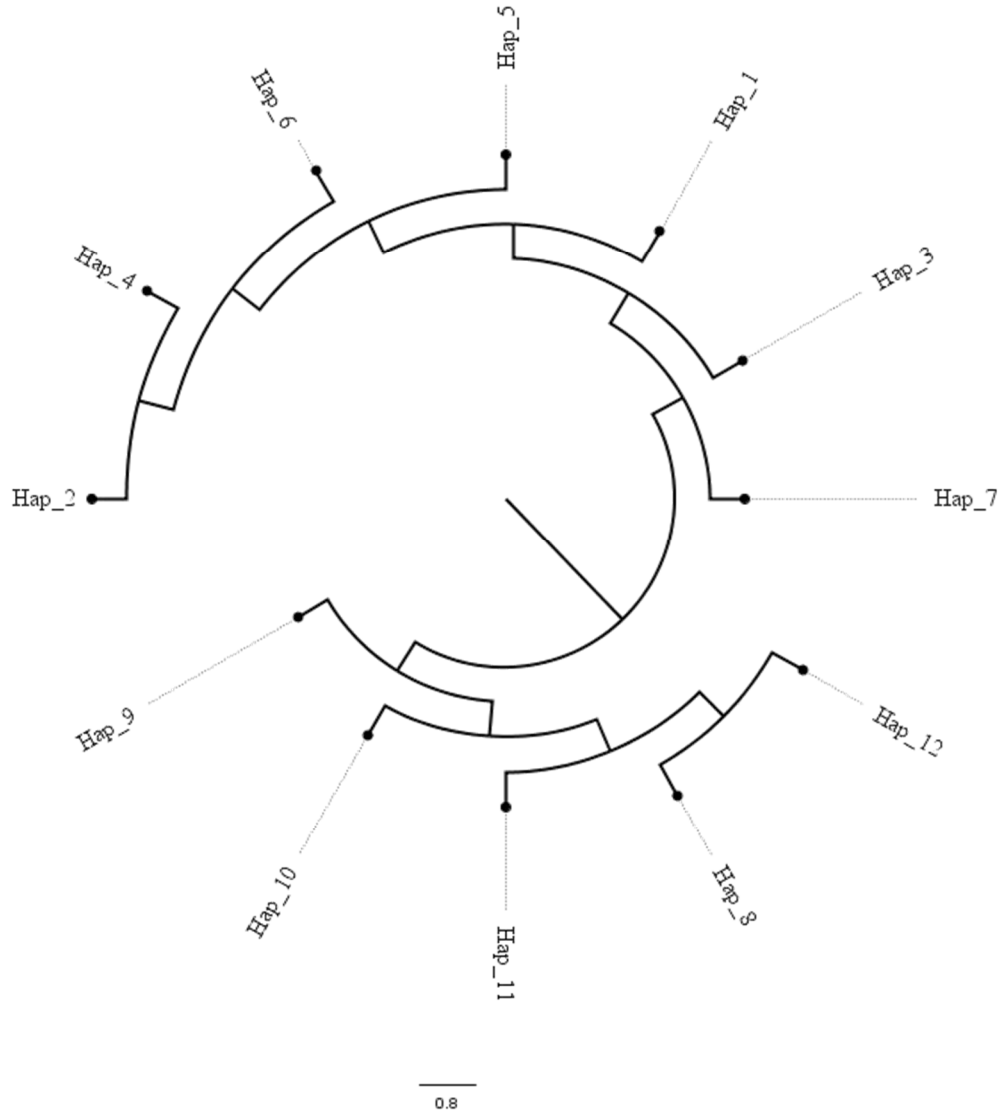
Çizelge 4.3. Haplotip sayısı ve türler arasındaki dağılımı

Haplotip	<i>Lagocephalus sceleratus</i>	<i>Sphoeroides pachygaster</i>	<i>Torquigener flavimaculosus</i>
Hap_1	1	-	-
Hap_2	2	-	-
Hap_3	4	-	-
Hap_4	1	-	-
Hap_5	1	-	-
Hap_6	1	-	-
Hap_7	-	3	-
Hap_8	-	-	1
Hap_9	-	-	1
Hap_10	-	-	1
Hap_11	-	-	1
Hap_12	-	-	1
<b>Toplam</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>5</b>



Çizelge 4.4. Tespit edilen haplotiplerin değişken nükleotid pozisyonları

Haplotip	Nükleotid Pozisyonları
Hap_1	GTATTCACTACCACGAATGGTAATTACTCCAACATACTAATCTG CTCACGCGCCACCTTTAGCCTCGCTCCCTGTCTCGGTACTACCT CTAAACTCTCGCACAAGTTCCGACCTGCCCC
Hap_2	GTATAAATTGCCACGAATGGTAATTACTCCAATTACCTAATCTG CTCACGCGCCACCTTTAGCCTCGCTCCCTGTCTCGGTACTACCT CTAAACTCTCGCACAAGTTCCGACCTGCCCC
Hap_3	TTATAAATTGCCACGAATGGTAATTACTCCAATTACCTAATCTGC TCACGCGCCACCTTTAGCCTCGCTCCCTGTCTCGGTACTACCTTC TAAACTCTCGCACAAGTTCCGACCTGCCCC
Hap_4	GTATAAATTGCCACGAGTGGAAAGTACTCCGACTTACCAAATCTG CTCACGCGCCACCGTTAGCCTCGCTCCCTGTCTCGGTACTACCT CTAAACTCTCGCACAAGTTCCGACCTGCCCC
Hap_5	GTATAAATTGCCACGAAGGGTAATTACTCCGACTTACCTAATCTG CTCACGCGCCACCTTTAGCCTCGCTCCCTGTCTCGGTACTACCT CTAAACTCTCGCACAAGTTCCGACCTGCCCC
Hap_6	ATATAAATTGCCACGAATGGTAATTACTCCGACTTACCTAATCTG CTCACGCGCCACCTTTAGCCTCGCTCCCTGTCTCGGTACTACCT CTAAACTCTCGCACAAGTTCCGACCTGCCCC
Hap_7	TAATAAATCACTACGAATAGTCGTCTTGTAATTCGTCTCAGGAC CCTACGCACTAAATTCCGACCTTAACTACTACTTCTGTACCACTCC TCACCCCTCTACATACACATTACTCTAAAAT
Hap_8	TATAAGTTCAGACGAGATGTTAATTCCTCCACTTTACTTCCGGACA CCCTAAGTCCGGTTCCTATAGTTCCACTCACACTATCTGCTACTCC CCCATCCGTATGACAGAATAACCTCAACCA
Hap_9	TATTAGTTCGGAACGAATAGTAATTCCTCAAATTTACTTCCGGAC ACCCTGAGTCCGGTTCCTATAGTTCCACTCACACTATCTGCTACTC CCCCATCCGTATGACAGAATAACCTCAACCA
Hap_10	TATTAGTTCGGAACGAATAGTAATTCCTCAAATTTACTTCCGGAC ACCCTAAGTCCGGTTCCTATAGTTCCACTCACACTATCTGCTACTC CCCCATCCGTATGACAGAATAACCTCAACCA
Hap_11	TATTAGTTCAGAACAGATGGTAATTCCTCAAATTTACTTCCGGAC ACCCTAAGTCCGGTTCCTATAGTTCCACTCACACTATCTGCTACTC CCCCATCCGTATGACAGAATAACCTCAACCA
Hap_12	TATAAGTTCGGAACAGATGTTAATTCCTCAAATTTACTTCCGGAC ACCCTAAGTCCGGTTCCTATAGTTCCACTCACACTATCTGCTACTC CCCCATCCGTATGACAGAATAACCTCAACCA



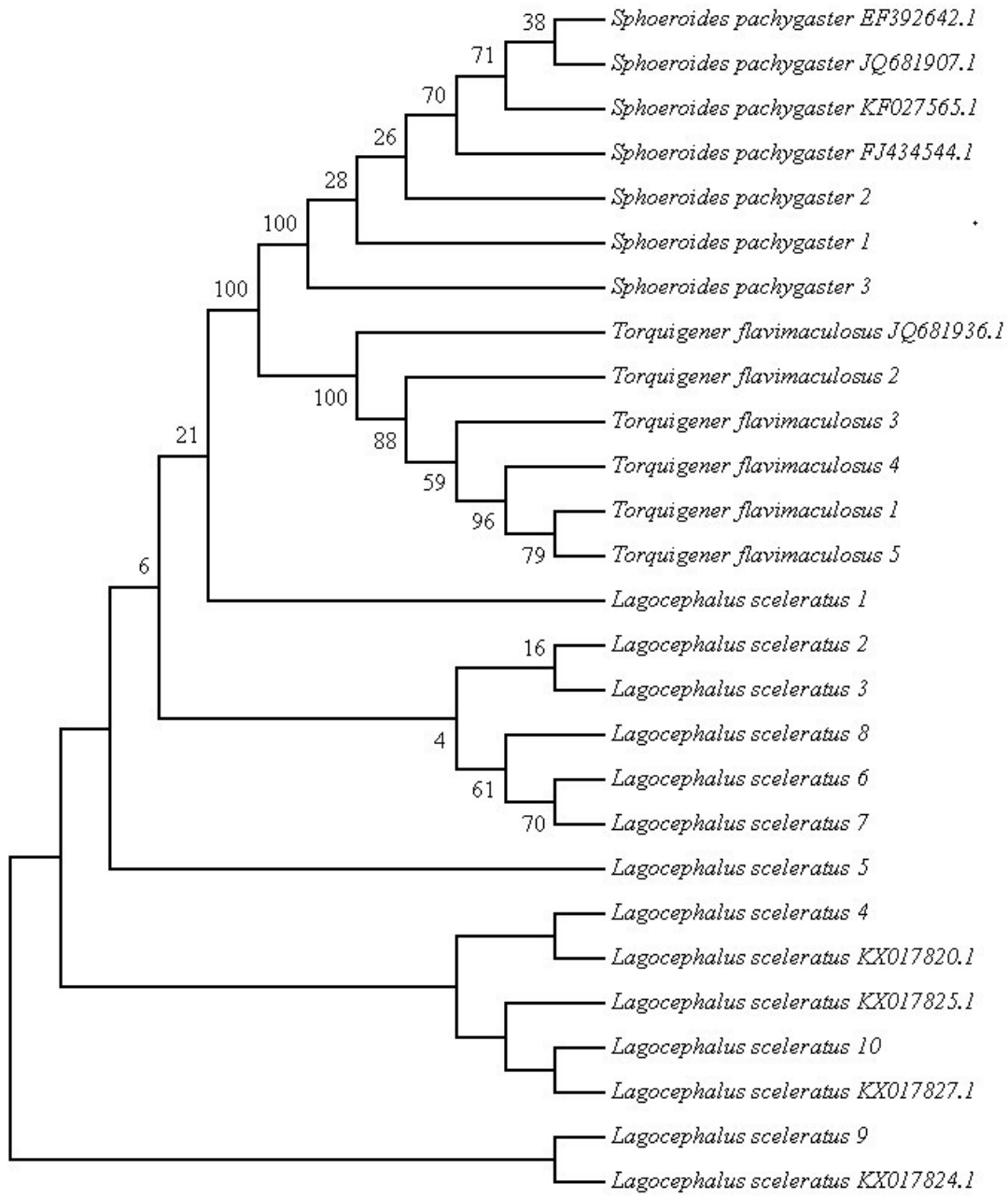
Şekil 4.8. Haplotipler arasındaki ilişkinin MST metoduyla görünümü

En iyi model yöntemi kullanılarak test edilen modelde Kimura 2 (BIC Puanı: 2 699 079) olarak tespit edildi. Türler arası ortalama genetik çeşitlilik 0,1502 olarak gözlemlendi. En düşük genetik çeşitlilik *L. sceleratus* ve *S.pachgaster* (0,2209) arasında, en yüksek ise *L. sceleratus* ve *T. flavimucolus* (0,26127) arasında gözlemlendi. En yüksek genetik çeşitlilik ise *T. flavimaculosus*'ta gözlenmiştir (0,0146). Türler arasındaki mesafelerin matrisi Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

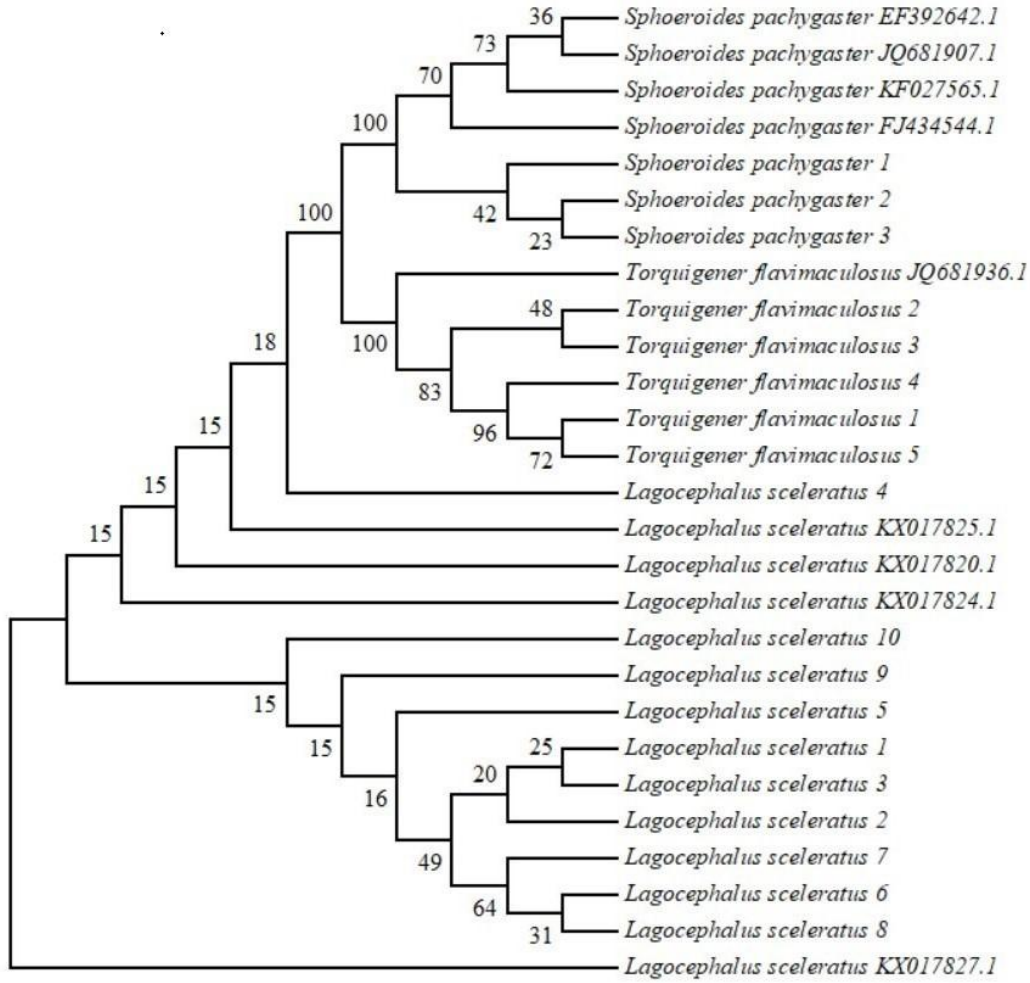
Çizelge 4.5. Türler arası genetik çeşitlilik ve türler arasındaki genetik uzaklık (koyu) ( $P < 0.05$ )

Species	<i>L. sceleratus</i>	<i>S. pachygaster</i>	<i>T. flavimaculosus</i>
<i>L. sceleratus</i>	-	<b>0,96311*</b>	<b>0,95073*</b>
<i>S. pachygaster</i>	0,2209	-	<b>0,95042*</b>
<i>T. flavimaculosus</i>	0,2493	0,2243	-

Filogenetik analizler kapsamında yapılan komşu kalıtım (NJ) ve maksimum parsimony (MP) filogenetik ağaçlarının benzer topolojiler gösterdiği gözlemlendi. NJ ve MP ağaçlarında üç ana kök tespit edildi ve GenBank'tan alınan örnekleriyle eşleşen tüm türler ayrı dallara dağıldı (Bkz. Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).



