T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

Çeşitli Gıda Formülasyonlarında Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Jelatinin Orijininin UPLC-MS QTof MS Sistemi Kullanılarak Tespitine Yönelik Yöntem Geliştirilmesi

Proje No: FBA-10-2895

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Hasan YETİM
Mühendislik Fakültesi/ Gıda Mühendisliği Bölümü

Doç. Dr. Zülal KESMEN
Uzm. Ahmet E. YETİMAN
Mühendislik Fakültesi/ Gıda Mühendisliği Bölümü

Nisan 2014
KAYSERİ

ÖZET

Bir hayvansal bağ dokusu ürünü olan jelatin, gıda ve ilaç sanayiinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Jelatinin hammaddesi, domuz ve sığır gibi hayvanların derisi ve kemiklerini içine alan kesimhnane yan ürünleridir. Dünya jelatin üretiminde ham maddenin % 46'sını domuz derisi, % 28'ni sığır derisi oluştururken, Avrupada hammaddenin %69'nu domuz ve %10'nu sığır derisi ve %19'u ise hayvan kemiklerinden temin edilmektedir. Ülkemizde, jelatin üretimi oldukça yeni olup, üretilen jelatin ihtiyacın ancak çok küçük bir bölümünü karşılamaktadır. Bu nedenle ithal olarak ülkemize hala yılda 1500-2000 ton jelatin girmektedir. Bu durum pek çok gıda ürününde yaygın kullanımı olan jelatinin orijini ile ilgili sorunların yaşanmasına neden olmakta ve dolaysıyla katkı maddesi olarak kullanılan jelatinin orijinini belirlemeyi zorunlu hale getirmektedir. Ancak bugün jelatinin orijininin hassas bir şekilde tespitine yönelik herhangi bir yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle ülkemize ithal edilen jelatinin orijininin, kontrolünü yapma imkanı olmadığı gibi çeşitli gıda ürünlerinde kullanılan jelatinin hangi hayvan türüne ait olduğu da tespit edilememektedir. Bu durum üreticileri zor durumda bıraktığı gibi, tüketicilerde de jelatin içeren ürünlere karşı endişe ve güvensizlik oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu amaca yönelik hassas ve güvenilir analitik metotların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla bu proje kapsamında çeşitli gıda ürünlerinde jelatinin orijininin tespiti amacıyla yeni bir proteomik yaklaşım olan nanoUPLC-ESI-qTOF-MS^E tekniğine dayalı bir yöntem geliştirilmiştir. İki aşamada gerçekleştirilen metodun, ilk aşamasında gıda örneklerinden jelatin ekstraksiyonu yapılmış, ikinci aşamada ise ekstrakte edilen jelatin, triptik peptidlere ayrıştırılmış ve nanoUPLC-ESI-qTOF-MS^E ile analiz edilmiştir. Sonuçta proje kapsamında geliştirilen yöntem ile gıdalarda bulunan domuz veya sığır orijinli jelatinin %0.1 seviyesine kadar tayin edilebileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar Sözcükler; Jelatin, orijin, tür tayini, nanoUPLC-MS-qTOF-MS^E, gıda katkı maddesi,

ABSTRACT

Gelatin is primarily an animal connective tissue product and has a wide range of applications in the food and pharmaceutical industries. Raw materials for gelatin production come from slaughterhouse by-products of various food animal species, including hide splits and bones of cattle and pig. Gelatin has not been produced in Turkey and being imported from the following countries; Germany, Italy, France, Kore, Japan, Canada, USA, Brazil, India, China and Pakistan. But, some religious beliefs do not accept the use of porcine gelatin in human consumption. In other respects the outbreak of BSE in the United Kingdom in 1986 and its extension to other countries have led the regulatory authorities to make restrictions to the use of bovine gelatin for human consumption, cosmetic and pharmaceutical products. Therefore, it became necessary to develop an analytical method to control the species origin of the gelatin. To support such edible gelatin documentation, sensitive and reliable analytical methods for determining the species origin of gelatin are important. At present such quality control measures do not exist for gelatin analysis. For this reason, nanoUPLC-ESI-qTOF-MS^E workflow technique of novel proteomic approachs was used for analysis of gelatin from foods. The technique was performed in two steps . In the first step, gelatin was extracted from products before the MS-sample preparation. In the second step, tryptic gelatin peptides were seperated and analyzed with nanoUPLC-MS-qTOF-MS^E workflow tecnhique. The Analysis results reveal that the method colud be an effective to differentiate porcine and bovine gelatin from the food products.

Keywords: Gelatin, species identification, origin, food additive, nanoPLC-MS-qTOF-MS^E

TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine, , projemize verdiği destekten ötürü, teşekkürü bir borç biliriz.

Prof. Dr. Hasan YETİM

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET……	ii
ABSTRACT…….	iii
1. GİRİŞ ……..	1
2. GENEL BİLGİLER……..	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM ……...	12
4. BULGULAR …….……...…..	18
5. TARTIŞMA VE SONUÇ …...…….	26
6. KAYNAKLAR…….	28

1.GİRİŞ

Jelatin sığır ve domuz gibi hayvanların bağ dokularından ekstrakte edilen kollojenin kısmi hidrolizi ile üretilen bir proteindir. Kollajen moleküllerinin en çarpıcı özelliği, amino asit dizisinin tekrarlayan tripeptit olmasıdır. Bu tekrarlayan tripeptit, Glisin−X−Y şeklinde gösterilebilir ve burada X ve Y genellikle prolin ve 4-hidroksi prolindir. Jelatinin bu yapısı ona yumuşak, elastiklik ve sıcaklığa bağlı tersinir olarak jel oluşturma gibi eşsiz özellikler kazandırır. Memeli hayvanlardan elde edilen jelatinin yapısındaki amino asitlerin yaklaşık %21'i prolin ve hidroksiprolin içerirken daha düşük jelleşme kapasitesine sahip soğuk su balıklarına ait jelatinlerde bu oran %17'dir (Ward, 1958; Veis, 1964).

Jelatinin primer yapısı ile ilgili diğer bir önemli konu yüksek miktarlarda bazik (lisin %2.5, arginin %5) ve asidik (glutamik asit %7.2, aspartik asit %4.7) amino asit içermesidir. Bu nedenle yapısında %80 oranında non-polar amino asit bulunan jelatinin alfa zinciri boyunca ona emulsifer özellikler kazandıran non-polar bölgeler mevcuttur (Cole, 2001).

Jelatinin bu farklı molekül yapısı, ona ortam sıcaklığı veya iyon yükündeki değişmeler gibi denatürantlardan neredeyse hiç etkilenmeme gibi özellikler yanında pek çok fonkisyonel özellik kazandırır. Örneğin; katılaştırma ve /veya su bağlama: kollojen denatüre olduğu zaman alfa zinzirindeki heliksel bölgeler kısmi olarak şekil değiştirir ve tipik "jelatin jel" olarak tanımlanan üç boyutlu su tutma ağlarını oluşturur. Mükemmel bir elastikiyet ve yumuşaklığa sahip bu jel, sıcaklığa bağlı olarak tersinir bir özellik gösterir. Diğer taraftan jelin katılaşması zamana bağımlıdır ve tam jel kuvvetinin oluşumu yaklaşık 16 saat sürebilir. Bu jelin oluşumu ve erimesinin yavaş olduğu anlamına gelir ve jelatinin bu özelliğinden dondurma gibi ürünlerin stabilize edilmesinde yararlanılır (Baziwane and He, 2003).

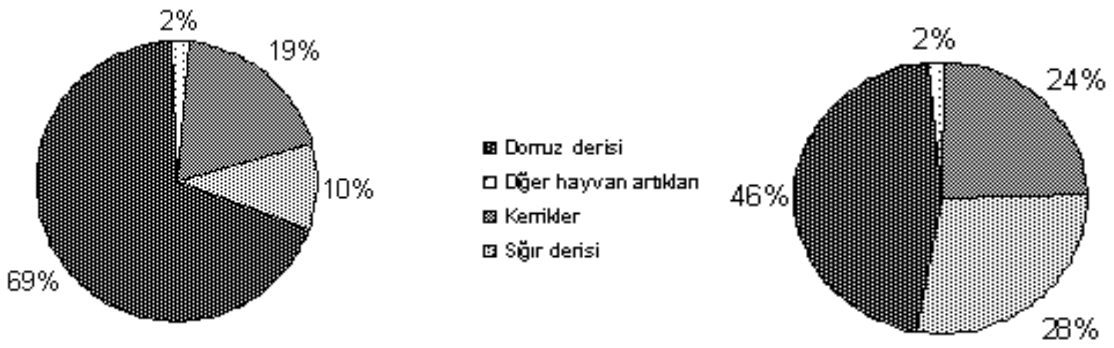
Köpürme: pek çok protein gibi jelatin de köpük oluşturma ve su içerisinde emulsifikasyon özelliği gösterir. Jelatinin köpük oluşturma özelliği film oluşturma özelliği ile kombine edilerek marshmallow üretimi gerçekleştirilir (Cole, 2001). Emulsifier: protein zincirinin non-polar kısmı nedeniyle jelatin yağ içinde su emülsiyonu oluşturma yeteneğine sahiptir ve bu özelliğinden dolayı süt ürünlerinde termal denatürasyon nedeniyle emülsifier özelliklerini kaybeden doğal süt proteinlerinin yerini alır (Kobayashi, 1996).

Kristalizasyona karşı koloidal koruma: jelatin kristalizasyonu kolloid oluşturarak önleme özelliğine sahiptir. Bu etki sayesinde buz şekeri ve dondurma üretiminde buz kristallerinin çok küçük olması sağlandığı gibi laktozun yavaş kristalizasyonu nedeniyle taneli bir yapı oluşumu da engellenir (Cole, 2001).

Jealtinin sayılan bu fonksiyonel özelliklerinden çok amaçlı bir gıda katkı maddesi olarak geniş ölçüde faydalanılmaktadır. Tablo 1.'de jelatinin fonksiyonel özellikleri ve bu özelliklerinden faydalanmak amacıyla katkılandığı gıda maddeleri özet halinde verilmiştir.

Yukarıda sayılan fonksiyonel özelliklerinin dışında jelatin beslenme açısından da önem arz etmektedir. Örneğin insan vücudu tarafından kolaylıkla ve tamamen sindirilebilir bir protein olan jelatin vücudumuz için gıdalarla alınması gereken 20 adet temel amino asitten dokuzunu içerir. Diğer taraftan jelatinin gıdalarla alınan diğer proteinlerle kombinasyonu bunların toplam biyolojik değerini arttırmaktadır (Baziwane and He, 2003).

Jelatinin sağlık açısından önemi özellikle osteoartritis denilen eklem rahatsızlıklarındaki olumlu etkisiden ileri gelmektedir. Bu rahatsızlık kemikler arasındaki kıkırdak dokusunun bozulması sonucu ortaya çıkmakta ve özellikle omuz, kalça ve diz eklemlerinde ağrılara neden olmaktadır. Kıkırdak dokusunun yeniden oluşturulması için kollajen gerekli bir maddedir. İnsan vücudu tarafından kollajenin oluşturulması için temel iki amino asit olan glisin ve prolince zengin bir kaynak olan jelatinin, kemik ve eklem sağlığının korunmasındaki olumlu etkisi klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır. (Adam, 1991). Ülkemizde ise yılda 5000 ton civarında jelatin kullanılmakta ve bunun da neredeyse tamamı ithal edilmektedir. İthalatın yapıldığı ülkelere arasında ise, Almanya, İtalya, Fransa,Kolombia, Kore, Japonya, Kanada, ABD, Brezilya, Hindistan, Çin, Pakistan' ın da içinde bulunduğu pek çok ülke yer almaktadır. Dünya jelatin üretimi 2006 yılı itibari ile yaklaşık 315.000 ton olup, üretimde kullanılan ham maddelerin % 46'sı, Avrupa jelatin üretiminde ise hammaddenin %69'nu domuz derisinden temin edilmektedir (Şekil 1). Türkiye'de 2008 yılında Uşak'ta Türkjel adında bir jelatin fabrikası kurulmuş ancak henüz daha üretime başlayamamıştır. Ülkemizde başarılı bir teşebbüs olarak Balıkesir Gönen de kurulan Seljel firmasının 2010 yılında sığır derisinden jelatin üretimine başladığı ve yaklaşık 2000 ton/yıl kapasite ile çalıştığı anlaşılmaktadır (Yetim, 2011).



Avrupa Jelatin Üretimi Dünya Jelatin Üretimi

Şekil 1. 2006 yılı Dünya ve Avrupa jelatin üretiminde hammade dağılımı (http://www.gelatine.org/en/gelatine/overview/127.htm).

