

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı**

**YUMUŞAK ŞEKERLEMELERDE KULLANILAN
YENİLEBİLİR JELATİN ORJİNİNİN LC Q-TOF İLE
BELİRLENMESİ**

**Filiz ÇAVUŞ
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nurgül ÖZBAY**

**BİLECİK, 2018
Ref.No:10176949**



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı**

**YUMUŞAK ŞEKERLEMELERDE KULLANILAN
YENİLEBİLİR JELATİN ORJİNİNİN LC Q-TOF İLE
BELİRLENMESİ**

**Filiz ÇAVUŞ
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nurgül ÖZBAY**

BİLECİK, 2018

TAGEM tarafından TAGEM/HSGYAD17/A03/P01/126 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.



ANADOLU UNIVERSITY



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
UNIVERSITY**

**Graduate School of Sciences
Department of Chemical Engineering**

**DETERMINATION OF THE ORIGIN OF EDIBLE
GELATIN THAT IS USED IN SOFT CANDIES BY USING
LC Q-TOF**

**Filiz ÇAVUŞ
Master Thesis**

**Thesis Advisor
Prof. Dr. Nurgül ÖZBAY**

BİLECİK, 2018



BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS
JÜRİ ONAY FORMU

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ...27.12.2017... tarih ve64..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından .11.01.2018.tarihinde tez savunma sınavı yapılan Filiz ÇAVUŞ'un, "Yumuşak Şekerlemelerde Kullanılan Yenilebilir Jelatin Orijinin LC Q-TOF ile Belirlenmesi" başlıklı tez çalışması Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak oy birliği/ oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Nurgül ÖZBAY

ÜYE : Doç. Dr. Canan Ece TAMER

ÜYE : Doç. Dr. Esin APAYDIN VAROL

ONAY

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/ MÜHÜR

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca bilgi ve desteği ile yanımda olan ve tecrübeleriyle beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nurgöl ÖZBAY'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalıőmamı proje kapsamında gerçekleőtirmemi sağlayan Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araőtırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü ve Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalıőmalarım boyunca gösterdiği katkılarından ve yardımlarından dolayı Dr. Murat Faruk Us ve çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme, eőime, kızlarım, Ezgi ve İrem'e teşekkür ederim.

ÖZET

Bu çalışmada, yumuşak şekerlemelerde kullanılan jelatin orijinin proteom analizi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Jelatin hammaddesi olarak dünyada en fazla kullanılan domuz ve sığır jelatin örnekleri analize alınmıştır. Örneklerdeki protein sindirimi tripsin enzimi ile gerçekleştirilmiştir. Elektrosprey iyonizasyon tekniği kullanılarak Sıvı kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (LC-Q TOF) ile domuz ve sığır jelatinlerine ait MSMS dataları elde edilmiştir. Elde edilen MSMS dataları internet ortamında açık erişimi bulunan veri tabanına yüklenmiştir. Sonuç olarak; domuz jelatini için 6, sığır jelatini için 7 adet ayırt edici niteliği taşıyan peptidlerin aminoasit dizilimlerine ulaşılmıştır. Elde edilen dizilimlerden domuz ve sığır jelatini için ayırt edici (marker) nitelik taşıyan peptidlerin alıkonma zamanlarına (RT) ve m/z (Tolerans ± 20 ppm) değerlerine ulaşılmıştır. Enzimatik sindirim için optimizasyon çalışması yapılmış, etüvde farklı bekleme sürelerinde ayırt edici iyonlara ait pik alanları karşılaştırılarak protein sindiriminin en iyi olduğu bekleme süresi belirlenmiştir. Tespit limitini belirlemek amacı ile sığır jelatini içerisine farklı oranlarda domuz jelatini ilave edilerek analizler gerçekleştirilmiştir. Son olarak Türkiye ve Avrupa'daki marketlerden orijinal ambalajlarında 5 farklı markadan toplam 50 adet yumuşak şekerleme örneklerinde analizler gerçekleştirilmiş ve bu örnekler içerisinde bulunan jelatin orijini, aminoasit sekans analizi ile belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: aminoasit sekansı, domuz jelatini, LC Q-TOF, sığır jelatini, yumuşak şeker

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the origin of gelatin used in soft candies by proteomic analysis. Porcine and bovine gelatin samples, which are mostly used in the world, were analyzed as the gelatin raw material. The protein digestion in the samples was performed with trypsin enzyme. MSMS data of porcine and bovine gelatin were obtained by Liquid Chromatography-Flight Time Mass Spectrometry (LC-Q TOF) using electrospray ionisation technique. The obtained MSMS data were uploaded to an open access database on the internet. As a result, amino acid sequences of peptides carrying 6 marker proteins for porcine gelatin and 7 marker proteins for bovine gelatin were obtained. The retention times (RT) and m/z (Tolerance ± 20 ppm) of the peptide having marker characteristics for porcine and bovine gelatin were obtained from the obtained sequences. Optimization studies for enzymatic digestion were performed and the peak periods of the protein digestion were determined by comparing the peak areas of the marker ions at different retention times of the sample. To determine the detection limit, porcine gelatine was added at different ratios into bovine gelatin and analyzes were carried out. Finally, 50 soft candy samples were analyzed from 5 different brands in their original packaging from Turkey and European markets and the gelatin content in these samples was determined by amino acid sequence analysis.

Keywords; aminoacid secans, porcine gelatin, LC-Q TOF, bovine gelatin, soft candies

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR	
ÖZET	I
ABSTRACT	II
İÇİNDEKİLER	III
SİMGELER VE KISALTMALAR	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
1. GİRİŞ	1
2. JELATİN	3
2.1. Jelatin Kullanım Alanları	5
2.2. Jelatinin Gıdalarda Kullanımı	7
2.3. Jelatinin Endüstriyel Kullanımı	7
3. PROTEOMİKS ANALİZ	9
3.1. Amino Asitler.....	9
3.2. Peptidler ve Peptid Bağı.....	10
3.3. Proteom Analizi.....	12
3.4. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi.....	17
3.4.1. Sıvı kromatografi.....	17
3.4.2. Kütle spektrometresi.....	17
3.4.2.1. Yüksek vakum sistemi.....	19
3.4.2.2. Numune giriş sistemleri.....	21
3.4.2.3. İyon kaynağı.....	22
3.4.2.4. Kütle analizörü.....	25
3.4.2.5. Dedektör.....	27
3.4.2.6. Data sistemi ve kayıt.....	28
3.4.2.7. Verilerin elde edilmesi.....	28
4.LİTERATÜR ÇALIŞMALARI	30

Sayfa No

5.MATERYAL VE METOTLAR.....	32
5.1. Materyal.....	32
5.1.1. Cihazlar.....	32
5.1.2. Kimyasal maddeler.....	33
5.1.3. Analitik standart maddeler.....	34
5.2. Metot.....	34
5.2.1. Enzim çözeltilisinin hazırlanması.....	35
5.2.2. Örneklerin hazırlanması.....	35
5.2.3. Cihaz Koşulları	35
5.2.3.1. HPLC şartları.....	35
5.2.3.2. Q-TOF tarama şartları.....	36
5.2.3.3 Q-TOF auto MS/MS tarama şartları.....	37
5.3.Metot Validasyonu.....	37
6. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	41
7. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR**Simgeler**

atm	: Atmosfer
dk	: Dakika
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
g	: Gram
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
kV	: Kilovolt
m/z	: Kütle/Yük
L	: Litre
mg	: miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
ms	: Milisaniye
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µs	: Mikrosaniye
s	: Saniye
°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
V	: Volt
%	: Yüzde

Kısaltmalar

RT	: Alıkonma zamanı
Arg	: Arijinin
Asp	: Aspartik asit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DTT	: Ditiotreitol
IAA	: İodoasetamit
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
Phe	: Fenilalanin
FTIR	: Fourier dönüşümlü infrared spektrometresi
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
Glu	: Glutamik asit
MS	: Kütle spektrometresi
Lsy	: Lizin
MALDI	: Matriks yardımcı desorpsiyon iyonlaştırma
Met	: Metiyonin
SIM	: Seçilen iyon taraması
LC	: Sıvı kromatografi
SCAN	: Toplam iyon taraması
Try	: Tirozan
Trp	: Triptofan
Q-TOF	: Uçuş zamanlı kütle spektrometresi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografi

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.: Jelatinin diğer kıvam arttırıcılarla özelliklerinin karşılaştırılması.....	6
Çizelge 2.2. : Gıda ürünlerine katılan jelatin ve icra ettiği fonksiyonlar.....	7
Çizelge 3.1. : Doğada bulunan başlıca amino asitler ve kısaltılmış adları.....	11
Çizelge 3.2. : Polipeptid zincirlerini spesifik noktalardan ayıran enzimler.....	15
Çizelge 3.3. : Proteinlerin tanımlanmasında kullanılabilecek web adresleri.....	16
Çizelge 3.4. : Moleküler kütle spektroskopide kullanılan iyon kaynakları.....	23
Çizelge 5.1. : HPLC hareketli faz akış programı.....	36
Çizelge 5.2. : Q-TOF iyonlaştırma şartları.....	36
Çizelge 5.3. : Q-TOF MS/MS iyonlaştırma şartları	37
Çizelge 5.4. : AOAC rehberinde önerilen metot validasyon parametreleri.....	38
Çizelge 6.1. : Domuz jelatinine ait peptidler.....	50
Çizelge 6.2. : Sığır jelatinine ait peptidler	50
Çizelge 6.3. : Farklı bekleme sürelerinde sığır jelatininde belirlenen ayırt edici peptidlerin pik alanları.....	58
Çizelge 6.4. : Farklı bekleme sürelerinde domuz jelatininde belirlenen ayırt edici peptidlerin pik alanları.....	58
Çizelge 6.5. : Türkiye’den alınan yumuşak şekerleme örneklerine ait sonuçlar.....	61
Çizelge 6.6. : Almanya’dan alınan yumuşak şekerleme örneklerine ait sonuçlar.....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. : Kolajen, jelatin ve jelatin hidrolizatının flematik olarak görünümü.....	4
Şekil 2.2. : ABD jelatin pazarı 2013-2024 (milyon ton).....	5
Şekil 3.1. : Proteom analizinin tarihsel gelişimi	9
Şekil 3.2. : Peptid bağının oluşumunun şematik gösterimi	10
Şekil 3.3. : Peptidin aminoasit şematik gösterimi.....	12
Şekil 3.4. : Spektroskopik analiz akış şeması.....	13
Şekil.3.5. : Roepstorff-Fohlmann-Biemann adlandırması	15
Şekil.3.6. : Sıvı kromatografi bileşenleri.....	18
Şekil 3.7. : Kütle spektroskopisinin bileşenleri.....	20
Şekil 3.8. : Turbo moleküler pompa.....	20
Şekil 3.9. : Sıvı kromatografisi giriş sistemleri şematik görünümü.....	22
Şekil 3.10. : MALDI iyonlaştırma şematik görünümü.....	25
Şekil 3.11. : Elektrosprey iyonizasyon(ECI) şematik görünümü.....	26
Şekil 3.12.: 4 kutuplu kuadropol yapısı.....	26
Şekil 3.13. : Uçuş zamanlı kütle analizörü yapısı.....	27
Şekil 3.14. : Sürekli elektron çoğaltıcının yapısı.....	28
Şekil 3.15. : Örnek kütle spektrumu	29
Şekil 5.1. : Almanya'dan alınan yumuşak şekerleme örnekleri	32
Şekil 5.2. : Kimlik belirleme ve doğrulama laboratuvarı.....	33
Şekil 5.3. : Agilent 6520 LC-ESI-Q-TOF	34
Şekil 6.1. : A. Domuz jelatini toplam iyon kromatogramı., B .Sığır jelatini toplam iyon kromatogramı	41
Şekil 6.2. : Mascot veri tabanına girişte seçilen parametrelerin gösterimi.....	42
Şekil 6.3. : Domuz jelatini protein kümesinden elde edilmiş peptidlerin ESI LC QTOF MS ile tespit edilen kütlelerine ait örnek kromatogram.....	43
Şekil 6.4. : Kesimi yapılan domuz jelatini protein kümesinin mascot araştırma sonucu.....	44
Şekil 6.5. : Protein kümesinden tespit edilen domuz proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları.....	45
Şekil.6.6. : 841,4099 m/z peptid dizilimi.....	45

Şekil 6.7. : Sığır jelatini protein kümesinden elde edilmiş peptidlerin ESI LC QTOF MS ile tespit edilen kütlelerine ait örnek kromotogram	46
Şekil 6.8. : Kesimi yapılan sığır jelatini protein kümesinin mascot araştırma sonucu.....	47
Şekil 6.9. : Protein kümesinden tespit edilen sığır proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları	48
Şekil 6.10. : 641,3140(+2) m/z peptid dizilimi	49
Şekil 6.11. :A.Sığır jelatinine ait kromotogramda 988,4987 m/z. B.Domuz jelatinine ait kromotogramda 988,4987 m/z.....	51
Şekil 6.12. :A.Sığır jelatinine ait kromotogramda 767,4029 m/z. B.Domuz jelatinine ait kromotogramda 767,4029 m/z.....	51
Şekil 6.13. :A.Sığır jelatinine ait kromotogramda 785,4259 m/z. B.Domuz jelatinine ait kromotogramda 785,4259 m/z	52
Şekil 6.14. :A.Sığır jelatinine ait kromotogramda 641,3127 m/z. B.Domuz jelatinine ait kromotogramda 641,3127 m/z	52
Şekil 6.15. :A.Sığır jelatinine ait kromotogramda 780,9125 m/z. B.Domuz jelatinine ait kromotogramda 780,9125 m/z	53
Şekil 6.16. :A.Sığır jelatinine ait kromotogramda 597,3339 m/z. B.Domuz jelatinine ait kromotogramda 597,3339 m/z	53
Şekil 6.17. : A. Sığır jelatinine ait kromotogramda 945,4365 m/z. B. Domuz jelatinine ait kromotogramda 945,4365 m/z	54
Şekil 6.18. : A.Domuz jelatinine ait kromotogramda 842,4107 m/z. B.Sığır jelatinine ait kromotogramda 842,4107 m/z	54
Şekil 6.19. : A.Domuz jelatinine ait kromotogramda 971,4536 m/z. B.Sığır jelatinine ait kromotogramda 971,4536 m/z	55
Şekil 6.20. : A.Domuz jelatinine ait kromotogramda 811,4420 m/z. B.Sığır jelatinine ait kromotogramda 811,4420 m/z	55
Şekil 6.21. : A.Domuz jelatinine ait kromotogramda 733,8751 m/z. B.Sığır jelatinine ait kromotogramda 733,8751 m/z	56
Şekil 6.22. : A.Domuz jelatinine ait kromotogramda 656,3184 m/z. B.Sığır jelatinine ait kromotogramda 656,3184 m/z	56
Şekil 6.23. : A.Domuz jelatinine ait kromotogramda 773,9138 m/z. B.Sığır	57

jelatinine ait kromotogramda 773,9138 m/z.....	
Şekil 6.24. : %1 domuz_%99 sığır örneği ECI kromotogramı(773,9138 m/z).....	57
Şekil 6.25. : Sığır jelatinine ait ayırt edici peptidlerinin optimizasyon grafiği.....	59
Şekil 6.26. : Domuz jelatinine ait ayırt edici peptidlerinin optimizasyon grafiği)....	59
Şekil 6.27. : Almanya'dan alınan şekerleme örneği m/z 811,4420(GPTGPAGVR).	60
Şekil 6.28. : Türkiye'den alınan şekerleme örneği m/z 811,4420(GPTGPAGVR)..	60

1.GİRİŞ

Jelatin, çok fonksiyonlu bir hidrokolloid olup; bu nedenle gıda, eczacılık, kozmetik, tıp ve fotoğraf ürünlerinde yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Dünyada en yaygın olarak şekerlemeler ve ilaç kapsüllerinde kullanılmaktadır. Jelatinin doğrulama ve köken değerlendirmesi; sadece gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisindeki ticari dolandırıcılıkların önlenmesine yardımcı olmamakta, aynı zamanda insan sağlığı için zararlı olabilecek besi hayvanlarında görülebilen hastalıklardan kaynaklanan güvenlik risklerini önlemeye de yardımcı olmaktadır. Bu nedenle, jelatin türlerinin doğru bir şekilde tespit edilmesi bu sektörler için birincil olarak önem taşımaktadır.

Sığır ve domuz jelatinlerini ayırt etmek için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda, her iki jelatinin birbirinden ayrılması; spektroskopik, kimyasal, sıvı kromatografisi ve immünokimyasal teknikler de dahil olmak üzere analitik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Nhari, vd., 2012; Doi, vd., 2009).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda proteinlerin yapılarının aydınlatılması için proteinlerin kendi aralarındaki etkileşimleri farklı tekniklerle açıklanmaya çalışılmıştır. Makromoleküllerin kompleks yapıda ve büyük boyutlarda olmaları bu çalışmaları zorlaştırmaktadır. Bu nedenle proteinlerin yapılarının ve fonksiyonlarının aydınlatılmasında, proteinlere göre daha az kompleks olan peptitlerin yapı analizleri önem kazanmıştır. Elektrosprey ile kütle spektrometresinin birleşimden doğan ESI-MS tekniği kullanılarak sekans belirlemeye hızlı ve doğru bir şekilde imkan tanıyan bu yöntem, proteomiğin gelişmesine yardımcı olmuştur. Kütle spektrometrisi yöntemi bu açıdan önde gelen çalışma alanlarından biridir.

Sığır ve domuz jelatinleri benzer yapılara ve fizikokimyasal özelliklere sahiptir ve bu nedenle de geleneksel spektroskopi yöntemiyle ayırt edilmeleri güçtür. İmmünokimyasal yöntem, kolajeni tanımlamak için kullanılmaktadır, ancak bu yöntem kolajen antijenitesinin belirlenmesinde önemli bir rol oynayan prolin hidroksilasyonunun derecesinden etkilenebilmektedir (Sawhney, vd.,2005; Venien, vd., 2005).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi, DNA analizinde kullanılmaktadır. Bu yöntem kolajen tanımlanmasında yaygın olarak uygulanmasına rağmen, işleme

esnasında jelatindeki DNA'nın büyük bir yıkıma uğramasından dolayı jelatin tanımlanması için uygun değildir (Tasanen, vd.,1998; Kausckke, vd., 1999).

Gerçek zamanlı PCR, küçük miktarlardaki hedef DNA'yı tespit edecek kadar hassastır ve spesifiktir. Bu nedenle, jelatin karışımları, jelatin içeren gıda ürünleri ve kapsül kabuklarında sığır ve domuz DNA'sının tespit edilmesi konusunda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak, ekipmanların ve kimyasalların yüksek maliyeti nedeniyle, tüm laboratuvarlarda bu yöntemin uygulanması mümkün olmamaktadır (Shabani , vd., 2015).

Proteomik yöntemler jelatinlerdeki kollajen türlerinin özgünlüğünün ve izlenebilirliğinin denetlenmesi için alternatif bir araç olarak ortaya çıkmaktadır ve homolog jelatinler arasındaki farklılıkları açıklamak için kütle spektrometresi başarıyla uygulanmaktadır (Zhang ve Lui, 2009).

Bu çalışmada yumuşak şekerlemelerde kullanılan jelatin orijininin elektrosprey iyonizasyon tekniği kullanılarak;

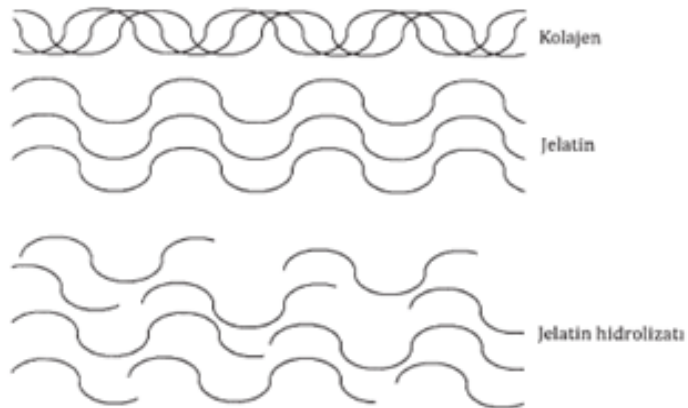
- Sıvı kromatografisi uçuş zamanlı kütle spektrometresi ile tanımlanmasına yönelik metod oluşturulması
- Oluşturulan metodun validasyonunun gerçekleştirilmesi
- Piyasadan yumuşak şekerleme örnekleri alınarak bu numunelerde kullanılan jelatin türünün proteomik yöntemler ile tanımlanması planlanmıştır.

2.JELATİN

Jelatin, sığır ve domuz gibi memeli hayvanların bağ dokularından ekstrakte edilen kollajenin kontrollü şartlarda kısmi hidrolizi ile üretilen yüksek molekül ağırlıklı polipeptid karışımıdır (Karim ve Bhat, 2008). Jelatinin yapısını %85-%92 protein, geri kalanını su ve mineraller oluşturmaktadır (Duconseille, vd., 2015).

Kollajen, (insanlar da dahil olmak üzere) hayvan organlarının temel yapısının bir parçası olup; cilt, tendon, kemik, zar ve bağ dokularından oluşturmaktadır. Lifler halinde düzenlenmiş ve kovalent bağlar ile bağlanmış katı çubuk benzeri moleküllerden oluşmaktadır. Bu moleküller, hidrojen ve hidrofobik bağlarla stabilize edilen ve tekrarlayan glisin-proline-hidroksiprolin (Gly-X-Y) dizisinden dolayı üçlü helis yapıda düzenlenmiş olan üç polipeptit zincirine sahiptir. Dokulardaki dağılımına dayalı olarak sınıflandırılabilen bir dizi kollajen türü bulunmaktadır. Ancak, çoğu kollajen tip I, II ve III'ten oluşur. Tip I kolajen, gevşek ya da yoğun bağ dokusu olarak dağılmış olup; deri, kemikler, tendonlar ve kan damarlarında bulunabilir. Tip II kolajen, kıkırdak ve camsı salgılardan türeyen dokulardan oluşur. Tip III kolajen ise, gevşek bağ dokusunda ve ayrıca tip I kolajen ile ilişki halinde bulunduğu kaslarda bulunmaktadır. Bu kollajen türleri, aynı zamanda moleküler kompozisyon açısından da farklılık göstermektedirler (Hanani, 2016). Kolajen molekülünün kısmi hidrolizi ile alfa zincirler arasındaki hidrojen bağları ve bazı kovalent bağlar kopar. Bununla birlikte alfa zincirler, peptit bağlarının da kopması ile daha küçük parçalara ayrılır. Oluşan kolajen parçalarından molekül ağırlığı 30 kDa'un üzerinde olanlar jelatin olarak adlandırılır.30 kDa'dan küçük kolajen parçaları jelatin olarak değil ancak jelatin hidrolizatı olarak adlandırılır. Kolajen, jelatin ve jelatin hidrolizatın flematik olarak görünümü Şekil 2.1'de verilmiştir. Bu parçaların tek başlarına jel oluşturma yetenekleri yoktur (Boran ve Regenstein, 2010).

Halen gıda olarak tüketilen ve endüstriyel hammadde olarak kullanılan jelatinin, çok uzun ve başarılarla dolu bir tarihi vardır. Hayvansal dokularda bulunan kollajenin kontrollü şartlarda hidrolizi ile üretilen jelatin, eski çağlarda “biyolojik bir yapışkan” olarak kullanılırdı, ancak zaman ilerledikçe, endüstriyel ölçekte üretilmeye ve çok çeşitli alanlarda da kullanılmaya başlanmıştır (Schrieber ve Gareis, 2007).



Şekil 2.1. Kolajen, jelatin ve jelatin hidrolizatın flematik olarak görünümü (Boran, 2011).

Örneğin, 8000 yıl önce, Ortadoğu’da mağara adamları, hayvansal dokulardan zank (yapıştırıcı) ürettiler. Bundan 3000 yıl sonra antik mısırlılar, kollajenden ürettikleri bir çeşit yapıştırıcıyı, mobilya tarzı eşya üretiminde kullandılar. Çok sonraları, İngiltere kralı VIII. Henry’nin (1491-1547) maiyetinde düzenlenen ziyafetlerde, jelatinden üretilen bazı yemekler menüde yerini almış ancak jelatinin, bir gıda maddesi olarak değeri, ilk kez Napolyon döneminde anlaşılmıştır. İngilizler tarafından kuşatılan Fransızlar et bulmakta çok sıkıntı çektikleri bir dönemde jelatini bir protein kaynağı olarak kullanmak zorunda kalmışlardır (Schrieber ve Gareis,2007).

İlk çağlardan beri üretilen ve kullanım alanı gittikçe artan jelatin, Türkiye dahil pek çok ülkede doğal bir gıda olarak kabul edilmekte dolayısıyla tüketimi de sınırlandırılmamaktadır. Son yıllarda Dünya’da yaklaşık 300 bin ton civarında jelatin üretildiği ve bunun da yaklaşık %65’inin Avrupa’ya ait olduğu bildirilmektedir. Endüstriyel olarak üstün özellikleri ve çok yaygın bir kullanım alanı bulunan jelatinin Dünyada ve ülkemizde ihtiyacının daha da artarak devam edeceği öngörülmektedir (Yetim, 2011).

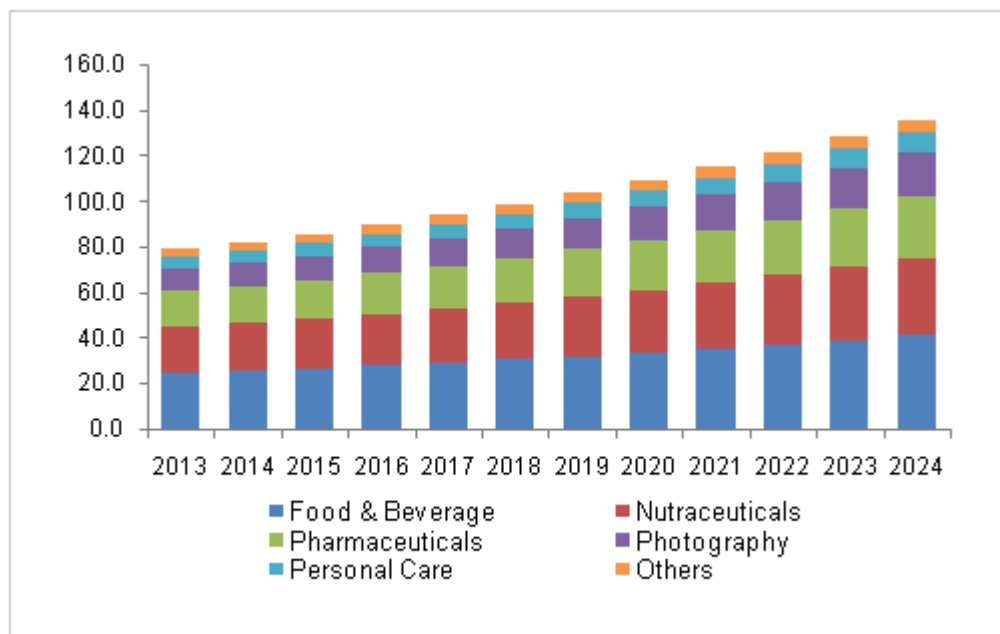
2015 yılında 412,7 bin ton üretilen jelatin üretiminin 2024 yılında 651,7 bin tona ulaşması beklenmektedir. 2015 raporları incelendiğinde jelatin tüketiminin en yüksek olduğu endüstri yiyecek ve içecek endüstrisi olarak belirtilmiştir. Grandviewresearch tarafından hazırlanan raporda, 2013 yılından 2024’e kadar Amerikada’ki jelatin tüketiminin en yüksek olacağı sektörler Şekil 2.2’de belirtilmiştir.