Şekil 4.9. GenBank örnek referansları ile Cyt b dizilerine dayalı komşu kalıtım ağacı



Şekil 4.10. GenBank örnek ile birlikte Cyt b dizilerine dayalı Maksimum Parsimony ağacı

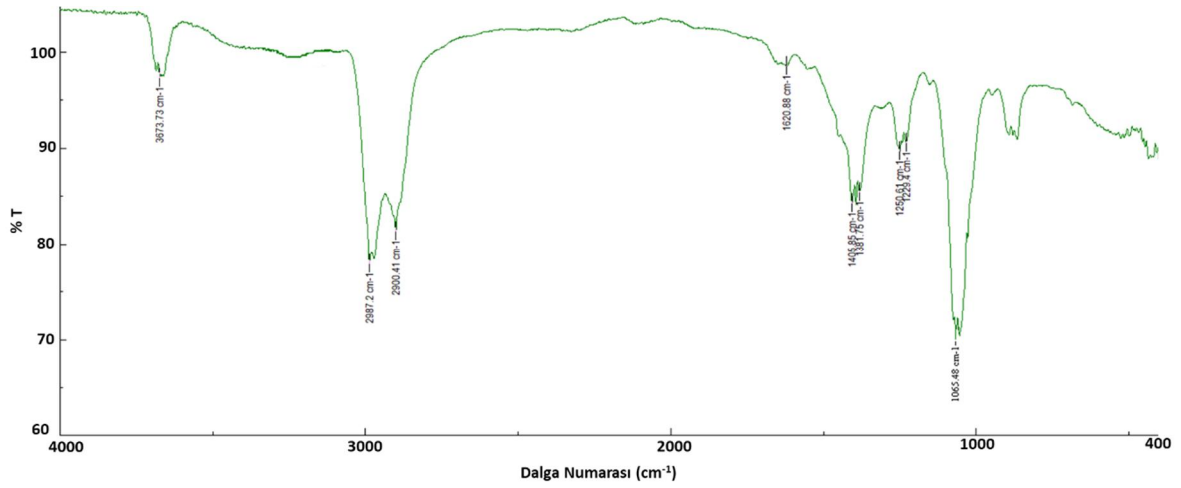
#### 4.2. *Charybdis longicollis*'in Biyomedikal Alanında Kullanımı

##### Kitin ve kitosan ekstraksiyonu

Tez çalışması kapsamında *C. longicollis* kabuklarından kitin ve kitosan elde edildi. Ekstrakte edilen kitin ve kitosan miktarını hesaplamak için üç tekrarlı analiz yapıldı. Yaş ağırlık durumundaki kurutulmuş ve öğütülmüş yengeç kabuklarından %25,78 oranında kitin elde edildi. Ekstre edilen kitinden üretilen kitosan verimi ise %80,23 olarak tespit edildi. Elde edilen kitin ve kitosan ürünlerine yapılan kül ve su tutma kapasitesi analizleri sonuçları sırasıyla %5,07, %275,6 ve %8,12 ve %595,78 olarak bulunmuştur.

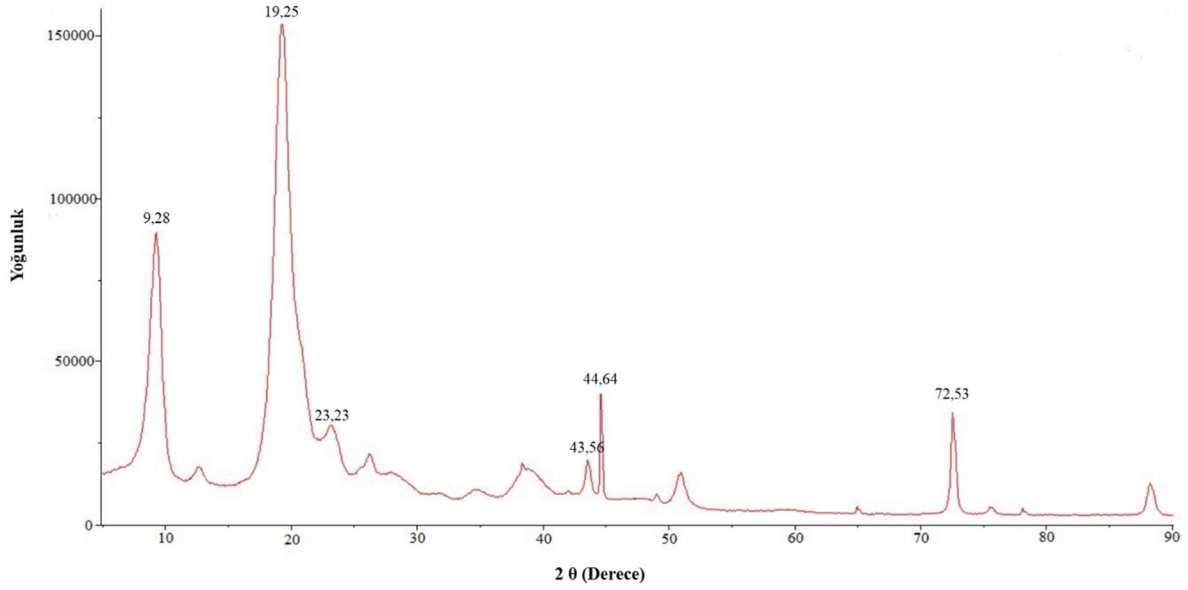
*C. longicollis*'ten elde edilen kitin fourier transform kızılötesi spektrometresi (FTIR) ile analiz edildi (Bkz. Şekil 4.11). Oluşan piklerden  $1063\text{ cm}^{-1}$  piki anomerik karbonun C-H

bağlarından kaynaklanan anomerik karbonun varlığı tespit edildi. Ekstrakte edilen kitinde bulunan glukopiranoz kalıntıları (C-H eksenindeki  $1063\text{ cm}^{-1}$  piki) elde edilen kitini karakterize etmek için kullanıldı. FTIR spektrumunda ilk geniş pik  $1229$  ile  $1250\text{ cm}^{-1}$  arasında tespit edilmiş. Bu aralık alfa kitinin göstergesi olan C=O'ya karşılık gelmektedir. İkinci geniş pik  $1381$  ile  $1405\text{ cm}^{-1}$  aralığında tespit edilmiştir. Bu aralık, N-H'nin amid II'sine ve C-N'nin amid III'sine karşılık gelen önemli amid bantlarını içerir. Üçüncü geniş pik ise  $2900$  ile  $2987\text{ cm}^{-1}$  arasında tespit edilmiştir. Son olarak, amid B'ye karşılık gelen bir düşük tepe noktası ( $3668$ – $3673\text{ cm}^{-1}$ ) tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar, proteinlerin yanı sıra amino-polisakkarit alfa kitin içeren bir yapı göstermektedir.



Şekil 4.11. *C. longicollis*'ten elde edilen kitinin  $4000$ – $400\text{ cm}^{-1}$  spektrum aralığındaki FTIR görüntüsü

*C. longicollis*'den elde edilen kitine XRD analizi yapılarak kristal yapıları belirlendi (Bkz. Şekil 4.12). Şekil 4.12'de verilen kitinin XRD analizi sonuçları, tüm yoğun yansımaların  $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_{20}\text{N}_4$  kimyasal formülüne sahip kitin ile örtüştüğünü göstermektedir. Kitin yansımaları, ICDD Kart No: 96-151-6345'de sunulan alfa kitin verileriyle mükemmel uyum sağlamaktadır. Kitinin hücre parametreleri  $a = 4,75$ ,  $b = 10,3330$  ve  $c = 18,89$  şekilde bulundu. Bunlar referans alfa kitine çok yakındır. Elde edilen XRD sonuçları FTIR analiz sonuçlarını desteklemektedir.

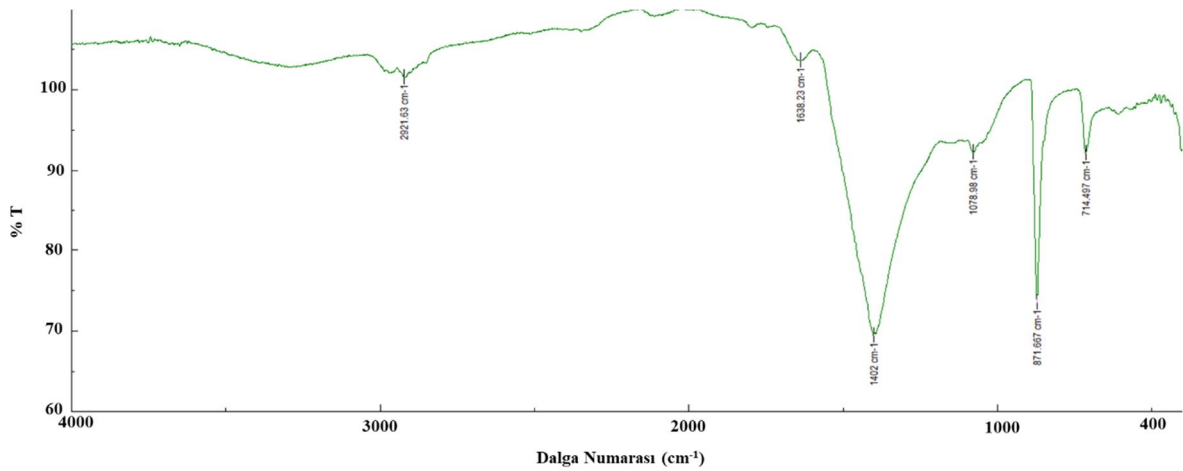


Şekil 4.12. *C. longicollis* kabuklarından elde edilen kitinin X-ışını kırınım desenleri

### 4.3. *Diadema setosum*'un Biyomedikal Alanında Kullanımı

#### Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

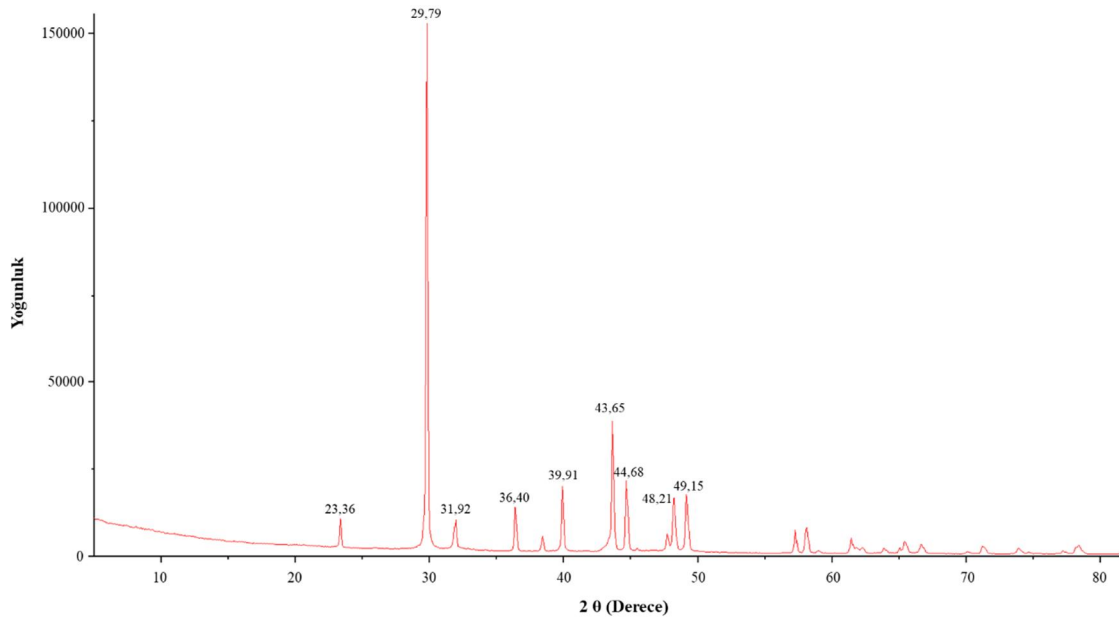
*D. setosum*'un toz haline getirilen kabuğu Fourier transform kızılötesi spektrometresi (FTIR) ile analiz edildi (Bkz. Şekil 4.13). Oluşan piklerden  $714 \text{ cm}^{-1}$  ve  $871 \text{ cm}^{-1}$  piki sırasıyla amorf ve kristal yapıyı tespit ettiği belirlenmiştir. Oluşan bir diğer pik olan  $1078 \text{ cm}^{-1}$  piki analiz edilen kabuğun yapısındaki sodyum sülfatı,  $1402 \text{ cm}^{-1}$  piki sodyum karbonatı ve  $1638 \text{ cm}^{-1}$  piki ise kalsiyum sülfatı karakterize etmektedir.



Şekil 4.13. *D. setosum* kabuğunun  $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$  spektrum aralığındaki FTIR görüntüsü

### X-Işını Kırınım (XRD) Analizi

Tez çalışması kapsamında *D. setosum*'un toz haline getirilen kabuklarının XRD analizi ile yapısı belirlendi (Bkz. Şekil 4.14). Şekil 4.14'de verilen uzun dikenli denizkestanesi kabuğunun XRD analizi sonuçlarındaki yansımaların  $\text{Ca}_5\text{MgC}_6\text{O}_{18}$  kimyasal formülüne sahip kalsit ile %91,  $\text{Mg}_4\text{O}_4$  kimyasal formülüne periklaz ile %9 oranında örtüştüğünü göstermektedir. Bu yansımaları, ICDD Kart No: 96-900-1299'da sunulan kalsit verileri ve ICDD Kart No: 96-901-3253'de sunulan periklaz ile mükemmel şekilde uyum sağlamaktadır. *D. setosum* kabuğunun hücre parametreleri  $a = 4,9380$ ,  $b = 4,9380$  ve  $c = 16,8320$  şekilde bulundu. Elde edilen XRD sonuçları FTIR analiz sonuçlarını desteklemektedir.



Şekil 4.14. *D. setosum* kabuğunun X-ışını kırınım desenleri



## 5. TARTIŞMA

Tez çalışmasının ilk bölümünde istilacı balon balıklarının biyomedikal alanında kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmış ve bunun sonucunda, ilk olarak *Lagocephalus sceleratus* dişinin biyomedikal alanda hidroksiapatit (HA) olarak kullanımı araştırılmış ve ekstrakte edilmiş, ikinci olarak *L. sceleratus* derisinden kolajen/jelatin üretimi yapılmıştır. Üçüncü kullanım alanı olarak yine balon balığı dişlerinin çevresel gösterge olarak kullanımını amaçlanmış ve bu çerçevede ağır metal birikim analizleri yapılarak dişlerin çevresel gösterge olarak kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır. Bu bölümde son olarak ülkemiz sularında sayıları giderek artan ve zehirlenmelere sebep üç balon balığı türü olan *L. sceleratus*, *Torquigener flavimaculosus* ve *Sphoeroides pachygaster* türlerinin deri, kas, yüzgeç ve iskelet gibi atıklarından mtDNA barkodlama tekniği kullanılarak türlerin barkodlamaları yapılmıştır.

İkinci bölümde ülkemiz sularında istilacı tür olan *Charybdis longicollis*'in biyomedikal alanında kullanımı amaçlanmış ve bunun için istilacı yengecin kabuklarından kitin ve kitosan ekstrakte edilmiştir.

Üçüncü ve son bölümde ise bir diğer istilacı tür olan *Diadema setosum*'un ülkemiz ekonomisine kazandırılması için kabuklarının karakterizasyonu yapılmış ve biyomedikal alanında olası kullanım alanları belirlenmiştir.

### 5.1. Balon Balıklarının Biyomedikal Alanında Kullanımı

#### 5.1.1. *Lagocephalus sceleratus* dişinin biyomedikal alanında hidroksiapatit (HA) olarak kullanımı

##### Elementel kompozisyon analizi

Ekstrakte edilen HA'ların elementel kompozisyonu birbirine çok yakındır. Ortalama olarak HA'nın ana yapısı %52 kalsiyum ve %39 fosfat, %2,5 manganez, %1,5 magnezyum, %1 titanyum, %0,8 vanadyum ve %3,2 diğer elementlerinden oluştuğu belirlenmiştir. HA'nın Ca/P atom oranı değeri, stokiyometrik HA'dan nispeten daha yüksek olan 1,32 olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen Ca/P oranı, B-tipi karbonat HA'nın varlığını doğrulayan fosfatın

yerini alan karbonat iyonlarının varlığı ile ilgili olabilir (Boutinguiza ve diğerleri, 2012). *L. sceleratus* dişlerinde tespit edilen HA karbonatların Ca/P oranını güçlü bir şekilde değiştirebildiği biyolojik apatitlerin mineral fazının tipik bir örneğidir (Antonakos, Liarokapis ve Leventouri, 2007). Lee, Koh, Yoon, Kim ve Kim (2007) mürekkep balığı kemiğinden fosforik asitte elde edilen HA'nın iki farklı karıştırma oranı için 1,64-1,70 arasında olduğunu bildirmiştir. Bahrololoom ve diğerleri (2009) çeşitli hayvan kemiklerinden elde edilen doğal HA'nın Ca/P oranlarını araştırmış ve 1,46-2,01 arasında olduğunu bildirmiştir. Nazarpak, Solati-Hashjin ve Moztaizadeh (2009) ürettikleri sentetik HA'nın Ca/P oranını 1,62 olarak hesaplamışlardır. Latif ve diğerleri (2020) *Thunnus thynnus*'tan doğal HA ekstrakte etmiş ve Ca/P oranını 1,60 olarak bulmuşlardır. Joschek, Nies, Krotz ve Göpferich (2000) yaptıkları çalışma ışığında insan kaval kemiğinin Ca/P oranını 1,68 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamız kapsamında tespit edilen Ca/P oranı diğer çalışmalara göre nispeten düşük olsa da, diş endüstrisi uygulamalarında doğal HA kaynağı olarak kullanılabilir sınır içerisinde olduğu tespit edilmiştir (Milella, Cosentino, Licciulli, ve Massaro, 2001; Shanaghi, Mehrjou, Ahmadian, Souri ve Chu, 2021).