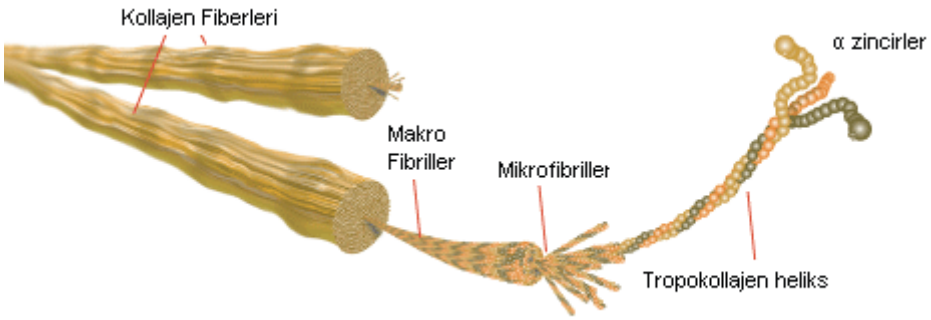
Diğer hayvansal kökenli ürünlerde olduğu gibi; inanç ve kültürel değerler yönünden tüketiciler tarafından tercih edilmeyen, sağlığa zararlı veya yasal olmayan hayvansal kaynaklı katkılamalardan tüketicileri korumak, gıda ürünlerinde kullanılan jelatinin orjinini tespit etmeyi zorunlu hale getirmiştir. Örneğin müslüman ve yahudi toplumlarında çeşitli gıda ürünlerinde domuz orjinli, deli dana hastalığının (BSE) bulunduğu ülkelerde ise sığır orjinli hammadde kullanılma ihtimali tüketicilerde endişe oluşturmuştur. Öyleki 1989 da ABD'nin Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) Deli Dana Hastalığı görülen ülkelerden sığır ithalatını yasaklamış, ancak, 1994'te FDA'nın bir kararı ile eczacılık kalitesindeki jelatinin üretiminde kullanılan kemik ve dokuların ithaline izin verilmiştir. Nitekim yenilebilir jelatinin kalite ve güvenliğini temin etmek amacıyla Avrupa Birliğinin 1999/724/EC nolu direktifinde insan tüketimine uygun hayvanlardan elde edilen hammaddeden üretildiğinin belgelenmesini de içine alan jelatin üretimindeki temel kurallar tanımlanmaktadır (Anonymous, 2005). 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 jelatinin orijininin belirlenmesi ve mutlaka sertifikalı olması büyük önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Kollajen, insan ve hayvan organizmalarında en çok bulunan proteinlerinden biridir ve toplam proteinlere oranı yaklaşık % 60'dır. Globüler proteinlerin aksine, doğrusal fiber benzeri bir yapıya sahip olan kollajen moleküllerinin en belirgin özelliği, üç polipeptid alt biriminden oluşan büklümlenmiş kangal şeklindeki üçlü sarmal yapılarıdır. Kollajen proteinin yapı taşları sayılan ve polipeptid alt birimlerden oluşan α-zincirler, bir ortak eksen etrafında dönerek 3000 A^o uzunluğunda ve 15 A^o çapında katı bir çubuk benzeri moleküller oluştururular. Bu zincirler, mikro fibrilleri, mikro fibriller makro fibrilleri ve daha sonra da makro fibriller bir araya gelerek kollajen fiberlerini meydana getirirler (Şekil 1). Kollajen tek bir çeşit protein değildir, bugüne kadar, 27 farklı tipte kollajen tespit edilmiştir. Bunlardan en yaygını olan Tip I kollajendir ve daha çok deri, kemik ve tendon gibi bağ dokularında bulunur. Tip II kollajen, özellikle kıkırdak dokuda bulunmaktadır. Tip III kollajen ise yaşa bağlı olarak büyük değişiklik gösteren bir proteindir. Diğer kollajen tipleri ise çok küçük miktarlarda bulunur ve genellikle organdan organa farklılık gösterirler (Schrieber and Gareis, 2007; Aberle et. al., 2001; Yetim, 2011).

Diğer proteinler gibi, kollajen de primer, sekonder ve tersiyer yapılara sahiptir. Kollajen proteinin yapı taşı olarak bilinen tropokollajen birimleri 3 farklı primer polipeptit zincirinin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Örneğin, jelatin üretiminde kullanılan Tip I kollajende, 1014 adet

aminoasidin bir araya gelmesiyle meydana gelmiş 3 polipeptit yer almaktadır ve herbir polipeptit zincirinin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 100 000 g/mol'dür. Polipeptit zincirlerindeki glisin (Gly), tek başına aminoasit kompozisyonunun %33'ünü, prolin ve hidroksiprolin ise %22'sini meydana getirmektedir. Bu nedenle alfa (α) zincir olarak da adlandırılan bu yapı, Gly-X-Y dizilimin 334 kere tekrarlanması ile meydana gelmiştir, burada X ve Y çoğu kez prolin ve hidroxiprolin olmakla birlikte başka herhangi bir amino asit de olabilir. Ancak sadece N- ve C- terminal uçlarında bu genel yapıya uymayan ve 15-26 adet aminoasitten meydana gelmiş kısa zincirler de bulunmaktadır. Glisin, prolin ve hidroksiprolin ile diğer amino asitler arasında oluşan H bağları, kollajen moleküllerinin kendine has sağlamlıkta bir yapı kazanmasını sağlamaktadırlar. İşte bu aminoasitler, polipeptid zincirinin rotasyonunu sınırlayarak üçlü sarmal yapının kararlı hale gelmesini sağlarlar. Tip I kollajendeki ikisi birbirine özdeş üç α-zincirden oluşan sarmal yapı, tropokollajen olarak adlandırılır ve kollajen proteinin yapıtaşını oluşturmaktadır. Hayvanın yaşına ve bulunduğu dokuya bağlı olarak bu α-zincirler ve tropokollajen molekülleri arasında (molekül içi ve moleküller arası) lisin ve hidroksilisin çapraz bağları oluşmakta, bu oluşumlar hep beraber kollajen fibrili adı verilen dayanıklı yapıyı meydana getirmektedir. Kollajen, bu sağlam ve kararlı yapısını, fibriller arasındaki bu çapraz bağlara borçludur ki; bu çapraz bağ yapıları da kovalent bağlar şeklindedir. Birçok kollajen fibrili yine bu çapraz bağlar sayesinde bir araya gelerek, deri, kemik, tendon gibi dokuların temel yapısını oluşturmaktadır (Schrieber&Gareis, 2007; Yetim 2011).



Şekil 2. Kollajen proteinin moleküler organizasyonu (Yetim 2011)

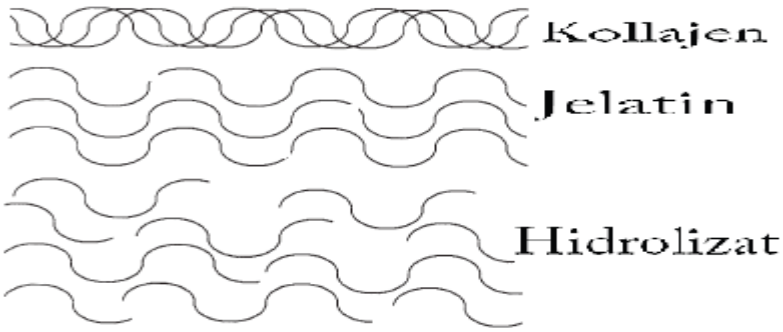
2.1. Jelatin

Jelatin, sığır ve domuz gibi hayvanların bağ dokularından ekstrakte edilen kollajenin kontrollü şartlarda kısmi hidrolizi ile üretilen bir proteindir. Bu işlemle moleküller arasındaki H bağları ve diğer çapraz bağlar zayıfladığı gibi bazı amino asitler arasındaki kovalent bağlar da kopar ve daha küçük moleküllü yapılar ortaya çıkar (Boran, 2011; Yetim, 2011). Böylece, ortalama 300-350 kDa olan kollojen molekülünün ağırlığı, jelatinde 10-65 kDa'a kadar düşmektedir. Jelatinin protein içeriği %85-92 arasında değişir ve jelatini oluşturan diğer maddeler ise mineral tuzlar ve kurutma

işlemi sonrasında bile mevcudiyetini sürdüren sudur. Jelatin, kollajen gibi sıradan bir molekülün nasıl çok fonksiyonlu bir yapıya dönüşebileceğine dair gösterilebilecek en güzel örneklerden biridir. Jelatinin kalitesi, üretimde kullanılan hammaddenin kalitesi ve üretim tekniği ile yakından ilgilidir. Amino asit içeriği bakımından, A tipi jelatin ile kollajen hemen hemen birbirinin aynıdır. B tipi jelatinde ise glutamin ve asparajin amino asitlerinin neredeyse tamamı glutamik asit ve aspartik asite dönüşmüştür. Yine kollajen ve dolayısıyla jelatin içerisinde, triptofan hiç yoktur ve metiyonin, sistin ve tirosin amino asitlerinin oranı ise yok denecek kadar azdır. Jelatin, bu yönü ile iyi bir besleyici özelliğe sahip değildir ancak su tutucu, kıvam artırıcı, jelleştirici, yapıştırıcı, taşıyıcı gibi özellikleri nedeniyle bir çok alanda tercih edilen bir hidrokolloiddir (Ockerman and Hansen, 1988; Yetim, 2011).

2.2. Jelatin üretim aşamaları ve meydana gelen değişimler

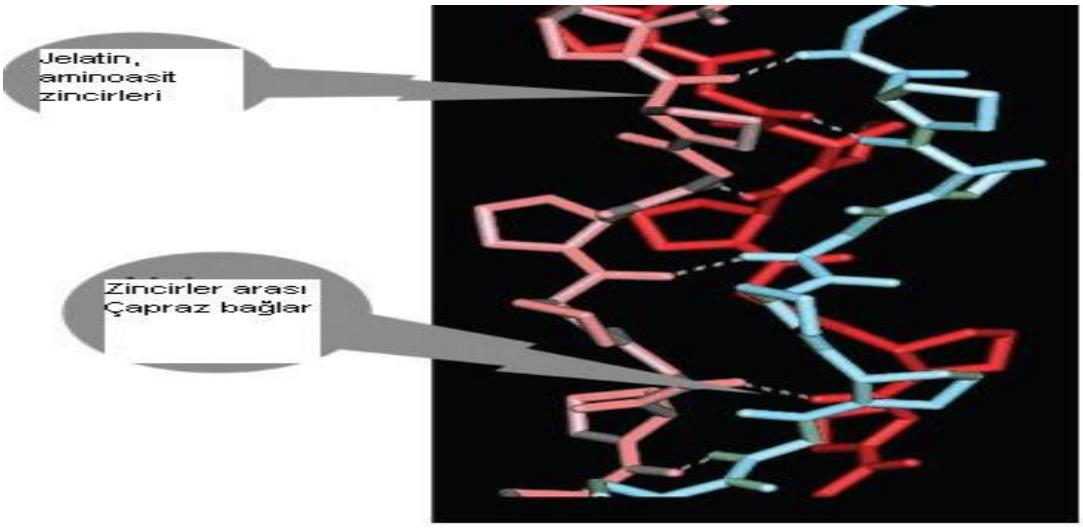
Jelatin üretiminde, hayvansal dokular, asit ya da alkali çözeltilerle muamele edildiği için, kollajenin yapısındaki H bağları ve çapraz bağlar kısmen yıkıma uğramakta ve moleküller de parçalanabilmektedir. Diğer bir anlatımla, uzun amino asit zincirleri parçalanarak daha kısalaşırken aralarındaki bağlar da zayıflamakta ve su molekülleri kolayca fibrillerin arasına girebilmektedir (Şekil 2). Böylece, ılık suda bile çözünebilen yeni bir yapı meydana gelmekte, ortaya çıkan bu çözünür yapıya da jelatin adı verilmektedir. Enzimler de bazen bu kimyasal maddelerle birlikte veya bu maddelere alternatif olarak kullanılabilmektedirler. Ancak burada yalnızca bazı özel enzimler kullanılmaktadır; çünkü proteini hidrolize edebilen birçok enzim, kollajeni parçalayamamaktadır. Sadece spesifitesi çok yüksek kollajenaz enzimleri, doğal kollajeni parçalayabilir. Bu şekilde kimyasal veya biyokimyasal denatürasyon (hidroliz) metotları kullanılarak kollajenin muamele edilmesi işlemine, jelatin endüstrisinde "kondisyonlama" adı verilmektedir (Schrieber&Gareis, 2007; Yetim, 2011). Bu yöntemle elde edilen ürünlere de jelatin hidrolizatları denilmektedir ve gıda endüstrisinin bir çok alanında bu tür ürünlerden de faydalanılmaktadır (Şekil 2).



Şekil 3. Kollajen ve jelatinin şematik görünümü (4).

2.2.1.Ön muamele (asit veya alkali uygulama)

Deri, kemik gibi kollajence zengin hammaddeler, asit veya baz ile muamele (Şekil 3) edildiğinde, kollajenin yapısında bulunan kovalent olmayan bağlar parçalanır ve proteinler hidrolize olur. Bu da kollajen molekülünün yeterli düzeyde su alarak şişmesine ve böylelikle çözünürlüğünün artmasına yol açmaktadır (Stainsby, 2011; Gomez Guillen et. al., 2011). Asitle ön muamele işlemi, daha çok kemiklerden üretileçek jelatinlerde kullanılır ve bu ürüne Tip A jelatin denir. Asitle jelatin üretiminde, yıkanarak temizlenen ve yağlarından ayrılan ham madde, bir mineral asit (pH~ 1.5-3.0) çözeltisine (H2SO4, HCl vb) daldırılarak 10 ila 72 saat (genel de bu süre 24-48 saat civarında) arasında bekletilir. Bu bekletme süresi, işlem gören hammaddenin kalınlığına ve boyutuna bağlı olarak değişir (Haug and Draget, 2009). Bu süre içerisinde ham materyal, başlangıçtaki hacminin 2-3 kat kadar şişer (Ledward, 2000) ve kollajen proteini çözünür. Daha sonra, asit çözeltisi ortamdan uzaklaştırılır ve ekstraksiyon için arzu edilen pH seviyesine (4-5) kadar bir alkali ile nötralizasyon yapılır (Haug and Draget, 2009). Böylece, seçilen isoelektrik nokta sayesinde kollajen yapısında olmayan diğer safsızlıklar ve çözünür hale gelmiş tuzlar su ile kolayca yıkanarak kollajenden ayrılır (Ockerman and Hansen, 1988, Yetim, 2011).