Jelatin üretiminde en büyük kaynak domuz derisi olup (%46) bunu sığır derisi (%29,4), sığır ve domuz kemiği (%23,1) izlemektedir (Karim ve Bhat, 2009).

Avrupa Jelatin Üreticileri Derneği (GME)'ne göre Avrupa'da üretilen jelatinin %80'i domuz derisi, %15'i sığır derisinden, %5'i sığır ve domuz kemiklerinden üretilmektedir (Koçak, 2013).

Levhalar, granüller, ya da tozlar gibi ticari jelatin formları, temel olarak sığır kemikleri ve postu, domuz derisi ve son zamanlarda ise domuz kemiğinden yapılmaktadır (Hermanto ve Fatimah, 2013).

Son yıllarda jelatin pazarında, balık ve kanatlı sanayi kaynaklı jelatinler üzerinde çalışmalar yapılmakta ve bu ürünlerin verim ve kalitelerinin iyileştirilmesi ile arge çalışmaları yapılmaktadır (Karim ve Bhat, 2009).



Şekil 2.2. ABD jelatin pazarı 2013-2024 (milyon ton) ([http:// www.grandviewreserch](http://www.grandviewreserch)).

2.1. Jelatinin Kullanım Alanları

Jelatin, diğer jelleştirici karbohidratlarla karşılaştırıldığında avantajlar sağlaması nedeniyle tercih edilmekte ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Jelatinin diğer kıvam arttırıcılarla özelliklerinin karşılaştırılması ve avantajları Çizelge 2.1'de verilmiştir. Bu avantajlar arasında jelatinin düşük sıcaklıklarda (insan vücut sıcaklığı) kolayca eriyebilmesi en önemli etkidir (Williams, 2007). Bununla birlikte jelatin, suda kolay çözünür olması, tatsız ve kokusuz olması, birkaç fonksiyonel özelliği birlikte

gösterebilmesi ve çeşitli uygulamalar için farklı özelliklere sahip olarak üretilebilmesi nedeniyle tercih edilmektedir (Baziwane ve He, 2003).

Çizelge 2.1. Jelatinin diğer kıvam arttırıcılarla özelliklerinin karşılaştırılması (Boran, 2011).

Jelatin	Diğer Kıvam Arttırıcılar
Çok fonksiyonludur. Jelleştirici, kıvam arttırıcı, emülsifiye edici, köpük önleyici ve film oluşturucu olarak kullanılabilir.	Diğer kıvam arttırıcılar jelatinin yerine getirdiği fonksiyonu tek başına yapamaz, her fonksiyon için ayrı ayrı kıvam arttırıcı kullanmak gerekir.
Jelatin ülkemiz dahil pek çok ülkede gıda katkısı olarak değerlendirilmez, bu yüzden kullanımı serbest ve güvenlidir.	Diğer kıvam arttırıcılar genellikle bir E kod numarasına sahiptir ve gıda katkısı olarak değerlendirilir.
Jelatin ısıl olarak geri dönüşlü bir jel oluşturur ve en önemli özelliği vücut sıcaklığında eriyebilmesidir. Dolayısıyla gıda endüstrisinde tercih edilmektedir.	Diğer kıvam arttırıcılar daha yüksek erime sıcaklığına sahiptir ve geri dönüşlü bir jel oluştursalar bile erime ve jelleşme sıcaklıkları arasında büyük fark vardır.
Jelatin kolajenin hidroliz derecesine göre farklı jel gücünde ve şekilde üretilebilir.	Diğer kıvam arttırıcılarla farklı jel gücü elde etmek için şeker ve tuz gibi farklı bileşenler kullanılır.
Jelatin tam ve kolay olarak sindirilebilir.	Diğer kıvam arttırıcılar bazı minerallerin emilimini düşürebilmektedir.

Jelatin, çok fonksiyonlu bir hidrokolloiddir; bu sebeple gıda ve ilaç ürünlerinde, kozmetik ve tıbbi ürünlerde (kan plazması ikame maddeleri, jelatin süngerler) yaygın şekilde kullanılır. Dünya’da en yaygın olarak şekerlemeler ve ilaç kapsüllerinde kullanılmaktadır (Hidaka, vd., 2003; Nhari, vd., 2012).

2.2. Jelatinin Gıdalarda Kullanımı

Jelatin genel olarak kolay ve güvenli bir gıda maddesi olarak kabul edilmektedir. Nötr bir tadı ve kokusu olduğu için jelatinin gıda ürünlerine eklenmesi gıda ürünlerinin özgün tadına etki etmemektedir (Schrieber ve Gareis, 2007).

Gıda sektöründe jelatinin kullanıldığı yerler ve kullanım amaçları Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir. Bunun yanı sıra jelatin hidrolizatları, gıdalara eklenmesi yanında bira, şarap ve meyve sularının berraklaştırılmasında kullanılır. Şekerleme endüstrisinde jelatin, ısıl tersinir jel oluşturma özelliği, köpük oluşturma ve stabilizasyonu, bağlama, emülsifikasyon ve kontrollü şeker kristalizasyonu gibi fonksiyonlara etki ettiğinden dolayı bu alanda çok fazla kullanılmaktadır (Schrieber, vd.,2007; Hau, vd.,2009).

Çizelge 2.2. Gıda ürünlerine katılan jelatin ve icra ettiği fonksiyonlar (Haug ve Draget, 2009).

Katıldığı gıda grubu	Katılım oranı (%)	Ana fonksiyon	Alt fonksiyon
Tatlılar	1,5-3,0	Jel oluşumu	Saydamlık, berraklık
Meyveli sakızlar	6,0-10,0	Jel oluşumu	Elastikiyet, tekstür
Lokumlar	1,0-3,0	Köpük oluşumu	Köpük stabilitesi
Yoğurt	0,2-1,0	Sinerezis kontrolü	Tekstür, kremsilik
Et ve sosisler	0,5-2,0	Emülsiyon stabilizasyonu	Su ve sızıntı suyu bağlama
Jelli süt tatlıları	1,0-2,0	Jel oluşumu	Tekstür, kremsilik
Karameller	0,5-2,0	Emülsifikasyon	Çiğnenebilirlik

2.3. Jelatinin Endüstriyel Kullanımı

Jelatin, farklı endüstrilerde yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Jelatinlerin kullanıldığı alanlar ve üretilen ürünlerde gösterdikleri fonksiyonlar ile bu ürünlere katılım amaçları;

- Fotoğraf endüstrisi: Fotoğrafçılıkta kullanılan modern gümüş bromür materyalleri, jelatin içeren emülsiyonlardan üretilir. Bu emülsiyonlarda jelatin,

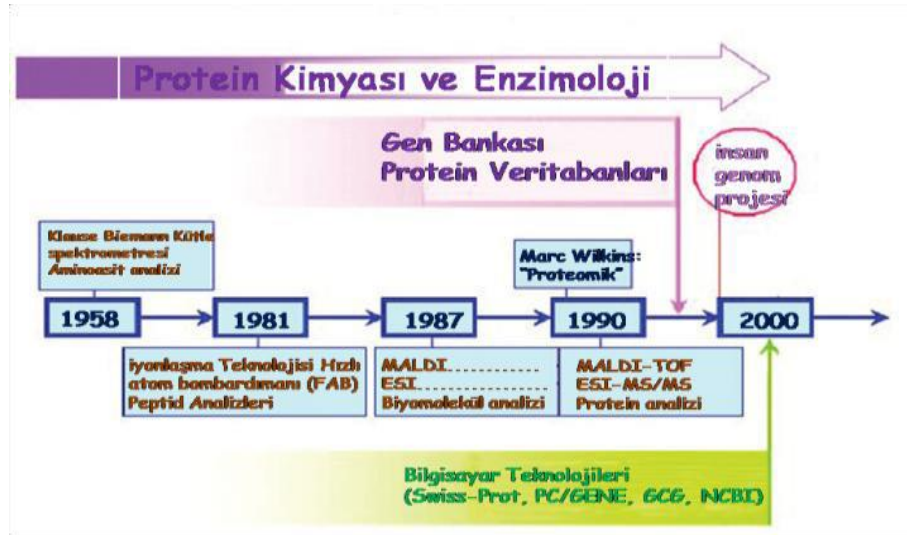
film tabakasına destek materyali görevi görür. Yaklaşık yüzyıl önce, fotoğrafçılık endüstrisinde kullanılmaya başlayan jelatin, son zamanlarda da X ışını filmlerinin üretimi için talep edilmektedir.

- Kozmetik endüstrisi: İnsanoğlunun güzel ve kırışmamış bir deriye sahip olma arzusu, kozmetik endüstrisinde kollajen ve jelatin kullanımında bir çığır açmıştır. Sığır, domuz ve balık kökenli kollajen ve jelatinler, saç ve deri bakım ürünlerinde kullanılan ve önemli fonksiyonlar icra eden ürünlerdir. Örneğin, jelatin hidrolizatları, su bağlama kapasitesini artırmak, trans-epidermal su kaybını azaltmak ve deriyi iyileştirmek amacıyla deri bakım setlerine ilave edilmektedir.
- Tıp ve eczacılık endüstrisi: Jelatin, acil veya tıpta kullanılan serumlarda (plazma ikamesi olarak), kapsüllerde, vitamin kaplama materyallerinde, pastillerde, tabletlerde, damlaların üretiminde, macun kaplamalarında, sünger üretiminde ve yeni geliştirilen aşıların formülasyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır.
- Beslenme ve sağlık endüstrisi: Jelatin, kolesterol, şeker ve yağ içermeyen bir Protein kaynağıdır. Kollajenin aksine sindirimi kolaydır ve insan metabolizmasında tamamen yıkıma uğratılır. Uzmanlara göre jelatin, iskelet ve omurilik sistemi ile kemiklerin, kırıkdağların, tendon ve ligamentler üzerinde rejeneratif etkide bulunmaktadır. Yine, jelatinin, saçları kuvvetlendirdiği, bağ ve destek dokularını da güçlendirerek deriyi sıkılaştırdığı, saçlara parlak bir görünüm ve tırnaklara dayanıklılık kazandırdığı ileri sürülmektedir (Yetim, 2011).

3.PROTEOMİK ANALİZ

Proteom, bir organizma ya da dokunun genomu tarafından ifade edilen proteinlere verilen addır. PROTEin ve genOM sözcüklerinin bileşiminden oluşmuştur. Proteom sözcüğü ilk kez 1994'de Marc Wilkins tarafından önerilmiş, 1995 yılında literatürde yerini almıştır (Wilkins, vd., 1995). Proteom analizinin 1958 yılından 2000 yıllara kadar olan tarihsel gelişimi Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

Proteomik olarak tanımlanan proteom analizi, proteinlerin yapısal özelliklerinin belirlenmesini ve işlevlerinin aydınlatılmasını kapsar. Protein analizi DNA analiziyle karşılaştırılmayacak kadar zordur. DNA yalnızca dört yapı taşından oluşurken, doğal proteinler 20 farklı aminoasitten oluşur ve üç boyutlu yapıları işlevlerini etkiler (Dass, 2007).



Şekil 3.1. Proteom analizinin tarihsel gelişimi (Doğan, 2013).

3.1. Amino Asitler

Biyolojik makromoleküllerin (proteinler, hormonlar, enzimler v.s.) büyük çoğunluğu amino asitlerden oluşmuştur. Her bir makro molekülün yapısı ise doğrudan doğruya kendisini oluşturan amino asitlerin yapılarına bağlıdır.

Proteinlerin yapıtaşı olan, aynı α -karbon atomuna bağlı $-\text{COOH}$ ve $-\text{NH}_2$ gruplarından oluşan monomere amino asit denir. Proteinlerin yapısında toplam 20 tane amino asit vardır. Doğada ise yaklaşık olarak 300 farklı amino asit olduğu

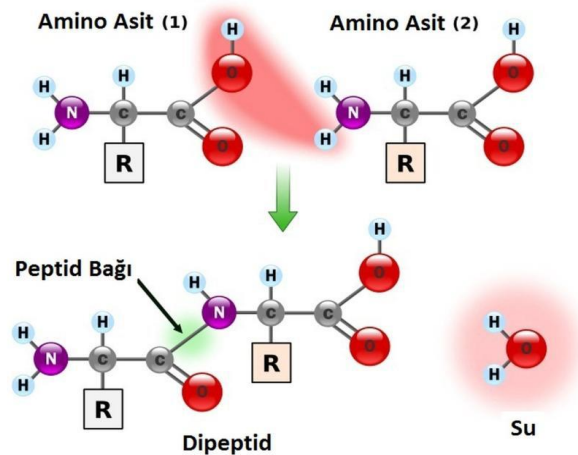
bilinmektedir. İlk olarak 1806'da asparajin keşfedilmiştir. Bulunan 20 amino asitten sonuncusu olan treonin 1938'e kadar tanımlanamamıştır.

Amino asitlerin sahip oldukları yan zincirler α -karbonuna bağlı olup 20 amino asitin her birinde farklıdır (Çizelge 3.1). Bu farklılık, proteinin kendine özgü yapısının ve aktivitesinin olmasını sağlar. Tüm amino asit yan zincirleri bir arada düşünüldüğünde, artı veya eksi yüklüden hidrofobiğe kadar oldukça fazla çeşitli yapısal özellikler gösterirler. Ayrıca bu yan zincirler, oldukça farklı çeşitlilikte kovalent ve nonkovalent bağların yapısına katılabilirler.

Aminoasitlerin amino ve karboksil grupları ortamın pH değerine göre negatif, pozitif veya hem negatif hem de pozitif yük taşıyan molekül oluşturabilirler. Fizyolojik pH'da karboksil grubu proton kaybederek negatif yüklü karboksil iyonunu (COO^-) oluşturur ve amino grubu proton alarak (NH_3^+) iyonize olur. Böyle bir aminoasit, yüklü olmakla beraber net yük taşımaz. Buna Zwitterion ya da dipolar iyon denir. Bu amino asitler nonpolar ve hidrofobik yan zincir içerirler. Alanin, Valin, Lösin ve İzolösinin yan grupları bir araya gelerek hidrofobik etkileşimlerle protein yapısını sabitler (Solomons ve Fryhle, 2004).

3.2. Peptidler ve Peptid Bağı

Peptidler, aminoasit monomerlerinin peptid bağları ile bir araya gelmesinden oluşan doğal polimerlerdir. Bir amino asidin -karboksil grubunun -OH'i ile diğer amino asidin -amino grubu arasından su ayrılarak peptid bağı oluşur. Peptid bağının şematik olarak gösterimi Şekil 3.2'de verilmiştir.

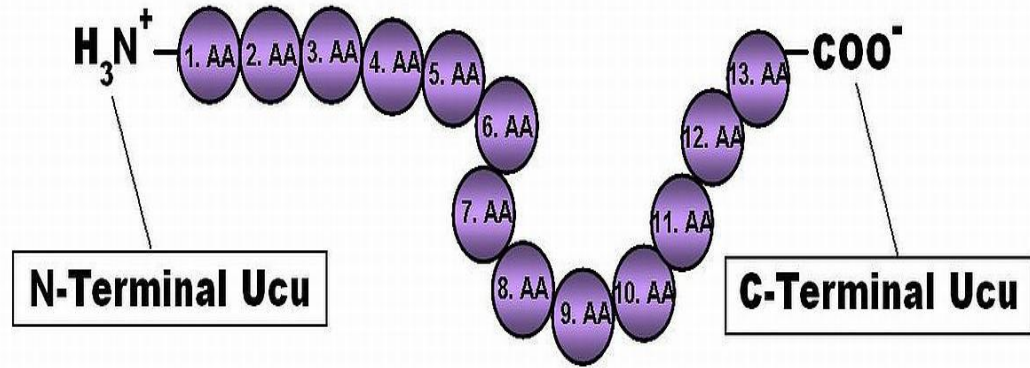


Şekil 3.2. Peptid bağının oluşumunun şematik gösterimi (Solomons ve Fryhle, 2004).

Çizelge 3.1. Doğada bulunan başlıca amino asitler ve kısaltılmış adları (<http://www.matrixscience.com>).

	Aminoasit Adı	Kimyasal Formülü	3 harfli gösterim	Tek harfli gösterim	Mono-İsotopic kütle
1	Alanin	C ₃ H ₅ NO	Ala	A	71,037114
2	Arjinin	C ₆ H ₁₂ N ₄ O	Arg	R	156,101111
3	Asparajin	C ₄ H ₆ N ₂ O ₂	Asn	N	114,042927
4	Aspartik asit	C ₄ H ₅ NO ₃	Asp	D	115,026943
5	Sistein	C ₃ H ₇ NO ₂ S	Cys	C	103,009185
6	Glütamik asit	C ₅ H ₇ NO ₃	Glu	E	129,042593
7	Glutamin	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	Gln	Q	128,058578
8	Glisin	C ₂ H ₅ NO ₂	Gly	G	57,021464
9	Histidin	C ₆ H ₇ N ₃ O	His	H	137,058912
10	İzolösin	C ₆ H ₁₁ NO	Ile	I	113,084064
11	Lösin	C ₆ H ₁₁ NO	Leu	L	113,084064
12	Lizin	C ₆ H ₁₂ N ₂ O	Lys	K	128,094963
13	Metiyonin	C ₅ H ₉ NOS	Met	M	131,040485
14	Fenilalanin	C ₉ H ₉ NO	Phe	F	147,068414
15	Prolin	C ₅ H ₇ NO	Pro	P	97,052764
16	Serin	C ₃ H ₅ NO ₂	Ser	S	87,032028
17	Treonin	C ₄ H ₇ NO ₂	Thr	T	101,047679
18	Selenosistein	C ₃ H ₅ NOSe	SeC	U	150,95363
19	Triptofan	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O	Trp	W	186,079313
20	Tirozin	C ₉ H ₉ NO ₂	Tyr	Y	163,06332
21	Valin	C ₅ H ₉ NO	Val	V	99,068414

Üç amino asidin iki peptid bağıyla bağlanmasıyla tripeptid meydana gelir. Bu şekilde az sayıda amino asidin bağlanmasıyla oluşan yapılar oligopeptidler, çok sayıda peptidin bağlanmasıyla oluşan, molekül ağırlıkları 10.000 Daltonun altında olan yapılar ise, polipeptidler olarak adlandırılır.



Şekil 3.3. Peptidin amino asit şematik gösterimi (Solomons ve Fryhle, 2004).

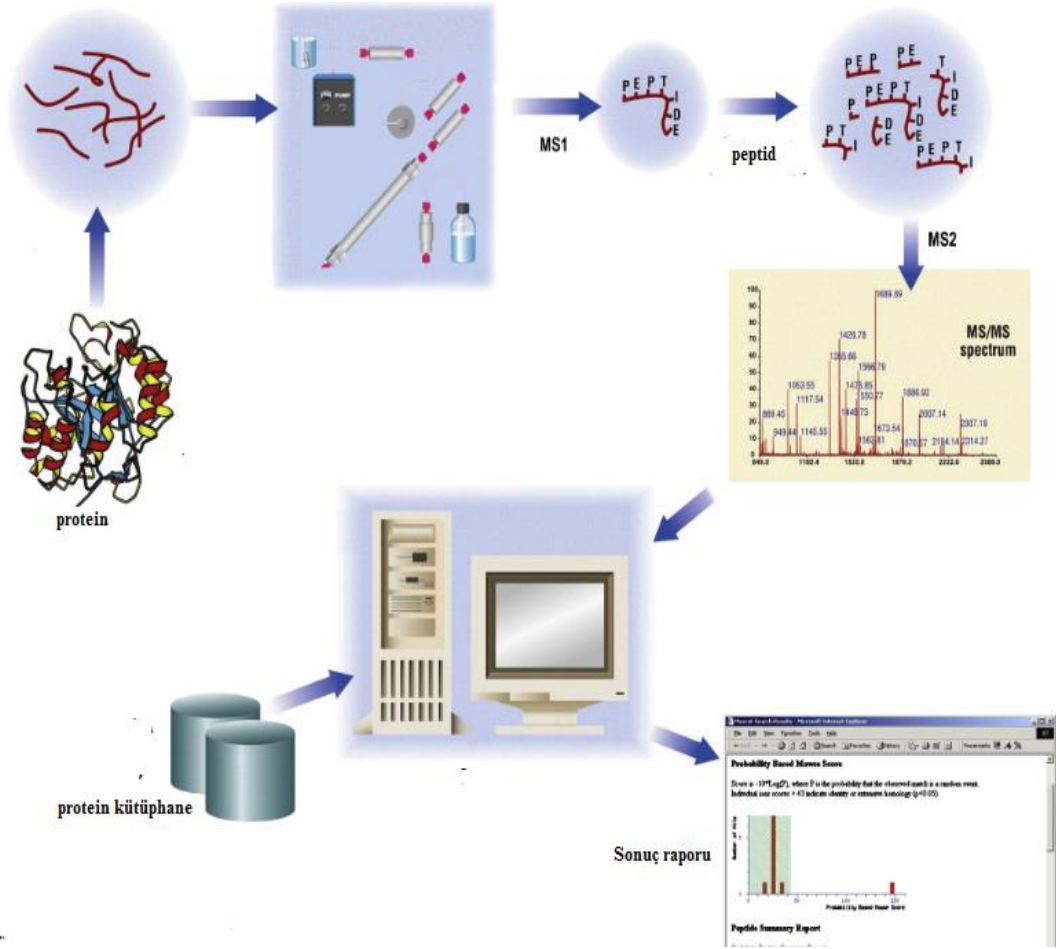
Polipeptidler lineer polimerlerdir. Bir polipeptid zincirinin ucundaki amino asit kalıntısı, serbest $-NH_3^+$ grubu, amino asit kalıntısının diğer ucu ise serbest $-COO^-$ grubuna sahiptir (Şekil 3.3). Bu iki grup, N-terminal ucu (N-terminus) ve C-terminal ucu (C-terminus) olarak adlandırılırlar (Solomons ve Fryhle, 2004).

3.3. Proteom Analizi

Proteom analizlerinin karmaşık yapısı nedeniyle çok güçlü analitik tekniklere ihtiyaç vardır. Genel olarak kullanılan teknikler;

- Tek ve iki boyutlu (2D) elektroforez
- Kapiler elektroforez
- Kromatografi
- Ultrafiltrasyon teknikleri
- Spektroskopik teknikler

Spektroskopik teknikler kullanılarak peptid yapısının belirlenmesine ait akış şeması Şekil 3.4'de verilmektedir.



Şekil 3.4. Spektroskopik analiz akış şeması (Cottrell, 2011).

Bir proteini tanımlamakta kullanılan en temel parametre kütesidir. Bir proteinin kütesinin bilinme hassasiyeti arttıkça, onun muhtelif etkileşimlerde aldığı rolü bilme imkânı da artar. Kütesindeki değişmelere bağlı olarak, bağlı kofaktör veya metal iyonlarının varlığından, kovalent modifikasyonlara kadar pek çok konuda bilgi edinilebilir. İşte bu nedenle protein kütle spektrometrisi (mass spectrometry – MS), proteomik çalışmalarının temel analitik yöntemidir. Bu teknik ile proteinlerin kütlelerinin belirlenmesi çok büyük bir hassasiyetle yapılabilmekte ve dizi analizleri, kısa zamanda, yüksek bir doğrulukla ve proteinlerin yapısından kaynaklanan pek çok sınırlamadan (çözünürlük, post-translasyonel modifikasyonlar, serbest N terminalinin olup olmaması v.b.) etkilenmeksizin yapılabilmektedir.

Proteomik stratejilerde proteinlerin tanımlanmasında uygulanan proteinlerin sindirimi, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan karakterizasyon ve kantitasyonda

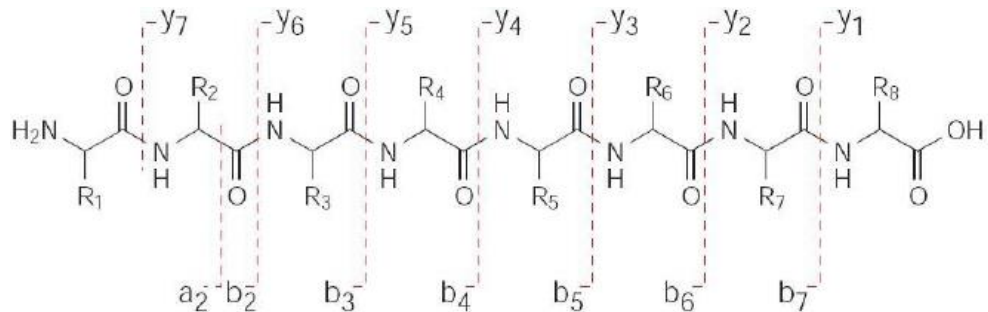
neredeşey vazgeçilmez bir araçtır. Protein parçalanması için klasik yaklaşımlar, proteolitik enzimleri içeren ve çoğunlukla çözelti içinde veya jel içerisinde gerçekleştirilen kimyasalları kullanan enzimatik sindirim ve enzimatik olmayan sindirimdir. Farklı enzimlerin düzenli olarak eklendiği enzimatik sindirim için çeşitli yarıлма spesifiteleri ve verimlilikleri olan geniş bir proteolitik enzim aralığı mevcuttur. Protein sindirimi için en yaygın kullanılan yöntem enzimatik sindirimdir. Bu amaca yönelik birçok proteaz (Çizelge 3.2) bulunmakta olup, bunların her biri özgülük, verimlilik ve optimum sindirim koşulları bakımından kendi özelliklerine sahiptir. Bu proteazlar arasında en yaygın kullanılanıdır ve altın standart olarak görülür. Tripsinin bu kadar yaygın kullanılmasında ve altın standart olarak algılanmasında veri tabanlarının birbirleri ile tutarlılığını sağlamak ve böylece karşılaştırma kolaylığı elde etmek amaçlanmıştır. Tripsin kullanımının bir diğer nedeni de karboksi terminalinde bazik amino asitler bırakarak analizi daha kolay 'y' türü iyonlar oluşturmasıdır. Bir diğer avantajı tripsin iki farklı bölgeye özgüldür (Arg-C ve Lys-C) ve C terminusunda temel bir Arg veya Lys olan kısa peptit üretmesidir. Protein dizilerindeki bu amino asitlerin sıklığı ve yan grupları yüksek bazlıkları nedeniyle ortaya çıkan peptitler, tandem MS (MS/MS) ölçümlerinde Collision Induced Dissociation (CID) parçalanması için çok uygundur (Şekil 2.5.3.2). Bu şu anki kromatografik ayırma, peptid parçalanması ve arama algoritmasına dayalı tanımlama yöntemleri için idealdir. Yani polipeptit zincirinde her arjinin ve lizin amino asidinin C-terminalindeki a.a. ile arasındaki bağı hidroliz eder. Lys ve Arg, insan proteomunda nispeten bol miktarda bulunan amino asitlerdir ve genellikle bir proteinde homojen olarak dağılmışlardır. Ayrıca tripsin enziminin fiziksel dayanımı olup kolay bir kullanım sağlar. Diğer bir kullanım amacı ise tripsin enzimi düşük maliyetlidir ve kolay temin edilebilir (Hustoft, vd., 2012).