Diş tozunun yerini alan materyallerin nano yapısı, genellikle osteoblast fonksiyonlarının artmasına neden olan iyi biyoaktivite ve osteokondüktivite ile ilişkilidir (Balasundaram, Sato ve Webster, 2006). Biyolojik apatitlerin insan hücre adezyonunda metabolizmaya katkılarında dolayı davranışlarında önemli olan elementler Na, Mg, K ve Se *L. sceleratus* dişlerinde ekstrakte edilen HA'da yüksek seviyelerde tespit edildi. Kemik metabolizmasında ve osteoporozda, Na ve Mg'nin önemli bir rolü vardır (Boutinguiza ve diğerleri, 2012; Šarić Piasek, Blanuša, Kostial ve Ilich, 2005). Mg hücre proliferasyonu ve fonksiyonunda çok önemlidir, çünkü hücreler Mg eksikliğinde DNA, RNA ve protein sentezindeki azalma nedeniyle hücreler çoğalamazlar (Joschek ve diğerleri, 2000). Ayrıca Sr, kemik erimesini azaltmak ve kemik oluşumunu hızlandırmakla bağlantılı olup, kırık riskinin önlenmesine yardımcı olur (Marie, 2006).

#### Tetrodotoksin (TTX) analizi

Tez çalışması kapsamında *L. sceleratus* dişinden elde edilen HA'nın TTX miktarının ölçülmesi için LC/MS-MS ve HPLC üniteleri birlikte çalıştırılarak analiz edilmiştir. Ancak analiz sonucunda ekstrakte edilen HA ürünlerinde tespit edilebilen minimum miktar olan 0,1 µg/mg'dan daha düşük TTX içerdiği saptanmıştır.

### X-Işını kırınım yöntemi (XRD) analizi

XRD analizi sonucuna göre tez çalışması kapsamında elde edilen HA'nın tüm yoğun yansımalarının  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  kimyasal formülüne sahip HA olduğu tespit edilmiştir. HA'nın XRD kırınım desenleri ICDD Kart No: 01-089-4405 olan verilerle mükemmel bir şekilde eşleşti. HA'nın hücre parametreleri şu şekilde bulundu:  $a = 9,451(1)$ ,  $b = 18,823(1)$  ve  $c = 6,926(2)$ , bu değerler ICDD Kart No: 01-089-4405 değerlerine çok yakın değerlerdir. XRD modellerinde görülen geniş yapı, organik bir matris ile biyolojik olarak mineralize edilmiş düşük kristalli hidroksiapatiti göstermektedir (Landi, Celotti, Logroscino ve Tampieri, 2003; Bahrololoom ve diğerleri, 2009). XRD analizi, element analizi sonuçlarını desteklemektedir. XRD sonucuna göre dişlerin ana bileşimi kalsiyum ve fosfattır. Diğer ağır metaller XRD modelinde tespit edilmedi. Ağır metaller, Vanadyum (V), Krom (Cr), Kobalt (Co), Nikel (Ni), Bakır (Cu), Çinko (Zn) Arsenik (As), Molibden (Mo) ve Kurşun (Pb) HA' da diş endüstrisi için organik kabul edilen ASTM Standartları tarafından belirlenen sınırın altında tespit edildi (Boutinguiza ve diğerleri, 2012). Bu sonuçlar ışığında, ağır metallerin toksik olmayan ölçümlerinin varlığı, elde edilen HA'nın etkileri sitotoksik olmadığı ve pazarlanabilir HA'nın yapısına benzer olduğunu ortaya koymuştur.

### Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Ekstrakte elde edilen HA örneklerinin yüzeylerinde yapılan SEM analizi sonucunda oval ve plaka şeklinde parçacıklar gözlemlendi ve *L. sceleratus* dişlerinin başlangıçta sarı olması yapısındaki kolajen ve diğer organik parçaların varlığını göstergesi olarak kabul edildi. Kristallerin boyutu ve morfolojik yapısı balon balığı dişlerinin biyomekanik işleyişinde önemli bir rol oynamaktadır, çünkü hiyerarşik düzenek ve HA kristallerinin kolajen içindeki oryantasyonu dişlerin yüksek sertliğini desteklemektir. SEM mikrograflarının gösterdiği gibi, elde edilen HA'ların muhtemelen temel blokların kaynaşmasıyla şekillendirilen bir çubuk şekli ortaya çıkardığını ve kristal uyumlu olduğu saptanmıştır (Eppell, Tong, Katz, Kuhn ve Glimcher, 2002). Ekstrakte edilen HA, Boutinguiza ve diğerleri (2012) tarafından bildirilen kuru ortam öğütme ile birlikte  $600^\circ\text{C}$  ön işlem yöntemi kullanılarak hazırlanan nano balık kılıçığı tozlarına benzerlik göstermektedir. Analizler sonucunda ekstrakte edilen HA'nın kapsamı ve şekli, iyi biyoaktivite ve esneklik gibi önemli özellikler sağlayabileceği bildirilmiştir (Huang, Wang, Ning, Nan ve Han, 2007; Chevalier ve Gremillard, 2009).

### Elastik modül (Er) ve sertlik (H) analizi

Elde edilen HA'nın makro ve mikro sertlik ve esneklik durumları Nanoindenter testi analizi ile gerçekleştirilmiştir. 7 örnek kontrol grubu, 7 örnek geliştirilen ürün grubu olacak şekilde toplam 14 numune hazırlanmıştır. Tüm numunelere 50 N yük altında toplam 5 girinti uygulanmıştır. Kontrol numunelerinin elastik modül (Er) ve sertlik testi (H) ortalama değerleri sırasıyla 9,33 ve 0,27 olarak bulunmuştur. Geliştirilmiş ürün grupları için ortalama elastik modül (Er) ve sertlik testi (H) değerleri sırasıyla 9,88 ve 0,40 olarak tespit edilmiştir. Diş endüstrisinde kullanılan malzemelerde en çok ölçülen ve uygulanan mekanik özellikler sertlik ve esneklik analizidir (Chung ve Yap, 2005). *L. sceleratus* dişlerinden elde edilen HA'nın yapısında titanyum ve vanadyum bulunması nedeniyle organik, düşük maliyetli, dayanıklı, bakterilere dayanıklı, leke tutmaz gibi avantajlara sahip olduğu sonucuna varılabilir. Doğal diş dolgu malzemesi olarak balon balığından ekstrakte edilen HA, dolgu, implant ve protez tedavilerinde estetiği, sertliği, sağlamlığı, işlevselliği, uygunluğu ve uyumluluğu etkin ve basit bir şekilde sağlanmaktadır.

#### **5.1.2. *L. sceleratus* Derisinden kolajen ve jelatin ekstraksiyonu**

Asitte Çözünür Kolajen (ASC) yöntemi ufak modifikasyonlarla kullanılarak ekstrakte edildi (Li ve diğerleri, 2013). Nötr pH'da tuz çökeltmesinden sonra izole edilen kolajenin verimi, liyofilize kuru ağırlık bazında %50,9 tespit edilmiştir. *L. sceleratus* derisinin kolajen verimi, diğer deniz balıklarının derilerinden, kemiklerinden (Nagai ve Suzuki, 2000), yüzgeçlerden (Nagai, 2004) ve denizanası, mürekkepbalığı gibi diğer deniz organizmalarından elde edilen kolajen veriminden daha yüksek veya daha yakın olarak tespit edilmiştir (Nagai ve Suzuki, 2000; Nagai ve diğerleri, 2001).

### Nem, protein içerikleri ve aminoasit analizleri

Elde edilen kolajenin nem, kül, yağ, protein içerikleri ve aminoasit analizleri gerçekleştirilmiştir. Nem içeriği %75,1, protein içeriği %2,45 olarak tespit edilmiştir. Mevcut sonuçlar, kolajenin çözünürlüğünde bir azalmaya yol açan moleküller arası çapraz bağlanmanın yanı sıra, derideki kolajen molekülünün büyük olasılıkla telopeptid bölgesindeki aldehit gruplarının yoğunlaşması yoluyla kovalent bağlarla çapraz bağlanmasıyla açıklanabilir (Foegeding, Lanier ve Hultin, 1996; Zhang ve diğerleri, 2007).

Aminoasit bileşimindeki glisin konsantrasyonu %35,1 olarak bulundu. Kolajende bulunan diğer aminoasitlerde en yüksek içeriği imino asit (%17,2), alanin (%15,01), hidroksprolin (%7,2), glutamik asit (%6,8) ve prolin (%5,6) olarak bulunmuştur. Muyonga ve diğerleri (2004) glisinin Tip 1 olarak telaffuz edilen kolajendeki en baskın aminoasittir ve kolajenlerin tüm tipleri prolinden zengin tripeptitlerin tekrarları olan alanlar ile karakterize edilmektedir. Glisin, kolajen moleküllerinin N-ucundaki ilk 14 aminoasit kalıntısı ve C-ucundaki ilk 10 aminoasit kalıntısı dışında üçlü sarmalın oluşumunda rol oynamaktadır (Foegeding ve diğerleri, 1996). *L. sceleratus* derisinden ekstrakte edilen kolajende tespit edilen imino asit içeriği (%17,2), Ikoma, Kobayashi, Tanaka, Walsh ve Mann, (2003) tarafından bildirilen domuz derisi kolajeninden daha düşük bulunmuştur. Ancak genel olarak bakıldığında balık kolajenlerindeki imino asit içeriği, memelilerden ekstrakte edilen kolajendekinden daha düşüktü olduğu bildirilmiştir (Foegeding ve diğerleri, 1996).

#### SDS-PAGE analizi

Ekstrakte edilen kolajen  $\alpha 1$  ve  $\alpha 2$  zincirlerinden oluşuyordu ve  $\alpha 1$  zincirlerinin bant yoğunluğu,  $\alpha 2$  zincirlerinininkinden yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu gözlemlendi. Ekstrakte edilen kolajendeki yüksek moleküler ağırlıklı bileşenler, özellikle b bileşenleri, küçük miktarlarda g bileşenleri ve daha yüksek moleküler ağırlıklı diğer çapraz bağlı moleküllerin bulunduğu gözlemlendi. Deriden elde edilen kolajen türlerinin yapılan çalışmalarda esas olarak tip I den oluştuğu bildirilmiştir (Foegeding ve diğerleri, 1996; Nagai ve Suzuki, 2000; Muyonga ve diğerleri, 2004; Nagai, Suzuki ve Nagashima, 2008). Yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda elde edilen kolajenin Tip I sınıfı olduğu doğrulanmıştır.

#### Tetrodotoksin (TTX) durumu

Kolajen ve jelatinin TTX durumları Agilent 1200 HPLC sistemine bağlı bir Agilent 6460 üçlü dört kutuplu kütle spektrometresinden oluşan LC-MS-MS sistemi ile analiz edildi. Ancak, elde edilen sonuçlara göre ekstrakte edilen kolajen ve jelatinde TTX tespit edilemedi. Bu da elde edilen kolajen ve jelatindeki TTX miktarının 0,1  $\mu\text{g}$  daha düşük olduğunu göstermektedir.

### 5.1.3. Balon balığı dişlerinin çevresel indikatör olarak kullanımı

Sucul ekosistemler, kirleticilerin çevreye bırakıldığı ana alıcılardır (Moiseenko ve Kudryavtseva, 2001). Bu nedenle çevresel izleme çalışmalarında biyolojik materyal olarak suda yaşayan organizmalar tercih edilmektedir (Rayment and Barry, 2000). Balon balıkları, Akdeniz ekosistemi besin zincirinde predatörleri olmayan, istilacı türlerdir. Bu nedenle, bu türlerin dokularında ağır metal birikiminin belirlenmesi, su ortamı için doğal seleksiyonu olarak kabul edilebilir. Tez çalışmasında gerçekleştirilen analizler sonucunda ilk kez diş dokusunun toksikoloji çalışmalarında gösterge olarak kullanılabileceğini ortaya çıkarılmış ve dişteki metal birikimlerinin balon balığı türlerinin incelenen diğer dokularına paralel olarak belirlendiği ortaya konmuştur.

#### Ağır metal birikimi analizi

Elde edilen sonuçlara göre, Fe, Se, As, Zn, Cu, Cr, Al elementleri *L. sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis* ve *T. flavimaculosus* dokularında önemli düzeyde bulunurken ( $P < 0.05$ ), Co, Ni, Mo, Cd, Pb tüm dokularda tespit limitleri altında bulundu ( $P > 0.05$ ). Diş dokusunda Al ve Zn metalleri *L. spadiceus*'ta, Cr ve As metalleri ise *T. flavimaculosus*'ta diğer türlere göre daha yüksek bulundu.

Balon balığı türlerinin diş dokusunda Cr ve Al en yüksek düzeyde birikirken Se tespit edilmedi. Bunun nedeni Cr ve Al'in Ca kanallarından geçişinin diğer metallere göre daha zor olmasıdır. Öte yandan, kalsiyumdan zengin diş dokusu bu metalleri şelatlayabilir. Diş ve beyin dokusu metal birikimi açısından benzerlik göstermiştir, bu da beyin ve kemik dokularının ağır metaller için son depolanma yeri olmasına bağlı olabilir. Bu sonuçlar, memelilerde yapılan çalışmalar tarafından da desteklenmektedir (Fosse ve Justesen, 1978, Appleton ve diğerleri, 2000).

Diş dokusu, diğer dokuların aksine stabil olması ve mineral fazındaki bazı metalleri bağlayabilmesi nedeniyle memelilerde toksikoloji çalışmalarında indikatör olarak kullanılmıştır (Fosse ve Justesen, 1978; Appleton ve diğerleri, 2000). Kirlilik izleme çalışmalarında insan diş dokusunda Ni, Cr, Mn, Pb, Cd, Hg ve Zn birikimlerinin yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir (Nowak ve Chmielnicka, 2000). Appleton ve diğerleri (2000) endüstriyel kirlilikte yaşayan *Clethrionomys glareolus* farelerinin diş dokusunda Pb, Cd, Zn,

Cu ve Sr birikiminin yüksek olduğunu bildirilmiştir. Diş dokusunun özelliklerinin organizmaların yaşam evrelerine göre metal birikiminin belirlenmesine olanak sağladığı da ayrıca belirtilmiştir.

Demir (Fe), oksijen transferi, solunum zincir reaksiyonları, DNA sentezi ve bağışıklık sisteminde işlevleri olan, yaşam için önemli bir eser elementtir, ancak aşırı dozda alındığında kalp hastalığına, kansere ve insülin duyarlılığının bozulmasına neden olmaktadır (Wood, Farrell ve Brauner, 2012). Analizler sonucunda balon balıklarının karaciğerinde ve solungaç dokusunda Fe en yüksek düzeyde gözlemlenmiştir. Fe'nin karaciğer ve solungaç dokusunda en yüksek yoğunlukta bulunmasının nedeni olarak Fe'nin temel özelliklerinin yanı sıra dokuların metabolik aktivitesi ile açıklanabilir.

Çinko (Zn), biyolojik sistemlerde Fe'den sonra ikinci bir öneme sahip olan ve karbonhidrat, protein, lipit ve nükleik asit metabolizmalarının yanı sıra bağışıklık sistemi, sinir iletimi ve hücre iletiminde aktif rol oynayan bir eser elementtir (Murakami ve Hirano, 2008). Gıda ve Tarım Örgütü'ne göre balık türlerinde Zn konsantrasyonu limitleri 98 ile 303  $\mu\text{g/g}^{-1}$  arasında değişmektedir (Dhanakumar, Solaraj ve Mohanraj, 2015). Çalışmamızda Zn en yüksek düzeyde solungaç ( $893,66 \mu\text{g/g}^{-1}$ ) ve karaciğer ( $634,83 \mu\text{g/g}^{-1}$ ) dokularında bulunmuştur. Ağır metallerin ana alım yolları balık solungaçları ve sindirim sistemidir, dolayısıyla solungaç dokusunda en fazla Zn birikimi bu şekilde açıklanabilir. Zn genellikle toksik değildir ve büyüme ve gelişme için küçük bir miktar gereklidir. Ancak, önerilen diyet miktarının (15-100 mg/gün) ötesinde aşırı yüksek Zn alımları bulantı, kusma, uyuşukluk ve yorgunluk gibi belirtilere neden olabilir (Fosmire, 1990).

Selenyum (Se), balıktaki proteinlerin yapısında yer alır ve antioksidan görevi gören selenoprotein adı verilen enzimleri üretir. Se, glutatyon peroksidaz, tioredoksin redüktazlar gibi antioksidan enzimler ve iyodotironin deiyodinazlar gibi seleno enzimler ile tiroid metabolizmasında görev alır. Se'nin toksik etkisi, metionin gibi diğer kükürt içeren aminoasitlerle kombinasyon halinde selenometiyonin üretiminden kaynaklanır. Kuantum noktaları gibi Se içeriğine sahip nanomalzemelerin, *Micropterus salmoides*'te olfaktör ampul yoluyla beyne ulaştığı bildirilmiştir (Bouldin, Ingle, Sengupta, Alexander, Hannigan ve Buchanan, 2018). Bu çalışmada tespit edilen en yüksek Se birikiminin beyin dokusunda olmasının nedeni olarak açıklanabilir.