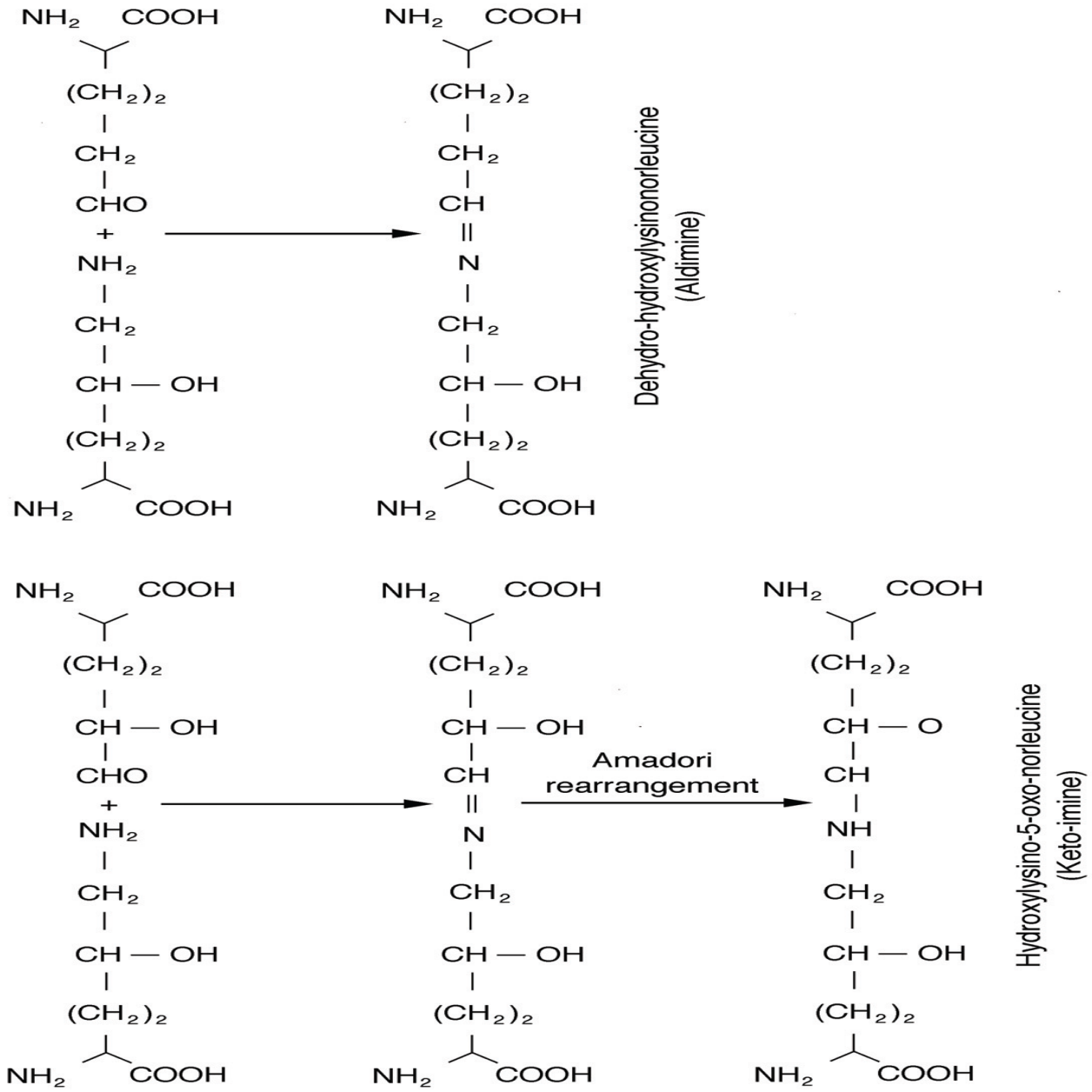
Şekil 4. Kollajende bulunan α-zincirler ve çapraz bağlar.

Alkali ile ön muamele işlemi sonucunda ise, Tip B türünde jelatin elde edilir ve ticari olarak üretilen jelatinin büyük bir bölümü bu yolla üretilmektedir. Bu işlemde farklı tipte alkali ajanları kullanılabilir, ancak kireçle hazırlanan kalsiyum hidroksit [$Ca(OH)_2$, pH 12.0] çözeltisi kullanılan en yaygın alkali çözeltisidir. Önceden yıkanmış, bağ doku harici dokulardan (et, yağ, kan, kıl vb) temizlenmiş hammadde, doku ağırlığının yaklaşık % 10 oranında kireç ile hazırlanan $Ca(OH)_2$ çözeltisi ile dolu tekne veya fıçılara konularak uzun bir süre bekletilir. Bu işlem sırasında sıcaklık 24ºC'nin altında tutulur ve belirli aralıklarla hammadde uygun bir alet yardımıyla karıştırılır. Bu bekletme süresi, $Ca(OH)_2$ konsantrasyonu, sıcaklık ve işlem gören hammaddenin

özelliğine/boyutlarına bağlı olarak değişebilir. Dolayısıyla, en az 10 gün ve en fazla 6 ay olmakla birlikte bu süre, genellikle 2-3 aydır. Alkali çözelti içerisinde bekletme esnasında kollajen fibrilleri şişer, aralarındaki çapraz bağlar zayıflar ve moleküllerde kısmi bir depolimerizasyon (parçalanma) meydana gelir. Yine kollajen harici diğer protein vb safsızlıklar ise suda daha çözünür hale gelir ve yıkama suyu ile kolaylıkla uzaklaştırılabilirler (Ockerman and Hansen, 1988). Bu süre sonunda, ham madde tekneden çıkarılır; musluk suyu altında yıkanarak üzerindeki kireç kalıntıları ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılır. Daha sonra alkalik hammadde, seyreltik bir asit çözeltisi (örneğin HCl) ile ekstraksiyon için gerekli asitlik (pH 6-7,5) seviyesine ulaşana kadar nötralize edilir (Haug and Draget, 2009). Alkali ile muamele işlemi sonucunda, iyonlaşmamış durumdaki glutamin ve asparajin rezidüleri, asidik formlarına dönüşür; bu reaksiyondan amonyak açığa çıkar ve elde edilen jelatin asidik özellikte olur (Tablo 1). Böylelikle B tipi jelatinin izoelektrik noktası 4.8-5.5 arasında iken A tipi jelatininki 8.5–9.4 arasındadır. İzoelektrik nokta, proteinlerin yük olarak nötral (+ ve – yüklerin eşit) olduğu pH'dır.

2.2.2. Ekstraksiyon işlemi

Yukarıda anlatıldığı gibi asit veya alkali ile ön işleme tabi tutulmuş hammadde, ekstraksiyon kazanlarına konulur ve üzeri sıcak su ile örtülür. Sıcak su ile muamele işlemi, ard arda birkaç aşamada (genelde 5-10 kez) uygulanır; ancak her aşamada su sıcaklığı bir önceki aşamadakinden daha yüksek tutulur. Yani başlangıçtaki su sıcaklığı 55ºC iken, en son aşama kazanındaki su sıcaklığı yaklaşık 100ºC'dir (Haug and Draget, 2009). Her bir aşamadaki ekstraksiyon süresi ise 4 ile 8 saat arasında değişmektedir (Ledward, 2000). Her bir ekstraksiyon aşamasından sonra, jelatin daha ileri derecede parçalanır ve rengi daha koyu olur. Bu aşamada, elde edilen jeatinin kalitesi, sıcaklık ile ters orantılıdır, bu nedenle her sıcaklık aşamasında elde edilen partinin kalitesi ayrıdır. Sıcaklık artırılmaz ise de ekstraksiyon olmaz veya verim düşer. Ekstraksiyon sonrası jelatinin kül içeriği, % 2-3 arasında değişmektedir, ancak arzu edilirse kül içeriği, ion-değiştiricilerle azaltılabilir.



Şekil 5. Kollajen molekülünde bulunan indirgenebilir "aldimine ve keto-imine" çapraz bağlarının oluşumu.

Glisin aminoasidinin miktarı diğer tüm aminoasit rezüdilerinin neredeyse 1/3'ü, prolin ve OH-prolinin miktarı ise 1/5'i kadardır (Tablo 1). Yine ekstraksiyon işlemi sonucunda, sülfür içeren aminoasitlerin miktarı ise yok denecek kadar azdır ve zincirler arasındaki çapraz bağlarda bile bu aminoasitler bulunmamaktadır(Ledward, 2000). A tipi jelatinlerde isoelektrik nokta 9,0 civarında, molekül ağırlığı ise 70–90 kDa aralığındadır. Bu yöntemle üreti len jelatinde protein hidrolizasyonu daha düşük orandadır ve ürünün jel kuvveti daha yüksektir. Alkali uygulaması ile elde edilen B tipi jelatinlerin izoelektrik noktası 4.8-5.5, molekül ağırlığı ise 10 ile 65 kDa arasında değişmektedir (Ockerman and Hansen, 1988).

2.2.3. Filtreleme (süzme)

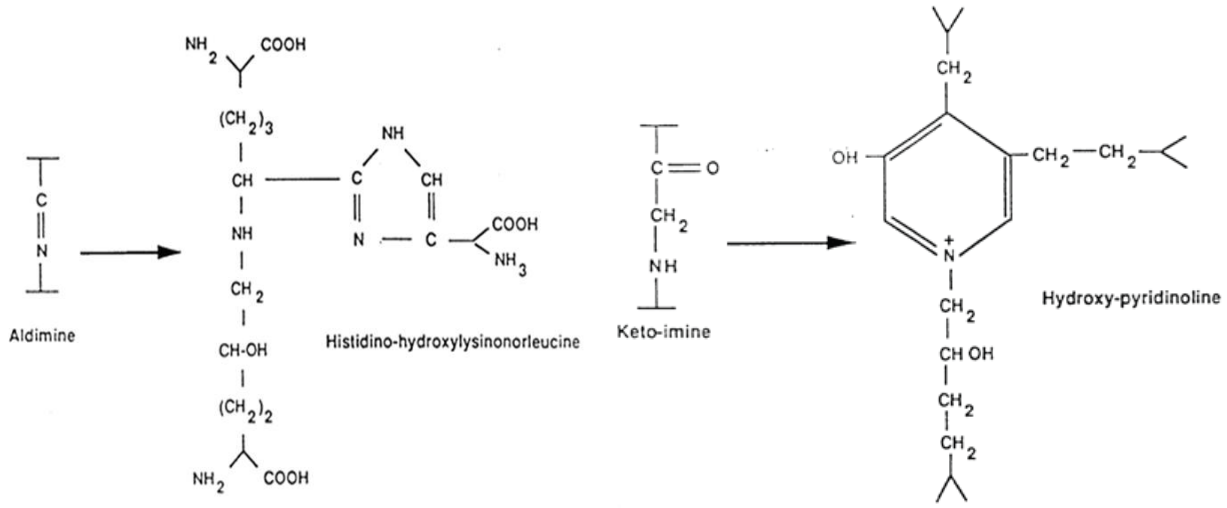
Sıvı ekstrakt çeşitli özellikteki süzgeçlerden geçirilirek içerisindeki çökeltiler, topaklanma ürünleri ve diğer safsızlıklar ayrıldığı gibi bu yolla molekül ağırlığına ve rengine göre bir sınıflandırma da yapılabilir. Eğer arzu edilirse, kaliteyi daha da artırmak için, konsantre jelatin solüsyonu da süzülebilir ve tekrar ağartılabilir (Ledward, 2000; Yetim, 2011).

2.2.4. Evaporasyon (kurutma) işlemi

Yukarıda bahsedilen işlemler sonucu elde edilen sıvı jelatin ekstraktı, evaporasyon işlemi ile suyu uçurularak, belirli bir viskoziteye ulaşıncaya kadar konsantre edilir. Nem miktarı, yüksek kalitedeki (yüksek molekül ağırlığına sahip) jelatinlerde % 20-25 civarında, düşük kaliteli (düşük molekül ağırlığına sahip) jelatinlerde ise % 40 civarındadır (Haug and Draget, 2009). Çünkü suyun mevcudiyetinde termal hidrolizasyon her zaman mümkündür. Koyulaşmış jelatine tamamen kurumadan önce gerekli hallerde bazı kimyasal koruyucular da ilave edilebilmektedir (Ockerman and Hansen, 1988; Yetim, 2011).

2.2.5. Sterilizasyon

Kurutulmamış viskoz yapıdaki jelatin hâlâ bozulabilir bir formdadır. Jelatinde sterilizasyon, hem dolaylı hem de doğrudan olmak üzere iki aşamada yapılır. Dolaylı olarak yapılan sterilizasyon işleminde plakalı ısı değiştiriciler kullanılmakta; doğrudan yapılan sterilizasyon işleminde ise doğrudan buhar sterilizasyonu tekniği kullanılmaktadır (Haug and Draget, 2009). Sterilizasyon işlemini takiben, soğutma işlemi uygulanarak konsantre jelatin solüsyonu, tamamen jel haline getirilir. Toz jelatin üretimi için, jelatin jelleri şerit şeklinde ekstrüde edilir ve kurutulur (Haug and Draget, 2009; Yetim, 2011).



Şekil 6. "İki değerlikli" aldimine ve keto-imine çapraz bağlarından oluşmuş "üç değerlikli"mature çapraz bağlar.

Tablo 1. Kollajen ve farklı jelatin tüplerinin amino asit kompozisyonları (oransal olarak 1000 de x)

Amino asit Kompozisyonu	**Tip I kollajen (sığır)**	**Tip A Jelatin [a]**	**Tip B jelatin [b]**
Alanin	114	112	117
Arjinin	51	49	48
Asparajin	16	16	-
Aspartik asit	29	29	46
Glutamin	48	48	-
Glutamik asit	25	25	72
Glisin	332	330	335
Histidin	4	4	4
4-Hidroskiprolin	104	91	93
ε- Hidroksilisin	5	6	4
İzolösin	11	10	11
Lösin	24	24	24
Lisin	28	27	28
Metiyonin	6	4	4
Fenilalanin	13	14	14
Prolin	115	132	124
Serin	35	35	33
Treonin	17	18	18
Tirozin	4	3	1
Valin	22	26	22

[a] Tip A jelatin: asitle muamele edilmiş domuz derisi jelatinin ; [b] Tip B jelatin: alkali ile muamele edilmiş kemik jelatini

2.2.6. Kurutma

Çeşitli yöntemlerle koyulaştırılmış ve jel haline getirilmiş jelatin, ekstruderler veya fırınlarda daha da ileri derecede kurutularak, yaprak, granül veya toz haline getirilir. Kurutma işlemi, filtrelenmiş, nemi giderilmiş ve mikrobiyal açıdan temiz kuru hava kullanılarak gerçekleştirilir. Kurutmada kullanılacak havanın başlangıç sıcaklığı 30 ºC'dir. Hava sıcaklığı, jelatin şeritlerinin kuruluk derecesine göre ayarlanır. Bu işlem için kurutulmuş jelatin şeritleri ezilir ve öğütülerek her birinin çapı, 0,1 ile 10 mm arasında değişen granül taneleri haline getirilir. Ticari olarak üretilip piyasaya sürülen jelatinlerin nem içeriği, % 8 ile 12 arasındadır (Haug and Draget, 2009; Yetim, 2011).

