

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HELAL GIDA KAPSAMINDA YUMUŞAK ŞEKERLEMELERDE
JELATİN KÖKENİNİN TESPİTİNDE SPEKTROSKOPİK VE
KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
METOT VALİDASYONU**

NUR ÇEBİ

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. OSMAN SAĞDIÇ**

İSTANBUL, 2018

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HELAL GIDA KAPSAMINDA YUMUŞAK ŞEKERLEMELERDE
JELATİN KÖKENİNİN TESPİTİNDE SPEKTROSKOPİK VE
KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
METOT VALİDASYONU**

Nur ÇEBİ tarafından hazırlanan tez çalışması 03/07/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Osman Sağdıç
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Prof. Dr. Muhammet Arıcı
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Osman Sağdıç
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Beraat Özçelik
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Canan Doğan
Tübitak Marmara Araştırma Merkezi

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Yaman
İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Salih Karasu
Yıldız Teknik Üniversitesi



Bu doktora tezi çalışması, “Gıdalara Normal veya Tağşiş Amaçlı Katılan Jelatin Kaynağının Tespiti İçin Yeni Yöntemlerin Geliştirilmesi” isimli TAGEM projesi tarafından ve TÜBİTAK 115O065 numaralı “Helal Gıda Denetimde Jelatin, Glutamat ve L-sisteinin Kaynağına Yönelik Hızlı, Ekonomik ve Pratik Tespit Metotlarının Geliştirilmesi, Uygulanması ve Yaygınlaştırılması” isimli 1003 Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı projesi tarafından desteklenmiştir

ÖNSÖZ

Öncelikle doktora eğitimim süresince bana destek olup yoluma ışık tutan, bilimsel çalışmalar yapabilmemiz için sınırsız imkânlar tanıyan çok değerli, çok sevdiğim danışman hocam Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ' a en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım süresince yardım ve bilgilerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Muhammet ARICI' ya saygı ve sevgilerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince her konuda benimle tecrübelerini paylaşan, her konuda limitsiz destek olan değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Tahsin YILMAZ' a en derin saygı ve sevgilerimle, yüreğten teşekkür ediyorum.

Tezimin zenginleşmesine katkıda bulunan, yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Canan EKİNCİ DOĞAN' a en içten dileklerle teşekkür ederim.

TÜBİTAK'taki çalışmalarım boyunca benimle tecrübelerini, birikimlerini ve bilgilerini paylaşan ve desteğini esirgemeyen TÜBİTAK MAM Çevre Enstitüsü araştırmacılarından Elmas ÖKTEM OLGUN' a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK'taki proje çalışmalarım süresince bana kendi bilgi ve tecrübelerini aktararak her konuda yardımcı olan çok değerli Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAN' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince yaptığımız bilimsel çalışmalara büyük katkı sağlayan Prof. Dr. Durmuş ÖZTÜRK ve proje asistanı Ayten Ekin MEŞE' ye özverileri için en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca sadece varlığı bile bana en büyük destek olan sevgili canım annem Gülizar ÇEBİ' ye ve sevgili babama sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Mayıs, 2018

Nur ÇEBİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	İX
KISALTMA LİSTESİ	X
ŞEKİL LİSTESİ.....	XI
ÇİZELGE LİSTESİ	XIII
ÖZET	XIV
ABSTRACT.....	XVI
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.1.1 Jelatin Tanımı ve Önemi.....	1
1.1.2 Jelatin Tarihi ve Üretimi	3
1.1.2.1 Kollajenin Tanımı ve Yapısı.....	5
1.1.3 Jelatinin Kullanım Alanları.....	6
1.1.3.1 İlaç Endüstrisinde Kullanımı	7
1.1.3.2 Fotoğrafçılıkta Kullanımı	7
1.1.3.3 Gıda Endüstrisinde Jelatin Kullanımı	8
1.1.4 Yumuşak Şekerlemeler	10
1.1.5 Helal Gıda Kapsamında Jelatin.....	11
1.1.6 Jelatinde Köken Tespiti ve Önemi.....	13
1.1.7 Jelatinde Köken Tespitine Yönelik Literatür Çalışmaları	14
1.1.8 Spektroskopik Metotlar.....	17
1.1.8.1 Titreşimsel Spektroskopi	17
1.1.8.2 FTIR Spektroskopisi	20
1.1.8.3 Raman Spektroskopisi	24
1.1.9 Kromatografik Metotlar	26
1.1.9.1 Sıvı Kromatografisi Sıralı Kütle Spektroskopisi (LC MS/MS).....	26
1.1.10 Gerçek Zamanlı (Real-Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	27
1.1.11 Kemometri	28
1.1.11.1 HCA (Hiyerarşik Kümeleme Analizi) and PCA.....	28
1.1.11.2 PLS-DA (Kısmi En Küçük Kareler-Ayırt Edici Analiz).....	29

1.1.11.3 GADA (Genetik Algoritmalar Ayırt Edici Analiz)	30
1.1.12 Tekstür Analizi	30
1.1.13 Renk Analizi	31
1.2 Tezin Amacı.....	31
1.3 Hipotez.....	32
BÖLÜM 2	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
2.1 Spektroskopik Metotların Geliştirilmesi.....	34
2.1.1 Standart Jelatinlerin FTIR analizi	34
2.1.1.1 FTIR Analizi Öncesi Saf Jelatinler İçin Numune Hazırlığı.....	34
2.1.1.2 FTIR Ölçümleri.....	35
2.1.1.3 Kemometrik Analiz.....	35
2.1.2 Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerleme Üretimi.....	36
2.1.2.1 Materyal	36
2.1.2.2 Yöntem.....	36
2.1.2.3 Yumuşak Şekerlemelerden Jelatin Ekstraksiyonu	37
2.1.3 Standart Jelatinlerin Raman Tekniği ile Analizi.....	37
2.1.3.1 Materyal	37
2.1.3.2 Raman Analizi Öncesi Saf Jelatinler İçin Numune Hazırlığı	37
2.1.3.3 Raman Çalışmaları İçin Ön Denemeler	38
2.1.3.4 Kemometrik Analiz.....	38
2.1.4 FTIR Çalışmaları için Farklı Konsantrasyonlarda Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerleme Üretimi	39
2.1.4.1 Materyal	39
2.1.4.2 Yöntem.....	39
2.1.5 Farklı Konsantrasyonlarda Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemelerin FTIR Analizlerinin Gerçekleştirilmesi.....	41
2.1.5.1 Materyal	41
2.1.5.2 FTIR Ölçümleri.....	41
2.1.5.3 Kemometrik Analiz.....	41
2.1.6 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerleme Üretimi	42
2.1.6.1 Materyal	42
2.1.6.2 Yöntem.....	42
2.1.7 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemelerin FTIR Analizinin Gerçekleştirilmesi	44
2.1.7.1 Materyal	44
2.1.7.2 FTIR Ölçümleri.....	44
2.1.7.3 Kemometrik Analiz.....	44
2.1.8 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemelerin Raman Analizinin Gerçekleştirilmesi	44
2.1.8.1 Materyal	44
2.1.8.2 Raman Analizi Öncesi Yumuşak Şekerlemeler İçin Numune Hazırlığı. 45	
2.1.8.3 Raman Ölçümlerinin Gerçekleştirilmesi	45
2.1.8.4 Kemometrik Analiz.....	45
2.2 Kromatografik Metotların Geliştirilmesi	45
2.2.1 Jelatinde Markör Peptitlerin Belirlenmesine Yönelik Nano LC-MS/MS Proteomiks Çalışması.....	45

2.2.1.1 Triptik Parçalama İşlemi.....	46
2.2.1.2 Nano LC-MS/MS çalışması.....	46
2.2.1.3 Markör Peptitlerin Belirlenmesi	46
2.3 Gerçek Zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmaları..	47
2.3.1 Materyal	47
2.3.2 DNA Ekstraksiyonu	48
2.3.3 DNA Çoğaltılması	48
2.4 Renk ve Tekstür Analizleri	48
2.4.1 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemelerin Tekstür Analizlerinin Gerçekleştirilmesi	48
2.4.1.1 Materyal ve Metot.....	48
2.4.1.2 İstatiksel Analiz	49
2.4.2 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemelerin Renk Analizlerinin Gerçekleştirilmesi.....	49
2.4.2.1 Materyal ve Metot.....	49
2.4.2.2 İstatiksel analiz	49
BÖLÜM 3	
BULGULAR VE TARTIŞMA	50
3.1 Spektroskopik Metotlar Kullanılarak Elde Edilen Bulgular.....	50
3.1.1 Standart Jelatinlerin FTIR Çalışmalarına İlişkin Spektral Bulgular	50
3.1.2 Standart Jelatinlerin FTIR Çalışmalarına İlişkin Kemometrik Bulgular	52
3.1.2.1 Saf Standart Jelatinlerin FTIR Çalışmalarına İlişkin Kemometrik Bulgular.....	52
3.1.2.2 Karışım Standart Jelatinlerin FTIR Çalışmalarına İlişkin Kemometrik Bulgular.....	54
3.1.3 Yumuşak Şekerlemelerden Ekstrakte Edilen Jelatinin Kemometrik Olarak Değerlendirilmesi	57
3.1.4 Standart Jelatinlerin Raman Çalışmalarına İlişkin Spektral ve Kemometrik Bulgular	58
3.1.5 Farklı Konsantrasyonlarda Üretilen Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerleme için FTIR ve Kemometri Bulguları	65
3.1.6 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemeler için FTIR ve Kemometri Bulguları	70
3.1.7 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemeler için Raman ve Kemometri Bulguları	78
3.2 Gerçek Zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmalarına İlişkin Bulgular.....	80
3.3 Kromatografik Metotlara İlişkin Bulgular	82
3.3.1 Jelatinde Markör Peptitlerin Belirlenmesine Yönelik Nano LC-MS/MS Proteomiks Çalışması Bulguları.....	82
3.4 Renk ve Tekstür Analizlerine İlişkin Bulgular	84
3.4.1 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemeler için Tekstür Analizi Bulguları.....	84
3.4.2 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemeler için Renk Analizi Bulguları	86
BÖLÜM 4	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	90

KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ	99



SİMGE LİSTESİ

A ⁰	Angstrom
DLaTGS	Triglisin sülfat
KBr	Potasyum bromür
kDa	KiloDalton
δ	Eğilme titreşimleri
ν	Gerilme titreşimleri

KISALTMA LİSTESİ

ANOVA	Varyans Analizi
ATR	Azaltılmış Tam Yansıma
DA	Ayırt Edici Analiz
ELISA	Enzim İlintili İmmün Test
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GADA	Genetik Algoritmalar ile Ayırt Edici Analiz
HCA	Hiyerarşik Kümeleme Analizi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HSI	Hiperspektral Görüntüleme
MIR	Orta Kızılötesi
MS	Kütle Spektroskopisi
NIR	Yakın Kızılötesi
RP	Ters Faz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCA	Temel Bileşen Analizi
PLS	Kısmi En Küçük Kareler
q-TOF	Quadrupole-Uçuş Zamanlı

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. 1 Kollajen, jelatin ve jelatin hidrolizatının şematik görseli	6
Şekil 1. 2 Kollajen proteininin moleküler organizasyonu	6
Şekil 1. 3 2006 yılına ait dünya ve Avrupa jelatin üretimindeki hammadde dağılımı ...	14
Şekil 1. 4 Titreşimsel uyarılma diyagramı. Bir elektronun temel hali (TH), titreşimsel uyarılma hali (TU), elektronik olarak uyarılmış hali (EU)	19
Şekil 1. 5 FTIR spektrometrenin şematik olarak gösterimi	21
Şekil 1. 6 Bir interferogram örneği	22
Şekil 1. 7 ATR kristali üzerinde gerçekleşen yansıma ve şematik gösterimi.....	23
Şekil 1. 8 Raman spektrometresinin şematik gösterimi.....	25
Şekil 1. 9 HPLC sistemimin şematik gösterimi.....	26
Şekil 3. 1 Balık, sığır ve domuz jelatinlerine ait FTIR spektrumu	51
Şekil 3. 2 Konsantrasyon ile ilişkili FTIR spektrumları. Sığır jelatini (a), domuz jelatini (b), balık jelatini (c).....	52
Şekil 3. 3 Sığır, domuz ve balık standart jelatin numunelerine ilişkin hiyerarşik kümeleme analizi dendrogramı.....	53
Şekil 3. 4 Sığır, domuz ve balık standart jelatin numunelerine ilişkin PCA kümeleme analizi sonuçları. a) İki boyutlu PCA grafiği, b) Üç boyutlu PCA grafiği.....	54
Şekil 3. 5 Standart sığır jelatini, standart domuz jelatini ve farklı oranlarda standart sığır-domuz jelatini karışım numuneleri için HCA dendrogramı (a) 1722-1487 cm ⁻¹ spektral bölgesi (b) 1722-1487 cm ⁻¹ ve 1313-1124 cm ⁻¹ spektral bölgesi	55
Şekil 3. 6 Standart sığır jelatini, standart domuz jelatini ve farklı oranlarda standart sığır-domuz jelatini karışım numuneleri için üç boyutlu PCA grafikleri (a) 1722-1487 cm ⁻¹ spektral bölgesi (b) 1722-1487 cm ⁻¹ ve 1313-1124 cm ⁻¹ spektral bölgesi	56
Şekil 3. 7 Yumuşak şekerlemeden ekstrakte edilen sığır jelatini numunesinin dahil edildiği hiyerarşik kümeleme analizi dendrogram	57
Şekil 3. 8 Yumuşak şekerlemeden ekstrakte edilen domuz jelatini numunesinin dahil edildiği hiyerarşik kümeleme analizi dendrogramı	58
Şekil 3. 9 Standart sığır ve domuz jelatinlerine ait Raman spektrumları	59
Şekil 3. 10 50x ve 20x objektifler kullanılarak elde edilen jelatine ait Raman spektrumları.....	60
Şekil 3. 11 Sığır ve domuz standart jelatin numunelerine ilişkin hiyerarşik kümeleme analizi Raman dendrogramı	60
Şekil 3. 12 Sığır ve domuz standart jelatin numunelerine ilişkin Raman PCA kümeleme analizi üç boyutlu grafiği.....	61
Şekil 3. 13 Ortalama değerleri alınan on iki adet (3'ü sığır, 9'u domuz) jelatin örneğine ait Raman spektrum grafiği.	62

Şekil 3. 14 Raman ölçümleri alınmış sığır (kırmızı) ve domuz (yeşil) jelatininin ilk iki temel bileşenine (PC1 ve PC2) ait skor grafiği.....	63
Şekil 3. 15 Raman ölçümleri alınmış sığır (kırmızı) ve domuz (yeşil) jelatininin ilk üç temel bileşenine (PC1,PC2 ve PC3) ait skor grafiği.....	63
Şekil 3. 16 Raman ölçümleri alınmış sığır (kırmızı) ve domuz (yeşil) jelatinine ait iki grubun (A ve B) birbirlerine uzaklık grafikleri.....	64
Şekil 3. 17 Seçilen dalga boylarının frekans dağılım grafiği.....	64
Şekil 3. 18 Skor ve yükleme vektörlerinin (PC1 vs PC2) biplot grafiği	64
Şekil 3. 19 Üç farklı yüzde (%1, %5, %10) jelatin içeriğine sahip 48 adet yumuşak şekerleme numunesine (dokuz farklı tür domuz, altı farklı türde sığır ve bir tür balık) ait FTIR spektrumları.....	65
Şekil 3. 20 Model oluşturmada kullanılan 21 adet domuz, 15 adet sığır ve 2 adet balık yumuşak şekerlemelere ait PRESS grafiği.	66
Şekil 3. 21 48 adet yumuşak şekerleme örneğinin ilk üç temel bileşenine (PC1, PC2 ve PC3) ait skor grafiği.....	67
Şekil 3. 22 Model oluşturmada kullanılan 20 adet domuz, 15 adet sığır ve 2 adet balık yumuşak şekerlemelerine ait PRESS grafiği.	67
Şekil 3. 23 47 adet yumuşak şekerleme örneğinin ilk üç temel bileşenine (PC1, PC2 ve PC3) ait skor grafiği.....	68
Şekil 3. 24 Kalibrasyon setini oluşturan örnek spektrumları (mavi), bilinmeyen ticari örnek spektrumları (sarı), mavi ve sarı spektrumlar arasındaki fark (kırmızı)	69
Şekil 3. 25 Daraltılmış FTIR spektrumu kullanılarak 47 adet yumuşak şekerleme örneğinin ilk üç temel bileşenine (PC1, PC2 ve PC3) ait skor grafiği.	69
Şekil 3. 26 Daraltılmış FTIR spektrumu kullanılarak 47 adet yumuşak şekerleme örneğinin ve 10 adet bilinmeyen örneğin ilk üç temel bileşenine (PC1, PC2 ve PC3) ait skor grafiği.	70
Şekil 3. 27 (A) Laboratuvarında üretilen yumuşak şekerlemelerin FTIR spektrumu (Sükroz+Fruktoz) (I), Laboratuvarında üretilen yumuşak şekerlemelerin FTIR spektrumu (Sükroz+Glikoz) (II) Laboratuvarında üretilen yumuşak şekerlemelerin FTIR spektrumu (Sükroz+Maltoz)(III) (B) Laboratuvarında üretilen ve ticari yumuşak şekerlemeleri temsil eden FTIR spektrumları ...	71
Şekil 3. 28 (A) 30 farklı yumuşak şekerleme örneği için HCA analizi (Ward algoritması) denrogramı (B) Toplam 30 yumuşak şekerleme örneği için iki ve üç boyutlu PCA analizi grafikleri	74
Şekil 3. 29 Yumuşak şekerlemeler (YŞ) için PLS-DA sınıf tahmin (kalibrasyon-kros validasyon) grafikleri	75
Şekil 3. 30 Yumuşak şekerleme örneklerinin HCA analizi (Ward algoritması) ile şeker kompozisyonuna göre sınıflandırılması.....	77
Şekil 3. 31 Laboratuvarında üretilen yumuşak şekerlemelerin (30 adet) Raman spektrumları	79
Şekil 3. 32 (A) 30 farklı yumuşak şekerleme örneğinin Raman analizi için HCA (Ward algoritması) denrogramı (B) Toplam 30 yumuşak şekerleme örneği için iki ve üç boyutlu PCA analizi grafikleri (Raman Analizi).....	80
Şekil 3. 33 Nano-LC-MS/MS çalışması standart jelatin toplam iyon kromatogramları. a) Halavet sığır jelatini, b) Sigma 9282 sığır jelatini, c) Sigma G2500 domuz jelatini, d) Sigma 2625 domuz jelatini.....	83
Şekil 3. 34 Yumuşak şekerlemeler (YŞ) için renk değerlerine (L^* , a^* , b^*) karşılık sütun grafikleri.....	89