Arsenik (As) doğada farklı kimyasal formlarda bulunur ve organizmada birikimi ve toksisitesi çevresel faktörlerin etkisiyle kolaylıkla değişebilir. Epidemiyolojik toksisiteyi indeklediğinden, aşırı Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üreterek organizmalara zarar verir. Ayrıca insan üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkiye sahiptir (Gentry, McDonald, Sullivan, Shipp, Yager ve Clewell, 2010). Ayrıca, arseniğe kronik maruziyetin cilt lezyonları, siyah ayak hastalığı, periferik vasküler hastalıklar ve kanserler dâhil olmak üzere arsenikoza yol açabileceği iyi bilinmektedir (Sun, Rathinasabapathi, Wu, Luo, Pu ve Ma, 2015). Bu çalışmada solungaç ve kas dokusunda As birikimi karaciğer dokusuna göre daha fazlaydı. Solungaç dokusundaki As seviyesinin yüksek olması, bu dokunun alım mekanizmasının yanı sıra bir boşaltım mekanizmasına da sahip olmasından kaynaklanabilir. As'ın biyometilasyonu, kas dokusunda saptanan yüksek birikimin nedeni olabilir.

Bakır (Cu) temel bir mikro besindir, ancak yüksek konsantrasyonlarda suda yaşayan organizmalar için toksik hale gelir (Upadhyay ve Panda, 2010). Bu çalışmada Cu beyinde en yüksek düzeyde, kas dokularında ise daha az bulunmuştur. Karaciğer dokusunun fonksiyonel özellikleri açısından daha yüksek düzeyde Cu biriktirdiği bildirilmiştir. Ancak gonad, beyin ve kemik dokularında yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur (Jeziarska ve Witeska, 2016). Papagiannis, Kagalou, Leonardos, Petridis ve Kalfakakou (2004), Pamwotis Gölü'nden alınan dört farklı balık türünde bakırın yüksek konsantrasyonlarda karaciğerde biriktiğini bildirmiştir. Jiang ve diğerleri (2014) Cu'nun potansiyel bir nörotoksik etkiye sahip olduğunu ve *Oncorhynchus mykiss*'in beyin dokusunda birikmesi sonucunda lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu artırarak antioksidan enzim aktivitesinin inhibisyonunu ortaya çıkardığını bildirmiştir.

Krom (Cr) bir hayvanda +3 şeklinde düşük konsantrasyonlarda karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasında görev yapan esansiyel bir element olmasına rağmen, Cr anemi, zosinofili ve lenfositoz gibi bazı balık türleri, bronşiyal ve renal lezyonlar için zehirli etkiye sahiptir. Nehirlerde ve göllerde Cr konsantrasyonu 1 ila 10 ug/L arasında değişir ve EPA'ya göre izin verilen seviye tavsiyesi insan sağlığı ve su yaşamının korunması için 50 ila 100 ug Cr/L arasındadır. Cr, balık gövdelerinde daha az birikmesiyle bilinirken, daha yüksek Cr konsantrasyonları, Cr atma noktasına yakın yüzen balıkların solungaçlarına zarar verir (Afshan ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda Cr, dört farklı balon balığı türünün dış örneklerinde yüksek konsantrasyonlarda olduğu saptanmıştır. Abbas ve Ali (2007) Cr'nin *Oreochromis sp.*'de 43,7 mgL<sup>-1</sup> Cr+6 konsantrasyonunda 24 ve 96 saat etkisinde karaciğer



ve beyinde DNA hasarı tespit edilen yüksek konsantrasyonlarda yüksek oksidasyon kabiliyetine sahip olduğunu bildirmiştir. Ayrıca Cr<sup>+</sup> 6'nın etkileri solungaç, karaciğer ve böbrek dokusunda histopatolojiye neden olmuş, plazma kortizol düzeyini değiştirmiş ve *Channa punktata*'da 2 ve 4 mgL<sup>-1</sup>'lik büyümeyi yavaşlatmıştır (Mishra ve Mohanty, 2009). Ayrıca Cu, Zn ile bağlantılı olarak ilave toksik etkilere de neden olabilir (Schmitt ve Brumbaugh, 1990).

Alüminyum (Al), hayvanlar için esansiyel olmayan bir elementtir, bu nedenle çok düşük konsantrasyonda birikimi bile toksik etkilere neden olur. Bu çalışmada Al, en yüksek dış dokusunda ve ikinci olarak beyin dokusunda karaciğer ve kas dokusundan daha yüksek konsantrasyonlarda birikmiştir. Al'ın ortamdan uzaklaştırılması, dış dokusundaki yüksek Al konsantrasyonunun mineral fazda iyonik Al formunun birikmesi ile açıklanabileceği iyonik veya askıda katı maddeler ile gerçekleştirilir. Beyin dokusundaki yüksek Al konsantrasyonu, bu metalin nörotoksik etkilerini destekler. Al ile kirlenmiş bölgelerde farklı Al formları, farklı balık türlerinin karaciğer, böbrek, iskelet ve solungaç dokularında yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur (Moiseenko ve Kudryavtseva, 2001).

Ağır metal toksinleri, çeşitli olumsuz sağlık etkilerine katkıda bulunur. İnsan sağlığını etkileyebilecek 23'ün üzerinde farklı ağır metal toksini vardır ve her toksin maruz kalan bir bireyde farklı davranışsal, fizyolojik ve bilişsel değişiklikler üretecektir (Dural, Göksu ve Özak, 2007). Balıklardaki ağır metal konsantrasyonlarının bilinmesi hem doğa yönetimi hem de insan sağlığı açısından önemlidir. Metallerin toksisitesi en yaygın olarak beyin ve böbrekte bulunur, ancak arsenik gibi bazı metallerin neden olduğu diğer ortaya çıkan belirtiler insan kanserine neden olabilir (Gentry ve diğerleri, 2010; Sun ve diğerleri, 2014). Biyobirikim, metalle kirlenmiş bölgelerdeki biyotik ve abiyotik faktörlere ve dokular arasındaki fonksiyonel farklılıklara bağlı olarak değişmektedir. Karaciğer ve solungaç, çalışma özellikleri nedeniyle metabolik olarak aktif dokulardır, kas ve dış dokuları ise metabolik olarak daha az aktiftir. Bu nedenle dış dokusu, stabil yapısı nedeniyle dokusunu koruduğu için zamana bağlı izleme çalışmalarına katkı sağlayabilir. Ayrıca dış dokusunun mineral fazı ağır metaller için şelasyon etkisi gösterebilir.

#### 5.1.4. DNA dizileme yöntemi kullanılarak balon balığı türlerinin doğrulanması ve izlenmesi

Tüm dünyada deniz ürünleri ticareti yapılmaktadır. Yanlış etiketlenmiş deniz ürünleriyle bağlantılı olası sağlık riskleri giderek artmaktadır (Tuney, 2016). Akdeniz ve Kızıldeniz kıyılarında yasa dışı veya yanlışlıkla karaya çıkarılan ve deniz ürünü olarak tüketilen balon balıklarının ticareti ve karaya çıkarılması pek çok ülkede yasaklanmıştır (El-Ganainy, Sabrahand ve Zaky, 2006).

Geleneksel morfolojik yöntemler, türlerin çözümlenmesini sağlamak için genellikle yetersizdir. Bu nedenle genetik tanımlama araçları özellikle DNA barkodlama balık türleri için güvenilir araçlar olarak kabul edilmektedir (Nehal, Choudhary, Nagpure ve Gupta, 2021). Bu problemin çözümünde genellikle mtDNA'nın COI, 16s rRNA ve Cyt b gen bölgeleri çalışılmış ve tür tanımlamasında etkili gen bölgeleri olduğu bildirilmiştir (Tuney, 2016; Turan ve diğerleri, 2017a; Ghouri ve diğerleri, 2020).

Tez çalışması kapsamında Türkiye deniz sularında dağılım gösteren üç istilacı balon balığı türü *L. sceleratus*, *S. pachygaster* ve *T. flavimaculosus* Cyt b gen bölgesi kullanılarak DNA barkodlama yöntemiyle araştırılmıştır. Sonuçlar için, üç cins altındaki tüm türler, yüksek bir önyükleme değeri ile NJ ve MP ağaçlarıyla analiz edilmiştir. Ünlversal Cyt b primerleri kullanılarak tüm türlerde hedef bölgeyi büyüterek 388 bp'lik 18 Cyt b barkodu üretildi. Ortak haplotip tespit edilmedi ve DNA barkod dizileri onları ayırdı.

*Lagocephalus sceleratus* sekans sonuçları, Genbank'a Cyt b geni ile kaydedildi ve erişim numarası alındı (MZ512179-MZ675776). Genbank sisteminde kayıtlı olan sırasıyla Türkiye, Mısır, İtalya ve Yunanistan'dan (KP663723.1, KX017842.1, MG878891.1 ve EF362414.1) olan örneklerle % 98,19, % 98,17, % 98,16 ve % 98,10 benzerlik göstermiştir (Kasapidis, Peristeraki, Tserpes ve Magoulas, 2007; Farrag, El-Haweet ve Moustafa, 2015; Tuney, 2016; Giusti ve diğerleri, 2018). Blast sonuçlarına göre, Akdeniz'den gelen on dizi, yüksek düzeyde bir genetik benzerliğe işaret eden %98'den fazla olan yüksek bir kimlik düzeyini yansıttı. Genel olarak, kimlik yüksekliği %98'e yükseldi ve bu sonuçlar *L. sceleratus*'un taksonomik seviyesini onayladı.

*Spherooides pachygaster* sekans sonuçları Genbank'a Cyt b geni ile kaydedildi ve erişim numarası alındı (MZ675777-MZ675779). Genbank sisteminde kayıtlı olan sırasıyla Tayvan, İtalya ve İspanya'dan (FJ434544.1, AY267358.1, JQ681907.1 ve EF392642.1) bildirilen örneklerle %98,71, %98,45, %98,20 ve %98,66 oranında benzerlik göstermiştir (Hsieh ve Hwang, 2004; Bautista, Verrez-Bagnis ve Kourti, 2006; Hsieh, Chang, Chang, Hsieh, Chung ve Hwang, 2010; Santini ve diğerleri 2013). Mitokondriyal DNA tam genomu ile (AP006745.1) ile %98,45 benzerlik gösterdi (Yamanoue ve diğerleri, 2009).

Genbank'a *Torquigener flavimaculosus* türü için Cyt b geninin beş sekans dizisi kaydedildi ve erişim numarası alındı (MZ675780- MZ675784). Genbank sisteminde İtalya'dan sadece bir *T. flavimaculosus* Cyt b gen dizisi bulunmaktadır. Blast sonuçlarına göre, sekanslarımız JQ681936.1 ile %97,53 benzerlik göstermektedir (Santini ve ark. 2013).

Komşu kalıtım (NJ) ve Maksimum Parsimoni ilişkisi, Türkiye kıyılarından elde edilen mevcut dizinin Akdeniz ülkelerindeki diğer çalışmalara daha yakın olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, farklı diziler arasındaki tanımlama farklılıklarıyla açıklanabilir; bununla birlikte, mevcut çalışma ile Akdeniz'de yapılan diğer çalışmalar arasındaki korelasyon %98 olarak bulunmuştur. Bu sonuç iki grubun aynı taksonomik seviyede olduğunu gösterebilir. Potansiyel olarak zehirli bir lesepsiyen türler, son yıllarda Akdeniz'in çoğuna yayılarak halk sağlığı için gerçek bir tehdit oluşturmakta ve deniz ekosistemi üzerinde büyük bir baskı kurmaktadır (Akbora ve diğerleri, 2020). Özellikle zehirli yabancı balık türlerinin morfolojik ve genetik olarak neyin ayırt ettiğini bulmak çok önemlidir (Islam ve diğerleri, 2011; Guardone, Maneschi, Meucci, Gasperetti, Nucera ve Armani, 2020; Zhu, Yang, Fan, Zhou ve Fan, 2021).

## 5.2. *Charybdis longicollis*'in Biyomedikal Alanında Kullanımı

Tez çalışması kapsamında *C. longicollis* kabuklarından kitin ve kitosan elde edildi. İstilacı yabancı yengeç *C. longicollis* kabuğundan ekstrakte edilen kitosan verimi %80,23 olarak tespit edildi. Oduor, Struszczyk ve Peter (2005) tarafından literatürde rapor edilen sonuçlardan daha yüksekti, *Sylla cerrata*'dan %74,6 kitosan verimi elde etti. Kaya ve diğerleri, (2016) *Callinectes sapidus*'tan %76'lık bir kitosan verimi gözlemledi. Bölgen ve diğerleri, (2016) *Callinectes sapidus*'tan %77,78'lik bir kitosan verimi elde etmiştir. Varun, Senani, Kumar, Gautam, Gupta ve Gupta (2017) atık yengeç kabuklarından yaptığı

çalışmada %10,57 oranında kitosan ekstrakte edildiğini bildirmiştir. Ahyat, Mohamad, Ahmad ve Azmi (2017) tarafından yapılan çalışmada *Portunus pelagicus*'tan % 13,56'lık bir kitosan verimi gözlemlenmiştir. Çalışmamız ve diğer çalışmalardaki sonuçlar, yengeçlerin diğer kabuklu organizmalar arasında kitin ve kitosan'ın önemli kaynaklarından biri olduğunu göstermektedir.

Çalışması kapsamında *C. longicollis* kabuklarından elde edilen kitinin XRD analizinde yansımaların  $C_{32}H_{52}O_{20}N_4$  kimyasal formülüne sahip kitin ile eşleştiğini saptanmıştır. Kitinin yansımaları ICDD Kart No: 96-151-6345'te sunulan alfa kitin verileriyle mükemmel bir uyum içindedir (Sikorski, Hori ve Wada, 2009). Hücre parametreleri ICDD kartına çok yakın olan  $a=4,75$ ,  $b = 10,3330$  ve  $c = 18,89$  olarak bulunmuştur. XRD analizi sonuçları, FTIR analizinin sonuçlarını desteklemektedir.

### 5.3. *Diadema setosum*'un Biyomedikal Alanında Kullanımı

Çalışması kapsamında *D. setosum* kabuğunun karakterizasyonu için kitin FTIR ve XRD yöntemleri kullanıldı. FTIR analizi sonuçlarına göre  $714\text{ cm}^{-1}$  piki amorf yapıyı,  $871\text{ cm}^{-1}$  piki kristal yapıyı temsil etmektedir (Yuniarto, Purwanto, Purwanto, Welt, Purwadaria ve Sunarti, 2016). Oluşan bir diğer piklerden  $1078\text{ cm}^{-1}$  piki analiz edilen kabuğun yapısındaki sodyum sülfatı,  $1402\text{ cm}^{-1}$  piki sodyum karbonatı ve  $1638\text{ cm}^{-1}$  piki ise kalsiyum sülfatı karakterize ettiği tespit edilmiştir (Kiefer, Stärk, Kiefer ve Glade, 2018). XRD analizi sonuçlarındaki yansımaların  $Ca_5MgC_6O_{18}$  kimyasal formülüne sahip kalsit ile %91,  $Mg_4O_4$  kimyasal formülüne periklaz ile %9 oranında örtüştüğünü göstermektedir. Bu yansımaları, ICDD veri tabanında sunulan kalsit ve periklaz verileri ile uyum sağlamaktadır (Paquette ve Reeder, 1990; Jacobsen ve diğerleri, 2008). Elde edilen XRD ve FTIR verileri *D. setosum* kabuğunun kalsit bir yapıda olduğunu desteklemektedir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında ülkemiz sularından istilacı türler olarak kabul edilen beş balon balığı türü (*Lagocephalus sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis*, *Sphoeroides pachygaster* ve *Torquigener flavimaculosus*), istilacı lesepsiye yengeç *Charybdis longicollis* ve uzun dikenli denizkestanesi *Diadema setosum*'un biyomedikal endüstrisinde kullanım alanları belirlenerek ekonomiye kazandırılması amaçlanmıştır.