Tipik bir triptik protein sindirimi için standart protokoller, proteinin üre veya guanidin gibi kaotropik ajanlar, ditiyotritol (DTT) kullanarak disülfür köprülerinin indirgenmesi ve ardından sisteinlerin iyodoasetik asit veya iyodoasetamid ile alkilasyonu ile denatürasyonunu içerir. Reaktiflerin uzaklaştırılmasından sonra ve tampon değişiminden sonra, tripsin sindirimi tipik olarak 37°C'de bir amonyum bikarbonat tamponu içinde nötr pH'da gerçekleştirilir (Rebekah ve Gundry, 2009).

Çizelge 3.2. Polipeptid zincirlerini spesifik noktalardan ayıran enzimler ve kesim noktaları (www.erzurum.edu.tr/MKBY II-716323.pdf).

Enzim	Kesim Noktaları
Tripsin	Lys, Arg (C)
Submaksilarus Proteaz	Arg (C)
Kimotripsin	Phe,Trp,Try (C)
Staphylococcus aureus V8 proteaz	Asp,Glu (C)
Asp-N-Proteaz	Asp,Glu (N)
Pepsin	Phe,Trp,Try (N)
Endoproteinaz Lys C	Lys (C)
Siyonejen Bromür	Met (C)

En yaygın ve bilgi verici iyonları, amino asitler arasındaki amit veya peptit bağının kırılması oluşturur. Peptidin parçalanması sonucu meydana gelen iyonların tayini peptidin kimyasal yapısını göstermektedir. Yeni bir iyonlaşmanın olmadığı parçalanma işlemi sırasında var olan yükün amino terminali tarafında kalması ile “b” türü iyonlar, karboksi terminali tarafında kalmasıyla da “y” türü iyonlar oluşur. (Şekil 3.5 Roepstorff-Fohlmann-Biemann adlandırılması Quadrupole veya Quadrupole-TOF türü cihazlarda y-iyonları baskın halde bulunan tür iken, iyon kapanı türü cihazlarda hem b-iyonları hem de y-iyonları birlikte gözlenir (Steen ve Mann, 2004).



Şekil 3.5. Roepstorff – Fohlmann – Biemann Adlandırması (Steen ve Mann, 2004).

Veri tabanı aracılığıyla protein tanımlanması ile ilgili birbirinden farklı yaklaşımlar bulunmaktadır.. Her bir yöntemin uygulanışında kullanılan algoritmalar da farklıdır. Temel olarak üç değişik yaklaşımdan bahsedilebilir. “Peptide Sequence Tags” (PST) olarak da bilinen bir yaklaşım ve ilgili algoritma, ilk olarak “PeptideSearch” programı tarafından kullanıma sunulmuştur. Bu teknik 90’ların ortasında, Matthias Mann ve Matthias Wilm tarafından geliştirilmiştir. Buradaki temel mantık, parçalanma spektrumu içinde çoğu zaman için kolayca tespit edilebilecek dizilerin küçük bir serisinin var olduğu gerçeğidir.

İkinci temel yaklaşım ise Sequest algoritması adı altında piyasaya sunulmuştur. Buradaki temel mantık deneysel olarak elde edilmiş MS2 spektrumunun, eldeki veri tabanında bulunan polipeptitlerin triptik kesim ürünlerinin verebileceği teorik spektrumlar ile karşılaştırılmasına dayanır.

Üçüncü ana yaklaşım ise Mascot isimli bir arama motoru tarafından piyasaya sürülmüştür. Olasılık tabanlı eşleştirme diye de anılan bu yöntem, veri tabanındaki tüm peptitlerden teorik olarak oluşması beklenen bütün olası peptit parçalarının hesabına dayanır (Cottrell, 2011).

Proteinlerin tanımlanmasında en sık kullanılan veri tabanları ve web adresleri Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Proteinlerin tanımlanmasında kullanılabilir web adresleri.

Program	Web Adresi
BLAST	http://www.ebi.ac.uk
Mascot	http://www.matrixscience.com
Mass Search	http://cbrg.ethz.ch
MOWSE	http://srs.hgmp.mrc.ac.uk
Peptide Search	http://www.narrador.embl-heidelberg.de
Protein Prospector	http://prospector.ucsf.edu
Prowl	http://prowl.rockefeller.edu
SEQUEST	http://fields.scripps.edu

3.4. Sıvı Kromatografi - Kütle Spektrometresi

3.4.1.Sıvı kromatografi

Kromatografi, karışımlarda bulunan birbirine yakın özellikteki maddeleri ayırmak için kullanılan birçok farklı yöntemi içerir. Bütün kromatografik ayırmalarda numune gaz, sıvı veya bir süperkritik akışkan olan hareketli faz ile taşınır. Kromatografik yöntemler genel olarak gaz, sıvı ve süper kritik sıvı olmak üzere hareketli fazın fiziksel durumuna göre sınıflandırılırlar. Bir kütle spektrometreye az uçucu bileşikler için örnek verme işleminde uygulanan tekniklerden biri de sıvı kromatografisidir.

Sıvı kromatografi cihazı aşağıdaki bileşenlerden oluşur. Bir sıvı kromatografisi bileşenleri Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

- Hareketli Faz
- Pompa Sistemi
- Numune Enjeksiyon sistemi
- Kolon
- Dedektör

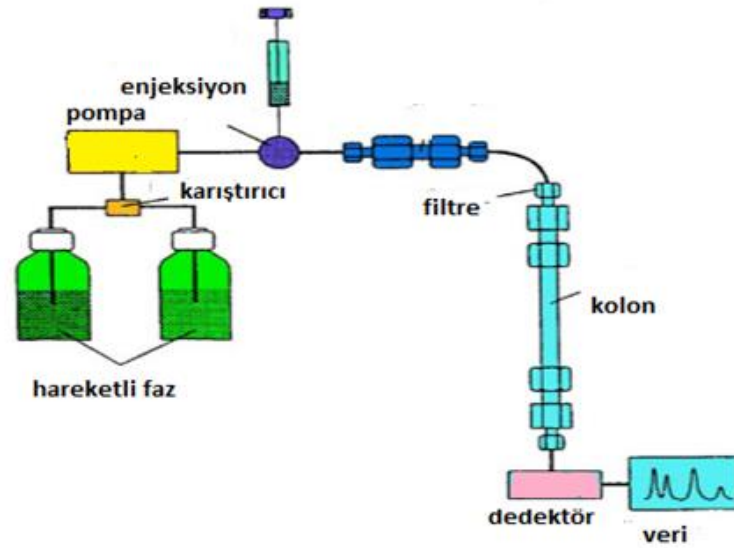
Kompleks karışımlar önce sıvı kromatografisi ile ayrılır, her bir bileşenin tanımlanması ve miktarlarının saptanması için kütle spektrometresine verilir.

3.4.2.Kütle spektrometresi

Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi iki güçlü analitik tekniğin kombinasyonudur. Sıvı kromatografisi bir ayırma tekniği, kütle spektrometresi ise bir teşhis tekniğidir. Bu kombinasyon birçok avantaja sahiptir. Birincisi, bu teknikle nitel analiz amacıyla karmaşık yapılı bir karışım bileşenlerine ayrılır, her bir bileşiğin kütle spektrumu elde edilir; ikincisi bu bileşiklerin miktarıyla ilgili bilgi elde edilir (Watson ve Sparkman, 2008).

Kütle spektrometresinin kimyasal analizlerde ilk kullanımları, 1940'lı yıllarda, petrokimya endüstrisindeki hidrokarbon karışımlarının kantitatif analizleriyle başlamıştır. Önceleri az sayıda hidrokarbon içeren karışımların analizi, fraksiyonlu damıtma sonrası ayrılan bileşenlerin kırma indislerinin ölçülmesiyle yapıyordu. Böyle bir analizin tamamlanması en az 200 saat gerektiriyordu. Benzer bir analiz kütle

spektrometresiyle ise birkaç saatte gerçekleştirilebilmektedir. Bu durum, ticari kütle spektrometrelerinin hızla gelişip yaygınlaşmasına neden olmuştur.



Şekil 3.6. Sıvı kromatografi bileşenleri.

1950’li yılların başında kütle spektrometreleri, kimyacılar tarafından organik maddelerin teşhisinde ve yapı tayininde kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra nükleer manyetik rezonans ve geliştirilmiş infrared spektrometreleri ile birleştirilmesi sonucu, organik kimyacılar için hem madde tanımda hem de moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında kütle spektrometrisi yaygın yöntemlerden biri olmuştur. Kütle spektrometrelerinin bu şekilde uygulaması günümüzde de çok yaygındır.

Kütle spektrometresinin amino asitler ve peptitler üzerinde ilk kullanımları ise 1950’li yılların sonlarında gerçekleşmiştir. Örneğin; Carl-Ove Andersson metil esterlerinin ana iyon parçalarının aydınlatılması üzerine çalışmıştır (Doğan, 2013).

1980’li yıllara gelindiğinde, kütle spektrometrelerinin moleküler uygulamaları, biyokimyacı ve biyologların sık sık karşılaştıkları uçucu olmayan ve termal olarak kararsız maddeleri iyonlaştırmak için geliştirilen yöntemler sayesinde önemli ölçüde değişime uğramıştır. 1990’dan beri bu yeni iyonlaştırma yöntemlerinin kullanımı çok fazla artış göstermiştir.

Kütle spektrometrisi en hızlı gelişimini son 20 yılda kaydetmiştir. Bu gelişmeler teknolojik olarak yeni özelliklerin cihazlara kazandırılmasıyla sağlanmıştır. Bunların başında, atmosferik basınç kaynaklarının gelişimi, analizörlerin hassasiyetinin artması ve cihazların birbirleriyle kombine edilmesi gelmektedir.

Proteinlerin yapılarının aydınlatılması için, kendi aralarındaki etkileşimler farklı tekniklerle açıklanmaya çalışılmıştır. Makromoleküllerin kompleks yapıda ve büyük boyutlarda olmaları bu çalışmaları zorlaştırmaktadır. Bu nedenle proteinlerin yapılarının ve fonksiyonlarının aydınlatılmasında, proteinlere göre daha az kompleks olan peptitlerin yapı analizleri önem kazanmıştır.

Günümüzde kütle spektrometreleri polipeptitlerin, proteinlerin ve diğer yüksek molekül kütleli biyopolimerlerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır. 2002 yılında John Fenn, *Elektro-sprey iyonlaştırma metodu ile kütle spektrometresinde biyomoleküllerin analizi* çalışmasıyla Nobel ödülü almıştır (Hoffmann, 2007).

Elektrosprey ile kütle spektrometresinin birleşimden doğan ESI-MS tekniği kullanılarak sekans belirlemeye hızlı ve doğru bir şekilde imkan tanıyan bu yöntem, proteomikğin gelişmesine yardımcı olmuştur.

Kütle spektrometrisinin temel prensibi inorganik ya da organik bileşiklerin uygun bir yöntemle iyonlarını oluşturmak, bu iyonları kütle/yük oranlarına göre ayırmak ve bunların kütle/yük oranlarını ve bolluklarını ayrı ayrı nitel ve nicel olarak tespit etmektir (Gross , 2004).

Kütle Spektrometresi kullanım alanları genel olarak şu şekilde sıralanabilir;

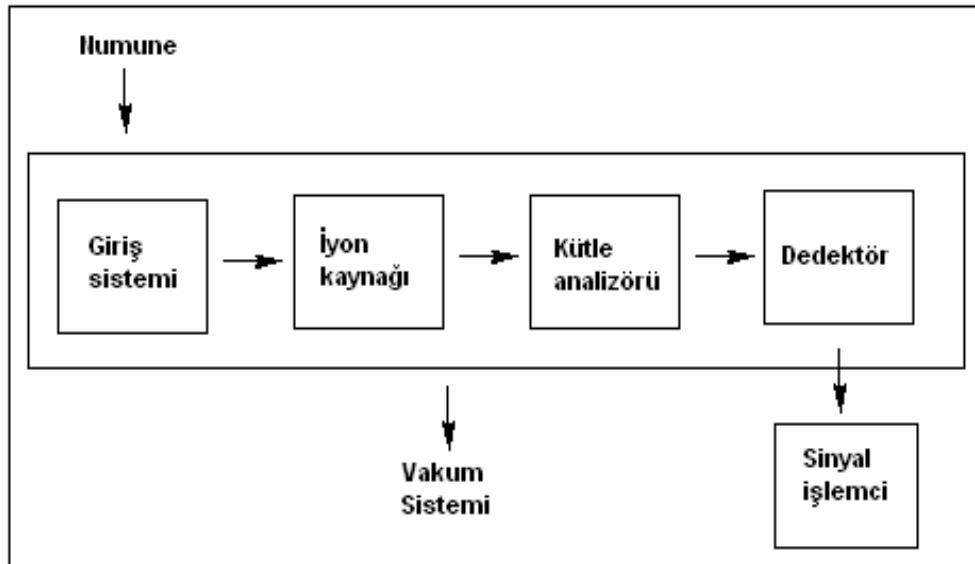
- Maddelerin elementel bileşimlerinin belirlenmesi,
- İnorganik, organik ve biyolojik moleküllerin yapılarının aydınlatılması,
- Karışımların kalitatif ve kantitatif analizleri,
- Katı yüzeylerin yapılarının ve bileşimlerinin açığa kavuşturulması,
- Bir numunedeki atomların izotopik oranlarının bulunması.

Bir kütle spektrometresinin bileşenleri Şekil 3.7'de gösterilmiştir (Skoong ve Nielman, 2007).

3.4.2.1.Yüksek vakum sistemi

Kütle spektrometresi ile çalışmalarda sistemin vakum altına tutulması gerekir; bunun temel nedeni ortalama–serbest yolu yükseltmektir. Ortalama mesafe, iyonize

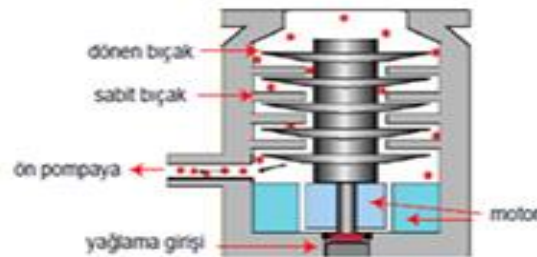
moleküllerin, diğer iyon ve moleküllerle çarpışmalarından önceki yolculuğu olarak tanımlanır. Yüksek bir ortalama-serbest yol, tekrarlanabilir fragmentasyon sağlar ki bu da yüksek hassasiyet ve güvenilir bir kütle analizi yapılmasına olanak verir. Ortalama-serbest yol, iyonizasyon kaynağı ve iyon dedektörü arasındaki mesafeden daha büyük olmalıdır.



Şekil 3.7. Kütle spektrometrisinin bileşenleri.

Vakum, iki kademeli vakum sistemiyle sağlanır. Birincisi, bir kaba veya ön pompa olup 10^{-2} - 10^{-4} torr vakum sağlar. İkinci pompa bir turbomoleküler veya bir difüzyon pompası olabilir; vakum 10^{-5} torr değere ulaşır. Bu pompalar kompresörler gibi çalışır.

Turbomoleküler pompada bir dizi bıçak veya kanat bulunur; bunlar 30 000-90 000 rpm hızla dönerken etraftaki gaz moleküllerini aşağı ve dışarı atarlar (Şekil 3.8). Bir turbo pompa birkaç saat içinde temiz bir vakum ortamı sağlar (Skoog, 1981).



Şekil 3.8. Turbo moleküler pompa(<http://ull.chemistry.uacron.edu>).

Yağ difüzyon pompası yüksek vakum elde etmek için kullanılan, 4-kademeli bir pompa türüdür. Yağ ısıtılır ve bacalardan yükselir, tepeye ulaştığında her bir bacanın üst kısmında bulunan deliklerden püskürtür; püsküren her bir tanecik çevresine bulunan gaz moleküllerini toplar ve aşağıya doğru ittirir. Dördüncü ve son kademedeki yağ damlaları bir pompayla toplanır ve tekrar devreye gönderilir. Bu tür pompaların bakımı kolaydır, ancak yüksek vakuma ulaşmak zaman alır. Ayrıca, iyi dizayn edilmemiş ise deney örneğine yağ kaçma olasılığı vardır.

3.4.2.2. Numune giriş sistemleri

LC-MS sistemlerini birbirine bağlamak için, GC-MS sistemlerinde olduğu gibi çeşitli arayüzler (interface) kullanılmaktadır (Şekil 3.9).

Doğrudan Giriş (Direct Inlet): Bu teknikte sıvı kromatografi cihazından gelen akımın bir kısmı, çapı ~2,5 mm olan bir orifisten doğrudan injekte edilir. İnjektörden basınçla çıkan sıvı ince spreyleyler halinde dağılır, damlalar ısıtılan bir odacıkta buharlaştırılarak çözücüsünden kurtulur ve sonra iyonizasyon odacığına girer

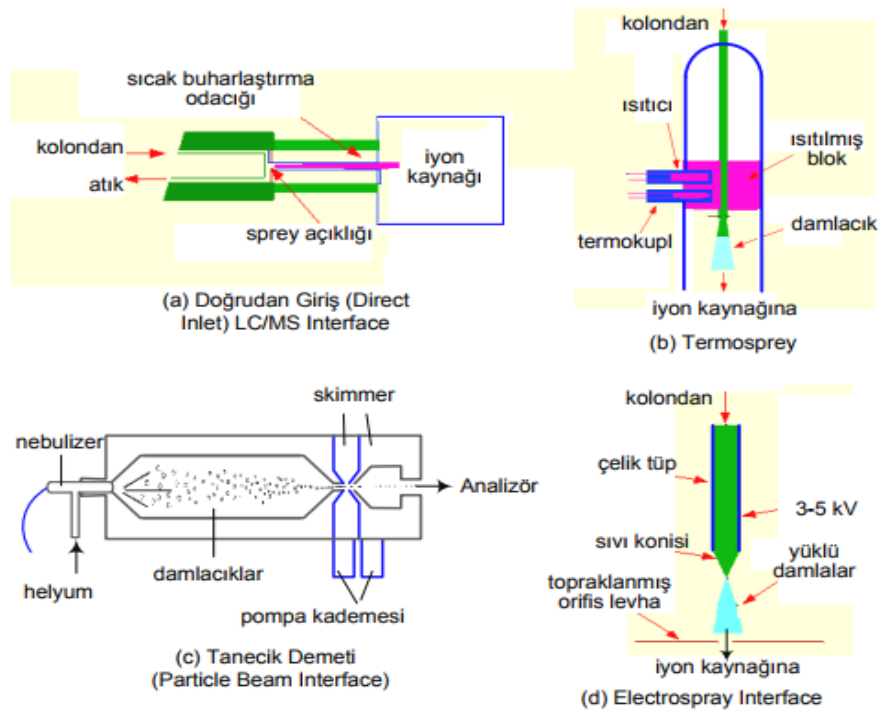
Termosprey: Termosprey arayüz doğrudan giriş sisteminin doğal bir uzantısı gibi düşünülebilir. Giriş tüpünün ucu uygun bir sıcaklığa ısıtılarak örnek damlacıklarının buharlaşması kolaylaştırılır. Optimum arayüz sıcaklığı hareketli fazın bileşimine bağlıdır.

Tanecik Demeti (Particle Beam): Sürekli (continue) bir örnek giriş sistemidir. Sıvı birkaç mikron çapında damlacıklar halinde atomize edilir ve çözücünün büyük bir kısmı buharlaşmaya kadar ısıtılır. Tanecikler, püskürtmeyle buharlaştırılarak kütle spektrometrenin iyonizasyon bölgesine gönderilir.

Elektrosprey: Elektrosprey arayüz atmosfer basıncında çalışır. Bu özelliği nedeniyle vakum altında (1-10 torr) çalışan termosprey tekniğinden ayrılır. Örnek çözeltisi, iyon orifisinden 1 cm kadar mesafedeki paslanmaz çelik bir kapilerin ucundan (jet) püskürtülür. Orifis levhası ve jet arasına uygulanan 3-5kV potansiyel damlacıkların iyonlaşmasını sağlar. Elektrospreyin iyonlaşma verimi iyonizasyon potansiyeline bağlı olarak değişir. Potansiyel farkının artırılması başlangıçta damlacık boyutunu yükseltir, ancak iyon oluşması gerçekleşemez. Ancak voltajın daha fazla yükseltilmesi halinde sisle kaplanan tanecikler yüklenir ve iyonlaşırlar.

3.4.2.3. İyon kaynağı

İyon kaynağının görevi molekülleri yüklü ya da iyonlaşmış hale dönüştürmektir. İyonların oluşmasından sonra bir kütle analizörü ile elektrik ve manyetik alanın uygulanmasıyla iyonlar kütle/yük oranlarına göre ayrılırlar (Gross, 2004).



Şekil 3.9. Sıvı kromatografisi giriş sistemleri şematik görünümü (<http://chromatography-online.org>).

Kütle spektrometrelerinde kullanılan iyon kaynakları iki ana kategoriye ayrılır; gaz faz kaynakları ve desorpsiyon kaynakları. Çizelge 3.4'de yer alan ilk üç yöntem numunelerin önce buharlaştırılması sonra da iyonlaştırılmasına dayanmaktadır. Diğer yöntemler katı veya sıvı haldeki bir numuneyi doğrudan gaz iyon haline dönüştürülür (Skoong ve Nielman, 2007).

Elektron İmpakt (EI) tekniğinde yüksek kinetik enerjili elektronlar çarptıkları moleküllerin öteleme enerjilerinde küçük bir artışa neden olur. Buna karşılık moleküller yüksek titreşim ve dönme seviyelerine uyarılırlar. Bunu izleyen durulmada

sık sık yoğun parçalanma görülür, mol kütlesi ana molekülden daha düşük olan çok sayıda değişik kütleli molekül oluşur (Skoong, vd., 2007; Kitson, vd.,1996).

Çizelge 3.4. Moleküler kütle spektroskopide kullanılan iyon kaynakları (Skoong, 2007).

Temel Tip	Adı ve Kısaltması	İyonlaştırıcı
Gaz Fazı	Elektron impakt (EI)	Enerjik elektronlar
	Kimyasal iyonlaştırma (CI)	Reaktif gaz iyonları
	Alan iyonlaştırma (FI)	Yüksek potansiyelli elektrot
Desorpsiyon	Alan desorpsiyonu (FD)	Yüksek potansiyelli elektrot
	Elektron spray iyonlaştırma (ESI)	Yüksek elektrik alanı
	Matriks yardımcı iyonlaştırma (MALDI)	Lazer demeti
	Plazma desorpsiyon (PD)	²⁵² Cf'nin fisyon ürünleri
	Hızlı atom bombardımanı (FAB)	Enerjik atom demeti
	İkincil iyon kütle spektrometresi (SIMS)	Enerjik iyon demeti
	Termospray iyonlaştırma (TS)	Yüksek sıcaklık

Kimyasal iyonlaştırmada, numunenin gaz haline gelmiş atomları, elektron bombardımanı ile iyonlaştırılmış çok miktarda başka bir reaktif gazın iyonları ile çarpıştırılır. Bu amaçla genellikle pozitif iyonlar kullanılmaktadır, fakat analitin moleküler yapısında elektro negativitesi yüksek atomlar varsa negatif iyonlarla kimyasal iyonlaştırma da kullanılmaktadır. En sık kullanılan gaz metandır.

Alan iyonlaştırma kaynaklarında iyonlar yüksek elektrik alanının etkisiyle (10^8 V/cm) meydana gelir. Duyarlılık alan iyonlaştırmayı sınırlayan bir faktördür.

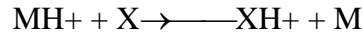
Gaz fazı iyonlaştırma yöntemleri termal kararlı veya uçucu olmayan numunelere uygulanmaz. Son yirmi yıldır bu tür numuneler için geliştirilmiş en önemli yöntem, desorpsiyon iyonlaştırmadır. Sonuçta termal olarak kolayca parçalanabilen

biyokimyasal türler ve mol kütlesi 100000 Da'den büyük türler için kütle spektrumu alabilmek mümkün olmuş, yeni bilgiler elde edilmiştir.

Desorpsiyon yöntemlerinde, gaz halindeki analit moleküllerini iyonlaştırmadan önce uçucu hale getirmek şart değildir. Bunun yerine çeşitli şekillerdeki enerji katı veya sıvıya verilerek, burada gaz iyonlarının doğrudan oluşumu sağlanır. Sonuçta büyük ölçüde basitleşmiş, yalnızca moleküler iyonun veya protonlanmış iyonun pikinin bulunduğu spektrumlar elde edilir (Skoong ve Holler, 2007).