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1. 1 Bazı jelatinlerin amino asit kompozisyonları (g/100g)	2
Çizelge 1. 2 Jelatini diğer kıvam vericilerden ayıran özellikler	2
Çizelge 1. 3 Jelatinin tipik özellikleri	4
Çizelge 1. 4 Tip I, II ve III kollajenlere ilişkin genel özellikler	7
Çizelge 1. 5 Jelatinin fonksiyonel özellikleri ve kullanıldığı ürünler.....	8
Çizelge 1. 6 Gıda uygulamalarında jelatinin avantaj ve dezavantajları.....	9
Çizelge 2. 1 Kullanılan standart sığır, domuz ve balık jelatini numuneleri.....	35
Çizelge 2. 2 Raman çalışmasında kullanılmış olan standart sığır ve domuz jelatin numuneleri	38
Çizelge 2. 3 FTIR çalışmasında kullanılan yumuşak şekerlemelere ait jelatin tür ve konsantrasyonları.....	40
Çizelge 2. 4 Farklı şeker ve jelatin içerikli yumuşak şekerlemelere ait içerik bileşimi .	43
Çizelge 2. 5 Nano LC-MS/MS analizinde kullanılan metot parametreleri.....	47
Çizelge 3. 1 Yirmi test örneği için ATR-FTIR sonuçlarının ve PCR sonuçlarının karşılaştırması	82
Çizelge 3. 2 Enzimatik olarak parçalanmış sığır ve domuz jelatinleri için tanımlanan markör peptitler	84
Çizelge 3. 3 Yumuşak şekerleme örnekleri için tekstür analizi sonuçları	86
Çizelge 3. 4 Yumuşak şekerleme örnekleri için renk analizi sonuçları	87

HELAL GIDA KAPSAMINDA YUMUŞAK ŞEKERLEMELERDE JELATİN KÖKENİNİN TESPİTİNDE SPEKTROSKOPİK VE KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE METOT VALİDASYONU

Nur ÇEBİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Eş Danışman: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Jelatin gıda endüstrisinde sağladığı eşsiz fonksiyonel özellikler sebebi ile yaygın şekilde kullanım alanı bulmaktadır. Genel olarak jelleştirme, koyulaştırma ve stabilizasyon amaçları ile kullanılmaktadır. Diğer fonksiyonel özellikleri ise tekstür geliştirici, emülsifiye edici ve yapı düzenleyici olması olarak sıralanabilir. Jelatin sahip olduğu eşsiz teknolojik özellikler ile gıda sektöründe arzulanan bir çok ürün özelliğini iyileştirebilmektedir. Yaygın olarak, yumuşak şekerlemeler, jöleler, sütlü tatlılar ve marşmelovlarda kullanılmaktadır.

Jelatin genel olarak, sığır eti, sığır kemiği ve domuz derisinden elde edilen kollajenin ısısal hidrolizi ile elde edilmektedir. Jelatin üretiminde kullanılan en yaygın kaynaklar sığır ve domuz kökenlidir. Sektörde talep edilen jelatin ihtiyacını karşılayabilmek için dünya genelinde jelatin ithalat ve ihracatı önem arz etmektedir. Farklı toplumların jelatinin elde edildiği kaynak hakkında hassasiyetleri olabilmektedir özellikle Müslüman toplumların helal gıda kapsamında jelatin kökenine yönelik tedirginlikleri mevcuttur bu sebeple jelatin kökeninin tespitine yönelik yeni, güçlü ve güvenilir metotların geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışması kapsamında yumuşak şekerlemelerin bileşiminde bulunan jelatinin kökeninin tespitine yönelik spektroskopik ve kromatografik teknikler kullanılarak metot geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Tez çalışmasının genelinde FTIR ve Raman spektroskopisi LC-MS/MS kromatografik tekniği ve RT-PCR teknikleri kullanılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında standart jelatinlerin kökeninin belirlenmesine yönelik FTIR ve kemometri temelli yöntemler geliştirilmiştir. Standart jelatinlerin FTIR spektroskopisi tekniği kullanılarak başarılı bir şekilde orijine göre sınıflandırılabilirdiği görülmüştür. Benzer şekilde Raman spektroskopisi ile standart jelatinlerin kökenine göre ayırt edilebildiği tespit edilmiş ve kemometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Raman tekniği ile standart jelatinler kökenine göre ayırt edilebilmiştir. Saf jelatinlerin ve jelatin karışımlarının kökeninin tespitine yönelik yeni FTIR temelli bir metod geliştirilmiştir. Tez kapsamında geniş çeşitlilikte ve farklı şeker kompozisyonlarında yumuşak şekerleme üretimi yapılmış ve yumuşak şekerlemeler herhangi bir ön hazırlık yapılmaksızın başarılı bir şekilde FTIR tekniği kullanılarak sığır ve domuz kökenine sahip olmaları yönünden ayırt edilebilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, FTIR tekniği yumuşak şekerlemelerin kökeninin tespitinde daha başarılı sonuçlar vermiştir. Çalışmalar kapsamında HCA, PCA, PLS-DA ve GADA kemometrik teknikleri etkin şekilde kullanılmıştır. Elde edilen bulgular referans bir teknik olan RT-PCR tekniği ile doğrulanmıştır. Ayrıca, LC-MS/MS tekniği kullanılarak jelatinler için markör peptitler belirlenmiştir. Bu çalışma ile jelatinlerin kökeninin nano-LC-MS/MS kromatografi tekniği ile belirlenebileceği görülmüştür.

Elde edilen bulgular doğrultusunda saf jelatinin ve yumuşak şekerlemelerde bulunan jelatinin kökeninin geliştirilen yeni FTIR temelli yöntemle tespitinin mümkün olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Jelatin, yumuşak şekerleme, helal gıda, FTIR, Raman, LC-MS/MS, Kromatografi, HCA, PCA, PLS-DA, GADA, RT-PCR.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SPECTROSCOPIC AND CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES AND VALIDATION OF METHODOLOGIES FOR DETERMINATION THE SOURCE OF GELATIN IN GUMMY CANDIES IN THE SCOPE OF HALAL FOOD

Nur ÇEBİ

Department of Food Engineering

PhD. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Co-Adviser: Prof. Dr. Muhammet ARICI

Gelatin is widely used in food industry due to its favorable and unique functional properties. Generally, gelatin is used as gelling, thickening and stabilizing agent. Other functional properties of gelatin can be listed as texturization, emulsification and adhesiveness. Food producers utilize from gelatin for its favorable functional properties in a wide variety of food stuffs such as gummy candies, jellies, milk desserts, marshmallows and more. Mainly porcine and bovine gelatins are produced and exports and imports of them occur around the world in order to respond to the demands of especially confectionery sector. At this point, authentication of the gelatin comes into prominence since communities including Muslims, Hindus and vegetarians have sensivity and selectivity in consumption of certain ingredients. However most of the commercial gelatin is produced from pork meat and skin since pork has been cheaper. When we consider the status in Turkey, gelatin production does not occur at a level that satisfies the demand of the industry therefore most of the gelatin is imported from other countries. In this case, control mechanisms of government should determine the origin of gelatin both in pure state and in the product. Namely, there is an essential necessity for building reliable and strong methods in order to detect the origin of commercial gelatin and detect the source of gelatin as an ingredient in food products.

The objective of this thesis was to develop a rapid spectroscopic technique as an alternative method for the differentiation and authentication of gelatin sources in food

products by using Fourier transform infrared (ATR–FTIR) spectra combined with chemometrics. Clear discrimination and classification of all the studied gelatin sources (bovine, porcine, and fish) were achieved by hierarchical cluster and principle component analysis (PCA). Moreover, ATR–FTIR spectral data successfully discriminated pure bovine gelatin from mixture of bovine and porcine gelatins. Raman spectroscopic techniques combined chemometrics were successfully applied in order to determine the origin of gelatin. Raman spectroscopy and chemometrics of HCA, PCA and GADA were successfully applied for determination the source of standard gelatins (bovine, porcine). Additionally, marker peptides for standard gelatins were determined using nano LC-MS/MS study.

In this thesis study, for the first time, FTIR-ATR technique combined chemometrics of HCA (hierarchical cluster analysis) and PCA (principal component analysis) were used with the aim of building a new, rapid, effective, non-destructive and cost-effective method in order to determine the origin of gelatin in gummy candies. In addition PLS-DA (partial least squares-discriminant analysis) was performed for calibration and cross-validation using Matlab programming (Matlab R2017b - MathWorks Inc., Natick, MA). Eventually, results of test samples were validated using a real-time PCR based method.

Keywords: Gelatin, FTIR, gummy candy, Raman, Halal Food, Chromatography, LC-MS/MS, HCA, PCA, PLS-DA, GADA, RT-PCR

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Jelatin Tanımı ve Önemi

Jelatin, köpük önleyici, kıvam artırıcı, jelleştirici, emülgatör, çöktürücü ve mikro enkapsüle edici ajan olarak gıda endüstrisinde çeşitli amaçlarla kullanılan ve önemli teknolojik özellikleri olan suda çözünebilen bir proteindir [1, 2]. Jelatin yüksek molekül ağırlıklı bir polipeptit olmakla birlikte önemli bir hidrokolloiddir. Jelatin, triptofan dışındaki tüm esansiyel aminoasitleri içeren sindirilebilir bir proteindir [3]. Jelatinin protein içeriği %85-92 arasında değişim göstermektedir ve yapısındaki diğer bileşenler ise mineral tuzlar ve kurutma sonrasında kalan sudur. Tam hidroliz ile bazı jelatinlerden elde edilebilen çeşitli aminoasitler (g/100g) Çizelge 1.1’de sunulmuştur [4]. Jelatinin diğer hidrokolloidlerden farklı olmasının sebebi, diğer hidrokolloidlerin çoğunun polisakkarit yapıda olmasıdır. Çizelge 1.1’de görüldüğü üzere jelatin yapısında bir çok farklı amino asiti ihtiva eden bir proteindir. Amino asit kompozisyonu jelatin türleri arasında farklılık göstermektedir. Özellikle prolin ve hidroksiprolin türden türe kompozisyonel olarak farklılık göstermektedir. Farklı kimyasal yapısı ve fonksiyonel özellikleri ile jelatini diğer kıvam vericilerden ayıran özellikler Çizelge 1.2’de sunulmuştur. Jelatin bir hidrokolloid olarak gıda endüstrisinde yaygın şekilde kullanım alanı bulmaktadır. Özellikle, meyve sularında, gazlı içeceklerde, berraklaştırıcı olarak jelatinden yararlanılmaktadır [5]. Aynı zamanda şekerleme sektöründeki, yumuşak şekerlemelerde, jölelerde ve tatlılarda jelleştirici olarak kullanılmaktadır [2]. Özellikle, meyve sularında, gazlı içeceklerde, berraklaştırıcı olarak jelatinden yararlanılmaktadır [5].

Çizelge 1. 1 Bazı jelatinlerin amino asit kompozisyonları (g/100g)

	Tip A (Domuz Derisi)		Tip B (Sığır Derisi)		Tip B (Kemik)	
Alanin	8,6	10,7	9,3	11	10,1	14,2
Arjinin	8,3	9,1	8,55	8,8	5	9
Aspartik asit	6,2	6,7	6,6	6,9	4,6	6,7
Sistin	0,1	0	İz miktar		İz miktar	
Glutamik asit	11,3	11,7	11,1	11,4	8,5	11,6
Glisin	26,4	30,5	26,9	27,5	24,5	28,8
Histidin	0,9	1	0,74	0,8	0,4	0,7
Hidroksilizin	1	0	0,91	1,2	0,7	0,9
Hidroksiprolin	13,5	0	14	14,5	11,9	13,4
İzolösin	1,4	0	1,7	1,8	1,3	1,5
Lösin	3,1	3,3	3,1	3,4	2,8	3,5
Lizin	4,1	5,2	4,5	4,6	2,1	4,4
Metiyonin	0,8	0,9	0,8	0,9	0	0,6
Fenilalanin	2,1	2,6	2,2	2,5	1,3	2,5
Proline	16,2	18	14,8	16,4	13,5	15,5
Serin	2,9	4,1	3,2	4,2	3,4	3,8
Treonin	2,2	0	2,2		2	2,4
Tirozin	0,4	0,9	0,2	1	0	0,2
Valin	2,5	2,8	2,6	3,4	2,4	3

Çizelge 1. 2 Jelatini diğer kıvam vericilerden ayıran özellikler [5].

Jelatin	Diğer Kıvam Arttırıcılar
Çok fonksiyonludur (Jelleştirici, kıvam arttırıcı, emülsifiye edici, köpük önleyici, film oluşturucu)	Jelatinin sahip olduğu özelliklerin hepsine aynı anda sahip değildirler. Her fonksiyon için ayrı kıvam arttırıcı kullanmak gerekir.
Geri dönüşümlü bir jel oluşturur, vücut sıcaklığında eriyebilmesi en önemli özelliklerindedir.	Jelatine göre daha yüksek erime sıcaklığına sahiptirler.
Kollajenin hidroliz derecesine göre farklı jel gücünde ve sıcaklıklarda üretilebilir.	Diğer kıvam arttırıcılarda farklı jel gücü için şeker ve tuz gibi bileşenlerin ilave edilmesi gerekir.
Tam ve kolay olarak sindirilebilir.	Bazı kıvam arttırıcılar minerallerin emilimini düşürebilir.
Gıdaların normal pH değerinde fonksiyonunu yerine getirebilir.	Jelleşmeleri için tuz, şeker ve gıda asitlerine gereksinimleri vardır.

Aynı zamanda şekerleme sektöründeki, yumuşak şekerlemelerde, jölelerde ve tatlılarda jelleştirici olarak kullanılmaktadır [2]. Jelatinin tercih edilmesinin en önemli sebebi çok fonksiyonlu bir hidrokolloid olmasıdır. Jelatin, jelleştirici, koyulaştırıcı, emülsifiye edici, köpük oluşturucu ve su bağlayıcı özelliklerin hepsini sağlayabilmesine rağmen

başka hiçbir hidrokolloidin tek başına bahsedilen fonksiyonları sağlayabilme özelliği bulunmamaktadır [2]. Gıda uygulamalarında, kuru ağırlığın %8-10 'u olacak şekilde tatlılarda, gıda kaplamalarında, vitamin kapsüllerinde yer almaktadır.

1.1.2 Jelatin Tarihi ve Üretimi

Jelatin doğada serbest halde bulunmaz ve omurgalı hayvanların kollajen içermeyen kısımlarından elde edilmesi mümkün değildir. Jelatinin bitkisel bir kaynağı yoktur ve jelatin ile bitkisel jelatin olarak adlandırılan maddeler arasında bir kimyasal ilişki yoktur. Jelatin üretimi ilk çağlardan beri gerçekleşmektedir ve kullanımı giderek artmaktadır. Ticari jelatinin ilk üretimi 1685 yıllarında Hollanda'da gerçekleştirilmiştir ve kısa bir süre sonra İngiltere'de 1700 yıllarında ticari jelatin üretimi gerçekleştirildi. 1808 yıllarında ise Amerika'da ilk ticari jelatin üretimi yapılmıştır [4]. Gıda endüstrisi yönünden, jelatin bir gıda katkısıdır ve genel olarak güvenilir (GRAS) kabul edilmiştir. 1993 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) jelatinin bu durumunu onaylamış ve Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak uzmanları Komitesi (JECFA) 1970 yılında jelatinin kullanımına herhangi bir sınır getirmemiştir ki dolayısıyla bir engel olmaksızın üretimi ve kullanımı gerçekleştirilmiştir [1]. Dünya genelinde yaklaşık 400 bin ton civarında jelatin üretimi gerçekleşmekte ve bu miktarın yaklaşık %65 i Avrupa'da gerçekleşmektedir.