2.3.2. Jelatinin Endüstriyel Kullanımı

Çok yönlü bir hidrokolloid olan jelatin; farklı endüstrilerde yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Jelatinlerin kullanıldıkları alanlar ve üretilen ürünlerde gösterdikleri fonksiyonlar ile bu ürünlere katılım amaçları şağıda çok kısa olarak verilmiştir (Schrieber, 2007; Haug and Draget, 2009; Ledward, 2000; Yetim, 2011).

2.3.2.1. 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 (Yetim, 2011).

2.3.2.2. 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, subağlama kapasitesini artırmak, trans-epidermal su kaybını azaltmak ve deriyi iyileştirmek amacıyla deri bakım setlerine ilave edilmektedir (Yetim, 2011).

2.3.2.3. Gıda endüstrisi

Jelatinin, sahip olduğu eşsiz fonksiyonel özellikleri nedeniyle çok amaçlı bir gıda katkı maddesi olarak en yaygın kullanıldığı alanlardan birisi gıda endüstrisidir. Tablo 2'de jelatinin kullanıldığı başlıca gıda grupları ve bu gıdalarda icra ettiği fonksiyonlar kısaca özetlenmiştir. Yine jelatin hidrolizatları, gıdalara eklenme 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 fonksiyonları icra ettiği için özellikle bu alanda çok fazla kullanılmaktadır (Schrieber and Gareis, 2007; Haug and Draget, 2009; Yetim, 2011).

Tablo 2 Gıda ürünlerine katılan jelatin ve icra ettiği fonsiyonlar (Schrieber and Gareis, 2007; Haug and Draget, 2009; Yetim, 2011)

Katıldığı gıda grubu	Katılım oranı (%)	Başlıca fonksiyon	Alt fonksiyon
Tatlılar	1,5-3,0	Jel oluşumu	Tekstür, Saydamlık, Berraklık
Köpüklü sütlü tatlılar	0,3-3,0	Köpük oluşumu	Tekstür, Stabilizasyon
Jelli sütlü tatlılar	1,0-2,0	Jel oluşumu	Tekstür, Kremsilik
Meyveli sakızlar	6,0-10,0	Jel oluşumu	Tekstür, Elastikiyet, Saydamlık, Berraklık
Lokumlar	1,0-3,0	Köpük oluşumu	Köpük stabilizasyonu, jel oluşumu
Kos helvası	1,5-3,0	Köpük oluşumu	Köpük stabilizasyonu, jel oluşumu
Pastiller	1,0-2,0	Bağlama ajanı	Tekstür, Erime özelliği, Dağılmayı önleme
Karameller	0,5-2,5	Emülsifikasyon, Stabilizasyonu	Çiğnenebilirlik
Yoğurt	0,2-1,0	Sineresis kontrolü	Tekstür, Kremsilik
Et ve Sosisler	0,5-2,0	Emülsiyon stabilizasyonu	Su ve sızıntı suyu bağlama
Et suyu ve konserve etler	0,5-2,0	Bağlama ajanı	Tekstür, Dilimlenebilirlik
Sürülebilir sandviç ürünleri (etsiz)	0,3-1,5	Emülsiyon stabilizasyonu	Tekstür, Kremsilik

2.3.2.4. Tıp ve eczacılık endüstrisi

Jelatin, acil veya tıp da 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 (Yetim, 2011).

2.3.2.5. 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 özellikle kemiklerin, kıkırdakların, 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. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Jelatinin Hazırlanması

Projede Helal Sertifikalı Sığır jelatini ve Tip A domuz derisinden elde edilen, domuz jelatini (Sigma, G2500) kullanılmıştır. Toz haldeki jelatin örnekleri yarı hacimde distile suda seyreltilmiş, ürünlere katılmadan önce ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda şeffaflaşıncaya kadar ısıtılarak suda çözülmüştür.

3.2. Model Gıda örneklerinin hazırlanması ve jelatin izolasyonu

3.2.1. Krem Peynir

Krem peynir yapımında 1 litre çiğ süt ve 5 ml ticari peynir mayası kullanılmıştır. Çiğ süt 37 ˚C sıcaklığa gelene kadar ısıtılmış ve sonra enzim ilave edilerek 37 ˚C' de yaklaşık 2-3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonrasında pıhtı kesilerek bez torbadan süzülmüştür. Elde edilen pıhtıya %1, %0.5, %0.3 ve %0.1 oranında jelatin ilavesi yapılarak krem peynirler hazırlanmıştır.

3.2.2. Dondurma

Dondurma üretiminde; süt (75g/100g), sükroz (15g/100g), krema (7g/100g), emülgatör (0.5g/ 100g), salep (stabilizatör) (0.5g/100g) karışımı kullanılmıştır. Karışımlara %1, %0.5, %0.3 ve %0.1 oranında jelatin (sığır veya domuz) ilave edilmiştir. Emülgatör ve jelatin hariç diğer bileşenler karıştırılıp, 85 ºC' de 15 dakika sabit hızda karıştırılarak pastörize edilmiştir. Pastörizasyondan

sonra dondurma miksi hızlıca 50 ºC'ye soğutulmuş ve 3 dakika homojenize edildi. Olgunlaşma için dondurma miksi, 4 ºC'de 24 saat muhafaza edilmiştir. Emülgatör ve jelatin karışımından oluşan solüsyon karışıma eklenerek 815 rpm de, 4 ºC, 5 dakika dövülmüştür. Daha sonra soğutucuda soğutularak ve analize hazır olarak -20 ºC'de bekletilmiştir.

3.2.3. Yoğurt

Yoğurt üretimi yapılırken, süt ürünü işleme tesislerindeki sıcaklık zaman parametreleri uygulanmıştır. Çiğ inek sütü 90 ºC'de 15 saniye ısıtıldıktan sonra hızlı bir biçimde 65 ºC'ye kadar soğutulmuştur. Ardından %1, %0.5, %0.3 ve %0.1 seviyelerinde jelatin (her ürüne ayrı ayrı domuz ve sığır jelatini) ilave edildikten sonra, manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Sıcaklık 45 ºC'ye düştüğünde ise içinde *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* bulunan ticari yoğurt kültüründen %2 oranında eklenmiştir. Kültürün homojen bir şekilde ürünün her tarafına dağılması için ise manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. Yoğut örnekleri pH 4.5'e düşünceye kadar 43 ºC'de inkübe edilmiş ardından asit oluşumunu engellemek için 3 ºC'de depolanmıştır.

3.2.4. Sosis

Gökalp ve ark. (1999)'e göre hazırlanan sosis formülasyonlarına, %1, %0.5, %0.3, %0.1 oranlarında jelatin ilave edilmiştir.

3.2.5. Konserve Et

50 gram parça et bir şişeye tartıldıktan sonra üzerine 20 ml su içerisinde çözündürülen %1, %0.5, %0.3, %0.1 oranlarındaki jelatinli su ilave edilmiştir. Konservelere 121 ˚C' de 15 dakika otoklav işlemi uygulanmıştır.

3.2.6. Puding

Piyasadan temin edilen ve içerisinde jelatin içermeyen pudinge [%60 şeker, %18 mısır nişastası, %12 kakao, %9.5 süt tozu, % 0.5 kıvam arttırıcı (karragenan)] gerekli oranlarda (%1, 0.5, 0.3 ve 0.1 oranlarında) jelatin ilave edilmiş ve 125 gr toz karışım için 650 ml süt eklenir. Daha sonra iyice karıştırılarak jelatinin çözünmesi ve puding karışımının sütün içinde dağılarak kıvamını alması sağlanmıştır. Karışım kaynadıktan sonra soğumaya bırakılmıştır.

3.2.7. Kek

Kek yapımında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 3' de verilmiştir. Yumurta, şeker ve sıvı yağ iyice karıştırıldıktan sonra un, kabartma tozu ve su içerisinde çözündürülen jelatin (%1, 0.5, 0.3 ve 0.1 oranlarında) ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan kek karışımı kalıplara alınarak 210 ˚C sıcaklıktaki fırında 30 dakika pişirilmiştir. Kekler soğutulduktan sonra blenderda toz haline getirilerek jelatin izolasyonu için hazırlanmıştır.

Tablo 3. Kek yapımında kullanılan malzemeler ve miktarları

Malzemeler	**%1 seviyesi için**	**%0.5 seviyesi için**	**%0.3 seviyesi için**	**%0.1 seviyesi için**
Un	25 g	25 g	25 g	25 g
Yumurta	25 g	25 g	25 g	25 g
Şeker	25 g	25 g	25 g	25 g
Sıvı yağ	8 ml	8.5 ml	8.7 ml	8.9 ml
Kabartma tozu	1 g	1 g	1 g	1 g
Su	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml
jelatin	1 g	0.5 g	0.3 g	0.1 g

3.2.8. Jelatinli şekerleme

Jelatinli şekerleme yapımında 100 ml saf su, 40 gram şeker ve 15 gram jelatin kullanılmıştır. Tüm malzemeler karıştırılmış ve 100-150 ˚C sıcaklıkta yaklaşık 1 saat ısıtıldıktan sonra -20 ˚C' de bir gece bekletilmiştir. Jelatinli şekerlemede kullanılan jelatin oranı sabit olup %15 olarak belirlenmiştir.

3.2.9. Toz Çorba

Jelatin içermeyen hazır toz çorba karışımına %1, 0.5, 0.3 ve 0.1 oranlarında jelatin ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır.

3.3. Üretilen model gıda ürünlerinden jelatin izolasyonu

Ürünlerden jelatin izolasyonu için, A.O.A.C metodu (Anonymous, 2000) kullanılmıştır. 20 g (katı gıdalar için) veya 20 ml (sıvı gıdalar için) örnek ile 20 ml civalı $Hg(NO_3)_2$ civalı nitrik asit solüsyonu karıştırılmıştır. Bu karışım çalkalandıktan sonra, üzerine 40 ml distile su eklenmiş ve tekrar çalkalmıştır. Karışım, 5 dakika bekletildikten sonra filtre edilmiştir. Ardından 20ml'si test tüpüne aktarılarak üzerine 20ml %4'lük pikrik asit çözeltisi (sigma) eklenmiştir. Ardından test tüpü 4000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş (Nüve, NF400/R, Türkiye) ve süpernatant atılmıştır. Oluşan çökelti disitle su ile yıkandıktan sonra bir spatül ile toplanmış ve yıkandıktan sonra 50 ˚C sıcaklıkta bir gece kurutulmuştur. Analiz edilmek üzere ürünlere ilave edilen jelatinlerin geri kazanım oranları verilmiştir (Tablo 4.).

Tablo 4. Ürünlere ilave edilen jelatinin geri kazanım oranı

Ürün Grupları	**Ürünler**	**% Geri kazanım**				
		%1.5	%1	%0.5	%0.3	%0.1
SÜT ÜRÜNLERİ	Krem peynir	-	95	98.7	100.8	-
	Yoğurt	-	71.1	112.7	115.3	52.5
	Dondurma	-	45.5	24.4	11.1	-
ET ÜRÜNLERİ	Sosis	--	64.6	89.8	102.1	99.5
	Konserve et	-	103.7	-	100.6	109.3
DİĞER ÜRÜNLER	Puding	-	59.2	92.4	85.5	-
	Kek	-	54.6	-	-	-
	Jelatinli şekerleme	55.1	-	-	-	-
	Toz çorba	-	91.1	99.1	114.6	110

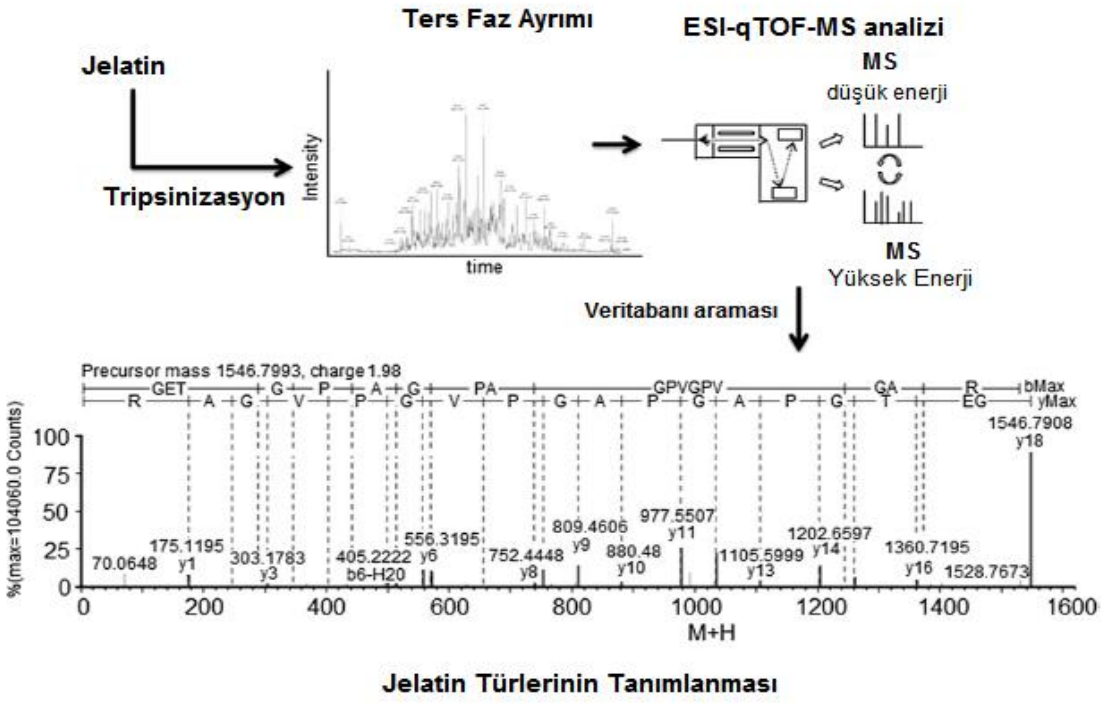
3.4. Ekstrakte edilen jelatinlerinden UPLC-MS-qTOF- MS analizi için örnek hazırlama

Ekstrakte edilen jelatin örnekleri, Tübitak Marmara araştırma merkezi, Genetik Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsünde nanoACQUITY UPLC-MS-qTOF-MS sistemi ile analiz edilmiştir. Analiz edilmeden önce 2 mg saf jelatin (domuz ve sığır türlerine ait) ve aynı miktarda ürünlerden izole edilmiş olan jelatinler 1ml 50mM NH_4HCO_3 ile karıştırılmış ve ultrasonic homojenizatörde homojenize (10sn aktif, 10sn pasif, 3 döngü) edilmiştir. Karışım çözülmemiş partikülleri uzaklaştırmak için 15.000 rpm'de santrifüjlenmiş ve homojenat 0.22µm şırınga filtreden geçirilmiştir. Daha sonra 10 µL filtre edilmiş homojenata 40 µL 50mM NH_4HCO_3 ve disülfit bağlarını kırmak için 5mM DTT eklenmiş ve 60°C'de 15 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra sistein yan zincirlerini indirgemek için 10mM IAA (iyodoasetamid) eklenmiş ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Jelatinin proteolitik parçalanması ise 50 µL 50mM NH_4HCO_3 içinde çözülmüş %0.4'lük Rapigest ve 50mM NH_4HCO_3 içinde çözülmüş 1 µg proteomik grade tripsin (50 µL, 20ng/µL) eklenerek 37°C'de 16 saatte gerçekleştirilmiştir. Kullanılan aside dayanıksız deterjanların ortamdan uzaklaştırılması için, 3 µL TFA ve 2 µL ACN (Asetonitril) eklenmiş, ve karışım 60°C'de ve 600 rpm sabit hızda 2 saat çalkalanmıştır. Rapigest deterjanı ortamdan uzaklaştırılırken, son konsantrasyonu 50 fmol/µL olacak şekilde Triptic parçalanmış ADH (Alkol dehidrojenaz) internal standardı eklenmiştir. Toplam karışıma uygun miktarda 50mM NH_4HCO_3 tamponu eklenerek 200 µL hacime tamamlanmıştır. Deterjanlar ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra karışım 15.000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş, sıvı analiz için LC vialine aktarılmış ve -86°C'de muhafaza edilmiştir.