Bu kapsamda *L. sceleratus*'un diş örneklerinde gerçekleştirilen hidroksiapatit ekstraksiyonu sonucunda elde edilen HA'nın elemental kompozisyonunu belirlemek için gerçekleştirilen ICP-MS analizi sonucunda, yapısının %52 kalsiyum ve %39 fosfat, %2,5 manganez, %1,5 magnezyum, %1 titanyum, %0,8 vanadyum ve %3,2 diğer elementlerden oluştuğu saptanmıştır. HA'nın Ca/P oranı 1,32 olarak tespit edilmiştir. HA'nın yapısında bulunan elementlerin nano yapısı, genellikle osteoblast fonksiyonlarının artmasına neden olan iyi biyoaktivite ve osteokondüktivite ile ilişkilidir. Biyolojik apatitlerin insan hücre adezyonun metabolizmaya katkılarında dolayı önemli olan Na, Mg, K ve Sr elementler elde edilen HA'da yüksek seviyelerde tespit edildi. HA üzerinde gerçekleştirilen XRD analizi sonuçlarına göre tüm yoğun yansımalarının  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  kimyasal formülüne sahip hidroksiapatiti gösterdiği tespit edilmiştir. XRD sonuçlarına göre hücre parametreleri  $a = 9,451(1)$ ,  $b = 18,823(1)$  ve  $c = 6,926(2)$  olarak bulundu. XRD sonuçları, *L. sceleratus*'dan elde edilen HA'nın insan dişleriyle uyumlu olduğunu göstermiştir. XRD modellerinde görülen geniş yapı, organik bir matris ile biyolojik olarak mineralize edilmiş düşük kristalli hidroksiapatiti göstermektedir. Hidroksiapatitin ana bileşimi kalsiyum ve fosfattır. XRD analizi sonuçları, element analizinin sonuçlarını desteklemektedir. HA örnekleri yüzeylerinde yapılan SEM analizi sonucunda oval ve plaka şeklinde parçacıklar gözlemlendi. Balon balığı dişlerinin başlangıçta sarı olması yapısındaki kolajen ve diğer organik parçaların varlığını göstermektedir. Dişlerden ekstrakte edilen HA'nın beyaz renge dönüşmesi diş yapısındaki kolajen ve diğer organik kısımların kesin olarak dışlandığını gösterir. Elde edilen HA'nın şekli, iyi biyoaktivite ve esneklik gibi önemli özellikler sağlayabildiğini göstermektedir. Nanoindenter testi ile HA'nın makro ve mikro sertlik ve esneklik durumlarının analizi gerçekleştirildi. Kompozit kitler ile ekstrakte edilen HA'nın birleşimiyle 7'si kontrol grubu, 7'si geliştirilen ürün grubu olacak şekilde toplam 14 grup hazırlanmıştır. Tüm gruplara 50 N yük altında toplam 5 girinti uygulanmıştır. Kontrol

gruplarının elastik modül (Er) ve sertlik testi (H) ortalama değerleri sırasıyla 9,33 ve 0,27 olarak bulunmuştur. Geliştirilmiş ürün grupları için ortalama Er ve H değerleri sırasıyla 9,88 ve 0,40 olarak tespit edilmiştir. Ekstrakte edilen HA ile kompozit dolgu kitlerinin birleşimiyle geliştirilen kompozit dolgu maddesi insan dişine uygulanmış ve daha elastik ve sert bir dolgu oluşturulmuştur. HA ile geliştirilen kompozit dolgunun diş dolgusunda kullanılan standart kompozit dolgudan daha sert ve elastik olduğu sonucuna varılmıştır. *L. sceleratus* dişinden elde edilen HA, dolgu, implant, kemik tozu ve protez üretimi için doğal, orijinal ve alternatif bir ürün kaynağı olarak kullanılabilceği ortaya çıkarmıştır.

Çalışma kapsamında, *L. sceleratus* derisinden Asitte Çözünür Kolajen yöntemi kullanılarak kolajen ve jelatin ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonucunda kolajen oranı %50,9, jelatin miktarı ise %20,63 olarak saptanmıştır. Gerçekleştirilen nem, protein içerikleri ve aminoasit analizleri sonucunda, kolajenin nem içeriği %75,1, protein içeriği %2,45. Ekstrakte edilen kolajenin aminoasit bileşimindeki glisin konsantrasyonu %35,1 olarak bulundu. Kolajende bulunan diğer aminoasitlerin diğer en yüksek içeriği imino asit (%17,2), alanin (%15,01), hidroksprolin (%7,2), glutamik asit (%6,8) ve prolin (%5,6) olarak tespit edilmiştir. Kolajen ve jelatine gerçekleştirilen SDS-PAGE analizi sonucunda Ekstrakte edilen kolajen  $\alpha 1$  ve  $\alpha 2$  zincirlerinden oluştuğu ve  $\alpha 1$  zincirlerinin bant yoğunluğu,  $\alpha 2$  zincirlerinininkinden yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu gözlemlendi. Ayrıca ekstrakte edilen kolajende yüksek moleküler ağırlıkta  $\beta$  bileşeni ve az miktarlarda  $\gamma$  bileşeni gözlemlendi. Yapılan kolajen ve jelatin analizi sonuçlarına göre balon balıklarının deri atıklarının kullanılması, endüstriyel amaçlar için kullanılan sığır ve domuz kolajenlerine alternatif bir kaynak olarak kullanılabilir ve ülkemizde ve Akdeniz'de istilacı tür olarak kabul edilen balon balıkları bu sayede ekonomiye kazandırılabilir.

Tez çalışması kapsamında ülkemizde yaygın olarak dağılım gösteren balon balığı türleri olan *Lagocephalus sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis* ve *Torquigener flavimaculosus*, dişlerinin kirlilik için çevresel indikatör olarak kullanılabilceği ortaya çıkarılmıştır. Bu türlerden alınan yumuşak dokuların (kas, solungaç, karaciğer ve beyin) ve dişlerin ağır metal birikimi analizleri için ICP-MS analiz yöntemi kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre, Fe, Se, As, Zn, Cu, Cr, Al elementleri *L. sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis* ve *T. flavimaculosus* dokularında önemli düzeyde bulunurken ( $P < 0.05$ ), Co, Ni, Mo, Cd, Pb tüm dokularda tespit limitleri altında bulundu ( $P > 0.05$ ). Diş dokusunda Al ve Zn metalleri *L. spadiceus*'ta, Cr ve As metalleri ise *T. flavimaculosus*'ta diğer türlere göre daha yüksek

bulundu. Diş ve yumuşak dokulardaki ağır metal düzeylerinin karşılaştırmaları sonucunda diş dokusundaki metal seviyelerinin beyin dokusuna benzer olduğu saptanmıştır. Tüm dokularda alüminyuma rastlandı. Karaciğer ve solungaç dokuları birbirleriyle aynı biyobirikim özelliklerini göstermiştir. Zn dokular arasında en yüksek birikime sahiptir ( $P<0.05$ ). Dokularda incelenen her metalin birikim seviyeleri, Cr, Al ve Cu'nun diş ve beyin dokularında diğer dokulara göre daha fazla biriktiği tespit edilmiştir. Kas dokusu en düşük birikimi göstermesine rağmen, As ve Se, kas dokusunda incelenen diğer metallere daha yüksek konsantrasyonda olduğu ortaya çıkmıştır. Selenyum diş dokusunda tespit edilmemiştir. Cu, Cr ve As diğer türlere göre *T. flavimaculosus*'ta, Zn ve Se *L. spadiceus*'da daha yüksek bulunmuştur. Balıklardaki ağır metal konsantrasyonlarının bilinmesi hem doğa yönetimi hem de insan sağlığı açısından önemlidir. Metallerin toksisitesi en yaygın olarak beyin ve böbrekte bulunur, ancak arsenik gibi bazı metallerin neden olduğu diğer ortaya çıkan belirtiler insan kanserine neden olabilir. Biyoakümülyasyon, metalle kirlenmiş bölgelerdeki biyotik ve abiyotik faktörlere ve dokular arasındaki fonksiyonel farklılıklara bağlı olarak değişmiştir. Karaciğer ve solungaç, çalışma özellikleri nedeniyle metabolik olarak aktif dokulardır, kas ve dentin dokuları ise metabolik olarak daha az aktiftir. Bu nedenle dentin dokusu, stabil yapısı nedeniyle dentin dokusunu koruduğu için zamana bağlı izleme çalışmalarına katkı sağlayabilir. Ayrıca dentin dokusunun mineral fazı ağır metaller için şelasyon etkisi gösterebilir. Sonuç olarak, analiz edilen metaller ve dokular açısından her balon balığı türünde farklı biyobirikim seviyeleri bulunmuştur. Balon balıklarında Fe, Se, As, Zn, Cu, Cr ve Al birikimi, deniz ortamlarında metal kirliliğinin izlenmesi için etkin bir şekilde kullanılabilir. Balon balığı diş dokusunda metallerin birikimi  $Al>Zn>Cr>Fe>As>Cu$  olarak belirlendi ve çalışma sonucunda balıklarda diş dokularının ağır metallerin biyobirikimi için bir gösterge dokusu olarak kullanılabilirliği ortaya çıkarıldı.

Çalışma kapsamında ülkemizde ve Akdeniz'de karaya çıkarılması yasak olan balon balığı türlerinden olan *L. sceleratus*, *S. pachygaster* ve *T. flavimaculosus* tüketilmesi halinde takibinin yapılabilmesi için DNA barkodlama yöntemi ile barkodları oluşturulmuştur. DNA barkodlaması için öncelikle türlerden kas, yüzgeç, deri ve iskeletinden doku örnekleri alınmış ve standart fenol kloroform yöntemi modifiye edilerek mtDNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'lar mtDNA sitokrom B (Cyt b) gen bölgesi kullanılarak PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. PZR sonucunda 18 Cyt b sekansı elde edilmiş ve bunların uzunluğu 388 bp olarak bulunmuştur. Bunun 122 bp değişken bölge ve 266 bp konservatif bölge ve 110 bp bilgilendirici bölge olarak tespit edilmiştir. Ortalama nükleotid

bileşimi %28 timin (T), %30,7 sitozin (C), %24,8 adenin (A) ve %16,6 guanin (G) şeklinde bulunmuştur. Analiz edilen 18 sekansta on iki haplotip bulundu ve ortak haplotip tespit edilmedi. Ortalama haplotip çeşitliliği 0,9346 olarak bulundu. Elde edilen 18 sekans için Genbank'tan MZ 512179-MZ 512196 kodlarıyla erişim numaraları alınmıştır. Türler arası ortalama genetik çeşitlilik 0,1502 olarak gözlemlendi. En düşük genetik çeşitlilik *L. sceleratus* ve *S.pachygaster* (0,2209) arasında, en yüksek ise *L. sceleratus* ve *T. flavimucolus* (0,26127) arasında gözlemlendi. En yüksek genetik çeşitlilik ise *T. flavimucolus*'ta gözlenmiştir (0,0146). Bu çalışma ile tespit edilen barkodlar sayesinde *L. sceleratus*, *S. pachygaster* ve *T. flavimucolus* türlerinin tanımlanmasında Cyt b'nin etkinliğini güçlü bir şekilde çalıştığı ortaya çıkarılmıştır. Genbank'a kaydedilen bu barkodlar, ülkemizin Doğu Akdeniz kıyılarından Cyt b gen dizisi ile kaydedilmiş barkodlardır. GenBank veri tabanında Akdeniz'de *L. sceleratus* ve *S. pachygaster* Cyt b gen dizisine ait az sayıda veri bulunmaktadır ve ayrıca *T. flavimucolus* İtalya'dan sadece bir Cyt b gen dizisi mevcuttur. Mevcut sonuçlar ayrıca, Cyt b barkodlarının Akdeniz'deki balon balığı türlerinin tanımlanması, yönetimini ve izlenmesi için pragmatik bir yöntem olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

Tez çalışması kapsamında kullanılan bir diğer tür istilacı lesepsiyen yengeç *C. longicollis*'dir. İstilacı lesepsiyen yengecin ülkemiz ekonomisine kazandırılması ve biyomedikal alanında kullanılabilceğini ortaya çıkarmak için kabuğundan kitin ve kitosan başarılı bir ekstrakte edilmiştir. Yaş ağırlık durumundaki kurutulmuş ve öğütülmüş yengeç kabuklarından %25,78 oranında kitin elde edildi. Ekstre edilen kitinden üretilen kitosan verimi ise %80,23 olarak tespit edildi. Elde edilen kitin ve kitosan ürünlerine yapılan kül ve su tutma kapasitesi analizleri sonuçları sırasıyla %5,07, %275,6 ve %8,12 ve %595,78 olarak bulunmuştur. *C. longicollis*'ten elde edilen kitin fourier transform kızılötesi spektrometresi (FTIR) ile analiz edildi. Oluşan piklerden 1063  $\text{cm}^{-1}$  piki anomerik karbonun C-H bağlarından kaynaklanan anomerik karbonun varlığı tespit edildi. Ekstrakte edilen kitinde bulunan glukopiranoz siklik kalıntıları (C-H eksenindeki 1063  $\text{cm}^{-1}$  piki) elde edilen kitini karakterize etmek için kullanıldı. Elde edilen bu sonuçlar, proteinlerin yanı sıra aminopolisakarit alfa kitin içeren bir yapı göstermektedir. *C. longicollis*'den elde edilen kitine XRD analizi yapılarak kristal yapısı belirlendi. XRD analizi sonucunda oluşan tüm yansımaların  $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_{20}\text{N}_4$  kimyasal formülüne sahip kitin ile örtüştüğünü tespit edildi. Elde edilen kitinin hücre parametreleri  $a = 4,75$ ,  $b = 10,3330$  ve  $c = 18,89$  şekilde bulundu. Elde edilen XRD sonuçları FTIR analiz sonuçlarını desteklemektedir. Bu çalışma sonucunda



yengeçlerin diğer kabuklu organizmalara göre kitin ve kitosanın önemli kaynaklarından biri olduğunu doğrulandı. Yapılan analizler sonucunda *C. longicollis* kabuklarından elde edilen kitin ve kitosanın farmasötik ve biyomedikal uygulamalar için uygun özelliklere sahip olduğu tespit edildi. Böylelikle ülkemizde istilacı türlerden biri olan *C. longicollis*'in kitin ve kitosan için alternatif bir kaynak olduğu ve ekonomik potansiyelinin yüksek olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Tez kapsamında son olarak bir başka istilacı tür olan uzun dikenli denizkestanesi *D. setosum* kullanılmıştır. *D. setosum* kabuğuna yapılan FTIR analizleri sonucunda oluşan piklerden  $714\text{ cm}^{-1}$  ve  $871\text{ cm}^{-1}$  piki sırasıyla amorf ve kristal yapıyı tespit ettiği belirlenmiştir. Oluşan bir diğer pik olan  $1078\text{ cm}^{-1}$  piki analiz edilen kabuğun yapısındaki sodyum sülfatı,  $1402\text{ cm}^{-1}$  piki sodyum karbonatı ve  $1638\text{ cm}^{-1}$  piki ise kalsiyum sülfatı karakterize etmektedir. XRD analizi ile yapısı belirlenen uzun dikenli denizkestanesi kabuğunun tüm yansımaların  $\text{Ca}_5\text{MgC}_6\text{O}_{18}$  kimyasal formülüne sahip kalsit ile %91,  $\text{Mg}_4\text{O}_4$  kimyasal formülüne periklaz ile %9 oranında örtüştüğünü tespit edilmiştir. *D. setosum* kabuğunun hücre parametreleri  $a = 4,9380$ ,  $b = 4,9380$  ve  $c = 16,8320$  şekilde bulunmuştur. Elde edilen XRD ve FTIR verileri *D. setosum* kabuğunun kalsit bir yapıda olduğunu desteklemektedir. Kalsit yapıda olduğu tespit edilen *D. setosum* kabuğu birçok alanda kullanılabilir. Bunlara örnek olarak kâğıt, boya, plastik, inşaat, gıda, seramik ve ilaç sektörü gibi sektörler örnek gösterilebilir. Uzun dikenli denizkestanesinin bulunabilirliği ve ulaşılabilirliği yüksek olduğundan bu sektörler için oldukça ekonomik bir ürün haline gelebilir ve bu sayede ülkemiz sularındaki bir istilacı türde ekonomimize kazandırılacaktır.