Ülkemizde yılda 5.000 ton civarında jelatin tüketilmektedir [6]. Genel anlamda ihtiyaç ithalat ile karşılanmaktadır fakat yerel üretim de mevcuttur. Balıkesir, Kocaeli ve İstanbul illerinde jelâtin üretimi yapan Halavet, SelJel ve BB Tarım Gıda San. ve Tic. Şti. arasında en fazla kapasite ile üretim yapan SelJel'dir. Ancak bu firmaların toplam üretimi 5.000 ton/yıl civarındadır. Ülkemizde gerek yerli gerek ithal jelatin tüketimi tercih doğrultusunda gerçekleşmektedir.

Jelatin genel olarak üretici için makul miktarlarda ve maliyette olan kollajen kaynaklarından üretilmektedir. Yaygın olarak, sığır ve domuz gibi hayvanların bağ dokularından ekstrakte edilen kollajenin kontrollü şartlarda kısmi hidrolizi ile üretilen bir proteindir [6]. Başka bir deyişle, kollajen hidrolizi jelatin üretimi süresince gerçekleşen temel prostestir. Ham maddenin jelatine dönüşümü beş adımda gerçekleşmektedir. Bu aşamalar, yıkama (1), ekstraksiyon (2), saflaştırma (3), koyulaştırma (4) ve kurutma (5) olarak sıralanabilir [1].

Jelatin üretiminde asit ve alkali üretim prosesleri uygulanır:

- Asit prosesin de genel olarak domuz derisi, balık derisi ve bazen kemik kullanılmaktadır. Söz konusu asit prosesinde, kollajen pH 4 değerine getirilir ve ardından 50 °C' den artırılarak kaynama noktasına kadar ısıtılır ve denatüre edilir. Kollajen A tipi jelatine çözülebilecek hale getirilir.
- Alkali proses ise genel olarak sığır derisi üzerinde uygulanır. Ekstraksiyon öncesi, kollajene kostik soda ve kireçleme prosesi uygulanır ve bu şekilde asparajinler ve glutimin yan zincirleri hızlıca glutamik asit ve aspartik asite hidroliz olur.
- Ekstrakte edilen jelatin çözeltisi silisli topraktan filtre edilir böylece süspanse olmuş yağ gibi çözünmeyenler ve hidroliz olmamış kollajen lifleri uzaklaştırılır ayrıca pH değerinin 5-5,8 değerine ayarlanması ürünün satış için uygun hale gelmesini sağlar.
- Üretimin son aşaması ise dehidrasyon sterilizasyon ve kurutma aşamalarından oluşmaktadır. Bu üç temel işlem son ürün jelatinin fizikokimyasal özelliklerini koruma amacı ile mümkün olduğunca hızlı gerçekleştirilir.

Nihai ürün olarak elde edilen jelatinin gıda endüstrisinde uygunluğunu belirlemek amacı ile jelleştirme gücü, viskozite, renk, berraklık, pH, nem, kül, SO₂, ağır metal ve mikrobiyal yük gibi bir çok analiz gerçekleştirilir. Bir jelatinin sahip olması gereken özellikler Çizelge 1.3'te sunulmuştur.

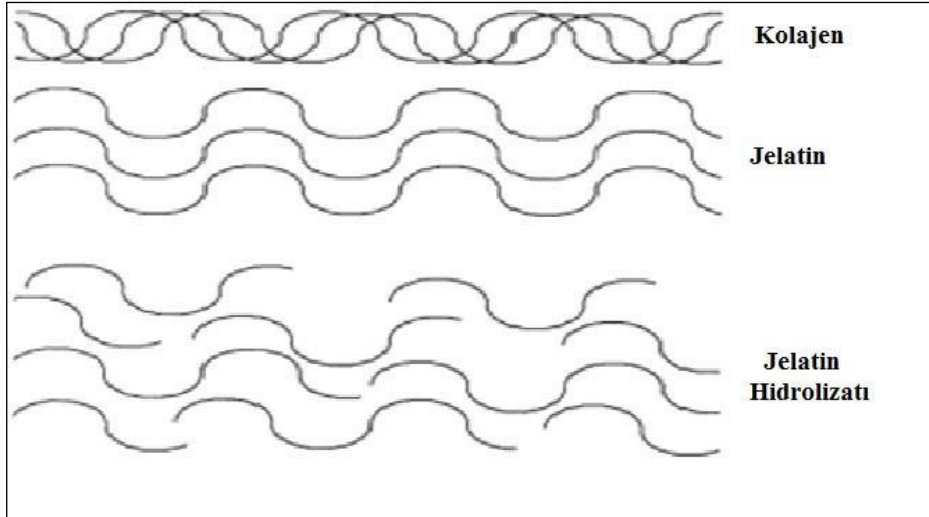
Çizelge 1. 3 Jelatinin tipik özellikleri [1]

Test	Kabul edilebilirlik
Jel gücü	Değişken
Viskozite	Değişken
Renk ve berraklık	Beer yasasına uygun olmalı
pH	5
Nem içeriği	% 10-% 13
Kül içeriği	maksimum % 2,5
Sülfür dioksit içeriği	<200 ppm
Mikrobiyal yük	maksimum 1000 mezofilik sayım (Bazı ülkelerde coliform, E. coli, Salmonella, Clostridium sporları, Staphylococci ve Pseudomonas için limitler bildirilmiştir)

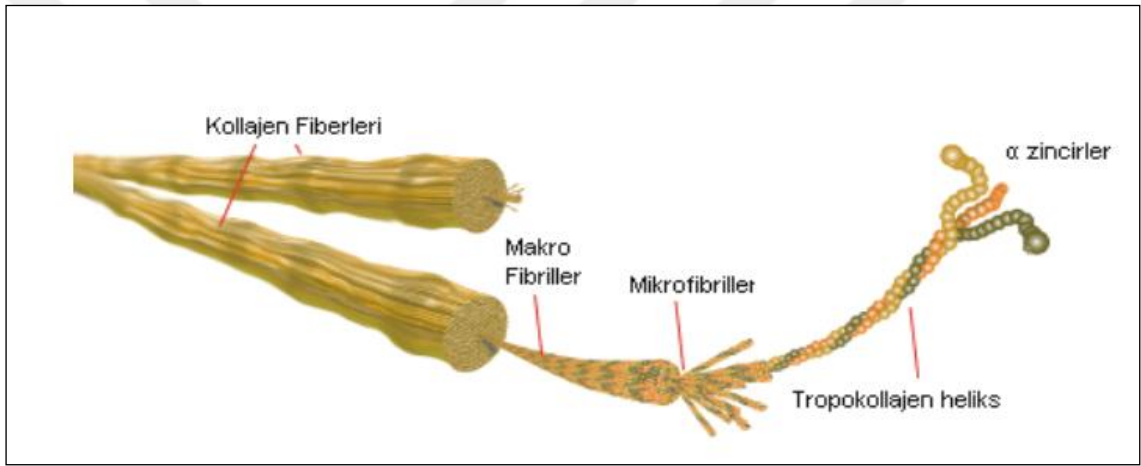
1.1.2.1 Kollajenin Tanımı ve Yapısı

Kollajen sadece hayvanlarda bulunan, deri, kemik, tendon ve bağ dokunun temel yapı taşı olan yapısal bir proteindir. Kollajenin temel yapısı üç adet çoklu prolin zincirinin oluşturduğu üçlü sarmaldır. Prolin zincirlerinde bulunan her üç aminoasitten biri glisindir. Glisin (Gly) üçlü sarmal yapının oluşumunda büyük role sahiptir ve bir kollajen molekülüne karakterisik özellik kazandırmaktadır [5]. Başka bir deyişle her kollajen türü üç polipeptit zincirinden oluşur ve en az biri Gly-X-Y şeklindedir. X ve Y pozisyonları genellikle sırasıyla prolin ve hidroksiprolin olarak bilinmektedir [7]. Sadece memeli proteinleri yüksek miktarlarda hidroksiprolin ve hidroksilizin içerir ve toplam imino asit içeriği yüksektir. Jelatinin amino asit kompozisyonu kaynağı olan kollajen ile oldukça benzerdir ve tekrar eden Gly-X-Y tripletleri ile karakterize edilir. X genel olarak prolin ve Y genel olarak daha çok hidroksiprolindir [8].

Üçlü sarmal yapıda bulunan her zincir saat yönünün tersinde döner. Bu üçlü helis yapıda yaklaşık 300 nm uzunluğundadır ve zincir yaklaşık olarak 10^5 kDa molekül ağırlığındadır [9]. Polipeptit alt zincirlerinden oluşan söz konusu α -zincirler ortak bir eksen etrafında dönerek 3000 \AA uzunluğunda ve 15 \AA çapında katı bir çubuk benzeri moleküller oluştururlar. Bu zincirler, mikro fibrilleri, mikro fibriller makro fibrilleri ve daha sonra da makro fibriller bir araya gelerek kollajen fiberlerini meydana getirirler [6]. Kollajen proteinin moleküler organizasyonuna ilişkin yapı Şekil 1.2'de gösterilmiştir. Jelatinin kaynağı olan kollajenin molekül ağırlığı 330 kDa olarak bilinmektedir. Jelatin üretimi için kollajenin hidrolizi sırasında peptit bağları kopar ve α -zincirler küçük parçalara ayrılır. Kollajenin bu parçalanma ürünlerinden ağırlığı 30 kDa'dan fazla olanlarına jelatin denilirken 30kDa'dan az olanlarına ise jelatin hidrolizatı denmektedir [10]. Başka bir deyişle, jelatin üretim sürecinde kollajen asit veya alkali çözeltilerle hidroliz edilir, kollajenin yapısında bulunan çapraz bağlar ve hidrojen bağları kısmen yıkıma uğrar. Uzun amino asit zincirleri parçalanarak daha küçük (kısa) peptit zincirleri oluşur, aralarındaki bağlar zayıfladığı için su molekülleri yapı arasına girebilmektedir. Dolayısıyla suda çözünebilir ve jelatin diye adlandırılan yeni bir yapının oluşumu gözlenmektedir. Kollajen, jelatin ve jelatin hidrolizatına ilişkin görsel Şekil 1.1'de sunulmuştur. Genel anlamda kollajen terimi deride, tendonlarda ve kemiklerde bulunan kollajeni ifade eder. On farklı hayvansal kaynaklı kollajen tanımlanmıştır. Tüm kollajenler eşsiz bir üçlü heliks yapısına sahiptir. Deri, tendon ve kemiğin baskın kollajeni tip 1 kollajendir.



Şekil 1. 1 Kollajen, jelatin ve jelatin hidrolizatının şematik görseli [5]



Şekil 1. 2 Kollajen proteininin moleküler organizasyonu [6]

Tip II kollajen temel olarak kırıkdağ için eşsizdir. Tip III kollajen ise tip I kollajen ile bağlantılı olarak yetişkin derisinde (%5-10) bulunmaktadır [11]. Kollajen kompozisyonu tüm yirmi çeşit amino asidi kapsamaktadır. Farklı kaynaklardan üretilen kollajenlerde elde edildikleri kaynağa göre kompozisyonel olarak farklılıklar görülmektedir fakat tüm kollajenler için karakteristik ve ortak olan belirli özellikler mevcuttur. Tip I, II ve III kollajenler yaygın olarak bulunmaktadır ve bu kollajenlerin genel özellikleri kısaca Çizelge 1.4'te sunulmuştur.

1.1.3 Jelatinin Kullanım Alanları

Jelatin, gıda, kozmetik, ilaç, fotoğraf ve boya endüstrisinde yaygın olarak kullanım alanı bulmaktadır [3]. Bahsi geçen tüm alanlarda önemli ve spesifik rollere sahiptir. Jelatinin bu alanlardaki önem ve özellikleri genel olarak anlatılmıştır.

Çizelge 1. 4 Tip I, II ve III kollajenlere ilişkin genel özellikler [8]

Tip	Tanım
Tip I	Bu tip kollajen yaygın olarak deri kemik ve tendonlar gibi bağ dokularında bulunur.
Tip II	Bu tip kollajen özellikle kırıkta dokularında bulunmaktadır.
Tip III	Bu tip özellikle yaşa bağlıdır: çok genç deri %50 oranına kadar içerirken, zaman ilerledikçe %5-10 değerine kadar düşer
Diğer tipler	Diğer tiplerdeki kollajen çok düşük miktarlarda bulunur ve bunlar daha çok organlara özgüdür.

1.1.3.1 İlaç Endüstrisinde Kullanımı

İlaç endüstrisi tarafından temin edilen jelatinin en büyük kısmı yumuşak ve sert jelatin kapsülleri, tabletleme, tablet kaplaması, granülasyon, enkapsülasyon ve mikroenkapsülasyon için kullanılmaktadır. Jelatinin kullanım amacı ise oksidasyonu önlemesi ve daha makul ürün hazırlığı sağlamasıdır [4]. Farklı jelleştirme gücüne (0-140 arasında) sahip olan jelatinler A, D ve E vitaminlerinin enkapsülasyonu için kullanılmaktadır [3]. Jelatin kapsüller genel olarak çeşitli gıdaların, gıda takviyelerinin ve ilaçların enkapsülasyonu için kullanılmaktadır. Böylece kapsüllenen maddeler nemden, sıcaklıktan ve diğer istenmeyen durumlardan korunabilecektir ve ürün stabilizasyonu sağlanmış olmaktadır [12]. Benzer şekilde jelatin özellikle aşılarda kullanılmak üzere ilaç formülasyonlarında yardımcı madde olarak ve tabletlerde ise bağlayıcı olarak kullanılmaktadır [13].

1.1.3.2 Fotoğrafçılıkta Kullanımı

Kolodyum ıslak prosesi yerine jelatin emülsiyonu kullanılabilir. Yıllar geçtikçe jelatin emülsiyonları sürekli olarak hız ve kalite yönünden geliştirilmiştir. Jelatin halen fotoğraf emülsiyon prosesi yönünden en iyi ortam olarak bilinmektedir [4]. Jelatin, fotoğraf filminin maruz bırakıldığı fotoğrafik geliştiricinin bir bileşenidir. Jelatin, fotoğraf geliştiriciye maruz kalan ve kalmayan kristallerin ayırt edilmesine katkı sağlayarak, kolaylaştırır.

1.1.3.3 Gıda Endüstrisinde Jelatin Kullanımı

Tatlı ve şekerlemelerde, süt ürünlerinde, fırın ve pastacılık ürünlerinde, et ürünlerinde ve içecek endüstrisinde yaygın kullanım alanına sahiptir [14]. Jelatin, kimyasal yapısından dolayı birçok fonksiyonel özelliğe sahiptir. Jelatin, köpük önleyici, kıvam artırıcı, jelleştirici, emülgatör, çöktürücü ve mikro enkapsüle edici ajan gibi fonksiyonel özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde özellikle şekerleme ürünlerinde çok yaygın olarak kullanılmaktadır [5]. Jelatinin, Çizelge 1.2'de belirtilen üstünlükleri göz önüne alındığında gıda endüstrisinde birçok ürünün formülasyonunda kullanılması kolaylıklar sağlamaktadır. Çizelge 1.5 ise jelatinin fonksiyonel özelliklerini ve bu özelliklerinden dolayı jelatinin kullanıldığı gıda ürünlerini göstermektedir.

Çizelge 1. 5 Jelatinin fonksiyonel özellikleri ve kullanıldığı ürünler [5, 15]

Fonksiyonel Özellikler	Kullanım Alanları
Jelleşme ajanı	jöleli tatlılar, etler, şekerlemeler, et sosları
Yapı bağlayıcı	lokum, koz helvası, sufleleler, fırın ürünleri
Bağlama ajanı	konserve etler, şekerlemeler, peynirler, süt ürünleri
Kolloidal yapıyı koruyucu	şekerlemeler, dondurmalar, donmuş tatlılar
Durultma ajanı	bira, şarap, meyve suları
Film oluşturucu	meyvelerin kaplanması
Koyulaştırıcı	toz içecekler, et suyu, soslar, çorbalar, puddingler, jöleler, şuruplar
Emülgatör	çorbalar, soslar, tatlandırıcılar, et ürünleri, kremalar, şekerlemeler
Stabilizör	krem peynirler, çikolatalı sütler, yoğurt, kremalar, donmuş tatlılar
Yapışma ajanı	şekerlemeler, et ürünleri
Köpürmeyi sağlayıcı	şekerlemeler, kremalar, dondurmalar
Kristalizasyonu düzenleyici	dondurmalar, buzlu ürünler, donmuş tatlılar

Çizelge 1.5'te görüldüğü gibi, jelatin çok amaçlı bir gıda katkı maddesi olarak çeşitli et, süt ve şekerleme ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çizelge 1.5'te sayılan jelatinin fonksiyonel özelliklerine ilave olarak, jelatin içerdiği 9 elzem aminoasitten dolayı da insan beslenmesi için önem arz etmektedir [1]. Daha öncede bahsedildiği üzere jelatin gıda prosesinde ve gıda formülasyonlarında birden fazla role sahiptir. İlk özellikleri, jelleşme ajanı olması ile ilgilidir. Bu özellikler jel gücü, jelleşme süresi, erime sıcaklığı, viskozite, koyulaşma, su bağlama, yapı düzenleme olarak sıralanabilir. İkinci gruptaki özellikleri jelatinin yüzey davranışından ileri gelmektedir. Bu özelliklere örnek olarak ise, emülsiyon oluşturma, köpük oluşturma, stabilizasyon ve adezyon/kohezyon verilebilir. Şu an piyasada bulunan hiçbir hidrokolloid bahsedilen

özellikleri tümünü kapsayan özelliğe sahip değildirler. En yaygın özelliği ise jelatinin ısıya bağlı olarak geri-dönüşümlü şekilde jelleşme özelliğine sahip olmasıdır. Yüzde birkaç oranda jelatin içeren sulu çözeltiler su ile ısıya bağlı olarak geri dönüşümlü jeller oluştururlar. Bu prosesin ısıl-tersinir olması jelatin jeline eşsiz “ağızda-erime” kalite özelliğini kazandırır. Bitkisel kaynaklı polisakkarit jellendirme ajanları jel oluşturma gücüne sahiptir fakat ağızda erime özelliğinden ve elastik özelliklerden yoksundurlar aynı zamanda jelatinin parlak ve berrak görsel özelliği diğer polisakkarit jelleştiricilerde yoktur [2]. Yinede jelatinin bazı dezavantajları olabilmektedir. Gıda uygulamalarında jelatinin avantaj ve dezavantajları Çizelge 1.6’da sunulmuştur.