3.5. Hazırlanan örneklerin LC-ESI-qTOF-MS ile analizi

Teknik hataları elimine etmek için her örnek için 3 tekerrür yapılmıştır. Toplamda 200ng triptic peptid karışımı içeren 2 µL örnek nanoUPLC-ESI-qTOF-MS^E (nanoUPLC: nanoACQUITY ultra pressure liquid chromatography, SYNAPT HDMS: high definition mass spectrometer with nano

lockspray ion source) sistemine yüklenmiştir. Enjeksiyondan önce kolonlar %97 mobil faz A (%0.1'lik formik asit-suda) ve mobil faz B (%0.1'lik formik asit-asetonitrilde) ile şartlandırılmış ve kolon sıcaklığı 35°C'ye ayarlanmıştır. İlk önce peptidler akış hızı 5 µL /dk olan, nanoACQUITY UPLC Symmerty C18 Trap kolonunda (5 µm partikül büyüklüğünde) 5dk hapsedilmiştir. Daha sonra gradient elüsyonu (300nl/dk akış hızı, %5 ten % 40 asetonitril linear gradientinde, yaklaşık 90 dk) yapılarak peptidler trap kolonundan, bir analitik kolona (nanoACQUITY UPLC BEH C18 kolonu, 1.7 µm partikül büyüklüğünde) aktarılmıştır. Daha sonra ayrıştırılan triptik peptidlerin dizisinin ve miktarının saptanması için, cihazın MS ve MS/MS fonksiyonları kullanılarak, 1.5-2 sn den fazla 6V düşük enerji ve 15-40V aralığında yüksek enerji çarpışması uygulanmış ve peptidlerin kütle/yük oranları ve iyon kapasiteleri elde edilmiştir. Kapiller voltaj ve iyon kaynağının sıcaklığı ise, 3.2 kV ve 80°C'ye ayarlanmıştır. Peptid sinyal verileri ise 50-1600 m/z değerleri arasında toplanmıştır. Bu projede Label-free proteomik metodu başarı ile uygulanmış ve Şekil.7'de projede yapılan proteomik analizin akış şeması verilmiştir. Benzer hidrofobisiteye sahip peptid sekansları hem sığır hemde domuz jelatinden elde edilen peptidlerde bulunabileceğinden peptidlerin benzerliklerinin bulunması için ilk önce kromatografik olarak ayrılmış, sonrada MS analizine alınmıştır.



Şekil 7. LC-ESI-qTOF proteomik analizleri için deneysel akış şeması; Jelatin ekstraksiyonundan sonra triptik peptidler DTT redükdiyonu ve IAA metilasyonu ile modifiye edildikten sonra.Disülfit bağlarını elimine etmek için sistein yan zincirleri alkile edilmiştir. Triptik peptidler ters faz kromatografi ile ayrıştırıldıktan sonra SYNAPT HDMS sisteminde sırasıyla düşük ve yüksek enerji çarpışma metodları kullanılarak, jelatin peptidlerinin amino acid dizisini ve miktarını belirlemek için peptid ve işaretçi yükleri toplanmıştır.

3.6. LC-ESI-qTOF-MS analizi ile elde edilen peptidlerin tanımlanması

Analiz sonucunda elde edilen ham peptid dizileri Protein Lynx Global Server v2.4 (Waters corp., Milford, MA) ile işlenmiş ve IDENTITY^E algoritması ile türe spesifik triptik peptidlerin bulunduğu özel jealtin veri tabanından taranmıştır. Internal standard olarak Maya alkol dehidrojenaz peptid dizisi (Uniprot accession #P00330) FASTA dosyası olarak veritabanına eklenmiştir. Tanımlama için, veritabanın yalancı pozitiflik oranı (FPR) %4 olarak ayarlanmıştır. Peptid seçimi ve tanımlanması için, her peptid için 3 fragment, her protein için 7 fragment referans olarak alımıştır.

3.7. PCR temelli yöntemlerle jelatinin orjinin belirlenme olanağının araştırılması

Bu amaçla hem saf jelatinden (domuz ve sığır) hem de üründen izole edilmiş jelatin örnekleri kullanılmıştır. Öncelikle örneklerden manuel yöntemle DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen jelatin DNA'ları real-time PCR analizinde kullanılmıştır.

3.7.1. Manuel yöntem ile Jelatinden DNA izolasyonu

1. 0.3-0.5 g jelatin örneği 2ml'lik mikrosantrifüj tüplerine tartılmıştır.
2. Tüpte bulunan örneğin üzerine 600 µL lysis buffer(100mM Tris-HCl, 50mM EDTA, 0.8M NaCl, %1 PVP, pH:8) eklenmiştir.
3. Tüpler, 65°C'de 15 dk inkübe edilmiştir.
4. Tüpler soğuyuncaya kadar bekletilmiş, ardından 40 µL proteinaz K eklenmiş, ve 56°C'de en az 6 saat inkübe edilmiştir.
5. Daha sonra tüpler, 75 °C'de 15 dk inkübe edilmiştir.
6. Örnekler oda sıcaklığına kadar soğutulmuş, ardından 13.000 rpm'de 15dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucunda oluşan üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
7. Örneklerin üzerine 750 µL NH_4OAc eklenmiş ve -20°C'de en az 1 saat bekletilmiştir.
8. Tekrar örnekler 13.000 rpm'de 15dk santrifüjlenmiş ve santrifüj sonucunda oluşan üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
9. Daha sonra tüplere 500 µL fenol-kloroform-izoamilalkol(25:24:1) karışımı eklenmiş ve 30 dk boyunca homojenize edilmiştir.
10. Tekrar örnekler 13.000 rpm'de 15dk santrifüjlenmiş ve santrifüj sonucunda oluşan üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
11. Tüplere tüp içerisinde bulunan hacmin 2/3'ü kadar 2-propanol eklenmiş ve -20°C'de en az 1 saat bekletilmiştir.
12. Tekrar örnekler 13.000 rpm'de 15dk santrifüjlenmiş ve santrifüj sonucunda oluşan üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.

13. Daha sonra tüplere 1000 µL soğuk %70'lik etanol eklenmiş, hafif vortekslendikten sonra, 13.000 rpm'de 15dk santrifüjlenmiş ve üst faz uzaklaştırılmıştır.
14. Tüpler kurumaya bırakılmıştır.
15. Tüpler kuruduktan sonra TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH:8) ile sulandırılmış ve nanodropta DNA konsantrasyonu ölçülmüştür.

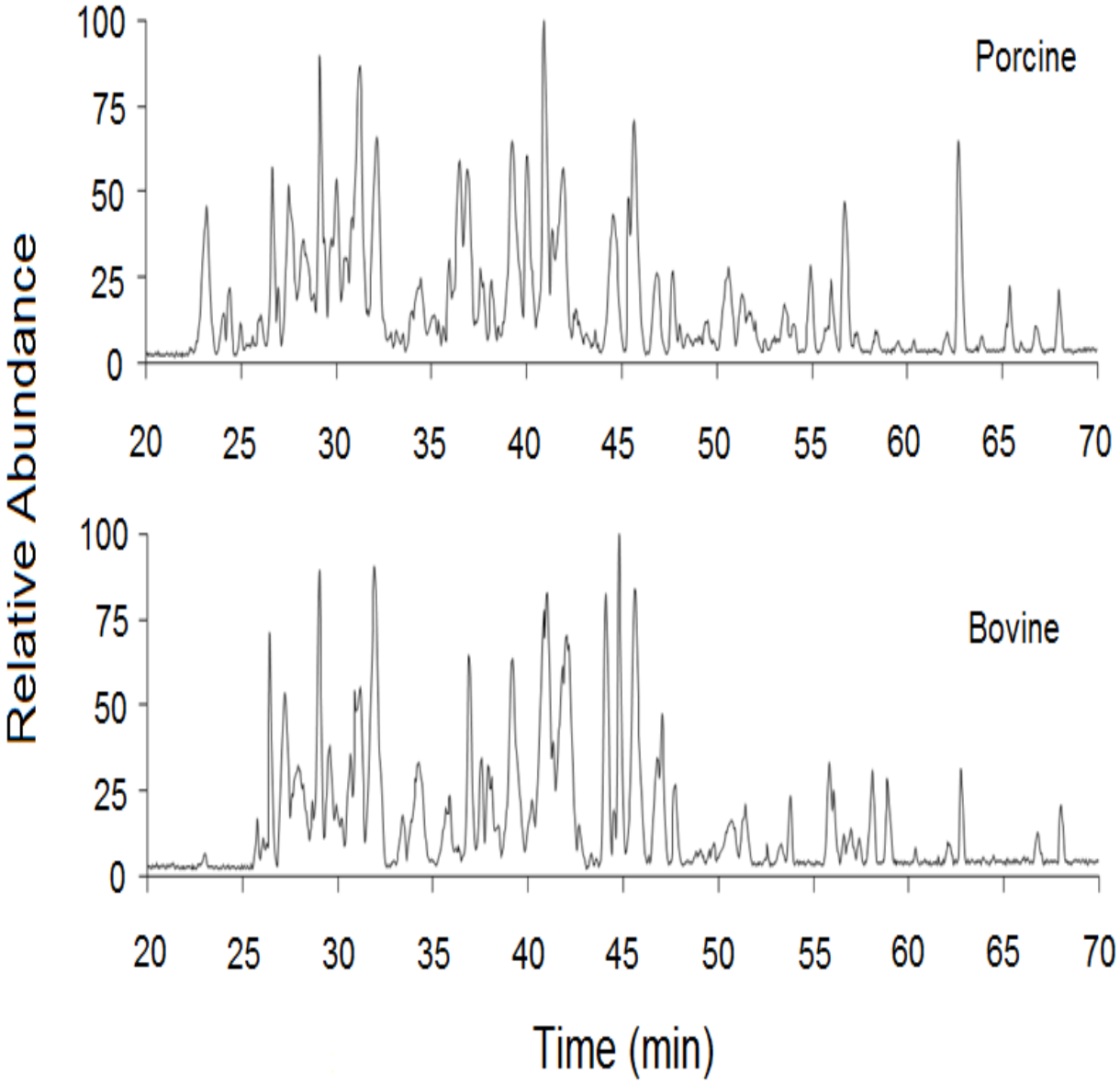
3.7.2. Jelatin örneklerinden izole edilen DNA'lar ile Real-Time PCR analizi

Hem standard jelatinler ve hem de ürünlerden izole edilen jelatinlerin DNA'ları kullanılarak SBYR Green yöntemi ile LightCycler Nano (Roche, Almanya) Real-Time PCR cihazı kullanılarak, PCR reaksiyonu kurulmuştur. Bu amaçla, kullanılan tüplerin son hacmi 25 µL olacak şekilde, 12.5 µL Fast Start Essential DNA Green Master (Roche, Almanya), 0.8 µM ileri primer, 0.8µM geri primer, 2 µl DNA ve son hacme kadar PCR grade su kullanılmıştır. Her iki tür için uygulanan termal döngü protokolü ; 95°C'de 10dakika ilk denatürasyon basamağı, daha sonra 35 döngü 94 °C'de 15 saniye, 55 °C'de 20 saniye ve 72 °C'de 30 saniye denatürasyon, yapışma ve uzama basamağı olarak ayarlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Proteomik analiz sonuçlarının değerlendirlmesi

Proje kapsamında kullanılan nanoUPLC-ESI-q-TOF-MS^E sistemi, jelatinin güvenilir ve tekrarlanabilir kromatografik analizini mümkün kılmıştır. Şekil 8'de sığır ve domuz tirptik peptidlerine ait toplam ion kromatogramları görülmektedir. 3 tekerrürlü yapılan analizler, kromatogramlarda mükemmel tekrarlanabilirlik göstermiştir. Her analiz için yaklaşık 200 ng triptik parçalanmış protein kolona yüklenmiş ve jelatin peptidlerinin tanımlanmasını mümkün kılmıştır (Tablo 5 ve 6). İyon kromatogramlarından görülebildiği gibi, elüsyon profillerinde birçok benzer peptid profilinin yanında oldukça farklı profiller de görülmektedir. Kromatografik ayrım 2 saat sürmüştü ve kromatografide kullanılan %5-40 gradient elüsyonu peptidlerin ayrımında etkili olmuştur. Karışımda az miktarda bulunan peptidlerin bol miktarda bulunan peptidler tarafından maskelenmeden tanımlanması mümkün olmuştur.