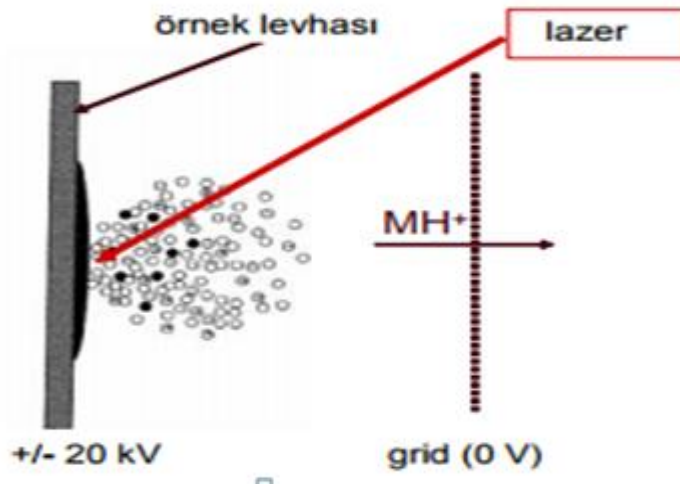
Matriks-yardımlı desorpsiyon iyonlaştırma (MALDI), atomik bombardıman (FAB) iyonizasyona benzer. Örnek, spesifik bir dalga boyundaki kısa pulslu lazerden gelen ışını absorblayan matriks içinde çözülür, iyonlaşır ve kütle analizörlerinde ekstrakt edilir (Şekil 3.10). Zaman-yol bağımlı kütle spektroskopisiyle (TOF, Time of Flight MS) bileştirilerek kullanılır, fakat sıvı kromatografisiyle uygun değildir. Yüksek kütle sayılarına çıkabilme özelliği nedeniyle kullanımı oldukça yaygın bir iyonizasyon yöntemidir. MALDI hem pozitif ve hem de negatif iyonlar üretir; bunlar genellikle (M+H)⁺, (M+Na)⁺ ve (M-H)⁻ şeklindedir. Ayrıca, +3'e kadar çok yüklü iyonlarla, dimerler, trimerler, v.s. de meydana gelir. Ana pik (veya pikler) sadece bir yük taşır.

Örnek matriksle (X) karıştırılır ve levha üzerinde kurutulur. Lazer matriks moleküllerini iyonlaştırır. Örnek molekülleri (M) proton transferiyle iyonlaşır.



Elektrosprey iyonlaştırma (ESI): ESI, ES, IS kodlarıyla tanımlanabilir. Ayrıca, iyon sprey, nanosprey, sonik sprey ve saf elektrosprey de denilmektedir. Bu yöntem ilk defa 1984 yılında proteinler, polipeptidler ve oligonükleotitler gibi biyomoleküllerin analizi için kullanılmıştır. ESI atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleşmektedir.

Polar ve uçucu olmayan bileşikler için ideal bir iyonizasyon yöntemidir. Bunlar arasında, proteinler, peptidler, nükleik asitler, farmasetikler ve doğal ürünler sayılabilir. Bir çok organik bileşik ve ilaç molekülleri için moleküler iyonu belirlemede oldukça uygun bir yöntemdir. Bu yöntemin avantajı büyük ve ısı ile kolayca parçalanan maddelerin mol kütlelerinin belirlenebilmesidir. ESI yöntemi özellikle sıvı kromatografi kütle spektrometresi ile kullanılmaktadır.



Şekil.3.10. MALDI iyonlaştırma şematik görünümü (<http://msg.ucsf.edu>).

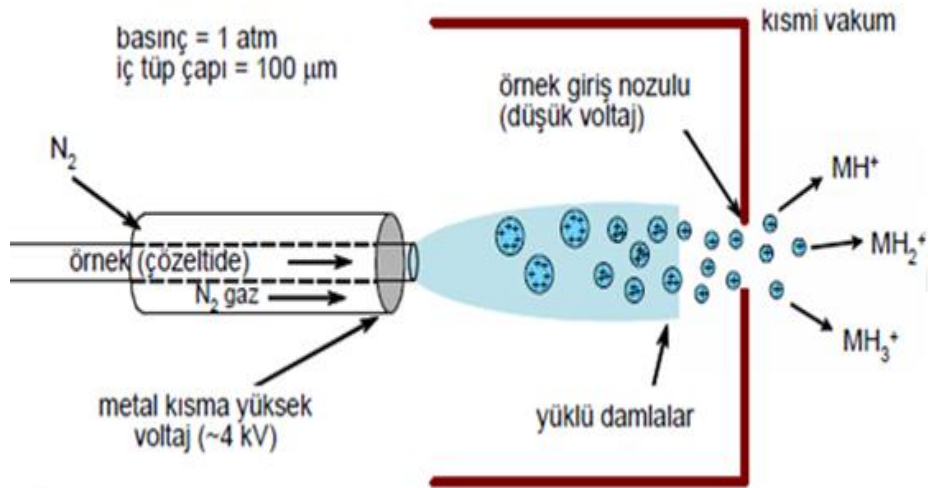
Sıvı kromatografi ile birleşik olarak kullanılabilir. Yüklü buhar damlacıklarından gaz faza geçen iyonlar $M+H^+$ veya $M-H^-$ iyonları üretir. Çok yüklü iyonlar da üretebilmesi yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin analizine olanak verir.

ESI kaynak, yüksek voltaj (4,5 kV) uygulanabilen çok ince bir iğne içerir. Örnek çözeltisi bu iğne içinden kaynak odacığına püskürtülür ve damlacıklar halinde dağıtılır. Damlacıklar kapilerden çıkarken yüklüdürler. Çözücü buharlaşırken yüklü analit moleküllerini bırakırlar ve damlalar kaybolur (Şekil 3.11).

3.4.2.4.Kütle analizörü

İyonlaştırma bölgesinde oluşturulan iyonlar kütle analizörüne gelirler. Kütle analizörü olarak kuadropol, manyetik sektör analizörleri, çift odaklı spektrometreler, iyon tuzaklı analizörler, uçuş zamanlı analizörler kullanılır.

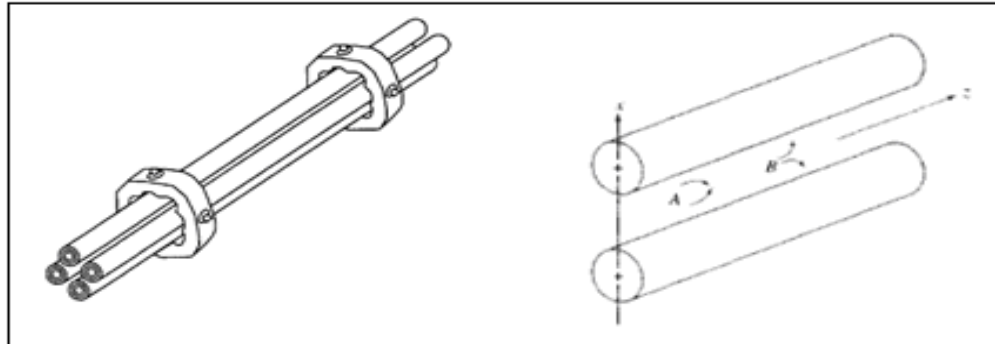
Kuadropol kütle analizörleri belirli m/z değerine sahip iyonlar için filtre görevi görür. Bu, elektrot olarak iş gören dört paralel silindirik çubukla sağlanır (Şekil 3.12). Karşılıklı çubuklar birbirine bağlı olup; bir çift değişebilir doğru akım kaynağının pozitif tarafına, diğer çift ise negatif ucuna bağlanır. Ayrıca, her çubuk çiftine değişebilir radyo-frekanslı alternatif akım potansiyeli uygulanır (Skoong, D., vd., 2007; Gross, J., vd., 2004).



Şekil.3.11. Elektrosprey iyonizasyon(ECI) şematik görünümü(<http://uncw.edu>).

Uygulanan radyo frekansı salınımı iyonların çubuklar tarafından itilmesine veya çekilmesine neden olur. Şekil 3.12’de gösterildiği gibi sadece belirli m/z oranına sahip A ile gösterilen iyonlar z eksenini boyunca bir yörüngeye sahip olurken B iyonları kuadropol çubuklarına çekilir (Marvin, vd., 2007; Lee, vd., 2009).

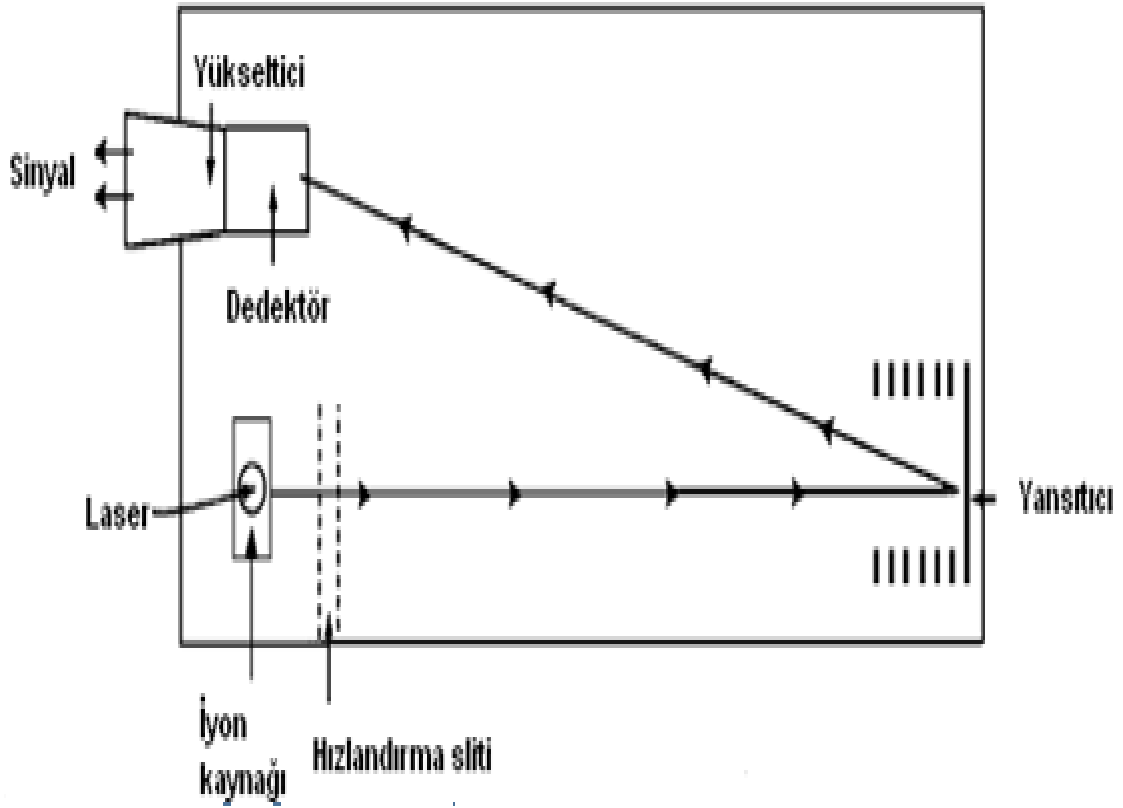
Uçuş zamanlı (TOF) cihazlarda pozitif iyonlar numunenin periyodik olarak kısa süreli elektron, ikincil iyon veya lazer pulsları ile bombardımanlarıyla üretilir.



Şekil 3.12. 4 Kutuplu kuadropol yapısı (Marvin, 2007).

Bu pulsların frekansı tipik olarak 10–50 kHz ve yarı ömrü 25 µs’dir. Bu şekilde üretilmiş iyonlar bir toplama tüpüne 10³–10⁴ V’luk elektrik alan pulslarıyla hızlandırılarak elektrik alanı olmayan ayırma tüpüne gönderilir. Bütün iyonlar ayırma tüpüne aynı kinetik enerji ile girdiklerinden hızları kütleleri ile ters orantılı olup; hafif olanlar dedektöre daha çabuk ulaşırlar. Dedektöre ulaşma zamanlarına göre de kütleler

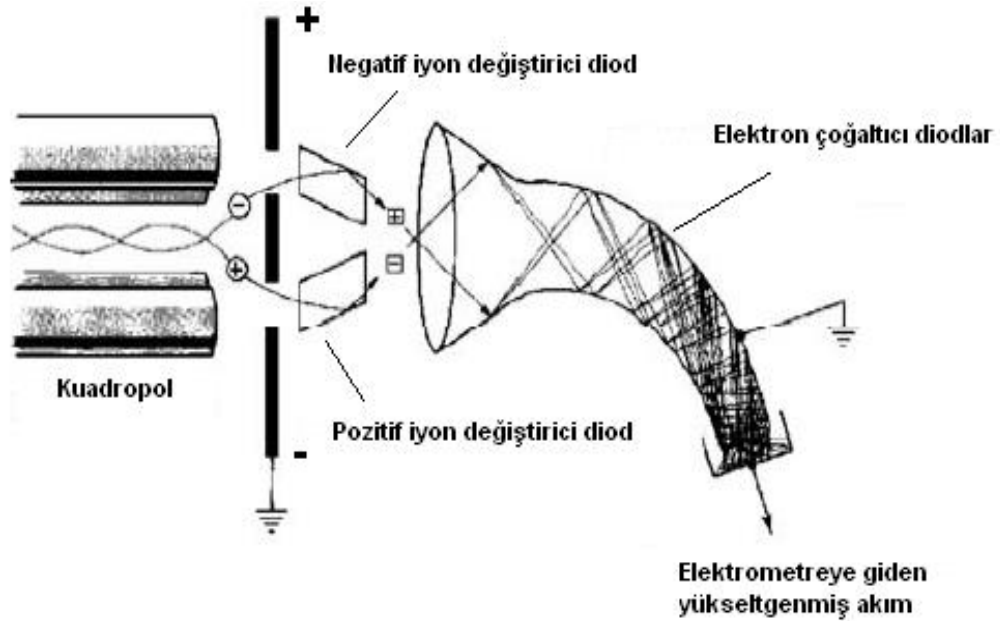
tespit edilir. Böylece kütle analizi yapılmış olur (Şekil 3.13). Tipik olarak bir iyonun uçuş süresi 1–30 μs arasında değişir (Skoong ve Nielman, 2007).



Şekil 3.13. Uçuş zamanlı kütle analizörü yapısı (yansıtmalı tasarım) (Lee, 2009).

3.4.2.5. Dedektör

Kütle spektrometrelerinde yaygın olarak kullanılan dedektör elektron çoğaltıcılarıdır (Electron Multiplier (EM)). Şekil 3.14'de kurşunla yoğun şekilde doplanmış, camdan yapılmış bir sürekli diyod elektron çoğaltıcı dedektörü göstermektedir. Dedektör girişinde yüzeye çarpan iyonlar elektronların salınmasına neden olur. Yüzey boyunca elektron salımı katlanarak arttığından 10^5 civarında akım artışı sağlar (Şekil 3.14) (Hoffmann ve Stroobant, 2007).



Şekil 3.14. Sürekli elektron çoğaltıcının yapısı (Hoffmann, 2007).

3.4.2.6.Data sistemi ve kayıt

Yükseltelen iyon akım alan kuvveti veya hızlandırma potansiyelinin fonksiyonu olarak kaydedilir.

Temel Pik: Bir kütle spektrumundaki en büyük pike "temel pik" denir. Uygulamada, çoğunlukla, pik yükseklikleri temel pikin kesirleri olarak rapor edilir. Başka bir rapor şeklinde, pik yükseklikleri yerine, toplam pik yüksekliğinin kesirleri olarak pik şiddetleri kaydedilir; bu değerler daha tanımlayıcıdır.

Moleküler İyon (M^+ , veya M^+) Piki: Molekül, iyonizasyon işleminde sadece bir elektron kaybetmişse bir moleküler iyon oluşmuştur ve spektrumda bu moleküler iyonun ait pik, M^+ görülür.

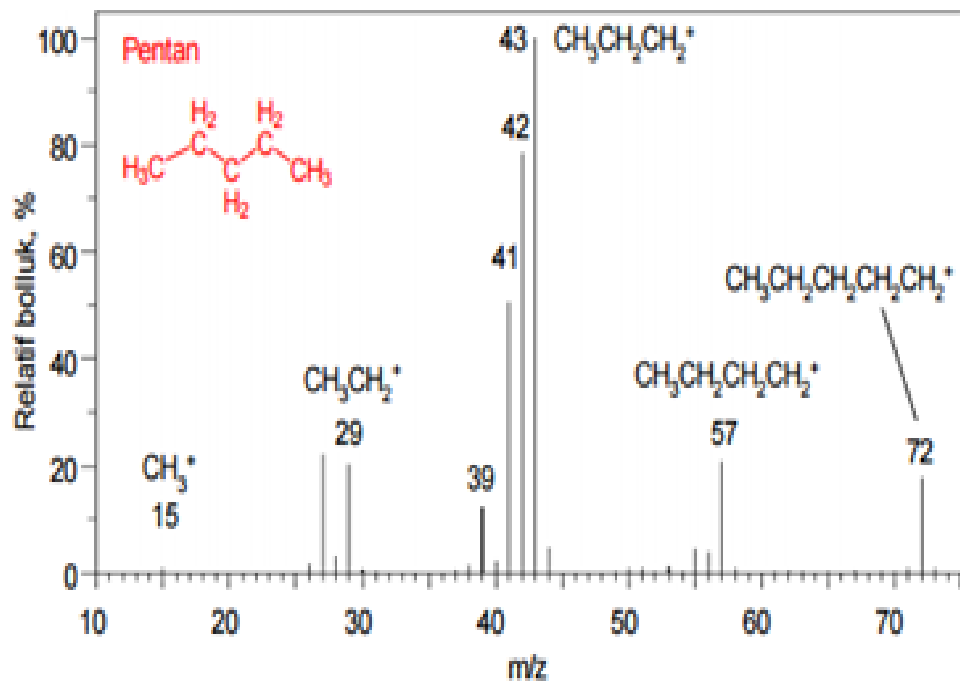
Kütle spektrumu örneği Şekil 3.15' de gösterilmiştir.

3.4.2.7. Verilerin elde edilmesi

Kütle spektrometrisinde iki tip iyon tarama modu vardır. Bunlar toplam iyon taraması (SCAN) ve seçilmiş iyon taraması (SIM) modlarıdır. Toplam iyon tarama modunda geniş bir m/z taraması yapılır. SIM modu ise sadece seçilmiş m/z değerlerine sahip iyonların tarandığı moddur (Watson ve Sparkman, 2008). Tarama, m/z değerleri hedef bileşiği en iyi temsil edecek şekilde yapılır. SIM modunda kütle analizörü,

ilgilenilen m/z değerlerini dönüşümlü olarak ölçer. Bir m/z değerinden diğerine atlar. Bu nedenle analiz için gereksiz olan m/z değerlerinde harcanan tarama süresi sıfıra inerken ilgilenilen iyonlar için sinyal integrasyon süresi 10-100 kat artar. Dolayısıyla hassasiyetin arttığı gözlenir. SCAN ya da SIM modu arasında yapılacak seçim gerekli olan gözlenebilme sınırına ve elde edilmek istenen bilgiye göre değişir (Gross ,2004).

Bir Kütle Spektrumu



26.0	1.6	40.0	2.2	53.0	1.1
27.0	22.2	41.0	50.5	55.0	4.4
28.0	3.1	42.0	78.3	56.0	3.7
29.0	20.3	43.0	100.0	57.0	20.6
38.0	1.3	44.0	4.6	72.0	17.8
39.0	12.2				

Şekil.3.15. Örnek kütle spektrumu

4. LİTERATÜR ÇALIŞMALARI

Özellikle sığır ve domuz jelatini içeren jelatinleri ayırt etmek için 2003 yılından 2016 yılları arasında çalışmalar yayınlanmıştır. Bu çalışmalarda, bu jelatinlerin ayırımının; spektroskopik, kimyasal, sıvı kromatografi uygulamaları ve immünokimyasal teknikler da dahil olmak üzere analitik yöntemler kullanılarak yapılabileceği ortaya konulmuştur.

Nemati, vd. (2004), yaptıkları çalışma ile 14 sığır, 5 domuz jelatini analizini ters fazlı(RP) HPLC ile gerçekleştirmişlerdir. Çok değişkenli istatistiksel yöntemlerin domuz ve sığır jelatinlerinin sınıflandırılmasında kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Gui-Feng, vd. (2008), yüksek performanslı bir sıvı kromatografisi/kütle spektrometrisi (HPLC/MS) metodu geliştirerek, kolajen dizilerindeki markör peptidlere dayalı olarak ham jelatini ayırabilmişlerdir

Doi, vd. (2009), jelatin alerjisi olan hastalar için işlenmiş gıdalardaki jelatini tespit etmek için kullanılabilecek bir sandviç ELISA yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemi duyarlılık, özgüllük, çapraz reaktivite ve uygulanabilirlik açısından değerlendirmişler, yöntemin sığır ve domuz jelatin için oldukça spesifik ancak balık jelatininde istenilen düzeyde sonuçlar vermediğini tespit etmişlerdir.

Zhang, vd. (2012), yaptıkları çalışmada HPLC-MS/MS kullanarak sığır ve domuz jelatini için marker peptidler elde etmişler, prolin hidoksilasyonunun peptid tanımlamasını etkileyen bir faktör olduğu sonucuna varmışlardır.

Xian Long, vd. (2009), yaptıkları çalışma ile temel bileşen analizi ile birleştirilmiş HPLC-QTOF-MS ile domuz, sığır, at, eşek ve kaplumbağa ait bir tane ayırt edici peptid elde etmişlerdir.

Widyaninggar, vd. (2012), yapmış oldukları çalışma ile kapsüllerdeki domuz ve sığır jelatinlerinin temel bileşen analizi (PCA) ile ayrılabilceği sonucuna ulaşmışlardır. Çalışmada domuz ve sığır jelatininde bulunan aminoasitlerin tek tek miktarları belirtilmiş sekans analizi yapılmamıştır.

Nhari, vd. (2012), yapmış oldukları çalışmada sığır ve domuz jelatini ve jelatininin gıda ürünlerindeki tespiti için mevcut analitik yöntemleri genel hatlarıyla incelemişlerdir. FTIR, ELİSA, HPLC, HPLC-MS sistemlerinin avantajlı ve dezavantajlı yönlerine vurgu yapmışlar, jelatinleri ham biçiminde ayırt edebilme özelliğinden dolayı ELISA yönteminin, ham jelatinlerin tespitinde uygulanabilir bir yöntem olduğunu

belirtmişlerdir. Bunun yanında işlenmiş gıdalarda gelecekte yapılacak araştırmalar için, jelatin bazlı ürünlerdeki jelatin özgünlüğünü sağlamak ve jelatin bazlı ürünlerden jelatinin özütlenmesini ve saflaştırılmasını içeren temel araştırmalara ihtiyaç duyuldu çalışmada belirtilmiştir.

Yılmaz, vd. (2013), ultra performanslı sıvı kromatografisi ve elektrosprey iyonizasyon dört kutuplu uçuş zamanlı kütle spektrometresi (nanoUPLCESI-q-TOF-MSE) ile domuz ve sığır jelatinlerini tatmin edici bir şekilde birbirinden ayırt edebilmişlerdir. Yoğurt, dondurma ve peynir örneklerinde marker peptidlerin kalitatif olarak tespitinde, bu yöntemlerin güvenilir ve başarılı olduğunu bildirilmişlerdir.

Grundy, vd. (2016), gıda ve ilaç sektöründe kullanılan jelatin orijininin belirlenmesinde PCR, Elisa ve kütle spektrofotometresi yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Kütle spektrofotometrik yöntemlerin jelatin orijinin belirlenmesinde diğer tekniklere göre daha başarılı olduğu bildirilmiştir.

Sarah vd. (2016), yaptıkları çalışmada ısıl işleme tabi tutulan domuz etindeki domuza özgü peptidleri belirlemek için LC-QTOF-MS yöntemini geliştirmişler ve bu yöntem ile domuza özgü dört peptid elde ettiklerini belirtmişlerdir.

5. MATERYAL VE METOTLAR

5.1. Materyal

Bu çalışmada, Türkiye’den ve Avrupa’daki marketlerden orijinal ambalajlarında 5 farklı markadan toplam 50 adet yumuşak şekerleme numuneleri analize alındı. Türkiye’den alınan numunelere T, Almanya’dan alınan numunelere A kodu verilerek analiz öncesinde oda sıcaklığında muhafaza edildi (Şekil 5.1).



Şekil 5.1.Almanya’ dan alınan yumuşak şekerleme örnekleri

5.1.1. Cihazlar

Cihaz	Marka
LC(HPLC)	Agilent 1200
Q-TOF	Agilent 6550 iFunnel
HPLC kolonu	Agilent, Poroshell C18, 4,6x100mmx2,7 micron
Analitik Terazı (± 0.0001 g)	Mettler Toledo
Membran filtre (0,22 mikron çap gözenekli)	Agilent
Derin dondurucu	Arçelik
Vorteks	Heidolph
Santrifüj	Sigma
Enjektör (Tek kullanımlık)	Plusmed

Ultrasonik su banyosu	Bandelin Sonorex
Laboratuvar malzemeleri	
Vial(Kahverengi cam şişe)	Agilent

MS ve MS/MS analizleri Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsünde Kimlik Belirleme ve Doğrulama Laboratuvarında (Şekil 5.2) bulunan sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyon-kuadropol zamanlı uçuş sistemi (LC-ESI-Q TOF Agilent 6520, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 5.3). MS ve MS/MS çalışmaları için m/z 100-2500 kütle aralığında spektrumlar elde edildi.



Şekil 5.2.Kimlik Belirleme ve Doğrulama Laboratuvarı

5.1.2. Kimyasal maddeler

Adı	Kimyasal Formülü
Amonyum bikarbonat (Sigma Aldrich 09830)	NH_4CO_3
Formik asit (%99, Merck)	CH_2O_2
Ultra saf su (merck)	H_2O
Asetonitril (%99, Sigma Aldrich)	ACN

İodoasetamit (Sigma Aldrich)	$\text{ICH}_2\text{CONH}_2$
Ditiotreitol (Sigma Aldrich)	$\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SH}$



Şekil 5.3. Agilent 6520 LC-ESI-Q-TOF.

5.1.3. Analitik standart maddeler

Standart olarak kullanılan domuz jelatini ve sığır jelatini Sigma Aldrich firmasından, proteinlerin parçalanmasında kullanılan tripsin enzimi (Modified Sequencing Grade) Roche firmasından temin edildi.

5.2. Metot

Analizlerde 4,6x100mmx2,7 micron C 18 kolon kullanıldı. Çalışmalarda kullanılan tampon çözeltiler günlük olarak hazırlanıp cihaza verilmeden önce 0,20 µm gözenekli membran filtre (Econofilter, Agilent Technologies) ile süzüldü ve içerebileceği gazları gidermek için ultrasonik banyoda 10 dk bekletildi. Ayrıca

çalışmaya başlamadan önce kolon aşağıda belirtilen çözeltiler ile sırasıyla yıkandı ve şartlandırıldı.

Kolonun ilk kullanımında sırasıyla;

- 15 dk deiyonize su,
- 15 dk asetonitril ile şartlandırıldı.