Çizelge 1. 6 Gıda uygulamalarında jelatinin avantaj ve dezavantajları [16]

Avantajlar	Dezavantajlar
Çok fonksiyonlu (tekstür, yüzey aktivitesi, emülsifiyer, stabilizasyon, film oluşturucu)	Isıya karşı düşük stabilite
Hızlı ve yoğun aroma ile vücut sıcaklığında erir	Düşük jelleşme sıcaklığı
Eşsiz tektür, elastiklik ve parlaklık	Yavaş jelleşme
Kolay proses etme	Daha yüksek sıcaklıklarda çözünebilme
Osteoartrit ve osteoporoz açısından önleyici fonksiyon	BSE (Deli inek hastalığı) konusundaki tartışmalar
Protein zenginleştirme	Hayvansal kökenli olması
	Dini çekinceler

Jelatin Gıda Uygulamalarında Eşsiz Özellikleri

- Jelatinin en önemli üstünlüklerinden biri “ağızda erime” özelliğidir. Bu özelliği ile ürüne ilişkin lezzet ve aromanın yoğun şekilde ortaya çıkmasını sağlar. Bu özellik jelatine karakteristiktir ve diğer biyopolimer yapılarında bunu sağlamak mümkün değildir [17]. Bu zamana kadar bilim insanları jelatinin yerine geçebilecek jelleştirici protein veya polisakkarit bulamamışlardır.
- Jelatinin ısısal olarak tersinir özellikte bir jel olması üstün özelliklerinden bir diğeridir. Karragenan ve agar gibi bazı bitkisel hidrokolloidler tersinir jel oluşturma özelliğine sahiptir. Fakat erime noktaları jelatine nispeten çok daha yüksektir.
- Jelatinin diğer bir önemli özelliği ise yüzey aktivitesidir. Arap zıkkı ile karşılaştırıldığında çok iyi nitelikte değildir. Ancak özellikle yüzey aktivitesinin jel oluşturma özelliği ile kombinasyonu jelatini oldukça özel kılar.

- Jelatin gıda endüstrisindeki en çok fonksiyonu olan hidrokolloiddir. Bu fonksiyonları, jelleştirici, koyulaştırıcı, su-bağlayıcı, emülsifiye edici, köpükendirici, film oluşturucu olarak sıralamak mümkündür. Başka hiçbir hidrokolloid tek başına bu özellikleri sağlamaz [16].
- Jelatinin diğer bir önemli özelliği, farklı jel gücü ve farklı partikül büyüklüklerinde bulunabilmesidir. Bu şekilde çok spesifik uygulamalarda kullanımı mümkün olabilmektedir. Genel olarak diğer hidrokolloidler geniş bir aralıkta jel gücü çeşitliliğine sahip değildir ve jel gücü ayarlaması şeker ve tuz gibi bileşenler ile karıştırılarak elde edilir [4, 16].
- Jelatinin kullanımı oldukça basittir. Çoğu gıdanın normal pH değerine yakın aralıkta jel oluşturur dolayısıyla ayarlamak için ilave tuz veya şeker ihtiyacı yoktur. Diğer jelleştirici hidrokolloidler tuz, gıda asitleri ve şekerlerin ilavesine ihtiyaç duyar [2].

1.1.4 Yumuşak Şekerlemeler

Şekerlemeler; şeker ve glikozun veya sadece şekerin pişirilmesinden sonra sitrik asit, tartarik asit veya potasyum bitartarat ilave edilerek kestirilmesi sonucu oluşan hamura, üretilen ürünün çeşidine göre süt, süt tozu, jelatin, kıvam verici yağ ve aroma gibi maddelerin eklenmesi ve şekillendirilerek ambalajlanması sonucu elde edilen gıda ürünleridir. Şekerlemeler, Türk Gıda Kodeksinde aşağıdaki şekilde gruplara ayrılmıştır [18].

- Sert şekerleme
- Yumuşak şekerleme
- Jöle şekerleme
- Draje şekerleme
- Tablet şekerler
- Meyve şekerlemeleri
- Badem ezmesi ve benzerleri
- Koz helva, nuga ve benzerleri
- Fondan

- Krokan
- Dolgulu şekerleme ürünleri

Bu tez çalışması kapsamında yumuşak şekerleme üretimi gerçekleştirilmiş ve yumuşak şekerlemelerdeki jelatinin kökeninin tespitine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Yumuşak şekerlemeler genel olarak jelatin kullanılarak üretilirler ve şekerleme pazarı değerinin %50' sini temsil ederler [19]. Yumuşak şekerlemeler yüksek oranlarda sükröz ve glikoz şurubu içermektedir. Ayrıca jelleşmeyi ve arzulanan tekstürel özellikleri sağlamak amacı ile nişasta, jelatin ve pektin kullanılmaktadır. Diğer katkı maddeleri ise gıda asitleri, aromalar ve renklendiricilerdir. Yumuşak şekerlemelerdeki en önemli bileşenler tatlandırıcılardır. Genel olarak sükröz, glikoz ve mısır şurubu kullanılmaktadır. Glikoz veya mısır şurubu nişastanın hidrolizi ile elde edilmektedir [20]. Tüketiciler yumuşak şekerlemeleri eşsiz tekstür ve duyu özellikleri sebebi ile tercih etmektedirler. Dünya genelinde yenilikçi ve farklı yumuşak şekerleme ürünlerine olan ilgi artmaktadır.

1.1.5 Helal Gıda Kapsamında Jelatin

Helal kelimesi Arapça kökenli olup “izin verilen” anlamına gelmektedir. Bu kelime bir gıda ile ilişkili olarak kullanıldığında ise herhangi bir yiyecek veya içeceğin Müslümanların tüketimi yönünden herhangi bir yasak içermediğini ifade eder [21]. Türkiye'nin de üyesi olduğu Birleşmiş Milletler organlarından Codex Alimentarius Komitesi helal gıdayı:

“İslami kurallara göre yasak olan herhangi bir unsuru içermeyen, bu unsurlardan arındırılmış yerlerde ve cihazlarda hazırlanan, işlenen, taşınan ve depolanan; bu durumların dışında üretilen herhangi bir gıda ile hazırlama, işleme, taşıma ve depolama aşamasında direkt temasta olmayan ürün” olarak tanımlanmaktadır. Helal olmayan (haram) gıdalar çok istisnai durumlar dışında tüm Müslümanlar için yasaklanmıştır. Haram gıdaları dokuz gruba ayırmak mümkündür [21]:

- Ölü hayvanlar (leşler)
- Akan veya pıhtılaşmış kan
- Tüm yan ürünleri dâhil olmak üzere domuz türevleri
- Allah adına kesilmeyen tüm hayvanlar
- Kanın tamamen akmasını engelleyecek şekilde öldürülen hayvanlar

- Alkol ve uyuşturucu dahil olmak üzere her türlü sarhoş edici madde
- Aslanlar, köpekler, kurtlar veya kaplanlar gibi dişleri olan etobur hayvanlar
- Şahinler, baykuşlar, kartallar veya akbabalalar gibi keskin pençeli kuşlar
- Kurbağalar veya yılanlar gibi kara hayvanları

Domuz türevleri, domuzdan doğrudan veya dolaylı olarak elde edilen her türlü maddeyi içermektedir. Bu maddeler domuz yağı, domuz eti ve domuz kemiği veya derisinden elde edilen jelatin olarak sıralanabilir. Domuzdan elde edilen jelatin veya diğer ürünler sığırdan elde edilenlere göre genel olarak daha ucuzdur. Bu sebeple çoğu gıda sisteminde domuz kökenli ürünler kullanılabilir. Jelatinin gıda endüstrisinde sahip olduğu eşsiz özellikler sebebi ile yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Dolayısıyla domuz kökenli jelatinin gıda endüstrisinde kullanılma ihtimali geniş çeşitlilikteki gıda ürünü içerisinde bulunma ihtimalini oluşturmaktadır. Sonuç olarak, Müslüman toplumların özellikle şekerleme ürünleri gibi gıdaların tüketimindeki tedirginlikleri ve endişeleri domuz kökenli jelatin varlığı şüphesiyle artmaktadır. Açıkça görülmektedir ki, domuz kökenli ürünlerin gıdalardaki varlığının tespiti için etkin ve güçlü analitik metotlara ihtiyaç vardır. Yeterli etkinliğe ve doğruluğa sahip metotların oluşturulması ve yaygınlaştırılması yolu ile gıda ürünlerinin helalliyi hususunda kontrolleri ve sertifikalandırılması yapılabilecektir. Helal sertifikasyon ise “muteber, ehil ve tarafsız bir kurumun, söz konusu üretimi denetlemesini, helal standartlara uygunluk içerisinde üretimin yapıldığını teyit etmesini ve buna bağlı olarak, onaylanmış bir belge vermesini kapsayan bir işlemdir [22]. Helal sertifikası veren kuruluşlar kendi belirledikleri standartları uygulamaktadır. Fakat ortak bir dil olabilecek, helal gıda açısından uluslar arası geçerliliğe sahip tek bir standart oluşturulması ve bu standartta belirtilen hususlara göre helal gıda denetiminin uluslar arası akreditasyona sahip kuruluşlar tarafından gerçekleştirilmesi önem taşımaktadır. Bu amaçla İslam Konferansı Teşkilatı (OIC) altında Türkiye'nin öncülüğünde İslam Ülkeleri Standardizasyon ve Metroloji Enstitüsü (SMIIC) kurulmuştur. SMIIC'e 13 OIC ülkesi üyedir: Cezayir, Kamerun, Gine, Ürdün, Libya, Mali, Fas, Pakistan, Somali, Sudan, Tunus, Türkiye ve Birleşik Arap Emirlikleri. Merkezi İstanbul'dadır ve 3 yıllık harcamaları Türk Standartları Enstitüsünce karşılanmaktadır. Kuruluş 2007 yılında helal standartları geliştirme faaliyetlerine başlamıştır. 17 Mayıs 2011 tarihinde bu faaliyetler sonucunda üç standart oluşturulmuştur [22, 23]. Türk Standartları Enstitüsü (TSE), Diyanet İşleri

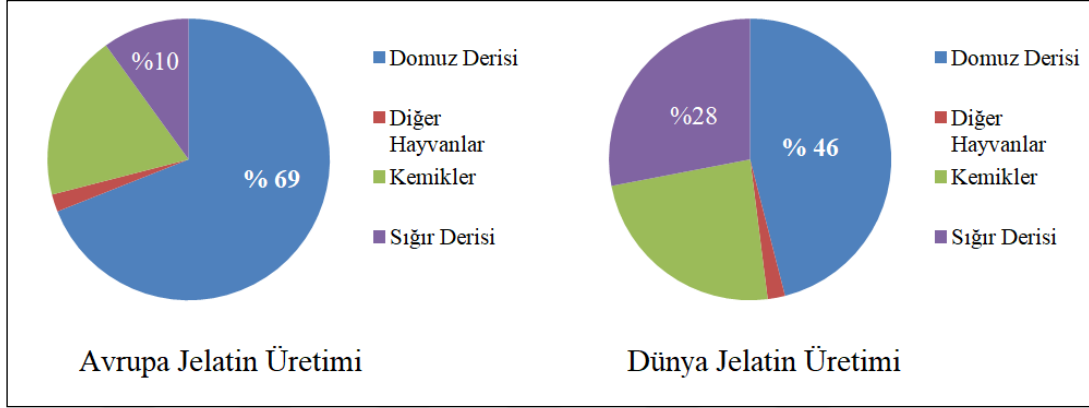
Başkanlığı ile işbirliği içerisinde 14 Temmuz 2011 tarihinden itibaren, SMIIC tarafından yayınlanan Helal Gıda Standartları kapsamında Helal Gıda Belgelendirmesi yapmaktadır [23]. Yumuşak şekerlemeler dâhil olmak üzere gıdalara ilave edilme ihtimali olan domuz kökenli jelatinin tespit edilebilmesi için yeni ve etkin metotların geliştirilerek helal gıda denetim mekanizmalarına kazandırılması büyük önem taşımaktadır.

1.1.6 Jelatinde Köken Tespiti ve Önemi

Jelatin, erişebilirlik, maliyet, bölge ve dini inanç gibi sebeplerden dolayı farklı kaynaklardan üretilmektedir. Bu sebeple jelatinde otantisite çalışmaları Müslüman, Hıristiyan, Hindu ve Yahudiler için önemli bir mesele haline gelmiştir. Örneğin, Müslümanların domuz içeren bir ürünü tüketmesi kesinlikle yasaktır [10]. Aynı zamanda, Hindu inancına göre dana veya ineklerin kesilmesi ve tüketilmesi yasaklanmaktadır. Benzer şekilde vejetaryenler hayvansal kökenli herhangi bir gıda ürünü tüketemezler [14]. Jelatin, yaygın ve farklı şekillerde kullanım alanı bulduğu için birçok gıda içerisinde katkı olabilmektedir. Jelatin bazı gıdalara tekstür özelliklerini iyileştirmek için katılırken tağşiş sebebi olabilmektedir. Örneğin, jelatin yoğurda ürünün sürekliliğini artırmak için ve sineresisi azaltmak amacı ile katılmaktadır ve Türkiye dâhil olmak üzere birçok ülkede yoğurda jelatin katılması tağşiş olarak kabul edilmekle beraber yasaklanmıştır. Birçok açıdan değerlendirdiğimizde, jelatinin otantisitesinin değerlendirilmesi önemli bir konudur. Dolayısıyla, gıda ürünlerinde jelatinin varlığının ve kaynağının belirlenmesi için güvenilir ve güçlü metotların geliştirilmesi önemli bir ihtiyaç haline gelmiştir

Sahip olduğu fonksiyonel özellikleri sebebi ile gıda üreticileri jelatinden geniş çeşitlilikte gıda ürününde yararlanırlar. Bu gıda ürünlerine örnek olarak yumuşak şekerlemeler, jöleler, sütlü tatlılar, marşmelovlar ve daha fazlası verilebilir [2]. Özellikle şekerleme sektöründe jelatine olan talep çok fazla olduğundan dünya genelinde jelatinin yaygın olarak ithalatı ve ihracatı gerçekleşmektedir. Fakat jelatinin büyük bir kısmı domuz eti daha ucuz ve işlenebilir olduğundan dolayı domuzdan üretilmektedir. Türkiye’ de ki durumu göz önüne aldığımızda, jelatin üretimi endüstrinin talebini karşılayacak düzeyde gerçekleşmemektedir ve bu sebeple jelatinin çoğu diğer ülkelerden ithal edilmektedir. Daha önce belirtildiği gibi birçok fonksiyonel özelliğe sahip jelatin ülkemizde yeterli miktarda üretilmediğinden dolayı yılda 1.500-

2.000 ton jelatin ülkemize ithal edilmektedir. Jelatinin yurt dışından bir kısmının ithal edilmesi nedeniyle orijini hakkında tüketiciler üzerinde daima kuşku bulunmaktadır. 2006 yılında gerçekleştirilen bir araştırmaya [24] göre Avrupa'da üretilen jelatinlerin %69'unun domuz derisinden üretildiği belirtilmiştir. Şekil 1.3'de görüldüğü gibi dünya genelinde bu oran %46'dır.



Şekil 1. 3 2006 yılına ait dünya ve Avrupa jelatin üretimindeki hammadde dağılımı [24] Bu sebeple, gıda kontrol mekanizmalarının jelatin saf halde iken ve gıda içerisinde iken kökenini belirlemesi gerekmektedir. Başka bir deyişle, saf haldeki ticari jelatinin ve bir gıda içerisinde bir bileşen olarak jelatinin kökeninin tespit edilebilmesi için güvenilir ve güçlü metotlara ihtiyaç duyulmaktadır.

