

HOROZ İBİĞİNDEN HYALURONİK ASİT ÜRETİMİ VE ANALİZİ

HYALURONIC ACID PRODUCTION AND ANALYSIS FROM ROOSTER COMB

Cevriye Kalkandelen^{1*}, Sena Su²

¹İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Teknik Bilimler Meslek
Yüksekokulu, 34500, İstanbul, Türkiye

²Yıldız Teknik Üniv. Kimya ve Metalurji Mühendisliği
Bölümü, 34220, İstanbul, Türkiye
kalkan@istanbul.edu.tr¹, senasu01@gmail.com³

Elif Saatçioğlu³, Oğuzhan Gündüz^{4*}

³Marmara Üniversitesi Nanoteknoloji ve Biyomalzeme
Uygulama – Araştırma Merkezi, 34722 İstanbul, Türkiye

⁴Marmara Üniversitesi Teknoloji Fakültesi, 34722 İstanbul,
Türkiye
e.saatcioglu@gmail.com³, oguzhan@marmara.edu.tr⁴

Özetçe— Hyaluronik asit (HA), su afinitesi yüksek, biyolojik uyumlu, glukozaminoglikan olarak isimlendirilen amino asit içeren doğrusal doğal polimer, polisakkarittir. HA'nın biyolojik uyumluluğu yüksek, biyobozunur ve biyofonksiyonelliğiyle biyomühendislik araştırmalarında tercih edilen malzemedir. Bu çalışmada, ülkemizde çok ta değerlendirilmeyen horoz ibiğinden, kimyasal ekstraksiyon ile hyaluronik asit üretilmiştir. Ayrıca üretilen hyaluronik asitin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi ve Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi analizi yapılmıştır. Sonuç olarak, katma değeri yüksek bir ürün olan hyaluronik asitin, horoz ibiklerinden kimyasal yöntemlerle üretilebildiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler — Hyaluronik asit (HA), üretim metodu, horoz ibiği, ekstraksiyon

Abstract - Hyaluronic acid (HA) is a linear natural polymer, polysaccharide, with a high water affinity, biocompatible, called glucosaminoglycan. It is the preferred material in bioengineering research with its biodegradability, biodegradability and biofunctionality. In this study, hyaluronic acid was produced by chemical extraction from the rooster needle, which has not been evaluated much in our country. In addition, Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy analysis of the produced hyaluronic acid was performed. As a result, it has been shown that hyaluronic acid, a product with high added value, can be produced from cock crests by chemical methods.

Keywords — Hyaluronic acid (HA), production method, rooster comb, extraction

1. Giriş

İnsan ömrünün uzaması ve travmalar yapay doku ve organlara ihtiyacı artırırken biyolojik gelişmelerin teknoloji ile desteklenmesi araştırmaların bu yönde artmasına neden olmuştur. Yapay organ ve doku çalışmalarında biyoyumluluğunun yüksek olması nedeniyle organik kökenli materyaller yaygın olarak tercih edilmektedir [1-3].

Biyolojik ortamlarda hücreler; nanofiber formda proteinlerden oluşan ekstraselüler matris (ECM) içerisinde bulunmaktadır. ECM, çok hücreli bir canlıda bazı hücrelerden salgılanan, hücrelerin arasında dolduran ve belirli alanda hücreleri bağlayan madde olarak görev yapan çeşitli protein ve polisakkaritlerdir. Hyaluronik asit (HA) bağlayıcı özellik taşıyan bir tür polimer; anyonik, uzun polisakkaritler içeren glikozaminoglikandır [4]. Hücre dışı matrisin ana bileşenlerinden olan HA insan vücudundaki çeşitli dokularda

bulunmakla birlikte en yüksek miktarda gözün vitröz sıvısında bulunmaktadır (Tablo1) [5, 6].

Doğadaki canlılar arasında HA bulunma ve oranları incelendiğinde mantar, bitki ve böceklerde bulunmazken en yüksek oranda horoz ibiğinde bulunduğu belirlenmiştir. HA omurgalı hayvanların yanı sıra bazı bakteri gruplarında (örneğin Streptococcus pyogenes) da bulunduğu görülmüş ve ticari üretim için bu yönde çalışmalar mevcuttur (Tablo1) [5, 6].