5.2.1.Enzim çözeltisinin hazırlanması

1mg tripsin, 1 ml 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde çözülerek enzim çözeltisi hazırlandı.

5.2.2.Örneklerin hazırlanması

Çalışmada domuz ve sığira ait marker peptidlerin tanımlanmasında standart maddeler analize alındı. İlk olarak santrifüj tüpüne 2,5 ml 50 mM amonyum bikarbonat çözeltisi ve 250 µL 100 mM DDT çözeltisi ilave edildi. Üzerine 2,5 mg domuz jelatini standartı eklenerek vortekste yüksek hızda 1 dakika karıştırıldı ve örneğin çözünmesini sağlamak için 37°C'lik etüvde 15-20 dk bekletildi. Tüp oda sıcaklığına geldikten sonra üzerine 500 µL 100 mM IAA çözeltisi eklendi. Karanlıkta, oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi.

Bu çözeltiden 50 µL alınıp ayrı bir 2 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı. Örnek çözeltinin üzerine 50 µL enzim çözeltisi ilave edilip 37° C'lik etüvde bekletildi. Örnek çözeltinin etüvde bekleme süresi ile ilgili olarak optimizasyon çalışması yapıldı. Son olarak 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek LC-QTOF MS cihazına enjekte edildi. Aynı işlemler sırası ile sığır jelatin standartı, Almanya ve Türkiye'den alına yumuşak şekerleme örnekleri içinde gerçekleştirilerek analizler yapıldı.

5.2.3.Cihaz koşulları

5.2.3.1.HPLC koşulları

Kromotografik ayırma, Poroshell 120 EC ters fazlı C 18 analitik kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Numuneler cihaza 5µL olarak enjekte edilerek,akış hızı 0,6 mL/dk olarak belirlendi. Mobil faz olarak ultra saf su (%1'lik formik asit ilaveli), asetonitril (%1'lik formik asit ilaveli) kullanıldı. Mobil faz akış programı Çizelge 5.1.'de verilmiştir. Kolon fırın sıcaklığı 40°C tutularak, analiz süresi 33 dk olarak belirlendi.

Çizelge 5.1. HPLC hareketli faz akış programı.

Zaman(dakika)	A [%]	B [%]
0,0	95,0	5,0
0,5	95,0	5,0
25,0	5,0	95,0
28,0	5,0	95,0
28,10	95,0	5,0

5.2.3.2.Q-TOF tarama şartları

Analizler pozitif iyonlaştırma modu kullanılarak yapıldı. Q –TOF iyonlaştırma şartları çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Q-TOF iyonlaştırma şartları.

Gaz sıcaklığı	200°C
Kurutma gaz akışı	14 L/dk
Nebulizer basıncı	45 psig
Sheath gaz sıcaklığı	300°C
Sheath gaz akışı	11 L/dk
Fragmentor	300 V
OCT 1 RF Vpp	750 V
Skimmer	65 V
Nozzle	300 V

MS çalışmalarında, 4 spektrum/sn ve 250 ms/spektrum çalışma aralıkları seçildi.

Verilerin toplanmasında MS Abs. Threshold 200, MS Rel.Threshol %0,001 filtrelemeleri kullanılarak, m/z 100-2500 kütle aralığında spektrumlar elde edildi.

5.2.3.3. Q-TOF Auto MS/MS tarama şartları

MS/MS çalışmaları pozitif iyonlaştırma modu kullanılarak yapıldı. Q -TOF MS/MS iyonlaştırma şartları çizelge 5.3’de verilmiştir.

Çizelge 5.3. Q -TOF MS/MS iyonlaştırma şartları.

Acquisition-MS		
Kütle aralığı	100-2500 m/z	
Rate	4 spektrum/s	
Time	250 ms/spektrum	
Acquisition-MS/MS		
Kütle aralığı	100-200 m/z	
Rate	3 spektrum/s	
Time	333 ms/spektrum	
Precursor selection		
Max.Precursor ion per cyle	10	
Abs.Threshold	500 counts	
Rel. Threshold	% 0,01	
Precursor Charge-state selection	1,2,3	
Isotope model	Peptid	
Collision Energy	Formül= (slope)x(m/z)/100+Offset	
Charge	Slope	Offset
All	4	12

5.3. Metod Validasyonu

Uygulanan analiz metodunun geçerli kılınması amacı ile metod validasyon çalışmaları yapılmıştır.

AOAC “How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Verification“ rehberinde kimyasal analizleri 6 kategoriye ayırmaktadır. Bu kategoriler;

1. İdentifikasyonu doğrulayan metot, materyalin ne olduğunu veya hedef analitin tespitini sağlar.

2. Düşük konsantrasyonlarda analitin miktarının belirlenir.

3. Eğer analit spesifiye edilen düşük konsantrasyonun altında veya üstünde ise belirlenmesini sağlar (çoğunlukla limit test olarak adlandırılır). Spesifiye edilen konsantrasyon tayin limiti (LOQ) değerine yakın bir değerdir.

4. Yüksek konsantrasyonlarda analiti belirlenir.

5. Eğer analit spesifiye edilen yüksek konsantrasyonun altında veya üstünde ise belirlenmesini sağlar (çoğunlukla limit test olarak adlandırılır). Spesifiye edilen konsantrasyon tayin limiti (LOQ) değerinin oldukça üstünde bir değerdir.

6. Kalitatif test

Bu kategorilere göre önerilen validasyon parametreleri Çizelge 5.4’de verilmiştir. Aynı şekilde Eurachem, NMKL vb. diğer birçok kaynakta metot validasyonu için incelenmesi önerilen performans kriterleri, doğruluk, kesinlik, spesifite, tespit limiti, tayin limiti, sağlamlık, linearite ve ölçüm aralığı olmak üzere sekiz ana parametreden oluşmaktadır (<http://turklab.org>).

Çizelge 5.4. AOAC rehberinde önerilen metot validasyonu parametreleri(<http://turklab.org>).

Performans karakteristiği	1	2	3	4	5	6
1.Doğruluk	H	E	H	E	E	H
2.Kesinlik	H	E	H	E	E	E
3.Spesifite	E	E	E	E	E	H
4.Tespit Limiti(LOD)	H	E	E	E/H	H	H
5.Tayin Limiti(LOQ)	H	E	H	E/H	H	H
6.Sağlamlık	H	E	H	E	H	H
7.Doğrusallık	H	E	H	E	H	H

Kalitatif analizlerde analiz sonucu “var/yok”, “tespit edildi/tespit edilmedi” gibi sonuçlar verilmektedir. Bu analizlerde kesinlik parametresi “yanlış pozitif” ve “yanlış negatif” olarak aşağıdaki formüllerle hesaplanır.

	Analiz Sonucu		
	Pozitif (Var)	Negatif (Yok)	Toplam
Pozitif	TP	FP	TP+FN
Negatif	FN	TN	FN+TN
Toplam	TP+FN	FP+TN	TP+TF+FP+FN

$$\text{Yanlış pozitif cevap oranı FPR} = \text{FP} \times 100 / \text{FP} + \text{TN}$$

$$\text{Yanlış negatif cevap oranı FNR} = \text{FN} \times 100 / \text{FN} + \text{TP}$$

Hassasiyet = Gerçek pozitif analiz sayısının gerçek pozitif sonuçların toplamına oranıdır.

$$\text{Hassasiyet} = \text{TP} \times 100 / (\text{TP} + \text{FN}) \quad (1)$$

Spesifiklik = Gerçek negatif analiz sayısının gerçek negatif sonuçların toplamına oranıdır.

$$\text{Spesifiklik} = \text{TN} \times 100 / (\text{TN} + \text{TP}) \quad (2)$$

Yapılan çalışmada yumuşak şekerleme örneğinde kullanılan jelatin orijini analiz sonucu kalitatif olarak verildiğinden validasyon çalışmasında Sığır jelatini ve sığır jelatini içerisine % 1 oranında ilave edilen domuz jelatini örneği analiz edilmiştir. 20 pozitif, 20 negatif olmak üzere toplam 40 enjeksiyon yapılmıştır.

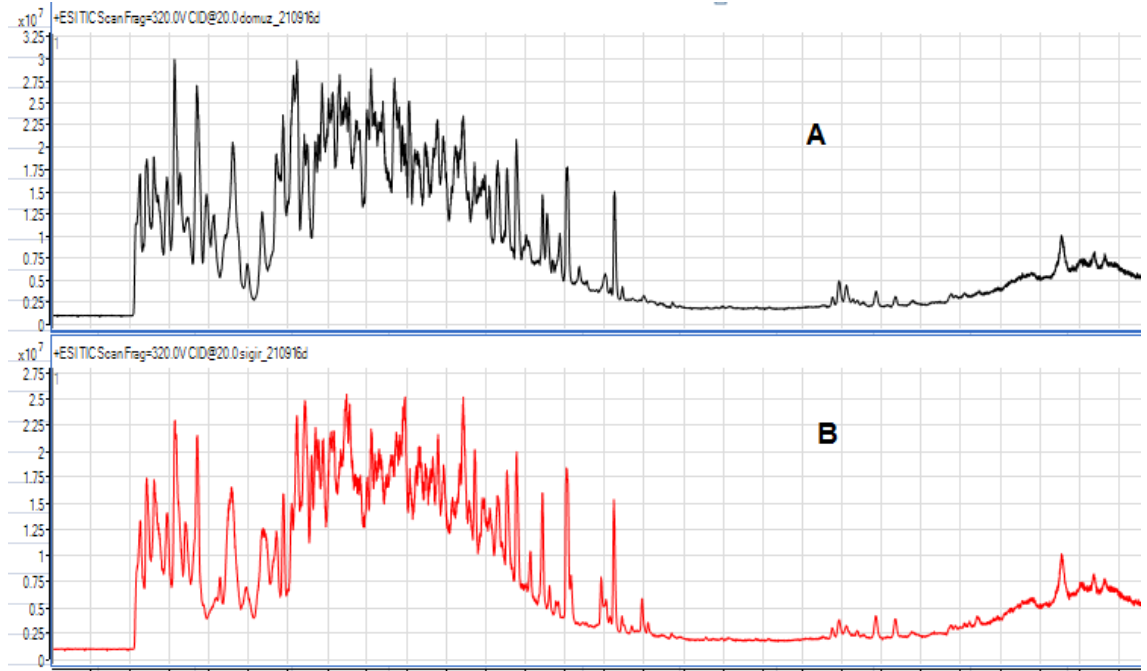
	Analiz Sonucu		
	Pozitif	Negatif	Toplam
Pozitif (%1 domuz_ %99 sığır jelatini)	20	0	20
Negatif (Sığır jelatini)	0	20	20
Toplam	20	20	40

Doğruluk (accuracy)	1,00	$(\text{TP} + \text{TN}) / (\text{TP} + \text{TF} + \text{FP} + \text{FN})$
Hassasiyet (sensivity)	1,00	$\text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})$
Spesifiklik (specificity)	1,00	$\text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})$
Yanlış pozitif (FPR)	0,00	$\text{FP} / (\text{TN} + \text{FP})$

Yanlış negatif (FNR)	0,00	$FN/(TP+FN)$
Verimlilik (efficiency)	1,00	$(TP+TN)/(TP+TN+FP+FN)$
TP	20	
FP	0	
TN	20	
FN	0	
Hassasiyet	100,00	
Spesifiklik	100,00	
%Yanlış pozitif(FPR)	0,00	
%Yanlış negatif(FNR)	0,00	

6.DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Hedeflenen peptidlerin gerçekten türlere özgü olmasını sağlamak için her bir peptidin tarama iyonu incelenerek toplam iyon (TIC) ve autoMSMS modunda datalar elde edilmiştir. Domuz ve sığır jelatinlerine ait toplam iyon kromatogramları Şekil 6.1’ de verilmiştir. Domuz ve sığır jelatinine ait toplam iyon kromatogramlarının birbirine benzer oldukları gözlenmiştir.



Şekil 6.1. A) Domuz jelatini toplam iyon kromotogramı B) Sığır jelatini toplam iyon kromotogramı.

Mascot yazılımı ile protein tanımlaması: LC ESI Q-TOF MS spektrumlarından elde edilen m/z değerleri belirtilen Mascot veritabanında taranırken yazılım üzerinde yapılanlar aşağıda sıralanmıştır.

- Peptit örneklerinde veri tabanlarının birbiri ile tutarlılığını sağlamak ve karşılaştırma kolaylığı elde etmek için enzimatik reaksiyonda kullanılan tripsin sabit modifikasyon olarak seçildi.
- Yazılımda taksonomi bölümü mammalia olarak seçildi. Böylece verilen m/z değerleri ile eşleşen peptitlerden domuz ve sığırın da içerisinde olduğu familya türünün listelenmesi sağlandı. Peptit toleransı ± 1.2 , MS/MS tolerans değeri ± 0.6 Da aralığında seçildi. En fazla 1 kaçırılan kesime (missedcleavages) izin verildi.

- Aminoasit kütüphanesi olarak en sık kullanılan SwissProt (AA) ve NCBIprot (AA) kütüphaneleri seçildi. Sığır jelatin örneğine ait veri tabanına girişte seçilen parametreler Şekil 6.2’de verilmiştir.

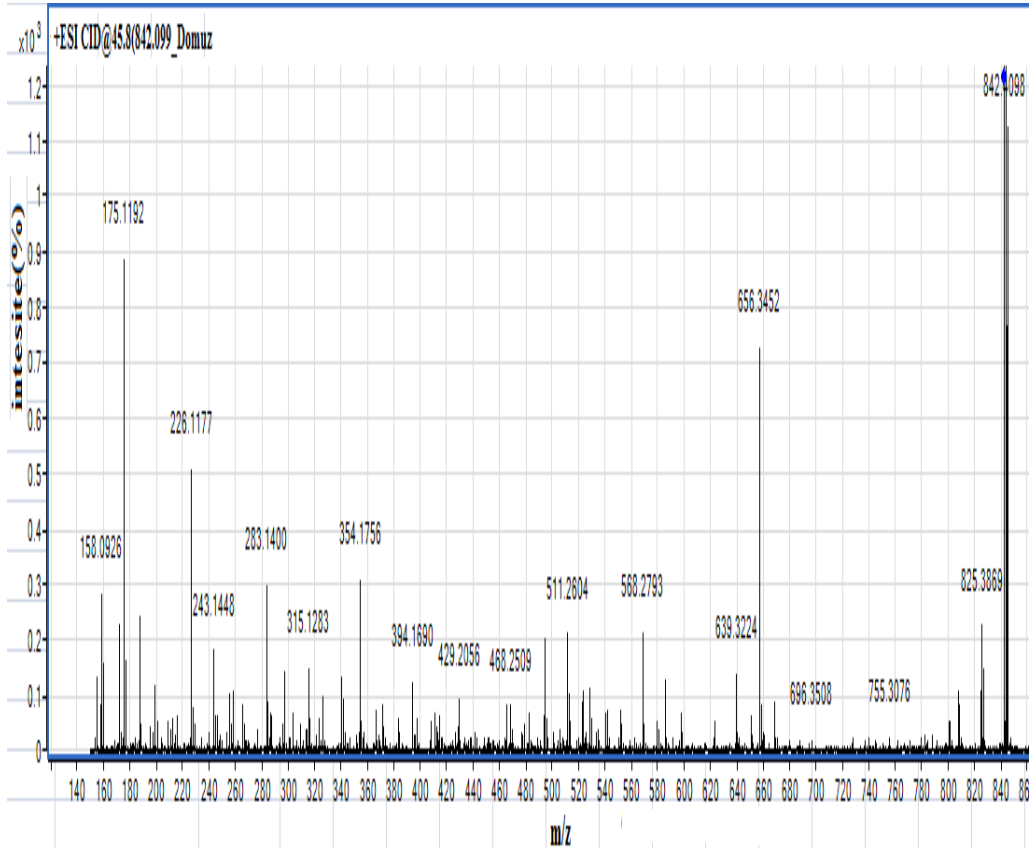
MASCOT MS/MS Ions Search

The screenshot displays the MASCOT MS/MS Ions Search interface with the following parameters:

- Your name:** filiz
- Email:** filizcavus@hotmail.com
- Search title:** (empty)
- Database(s):** NCBIprot (AA), SwissProt (AA)
- Taxonomy:** Mammalia (mammals)
- Enzyme:** Trypsin
- Allow up to:** 1 missed cleavages
- Quantitation:** None
- Fixed modifications:** Carbamidomethyl (C)
- Variable modifications:** --- none selected ---
- Peptide tol. ±:** 1.2 Da
- MS/MS tol. ±:** 0.6 Da
- Peptide charge:** 2+
- Monoisotopic:** * Average
- Data file:** sigir MS MS 280616_2.mgf
- Data format:** Mascot generic
- Instrument:** ESI-QUAD-TOF
- Precursor:** m/z
- Error tolerant:** (unchecked)
- Decoy:** (unchecked)
- Report top:** AUTO hits
- Buttons:** Start Search ..., Reset Form

Şekil 6.2. Mascot veri tabanına girişte seçilen parametrelerin gösterimi.

Elektrospey İyonizasyon Sıvı Kromatografi Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometreleri (ESI LC-Q TOF MS) ile elde edilen domuz jelatinine ait peptit kütleleri (Şekil 6.3) Matrix Science Mascot programına yüklenmiştir.



Şekil 6.3. Domuz jelatini protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, ESI LC QTOF MS ile tespit edilen kütlelerine ait örnek kromatogram.

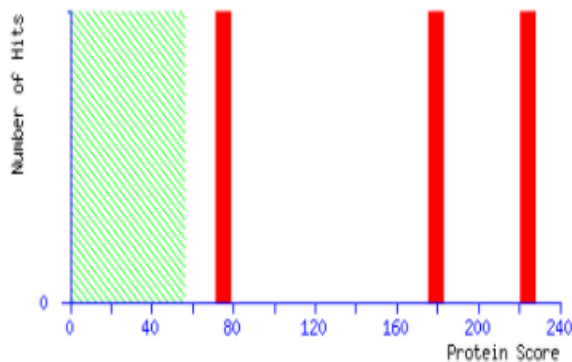
Kesimi yapılan domuz jelatini protein kümesinin mascot araştırma sonucu sonuçları ve protein kümesinden tespit edilen domuz proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları Şekil 6.4 ve Şekil 6.5'de verilmiştir

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User : filizcavus
 Email : filizcavus@hotmail.com
 Search title :
 MS data file : domuz_AMSMS_200516_2_2.mgf
 Database 1 : NCBIprot 20170811 (128624863 sequences; 47232664302 residues)
 Taxonomy 1 : Mammalia (mammals) (4192013 sequences)
 Database 2 : SwissProt 2017_08 (555426 sequences; 198919479 residues)
 Taxonomy 2 : Mammalia (mammals) (66727 sequences)
 Timestamp : 8 Sep 2017 at 08:12:46 GMT
 Protein hits : [1::XP_004655625.1](#) PREDICTED: collagen alpha-1(I) chain [Jaculus jaculus]
 [1::XP_012893546.1](#) PREDICTED: collagen alpha-1(I) chain [Dipodomys ordii]
 [1::XP_005394233.1](#) PREDICTED: collagen alpha-1(I) chain isoform X1 [Chinchilla lanigera]

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 56 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As	Peptide Summary	Help	Help
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits	AUTO
Standard scoring	<input checked="" type="radio"/> MudPIT scoring <input type="radio"/>	Display non-significant matches	<input type="checkbox"/>
Show pop-ups	<input checked="" type="radio"/> Suppress pop-ups <input type="radio"/>	Sort unassigned	Decreasing Score
Preferred taxonomy	All entries	Require bold red	<input type="checkbox"/>

Şekil 6.4. Kesimi yapılan domuz jelatini protein kümesinin mascot araştırma sonucu.

✓	152	760.3577	759.3504	759.3148	0.0357	0	25	0.79	1	GDDGSPGR
✓	136	729.3524	728.3451	728.3817	-0.0365	0	25	0.48	1	NSNGIPK
✓	190	802.4448	801.4375	800.4756	0.9620	1	25	1.4	1	KLGLGEGK
✓	144	744.3527	743.3454	743.4177	-0.0723	0	25	0.66	1	ANIEGLK
✓	113	702.3416	701.3343	701.4072	-0.0728	0	25	0.36	1	NLASIGK
✓	139	645.3203	644.3130	644.3606	-0.0475	0	24	0.072	1	AGLAGTR
✓	212	840.4688	839.4615	840.4202	-0.9587	0	24	1.1	1	AGPGAAGAGGR
✓	181	785.3887	784.3814	784.3828	-0.0014	0	24	1.1	1	GDQGPVGR
✓	221	852.4316	851.4244	850.4661	0.9583	1	23	1.4	1	VTYQQR
✓	447	746.3124	2235.9153	2235.0444	0.8709	0	23	0.74	1	QLLEESYDGGAGAAAFAPPR
✓	215	842.4107	841.4034	841.4042	-0.0008	0	23	1.9	1	GEAGPQGAR
✓	254	934.4742	933.4670	934.4257	-0.9587	0	22	2.8	1	NLAFQQR
✓	149	758.3790	757.3718	757.4082	-0.0365	0	21	1.8	1	GQVEAVR
✓	261	971.4536	970.4463	971.5222	-1.0759	0	21	3.3	1	IPLSGIGCR
✓	310	663.8336	1325.6526	1326.7078	-1.0552	1	21	2.5	1	EVDRLALQPR
✓	357	757.9020	1513.7894	1512.8049	0.9845	0	21	2.3	1	DGINGIPGIGPPGPR
✓	95	684.3789	683.3717	684.3304	-0.9587	0	21	0.24	1	GQPGGGR

Şekil 6.5. Protein kümesinden tespit edilen domuz proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları.

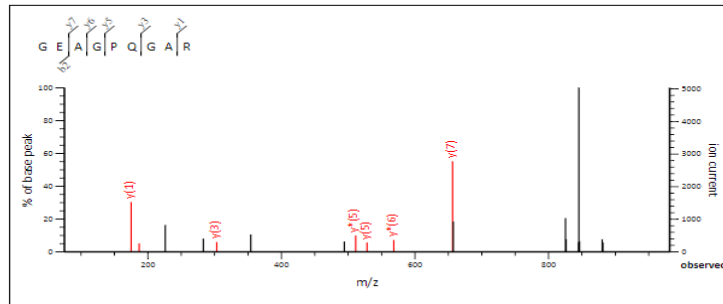
Protein kümesinden domuz proteinine ait belirlenen GEAGPQGAR peptid diziliminde tripsin enzimi ile parçalanma işlemi sırasında yükün amino terminali tarafında kalması ile oluşan b türü iyonlar ile karboksini terminali tarafında kalması ile oluşan y türü iyonlar Şekil 6.6'da verilmiştir.

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **GEAGPQGAR**
Found in **NP_445756.1** in NCBIprot, collagen alpha-1(I) chain precursor [Rattus norvegicus]

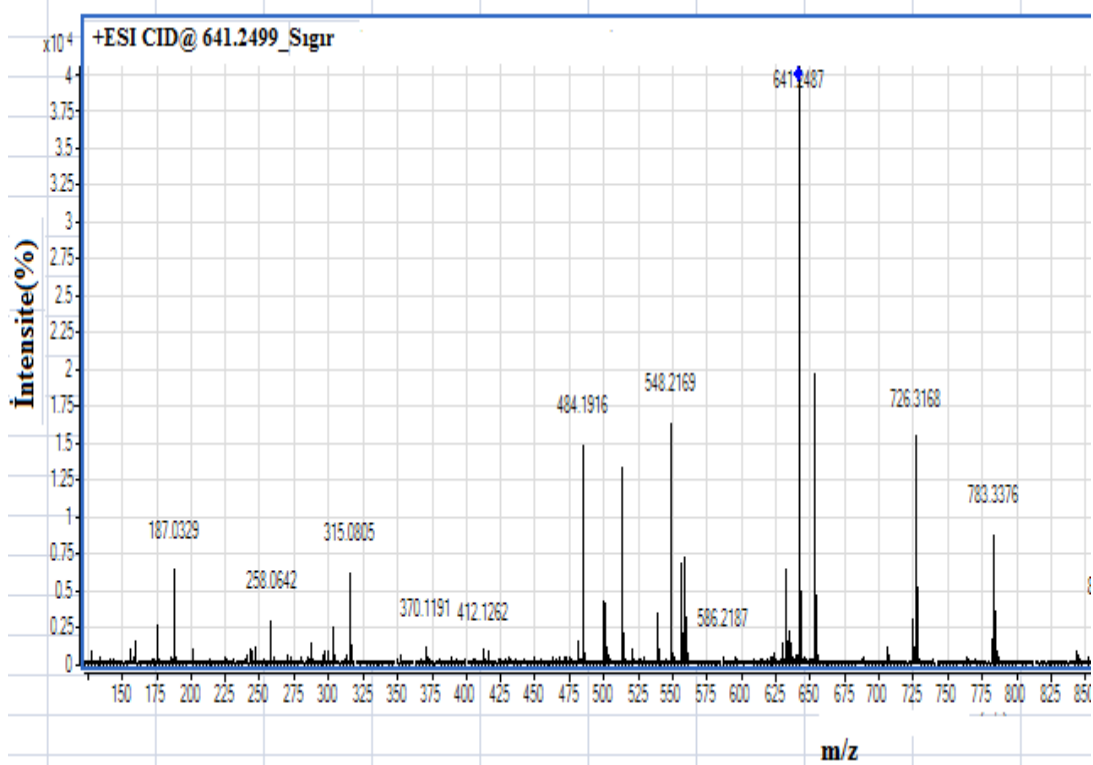
Match to Query 10: 841.403399 from(842.410675,1+) intensity(0.0000) rtinseconds(189.837) index(3)
Title: domuz_AMSMS_200516_2.d, MS/MS of 842.4106750 1= at 3.16395 mins
Data file domuz_AMSMS_200516_2_2.mgf



#	b	b*	b ⁰	Seq.	y	y*	y ⁰	#
1	58.0287			G				9
2	187.0713		169.0608	E	785.3900	768.3635	767.3795	8
3	258.1084		240.0979	A	656.3474	639.3209		7
4	315.1299		297.1193	G	585.3103	568.2838		6
5	412.1827		394.1721	P	528.2889	511.2623		5
6	540.2413	523.2147	522.2307	Q	431.2361	414.2096		4
7	597.2627	580.2362	579.2522	G	303.1775	286.1510		3
8	668.2998	651.2733	650.2893	A	246.1561	229.1295		2
9				R	175.1190	158.0924		1

Şekil 6.6. 841,4099 m/z peptid dizilimi.