1.1.7 Jelatinde Köken Tespitine Yönelik Literatür Çalışmaları

Literatürde, jelatinin kökenin belirlenmesi için çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Genel olarak bu çalışmalarda PCR temelli, elektroforetik, kromatografik ve spektroskopik tekniklerden yararlanılmıştır [25]. Bu çalışmaların çoğunda çeşitli analitik teknikler kullanılarak saf jelatinin kökenin belirlenmesi sağlanmıştır [26–30]. Domuz ve sığır jelatinlerinin ayırt edilmesine ilişkin çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Hashim vd. [31] FTIR tekniğinden yararlanarak jelatin numunelerini domuz veya sığır kökenli olmasına göre sınıflandırabilmişlerdir. Bulgularına göre, jelatinler Amid I ve Amid II titreşimsel bantları kullanılarak başarılı şekilde sınıflandırılabilmiştir. Gıdalarda ve farmasötik ürünlerde jelatin tespiti immünokimyasal yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemler kısa sürede ve nispeten ekonomik şekilde uygulanabilmektedir. Doi vd. [32] jelatine alerjisi olan insanlar için işlenmiş gıdalarda domuz ve sığır jelatinini tespit edebilecek ELISA temelli bir yöntem geliştirmişlerdir. Başka bir çalışmada, Tukiran vd. [33] ELISA yöntemini kullanarak ticari şekerleme

ürünlerinde bulunan jelatinin kökenini tespit etmişlerdir. Özellikle, domuz jelatinin varlığını gösteren proteini saptamak amacı ile jelatini SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Gel Elektrofrezisi) ile analiz etmişlerdir. Domuz jelatini 90,28-114,51 % aralığındaki geri kazanım değerleri ile tespit edilmiştir. Benzer bir çalışmada Azira vd. [34] SDS-PAGE yöntemi ile domuz ve sığır jelatinin molekül ağırlıklarına göre tespiti üzerinde çalışmıştır. Elde ettikleri sonuçlara göre, sığır ve domuz jelatinleri bant sayısına göre ayırt edilemezken ayırım bantların farklılık gösteren şiddetleri ile sağlanabilmektedir. Bulgulara göre, sığır jelatinine %5 oranında ilave edilen domuz jelatini tespit edilebilirken domuz jelatinin sığır jelatini ile tağışı tespit edilememiştir.

Kromatografi ve kütle spektroskopisinin birlikte uygulanması ile jelatin kökeninin tespitine yönelik çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bir çalışmada, domuz, sığır ve balık jelatinlerine ait amino asit kompozisyonu RP-HPLC tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Domuz, sığır ve balık jelatinleri başarılı bir şekilde temel bileşen analizi kullanılarak üç farklı grup şeklinde ayırt edilebilmiştir [35]. Bir çalışmada, Cheng vd. [36] UPLC/Q-TOF-MS tekniğini, temel bileşen analizi ile birlikte uygulamış ve sığır ve domuz jelatinlerini tanımlayabilmişlerdir. Tripsin enzimi ile muamele edilmiş jelatinlerin UPLC-MS verilerine temel bileşen analizi uygulanmıştır ve markör peptitlerden yararlanılarak ayırım sağlanabilmiştir. Benzer amaçlı olan bir diğer çalışmada Flaudrops vd. [37] jelatinin kökeninin (sığır,domuz) tespitini amaçlamışlardır. Jelatin enzimatik parçalama yolu ile peptitlerine ayrılmış ve kütle spektrumlarından yararlanılarak domuz jelatini sığır jelatininden ayırt edilebilmiştir.

Nemati vd. [28] RP-HPLC analizi ile elde edilen amino asit kompozisyonu verilerine temel bileşen analizini uygulayarak sığır ve domuz jelatinlerini ayırt etmeyi başarmışlardır. Gui-Feng [29] kollajen dizilerindeki markör peptitlerden yararlanarak HPLC/MS tekniği ile saf jelatini ayırt etmişlerdir. Hidaka ve Liu [38] kimyasal çöktürme tekniği ile sığır ve domuz jelatinlerinin ayırt edilebileceğini göstermişlerdir. Saf jelatinlerin kökenlerinin belirlenmesinin yanında işlenmiş gıdalarda bulunan jelatinlerin orijininin belirlenmesine yönelik başarılı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yılmaz [39] nanoUPLCESI-q-TOF-MSE tekniği ile sığır ve domuz jelatinlerini başarılı şekilde ayırt edebilmişlerdir. Bir çalışmada yumuşak şekerlerin amino asit kompozisyonlarını belirleyerek kemometrik yaklaşımlar ile yumuşak şekerlerde jelatin kaynağını tespit etmişlerdir [40]. Bir diğer çalışmada, yumuşak ayıcık şekerlerdeki jelatin kaynağını belirlemek üzere kromatografik bir teknik olan LC-MS/MS

tekniklerinden yararlanılmıştır [41]. Demirhan vd. [42] RT-PCR tekniğini kullanarak yumuşak şekerlerde, marşmelovda ve türk lokumunda jelatin kökenini belirlemek üzere bir araştırma çalışması gerçekleştirmişlerdir. Başka bir çalışmada, domuz, sığır, at ve tavuk etlerine ilişkin iz miktarlar gerçek zamanlı time kantitatif PCR metodu kullanılarak tespit edilmiştir [43]. PCR temelli metotlar jelatinde köken tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır. Cai vd. [44] RT-PCR tekniğini kullanarak jelatin karışımlarında ve kapsüllerde sığır ve domuza ait DNA' nın nicel ve nitel olarak tespitini gerçekleştirmiştir. Her iki türde (sığır ve domuz) hassas olan kantitatif PCR analizlerini başarı ile gerçekleştirmişlerdir. Farklı bir çalışmada, Abd Mutalib vd. [45] jelatin kapsüllerinin helallik yönünden otantisitesinin tespiti için klasik PCR tekniği ile southern hibridizasyon tekniklerini uygulamışlardır. Sonuçları birbiri ile karşılaştırmışlar ve yirmi markaya ait jelatin kapsüllerine ilişkin sonuçları karşılaştırmışlardır. Yirmi örneğin altısında PCR-southern hibridizasyon tekniği ile domuz geni tespit edilirken, klasik PCR tekniğinde domuz pozitif bir örnek tespit edilememiştir. İki boyutlu elektroforez güçlü ve umut vadeden bir ayırma tekniğidir. Molekül ağırlıkları ve izoelektrik noktadan yararlanılarak jelatin kökeninin belirlenmesi mümkün olabilir. Bir çalışmada, Aina vd. [46] iki boyutlu elektroforez tekniğini kullanarak domuz derisine ait on markör peptit tespit edilebilmiştir.

Hermanto vd. [47] spektroskopik ve elektroforetik analizleri kullanarak sığır ve domuz jelatini türlerini ayırt etmişlerdir. Çalışmaları kapsamında her iki jelatin türünü de pepsin enzimi ile hidroliz ederek farklı molekül ağırlığına sahip peptit parçalarını elde etmişlerdir. Hidroliz öncesi ve sonrasında ultraviyole-görünür bölge spektrumlarındaki ve FTIR spektrumlarındaki farklılıkları değerlendirmişlerdir.

Bahsi geçen metotların doğru ve güvenilir olduğu raporlanmıştır. Fakat bu metotların dezavantajları zaman alıcı olmaları, tahrip edici, pahalı ve meşakkatli olmaları şeklinde sıralanabilir. İlaveten, bu çalışmaların gerçekleştirilmesi için zehirli kimyasallar ve uzman kullanıcıya ihtiyaç vardır.

IR spektroskopisi jelatin tanımlanması için yararlanılabilir niteliktedir çünkü spesifik maddelerin kimyasal kompozisyonu hakkında bilgi sunmaktadır [14]. Böylece FTIR tekniğinden yararlanarak tahribatsız ve hızlı şekilde moleküler yapı ve kompozisyona ilişkin bilgi elde edilebilir [48]. Bu metotların güvenilir ve başarılı olduğu raporlanmıştır. Diğer bir yandan, genellikle maliyetli, zaman alan, tahrip edici ve tecrübeli kullanıcı gerektiren metotlardır. Alternatif bir teknik olarak, FTIR

spektroskopisi gıdaların otantisite çalışmalarına ilgi çekici bir çözüm seçeneği sunmaktadır. FTIR spektroskopisi moleküler yapı ve kompozisyon hakkında kimyasal bilgi elde edilmesi hususunda tahribatsız ve hızlı bilgi sağlayabilen bir teknolojidir [49]. Bu spektroskopik teknik geniş çeşitlikteki gıdalarda taşış ve otantisite problemlerinde etkin ve başarılı bir araç olarak kullanılabilir. Bir kızılötesi spektrumu molekölün parmak izi niteliğindeki eşsiz bilginin elde edilmesine imkân tanır. FTIR tekniği kullanılarak, farklı kaynaklara sahip her örnekten farklı ve spesifik bir IR spektrumunun elde edilmesi mümkündür. Bu sebeplerden dolayı, gıdaların ve gıda bileşenlerinin otantisite tespiti için hızlı, ucuz ve etkin tekniklere ihtiyaç vardır. Bu problemlere kemometrik tekniklerin FTIR spektroskopisi ile kombinasyonu çözüm sunabilme yeteneğine sahiptir.

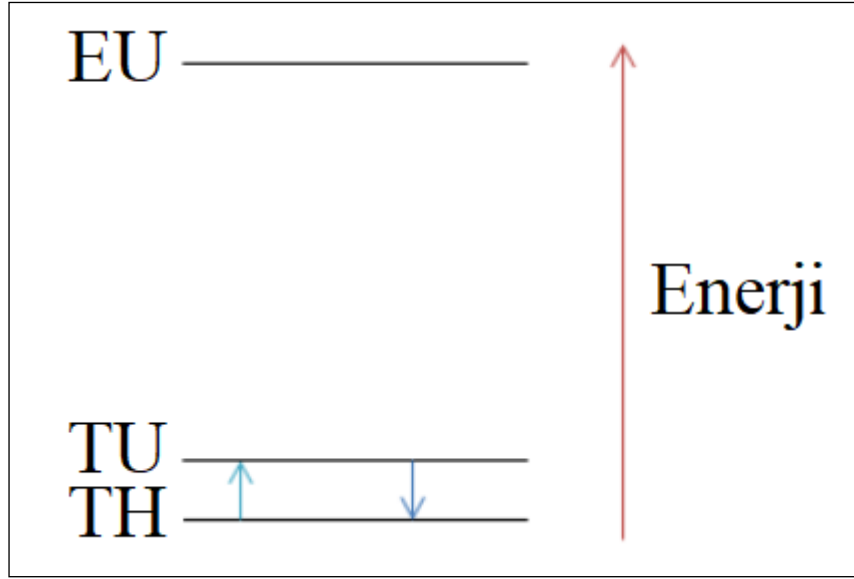
1.1.8 Spektroskopik Metotlar

Spektroskopik teknikler atomların ve moleküllerin elektromanyetik radyasyon ile etkileşmesi esasına dayanır. Yapısal, fiziksel-kimyasal ve kalitatif-kantitatif bilgi spektroskopik çalışmalar kapsamında elde edilebilir. Bu bilgiler yayılan veya absorblanan enerjinin dalgaboyu ve frekansı sayesinde elde edilir. Spektroskopik teknikler etkin olmaları, gıda bileşenlerine ilişkin hızlı bilgi vermeleri, sık kullanılmaları, zehirli reaktif veya çözücü gerektirmemesi gibi nedenler ile gıda analizlerinde yaygın kullanım alanı bulur. Tahribatsız ve noninvazif olmaları sebebiyle spektroskopik teknikler sıklıkla uygulanır. İlâveten, aynı anda birden fazla bileşenin tespitinin yapılmasına olanak sağlar. Spektroskopik teknikleri atomik spektroskopi, kızılötesi spektroskopisi, nükleer manyetik rezonans ve kütle spektroskopisi olarak sıralamak mümkündür [50].

1.1.8.1 Titreşimsel Spektroskopi

Titreşimsel spektroskopi gıdaların ve gıda ürünlerinin hem kalitatif hem kantitatif analizini gerçekleştirmek için uygulanmaktadır. Titreşimsel teknikler kullanılarak araştırılan numune hakkında kompleks kimyasal bilgi elde edilebilir. Titreşimsel tekniklere örnek olarak FTIR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi), NIR (yakın kızılötesi spektroskopisi), MIR (orta kızılötesi spektroskopisi), Raman spektroskopisi ve HSI (hiperspektral görüntüleme) verilebilir. Bu tekniklerin başlıca avantajları tahribatsız ve düşük maliyetli olmalarıdır [51]. Titreşimsel spektroskopi daha çok IR (kızılötesi) ve

Raman spektroskopisi olarak iki güçlü analitik yöntemi kapsar. IR bölge elektromanyetik spektrumun $14000-50\text{ cm}^{-1}$ aralığını kapsamaktadır. Bu aralık yakın IR ($14000-4000\text{ cm}^{-1}$), orta-IR ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) ve uzak IR ($400-50\text{ cm}^{-1}$) olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Bu teknikler örneklerin kimyasal bağları ile ilişkili olan titreşimsel enerji seviyelerini ölçmektedir. Bir molekül doğru frekanstaki elektromanyetik radyasyona maruz kaldığında örneğin molekülleri bu frekansta titreşir ve bu titreşim sonucunda moleküldeki bağların gerilme açıları ve uzunlukları değişir. Titreşimsel spektroskopinin temeli bu olguya dayanmaktadır [52]. Herhangi bir molekülün veya numunenin spektrumu parmak izi niteliğindedir ve numuneye özgü eşsiz karakteristik özellikleri sunmaktadır. Titreşimsel spektroskopinin en önemli özelliklerinden biri aynı anda birçok bileşenin analizinin yapılabilmesi ve molekül yapılarına ilişkin bilgiyi içeren mükemmel çözünürlükteki spektral bantlardır [53]. En yaygın olarak kullanılan titreşimsel teknik kızılötesi (IR) spektroskopisidir. Spektroskopik teknikler genel olarak moleküllerin ve kimyasal reaksiyonların karakterizasyonunda kullanılır. Titreşimsel spektroskopi yaygın olarak kullanılan ultraviyole-görünür bölge spektroskopisinden temel prensip bakımından farklıdır. Şöyle ki, elektromanyetik spektrumun görünür bölgesinden gelen radyasyon etkileştiği bir kimyasal bileşen ile etkileşir ve elektron temel halden daha yüksek enerjideki uyarılmış hale geçiş yapar, bu elektronik geçişe sebep olan radyasyon absorblanır ve absorban spektrumunda bir pik oluşmasını sağlar [52]. Titreşimsel spektroskopi metotlarında ise görünür bölge spektroskopisine benzer şekilde titreşime sebep olan radyasyon absorblanır ve ilişkili bir pik oluşumu gözlenir. Fakat titreşimsel spektroskopide IR bölgedeki foton enerjileri elektronları üst enerji seviyelerine geçirecek kadar büyük değildir [52]. Şekil 1.4'te bir elektronun temel hali, titreşimsel olarak uyarılmış hali ve elektronik olarak uyarılmış hali gösterilmiştir. IR ışınları kovalent bağlı atomları veya moleküllerin zaten var olan titreşimsel hareketlerini uyaracak düzeydedir. Başka bir deyişle, IR ışınları belirli moleküller tarafından absorblanır ve moleküller titreşim enerjisine dönüşür. IR ışınını absorblayan bağlar kendi yapılarına bağlı olarak farklı şekillerde titreşirler. Bir molekülün IR aktif olabilmesi için titreşimsel veya rotasyonel hareket sonucunda dipol momentinde değişiklik olması gerekir. Spesifik bir titreşimin frekansı, moleküle yönlendirilen IR radyasyonuna eşit olduğunda molekül radyasyonu absorblar. IR radyasyonu molekül tarafından absorblandığında ise söz konusu enerji çeşitli şekillerdeki titreşimsel veya rotasyonel hareketlere dönüşür.