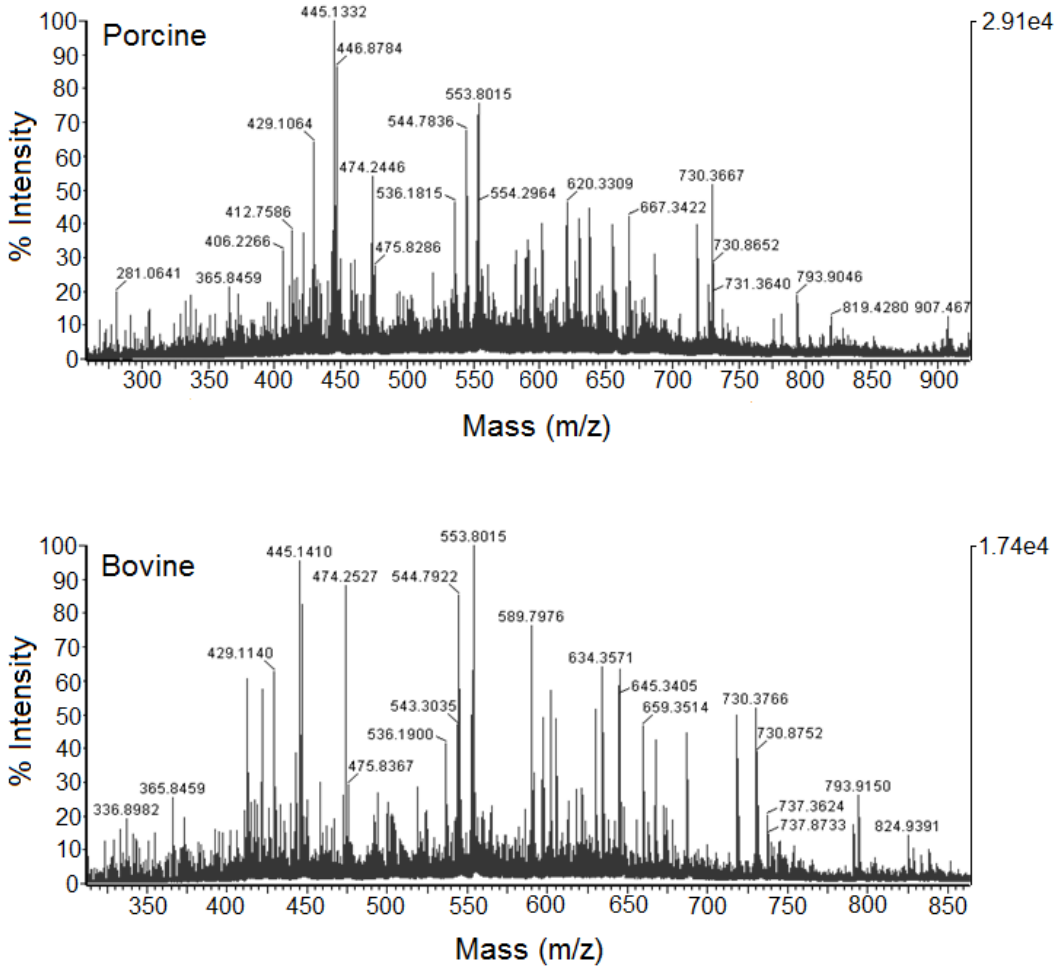


Şekil 8. 50-1600 m/z üzerinde elde edilen sığır ve domuz standard jelatinlerine ait toplam iyon kromatogramları. Jelatin peptidleri, nano kolonda(75 µm i.d. x 250 mm genişlikte) 90 dk'da %5-40 ACN gradient elüsyonunda ayrılmış. Elüsyon kromatogramlarındaki geniş farklılıklar, çeşitli hirdofobisitede olan özel peptidlerin bulunmasına katkı sağlamıştır.

Kromatografik ayrımdan sonra peptidler, MS kaynağına piko boyutta bir iğne ile infüze edilmiştir. Identity^{E} yaklaşımında ise sırasıyla değişik tarama modları uygulanmıştır. Burada ilk önce peptidlerin bilgileri düşük çarpışma enerjisi ile toplanırken, peptid dizilerinin bilgileri ise, çarpışma enerjisi daha yükseğe doğru çıkartılarak toplanmıştır. Bu yolla, her peptid için daha fazla fragment iyonu ve her protein için daha fazla peptid tanımlanması böylece protein tanımlanması için yüksek günenilirlik sağlamıştır. Şekil 9.'da değişik m/z değerlerinde, triptik parçalanmış standart domuz ve sığır jelatinine peptidler görülmektedir.

Tablo 5. Sadece Sığır jelatinine spesifik olarak bulunan peptidler. m/z değerleri tablodaki çeşitli peptidlerin jelatinin tanımlanması için kullanılabileceğini göstermektedir. m/z değerleri, tek yüklü iyonlaşma durumunda elde edilmiştir. Bazı peptidlerde prolin hidroksilasyonu, methiyonin oksidasyonu, asparajin ve glutamin deamidasyonu gözlenmiştir.

Peptid Dizisi	**m/z**
(F)PGSPGNIGPAGK(E)	1083.5428
(K)SGETGASGPPGFVGEK(G)	1484.6940
(G)PVGLPGIDGR(G)	996.5473
(L)PGVAGAPGLPGPR(G)	1193.6273
(G)VMGPAGSRGATGPAGVR(G)	1556.7961
(Q)GPVGPVGK(G)	710.4196
(I)PGEFGLPGPAGAR(G)	1257.6222
(R)AGVMGPAGSR(G)	918.4462
(I)PGPVGAAGATGAR(G)	1097.5698
(R)AGVMGPAGSRGATGPAGVR(G)	1684.8549
(K)EGPVGLPGIDGR(G)	1182.6113
(R)DGQPGHKGYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVGK(G)	2981.3438
(K)GAAGLPGVAGAPGLPGPR(G)	1562.8285
(R)DGSPGAKGETGPAGPPGAPGAPGAPGPVGPAGK(G)	2781.4500
(K)GAPGADGPAGA(P)	822.3741
(R)GAPGAIGAPGPAGANGDR(G)	1522.7244
(K)GAPGADGPAGAPGT(P)	1109.4858
(R)GENGPVGPTGPVGAAGPSGPNGPPGPAGSRTGPPGPSGISGPPGPPG PAGK(S)	4344.1390
(K)GAPGADGPAGAPGTPGPQGIAGQR(Q)	2076.6606
(R)GEPGPTGIQGPPGPAGEEGKGPAGER(G)	2432.1323
(K)GEAGPSGPAGPTGAR(P)	1281.6182
(R)GFPGSPGNIGPAGK(E)	1288.1248
(K)GEPGPAGAVGPAGAVGPR(G)	1532.7816
(R)GFPGSPGNIGPAGKEGPVGLPGIDGR(G)	2451.2263
(K)GEQGPAGPPGFQGLPGPAGTAGEAGK(G)	2323.0837
(R)GIPGPVGAAGATGAR(G)	1267.6753
(K)GETGPAGPAGPIGPVGAR(G)	1560.8129
(R)GPPGESGAAGPTGPIGSR(G)	1580.7664
(K)GIPGEFGLPGPAGAR(G)	1427.7277
(R)GPPGSAGSPGK(G)	911.4581
(K)GSTGEIGPAGPPGPPGLR(A)	1640.8315
(R)GPSGDPGKGAPGPDGNNGAQGPPGLQGVQGGK(G)	2825.3562
(K)GYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVGK(G)	2262.1150
(R)IGQPGAVGPAGIR(-)	1192.6792
(R)TGPPGPSGISGPPGPPGPAGK(S)	1829.9028



Şekil 9. LC-ESI-qTOF analizi sonucunda elde edilen m/z oranına göre tanımlanan peptitlerin spektrumu. Şekil 3.'te gösterilen (gradient boyunca elüe olan tüm peptidler) tüm peptidlere ait olan piklerin m/z değerleri.

Tablo 6. Sadece domuz jelatinine spesifik olarak bulunan peptidler. m/z değerleri tablodaki çeşitli peptidlerin jelatinin tanımlanması için kullanılabileceğini göstermektedir. m/z değerleri, tek yüklü iyonlaşma durumunda elde edilmiştir. Bazı peptidlerde prolin hidroksilasyonu, methiyonin oksidasyonu, asparajin ve glutamin deamidasyonu gözlenmiştir.

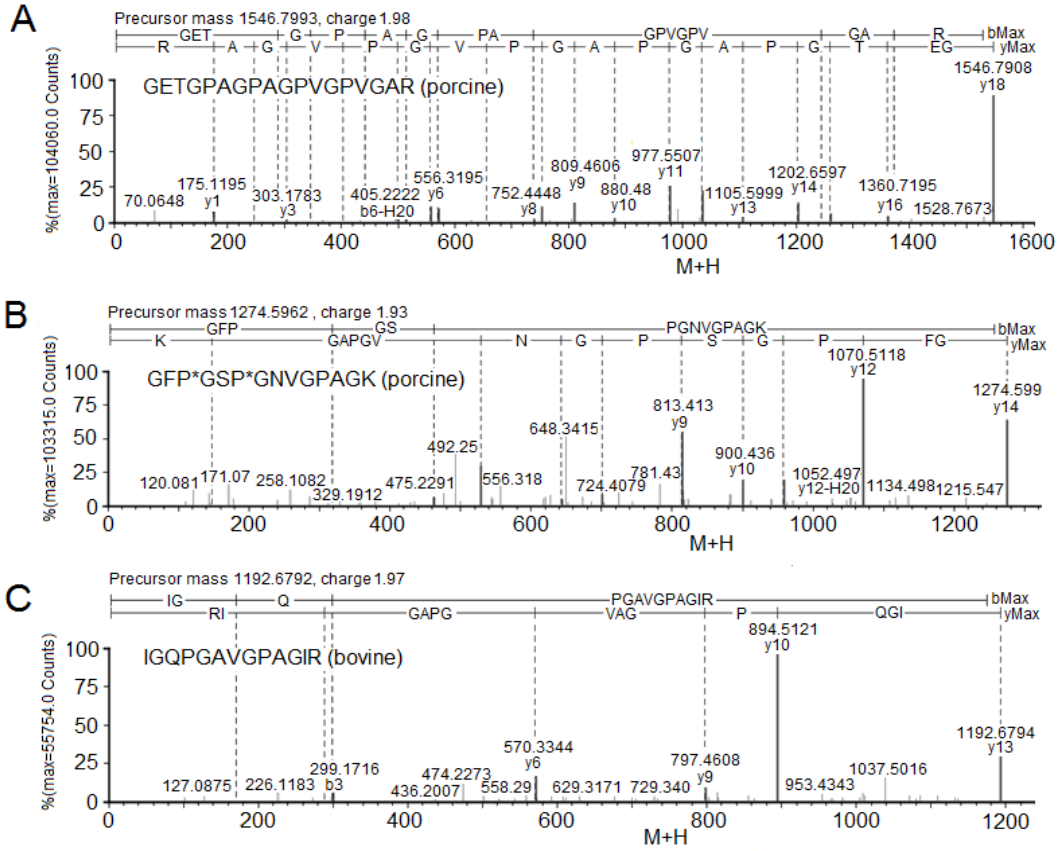
Peptid Dizisi	**m/z**
(_)PGPPGPAGAR(G)	892.4635
(R)AGVMGPPGSR(G)	952.4593
(A)PGPQGAVGPAGK(G)	1051.5531
(R)AGVMGPPGSRGPTGPAGVR(G)	1744.8836
(A)PGPVGPAGPR(T)	912.4974
(R)DGNPGSDGPPGRDGQAGHK(G)	1866.7961
(E)FGLPGPAGPR(G)	984.5261
(R)GAPGAVGAPGPAGANGDR(G)	1491.7299
(F)PGSPGNVGPAGK(E)	1070.0192
(R)GENGPVGPTGPVGAAGPAGPNGPPGPAGSR(I)	2566.7200
(G)ESGPAGPPGAPGAPGAPGPVGPAGK(G)	2082.0250
(R)GEPGAAGPQGPPGPSGEEGKGPNGEVGSAGPPGPPGLR(A)	3373.6042
(G)PAGLPGIDGR(G)	968.5160
(R)GEPGPTGVQGPPGPAGEEGK(G)	1849.8562
(G)PPGPAGAR(G)	722.3944

Tablo 6. Devamı

Peptid Dizisi	m/z
(R)GEPGPTGVQGPPGPAGEEGKGPAGER(G)	2433.1277
(G)PPGSR(G)	529.2729
(R)GEPGVLGAPGTAGPSGPSGLPGER(G)	2149.0520
(G)PPGSRGPTGPAGVR(G)	1321.6971
(R)GFPGSPGNVGPAGK(E)	1274.1091
(R)GHNGLQGLPGLAGHHGDQGAPG(P)	2053.9511
(I)PGEFGLPGPAGPR(G)	1291.6353
(R)GHNGLQGLPGLAGHHGDQGAPGPVGPAGPR(T)	2803.3695
(I)PGPAGAAGATGAR(G)	1069.5385
(R)GIPGPAGAAGATGAR(G)	1239.6440
(K)EGPAGLPGIDGR(G)	1146.5826
(K)EGPAGLPGIDGRGPTGDPGK(G)	1871.9170
(R)GPPGESGAAGPAGPIGSR(G)	1550.7557
(K)GEPGPAGSVGPAGAVGPR(G)	1548.7765
(R)GPPGSAGAPGK(G)	895.4632
(K)GEPGPAGSVGPAGAVGPRGHNGLQGLPGLAGHHGDQGAPGPVGPAGPR(T)	4324.1465
(R)GPTGPAGVR(G)	811.4421
(K)GESGPAGPPGAPGA(P)	1119.5065
(R)GPTGPAGVRGFPGSPGNVGPAGK(E)	2066.0414
(K)GESGPAGPPGAPGAPGAPG(P)	1514.6870
(R)IGPPGPSGISGPPGPPGPAGK(T)	1841.9392
(K)GESGPAGPPGAPGAPGAPGPVGPAGK(G)	2131.0490
(R)QGPSGPSGERDGAPGPK(G)	1610.7405
(K)GETGPAGPAGPVGPVGAR(G)	1546.7972
(R)TGQPGAVGPAGIR(-)	1188.6408
(K)GETGPAGPAGPVGPVGARGPPGSAGAPGK(G)	2455.2324
(S)PGNVGPAGK(E)	813.4101
(K)GETGPSGPAGPTGAR(P)	1311.6288
(V)MGPPGSR(G)	733.3297
(K)GIPGEFGLPGPAGPR(G)	1461.7409
(K)TGETGASGPPGFAGEK(G)	1478.6758
(K)GSPGADGPAGA(P)	838.3690
(L)PGLAGHHGDQGAPGPVGPAGPR(T)	2017.9951
(K)GSPGADGPAGAPGT(P)	1109.4858
(L)PGPAGPR(G)	667.3522
(K)GSPGADGPAGAPGTPGPQGIAGQR(Q)	2084.3300
(M)GPPGSRGPTGPAGVR(G)	1378.7186
(K)GYPGNPGPAGAAGAPGPQGAVGPAGK(G)	2197.0709
(P)GSPGNVGPAGK(E)	956.4796

Tablo 5 ve 6'da standart jelatin örneklerinden analiz edilen domuz ve sığır türlerine spesifik olan peptidler görülmektedir. Analiz sonucunda tanımlanan peptidler yaklaşık %30 civarındadır. Benzer peptid dizileri ise listeden çıkaraılmıştır. Identity^{E} yaklaşımıyla analiz edilen jelatin peptid dizileri, literatürdeki ve protein veritabanlarıdaki sekanlarla %90'nın üzerinde bir benzerlik göstermektedir. Identity^{E} yaklaşımında kullanılan yazılım ve yazılımın iyon hesaplayıcı informatik araçları, ondört

farklı fizikokimyasal özelliği dikkate almış, hesaplanmış sekans benzerliğini arttırarak daha iyi bir tanımlamaya olanak sağlamıştır.