Elektrospey İyonizasyon Sıvı Kromatografi Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometreleri (ESI LC-Q TOF MS) ile elde edilen sığır jelatine ait peptit kütleleri (Şekil 6.7) Matrix Science Mascot programına yüklenmiştir.



Şekil 6.7. Sığır jelatini protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, ESI LC QTOF MS ile tespit edilen kütlelerine ait örnek kromatogram.

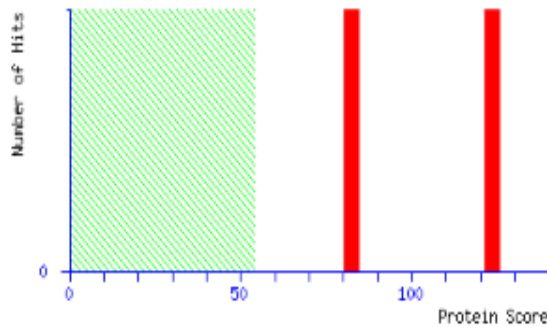
Kesimi yapılan sığır jelatini protein kümesinin mascot araştırma sonucu sonuçları ve protein kümesinden tespit edilen domuz proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları Şekil 6.8 ve Şekil 6.9'da verilmiştir.

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User : filiz
 Email : filizcavus@hotmail.com
 Search title :
 MS data file : sigir MS MS 280616_2.mgf
 Database 1 : NCBIprot 20170811 (128624863 sequences; 47232664302 residues)
 Taxonomy 1 : Mammalia (mammals) (4192013 sequences)
 Database 2 : SwissProt 2017_08 (555426 sequences; 198919479 residues)
 Taxonomy 2 : Mammalia (mammals) (66727 sequences)
 Timestamp : 9 Sep 2017 at 22:47:01 GMT
 Protein hits : [1:1F0T.A](#) Chain A, Bovine Trypsin Complexed With Rpr131247
 [1:COHJN3.1](#) RecName: Full=Collagen alpha-1(I) chain; AltName: Full=Alpha-1 type I collagen

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 54 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As [Help](#) [Help](#)
 Significance threshold $p <$ Max. number of hits
 Standard scoring MudPIT scoring Display non-significant matches Show sub-sets
 Show pop-ups Suppress pop-ups Sort unassigned Require bold red
 Preferred taxonomy

Şekil 6.8. Kesimi yapılan sığır jelatini protein kümesinin mascot araştırma sonucu.

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
99	1176.6372	1175.6299	1175.6299	0.0000	0	52	0.18	1	1	GVPGGGIVGAPGK
108	641.3156	1280.6167	1280.6109	0.0058	0	51	0.19	1	1	GEAGPSGPAQPTGAR
95	1160.6406	1159.6333	1159.6350	-0.0016	0	38	5.6	1	1	GVPGGGIVGAPGK
38	1046.4363	1045.4291	1046.4628	-1.0338	1	35	11	1	1	EDQERGAOK
31	1038.4820	1037.4747	1037.6094	-0.1347	0	34	12	1	1	QRPFGAALGR
228	1058.0624	2114.1102	2114.1120	-0.0018	0	34	6.7	1	1	GIPVSGSVGEPGPIGISGPPGAR
75	1100.4909	1099.4916	1099.5530	0.0386	1	33	16	1	1	QWATPAQRR
3	785.4268	784.4195	784.4192	0.0004	0	31	17	1	1	AGPGATQVR
29	1034.5241	1033.5168	1033.6284	-0.1116	1	30	30	1	1	GLPGPALGPKK
492	1039.2690	4153.0471	4152.1624	0.0847	1	30	3.1	1	1	VLPEVDLDAGKXKPSQAASVIVASVTSLLSSASAAVLSPPR
68	1090.4625	1089.4552	1089.5601	-0.1048	1	30	34	1	1	CLERSASGK
52	1074.4674	1073.4601	1073.5175	-0.0574	0	29	49	1	1	EGIQQPSLK
176	1029.4850	2056.9555	2057.1633	-0.2078	1	28	22	1	1	EVAEPLVGRVLPVGEAGLPR
174	1028.5508	2055.0070	2056.0509	-0.0719	1	28	27	1	1	GLTGRKGEFGAPGIPGEGSPGK
239	1069.0375	2136.0685	2136.0600	0.0005	0	27	28	1	1	GETGPSGPPGAPGAPGAPVGPAGK
102	1182.6106	1181.6033	1181.5677	0.0356	0	26	68	1	1	ETVDAPSGPPGR
34	1042.5433	1041.5361	1041.6335	-0.0974	0	25	96	1	1	QLGILPVFR
267	1085.0341	2168.0537	2167.1194	0.9343	0	24	53	1	1	AVAVATAQVINGSEGPAAELAK

Şekil 6.9. Protein kümesinden tespit edilen sığır proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları.

Protein kümesinden sığır proteinine ait belirlenen GEAGPQGAR peptid diziliminde tripsin enzimi ile parçalanma işlemi sırasında yükün amino terminali tarafında kalması ile oluşan b türü iyonlar ile karboksi terminali tarafında kalması ile oluşan y türü iyonlar Şekil 6.10'da verilmiştir.

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

Peptide View

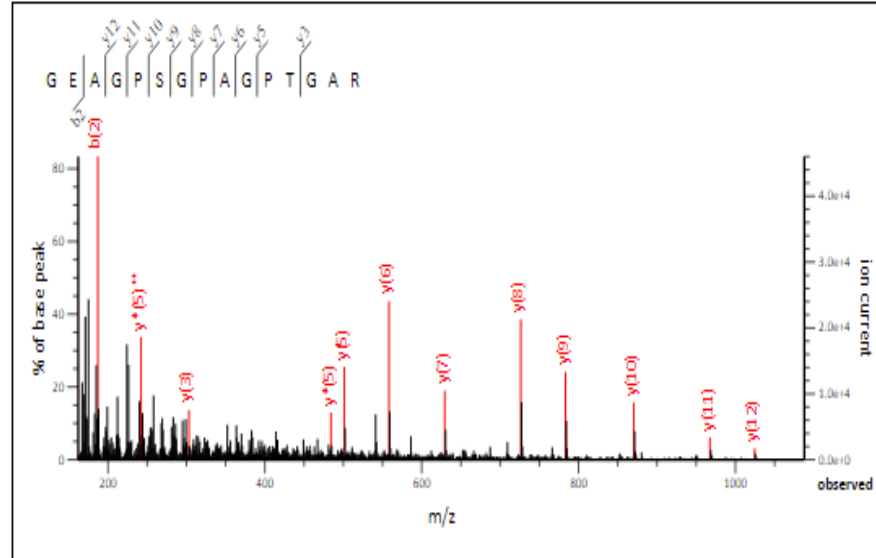
MS/MS Fragmentation of **GEAGPSCGAPPTGAR**

Found in **C0HJN5.1** in **NCBIprot**, RecName= Full=Collagen alpha-1(I) chain; AltName= Full=Alpha-1 type I collagen

Match to Query 108: 1280.616734 from(641.315643,2+) intensity(0.0000) rtinseconds(422.201) index(34)

Title: sigir MS MS 280616.d, MS/MS of 641.315643 2+ at 7.03668333333333 mins

Data file sigir MS MS 280616_2.mgf



#	b	b ⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y [*]	y ^{*++}	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	58.0287	29.5180			G							15
2	187.0713	94.0393	169.0608	85.0340	E	1224.5967	612.8020	1207.5702	604.2887	1206.5862	603.7967	14
3	258.1084	129.5579	240.0979	120.5526	A	1095.5541	548.2807	1078.5276	539.7674	1077.5436	539.2754	13
4	315.1299	158.0686	297.1193	149.0633	G	1024.5170	512.7622	1007.4905	504.2489	1006.5065	503.7569	12
5	412.1827	206.5950	394.1721	197.5897	P	967.4956	484.2514	950.4690	475.7381	949.4850	475.2461	11
6	499.2147	250.1110	481.2041	241.1057	S	870.4428	435.7250	853.4163	427.2118	852.4322	426.7198	10
7	556.2362	278.6217	538.2256	269.6164	G	783.4108	392.2090	766.3842	383.6958	765.4002	383.2037	9
8	653.2889	327.1481	635.2784	318.1428	P	726.3893	363.6983	709.3628	355.1850	708.3788	354.6930	8
9	724.3260	362.6667	706.3155	353.6614	A	629.3366	315.1719	612.3100	306.6586	611.3260	306.1666	7
10	781.3475	391.1774	763.3369	382.1721	G	558.2994	279.6534	541.2729	271.1401	540.2889	270.6481	6
11	878.4003	439.7038	860.3897	430.6985	P	501.2780	251.1426	484.2514	242.6293	483.2674	242.1373	5
12	979.4480	490.2276	961.4374	481.2223	T	404.2252	202.6162	387.1987	194.1030	386.2146	193.6110	4
13	1036.4694	518.7383	1018.4589	509.7331	G	303.1775	152.0924	286.1510	143.5791			3
14	1107.5065	554.2569	1089.4960	545.2516	A	246.1561	123.5817	229.1295	115.0684			2
15					R	175.1190	88.0631	158.0924	79.5498			1

Şekil.6.10. 641,3140(+2) m/z, peptid dizilimi.

Elde edilen dizilimlerden domuz ve sığır jelatini için ayırt edici nitelik taşıyan peptidlerin alıkonma zamanları (RT) ve m/z (Tolerans ± 20 ppm) değerlerine ulaşılmıştır. Sonuçlar Çizelge 6.1 ve Çizelge 6.2’de verilmiştir.

Çizelge 6.1. Domuz jelatinine ait peptidler.

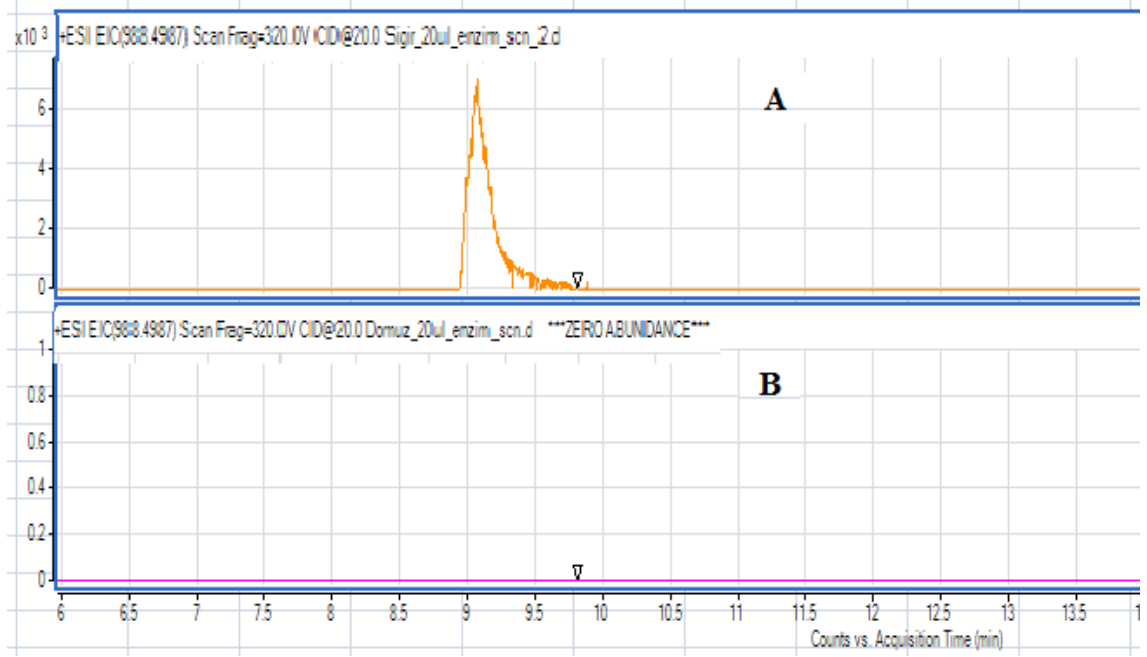
Sıra	Peptid	Alıkonma Zamanı (RT),dakika	Gözlenen m/z değeri	Peptidin kütlesi
1	GETGPSGPAGPTGAR	7,05	656,3184(+2)	1310,6223
2	GPTGPAGVR	6,90	811,4420	810,4347
3	QGPSGPSGER	4,04	971,4536	970,4463
4	GEAGPQGAR	3,19	842,4099	841,4020
5	SAGISVPGPMGPSGR	10,44	733,8751(+2)	1465,7356
6	GETGPAGPAGPVG PVGAR	9,15	773,9138	1545,8131

Çizelge 6.2. Sığır jelatinine ait peptidler.

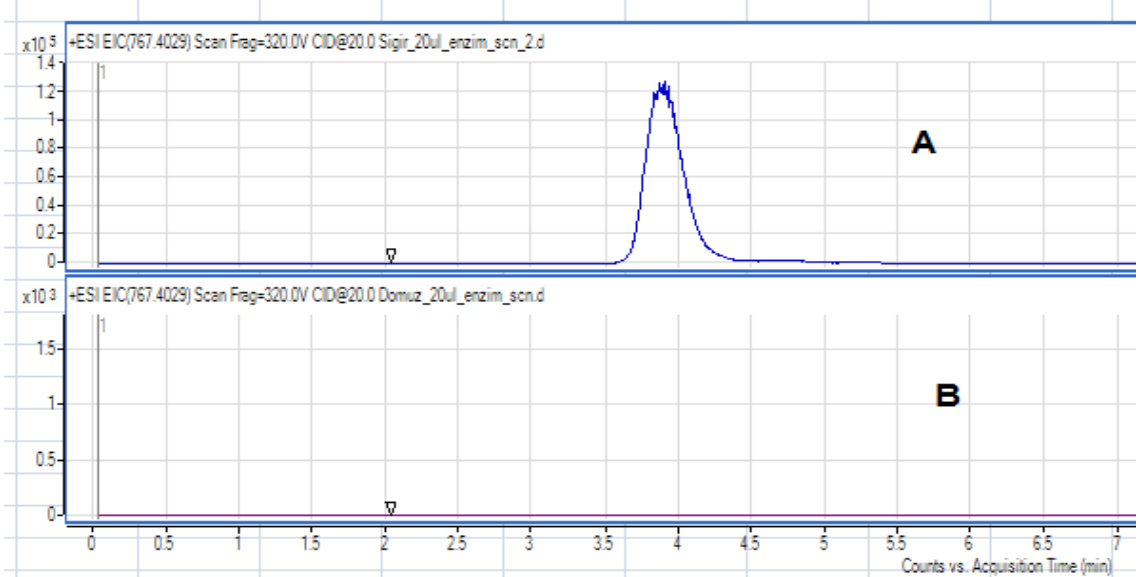
Sıra	Peptid	Alıkonma Zamanı (RT),dakika	Gözlenen m/z değeri	Peptidin kütlesi
1	GEAGPSGPAGPTGAR	7,04	641,3140(+2)	1280,6135
2	GATGPAGVR	6,58	785,4259	784,4186
3	QGPSGASGER	2,69	945,4365	944,4292
4	GAAGLPGPK	3,92	767,4029	766,3950
5	GETGPAGPAGPIGPV GAVGAR	9,64	780,9105(+2)	1559,8000
6	SGDRGETGPAGPAGPI GPVGAR	9,15	988,4987(+2)	1974,9817
7	IGQPGAVGPAGIR	9,58	597,3339(+2)	1192,6623

Belirlenen bütün peptidlerin m/z (Tolerans ± 20 ppm) değerleri sığır jelatinine ve domuz jelatinine ait ekstraksiyon iyon kromatogramında (EIC) incelenmiştir.

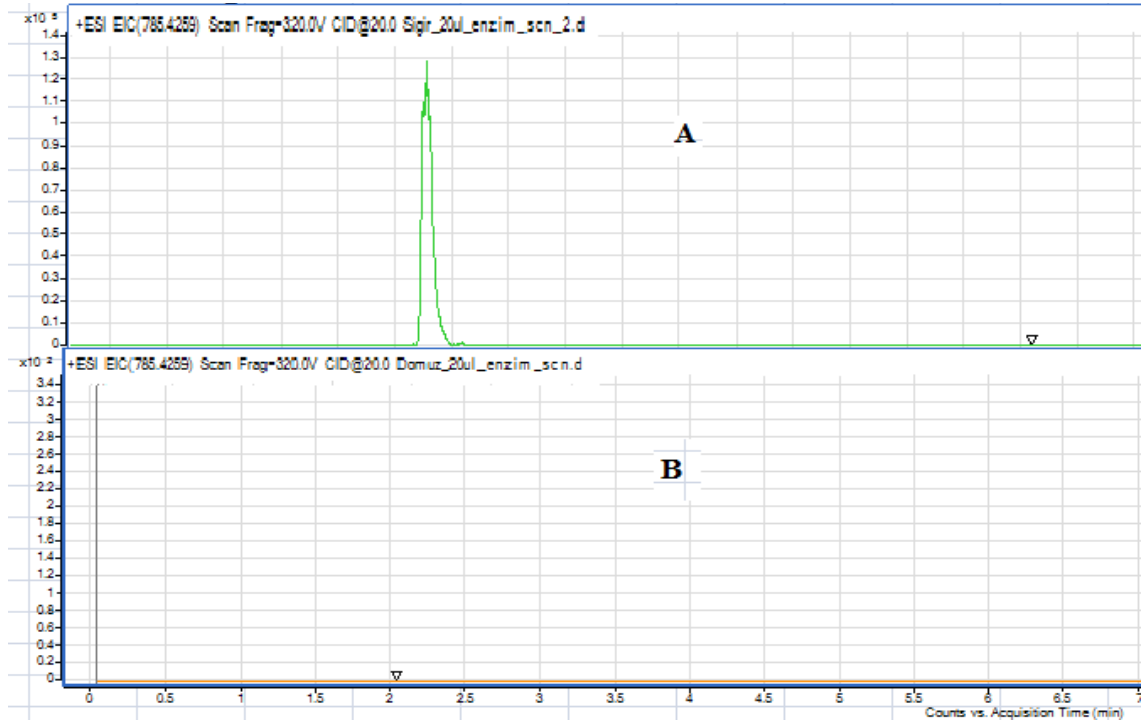
Sığır jelatini için belirlenen marker iyonlarına ait kromotogram sonuçları domuz jelatini ile karşılaştırılmalı olarak Şekil 6.11, Şekil 6.12, Şekil 6.13, Şekil 6.14, Şekil 6.15, Şekil 6.16, Şekil 6.17’de verilmiştir.



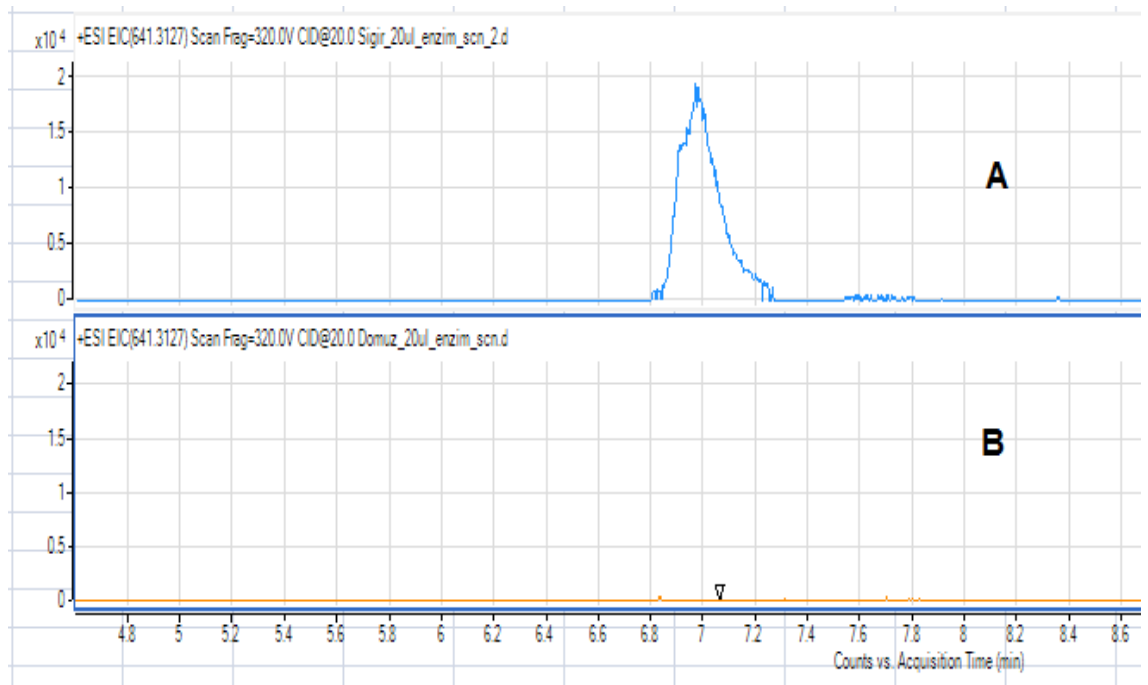
Şekil 6.11. A) Sığır jelatinine ait kromotogram 988,4987 m/z. B) Domuz jelatinine ait kromotogram 988,4987 m/z.



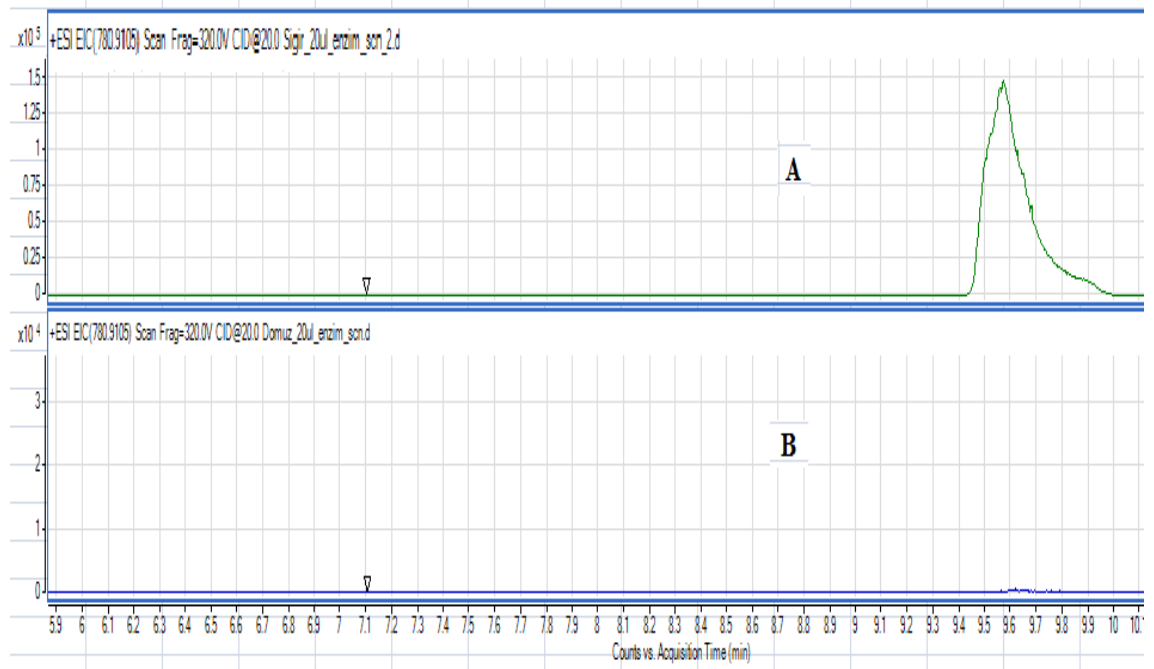
Şekil 6.12. A) Sığır jelatinine ait kromotogram 767,4029 m/z. B) Domuz jelatinine ait kromotogram 767,4029 m/z.



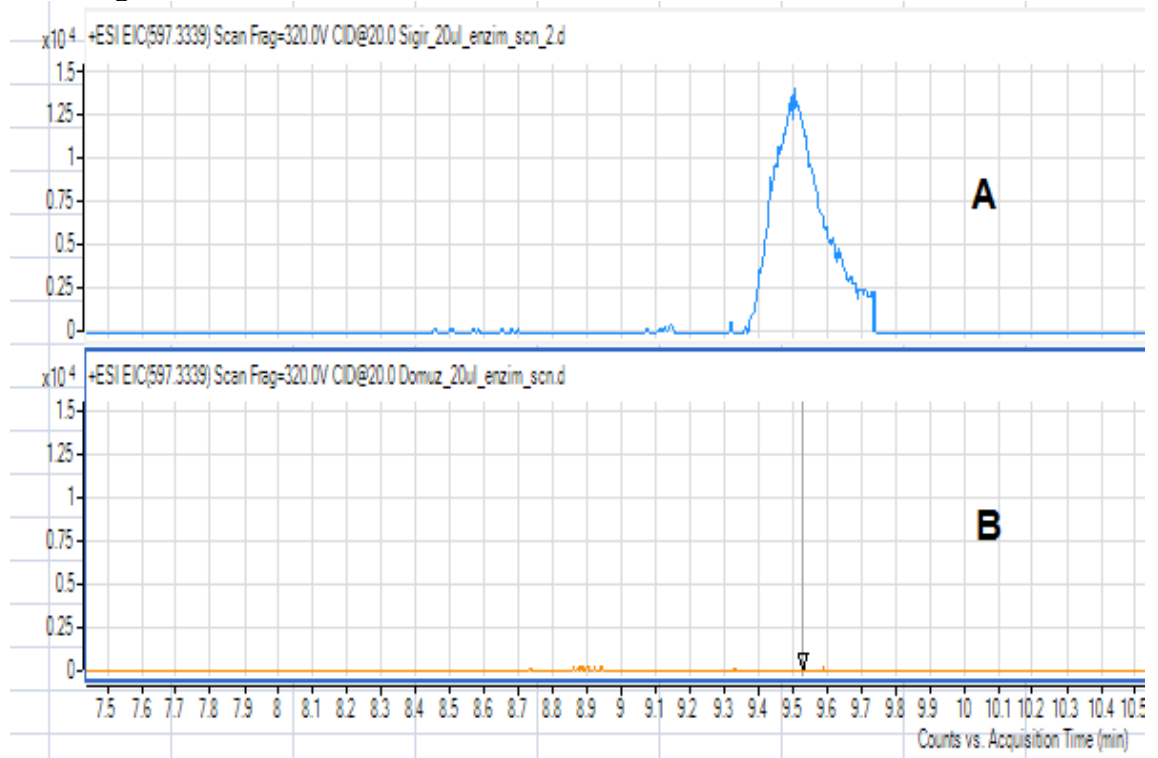
Şekil 6.13. A) Sığır jelatinine ait kromotogram 785,4259 m/z. B) Domuz jelatinine ait kromotogram 785,4259 m/z.