Şekil 1. 4 Titreşimsel uyarılma diyagramı. Bir elektronun temel hali (TH), titreşimsel uyarılma hali (TU), elektronik olarak uyarılmış hali (EU) [52]

Titreşimsel hareketler;

- Gerilme Titreşimleri
 - Asimetrik gerilme titreşimleri
 - Simetrik gerilme titreşimleri

- Eğilme Titreşimleri
 - Makaslama Titreşimleri
 - Sallanma Titreşimleri (düzlem dışında)
 - Sallanma Titreşimleri (düzlem içinde)
 - Burulma Titreşimleri (düzlem dışında)

Olarak sınıflandırılmaktadır [54]. Görüldüğü gibi IR spektroskopisi molekülün titreşimsel enerji seviyeleri arasındaki geçişler ile ilgilenmektedir dolayısı ile titreşimsel spektroskopi olarak isimlendirilmiştir. Günümüze kadar gerçekleştirilen gıda otantisitesi ve taşıyış ile ilgili çoğu çalışmada titreşimsel spektroskopi teknikleri kemometri birlikteliğinde uygulanmıştır [31, 55–60]. Uluslararası kemometri derneğine göre, kemometri bir kimyasal sistem veya süreç üzerinde yapılan ölçümleri matematiksel veya istatistiksel metotlar kullanılarak ilişkilendirme bilimidir. Kemometri, spektrumlardan elde edilen verileri iyileştirmek için 40 yıl önce spektroskopi ile

uygulanmaya başlamıştır. İlk zamanlarda çok sınırlı şekilde uygulanırken, günümüzde modern analitik cihazlar kullanılarak elde edilen zengin verilerin işlenmesinde temel bir araç haline gelmiştir [61]. Temel olarak, kemometri yardımı ile çok bileşenli veri matrislerinden en etkin şekilde yararlı bilginin ekstrakte edilmesi sağlanmaktadır. Başka bir deyişle kemometri, metotlar ve bu metotların kimya biliminde uyulabilirliği arasında bir köprü oluşturmakta niteliğine sahiptir. Yani kemometrinin spektroskopi alanında oldukça uygun bir rolü vardır. Kemometri titreşimsel spektroskopi birlikteliğinde özellikle aşağıdaki amaçlar ile başarılı şekilde uygulanmaktadır

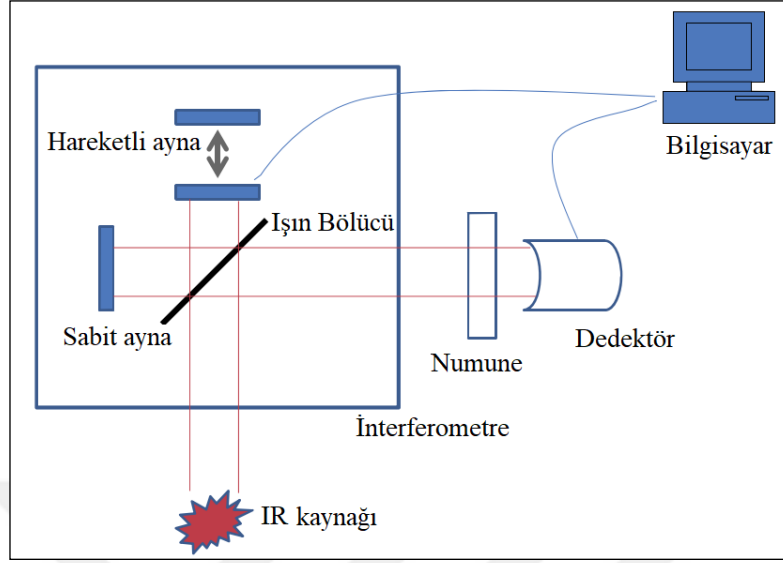
- Önışlem teknikleri: (normalizasyon, temelhat düzeltmeleri, merkezleme, türevlendirme, çoklu düzeltmeler). Bu işlemler uygulanarak kimyasal girişimler, temelhat değışimleri, dalgaboyu ile ilişkili değışiklikler ve benzeri problemler önlenmiş olur
- Sınıflandırma metotları: Örneklerin sınıflandırılması ve ayırt edilmesi için uygulanırlar.
- Regresyon metotları: Örneklerin titreşimsel spektrumları ile kantitatif özelliklerini ilişkilendirmek için uygulanırlar. Genel olarak uygulanan teknikler, temel bileşen analizi, PLS (kısmi en küçük kareler), kalibrasyon algoritmaları, genetik çok değışkenli kalibrasyon ve klasik en küçük karelerdir [61].

Bu tez çalışması kapsamında titreşimsel spektroskopi tekniklerinden FTIR ve Raman spektroskopi tekniğı kullanılmıştır. Kemometrik teknik olarak ise sınıflandırma teknikleri olan HCA(hiyerarşik kümeleme analizi), PCA (temel bileşen analizi) ve PLS-DA (kısmi en küçük kareler-ayırt edici analiz), GADA (genetik algoritmalar- ayırt edici analiz) teknikleri FTIR ve Raman tekniklerinden elde edilen spektral verilere uygulanmıştır.

1.1.8.2 FTIR Spektroskopisi

FT-IR spektrometreler 1960 yıllarında ticari kullanım için geliştirilmiştir ve zaman geçtikçe geliştirilerek FTIR teknolojisi yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde kullanılan FTIR spektrometreler Michelson interferometre içermektedir. Bir FTIR spektrometrenin şematik gösterimi Şekil 1.5'te sunulmuştur. Şekil 1.5'te görüldüğü üzere bir FTIR cihazı ışın kaynağı, dedektör, Michelson interferometre (ışın

bölücü, sabit ayna, hareketli ayna) kısımlarından oluşmaktadır. Interferometre sistemi oldukça önemlidir.



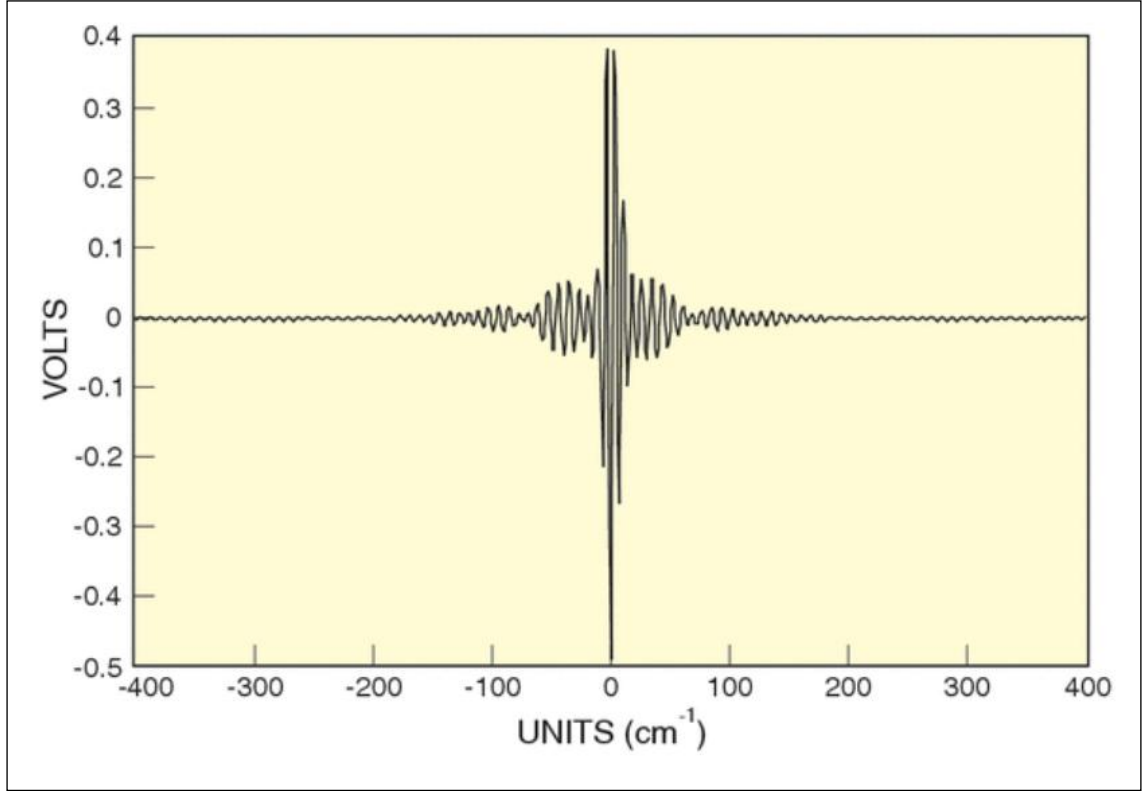
Şekil 1. 5 FTIR spektrometrenin şematik olarak gösterimi [54].

Bu sistem sayesinde ışın demeti iki yola bölünür bir ışın demeti sabit aynaya diğer ışın demeti ise hareketli aynaya gönderilir. Yansıyan ışınlar geri dönüp birleştiğinde bir interferans paterni oluşur. İnterferans paterninin oluşmasının sebebi iki ışın komponentinin değişen yol farkıdır. Başka bir deyişle interferometre ışın örnek içerisinden geçtikten sonra IR spektral bilgisini içeren interferans sinyallerini oluşturur. Tekrarlı olarak optik yol farkının bir fonksiyonu olarak interferans sinyalleri dedektör tarafından üretilir ve ölçülür [54]. Optik yol farkı interferometrenin iki kolu arasında hareket eden ışınların aldığı yollar arasındaki farktır [62]. Kızılötesi ışını seçici şekilde olarak örnek tarafından absorblandığı zaman dedektöre ulaşan enerjideki dalgalanmalar gerçek zamanlı olarak sayısallaştırılır ve bir interferogram elde edilir. İnterferogram örneğin kızılötesi spektrumunun elde edilebilmesi için gerekli olan tüm bilgiyi içerir fakat bu bilgi zaman düzleminde. Yorumlanabilir bilgiyi elde etmek amacı ile interferogramın frekans düzlemine geçirilmesi gerekir. Fourier dönüşümü ile bu gerçekleştirilir [63]. Şekil 1.6'da bir interferogram örneği görsel olarak sunulmuştur.

ATR (Attenuated total reflectance) Tekniği

Attenuated total reflectance (ATR) tekniği 1960' ların başlarında Fahrenfort ve Harrick Tarafından bağımsız olarak geliştirilmiştir. Işık yüksek kırılma indisine sahip ortamda

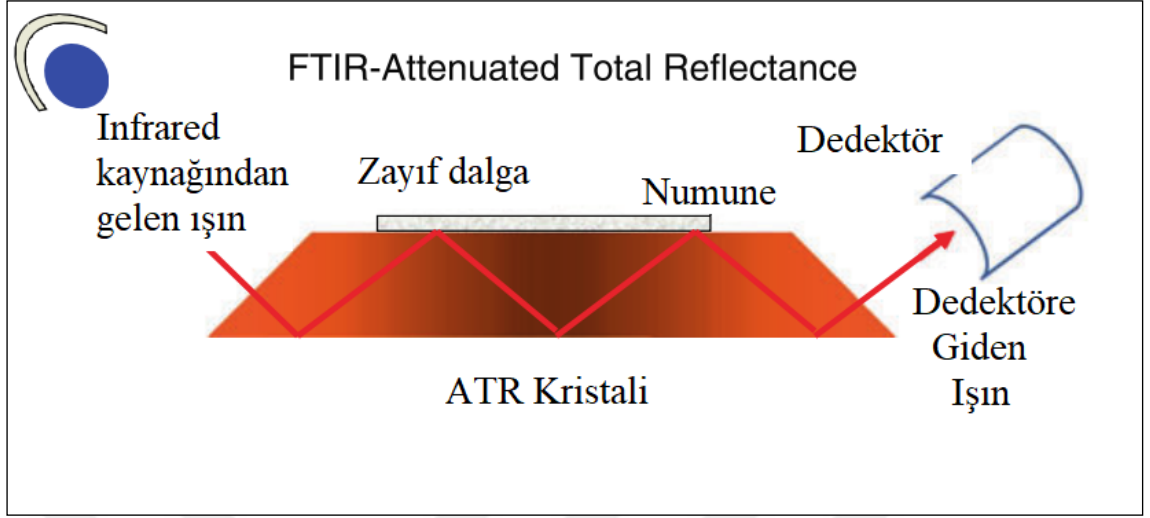
ilerlerken bu ortam ile daha düşük kırılma indisine sahip olan ortam arasındaki yüzeye çarpar ve ışık kısmen iletilir ve kısmen yansıtılır.



Şekil 1. 6 Bir interferogram örneği [62]

Yalnız kritik açı olarak ifade edilen belirli bir geliş açısındaki ve üzerindeki açı değerlerinde ışığın hiçbir kısmı ikinci ortama iletilmez ve tam içsel yansıma meydana gelir bu duruma toplam iç yansıma (total internal reflection) denir [64]. ATR tekniğinde örnek yüksek kırılma indisine sahip olan kristal üzerine yerleştirilir. IR ışını kristalin iç yüzeyinden tam içsel yansımaya uğrar ve kristal yüzeyinin ötesinde ATR kristali ile temasta olan numunenin içerisine yayılan kısa süreli bir dalga yaratır [63]. Kristal yüzeyine kaçan bu ışın 0.1-5 μm 'lik bir alanda yayılır. Bu dalganın bir kısmı numune tarafından absorblanır ve bir miktar azalma ile geri yansıyan ışın dedektörde algılanır. Bu durumda gerçekleşen zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) denir. Başka bir deyişle kristal yüzeyinden kaçan ışınlar numune tarafından absorblanır ve absorblanan kısım ölçülerek analizlenen numunenin FTIR spektrumu elde edilir [54]. Şekil 1.7'de ATR kristali ve üzerinde gerçekleşen yansıma şematik olarak gösterilmiştir. ATR aksesuarlarında farklı kristaller bulunabilmektedir. Özellikle, ZnSe, Ge ve elmas kristaller tercih edilmektedir [63]. FTIR-ATR tekniği gıda analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. FTIR ile birlikte ATR tekniğinin kullanılması katı, sıvı, yarı-katı ve

ince film şeklindeki numunelerden spektral veri elde edilmesini son derece kolay hale getirmiştir.



Şekil 1. 7 ATR kristali üzerinde gerçekleşen yansıma ve şematik gösterimi [54]

ATR tekniğinin kullanımı ile örnek hazırlığı kolaylaşmış ve neredeyse hiç numune hazırlığına gerek kalmamıştır. Bu durum ATR tekniğine üstünlükler kazandırmaktadır. IR-ATR tekniği klasik IR-transmitans ile kıyasladığında ATR tekniğinin birçok üstünlük kazandırdığını söyleyebiliriz. Örnek olarak, daha hızlı olması, daha az numune hazırlığı gerektirmesi, tekrar üretilebilirliğin artması, farklı ölçümlerdeki varyasyonların azalması, yüksek kalitede veri elde edilmesi ve daha birçok özellik sıralanabilir [65]. FTIR-ATR tekniği gıdalarda çok geniş çeşitlikteki numune için uygulanabilmektedir. FTIR tekniğinin kullanıldığı gıda analizleri şu şekildedir [62]:

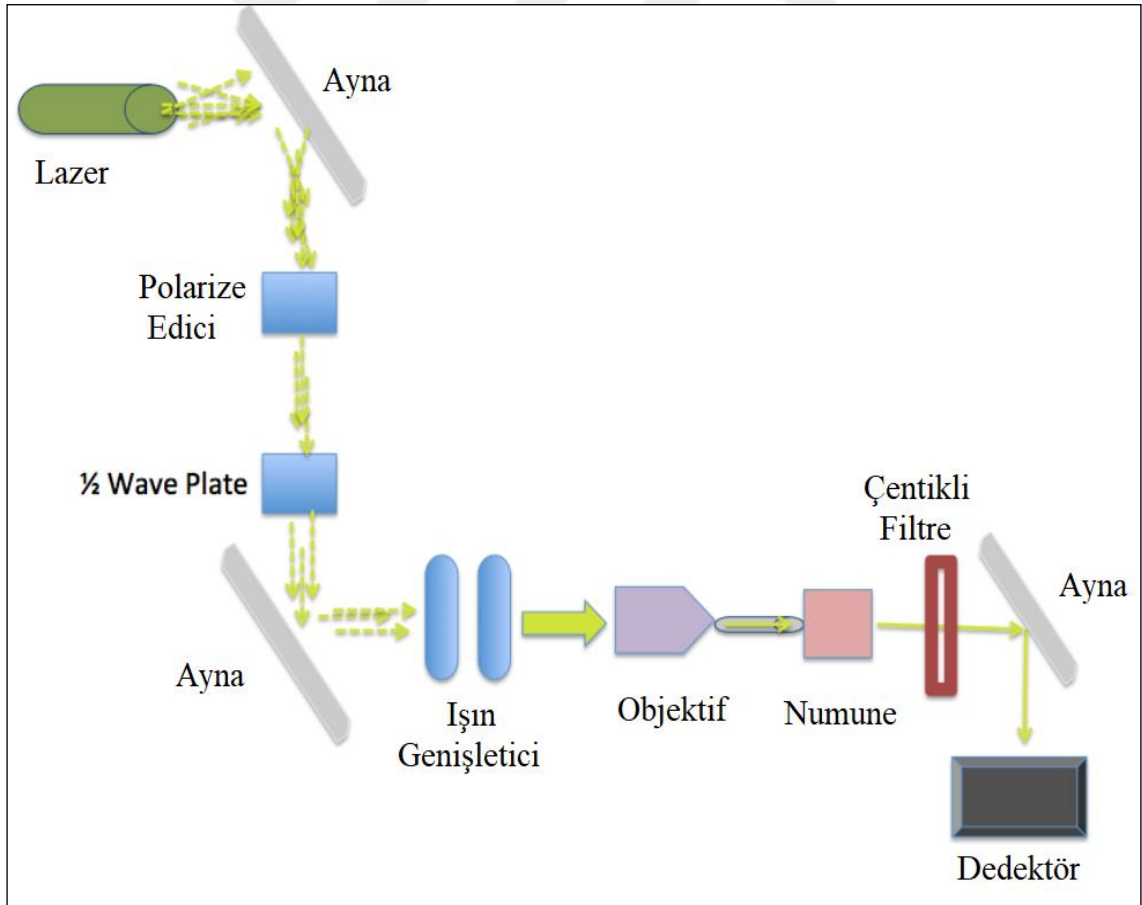
- Süt ve süt ürünlerinin analizleri
- Et ve et ürünlerinin analizleri
- Balık analizleri
- Yenilebilir yağların analizleri
- Tahıl analizleri
- Şeker ve bal analizleri
- Sebze ve meyve analizleri
- İçecek analizleri