Şekil 10. Domuz ve sığır jelatininden izole edilmiş çeşitli örnek peptidlerin MS/MS spektrumu. (A) GETGPAGPAGPVGPVGAR dizilimine sahip olan ve iyi bir sekans eşleşmesi gösteren domuz jellatinine spesifik peptidin MS/MS spektrumu. (B) iki prolin hidrosilasyonu ile modifiye edilmiş domuz peptidinin MS/MS spektrumu. (C) IGQPGAVGPAGIR dizisine sahip sığır jelatine spesifik olarak tanımlanmış olan bir peptidin MS/MS spektrumu.

Şekil 10'da tanımlanmış olan üç peptidin fragment iyon bilgileri görülmektedir. Şekil 10A'da GETGPAGPAGPVGPVGAR dizilimine sahip domuza spesifik bir peptidin MS/MS spektrumu görülmektedir. Bu peptid çift yüklü iyon olarak tanımlanmıştır. Öncül kütle hatası 1.3362 ppm (0.0021 Da) ve ürün iyon kütle hatası 12.1878 ppm olarak tespit edilmiştir. Peptid dizisi ise 31-b ve –y iyonları temel alınarak hesaplanmış ve neredeyse bu boyutta bir peptidin tamamı güvenilir bir biçimde tanımlanmıştır. Hücre içi ve hücre dışı enzimlerin kollajenin post translasyonel modifikasyonlar geçirmesine sebep olduğu daha önce (Kagan, 2000) rapor edilmiştir. Prolin hidroksilasyonunun, kollajenin stabilite, antijenite ve mekaniksel özellikleri üzerinde önemli rol oynadığı bilinmektedir(Arbogast, Gunson&Kefalides, 1976; Mizuno, Hayashi,&Bachinger, 2003; Vitagliano, Berisio, Mazzerella, & Zagari, 2001). Kollajen amioasitlerinin yaklaşık olarak %18'i prolinden oluşmaktadır, bu durum ise, peptid dizi doğrulaması için prolinin hidroksilasyon bölgelerinin analizinin önemini ortaya koymaktadır (Zhang et. al., 2009). Diğer bir taraftan, jelatin

peptidlerinin amino asit dizileri içerisinde çok sayıda prolin bulunur ve prolin yan zincirleri hidroksilasyon geçirirler, bu ise, MS/MS spektrumlarının işlenmesini daha kompleks bir hale getirir. Eğer dikkatli bir şekilde incelenmezse prolin yan zinciri, lösin yan zinciri varsayılabilir. Prolin yan zincir hidroksilasyonuna örnek ise, şekil 10B'de gösterilen GFP*GSP*GNVGPAGK aminoasit dizisine sahip, iki hidroksilasyon geçirmiş, domuza spesifik jelatin peptididir. Peptidin modifiye edilmemiş mono izotopik kütlesi 1240 m/z'dir, ancak iki prolin hidroksilasyonu ile 32 Da daha eklemiştir. Hidroksile domuz peptidi 1274 m/z değerinde tanımlanmıştır. Ayrıca peptidde prolin hidroksilasyonun yanı sıra asparajin deamidasyonu tanımlanmıştır, bu da tespit edilen m/z değerine 1 Da eklemiştir. Görüldüğü gibi, çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar peptid dizilerinin tespitini zorlaştırmaktadır, bu nedenle şekil 10C'de görüldüğü gibi, modifiye olmamış peptidleri seçmek daha güvenilir bulunmuştur. Hiç bir post translasyonel modifikasyon geççirmemiş ve yüksek doğrulukla tanımlanmış olan, sığır jelatinine spesifik IGQPGAVGPAGIR peptidi buna en güzel örnektir. Öncül kütle hatası 0.4051 ppm iken, ürün kütle hatası ise, 19.8187 ppm olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları, domuz ve sığır jelatinine spesifik peptidlerin iyonlaştırıldığını ve tespit edildiğini göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan metod, üçlü quadrupol bulunan MS cihazlarında kullanılan metodların modifiye edilerek (benzer diziye sahip peptidler filtre edilerek, sadece spesifik peptidlerin analizi yapılarak) geliştirilmesi için bir potansiyel oluşturmuştur. Bu metodun sığır ve domuz türlerine ait birçok türe spesifik peptidi belirleyerek, jelatinin orjinin belirlenmesini sağladığı anlaşılmıştır.

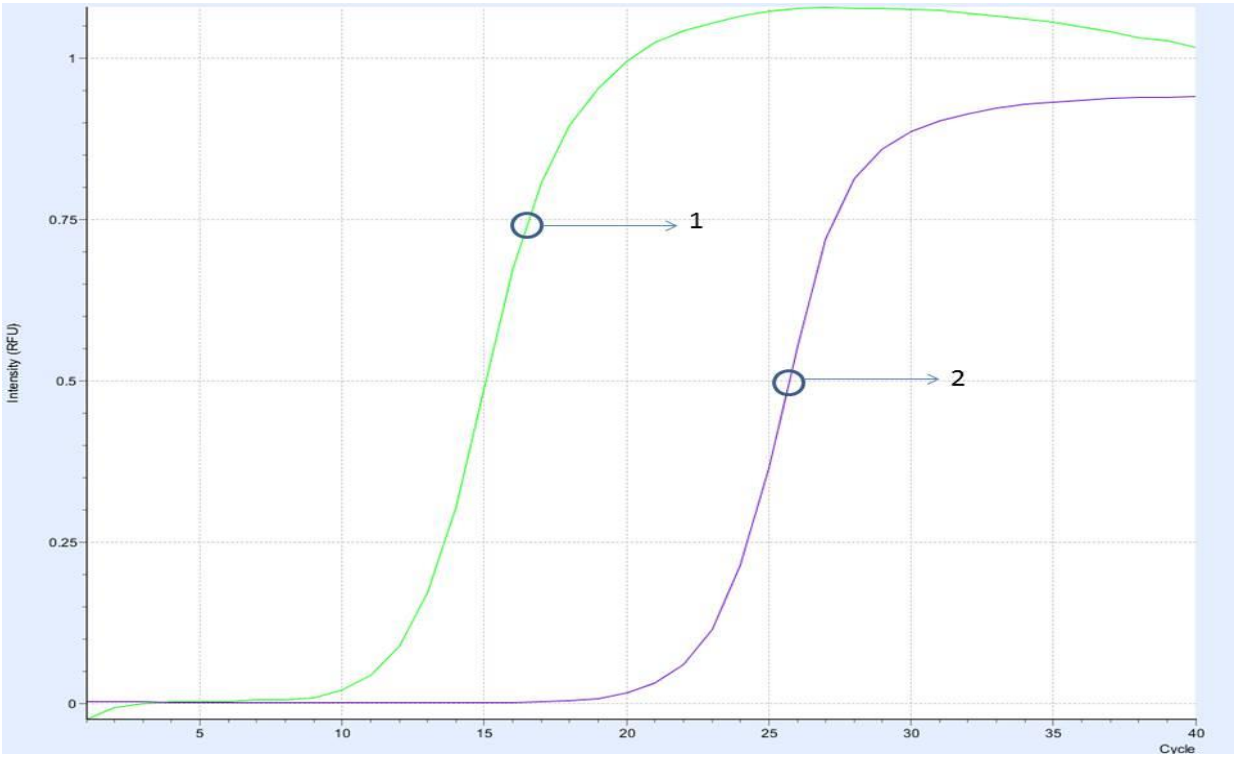
Gıda örneklerinden ekstrakte edilen jelatinlerin analizinde ise aynı yöntemler kullanılmış, üç tekerrürlü analiz yapılmış, ancak diğer standart jelatinlere oranla daha az peptidin tanımlandığı tespit edilmiştir. Buna rağmen, domuz ve sığır jelatinine spesifik peptidler tanımlanabilmiştir. Örneğin, Domuz jelatini eklenmiş tüm örneklerde 34-b ve –y iyonlarıyla, domuza spesifik olan GPPGESGAAGPAGPIGSR peptidi yüksek doğrulukla tanımlanmıştır. Öncül kütle hatası 0.29 ppm iken, ürün kütle hatası ise 20.8 ppm olarak tespit edilmiştir. Sonuçta nanoUPLC-ESI-qTOF-MS^E tekniğinin, yalnızca standartlar için değil analiz edilen ekstrakte edilmiş jelatinler için de jelatin orjinini belirlenmesi için güvenilir ve hızlı bir yöntem olduğu anlaşılmıştır. Analiz edilen gıda örneklerine değişik oranlarda ilave edilen %0.1 seviyesine kadar jelatinin orijininin tespit edilebileceği ortaya konulmuştur.

Yöntemin jelatin karışımlarıdaki peptidleri ayırt etme gücünü tespit etmek için 90:10, 50:50, 10:90 oranlarında sığır/domuz jelatini karışımları hazırlanmış ve üç tekerrürlü analizi yapılmıştır. Her iki jelatin kaynağında yüksek benzerlik olmasına rağmen spesifik peptidler, nano akışkan kromatografi

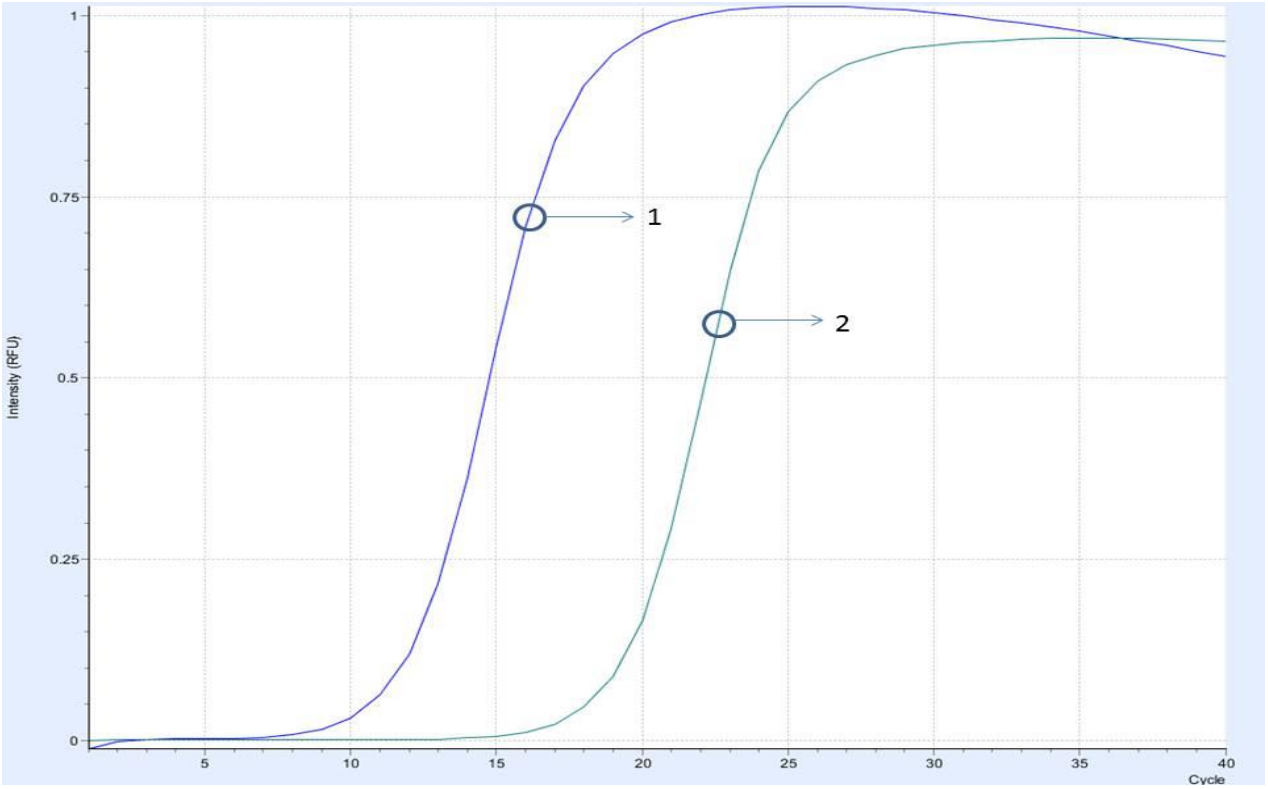
ile ayırt edilebilmiş ve Identity^{E} yöntemi kullanılarak tanımlana bilmişlerdir. Hatta Sığır jelatinin 9 kat daha fazla olduğu karışımlarda bile domuz peptidlerini tanımlamak mümkün olmuştur. Domuz ve Sığır türlerine ait jelatinlerin orijinin kesin tespiti için, spesifik internal kalibrant kullanılmaksızın uygulanan MS^{E} yöntemi, kullanışlı ve güvenilirdir. Bu metod hem tek bir protein kaynağının hem de protein karışımlarının analizinde çok kullanışlıdır (Silva, Gorenstein, Li, Vissers, & Geromanos, 2006). Ancak metod doğası gereği jelatin karışımlarının analizi için uygun değildir, çünkü jelatinin yapısında en yoğun bir şekilde bulunan üç peptid, her iki jelatin türünde de yüksek seviyede yapısal benzerlikler göstermektedirler. Patentli çalışmalar ve uniprot veritabanından alınan verilere göre domuz ve sığır tip 1 kollajenlerindeki peptid dizi farklılığının %3 civarında olduğu anlaşılmıştır (Bell, Neff, Polarek, & Seeley, 2001). Literatürde belirtildiği üzere, yapılan sekans benzerliği çalışmalarında 120 muhtemel peptidin dışında 30 farklı peptid dizisi tespit edilmiştir (Zhang et. Al., 2009).