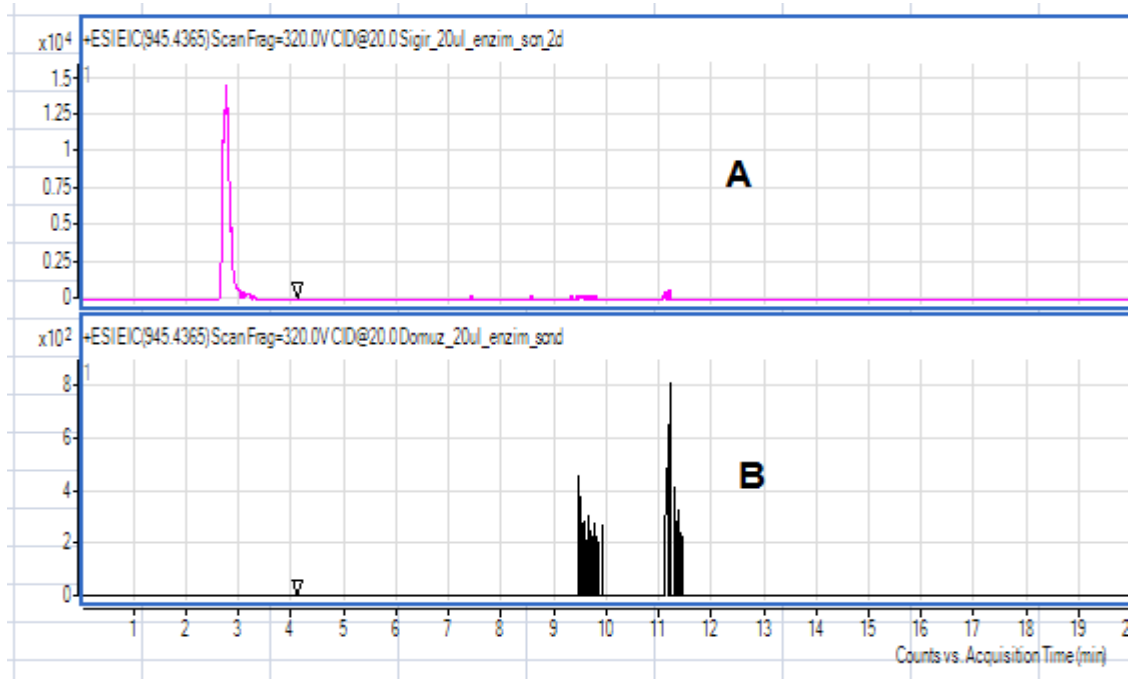
Şekil 6.14. A) Sığır jelatinine ait kromotogram 641,3127 m/z. B) Domuz jelatinine ait kromotogram 641,3127 m/z.



Şekil 6.15. A) Sığır jelatinine ait kromotogram 780,9125 m/z. B) Domuz jelatinine ait kromotogram 780,9125 m/z.

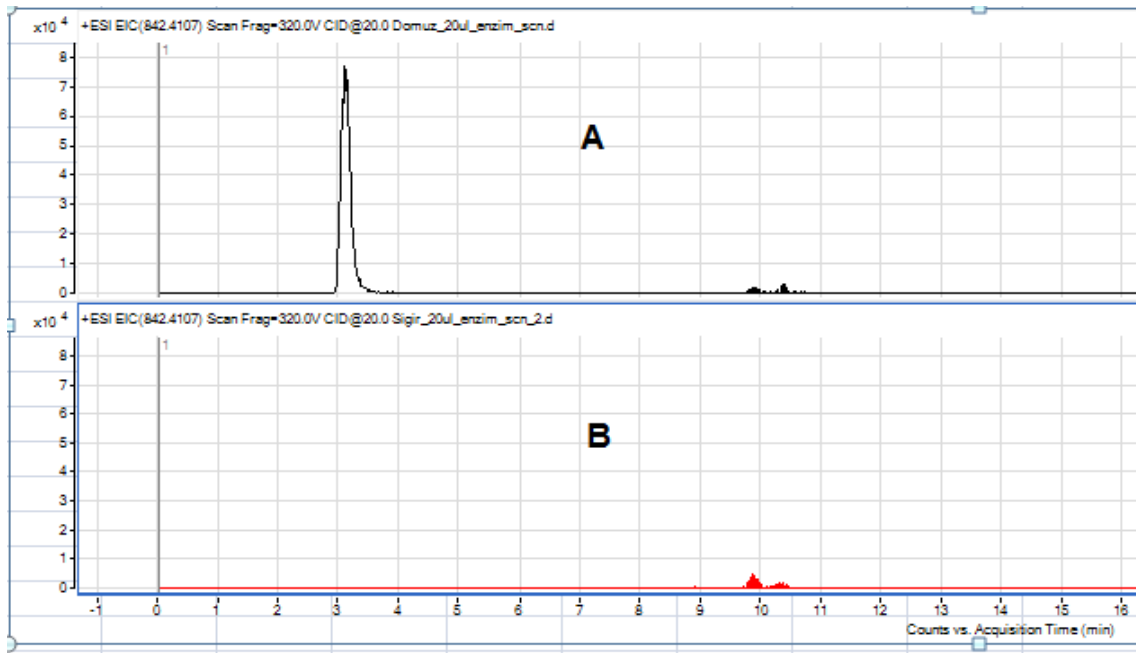


Şekil 6.16. A) Sığır jelatinine ait kromotogram 597,3339 m/z. B) Domuz jelatinine ait kromotogram 597,3339 m/z.

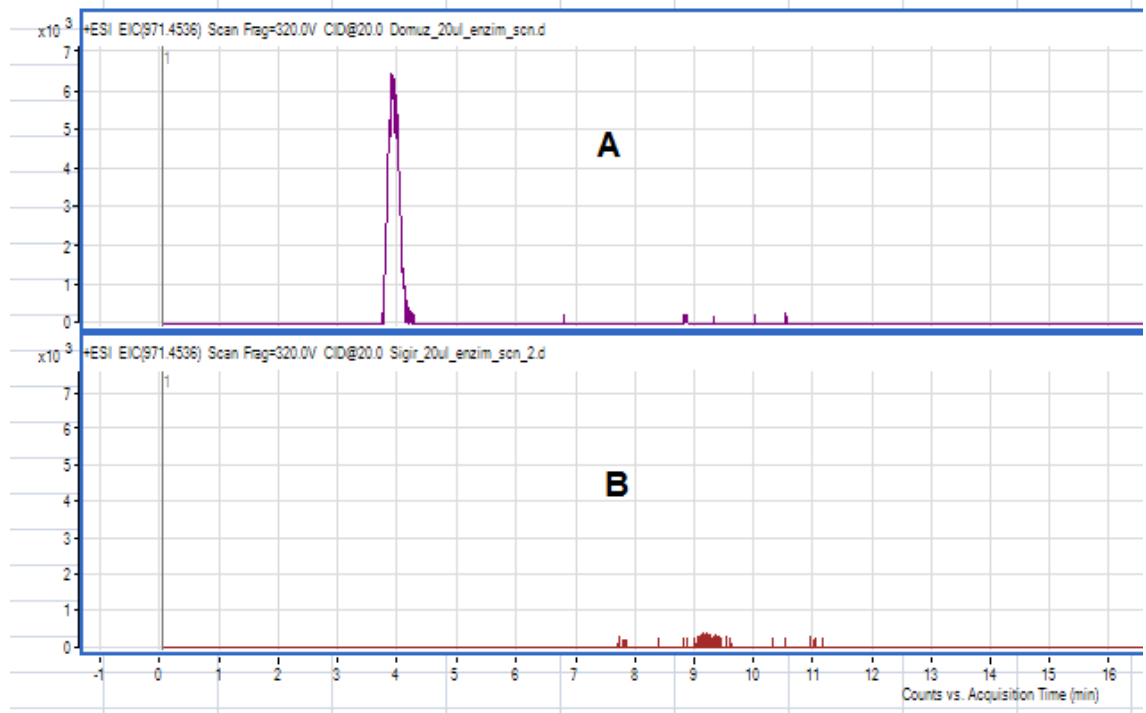


Şekil 6.17. A) Sığır jelatinine ait kromotogram 945,4365 m/z. B) Domuz jelatinine ait kromotogram 945,4365 m/z.

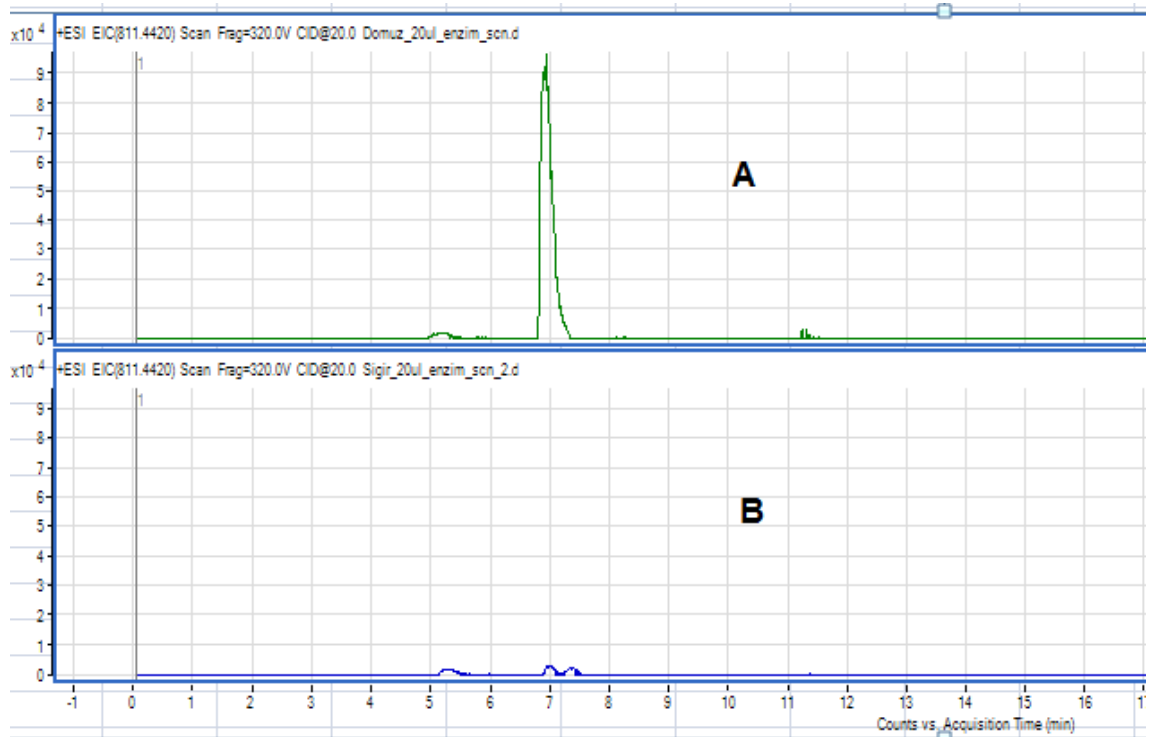
Domuz jelatini için belirlenen marker iyonlarına ait kromotogram sonuçları sığır jelatini ile karşılaştırılmalı olarak Şekil 6.18, Şekil 6.19, Şekil 6.20, Şekil 6.21, Şekil 6.22, Şekil 6.23’de verilmiştir.



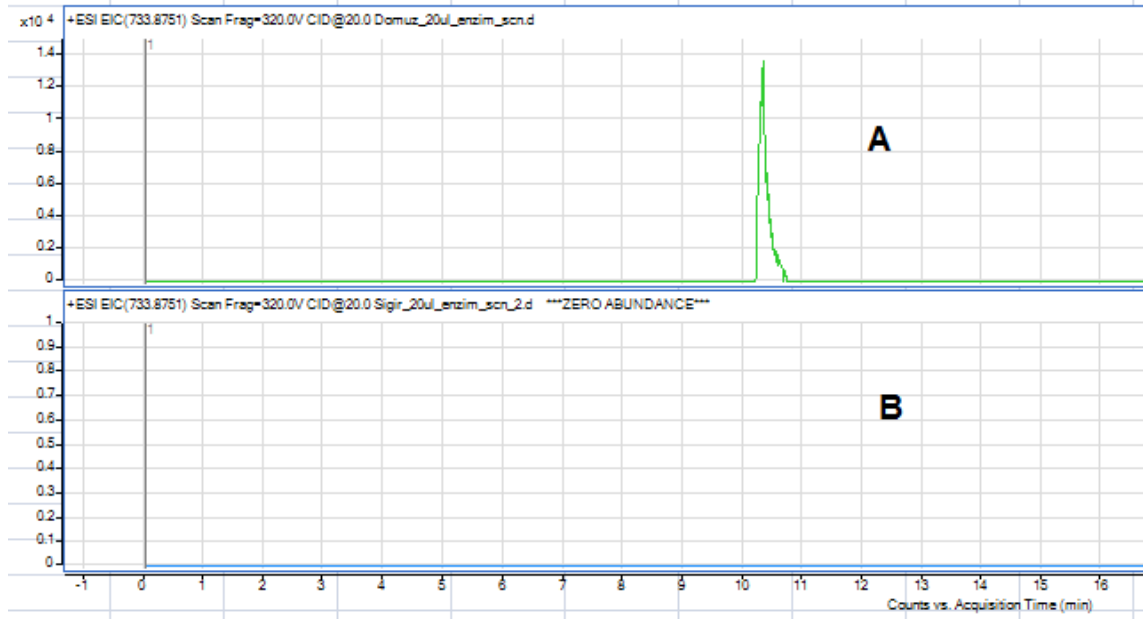
Şekil 6.18. A) Domuz jelatinine ait kromotogram 842,4107 m/z. B) Sığır jelatinine ait kromotogram 842,4107 m/z.



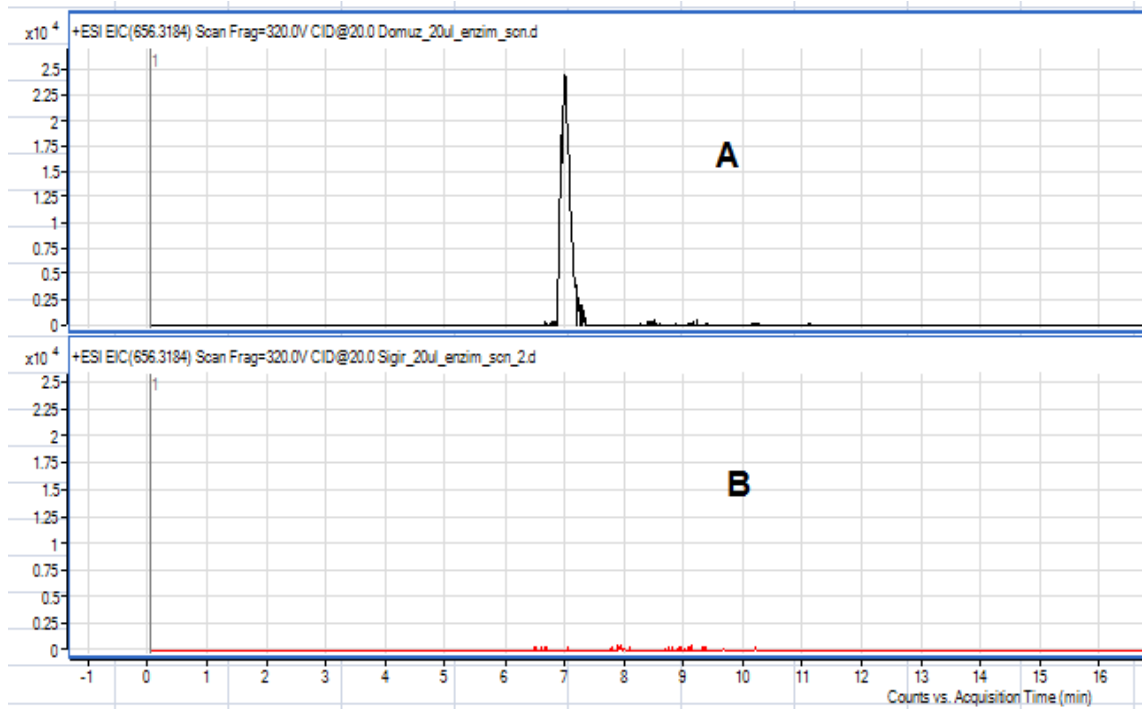
Şekil 6.19. A) Domuz jelatinine ait kromotogram 971,4536 m/z. B) Sığır jelatinine ait kromotogram 971,4536 m/z.



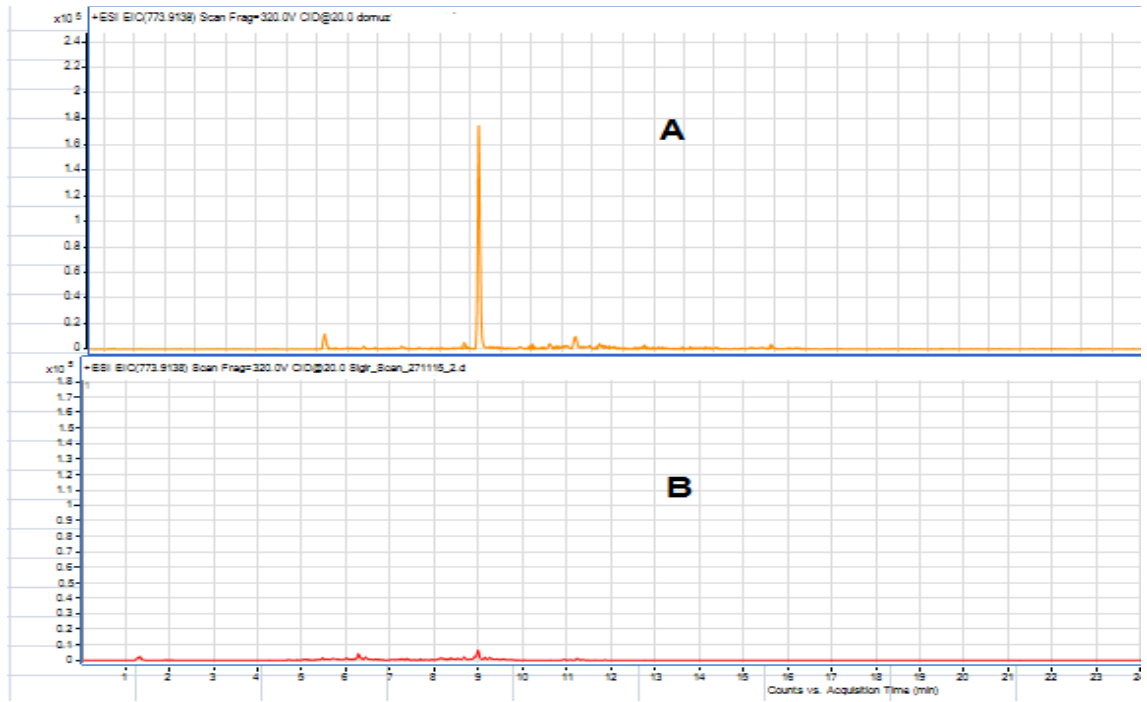
Şekil 6.20. A) Domuz jelatinine ait kromotogramda 811,4420 m/z. B) Sığır jelatinine ait kromotogramda 811,4420 m/z.



Şekil 6.21. A) Domuz jelatinine ait kromotogram 733,8751 m/z. B) Sığır jelatinine ait kromotogram 733,8751 m/z.

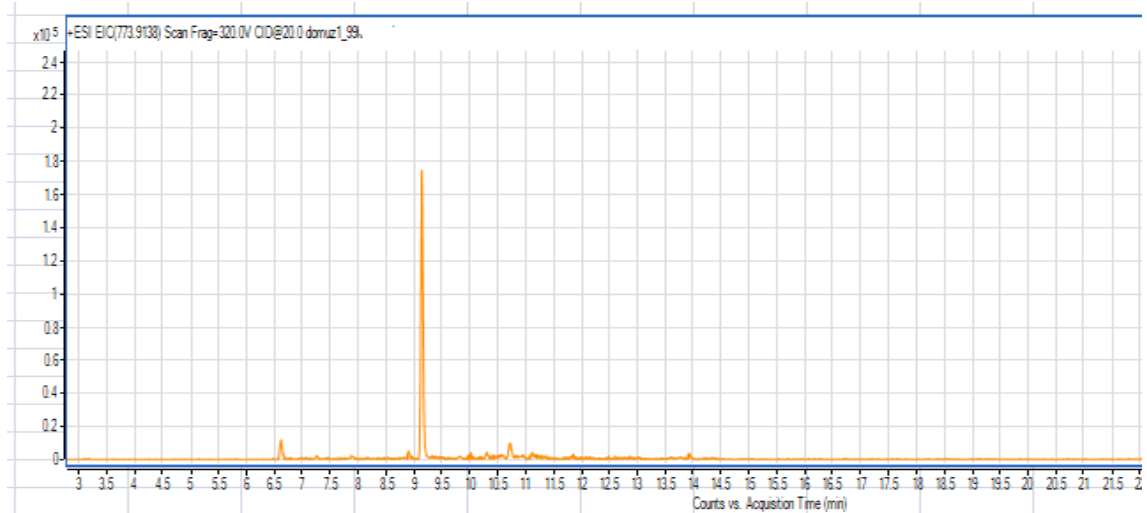


Şekil 6.22. A) Domuz jelatinine ait kromotogram 656,3184 m/z. B) Sığır jelatinine ait kromotogram 656,3184 m/z.



Şekil 6.23. A) Domuz jelatinine ait kromotogram 773,9138 m/z. B) Sığır jelatinine ait kromotogram 773,9138 m/z.

Domuz ve sığır jelatinleri için ayırt edici iyonların belirlenmesi sonrasında Sığır jelatini içerisine farklı oranlarda (%10,%5,%2,5,%1,%0,5) domuz jelatini katılarak tespit limiti çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Belirlenen tespit limitine ait kromatogram sonuçları Şekil 6.24’de verilmiştir.



Şekil.6.24. %1 domuz_%99 sığır örneği EIC kromatogram (773,9138 m/z).

Örneklerin ekstraksiyonunda enzimatik sindirimin gerçekleşmesi için 37°C'lik etüvde bekleme süreleri ile ilgili optimizasyon çalışması yapılmış olup, farklı bekleme sürelerinde her iki jelatin türü için belirlenen ayırt edici peptidlerin pik alanları incelenmiş olup sonuçlar Çizelge 6.3 ve Çizelge 6.4'de verilmiştir.

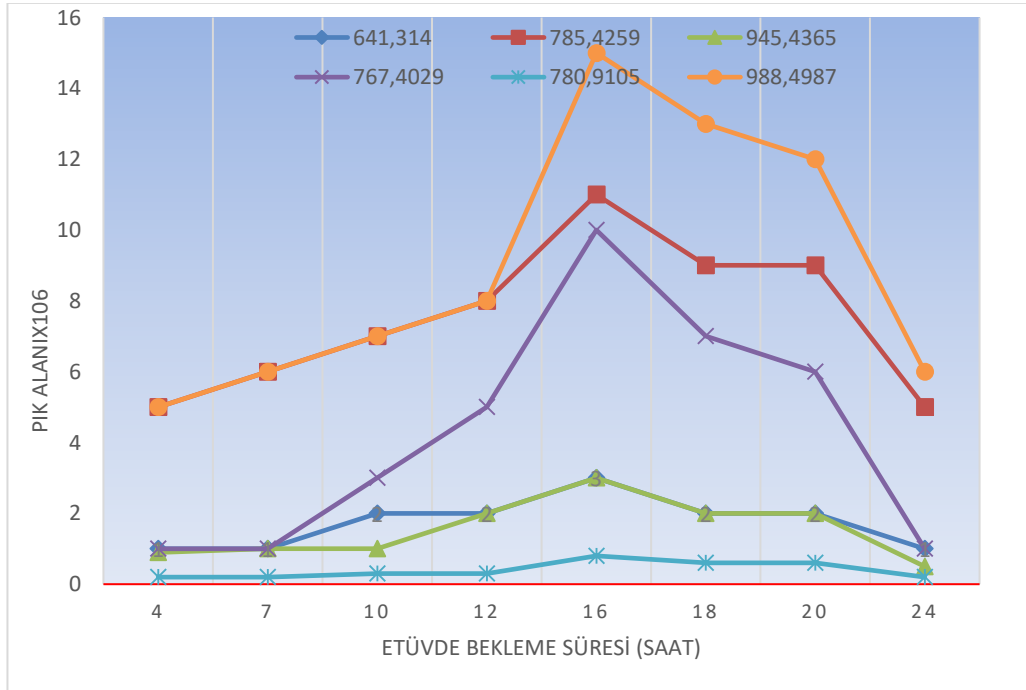
Çizelge 6.3. Farklı bekleme sürelerinde sığır jelatininde belirlenen ayırt edici peptidlerin pik alanları.

etüvde bekleme süresi(saatt)								
marker iyonlar(m/z)	4	7	10	12	16	18	20	24
641,314	1x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶	6x10 ⁶	4x10 ⁶	2x10 ⁶	1x10 ⁶
785,4259	5x10 ⁶	6x10 ⁶	7x10 ⁶	8x10 ⁶	11x10 ⁶	9x10 ⁶	9x10 ⁶	5x10 ⁶
945,4365	9x10 ⁵	1x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ⁶	5x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶	0,5x10 ⁶
767,4029	1x10 ⁶	1x10 ⁶	3x10 ⁶	5x10 ⁶	1x10 ⁷	7x10 ⁶	6x10 ⁶	1x10 ⁶
780,9105	2x10 ⁵	2x10 ⁵	3x10 ⁵	4x10 ⁵	1x10 ⁶	6x10 ⁵	6x10 ⁵	2x10 ⁵
988,4987	5x10 ⁶	6x10 ⁶	7x10 ⁶	8x10 ⁶	1,4x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,2x10 ⁷	6x10 ⁶
597,3339	1x10 ⁶	4x10 ⁶	5x10 ⁶	5x10 ⁶	9x10 ⁶	8x10 ⁶	4x10 ⁶	2x10 ⁶

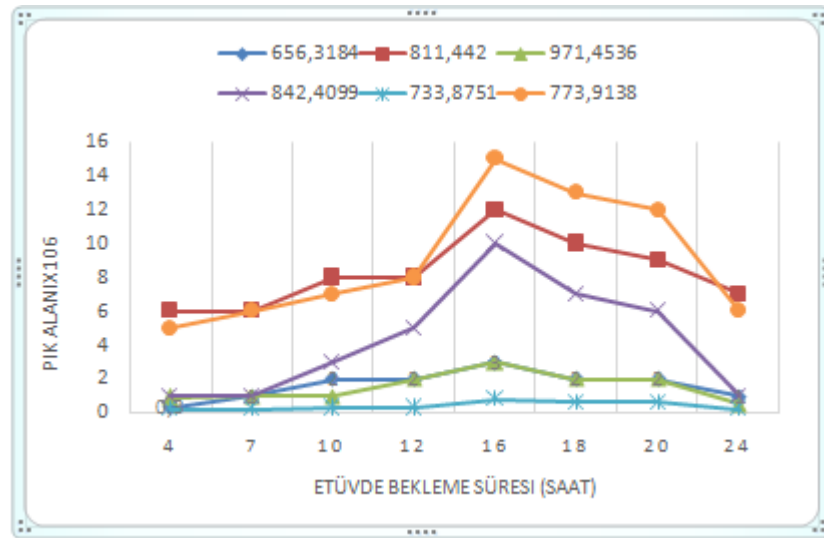
Çizelge 6.4 Farklı bekleme sürelerinde domuz jelatininde belirlenen ayırt edici peptidlerin pik alanları.

etüvde bekleme süresi(saatt)								
marker iyonlar(m/z)	4	7	10	12	16	18	20	24
656,3184	3x10 ⁵	1x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶	3x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶	1x10 ⁶
811,442	6x10 ⁶	6x10 ⁶	8x10 ⁶	8x10 ⁶	1,2x10 ⁷	1x10 ⁷	9x10 ⁶	7x10 ⁶
971,4536	9x10 ⁵	1x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ⁶	3x10 ⁶	2x10 ⁶	2x10 ⁶	5x10 ⁵
842,4099	1x10 ⁶	1x10 ⁶	3x10 ⁶	5x10 ⁶	1x10 ⁷	7x10 ⁶	6x10 ⁶	1x10 ⁶
733,8751	2x10 ⁵	2x10 ⁵	3x10 ⁵	3x10 ⁵	8x10 ⁵	6x10 ⁵	6x10 ⁵	2x10 ⁵
773,9138	5x10 ⁶	6x10 ⁶	7x10 ⁶	8x10 ⁶	1,5x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,2x10 ⁷	6x10 ⁶

Sığır ve domuz jelatinlerine ait optimizasyon grafikleri Şekil 6.25, Şekil 6.26'da verilmiştir.