Tez çalışması kapsamında çalışılan lesepsiyen türler kendi sularımızdaki yerli türler üzerinde baskı kurarak hem ekolojik hemde ekonomik yönde negatif sonuçlar doğuran türlerdir. Çalışmada kullanılan balon balıkları (*L. sceleratus*, *L. spadiceus*, *L. suezensis*, *S. pachygaster* ve *T. flavimaculosus*), istilacı lesepsiyen yengeç (*C. longicollis*) ve uzun dikenli denizkestanesi (*D. setosum*) bu istilacı türlerin başında gelmektedirler. Bu türlerin insanlar tarafından tüketilmemesi ekosistemde sayılarının giderek artmasına ve baskın hale gelmesine neden olmaktadır. Bu tez çalışması sayesinde türlerin hangi alanlarda ve nasıl kullanılacağı ortaya çıkarılmış ve başarılı bir şekilde ürünler elde ederek ekonomiye kazandırılması sağlanmıştır. Bu tez çalışması sonucunda, istilacı yabancı türler ile mücadele yöntemi olarak en güvenilir yolunun bu türlerin ekonomiye kazandırılması olduğu ortaya çıkarılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Abbas, H. H., ve Ali, F. K. (2007). Study the effect of hexavalent chromium on some biochemical, citotoxicological and histopathological aspects of the *Oreochromis spp.* fish. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(22), 3973-3982.
- Abdel-Aal, M. M. (2008). Effects of over-wintering and water depth on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In *Proceedings of the 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. 297-306.
- Afshan, S., Ali, S., Ameen, U.S., Farid, M., Bharwana, S.A., Hannan, F., ve Ahmad, R. (2014). Effect of different heavy metal pollution on fish, *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*, 2(1), 74-79.
- Ahyat, N. M., Mohamad, F., Ahmad, A., ve Azmi, A. A. (2017). Chitin and chitosan extraction from *Portunus pelagicus*. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 21(4), 770-777.
- Akbora, H. D., Kunter, İ., Erçetin, T., Elagöz, A. M., ve Çiçek, B. A. (2020). Determination of tetrodotoxin (TTX) levels in various tissues of the silver cheeked puffer fish (*Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789)) in Northern Cyprus Sea (Eastern Mediterranean). *Toxicol*, 175, 1-6.
- Al Shaqsi, N. H. K., Al Hoqani, H. A. S., Hossain, M. A., ve Al Sibani, M. A. (2020). Isolation, characterization and standardization of demineralization process for chitin polymer and minerals from the crabs waste of *Portunidae segnis*. *Advances in Biomarker Sciences and Technology*, 2, 45-58.
- Alparslan, Y., Baygar, T., ve Baygar, T. (2017). Extraction, characterization and antimicrobial activity of hydroxyapatite from seabass and seabream scale. *Food and Health*, 3(3), 90-96.
- Antoine, F. R., Wei, C. I., Littell, R. C., ve Marshall, M. R. (1999). HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-phthaldialdehyde precolumn derivatization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 5100-5107.
- Antonakos, A., Liarokapis, E., ve Leventouri, T. (2007). Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials*, 28(19), 3043-3054.
- Appleton, J., Lee, K. M., Kapusta, K. S., Damek, M., ve Cooke, M. (2000). The heavy metal content of the teeth of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) as an exposure marker of environmental pollution in Poland. *Environmental Pollution*, 110(3), 441-449.
- Arjunan, A., Baroutaji, A., Robinson, J., Praveen, A. S., Pollard, A., ve Wang, C. (2021). Future directions and requirements for tissue engineering biomaterials. In *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, Elsevier. 1-25.
- Asaduzzaman, K., Khandaker, M. U., Baharudin, N. A. B., Amin, Y. B. M., Farook, M. S., Bradley, D. A., ve Mahmoud, O. (2017). Heavy metals in human teeth dentine: A bio-indicator of metals exposure and environmental pollution. *Chemosphere*, 176, 221-230.
- Ayas, D., ve Kosker, A. R. (2018). The effects of age and individual size on metal accumulation of *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from Mersin Bay, Turkey. *Natural and Engineering Sciences*, 3(1), 45-53.
- Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A., ve Hara, K. (2008). Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. *Food Chemistry*, 108(1), 49-54.

- Baehaki, A., Widiastuti, I., Nainggolan, C. H., ve Gofar, N. (2002). Antioxidant activities of snakehead (*Channa Striat*) fish skin: peptides hydrolysis using protease TP2 isolate from swamp *Plant Silage*. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 14, 379-384.
- Bahrololoom, M. E., Javidi, M., Javadpour, S., ve Ma, J. (2009). Characterisation of natural hydroxyapatite extracted from bovine cortical bone ash. *Journal of Ceramic Processing Research*, 10(2), 129-138.
- Balasundaram, G., Sato, M., ve Webster, T. J. (2006). Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials*, 27(14), 2798-2805.
- Bautista, J. M., Verrez-Bagnis, V., ve Kourti, N. (2006). Genetic catalogue, biological reference collections and online database of European marine fishes.
- Berger, L. R. R., Stamford, T. C. M., Stamford-Arnaud, T. M., De Alcântara, S. R. C., Da Silva, A. C., Da Silva, A. M., Do Nascimento, A. E., ve Maria, G. (2014). Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 9082-9102.
- Bergmann, W., ve Feeney, R. J. (1951). Contributions to the Study of Marine Products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. *The Journal of Organic Chemistry*, 16(6), 981-987.
- Bernabé, P., Becherán, L., Cabrera-Barjas, G., Nesic, A., Alburquenque, C., Tapia, C. V., ve De Los Ríos, P. (2020). Chilean crab (*Aegla cholchol*) as a new source of chitin and chitosan with antifungal properties against *Candida spp*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 962-975.
- Best, S. M., Porter, A. E., Thian, E. S., ve Huang, J. (2008). Bioceramics: past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society*, 28(7), 1319-1327.
- Biazar, E., Daliri J, M., Heidari K, S., Navayee A, D., Kamalvand, M., Sahebalzamani, M., ve Farajpour L, F. (2020). Characterization and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles extracted from fish bone. *Journal of Bioengineering Research*, 2(2), 10-19.
- Bischel, M. S., Vanlandingham, M. R., Eduljee, R. F., Gillespie, J. W., ve Schultz, J. M. (2000). On the use of nanoscale indentation with the AFM in the identification of phases in blends of linear low density polyethylene and high density polyethylene. *Journal of Materials Science*, 35(1), 221-228.
- Blin, N., ve Stafford, D. W. (1976). A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 3(9), 2303-2308.
- Boaventura, T. P., Peres, A. M., Gil, V. S., Gil, C. S., Oréfice, R. L., ve Luz, R. K. (2020). Reuse of collagen and hydroxyapatite from the waste processing of fish to produce polyethylene composites. *Química Nova*, 43, 168-174.
- Bollinger, A., Thies, S., Katzke, N., ve Jaeger, K. E. (2020). The biotechnological potential of marine bacteria in the novel lineage of *Pseudomonas pertucinogena*. *Microbial Biotechnology*, 13(1), 19-31.
- Bouldin, J. L., Ingle, T. M., Sengupta, A., Alexander, R., Hannigan, R. E., ve Buchanan, R. A. (2008). Aqueous toxicity and food chain transfer of quantum dots™ in freshwater algae and *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(9), 1958-1963.
- Boustany, L., El Indary, S., ve Nader, M. (2015). Biological characteristics of the Lessepsian pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) off Lebanon. *Cahiers de Biologie Marine*, 56, 137-142.

- Boutinguiza, M., Pou, J., Comesaña, R., Lusquiños, F., De Carlos, A., ve León, B. (2012). Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. *Materials Science and Engineering: C*, 32(3), 478-486.
- Bölgen, N., Demir, D., Öfkeli, F., ve Ceylan, S. (2016). Extraction and characterization of chitin and chitosan from blue crab and synthesis of chitosan cryogel scaffolds. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 3(3), 131-144.
- Calvo, P., Remuñan-López, C., Vila-Jato, J. L., ve Alonso, M. J. (1997). Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharmaceutical Research*, 14(10), 1431-1436.
- Cardoso, A., Lins, C. I. M., Dos Santos, E. R., Silva, M. C. F., ve Campos-Takaki, G. M. (2012). Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. *Molecules*, 17(5), 4904-4914.
- Carvalho, L., Mackay, E. B., Cardoso, A. C., Baattrup-Pedersen, A., Birk, S., Blackstock, K. L., ve Solheim, A. L. (2019). Protecting and restoring Europe's waters: An analysis of the future development needs of the Water Framework Directive. *Science of the Total Environment*, 658, 1228-1238.
- Chatterjee, S., ve Guha, A. K. (2014). A study on biochemical changes during cultivation of *Rhizopus oryzae* in deproteinized whey medium in relation to chitosan production. *Letters in Applied Microbiology*, 59(2), 155-160.
- Chen, J., Li, M., Yi, R., Bai, K., Wang, G., Tan, R., ve Xu, N. (2019). Electrodialysis extraction of pufferfish skin (*Takifugu flavidus*): a promising source of collagen. *Marine Drugs*, 17(1), 25.
- Chevalier, J., ve Gremillard, L. (2009). Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years. *Journal of the European Ceramic Society*, 29(7), 1245-1255.
- Chung, S. M., ve Yap, A. U. J. (2005). Effects of surface finish on indentation modulus and hardness of dental composite restoratives. *Dental Materials*, 21(11), 1008-1016.
- Constantinides, G., Kalcioğlu, Z. I., McFarland, M., Smith, J. F., ve Van Vliet, K. J. (2008). Probing mechanical properties of fully hydrated gels and biological tissues. *Journal of Biomechanics*, 41(15), 3285-3289.
- Cragg, G. M., ve Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3670-3695.
- Crespo, M. P., Martínez, M. V., Hernández, J. L., ve Yusty, M. L. (2006). High-performance liquid chromatographic determination of chitin in the snow crab, *Chionoecetes opilio*. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 189-192.
- Da Cruz, J. A., Weinand, W. R., Neto, A. M., Palácios, R. S., Sales, A. J. M., Prezas, P. R., ve Graça, M. P. F. (2020). Low-cost hydroxyapatite powders from tilapia fish. *Advanced Manufacturing for Biomaterials and Biological Materials*, 72(4), 1435-1442.
- Dhanakumar, S., Solaraj, G., ve Mohanraj, R. (2015). Heavy metal partitioning in sediments and bioaccumulation in commercial fish species of three major reservoirs of river Cauvery delta region, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 145-151.
- Doğdu, S., Turan, C., ve Ayas, D. (2019). Isolation and characterization of collagen and jelatin from skin of silver cheeked pufferfish *Lagocephalus sceleratus* for pharmaceutical and biomedical applications. *Natural and Engineering Sciences*, 4(3), 308-314.
- Doğdu, S. A., Turan, C., Depci, T., Ayas, D. (2021). Natural hydroxyapatite obtained from pufferfish teeth for potential dental application. *Journal of Ceramic Processing Research*, 22(3), 356-361.
- Dronavalli, S. B. (2004). *Residual stress measurements and analysis by destructive and non-destructive techniques*. University of Nevada, Las Vegas.

- Dural, M., Göksu, M. Z. L., ve Özak, A. A. (2007). Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. *Food Chemistry*, 102(1), 415-421.
- Eken, M., Aydın, F., Turan, F., Uyan, A. (2017). Bioaccumulation of Some Heavy Metals on Silver-Cheeked Toadfish (*Lagocephalus sceleratus*) from Antalya Bay, Turkey. *Natural and Engineering Sciences*, 2(3): 12-21.
- Eken, M., Turan, F., Aydın, F., ve Karan, S. (2018). Determination of Heavy Metal Concentrations in Lessepsian Suez Puffer (*Lagocephalus suezensis* Clark and Gohar, 1953) from North-Eastern Mediterranean. *Natural and Engineering Sciences*, 3(2), 169-178.
- El-Ganainy, A.A., Sabrahand, M.M., Zaky, M.A. (2006). Biology and toxicity of the pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from the Gulf of Suez. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 32(1): 283-297.
- Eppell, S. J., Tong, W., Katz, J. L., Kuhn, L., ve Glimcher, M. J. (2001). Shape and size of isolated bone mineralites measured using atomic force microscopy. *Journal of Orthopaedic Research*, 19(6), 1027-1034.
- Ergüden, D., ve Doğdu, S. A. (2020). Age, growth and mortality estimates of *Sillago suezensis* from Iskenderun Bay, northeastern Mediterranean Sea. *Cahiers de Biologie Marine*, 61, 81-90.
- Farrag, M., El-Haweet, A. A., ve Moustafa, M. A. (2016). Occurrence of puffer fishes (Tetraodontidae) in the eastern Mediterranean, Egyptian coast-filling in the gap. *BioInvasions Record*, 5(1), 47-54.
- Fewster, P. F., Andrew, N. L., Holý, V., ve Barmak, K. (2005). X-ray diffraction from polycrystalline multilayers in grazing-incidence geometry: Measurement of crystallite size depth distribution. *Physical Review B*, 72(17), 174105.
- Foegeding, E. A., Lanier, T. C., ve Hultin, H. O. (1996). Collagen. *Food Chemistry*, 3, 902-906.
- Fosmire, G. J. (1990). Zinc toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 51(2), 225-227.
- Fosse, G., ve Justesen, N. P. B. (1978). Zinc and copper in bone and teeth of mice. *International Journal of Environmental Studies*, 12(2), 111-120.
- Froese, R. ve D. Pauly. (2021). FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (06/2021).
- Frogliá, C. (2012). First record of *Charybdis japonica* (Crustacea: Decapoda: Portunidae) in the Mediterranean Sea. *Marine Biodiversity Records*, 5, 1-3.
- Gentry, P. R., McDonald, T. B., Sullivan, D. E., Shipp, A. M., Yager, J. W., ve Clewell III, H. J. (2010). Analysis of genomic dose-response information on arsenic to inform key events in a mode of action for carcinogenicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(1), 1-14.
- Ghourri, M. Z., Ismail, M., Javed, M. A., Khan, S. H., Munawar, N., Umar, A. B., ve Ahmad, A. (2020). Identification of edible fish species of Pakistan through DNA barcoding. *Frontiers in Marine Science*, 7, 1-11.
- Giusti, A., Ricci, E., Guarducci, M., Gasperetti, L., Davidovich, N., Guidi, A., ve Armani, A. (2018). Emerging risks in the European seafood chain: Molecular identification of toxic *Lagocephalus spp.* in fresh and processed products. *Food Control*, 91, 311-320.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. A., ve Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and jelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827.

- Guardone, L., Maneschi, A., Meucci, V., Gasperetti, L., Nucera, D., ve Armani, A. (2020). A global retrospective study on human cases of tetrodotoxin (TTX) poisoning after seafood consumption. *Food Reviews International*, 36(7), 645-667.
- Guerra-Sanchez, M. G., Vega-Pérez, J., Velazquez-Del Valle, M. G., ve Hernandez-Lauzardo, A. N. (2009). Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. by effect of chitosan with different molecular weights. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(1), 18-22.
- Gullapalli, R. P., ve Mazzitelli, C. L. (2017). Jelatin and non-jelatin capsule dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(6), 1453-1465.
- Gürlek, M., Erguden, D., Dogdu, S. A., ve Turan, C. (2016). First record of greenback horse mackerel, *Trachurus declivis* (Jenyns, 1841) in the Mediterranean Sea. *Journal of Applied Ichthyology*, 32(5), 976-977.
- Gündüz, H., Öztürk, F., Hamzacebi, S., ve Akpınar, M. D. (2018). The assessment of seafood processing waste. *Aquatic Sciences and Engineering*, 33(1), 1-5.
- Güven, S. Y. (2010). Ortopedik malzemelerin biyouyumlulukları ve mekanik Özelliklerine göre seçimi. In *2nd National Design and Manufacturing Congress*. 27-29 Temmuz 2019. Balıkesir, 472-484.
- Hall, T., Biosciences, I., ve Carlsbad, C. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*, 2(1), 60-61.
- Hasan, M. R., Ghazali, M. S. M., ve Mohtar, N. F. (2021). Correlation of heating profile with calcination temperature for the extraction of nano hydroxyapatite (Nano-HAp) derived from bone. *Journal of Mechanical Engineering and Sciences*, 15(1), 7807-7823.
- Haug, I. J., ve Draget, K. I. (2011). Jelatin. In *Handbook of food proteins*. Woodhead Publishing. 92-115
- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., ve Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812-14817.
- Holthuis, L. B. (1961). Report on a collection of Crustacea Decapoda and Stomatopoda from Turkey and the Balkans. *Zoologische Verhandelingen*, 47(1), 1-67.
- Hossain, J., ve Jahan, R. (2021). Biofuel: Marine Biotechnology Securing Alternative Sources of Renewable Energy. In *Advances in the Domain of Environmental Biotechnology*. Singapur: Springer, 161-194.
- Hsieh, Y. W., ve Hwang, D. F. (2004). Molecular phylogenetic relationships of puffer fish inferred from partial sequences of cytochrome b gene and restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4159-4165.
- Hsieh, C. H., Chang, W. T., Chang, H. C., Hsieh, H. S., Chung, Y. L., ve Hwang, D. F. (2010). Puffer fish-based commercial fraud identification in a segment of cytochrome b region by PCR-RFLP analysis. *Food Chemistry*, 121(4), 1305-1311.
- Huang, L., Bi, S., Pang, J., Sun, M., Feng, C., ve Chen, X. (2020). Preparation and characterization of chitosan from crab shell (*Portunus trituberculatus*) by NaOH/urea solution freeze-thaw pretreatment procedure. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 931-936.
- Huang, Y. C., Hsiao, P. C., ve Chai, H. J. (2011). Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. *Ceramics International*, 37(6), 1825-1831.
- Huang, Y., Wang, Y., Ning, C., Nan, K., ve Han, Y. (2007). Hydroxyapatite coatings produced on commercially pure titanium by micro-arc oxidation. *Biomedical Materials*, 2(3), 196.