Tablo 1: Farklı kaynaklardaki HA oranları [6]

Doku veya vücut sıvısı	Konsantrasyon (µg / mL)
Horoz ibiği	7500
İnsan göbek kordonu	4100
İnsan eklem (snovial) sıvısı	1400-3600
Dana burun kıkırdağı	1200
İnsan göz içi sıvısı	130-340
İnsan dermis tabakası	200-500
İnsan epidermis tabakası	100
Tavşan beyni	65
İnsan idrarı	0.1-0.3
İnsan serumu	0.01-0.1

Shiedlin ve ark. ticari olarak satılan ve bakteri (Streptococcus zooepidemicus), horoz ibiği, dana göz içi sıvısı ve insan göbek kordonundan üretilen HA ile kendilerinin bakteriden ürettikleri (Streptococcus zooepidemicus) HA'nın safsızlıkları ve biyolojik aktiviteleri karşılaştırılmıştır [7].

Kang ve ark., moleküler ağırlıkları farklı dört ticari numune ile kendilerinin horoz ibiğinden ürettikleri HA'nın moleküler ağırlık ve moleküler yapısını ölçmek için asimetrik alan akışlı ayırma (asymmetrical flow field-flow fractionation, AsFFFF) kullanmıştır [8].

Saranraj ve ark., farklı pH ve glikoz değerlerinde iki farklı bakteriden (Streptococcus pyogenes 442 & 1926) üretilen HA'nın optimizasyonu ve karakterizasyon çalışması yapmıştır. En uygun sonuç 6.9 pH ve %1 glikoz değerlerinde elde edilmiştir [5].

Sadhasivam ve ark., HA'ı benekli vatoz olarak bilinen Aerobatus narinari karaciğerinden üretilmiş ve karakterizasyonu agarose-gel elektroforez, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC) ve Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (¹H NMR) ile gerçekleştirilmiştir. Üretilen HA miktarı kuru doku ağırlığının 0.8mg/gr olarak hesaplanmıştır [9].

Kanchana ve ark. bir tür deniz kabuklu türü olan Amussium pleuronectus'tan HA izole edilmiştir. FT-IR ve ¹H NMR

spektroskopisi ile karakterizasyon yapılmıştır. Verim 4.2mg/gr olarak bulunmuştur [10].