4.2 Real Time PCR analiz sonuçlarını değerlendirilmesi

Sığır ve domuz türlerine ait saf ve izole jelatinlere ait DNA'lar Light Cycler Nano Real-Time PCR cihazında analiz edilmiş ve cihaz yazılımından alınan veriler değerlendirilmiştir.



Şekil 11. Real-Time PCR cihazına ait yazılımdan alınan, amplifiye edilmiş saf domuz jelatinlerine DNA'ların ait logaritmik PCR eğrileri, 1: Domuz türüne ait pozitif kontrol, 2: 100ng saf domuz jelatinine ait DNA



Şekil 12. Real-Time PCR cihazına ait yazılmdan alınan, amplifiye edilmiş saf sığır jelatine ait DNA'ların logaritmik PCR eğrileri, 1:Sığır türüne ait pozitif kontrol, 2: 100ng saf sığır jelatinine ait DNA

Tablo 7. SBYR Green Reat Time PCR analizi sonucunda alınan saf ve izole domuz jelatinlerine ait Ortalama Cq değerleri

Örnek No	**Cq**	**Örnek No**	**Cq**
Sığır poz. Kont. (100ng)	10.965±0.010	Domuz poz. Kont. (100ng)	11.359±0.005
Sığır saf jelatin	18.411±0.005	Domuz saf jelatin	21.979±0.007
Gıdalardan izole sığır jelatini (Ort. değer)	>35.00	Gıdalardan izole domuz jelatini (Ort.değer)	>35.00

Saf ve izole domuz ve sığır jelatinlerine ait Ortalama Cq değerleri incelendiğinde; saf jelatinin orijinini hem sığır ve hem de domuz türlerinde orijninin tespitinin mümkün olduğu ancak gıda örneklerinden izole edilen jelatinlerde tür tespitinin mümkün olmadığı ve bunun için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu ortaya konulmuştur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Artan tüketici bilinci gıda ürünleri içerisinde çok farklı amaçlarla oldukça geniş bir kullanımı bulunan jelatinin kaynağı ile olarak endişeleri artırmıştır. Bu nedenle gıda ürünlerinde kullanılan

jelatinin ait olduğu hayvan türünün belirlenmesine yönelik hassas ve güvenilir metotlar geliştirmek gerekli olmuştur.

Bu amaçla tamamlanan bu projede, öncelikle proteomik temelli, yeni bir teknik olan nanoUPLC-ESI-qTOF-MS^E tekniği kullanılmıştır. UPLC-ESI-qTOF-MS^E tabanlı bir belirleme tekniği ile domuz ve sığır jelatinlerine spesifik marker peptidleri birbirinden ayırt etmek mümkün olmuştur. Bu yöntem kullanılarak jelatin karışımlarında ve gıda ürünlerinde kullanılan sığır ve domuz türlerine ait jelatininin tespiti başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Gıda ürünlerine farklı seviyelerde katılan sığır ve domuz jelatinlerinin %0.1 seviyesine kadar tespit edilebileceği ortaya konulmuştur. Ancak söz konusu yöntemle, jelatin karışımlarında veya gıda ürünlerinde kullanılan jelatinin yüzde oranlarının kantitatif olarak belirlemek için daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Diğer taraftan projede ayrıca real-time PCR tekniği de gıdalardaki jelatinin orijinini tespit etmek için kullanılmıştır. Bu amaçla, gıda ürünlerden ve saf standart jelatin örneklerinden DNA ekstrakte edilerek, PCR denemeleri yapılmış, yapılan denemeler sonucunda saf standart jelatin örneklerinden real-time PCR cihazında pozitif sonuç alınırken, ürünlerde yapılan analizlerde başarılı sonuç alınamamıştır. Bunu sebebinin jelatinin üründen ekstraksiyonu sırasında kullanılan kuvvetli asitlerden (nitrik asit, pikrik asit) dolayı DNA'nın yapısının bozulmasından kaynaklandığı anlaşılmıştır. Bununla birlikte saf jelatin örneklerinden yapılan real-time PCR analizlerinde, sığır jelatininden izole edilen DNA'ların, domuz jelatininden izole edilen DNA'lara göre daha başarılı sonuç verdiği, bununda jelatin örneklerinden izole edilen DNA'ların içeriğindeki hedef bölgenin kopya sayısı ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Bu bağlamda gıdalardan asidik yöntemle ektrakte edilen jelatinin PCR ile analizinin sağlıklı ve tekrarlanabilir sonuçlar vermediği anlaşılmıştır. Bunun için daha farklı ekstraksiyon yöntemlerinin denenmesine ihtiyaç olduğu ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Aberle, E.D., Forrest, J.C., Gerrard, D.E., Edward, V.M., Hedrick, H.B., Judge, M.D. and Merkel, R.A. (2001). Principles of Meat Science, Kendall/Hunt Pub. Co. Iowa, US.
2. Adam, M. (1991). Osteararthritis Therapy with Collagen Prepartions: *Results of a Clinical Study*. Vol. 38. Germany: Deutsche Therapiewoche Karlsruhe, 2456-2461.
3. Anonymous (2005). EU directive 1999/724/EC. Avaible at: http://www.fsai.ie/legislation /food/eu_docs/Gelatine/Dec%201999.724%20EC.pdf. Accessed 21 February 2005.
4. Arbogast, B.W., Gunson, D.E.,& Kefalides, N.A. (1976). The role of hydroxylation of proline in the antigenicity of basement membrane collagen. The journal of Immunology, 117, 2181.
5. Bailey, A.J. (1987). The biological diversity of collagen: A family of molecules'in Adv. Meat Res. 4, 17.
6. Bailey, A.J. and Light, N.D. (1989). Genes, Biosynthesis and Degradation of Collagen in Connective Tissue in Meat and Meat Products. Elsevier Applied Science, London, UK.
7. Baziwane, D., He, Q. (2003). *Gelatin: The Paramount Food Additive.* Food Reviews İnternational Vol. 19, No. 4, pp. 423-435.
8. Bell, M.P., Neff, T.B., Polarek, J.W., & Seeley, T.W. (2001). Animal collagen and gelatins. World Patent, PCT/034647.
9. Boran, G.(2011). Bir gıda katkısı olarak jelatin: yapısı, özellikleri, üretimi, kullanımı ve kalitesi. Gıda, 36 (2), 97-104.
10. Calvo, J. H., R. Osta, and P. Zaragoza. (2002). *Quantitative PCR detection of pork in raw and heated ground beef and pate*. J. Agric. Food Chem. 50:5265-5267.
11. Chisholm, J., Conyers, C., Booth, C., Lawley, W., Hird, H. (2005). The detection of horse and donkey using real-time PCR. Meat Sci., 70, 727-732.
12. Cole, C.G.B. (2001). *Gelatine: Its Properties and Its Application in Dairy Products.* Presented at the Dairy Symposium 2001.
13. Dalmasso, A., E. Fontanella, P. Piatti, T. Civera, S. Rosati, and M. T. Bottero. (2004). *A multiplex PCR assay fort he identification of animal species in feedstuffs.* Mol. Cell Probes 18:81-
14. Djabourov, M., Lechaire, J., Gaill, F. (1993). Structure and rheology of gelatin and collagen gels. Biorheology, 30 (3-4), 191-205.
15. Gomez-Guillen, M.C., Turnay, J., Fernandez-Diaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A., Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different

marine species: a comparative study. Food Hydrocolloids, 16, (1), 25-34.

16. Gomez-Guillen, M.C., Lopez-Caballero, M.E., Lopez de Lacey, A., Aleman, A., Gimenez, B., Montero, P. (2010). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. In: E. Le Bihan, & N. Koueta (Eds.), Sea by products as a real material: New ways of application (pp 89-115). Kerala, India: Transworld Research Network Signpost, Chapter 7.
17. Gomez-Guillen, M.C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M.E., Montero, M.P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. Food Hydrocolloids, 25, 1813-1827.
18. Gökalp, H.Y., Kaya, M., Zorba, Ö. (1999). Et Ürünleri İşleme Mühendisliği. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi. Erzurum.
19. Haug, I.J., And Draget, K.I. (2009). Handbook of hydrocolloids (Second edition), Edited by G.O. Philips and P.A. Williams, Glyndwr University, UK. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, No:173, 948 pages.
20. Hou, H., Li, B., Zhao, X., Zhuang, Y., Ren, G., Yan, M., Yangpeng, C., Xiukun, Z., Li, C. (2009). The effect of pacific cod (Gadus macrocephalus) skin gelatin polypeptides on UV radiation induced skin photoaging in ICR mice. Food Chemistry, 115, (3): 945-950.
21. Jung, W.K., Karawita, R., Heo, S.J., Lee, B.J., Kim, S.K., Jeon, Y.J. (2006). Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogtamma*) back bone by pepsinolytic hydrolysis. Process Biochemistry, 41, 2097-2100.
22. Jung, W.K., Park, P.J., Byun, H.G., Moon, S.H., Kim, S.K. (2005). Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous instestine crude proteinase. Food Chemistry, 91, 333-340.
23. Kagan, H.M. (2000). Intra- and extracellular enzymes of collagen biosynthesis as biological and chemical targets in the control of fibrosis. Acta tropica, 77, 147-152.
24. Kim, S., Kim, Y., Byun, H., Nam, K., Joo, D., Shahidi, F. (2001). Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49 (4): 1984-1989.
25. Kim, S.E., and Mendis, E. (2006). Bioactive compunds from marine processing by products-a review. Food research International, 39, 383-393.
26. Kobayashi, T. (1996). Properties and functions of gelatin. Food Ingredients J. Jpn. 170:82-88.
27. Ledward, D.A. (2000). Handbook of hydrocolloids, Edited by G.O. Philips and P.A. Williams. UK. Woodhead Publishing in Food Science and Technology, 450 pages.

28. Lin, L., and Li, B. (2006). Radical scavenging properties of protein hydrolysates from Jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichitii* Steenstrup) skin gelatin. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86 (14), 2290-2295.
29. Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H., Kim, S. (2005). Investigation of jumbo squid (Dosidicus gigas) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effecs. Life Sciences, 77, (17): 2166-2178.
30. Mizuno, K., Hayashi, T., &Bächinger, H.P. (2003). Hydroxylation-induced stabilization of the collagen triple helix. Journal of Biological Chemistry, 278, 32373-32379.
31. Moskowitz, R.W. (2000). Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. Seminars in Arthritis and Rheumat., 30 (2), 87-89.
32. Ockerman, H.W. and Hansen, C.L. (1988). Animal By-product Processing. Ellis Horwood Ltd., Chichester England, 336p.
33. Rodriguez, M.A., García, T., González, I., Hernández, P.E., Martín, R. (2005). TaqMan real-time PCR for detection and quantitaion of pork in meat mixtures. Meat Sci., 70,113-120.
34. Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. Food Control 14, 579-583.
35. Schrieber, R., and Gareis, H. (2007). Gelatine Handbook. Theory and Industrial Practice, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim, 335p.
36. Silva, J.C., Gorenstein, M.V., Li, G.Z., Vissers, J.P.C., & Geromanos, S.J. (2006). Absolute quantification of proteins by LCMSE. Molecular&Cellular Proteomics, 5, 144-156.
37. Stainsby, G. (1987). Gelatin gels. In A. M. Pearson, T.R. Dutson, & A.J. Bailey (Eds.) Advances in meat research, collagen as a food, vol. 4(pp. 209-222). New York: Van Nostrand Reinhold Company Inc.
38. Veis, A. (1964). The Macromolecular Chemistry of Gelatin. New York and London: Academic Press, p. 196.
39. Venien, A. and Levieux, D. (2005). Differentiation of bovine from porcine gelatines using polyclonal anti-peptide antibodies in direct and competitive indirect ELISA. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 39 (2005) 418-424.
40. Vitagliano, L., Berisio, R., Mazzarella, L., & Zagari, A. (2001). Structural bases of collagen stabilization induced by proline hydroxylation. Biopolymers, 58, 459-464.
41. Ward, A. G. (1958). Conversion of collagen to gelatin, and chemical composition. In: Stainsby, ed. Recent Advances in Gelatin and Glue Research. London, New York, Paris, Los Angeles: Pergamon Press.
42. Yang, J., Ho, H., Chu, Y., Chow, C. (2008). Characteristic and antioxidant activity of

retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. Food chemistry, 110 (1), 128-136.

43. Yetim, H. (2011). Jelatin Üretimi, özellikleri ve kullanımı. 1. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi; Gıda katkı maddeleri: Sorunlar ve Çözüm önerileri, 86-94.
44. Zhang, G., Liu, T., Wang, Q., Chen, L., Lei, J., Luo, J., et. al. (2009). Mass spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin: A new method to differentiate between bovine and porcine gelatin. Food hydrocolloids, 23, 2001-2007.
45. Zhang, Y., Kouguchi, T., Shimizu, K., Sato, M., Takahata, Y., and Morimatsu, F. (2010). Chicken collagen hydrolysate reduces proinflammatory cytokine production in C57BL/6.KOR-ApoE^{shl} Mice. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, Vol. 56, p208-210.