- Hwang, J. H., Mizuta, S., Yokoyama, Y., ve Yoshinaka, R. (2007). Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja kenoei*). *Food Chemistry*, 100(3), 921-925.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., ve Mann, S. (2003). Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticas*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 32(3-5), 199-204.
- Islam, Q. T., Razzak, M. A., Islam, M. A., Bari, M. I., Basher, A., Chowdhury, F. R., ve Mebs, D. (2011). Puffer fish poisoning in Bangladesh: clinical and toxicological results from large outbreaks in 2008. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(2), 74-80.
- Iswariya, S., Velswamy, P., ve Uma, T. S. (2018). Isolation and characterization of biocompatible collagen from the skin of puffer fish (*Lagocephalus inermis*). *Journal of Polymers and the Environment*, 26(5), 2086-2095.
- Jacobsen, S. D., Holl, C. M., Adams, K. A., Fischer, R. A., Martin, E. S., Bina, C. R., ve Dera, P. (2008). Compression of single-crystal magnesium oxide to 118 GPa and a ruby pressure gauge for helium pressure media. *American Mineralogist*, 93(11-12), 1823-1828.
- Jeziarska, B., ve Witeska, M. (2006). The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters. In *Soil and water pollution monitoring, protection and remediation*, Springer, Dordrecht, 107-114.
- Jiang, W. D., Liu, Y., Hu, K., Jiang, J., Li, S. H., Feng, L., ve Zhou, X. Q. (2014). Copper exposure induces oxidative injury, disturbs the antioxidant system and changes the Nrf2/ARE (CuZnSOD) signaling in the fish brain: protective effects of myo-inositol. *Aquatic Toxicology*, 155, 301-313.
- Joschek, S., Nies, B., Krotz, R., ve Göpferich, A. (2000). Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone. *Biomaterials*, 21(16), 1645-1658.
- Karim, A. A., ve Bhat, R. (2009). Fish jelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian jelatins. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 563-576.
- Karunanidhi, K., Rajendran, R., Pandurangan, D., ve Arumugam, G. (2017). First report on distribution of heavy metals and proximate analysis in marine edible puffer fishes collected from Gulf of Mannar Marine Biosphere Reserve, South India. *Toxicology Reports*, 4, 319-327.
- Kasapidis, P., Peristeraki, P., Tserpes, G., ve Magoulas, A. (2007). First record of the lessepsian migrant *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin 1789) (Osteichthyes: Tetraodontidae) in the Cretan sea (Aegean, Greece). *Aquatic Invasions*, 2(1), 71-73.
- Kaya, M., Baran, T., ve Karaarslan, M. (2015). A new method for fast chitin extraction from shells of crab, crayfish and shrimp. *Natural Product Research*, 29(15), 1477-1480.
- Kaya, M., Dudakli, F., Asan-Ozusaglam, M., Cakmak, Y. S., Baran, T., Menten, A., ve Erdogan, S. (2016). Porous and nanofiber  $\alpha$ -chitosan obtained from blue crab (*Callinectes sapidus*) tested for antimicrobial and antioxidant activities. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 1109-1117.
- Kenney, M. (1986). Schumpeterian innovation and entrepreneurs in capitalism: A case study of the US biotechnology industry. *Research Policy*, 15(1), 21-31.
- Khalaf, G., Saad, A., Jemaa, S., Sabour, W., Lteif, M., ve Lelli, S. (2014). Population structure and sexual maturity of the pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Osteichthyes, Tetraodontidae) in the Lebanese and Syrian marine waters (Eastern Mediterranean). *Journal of Earth Science and Engineering*, 4, 1-9.

- Kiefer, J., Stärk, A., Kiefer, A. L., ve Glade, H. (2018). Infrared spectroscopic analysis of the inorganic deposits from water in domestic and technical heat exchangers. *Energies*, 11(4), 798.
- Kim, S. K., ve Venkatesan, J. (2013). Introduction to marine biomaterials. In *Marine Biomaterials. Characterization, Isolation and Application*, 3-16.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., ve Shahidi, F. (2010). Isolation and characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry*, 119(4), 1519-1526.
- Kongsri, S., Janpradit, K., Buapa, K., Techawongstien, S., ve Chanthai, S. (2013). Nanocrystalline hydroxyapatite from fish scale waste: Preparation, characterization and application for selenium adsorption in aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 215, 522-532.
- Kosker, A. R., Ozogul, F., Durmus, M., Ucar, Y., Ozogul, Y., Boga, E., ve Ayas, D. (2018). Seasonal changes in proximate composition and mineral-heavy metal content of pufferfish (*Lagocephalus sceleratus*) from northeastern Mediterranean sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(11), 1269-1278.
- Kosker, A. R., Ozogul, F., Ayas, D., Durmus, M., ve Ucar, Y. (2019). Elemental composition of pufferfish species from Northeastern Mediterranean Sea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(6), 1-15.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., ve Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547.
- Kumari, S., Paul, S., Jayan, A., Sasikumar, C. S., ve Cherian, S. M. (2014). Extraction and purification of chitosan from chitin isolated from sea prawn *Fenneropenaeus indicus*. *Extraction*, 7(4), 201-204.
- Kurita, K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer science*, 26(9), 1921-1971.
- Laemmli, U. K. (1970). SDS-page Laemmli method. *Nature*, 227, 680-685.
- Landi, E., Celotti, G., Logroscino, G., ve Tampieri, A. (2003). Carbonated hydroxyapatite as bone substitute. *Journal of the European Ceramic Society*, 23(15), 2931-2937.
- Latif, A. F. A., Mohd Pu'ad, N. A. S., Ramli, N. A. A., Muhamad, M. S., Abdullah, H. Z., Idris, M. I., ve Lee, T. C. (2020). Extraction of Biological Hydroxyapatite from Tuna Fish Bone for Biomedical Applications. *Materials Science Forum*, 1010, 584-589.
- Leary, D., Vierros, M., Hamon, G., Arico, S., ve Monagle, C. (2009). Marine genetic resources: a review of scientific and commercial interest. *Marine Policy*, 33(2), 183-194.
- Lee, E. J., Koh, Y. H., Yoon, B. H., Kim, H. E., ve Kim, H. W. (2007). Highly porous hydroxyapatite bioceramics with interconnected pore channels using camphene-based freeze casting. *Materials Letters*, 61(11-12), 2270-2273.
- Lee, S., Lee, Y., ve Yoon, Y. (2007). Characteristics of calcium phosphate powders synthesized from cuttlefish bone and phosphoric acid. *Journal of Ceramic Processing Research*, 8(6), 427.
- Lee, J. H., Choi, H. J., Yoon, S. Y., Kim, B. K., ve Park, H. C. (2013). Processing of porous hydroxyapatite scaffolds containing calcium phosphate glass-ceramics for bone tissue engineering. *Journal of Ceramic Processing Research*, 14(4), 544-548.
- Li, Z. R., Wang, B., Chi, C. F., Zhang, Q. H., Gong, Y. D., Tang, J. J., ve Ding, G. F. (2013). Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorous niphonius*). *Food Hydrocolloids*, 31(1), 103-113.



- Limam, Z., Selmi, S., Sadok, S., ve El Abed, A. (2011). Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: Biological and physicochemical properties. *African journal of biotechnology*, 10(4), 640-647.
- Lin, X., Chen, Y., Jin, H., Zhao, Q., Liu, C., Li, R., ve Tang, Y. (2019). Collagen extracted from bigeye tuna (*Thunnus obesus*) skin by isoelectric precipitation: Physicochemical properties, proliferation, and migration activities. *Marine Drugs*, 17(5), 261.
- Liu, H., Li, D., ve Guo, S. (2007). Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Chemistry*, 101(2), 621-625.
- Liu, Y., Liu, M., Ji, S., Zhang, L., Cao, W., Wang, H., ve Wang, S. (2021). Preparation and application of hydroxyapatite extracted from fish scale waste using deep eutectic solvents. *Ceramics International*, 47(7), 9366-9372.
- Lu, Y., Weng, L., ve Zhang, L. (2004). Morphology and properties of soy protein isolate thermoplastics reinforced with chitin whiskers. *Biomacromolecules*, 5(3), 1046-1051.
- Marie, P. J. (2006). Strontium ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone*, 38(2), 10-14.
- Meng, D., Tanaka, H., Kobayashi, T., Hatayama, H., Zhang, X., Ura, K., ve Takagi, Y. (2019). The effect of alkaline pretreatment on the biochemical characteristics and fibril-forming abilities of types I and II collagen extracted from bester sturgeon by-products. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 572-580.
- Milella, E., Cosentino, F., Licciulli, A., ve Massaro, C. (2001). Preparation and characterisation of titania/hydroxyapatite composite coatings obtained by sol-gel process. *Biomaterials*, 22(11), 1425-1431.
- Mishra, A. K., ve Mohanty, B. (2009). Chronic exposure to sublethal hexavalent chromium affects organ histopathology and serum cortisol profile of a teleost, *Channa punctatus* (Bloch). *Science of the Total Environment*, 407(18), 5031-5038.
- Moiseenko, T. I., ve Kudryavtseva, L. P. (2001). Trace metal accumulation and fish pathologies in areas affected by mining and metallurgical enterprises in the Kola Region, Russia. *Environmental Pollution*, 114(2), 285-297.
- Mondal, P., Shah, S. P., ve Marks, L. (2007). A reliable technique to determine the local mechanical properties at the nanoscale for cementitious materials. *Cement and Concrete Research*, 37(10), 1440-1444.
- Mondal, B., Mondal, S., Mondal, A., ve Mandal, N. (2016). Fish scale derived hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *Materials Characterization*, 121, 112-124.
- Muhammad, N., Gao, Y., Iqbal, F., Ahmad, P., Ge, R., Nishan, U., ve Ullah, Z. (2016). Extraction of biocompatible hydroxyapatite from fish scales using novel approach of ionic liquid pretreatment. *Separation and Purification Technology*, 161, 129-135.
- Murakami, M., ve Hirano, T. (2008). Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Science*, 99(8), 1515-1522.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., ve Duodu, K. G. (2004). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 85(1), 81-89.
- Naczki, M., Synowiecki, J., ve Sikorski, Z. E. (1981). The gross chemical composition of Antarctic krill shell waste. *Food Chemistry*, 7(3), 175-179.
- Nadarajah, K. (2005). *Development and characterization of antimicrobial edible films from crawfish chitosan*. Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College.

- Nagai, T. (2004). Characterization of collagen from Japanese sea bass caudal fin as waste material. *European Food Research and Technology*, 218(5), 424-427.
- Nagai, T., ve Suzuki, N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material, skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68(3), 277-281.
- Nagai, T., Yamashita, E., Taniguchi, K., Kanamori, N., ve Suzuki, N. (2001). Isolation and characterisation of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). *Food Chemistry*, 72(4), 425-429.
- Nagai, T., Araki, Y., ve Suzuki, N. (2002). Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). *Food Chemistry*, 78(2), 173-177.
- Nagai, T., Suzuki, N., ve Nagashima, T. (2008). Collagen from Common Minke Whale (*Balaenoptera acutorostrata*) Unesu. *Food Chemistry*, 111(2), 296-301.
- Nalinanon, S. (2006). Uses of pepsin for collagen and jelatin extraction from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) skin. PhD Thesis. Prince of Songkla University.
- Narudin, N. A. H., Mahadi, A. H., Kusriani, E., ve Usman, A. (2020). Chitin, chitosan, and submicron-sized chitosan particles prepared from *Scylla serrata* Shells. *Materials International*, 2, 139-149.
- Nazarpak, M. H., Solati-Hashjin, M., ve Moztafzadeh, F. (2009). Preparation of hydroxyapatite ceramics for biomedical applications. *Journal of Ceramic Processing Research*, 10, 54-57.
- Nehal, N., Choudhary, B., Nagpure, A., ve Gupta, R. K. (2021). DNA barcoding: a modern age tool for detection of adulteration in food. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-25.
- Nessa, F., Masum, S. M., Asaduzzaman, M., Roy, S. K., Hossain, M. M., ve Jahan, M. S. (2010). A process for the preparation of chitin and chitosan from prawn shell waste. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 45(4), 323-330.
- Newman, D. J., ve Cragg, G. M. (2004). Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *Journal of Natural Products*, 67(8), 1216-1238.
- Nowak, B., ve Chmielnicka, J. (2000). Relationship of lead and cadmium to essential elements in hair, teeth, and nails of environmentally exposed people. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46(3), 265-274.
- Ogawa, M., Moody, M. W., Portier, R. J., Bell, J., Schexnayder, M. A., ve Lasso, J. N. (2003). Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8088-8092.
- Oduor, P. M., Struszczyk, M. H., ve Peter, M. G. (2008). Characterisation of chitosan from blowfly larvae and some crustacean species from Kenyan marine waters prepared under different conditions. *Discovery and Innovation*, 20(2), 129-136.
- Ozawa, M., ve Suzuki, S. (2002). Microstructural development of natural hydroxyapatite originated from fish-bone waste through heat treatment. *Journal of the American Ceramic Society*, 85(5), 1315-1317.
- Özalp, Y., ve Özdemir, N. (1997). Biomaterials and biocompatibility. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 25(2), 57-72.
- Özkaya, F. C., Erdoğan, C., ve Altunok, M. (2013). Denizel biyoaktif bileşikler. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 30(2), 85-92.
- Pal, A., Paul, S., Choudhury, A. R., Balla, V. K., Das, M., ve Sinha, A. (2017). Synthesis of hydroxyapatite from *Lates calcarifer* fish bone for biomedical applications. *Materials Letters*, 203, 89-92.
- Pallant, J. (2013). *SPSS survival manual*. McGraw-hill education (UK).

- Papagiannis, I., Kagalou, I., Leonardos, J., Petridis, D., ve Kalfakakou, V. (2004). Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). *Environment International*, 30(3), 357-362.
- Paul, S., Jayan, A., Sasikumar, C. S., ve Cherian, S. M. (2014). Extraction and purification of chitosan from chitin isolated from sea prawn *Fenneropenaeus indicus*. *Extraction*, 7(4). 201204.
- Paquette, J., ve Reeder, R. J. (1990). Single-crystal X-ray structure refinements of two biogenic magnesian calcite crystals. *American Mineralogist*, 75(9-10), 1151-1158.
- Permatasari, H. A., Wati, R., Anggraini, R. M., Almukarramah, A., ve Yusuf, Y. (2020). Hydroxyapatite Extracted from Fish Bone Wastes by Heat Treatment. *In Key Engineering Materials*, 840, 318-323.
- Piccirillo, C., Pullar, R. C., Costa, E., Santos-Silva, A., Pintado, M. M. E., ve Castro, P. M. (2015). Hydroxyapatite-based materials of marine origin: A bioactivity and sintering study. *Materials Science and Engineering: C*, 51, 309-315.
- Pon-On, W., Suntornsaratoon, P., Charoenphandhu, N., Thongbunchoo, J., Krishnamra, N., ve Tang, I. M. (2016). Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material. *Materials Science and Engineering: C*, 62, 183-189.
- Pu'ad, N. M., Koshy, P., Abdullah, H. Z., Idris, M. I., ve Lee, T. C. (2019). Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. *Heliyon*, 5(5), 1-14.
- Purwaningrum, W., Riyanti, F., Said, M., Hariyani, P. L., ve Handayani, A. S. (2021). Fixed-Bed Column for the Removal of Cd (II) from Aqueous by Hydroxyapatite from Red Snapper (*Lutjanus campechanus*) Fish Bone. *Indonesian Journal of Fundamental and Applied Chemistry*, 6(2), 46-52.
- Querellou, J., Cadoret, J. P., Allen, M. J., ve Collén, J. (2010). Marine biotechnology. *In Introduction to Marine Genomics*. Hollanda: Springer, 287-313.
- Rayment, G. E., ve Barry, G. A. (2000). Indicator tissues for heavy metal monitoring additional attributes. *Marine Pollution Bulletin*, 41(7-12), 353-358.
- Rohman, A., Windarsih, A., Erwanto, Y., ve Zakaria, Z. (2020). Review on analytical methods for analysis of porcine jelatine in food and pharmaceutical products for halal authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 122-132.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., ve Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Sadowska, M., Kołodziejska, I., ve Niecikowska, C. (2003). Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 81(2), 257-262.
- Saiki, R. K., Chang, C. A., Levenson, C. H., Warren, T. C., Boehm, C. D., Kazazian Jr, H. H., ve Erlich, H. A. (1988). Diagnosis of sickle cell anemia and  $\beta$ -thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *New England Journal of Medicine*, 319(9), 537-541.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., ve Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Santini, F., Nguyen, M. T., Sorenson, L., Waltzek, T. B., Lynch Alfaro, J. W., Eastman, J. M., ve Alfaro, M. E. (2013). Do habitat shifts drive diversification in teleost fishes? An example from the pufferfishes (Tetraodontidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 26(5), 1003-1018.
- Šarić, M., Piasek, M., Blanuša, M., Kostial, K., ve Ilich, J. Z. (2005). Sodium and calcium intakes and bone mass in rats revisited. *Nutrition*, 21(5), 609-614.