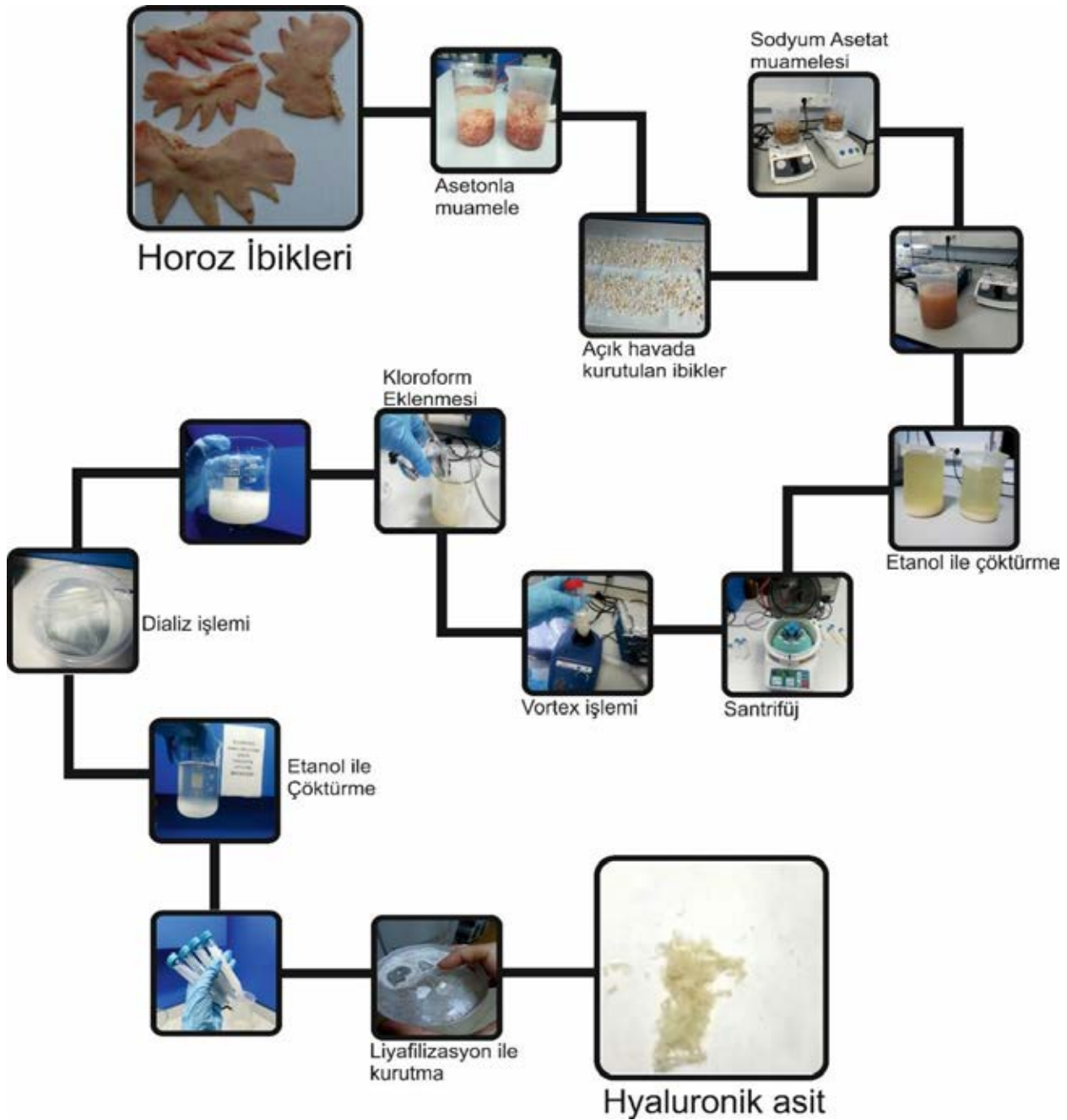
Oliveira ve ark. horoz ibiklerinden ürettikleri HA'ı kullanarak bakteriyel selüloz membran üretmişler ve HA karakterizasyonu FT-IR, TG, ¹H NMR ile yapmışlardır. Molar ağırlığı HPSEC (high-performance size-exclusion chromatography) kuplajlı dedektör kullanarak 0.687×10^6 gr/mol olarak ölçülmüştür [11].

Bu çalışmada horoz ibikleri kullanılarak HA üretimi gerçekleştirilmiş ve karakterizasyonu FT-IR ve ¹H NMR ile yapılmıştır.

2. MATERYAL – METOT

2.1. Materyal

hHA üretimi için Merck marka KGaA (64271 Germany) Aseton (C_3H_6O), Sodyum Asetat ($C_2H_3NaO_2$), Etanol (C_2H_5OH), Kloroform ($CHCl_3$), Amil alkol ($C_5H_{11}OH$) malzemeleri kullanıldı. Üretimde manyetik karıştırıcı (Wise Stirre), vorteks (Four e's), santrifüj (Hettick Zentrufugen) ve liyofilizatör (freeze-dryer) (CoolSafe – ScanVac, Almanya) cihazları kullanıldı.



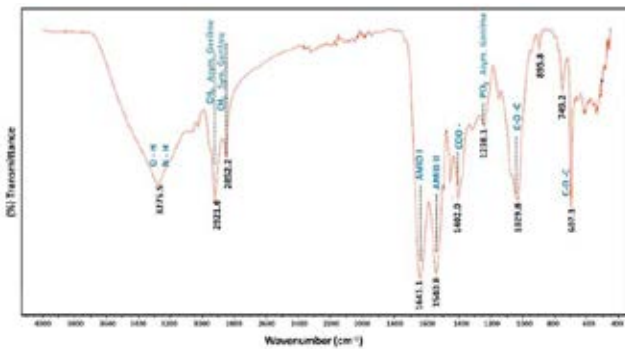
Şekil 1. Horoz ibiğinden hHA elde edilme aşamaları.