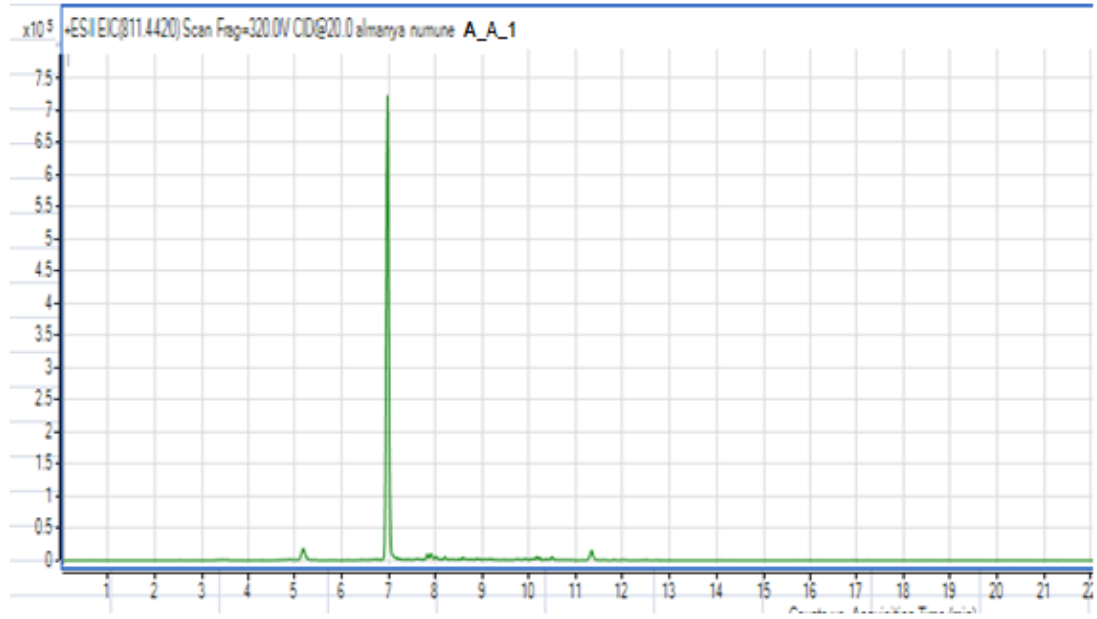


Şekil 6.25. Sığır jelatinine ait ayırt edici peptidlerinin optimizasyon grafiği.

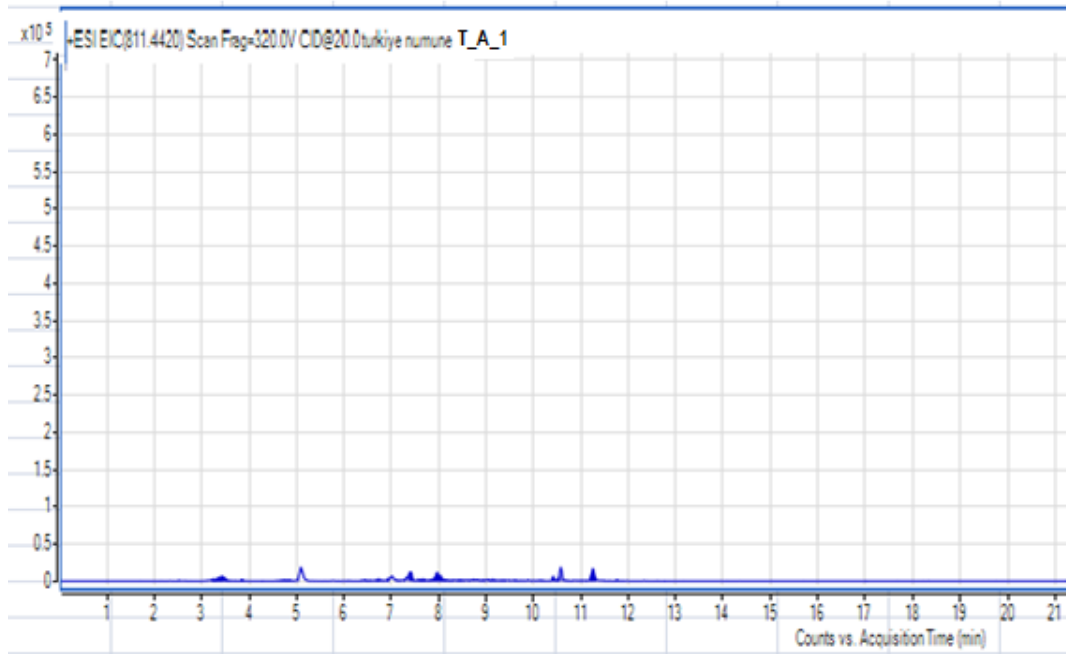


Şekil 6.26. Domuz jelatinine ait ayırt edici peptidlerinin optimizasyon grafiği.

Türkiye ve Almanya'dan alınan toplam 50 adet yumuşak şekerleme örneklerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Belirlenen bütün peptidlerin m/z değerleri numunelere ait ekstraksiyon iyon kromatogramında incelenmiştir (Şekil 6.27, Şekil 6.28). Türkiye'den alınan numunelere ait sonuçlar Çizelge 6.5'de, Almanya'dan alınan numunelere ait sonuçlar Çizelge 6.6'da verilmiştir.



Şekil 6.27. Almanya'dan alınan şekerleme örneği m/z 811,4420 (GPTGPAGVR).



Şekil 6.28. Türkiye'den alınan şekerleme örneği m/z 811,4420 (GPTGPAGVR)

Çizelge 6.5. Türkiye’den alınan yumuşak şekerleme örneklerine ait sonuçlar.

Örnek		Sığır jelatini	Domuz jelatini
T_A	1	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	2	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	2	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	4	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	5	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
T_B	1	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	2	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	3	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	4	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	5	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
T_C	1	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	2	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	3	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	4	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	5	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
T_D	1	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	2	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	3	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	4	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	5	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
T_E	1	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	2	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	3	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	4	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi
	5	Tespit Edildi	Tespit Edilemedi

Çizelge 6.6. Almanya'dan alınan yumuşak şekerleme örneklere ait sonuçlar.

Örnek		Sığır jelatini	Domuz jelatini
A_A	1	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
	2	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
	3	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
	4	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
	5	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
A_B	1	Tespit Edildi	Tespit Edildi
	2	Tespit Edildi	Tespit Edildi
	3	Tespit Edildi	Tespit Edildi
	4	Tespit Edildi	Tespit Edildi
	5	Tespit Edildi	Tespit Edildi
A_C	1	Tespit Edildi	Tespit Edildi
	2	Tespit Edildi	Tespit Edildi
	3	Tespit Edildi	Tespit Edildi
	4	Tespit Edildi	Tespit Edildi
	5	Tespit Edildi	Tespit Edildi
A_D	1	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
	2	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
	3	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
	4	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
	5	Tespit Edilemedi	Tespit Edildi
A_E	1	Tespit Edildi	Tespit Edildi
	2	Tespit Edildi	Tespit Edildi
	3	Tespit Edildi	Tespit Edildi
	4	Tespit Edildi	Tespit Edildi
	5	Tespit Edildi	Tespit Edildi

7.SONUÇ TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Doğal bir protein olması ve sahip olduğu emsalsiz teknolojik özellikler, jelatin üretim ve tüketiminin önümüzdeki yıllarda da artacağını göstermektedir. Ancak özel tercih ve hassasiyetleri olan tüketiciler için jelatin üretiminin kontrollü şartlarda yapılması ve kaynağının mutlaka sertifikalı olması büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada ilk olarak domuz ve sığır jelatinlerini birbirinden ayırt etmek için gerekli peptid dizilimlerine elektrosprey iyonizasyon tekniği ile birleştirilmiş spektroskopik yöntemler kullanılarak ulaşıldı. Domuz jelatinine ait 6, sığır jelatinine ait 7 adet peptid dizilimi elde edildi. Belirlenen peptidlerin her iki jelatin türü için ayırt edici olduğu tespit edildi. Yapılan işlemler sırasında DNA bütünlüğü bozulmadığından PCR tekniğinde karşılaşılabilecek olası muhtemel sorunlar ile karşılaşılmadı.

Tespit limiti belirlemek amacı ile sığır jelatini içerisine %10, %5, %2,5, %1, %0,5 oranında domuz jelatini ilave edilerek analizler gerçekleştirildi. Tespit limiti %1 olarak belirlendi.

Literatürler incelendiğinde çalışmalarda ekstraksiyon işlemi sırasında tripsin enzimi ilavesinden sonra enzimatik sindirimin gerçekleştiği etüvde bekleme süreleri ile ilgili farklı bilgilerin bulunduğu görüldü. Farklı bekleme süreleri ile ilgili optimizasyon çalışması yapılarak 16 saatlik bekleme süresi sonunda belirlenen ayırt edici peptidlerin pik alanlarının en yüksek değerlerde olduğu tespit edildi.

Yapılan analizler sonucunda Türkiye’de satışa sunulan yumuşak şekerlemelerde kullanılan jelatinlerde domuz jelatini tespit edilemedi. Almanya’da satışa sunulan yumuşak şekerlemelerin 10 tanesinde domuz jelatinin kullanıldığı belirlenirken 15 tanesinde domuz ve sığır jelatinlerinin beraber kullanıldığı tespit edildi.

Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında yapılması önerilen çalışmalar şu şekilde sıralandırılabilir:

- Her iki tür için belirlenen marker peptidlerinin jelatin türünü belirleme kullanılabileceği yapılan çalışma ile görülmüştür. Bunun yanından karışım içerisindeki jelatinlerin kantitatif olarak belirlenmesi için yöntemler geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için domuz ve sığır jelatininde bulunan ortak peptidlerin uzaklaştırılması gereklidir.

- Yumuşak şekerlemelerde yapılan bu çalışmanın jelatinin yoğun olarak kullanıldığı diğer gıda ürünlerinde yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Baziwane, D. and He Q., “Gelatin: The Paramount Food Additive”, *Food Rev Int.*, 19 (4): 423-435 (2003).
- Boran, G. and Regenstein JM., “Fish Gelatin, In:Advances in Food and Nutrition Research, Taylor SL(ed), *Academic Press*, UK, 60,119-144 (2010).
- Boran, G., “Bir gıda katkısı olarak jelatin: yapısı, özellikleri, üretimi, kullanımı ve kalitesi,*Gıda*, 36 (2): 97-104 (2011).
- Cottrell, J.S., “Protein identification using MS/MS data” *Journal Proteomics*,74:1842-1851 (2011).
- Skoog, D.A. and Holler, FJ. Nielman TA., “Enstrümantal Analiz İlkeleri”, Editörler: Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H. 1.Baskı.Ankara: *Bilim Yayınları*, 513-680 (2007).
- Dass, C., “Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry.”, *John Willey and Sons INC.*, 290-343 (2007).
- Doğan,F ., “ Peptidlerin Kütle Spektrometresindeki Parçalanmasına Metallerin Etkisi”, yüksek lisans, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara (2013).
- Doi, H., Watanabe, E. Shibata, H. and Tanabe, S., “A reliable enzyme linked immunosorbent assay for the determination of bovine and porcine gelatin in processed foods”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,57:1721–1726 (2009).
- Duconseille, A., Astruc, T. Quintana, N. Meersman, F. and Sante-Lhoutellier. V., “Gelatinstructure and composition linked to hard capsule dissolution”, *Food Hydrocolloids.*, 43: 360-376 (2015).
- Gelatin market by raw material (pig skin, bovine hides), by application (food &beverage, nutraceuticals, pharmaceuticals) expected to reach USD 3.18 billionby 2020, 2014. <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/gelatin-market-analysis>, (Ziyaret edilme tarihi, 21.08.2017).
- Gross JH., “Mass Spectrometry A textbook. 2nd ed.”, *Germany:Springer*, 518 (2004).
- Grundy,H.H ., Reece,P., Buckley,M., Solazza,C.M., Dowle,A.A., Ashford., Charlaton, A.J., Wadsley,M.K. and Collins,M.J., “A mass spectrometry method for the determination of the species of origin of gelatine in foods and pharmaceutical products”, *Food Chemistry*,190:276-284 (2016).
- Gui-Feng, Z., Tao, L., Qian, W., Jian-Du, L., Guang-Hui, M. and Zhi-Guo, S., “Identification of marker peptides in digested gelatins by high performance liquid chromatography/mass spectrometry”, *Chinese Journal of Analytical Chemistry.*, 36: 1499–1504 (2008).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Hanani, Z.A. Nur., “Gelatin”, *The Encyclopedia of Food and Health*, 3: 191-195 (2016).
- Haug, I.J. and Draget, K.I., “Handbook of hydrocolloids”, (Second edition) Edited by G O Phillips and P A Williams, Glyndwr University, UK. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, (173), 948 (2009).
- Hermanto, S. and Fatimah, W., “Differentiation of bovine and porcine gelatinbased on spectroscopic and electrophoretic analysis”, *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 1(3): 68-73 (2013).
- Hidaka, S. and S.Y. Liu., “Effects of gelatins on calcium phosphate precipitation: A possible application for distinguishing bovine bone gelatin from porcine skin gelatin”, *J. Food Compos. Anal.*, 16: 477-483 (2003).
- Hoffmann, E. and Stroobant, V., “Mass Spectrometry Principles and Applications. 3rd Ed.”, *John Wiley and Sons.*, England,100-101 (2007).
- <http://ull.chemistry.uakron.edu/gcms/1-MS%20detector.pdf>.,(Ziyaretedilme tarihi,20.05 2017).
- [http://www.chromatography-online.org/ion-chromatography/ion-chromatography Spectroscopy-system](http://www.chromatography-online.org/ion-chromatography/ion-chromatography-Spectroscopy-system).,(Ziyaret edilme tarihi,13.06.2017).
- http://uncw.edu/chem/documents/MSlecturafell2008312_000.ptt.,(Ziyaret edilme tarihi, 15.06.2017).
- http://turklab.org/tr/TURKLAB_Rehber_01_Rev_2pdf.,(Ziyaret edilme tarihi 15. 06. 2017).
- <http://www.msg.ucsf.edu/agard/maldi/IntrotoMS.ppt.9>.,(Ziyaret edilme tarihi, 23.06.2017).
- Hustoft, K.H and Malerod, H., “A Critical Review of Trypsin Digestion for LC-MS Based Proteomics”, Edited by Hon-Chiu Eastwood Leung *Integrative Proteomics.*, (2012).
- İşlekel, G., “LC-TANDEM MS-MRM Temel Araştırma ve Klinik Laboratuvarda Kullanımı”,**23. UlusalBiyokimya Kongresi**,Adana,sözlü sunum(2011).
- Karim, A. A. and Bhat, R., “Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as alternative to mammalian gelatins”, *Food Hydrocolloids*, 23: 563–576 (2009).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Karim, A.A. and R. Bhat., “Gelatin alternatives for the food industry: Recent developments, challenges and prospects”, *Trends Food Sci. Technol.*, 19: 644-656 (2008).
- Kauschke, S.G., Knorr A. and Heke, M., “Two assays for measuring fibrosis: reverse transcriptase-polymerase chain reaction of collagen alpha(1) (III) mRNA is an early predictor of subsequent collagen deposition while a novel serum Nterminal procollagen (III) propeptide assay reflects manifest fibrosis in carbon tetrachloride-treated rats”, *Anal. Biochem.*, 275: 131–140 (1999).
- Kitson F.G and Larsen B.S., “Gas Chromatography and Mass Spectrometry. 4th Ed. “*Academic Pres.*, California, 3-20 (1996).
- Koçak, K, “Tüketime Sunulan Yoğurtlarda Bazı Katkı Maddelerinin (Nişasta, Jelatin, Natamisin) Kullanımı ve Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesine Yönelik Piyasa Araştırması” Yüksek Lisan Tezi, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Afyon (2013).
- Lee, M., “Basic Skills in Interpreting Laboratory Data. 4th Ed.” *American Society of Health- System Pharmacists.*, USA, 621 (2009).
- Marvin, C.M., “GC MS: A Practical User’s Guide. 2nd ed.” *John Wiley and Sons.*, New Jersey, 8-10 (2007).
- Nemati, M., Oveisi, M., Abdollahi, H. and Sabzevari, O., “Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, 34: 485–492 (2004).
- Nhari, R.M.H.R., A, Ismail. and Y.B, Che Man., “Analytical methods for gelatin differentiation from bovine and porcine origins and food products”, *J. Food Sci.*, 71: 42-46 (2012).
- Rebekah, L. and Gundry, R.L., “Preparation of Proteins and Peptides for Mass Spectrometry Analysis in a Bottom Up Proteomics Workflow”, *Curr Protoc Mol Biol.*, (2009).
- Sarah, S.A., Faradalila, W.N., Salwani, M.S., Amin, I., Karsani, S.A. and Sazili, A.Q., “LC-QTOF-MS identification of porcine-specific peptide in heat treated pork identifies candidate markers for meat species determination”, *Food Chemistry.*, 199:157-164 (2016).
- Sawhney, R.S., “Immunological identification of types I and III collagen in bovine lens epithelium and its anterior lens capsule”, *Cell Biol. Int.*, 29 :133–137 (2005).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- Schrieber, R. and Gareis, H., “Gelatine Handbook. Theory and Industrial Practice”, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*, 335 (2007).
- Shabani, H., Mehdizadeh M., Mousavi,S.M., Ehsan Dezfouli ,E.A..Solgi , T.. Khodaverdi., M.. Rabiei ,M.. Rastegar,H. and Alebouyeh,M., “Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR” , *Food Chemistry*, 184: 203–206 (2015).
- Skoong D.A and West D.M., “Principles of Instrumental Analysis”, Ed. (1981).
- Skoong D.A. and Holler F.J.“Enstrümantal Analiz İlkeleri”, Editörler: Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H. 1.Baskı. *Bilim Yayınları*, Ankara, 513-680 (2007).
- Solomons G. and Fryhle C., “Organic Chemistry”, Eighth Edition, *Solomons & Fryhle Wiley Student Edition*., United States of America (2004).
- Steen,H.and Mann M., “The ABC’s (and XYZ’s) of Peptide Sequencing”,Nature Reviews, *Molecular Cell Biology*, 5: september (2004).
- Tasanen, K., Palatsi, R. and Oikarinen, A.,” Demonstration of increased levels of type I collagen mRNA using quantitative polymerase chain reaction in fibrotic and granulomatous skin diseases”, *Br. J. Dermatol.*, 139: 23–26 (1998).
- Venien, A. and Levieux, D., “Differentiation of bovine from porcine gelatines using polyclonal anti-peptide antibodies in indirect and competitive indirect ELISA”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39:418–424 (2005).
- Watson, J.T. and Sparkman, O.D. “Introduction to Mass Spectrometry.4th Ed. England”, *John Wiley and Sons* (2008).
- Widyaninggar, A., Triwahyudi., Triyana, K. and Rohman, A., “Differentiation between Porcine and Bovine Gelatin in Capsule Shells based on amino acid profiles and Principal Component Analysis”, *Indonesian J. Pharm.*,23(2):104-109 (2012).
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F. and Williams, K.L., “Progress with proteom projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it”, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13:19-50 (1995).
- Williams PA (ed)., “Handbook of Industrial Water Soluble Polymers.” *Wiley-Blackwell, USA*, pp. 75-76 (2007).
- www.grandviewreserch/industry-anaysis/gelatin-market-analysis.,(ziyaret edilme tarihi, 10,04.2017).
- www.matrixscience.com/help/aa-help.html.,(Ziyaret edilme tarihi 01.03.2017).

KAYNAKLAR (Devam ediyor)

- www.erzurum.edu.tr/Arzu-GORMEZ/MKYS_II-716323.pdf,(Ziyaret edilme tarihi 0904.2017).
- Xian-Long, C., Feng, W., Jia, C., Ming-hua, L.Lei ,Z. Ying-Yong, Z. Xin-Yue, X. Shuang-cheng ,M. and Rui-Chao, L., “Identification of five gelatins by ultra performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS) using principal component analysis”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.. 62:191-195 (2012).
- Xian-Long ,C., Feng, W. Jia, C. Ming-hua, L. Lei ,Z. Ying-Yong, Z. Xin-Yue, X. Shuang-cheng ,M. and Rui-Chao, L., “Using the Doubly Charged Selected Ion Coupled with MS/MS Fragments Monitoring (DCSI-MS/MS) Mode for the Identification of Gelatin Species” , *Hindawi Publishing Corporation Journal of Analytical Methods in Chemistry*., 7 (2014).
- Yetim,H.. “Jelatin üretimi, özellikleri ve kullanımı”, *1.Ulusal Helal ve Sağlık Kongresi*, Ankara,sözlü bildiri (2011).
- Yilmaz, M. T., Kesmen, Z., Baykal, B., Sagdic, O., Kulen, O.and Kacar, O., “A novel method to differentiate bovine and porcine gelatins in food products: NanoUPLC-ESI-Q-TOF-MSE based data independent acquisition technique to detect marker peptides in gelatin”, *Food Chemistry*., 141: 2450–2458 (2013).
- Zhang, G. and Liu, T., “Mass spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin: a new method to differentiate between bovine and porcine gelatin”, *Food Hydrocolloids*, 23(7): 2001–2007 (2009).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler



Adı Soyadı : Filiz ÇAVUŞ

Doğum Yeri ve Tarihi : 1976 – Bursa

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi– Kimya Mühendisliği

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

Bilimsel Faaliyetleri :

-Makaleler ve Bildiriler

- 1.Naturel sızma zeytinyağlarının coğrafi orijinlerinin headspace katı faz mikroekstraksiyon ve GC QTOF-MS kullanılarak kemometrik belirlenmesi-8.Ulusal Kimya Kongresi-2016 ISPARTA poster sunumu
2. Naturel sızma zeytinyağlarının coğrafi orijinlerinin HPLC-ESI-QTOF-MS kullanılarak kemometrik belirlenmesi-8.Ulusal Kimya Kongresi-2016 ISPARTA poster sunumu
- 3.Jelatin orijininin LC QTOF kullanılarak kemometrik olarak belirlenmesi-10.Gıda Mühendisliği Kongresi Antalya 2017-Antalya
- 4.Gıdalarda coğrafi orijinin belirlenmesine yönelik analiz yöntemleri-Sözlü Bildirim-10.Gıda Mühendisliği Kongresi Antalya 2017-Antalya

Yer Aldığı Projeler

- 1.Zeytinyağı duyuusal test laboratuvarı kurulması-BEBKA projesi 2014 (araştırmacı)
- 2.Naturel sızma zeytinyağlarında farklı malaksasyon parametrelerinin fenolik bileşikler,duyuusal özellikler,ransimat değeri üzerine etkisi-TAGEM- 2016 (araştırmacı)

- 3.Bazı Frenk üzümü çeşitlerinin kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi ve gıda katkı maddesi olarak kullanılabilirliğinin araştırılması-devam ediyor TAGEM-2016 (araştırmacı)
- 4.Badem ve fındıktaki alerjenlerinin proteomiks tekniği kullanılarak tespiti ve ısıtma işlemi sonrası alerjenlerini stabilitesinin araştırılması-devam ediyor TAGEM 2017 (araştırmacı)
- 5.Etilen ve karbondioksit uygulaması ile yeni sofralık siyah zeytin üretim yöntemlerinin geliştirilmesi-devam ediyor TAGEM 2017 (araştırmacı)
- 6.Farklı ön işlemler uygulanarak mikrodalga kurutucuda yeşil ve siyah sofralık zeytin üretimi ve ürün kalitesinin belirlenmesi-devam ediyor TAGEM 2017 (araştırmacı)
- 7.Türkiye’de üretilen ve ticari potansiyeli olan bazı monofloral balların parmak izlerinin belirlenmesi;Kimyasal içerikleri ile tıbbi aktivitelerinin araştırılması ve standardizasyonları-TAGEM-Ar-Ge Destek programı 2017(araştırmacı)
- 8.Farklı doğal kaynaklardan elde edilen biyoaktif ekstraktların enkapsüle edilerek margarinlerde antifungal etkilerinin incelenmesi- TAGEM-Ar-Ge Destek programı 2017 (araştırmacı)

İş Deneyimi

Stajlar : Sifaş Tekstil A.Ş

Çalıştığı Kurumlar :

Trabzon İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü 2004-2005

Çorum İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü 2005-2007

Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü 2007-halen

İletişim

Adres : Altınşehir mah.Abdi İpekçi Cad.Bulutpark Evleri C Blok D:7 Nilüfer/BURSA

Tel : 505 3486254

E-Posta Adresi : filiz.cavus@tarim.gov.tr