1.1.8.3 Raman Spektroskopisi

Bir numune bir lazer ışını ile uyarıldığı zaman bilinen frekans ve polarizasyondaki fotonların küçük bir kısmı örnekten saçılır. Raman çalışma prensibinde, ışık absorpsiyonu yerine ışık saçılması meydana gelir. Işık saçılması sırasında saçılan ışığın büyük kısmının enerjisi madde ile etkileşen ışığın enerjisine eşit olur ve bu tür elastik olan saçılmaya Rayleigh saçılması denir [52]. Elastik saçılmanın yanı sıra ışığın çok az bir kısmı elastik olmayan saçılmaya uğrar bu olay ise Raman saçılması adını alır. Raman etkisi olduğu zaman örnek molekülü ile anlık foton arasında bir elastik olmayan (esnemez) bir çarpışma meydana gelir. Bunun sonucunda molekülün titreşimsel ve rotasyonel enerjisi değişir ve saçılan radyasyon farklı bir dalgaboyuna kayar. Anlık radyasyon ve saçılan radyasyon arasındaki fark bir Raman kayması olarak adlandırılır. Eğer molekül enerji kazanırsa saçılan fotonlar daha uzun dalga boylarına kayarlar bu durumda Raman spektrumundaki Stokes çizgilerinde yükselmeye sebep olur. Tam tersi durumda daha kısa dalgaboyuna kayarlar ve anti-Stokes çizgilerinin Raman spektrumunda yükselmesini sağlarlar. Saçılan ışının frekans kaymaları analizlenerek spektrum olarak sunulmaktadır [66]. Başka bir deyişle, gönderilen fotonun enerjisinin bir kısmı moleküle aktarılıyorsa Stokes, molekülden bir miktar enerji fotona aktarılıyorsa AntiStokes hatları oluşur. Temel olarak cihazın çalışma prensibine göre, örnekteki elektronları uyararak amacı ile tek dalga boyunda bir lazer kullanılır. Şekil 1.8'de görüldüğü üzere lazer kaynağından çıkan ışın bir ayna ile polarize ediciye gönderilir. Sistemdeki polarize edici ve yarım dalga plakası ile tüm fotonların örneğin uyarılması için aynı yönde hareket etmesi sağlanır. Daha sonra ışın ölçümde yeterince güçlü bir yanıt alabilmek amacıyla ışın genişleticiye gönderilir ve spot büyüklüğü ayarlanır. Objektif genişletilmiş ışını örneğe götüreceği bir fiber optik kablo içerisine odaklar. Örnek içerisinden geçtikten sonra ışın bir çentikli filtreden geçirilir. Bu filtrede seçici olarak uyarıcı ışının frekansındaki radyasyon bloke edilir. Diğer tüm frekanslar bir monokromatörden geçerek dedektörde algılanmak üzere farklı frekanslara ayrılır. Şekil 1.8'de bir Raman spektrometresinin şematik gösterimi ve kısımları sunulmuştur. Raman tekniği gıda analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve gıda analizlerinde çok önemli avantajları vardır. Bu avantajlar, yüksek seçicilik, sıvı sistemleri ile güzel uyumluluk, hiç veya çok az örnek hazırlığı, kısa analiz süresi olarak sıralanabilir. FTIR tekniğinde bahsedilen tüm gıdaların analizleri Raman spektroskopisi

tekniki ile gerçekleştirilebilir. İlaveten aşağıda bahsedilen üstünlüklere gıda analizlerinde ulaşmak mümkündür.

- Yüksek seçicilik: Raman bantları güzel bir sinyal/gürültü oranına sahiptir. Piklerde akışma genel olarak görülmez. Raman tekniği numune analizlerinde örneklerin parmak izi olarak kullanılabilir.
- Sıvı sistemler ile güzel uyumluluk: Suyun Raman spektrumu zayıf veya fark edilmeyen nitelikte olduğu için sulu sistemler için güzel bir uygulamadır.
- Özel rnek hazırlığı gerektirmemesi: Bazı uygulamalarında, Raman alışmaları örnek hazırlığı gerektirmez ve örnek ile temas gerektirmez çünkü Raman spektrometre sadece örneğe lazer ışını gönderip saçılan fotonların toplanmasını gerçekleştirir.
- Kısa sürmesi: Raman spektrometre bir analizi birkaç saniyede tamamlayabilir ve endüstriyel çalışmaları gerçek zamanlı olarak gzlememeyi sağlar [66].

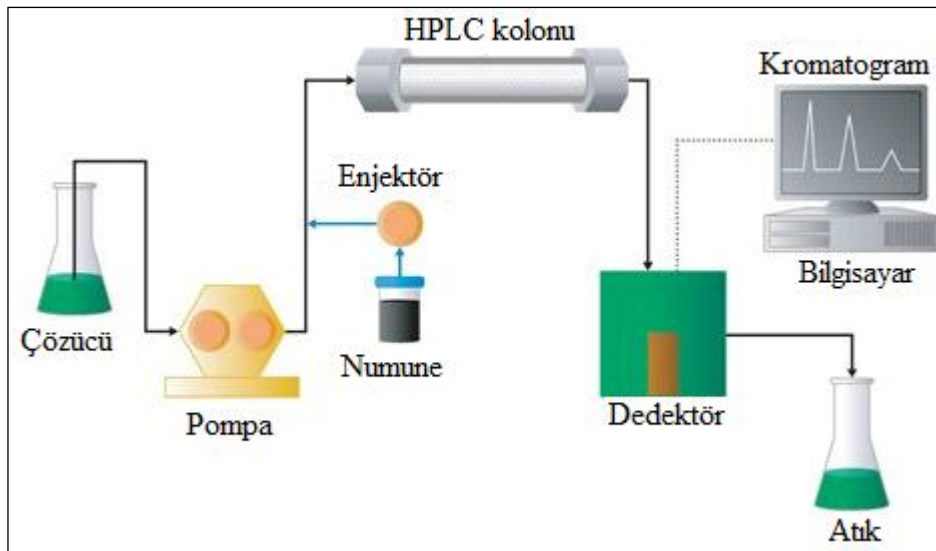


şekil 1. 8 Raman spektrometresinin şematik gösterimi [52]

1.1.9 Kromatografik Metotlar

1.1.9.1 Sıvı Kromatografisi Sıralı Kütle Spektroskopisi (LC MS/MS) Tekniği

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) 1960 yıllarının başında geliştirilmiştir. Günümüzde modern analitik cihazlar arasında yer almaktadır. HPLC bir tür sıvı kromatografisi tekniğidir. Ayrılma bir hareketli faz ile bir sabit faz arasında gerçekleşir. Ayrılmak istenen analit bir sıvı hareketli faz ile sistem boyunca taşınır. Analit içeriğinin sabit ve hareketli faz arasında dağılıma yeteneğinde göre ayrılma gerçekleşmektedir. Ayrılma prosesi dört farklı şekilde gerçekleşmektedir. Bunlar adsorpsiyon kromatografisi, partiyon kromatografisi, iyon değiştirme kromatografisi olarak sıralanmaktadır. Bir HPLC sistemi genel olarak pompa, enjeksiyon bloğu, HPLC kolonu ve dedektör kısımlarından oluşmaktadır. Şekil 1.9'da bir HPLC sisteminin temel komponentleri şematik olarak gösterilmiştir [67]. HPLC sistemlerinde genel olarak cihaz donanımları benzer olmakla beraber farklı türde dedektörler kullanılabilir. Bu dedektörlere örnek olarak absorpsiyon, floresans, refraktif indeks, elektrokimyasal, iletkenlik ve kütle dedektörleri verilebilir [68]. Gıda biliminde HPLC tekniği karbonhidratlar, yağlar, vitaminler, katkılar, renklendiriciler, doğal pigmentler, kontaminatlar, amino asitler gibi birçok gıda bileşeninin nitel ve nicel olarak tespit edilmesine imkan tanımaktadır [67].



Şekil 1. 9 HPLC sistemimin şematik gösterimi [67]

Sıvı kromatografisi ile birleştirilmiş kütle spektroskopisi gıdaların analizi için altın standart olarak ifade edilebilir. Kütle dedektörü ile birleştirilmiş sıvı kromatografi

sistemi daha iyi pik ayrılması, yüksek kütle ölçüm doğruluğu ve yüksek çözünürlük sağlayabilme özelliğine sahiptir [69]. Aynı zamanda LC-MS/MS tekniği kompleks gıda matrislerinde etkin biçimde kullanılabilir. Bahsedilen bu özellikler LC-MS/MS tekniğini kantitatif analizlerde daha güçlü, güvenilir ve etkin bir yöntem olarak tanımlar. LC-MS/MS tekniğinin bahsedilen yaygın gıda uygulamalarının yanında proteomik alanında da uygulamaları mevcuttur. Özellikle proteomik alanındaki yaklaşımlar son on yıldır popülerlik kazanmıştır. LC-MS temelli teknikler geniş çeşitlilikteki biyolojik uygulamada tercih edilmiştir çünkü doğru ve kesin sonuç alma imkânı sunmaktadır [70]. Özellikle LC-MS/MS tekniği kullanılarak proteomik çalışmaları gerçekleştirilebilmektedir. Bir proteini tanımlamakta kullanılan en temel parametre kütesidir. Bir proteinin kütesinin bilinme hassasiyeti arttıkça, onun muhtelif etkileşimlerde aldığı rolü bilme imkânı da artar. Kütesindeki değişimlere bağlı olarak, bağlı kofaktör veya metal iyonlarının varlığından, kovalent modifikasyonlara kadar pek çok konuda bilgi edinilebilir. İşte bu nedenle protein kütle spektrometresi (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. İsterse doğrudan doğruya kütle spektrometresinden alınan veri üzerinden dizi tespiti yapan teknik için olsun, isterse de daha sonra geliştirilmiş olan, geniş çaplı proteom taramaları için kullanılan ve spektrometreden elde edilen spektrumu geniş veri tabanlarıyla karşılaştırarak dizi ve işlev bilgisine ulaşmaya çalışan sistemler için olsun, geliştirilen dizileri betimlemekte biyoinformatik yöntemleri ve ilişkili tek harfli amino asit kodları kullanılır.

1.1.10 Gerçek Zamanlı (Real-Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu kısa DNA dizilimlerinin (100-600 baz) daha uzun çift sarmallı DNA molekülüne çoğaltılmasını sağlar. Polimeraz zincir reaksiyonundaki çoğalmayı görünür hale getiren ve monitörize eden floresan raporlayıcı moleküller kullanılır [71]. Floresan temelli gerçek-zamanlı PCR teknolojisi, hedef DNA'nın çoğaltılmasıyla orantılı olan floresan sinyalinin dedeksiyonuna dayanmaktadır. Real time PCR analizinde prensip olarak, bir PCR ürününün ilk tespit edildiği zaman noktası

belirlenir. Başka bir deyişle, raporlayıcı boya emisyon yoğunluğunun zemin gürültüsünün üzerine çıktığı döngü sayısı belirlenir. Döngü sayısı Ct olarak ifade edilmektedir [72]. Polimeraz zincir reaksiyonu üç temel basamaktan oluşmaktadır bu aşamalar denatürasyon, hibridizasyon ve polimerizasyon olarak sıralanabilir. Denatürasyon aşamasında DNA'nın iki zinciri yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılır. Hibridizasyon aşamasında, sentetik oligonükleotidler hedef DNA'ya bağlanır. Polimerizasyon aşamasında ise zincir uzaması veya DNA polimerazın primerleri uzatması gerçekleşir. Ard arda denatürasyon gerçekleşmesi, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması aşamalarıyla DNA parçaları üssel olarak artış gösterir.

1.1.11 Kemometri

“Kemometri” terimi deney dizaynının optimize edilmesi ve faydalı bilginin büyük ve kompleks veri kümelerinden ekstrakte edilmesi için kullanılan istatistiksel ve matematiksel yaklaşımları tanımlar. Kimyasal veri genel olarak çeşitli bileşenlerin laboratuvarında elde edilmiş birçok varyansa sahip olan değerlerini ve özelliklerini içermektedir. Böyle bir veri analizinde bir veya daha fazla çok değişkenli istatistiksel araç kullanılmaktadır. Çok değişkenli analiz bir veya daha fazla bağımlı değişkenin iki veya daha fazla bağımsız değişkene göre simültane olarak analizini kapsamaktadır [73]. Kemometrik analiz kapsamında birçok teknik bilimsel çalışmalarda ve endüstride kullanılmaktadır. Temel olarak sınıflandırma ve kalibrasyon olmak üzere kemometrik teknikler iki sınıfa ayrılmaktadır. Bu tekniklere örnek olarak ANOVA (varyans analizi), PCA (temel bileşen analizi), HCA (hiyerarşik kümeleme analizi) ve PLSR (kısmi en küçük kareler regresyonu) verilebilir [73].

1.1.11.1 HCA (Hiyerarşik Kümeleme Analizi) and PCA (Temel Bileşen Analizi)

Spektroskopik teknikler ile birlikte HCA ve PCA gibi çok değişkenli metotlar değerlendirilen elemanları benzerlikleri ile ilişkili olarak gruplara ayırmak üzere yaygın olarak gıda uygulamalarında kullanılmaktadır [74]. Söz konusu sınıflandırma analizlerinde temel mantık hiyerarşik olarak birbiri ile ilişkili kümeler oluşturabilmektir. Kemometrik analiz ile etkin bir şekilde analizlenen değişkenler arasındaki gizli benzerlikler veya farklılıklar tespit edilebilir. Temel bileşen analizi (PCA) sınıflandırmaya yardımcı olabilecek bir veri işleme metodudur. Bu analizin merkezinde olan mantık veri setinin boyutunu düşürmektir. PCA analizinde orijinal değişkenlerin

birkaç lineer kombinasyonları hesaplanır ve en az bilgi kaybı olacak şekilde sınıflandırma çalışmalarında uygulanır [28]. Başka bir deyişle, PCA genel olarak kullanılan bir veri sıkıştırma ve görselleştirme aracıdır. Spektral verileri her örnek için bir skor değerinin hesaplandığı yeni az sayıdaki ortogonal değişkenlere indirger. Bu skorların grafiksel gösterimi incelenen numuneler için bir pattern veya kümelenmenin gözlemlenmesini sağlar şöyle ki benzer özellikteki numunelerinin birbirine yakın şekilde kümelenmesi beklenir. Değerlendirilen hususta birbirinden farklı nitelikteki numunelerin ise elde edilen grafiklerde uzak ilişkili olması beklenir [75]. Hiyerarşik kümeleme analizinde de aslında benzer mantık söz konusudur. HCA analizi bir sınıflandırma (kümeleme) analizi olarak kümeler arasında bir yakınlık ilişkisi kurmak için kullanılır. HCA analizi daha çok ayırt edici kemometrik metotlar kapsamına girmektedir. Bu tür metotla genel olarak farklı sınıflardaki numuneler arasındaki sınırları belirler ve her sınıf için istatistiksel olarak güvenilirlik sınırlarını belirlemeyi kapsamaz. HCA analizi yapılarak numunelerden elde edilen spektrumlar benzerlik veya farklılık ilişkisine göre değerlendirilir ve numunelerin dağılım gösterdiği kümeler ve alt kümelere göre hedeflenen amaç kapsamında yorum yapılır [76].

1.1.11.2 PLS-DA (Kısmi En Küçük Kareler-Ayırt Edici Analiz)

PLS (Kısmi En küçük Kareler Regresyonu) bir kemometrik teknik olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. PLS yaklaşımı Herman Wold tarafından 1975 yıllarında başlatılmıştır [77]. PLS tekniği kullanılarak bağımsız değişkenler (X) ve bağımlı değişkenler (Y) arasındaki ilişkiyi gösteren bir model kurgulanır [78]. PLS yaygın olarak kullanım alanı bulmaktadır. Çünkü değişken sayısı belirgin şekilde gözlem sayısından fazladır. PLS analizinde, aralarında çoklu doğrusal bağlantı olan açıklayıcı değişkenler, algoritmalar yardımıyla hem bağımlı değişkendeki değişimi hem de açıklayıcı değişkenlerdeki değişimi açıklayacak, doğrusal bağlantı problemi ortadan kalkmış olan açıklayıcı değişken sayısından daha az sayıda bileşene indirgenmektedir [79]. PLS tekniği genel anlamda kalibrasyon için tercih edilmekle birlikte sınıflandırma analizlerinde de kullanılabilir ve sınıflandırma için kullanıldığı durum ise PLS-DA (kısmi en küçük kareler-ayırt edici analiz) olarak isimlendirilmektedir. PLS analizi sınıflandırma amacı ile uygulanmak istendiği zaman sınıf bilgisinin ikili olarak kodlaması yapılır ve elde edilen sonuçlar bağımlı değişken olarak sunulur. PLS-DA analizi uygulanarak farklı gruplara ait spektral verilerin (X bloğu) bir hedef sınıf (Y veri bloğu) ile

maksimum kovaryanslarına göre daha iyi ayırt edilebildiği tespit edilmiştir. PLS-DA analizi bir numunenin spektrumunun belirli bir sınıfa dâhil olup olmadığına ilişkin bilgi verir [80].