2.2. Metot

Horoz kafalarından ibikler ayrıldı ve ibikler kullanıma kadar -16°C'de derin dondurucuda tutuldu. Donuk ibikler kullanımdan bir saat önce çıkarılıp satır yardımıyla 0.2-0.5cm büyüklüklerde doğrandı. Yağ oranını azaltmak ve dehidrasyon işlemi uygulamak için kıyılmış ibiklerin üzerine 1 litre aseton eklendi. Daha sonra 2 saatte bir toplam 5 defa aseton yenildi. İşlem sonunda asetonun buharlaşması için ibikler iki gün açık havada kurumaya bırakıldı. 1 litre %5 sodyum asetat hazırlandı. Bu çözeltinin içine kurutulmuş ibikler atılarak 3 saat karıştırıcı ile döndürüldü. Cotton cloth ile sıkma işlemi 10 kez tekrarlandı. Kalıntı ibikler uzaklaştırıldı. Ekstrakt üzerine 1.5 litre etanol eklendi ve karıştırıldı. Oluşan çökelti alınarak santrifüj edildi (3500 rpm 15 dk). Santrifüj işlemi toplam 9 kere olucak şekilde 36 tüpün GAG'lerden ayrılması için toplam 1.5 saatte işlem gerçekleşti. Santrifüj sonrası süzüntü atılarak, çökeltinin üstüne %5 sodyum asetat çözeltisi eklendi. Çökelti vortex yardımıyla sodyum asetat çözeltisi içinde çözdürüldü ve tekrar santrifüjlendi (3500 rpm 15 dk). Süzüntüler beherde toplandı. Süzüntüye 3 kez yarım saatte bir 100mL kloroform eklendi karıştırıcıda döndürüldü ve karıştırıcıda dipte tortu oluşması için bekletildi. Süzüntünün içerisine 125mL kloroform amil alkol (1:2) eklenerek 40mL kloroform, 80mL amil alkol eklendi ve karıştırıcıda bekletildi. Çözelti karıştırıcıdan alınarak ekstrakt diyaliz işlemlerini gerçekleştirmek için diyaliz membrana koyularak 3 gün boyunca distile suya karşı diyaliz edildi. Diyalizden çıkan çözelti etanolle çöktürülerek çökelti alındı ve liyofilize edildi. Çöken kısım tüplere konuldu ve liyofilizasyon işlemi için bekletildi. Jel kıvamındaki süzüntü freeze-drying ile kurutuldu. 500gr ibikten 0.5gr kurutulmuş hHA elde edildiği görülmüştür. Çalışmanın aşamaları Şekil 1'de özetlenmiştir.

2.3 Analizler

hHA'nın hyaluronik asit kimliğini teyit etmek için Kızılötesi Fourier Dönüşümü (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR) ve Nükleer Manyetik Rezonans (¹H NMR) analizleri yapıldı. FT-IR için toz haldeki kurutulmuş hHA numuneler Jasco marka FT/IR 4700 (Jasco, Tokyo, Japan) ile (400 - 4000) cm⁻¹ aralığında incelenmiştir. ¹H NMR analizi (¹H NMR) Varian Unit Inova 500 (Varian Unit Inova 500, USA) kullanılarak 500 MHz'de ve 25°C sıcaklıkta yapıldı. hHA umunesi toplam hacmi 600µL ve hacimce oranları H₂O/D₂O, 90/10 karışımında çözdürüldü.