- Sathiyavimal, S., Vasantharaj, S., Shanmugavel, M., Manikandan, E., Nguyen-Tri, P., Brindhadevi, K., ve Pugazhendhi, A. (2020). Facile synthesis and characterization of hydroxyapatite from fish bones: Photocatalytic degradation of industrial dyes (crystal violet and Congo red). *Progress in Organic Coatings*, 148, 105890.
- Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. O., Kubota, E. H., Mazutti, M. A., Kempka, A. P., ve Demiate, I. M. (2016). Collagen extraction process. *International Food Research Journal*, 23(3), 913-922.
- Schmitt, C. J., ve Brumbaugh, W. G. (1990). National contaminant biomonitoring program: Concentrations of arsenic, cadmium, copper, lead, mercury, selenium, and zinc in US freshwater fish, 1976–1984. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19(5), 731-747.
- Senaratne, L. S., Park, P. J., ve Kim, S. K. (2006). Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technology*, 97(2), 191-197.
- Shahidi, F., Naczki, M. (1989). Effect of processing on the content of condensed tannins in rapeseed meals. *Journal of Food Science*, 54(4), 1082-1083.
- Shanaghi, A., Mehrjou, B., Ahmadian, Z., Souiri, A. R., ve Chu, P. K. (2021). Enhanced corrosion resistance, antibacterial properties, and biocompatibility by hierarchical hydroxyapatite/ciprofloxacin-calcium phosphate coating on nitrided NiTi alloy. *Materials Science and Engineering: C*, 118, 111524.
- Sikorski, P., Hori, R., ve Wada, M. (2009). Revisit of  $\alpha$ -chitin crystal structure using high-resolution X-ray diffraction data. *Biomacromolecules*, 10(5), 1100-1105.
- Silva, M., Azevedo, J., Rodriguez, P., Alfonso, A., Botana, L. M., ve Vasconcelos, V. (2012). New gastropod vectors and tetrodotoxin potential expansion in temperate waters of the Atlantic Ocean. *Marine drugs*, 10(4), 712-726.
- Sionkowska, A., Wisniewski, M., Skopinska, J., Poggi, G. F., Marsano, E., Maxwell, C. A., ve Wess, T. J. (2006). Thermal and mechanical properties of UV irradiated collagen/chitosan thin films. *Polymer Degradation and Stability*, 91(12), 3026-3032.
- Sionkowska, A., Kozłowska, J., Skorupska, M., ve Michalska, M. (2015). Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 605-609.
- Song, W. K., Liu, D., Sun, L. L., Li, B. F., ve Hou, H. (2019). Physicochemical and biocompatibility properties of type I collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) for biomedical applications. *Marine drugs*, 17(3), 137.
- Sousa, R. O., Martins, E., Carvalho, D. N., Alves, A. L., Oliveira, C., Duarte, A. R. C., ve Reis, R. L. (2020). Collagen from Atlantic cod (*Gadus morhua*) skins extracted using CO<sub>2</sub> acidified water with potential application in healthcare. *Journal of Polymer Research*, 27(3), 1-9.
- Srivastava, A., Srivastava, A., Srivastava, A., ve Chandra, P. (2015). Marine biomaterials in therapeutics and diagnostic. In *Springer Handbook of Marine Biotechnology*. Springer, Berlin, 1247-1263.
- Stamford, T. C. M., Stamford-Arnaud, T. M., Cavalcante, H. D. M., Macedo, R. O., ve Campos-Takaki, G. D. (2013). Microbiological chitosan: Potential application as anticariogenic agent. *Practical Applications in Biomedical Engineering*, 9, 229-244.
- Steel, R. G., ve Torrie, J. H. (1980). Duncan's New Multiple Range Test. *Principles and Procedures of Statistics*.
- Sun, H. J., Rathinasabapathi, B., Wu, B., Luo, J., Pu, L. P., ve Ma, L. Q. (2014). Arsenic and selenium toxicity and their interactive effects in humans. *Environment International*, 69, 148-158.

- Sunil, B. R., ve Jagannatham, M. (2016). Producing hydroxyapatite from fish bones by heat treatment. *Materials Letters*, 185, 411-414.
- Surya, P., Nithin, A., Sundaramanickam, A., ve Sathish, M. (2021). Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite from *Sardinella longiceps* fish bone and its effects on human osteoblast bone cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 119, 104501.
- Tang, L., Chen, S., Su, W., Weng, W., Osako, K., ve Tanaka, M. (2015). Physicochemical properties and film-forming ability of fish skin collagen extracted from different freshwater species. *Process Biochemistry*, 50(1), 148-155.
- Tsakamoto, H., Yokoyama, Y., Suzuki, T., Mizuta, S., Yoshinaka, R., ve Akahane, Y. (2013). Isolation of collagen from tiger pufferfish parts and its solubility in dilute acetic acid. *Fisheries Science*, 79(5), 857-864.
- Tuney, I. (2016). Molecular identification of puffer fish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) and *Lagocephalus spadiceus* (Richardson, 1845) from Eastern Mediterranean, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(5), 1428-1436.
- Turan, C., Ozturk, B., Erguden, D., Gurlek, M., Yaglioglu, D. A., ve Uygur, N. (2007). *Atlas of marine bony fishes of Turkey*. Nobel Publishing House, Adana, 83-485.
- Turan, C., Erguden, D., ve Uygur, N. (2011). On the occurrence of *Diadema setosum* (Leske, 1778) in Antakya Bay, Eastern Mediterranean Sea. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, 17(1), 78-82.
- Turan, C., Gürlek, M., Ergüden, D., Uyan, A., Karan, S., ve Doğdu, S. A. (2017a). Assessing DNA Barcodes for Identification of Pufferfish Species (*Tetraodontidae*) in Turkish Marine Waters. *Natural and Engineering Sciences*, 2(3), 55-66.
- Turan, C., Gürlek, M., Özeren, A., ve Doğdu, S. A. (2017b). First Indo-Pacific fish species from the Black Sea coast of Turkey: Shrimp scad *Alepes djedaba* (Forsskal, 1775)(Carangidae). *Natural and Engineering Sciences*, 2(3), 149-157.
- Tüylek, Z. (2017). Biomaterials and use their in Health. *Bozok Tıp Dergisi*, 7(4), 80-89.
- Upadhyay, R., ve Panda, S. K. (2010). Zinc reduces copper toxicity induced oxidative stress by promoting antioxidant defense in freshly grown aquatic duckweed *Spirodela polyrhiza* L. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3), 1081-1084.
- Varun, T. K., Senani, S., Kumar, N., Gautam, M., Gupta, R., ve Gupta, M. (2017). Extraction and characterization of chitin, chitosan and chitooligosaccharides from crab shell waste. *Indian Journal of Animal Research*, 51(6), 1066-1072.
- Vázquez, J. A., Rodríguez-Amado, I., Montemayor, M. I., Fraguas, J., González, M. D. P., ve 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.
- Venkatesan, J., ve Kim, S. K. (2010). Effect of temperature on isolation and characterization of hydroxyapatite from tuna (*Thunnus obesus*) bone. *Materials*, 3(10), 4761-4772.
- Venkatesan, J., Qian, Z. J., Ryu, B., Thomas, N. V., ve Kim, S. K. (2011). A comparative study of thermal calcination and an alkaline hydrolysis method in the isolation of hydroxyapatite from *Thunnus obesus* bone. *Biomedical Materials*, 6(3), 035003.
- Venkatesan, J., Lowe, B., Manivasagan, P., Kang, K. H., Chalisserry, E. P., Anil, S., ve Kim, S. K. (2015). Isolation and characterization of nano-hydroxyapatite from salmon fish bone. *Materials*, 8(8), 5426-5439.
- Wang, S. L., Shih, I. L., Liang, T. W., ve Wang, C. H. (2002). Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2241-2248.

- Wang, L., An, X., Xin, Z., Zhao, L., ve Hu, Q. (2007). Isolation and characterization of collagen from the skin of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Journal of Food Science*, 72(8), 450-455.
- Wang, Y., Chang, Y., Yu, L., Zhang, C., Xu, X., Xue, Y., ve Xue, C. (2013). Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 90-97.
- Wijedasa, N. P., Broas, S. M., Daso, R. E., ve Banerjee, I. A. (2020). Varying fish scale derived hydroxyapatite bound hybrid peptide nanofiber scaffolds for potential applications in periodontal tissue regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 109, 110540.
- Wood, C. M., Farrell, A. P., ve Brauner, C. J. (Eds.). (2012). *Homeostasis and toxicology of essential metals*. Academic press.
- Yağlıoğlu, D., Turan, C., Erguden, D., ve Gurlek, M. (2011). Range expansion of silverstripe blaasop, *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789), to the northeastern Mediterranean Sea. *Biharean Biologist*, 5(2), 159-161.
- Yamanoue, Y., Miya, M., Matsuura, K., Miyazawa, S., Tsukamoto, N., Doi, H., ve Sakai, H. (2009). Explosive speciation of Takifugu: another use of fugu as a model system for evolutionary biology. *Molecular Biology and Evolution*, 26(3), 623-629.
- Yan, M., Li, B., Zhao, X., Ren, G., Zhuang, Y., Hou, H., ve Fan, Y. (2008). Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry*, 107(4), 1581-1586.
- Yatkın, G., ve Güz, N. (2018). The use of DNA barcoding in entomology. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Journal of Agricultural Sciences*, 28(1), 126-134.
- Yokes, B., ve Galil, B. S. (2006). The first record of the needle-spined urchin *Diadema setosum* (Leske, 1778)(Echinodermata: Echinoidea: Diademataceae) from the Mediterranean Sea. *Aquatic Invasions*, 1(3), 188-190.
- Yotsu, M., Yamazaki, T., Meguro, Y., Endo, A., Murata, M., Naoki, H., ve Yasumoto, T. (1987). Production of tetrodotoxin and its derivatives by *Pseudomonas sp.* isolated from the skin of a pufferfish. *Toxicon*, 25(2), 225-228.
- Yu, X., Tang, X., Gohil, S. V., ve Laurencin, C. T. (2015). Biomaterials for bone regenerative engineering. *Advanced Healthcare Materials*, 4(9), 1268-1285.
- Yuniarto, K., Purwanto, Y. A., Purwanto, S., Welt, B. A., Purwadaria, H. K., ve Sunarti, T. C. (2016). Infrared and Raman studies on polylactide acid and polyethylene glycol-400 blend. *In AIP Conference Proceedings*, 1725(1), 1-6.
- Yücel, A., Sezer, S., Birhanlı, E., Ekinçi, T., Yalman, E., ve Depci, T. (2021). Synthesis and characterization of whitlockite from sea urchin skeleton and investigation of antibacterial activity. *Ceramics International*, 47(1), 626-633.
- Zenetos, A., Gofas, S., Morri, C., Rosso, A., Violanti, D., Raso, J. G., ve Verlaque, M. (2012). Alien species in the Mediterranean Sea by 2012. A contribution to the application of European Union's Marine Strategy Framework Directive (MSFD). Part 2. Introduction trends and pathways. *Mediterranean Marine Science*, 13(2), 328-352.
- Zhang, Y., Liu, W., Li, G., Shi, B., Miao, Y., ve Wu, X. (2007). Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chemistry*, 103(3), 906-912.
- Zhang, M., Li, J., Ding, C., Liu, W., ve Li, G. (2013). The rheological and structural properties of fish collagen cross-linked by N-hydroxysuccinimide activated adipic acid. *Food Hydrocolloids*, 30(2), 504-511.
- Zheng, L. Y., ve Zhu, J. F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 527-530.

Zhu, S., Yang, Y., Fan, Z., Zhou, Q., ve Fan, X. (2021). A fatal case of severe pufferfish poisoning: A case report. *Medicine, Case Reports and Study Protocols*, 2(1), 1-3.



## DİZİN

**A**

Ağır Metal · 16, 17, 18, 41, 43, 59, 60, 72, 77, 80  
 Akdeniz · Xiv, 11, 25, 26, 28, 29, 31, 77, 81, 82  
 Aljinat · 8  
 Antibiyotik · 7  
 Antimalaryal · 7  
 Antiproliferatif · 7  
 Anti-Tümör · 7  
 ASC · iv, 18, 19, 20, 39, 56, 75

**B**

Bioedit · 46, 89  
 Biyoaktif · 6, 7, 93  
 Biyoçeşitlilik · 11  
 Biyokimya · 7  
 Biyolojik · 6, 7, 8, 10, 13, 14, 24, 27, 29, 53, 73, 74, 77, 78  
 Biyolojik Materyaller · 7  
 Biyomateryal · 6, 7, 10, 14, 15, 19  
 Biyomedikal · 8, 9, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 22, 35, 46, 48, 50, 72, 84  
 Biyopolimer · 6, 8  
 Biyoteknoloji · 6  
 Biyouyumluluk · 7

**C**

Ca/P · 10, 13, 14, 15, 16, 51, 72  
 Charybdis · vii, viii, ix, xv, 12, 24, 27, 28, 29, 32, 34, 46, 68, 72, 82, 84, 88  
 Charybdis longicollis · vii, viii, ix, 12, 24, 27, 29, 32, 34, 46, 68, 72, 82, 84  
 CTAB · 44  
 Cyt b · xiv, iv, 45, 62, 63, 67, 68, 81, 82

**D**

Deniz · 2, Vi, Xiv, 6, 7, 8, 30, 33, 52  
 Denizel Biyoteknoloji · 6  
 Dental · 11  
 Diadema Setosum · Vii, Viii, Xv, 12, 24, 29, 30, 31, 32, 34, 48, 70, 72, 84, 96, 97  
 Diş · Xv, 7, 13, 15, 16, 25, 33, 35, 41, 54, 55, 56, 60, 73, 74, 75, 77, 79, 80  
 DNA · V, Viii, İx, Xv, İv, V, 11, 33, 43, 44, 45, 46, 62, 63, 73, 78, 80, 81, 82, 84, 86, 88, 93, 94, 96, 97  
 DNA Barkodlama · 11, 81, 84  
 Dnasp · 46, 63  
 Doku Mühendisliği · 7, 14, 15, 22

**E**

Ekolojik · 11

Element · 36, 50, 53, 74, 79  
 Enzim · 6, 79  
 Enzimler · 7, 78

**F**

Fizik · 7  
 Fosfat · 35, 51, 72  
 Fotoprotektif · 7  
 Fukoidan · 8

**G**

Gen Terapisi · 9  
 Genom · 45  
 Gıda · 6, 9, 10, 22  
 Goniohellenus · Xv, 27, 28, 29

**H**

HIV · iv, 6  
 Hidroksiapatit · vii, viii, ix, iv, 10, 13  
 HPLC · iv, 37, 38, 40, 41, 51, 58, 73, 76, 85

**I**

ICP-MS · v, 36, 43, 50, 59

**İ**

İkincil Metabolit · 6, 7  
 İmplant · 10, 11, 15, 35, 55, 75  
 İnorganik · 11

**J**

Jelatin · 10, 18

**K**

Kalsiyum · 10, 13, 35, 51, 53, 72, 74  
 Karajenan · 8  
 Karides · 8, 21, 22, 26  
 Kemik · 10  
 Kızıldeniz · 11, 25, 28, 31, 81  
 Kimya Endüstrisi · 7  
 Kitin · Vii, İv, 8, 20, 21, 22, 23, 34, 46, 47, 48, 68, 69, 70, 71, 72, 82, 83, 84  
 Kitosan · Vii, 8, 9, 20, 21, 22, 23, 34, 46, 47, 48, 68, 72, 82, 84  
 Kolajen · Vii, Viii, İx, Xiv, İv, 8, 9, 10, 18, 19, 20, 33, 39, 40, 41, 54, 56, 57, 58, 72, 74, 75, 76, 84



Kompozit · 7, 15, 38, 55  
Kozmetik · 6, 9, 19, 20

---

## L

*L. sceleratus* · viii, ix, xiv, xv, 25, 26, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 43, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 62, 63, 66, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 81, 84  
*L. spadiceus* · xv, 12, 18, 23, 41, 42, 59, 60, 77, 84  
*L. suzensis* · xv, 12, 18, 23, 41, 42, 59, 77, 84  
*Lagocephalus sceleratus* · vii, viii, ix, xv, 12, 17, 18, 23, 24, 25, 32, 33, 35, 36, 41, 42, 50, 56, 59, 64, 72, 81, 84, 85, 86, 87, 88, 90, 95, 97  
LC/MS-MS · 37, 51, 73  
Leseptiyen · 11, 23, 32, 82, 84  
Longicollis · xiv, xv, 27, 28, 29, 34, 46, 48, 68, 69, 70, 82, 83, 84

---

## M

Magnezyum · 51, 72  
Manganez · 17, 51, 72  
Mega X · 46, 91  
mtDNA · xiv, v, 43, 44, 62, 63, 72, 81

---

## N

Nanopartikül · 9

---

## O

Ortopedik · 7, 11, 13, 15

---

## P

Polimerler · 6, 7  
Protein · 6, 10, 21, 40, 41, 56, 73, 75, 78, 79, 92

PSC · İv, 18, 19, 20  
PZE · xiv, iv, 11, 44, 45, 62, 63

---

## S

Sağlık · 6, 80, 81  
SDS · xiv, iv, 40, 57, 58, 76, 91  
SDS-PAGE · xiv, 40, 57, 58, 76  
SEM · xv, iv, 38, 39, 53, 54, 74  
Seramik · 7, 10, 13, 35  
Sitokrom b · 45  
*Spherooides pachygaster* · 12, 23, 43, 62, 64, 72, 82, 84  
Suveyş Kanalı · 11  
Süveyş Kanalı · 25

---

## T

TEMED · iv, 40  
Tetrodotoksin · v, 26, 37, 41, 51, 58, 73, 76  
Tıp · 7  
Titanyum · 51, 72, 75  
Toksisite · 9  
*Torquigener flavimaculosus* · xv, 12, 18, 23, 41, 42, 43, 62, 64, 72, 82, 84  
TTX · xiv, v, 26, 27, 37, 41, 51, 52, 58, 73, 76, 85, 88

---

## V

Vanadyum · 51, 72, 75

---

## X

XRD · v, 22, 38, 48, 49, 52, 53, 69, 71, 74, 83, 84

---

## Y

Yengeç · 8, 12, 20, 22, 23, 26, 30, 32, 68, 82, 84



**TEKNOVERSİTE**



teknoversite AYRICALIĞINDASINIZ

İSTE