Şekil 2. Horoz ibiğinden üretilen hyaluronik asit (hHA)'nin FT-IR grafiği

3. SONUÇLAR

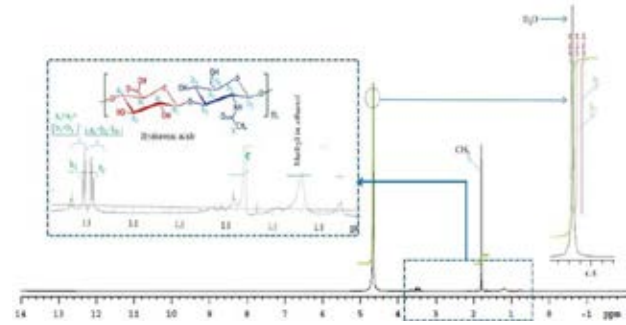
3.1. 1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

Şekil 2'deki hHA'nın FT-IR analizinde bulunan bağlar literatürde bulunan standart HA pikleri ile [11] karşılaştırıldığında hHA'nın

hyaluronik asit yapısında olduğu görülmektedir. hHA spektrumundaki 3200-3400 cm⁻¹ bandındaki pikler OH ve NH grubuna bağlı molekül içi ve moleküller arası gerilme titreşimini göstermektedir [11]. 2921.6 cm⁻¹ ve 2852 cm⁻¹deki pikler sırasıyla CH₂'nin Asimetrik ve simetrik gerilme titreşimine atfedilirken 1641.1 cm⁻¹'deki pik amid-I ve 1540.8 cm⁻¹ amide II pikleri ölçülmüştür. 1238 cm⁻¹ de ise fosfatın asimetrik gerilme piki ve 1402 cm⁻¹deki pik COO⁻ yağ asiti simetrik titreşimine atfedilir. 1029.8 cm⁻¹ ve 607 cm⁻¹deki pikler ise HA'nın standart C-O-C gerilmesinden kaynaklanabilecek birkaç pik noktaları görülmektedir. Bu sonuçlar literatürde daha önce yapılan araştırmalarla örtüşmektedir [11, 12].

3.2 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (¹H NMR)

Şekil 3'te hHA'nın ¹H NMR grafiği görülmektedir. Nükleer manyetik rezonans (NMR), karmaşık karbonhidrat yapısı olan biyomoleküllerin yapısının incelenmesinde kabul edilmiş önemli bir yöntemdir. hHA'nın ¹H NMR analizi sonucunda 1.79 ppm'de görülen pik, hHA'daki metil grubuna [10, 13, 14], 1.15 ppm'deki zayıf pik ise etanol içindeki metil grubuna [15] bağlanır. Ayrıca (3.42-3.55) ppm aralığındaki pikler hHA'daki şeker zincirlerine atfedilir [16]. 4.6 ppm ve 4.8 ppm'deki pikler dH₂O pikidir. Böylece ¹H NMR sonuçları horoz ibiğinden HA üretiminin başarıyla üretildiğini göstermektedir.



Şekil 3. hHA'nın ¹H NMR grafiği ve kimyasal bağları

1. SONUÇ

HA, bağ dokusu yapılandırması için anahtar bir moleküldür ve vücutta kollajen oluşumunu ve bakımını desteklediğinden biyoteknolojik uygulamalar için çok çekici bir materyaldir. HA'nın farklı materyallerden elde edilebiliyor olması bu konudaki araştırmaları canlı tutmaktadır. Çalışmamızda horoz ibiğinden HA üretimi, FT-IR ve ¹H NMR analizleri üretimin başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından 218S270 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

Çalışmada kullanılan horoz ibikleri ER PİLİÇ Entegre Tavukçuluk Üretim Pazarlama Tic. LTD. ŞTİ. tarafından hibe edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Fallacara A., Baldini E., Manfredini S. ve Vertuani S., Hyaluronic Acid in the Third Millennium, Polymers, (2018), 10, 701, DOI:10.3390/polym10070701
2. Ulag S., Kalkandelen C., Oktar F.N., Uzun M., Sahin Y.M., Karademir B., Arslan S., Ozbolat I.T., Mahirogullari M., ve



- Gunduz O., 3D Printing Artificial Blood Vessel Constructs Using PCL/Chitosan/Hydrogel Biocomposites, (2019), *ChemistrySelect* 2019, 4, 2387–2391, DOI: 10.1002/slct.201803740
3. Yang Y., Ding X., Zou T., Peng G. Liu H. ve Fan Y., Preparation and characterization of electrospun graphene/silk fibroin conductive fibrous scaffolds, (2017), www.rsc.org/advances, Open Acces, DOI: 10.1039/c6ra26807b
 4. Üçgül İ., Aras S., Elibüyük U., Ekstraselüler Matris Yapisi ve Görevleri, *Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, Cilt 23, Sayı 1, 2018 Derleme, DOI: 10.17482/uumfd.327376
 5. Saranraj P., Sivakumar S. , Sivasubramanian J., GeethaM., Production, Optimization And Spectroscopic Studies Of Hyaluronic Acid Extracted From *Streptococcus Pyogenes*, (2011), *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* 2011; 2(3):954-959
 6. Kogan G., Soltés L., Stern R. ve Gemeiner, P, Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications, (2007), *Biotechnology Letters*, 29(1), 17–25.
 7. Shiedlin A., Bigelow R., Christopher W., Arbabi S., Yang L., Maier R.V., Wainwright N., Childs A.,ve Miller R.J, Evaluation of Hyaluronan from Different Sources: *Streptococcus zooepidemicus*, Rooster Comb, Bovine Vitreous, and Human Umbilical Cord, (2004), *Biomacromolecules* 2004, 5, 2122-2127, DOI: 10.1021/bm0498427
 8. Kang D.Y., Kim W. S., Heo I. S., Park Y. H., Lee S., Extraction of hyaluronic acid (HA) from rooster comb and characterization using flow field-flow fractionation (FIFFF) coupled with multiangle light scattering (MALS), (2010), *Journal of Separation Science*, DOI: 10.1002/jssc.201000478
 9. Sadhasivam G., Muthuvel A., Pachaiyappan A, Thangavel B., Isolation and Characterization of Hyaluronic Acid From the Liver of Marine Stingray *Aetobatus Narinari*, *International Journal of Biological Macromolecules* 54, (2013), 84– 89, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.11.028
 10. Kanchana S., Arumugam M., Giji S. ve Balasubramanian T., Isolation, characterization and antioxidant activity of hyaluronic acid from marine bivalve mollusc *Amussium pleuronectus*, (2013), *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, DOI: [10.1016/j.bcdf.2013.06.001](https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.06.001)
 11. Oliveira S.A., Silvab B.C., Riegel-Vidotti I.C., Urbano A., Faria-Tischer P.C.S., Tischer C.A., Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb,(2017), *International Journal of Biological Macromolecules* 97, 642–653, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.077
 12. Reddy, K.J. and Karunakaran, K.T., “Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*, (2013), *J. BioSci. Biotech*, 2(3):173–179
 13. Zhang Y., Wu K., Sun H., Zhang J., Yuan J., and Zhong Z., Hyaluronic acid-shelled disulfide-crosslinked nanopolymerosomes for ultrahigh-efficiency reactive encapsulation and CD44-targeted delivery of mertansine toxin, (2017), *ACS Appl. Mater. Interfaces*. DOI: 10.1021/acsami.7b17718
 14. Monticelli D, Martina V, Mocchi R, Rauso R, Zerbinati U, Cipolla G, Zerbinati N. Chemical Characterization of Hydrogels Crosslinked with Polyethylene Glycol for Soft Tissue Augmentation, (2019), *Open Access Maced J Med Sci*. DOI: [10.3889/oamjms.2019.279](https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.279)
 15. Zelenetskii A. N., Uspenskii S., Zaboronok A., Cherkaev G, Shchegolihin A., Mathis B. J., Selyanin M., Yamamoto T., ve Matsumura A., Polycomplexes of Hyaluronic Acid and Borates in a Solid State and Solution: Synthesis, Characterization and Perspectives of Application in Boron Neutron Capture Therapy, (2018), *Polymers* 2018, 10, 181; doi:10.3390/polym10020181
 16. Snyder T.N., Madhavan K., Intrator M., Dregalla R.C. ve Park D., A fibrin/hyaluronic acid hydrogel for the delivery of mesenchymal stem cells and potential for articular cartilage repair, (2014), *Journal of Biological Engineering* 2014 8:10. DOI: 10.1186/1754-1611-8-10