1.1.11.3 GADA (Genetik Algoritmalar Ayırt Edici Analiz)

Genetik algoritmalar canlı bir türün evrim prosesini mimik etmek için icat edilmiştir. Genetik algoritmalar birçok probleme çözüm olarak başarılı şekilde uygulanmıştır. Bunlara örnek olarak, çok değişkenli kalibrasyon, moleküler modelleme, model tanımlama ve sınıflandırma verilebilir. Özellikle sınıflandırma analizlerinde, genetik algoritmalar iki sınıf arasındaki ayrımı maksimum seviyeye çıkarılmasını sağlayacak anahtar değişkenleri belirleyecek bir optimizasyon prosedürü olarak uygulanabilir [81].

Genetik algoritmalar ilk defa 1960 yıllarının başında geliştirme ve optimizasyon metotlarıdır. Günümüzde görüntü prosesleme, modelleme ve sistem tanımlama gibi uygulamalarda güçlü bir şekilde genel amaçlı olarak kullanılabilir. Kalibrasyon ve sınıflandırma yönünden değerlendirildiğinde, genetik algoritmaların bazı uygulamalarının gerçekleştirildiği görülmektedir [82, 83]. Bu çalışmalarda doğal sistemlerin adaptasyon prosesi anlaşılmasına çalışılmıştır. Ayrıca yapay sistemlerin dizaynı algılanmaya çalışılmıştır.

Spektral veriler kullanılarak genetik algoritmaya dayalı sınıflandırma ve öbekleme yöntemleri geliştirilebilmektedir. Geliştirilen yöntemler genetik algoritma gibi var olan çeşitli sınıflandırma ve kümeleme yöntemlerine uyarlanır. Başka bir deyişle genetik algoritmaya dayalı temel bileşen analiz yöntemi veya genetik algoritmaya dayalı diskriminant analiz gerçekleştirilebilmektedir.

1.1.12 Tekstür Analizi

Şekerleme ürünlerinde olduğu gibi diğer birçok gıdada tekstür başlıca jel ağının oluşmasında etkilidir. Yumuşak şekerlemelerde jelatin kullanılarak son ürünün arzulanan sertlik ve esneklikte olması sağlanmaktadır [84]. Tekstür gıda bileşiminde bulunan biyopolimerlerin doğal yapısından etkilenmektedir. Yumuşak şekerlemelerde özellikle önem taşıyan iki tekstür özelliği sertlik ve elastikiyettir. Sertlik terimi, tamamen sıkıştırmak için gerekli olan güç miktarı olarak tanımlanabilmektedir. Başka bir deyişle ise sertlik, malzemenin deformasyonunu sağlayacak gerekli olan güç miktarı olarak ifade edilebilir. Elastiklik ise deformasyona uğrayan bir maddenin deformasyona

sebepe olan güç kaldırıldıktan sonra orijinal haline dönme hızıdır [85]. Yumuşak şekerlemeler, yapılarında yüksek oranda jelatin, sükröz ve glukoz ihtiva ederler. Yumuşak şekerlemeler, şekerleme pazarında önemli bir yere sahiptir ve farklı tekstür, aroma ve görünüme sahip yumuşak şekerlemeler için tüketici talepleri söz konusudur. Bu sebeple yumuşak şekerlemelerin tekstür özelliklerinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

1.1.13 Renk Analizi

Genel olarak gıdanın görünümü taze veya proses edilmiş gıdalarda en önemli duyuşal faktördür. Gıda yüzeyinin rengi tüketiciler tarafından değeriendirilen ilk kalite parametresidir ve ürün kabul edilebilirliğı yönünden kritik bir özelliştir. Aynı zamanda ürünün renk özelliğı duyuşal, besinsel ve görünen veya görünmeyen kusurlar hakkında bilgi verme özelliğine sahiptir. Bu şekilde üretimde hızlı kontrol ve müdahale imkânı sunmaktadır dolayısıyla endüstriyel olarak gıda kalitesi canlı görüntüleme sistemleri ile görüntülenmekte ve takip edilmektedir [86]. Başka bir deyişle, gıda ürünün rengi aynı zamanda kompozisyonel bileşimindeki farklılıklar veya içerik hakkında bilgi sunabilme özelliğine sahiptir. Bir gıdanın veya maddenin rengi birkaç renk koordinat sistemi ile tanımlanmaktadır. Kantitatif olarak renk tanımlanması (L^*, a^*, b^*) modeli ile yapılabilmektedir. Bu model sisteminde, a^* değeri kırmızımsı renkler için pozitif değeri alırken yeşilimsi renkler için negatif değeri almaktadır aynı zamanda b^* değeri sarımsı renkler için pozitif değeri alırken mavimsi renkler için negatif değeri almaktadır. L^* değeri ise parlaklığın yaklaşık bir ölçütüdür ve her renk siyah ve beyaz arasındaki gri skalanın bir üyesine denk olarak kabul edilmektedir [87]. Başka bir deyişle ise renk üç boyut ile ifade edilir: L^* : Rengin parlaklığı (0: Siyah, 100: Beyaz), a^* : Kırmızılık Yeşillik (-60: Yeşil, +60: Kırmızı), b^* : Sarılık Mavilik (-60: Mavi, +60: Sarı) [88].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında yeni ve etkin bir yöntem olarak yumuşak şekerleme ürünlerindeki jelatinin kökeninin kolay ve pratik olarak belirlemek amacı ile FTIR, Raman ve RT-PCR tekniklerinden yararlanılmıştır. Çalışmaların ilk aşamasında standart jelatin numunelerinin kökeninin tespiti için FTIR temelli yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Sonraki aşamada ise yumuşak şekerlemelerde jelatin kökeninin FTIR spektroskopisi

tekniki kullanılarak tespiti için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. FTIR spektroskopisi gıdalarda otantisite ve tağşiş gibi konuların araştırılmasında ilgi çekici ve başarılı bir tekniktir. FT-IR metodunun hızlı ve hassas bir şekilde kesin sonuç vermesi, atığı olmaması ve analiz için çok az örneğe gereksinim duyulması, bu metodun avantajları arasında sayılmaktadır. Jelatin orijininin bu metod vasıtasıyla hızlı bir şekilde belirlenebilmesi gıda üreticileri ve tüketicileri için oldukça önemlidir. Gıda endüstrisinde kullanılan jelatinin büyük çoğunluğunun domuz orijinli olma ihtimali, Müslüman ve Yahudi tüketicileri, jelatin içeren ürünlerin tüketimini konusunda şüpheli hale getirmektedir. Buradaki temel etken de köken belirlemeye yönelik etkin bir yöntemin bulunmamasıdır. İnsanların güvenilir bir şekilde jelatin içeren ürünleri tüketebilmesi için jelatin kökeninin doğru ve hassas bir şekilde belirlenmesi zorunlu hale gelmiştir. Bu hedefi gerçekleştirebilmek için şu aşamalar planlanmıştır:

1. Standart jelatinlerin kökeninin belirlenmesi amacı ile FTIR ve Raman analizlerinin gerçekleştirilmesi
2. Standart jelatinler için elde edilen bulgulara kemometri (HCA, PCA, GADA) uygulanarak orijin tespitinin yapılması
3. Ticari yumuşak şekerlemelere benzer özelliklerde laboratuvar ortamında yumuşak şekerleme üretilmesi
4. Üretilen yumuşak şekerlemelerdeki jelatinin kökenini belirlemek amacı ile farklı kemometrik (HCA, PCA, GADA, PLS-DA) tekniklerin uygulanması
5. Yumuşak şekerlemeler için elde edilen sonuçların RT-PCR tekniği ile doğrulanması ve validasyonunun gerçekleştirilmesi
6. Renk ve tekstür analizlerinin gerçekleştirilmesi

1.3 Hipotez

Günümüzde, Müslüman toplumun tüketiminde hassasiyeti bulunan jelatinin orijininin tespitine yönelik efektif bir yöntem bulunamamasından dolayı, üretici firmalar ithal ettikleri jelatinin orijininini belirleyememektedirler. Şekerleme gibi jelatin içeren gıdaların tüketiminde de bireyler benzer endişeleri yaşamaktadırlar. Bu problemin ortadan kaldırılabilmesi ve tüketicilerin gönül rahatlığı ile jelatin içeren ürünleri tüketebilmesi amacıyla hızlı ve güvenilir metotlara gereksinim duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında, şekerleme ürünlerine ilave edilen jelatinin kökenini belirlemeye yönelik FTIR spektroskopisi tekniğine dayalı hızlı ve etkin bir yöntem geliştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında standart jelatin numunelerinin kökeni FTIR tekniği ile belirlenmiş ve sonraki aşamada farklı kökene sahip jelatinleri içeren yumuşak şekerleme üretimi yapılarak bu ürünlerin jelatin kökenine göre sınıflandırılması ve orijin tespiti gerçekleştirilmiştir. Konu ile ilgili çalışmalar TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü) projesi kapsamında başlatılmıştır. Bu proje kapsamında özellikle saf jelatinler için FTIR tekniği kullanılarak köken çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Akabinde, desteklenen TÜBİTAK ARDEB 1003 projesi kapsamında ise yumuşak şekerlemelerde jelatin orijinin tespitine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiş ve FTIR temelli metot geliştirilmiştir. FTIR tekniğine ilaveten, Raman, LC-MS/MS, RT-PCR teknikleri jelatin kökeninin belirlenmesi konusunda başarı ile uygulanmıştır ve önemli bulgular elde edilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Spektroskopik Metotların Geliştirilmesi

2.1.1 Standart Jelatinlerin FTIR analizi

Spektrumların elde edilmesi için Bruker Tensor 27 FTIR spektrometre (Bremen-Almanya) kullanılmıştır. Cihaz KBr ışın bölücü ve DLaTGS dedektöre sahiptir. FTIR ölçümlerinde ATR aksesuarı kullanılmıştır ve ATR elemanı elmas kristale sahiptir. Cihaz kontrolü ve veri toplanması OPUS Version 7.2 (Bruker, Almanya) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.1.1.1 FTIR Analizi Öncesi Saf Jelatinler İçin Numune Hazırlığı

Tez çalışmasında farklı jel gücüne sahip standart sığır, domuz ve balık jelatinleri kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Standart jelatin numuneleri Sigma-Aldrich (Almanya)'ten satın alınmıştır. Çizelge 2.1'de çalışma kapsamında kullanılacak standart jelatin numuneleri detaylı olarak belirtilmektedir. Çalışma kapsamında farklı jel gücüne sahip standart jelatinlerin saf su kullanılarak farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Kullanılan tüm numunelerin homojenizasyonu kusursuz şekilde sağlanmıştır. Homojen jelatin çözeltilerinin hazırlanmasında ise ultrasonik su banyosundan yararlanılmıştır (Wisebath, Almanya). Jelatin çözeltisi konsantrasyonları %4, %6, %8, %10, %12, %14, %16, %18 , %20 (m/v) olacak şekilde hazırlanmıştır. Dolayısıyla toplam 5 farklı jelatin için 45 numune hazırlanmıştır. Buna ilaveten domuz ve sığır jelatinlerinin oranları 3:1, 1:1 ve 1:3 olacak şekilde ve toplam jelatin konsantrasyonu %10 olacak şekilde jelatin karışımlarının sulu çözeltileri hazırlanmıştır.

Çizelge 2. 1 Kullanılan standart sığır, domuz ve balık jelatini numuneleri

Jelatin türü	Üretici Firma	Bloom Değeri
Balık jelatini	Sigma-Aldrich	-belirtilmemiş
Sığır jelatini	Sigma-Aldrich	~225
Sığır jelatini	Sigma-Aldrich	~75
Domuz jelatini	Sigma-Aldrich	~90-110
Domuz jelatini	Sigma-Aldrich	~175

2.1.1.2 FTIR Ölçümleri

Hazırlanan jelatin çözeltilerinin ATR-FTIR spektrumları 4 cm^{-1} çözünürlükte, her bir spektrum için 16 tarama olacak şekilde toplanmıştır. Spektrumlar $4000\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$ orta kızılötesi bölgede kaydedilmiştir. Her numune için aynı koşullarda üç ölçüm toplanmış ve spektrumların ortalaması alınmıştır. Her ölçüm öncesi saf su ile zemin taraması yapılmıştır. Kristal yüzeyi ılık su ve %100 saf etil alkol (Merck, Almanya) kullanılarak temizlenmiştir.

2.1.1.3 Kemometrik Analiz

Kemometrik analiz olarak HCA ve PCA analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler OPUS Version 7.2 (Bruker, Almanya) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. HCA analizi için spektrumlar 9 nokta ile düzgünleştirilerek vektör normalizasyonu gerçekleştirilmiş ve spektrumların birinci türevi alınmıştır. $1722\text{-}1487 \text{ cm}^{-1}$ spektral bölge kemometrik analizlerde tercih edilmiştir. Aynı zamanda kemometrik analizlerde Öklit mesafesi üzerinden Ward algoritması uygulanmıştır. Ayrıca karışımların ayrılabilmesi için $1313\text{-}1124 \text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesi kemometrik analize dâhil edilmiş ve karışımlar için daha iyi ayırt etme işlemi gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde kemometrik analiz olarak PCA (temel bileşen analizi) uygulanmıştır. HCA (Hiyerarşik sınıflandırma analizi) analizinde olduğu gibi dokuz noktalı düzgünleştirme ve vektör normalizasyonu gerçekleştirilmiştir farklı olarak spektral mesafelerin hesaplanabilmesi için faktörizasyon algoritması uygulanmıştır. OPUS yazılımı kullanılarak iki ve üç boyutlu sınıflandırma analizi grafikleri elde edilmiştir.

2.1.2 Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerleme Üretimi

2.1.2.1 Materyal

Tez çalışması kapsamında üretilen ilk yumuşak şekerlemeler, jelatin, glikoz şurubu, şeker, asit düzenleyici, meyve suyu, renklendirici, parlatici ve aroma vericileri ihtiva etmektedir. Kullanılan malzemelerin tümü Hammaddeler.com (<https://magaza.hammaddeler.com/>) internet sitesinden sipariş verilerek temin edilmiştir. Laboratuvar şartlarında yumuşak şekerleme üretiminde sığır (G9382-Sigma Aldrich, Almanya) ve domuz (G2500-Sigma Aldrich, Almanya) jelatinleri katkı olarak kullanılmıştır. Her iki jelatinde üretim formülasyonuna uygun olarak aynı oranda ürün içerisine ilave edilmiştir. Her ürün sadece tek bir jelatin türü içerecek şekilde numuneler hazırlanmıştır.

2.1.2.2 Yöntem

Yumuşak şekerleme üretimi USDA tarafından önerilen standart şekerleme yapım prosedürüne gerçekleştirilmiştir [89]. Üretim detayları aşağıda sunulmuştur.

Kullanılan malzemeler:

- 2 birim jelatin tozu
- 2 birim limon suyu
- 2 birim toz şeker
- Doğal elma suyu

Üretim prosedürü:

- Doğal elma suyu ve limon suyu içinde toz jelatin karıştırılarak eritilmiştir.
- Bir ısıtıcı kullanılarak hazırlanan karışım 2 dakika 100° C' de kaynatılmıştır.
- Kaynayan karışıma toz şeker ilave edilmiştir.
- ¼ inç tepe boşluğu olacak şekilde bir behere doldurulmuştur.
- Buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Hazırlanan yumuşak şekerlemeler sıcak halde iken ve kalıplara dökülmüş ve kalıplarda 1–2 gün süresince bekletilmiştir.

2.1.2.3 Yumuşak Şekerlemelerden Jelatin Ekstraksiyonu

Jelatinin yumuşak şekerlemelerden ekstraksiyonu için literatürde dondurma için uygulanan alkolle soğuk çöktürme tekniği uygulanmıştır [90]. Uygulanan ekstraksiyon metodu kapsamında öncelikle jelatin içeren şekerleme numuneleri 45 °C sıcaklık değerine ısıtılmıştır. 225 g şekerleme balon jöjeye alınarak saf su ile 250 mL hacme tamamlanmıştır. Ardından 100 ml alınarak 200 mL soğuk etil alkol yavaşça, karıştırarak ilave edilmiş, çökelti oluşumunu takiben numuneler 24 saat 0 °C'da bekletilmiştir. Çökmenin tamamlanmasının ardından filtrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonra ki aşamada çökelti soğuk alkol ile yıkanarak üzerine 50 mL saf su ilave edilmiş ve oda sıcaklığında yarım saat bekletilmiştir. Ardından su banyosunda sıcaklığı 90 °C değerine getirilerek, jelatinin tamamen çözücü fazına geçmesi sağlanmıştır. Bu işlemin ardından filtre edilecek, süzüntü 85 °C' da 15 dk karıştırılarak ısıtılmış ve içerisindeki etil alkolün uzaklaştırılmıştır. Bu işlemler sonucunda jelatinin sulu çözeltisi elde edilmiştir.

2.1.3 Standart Jelatinlerin Raman Tekniği ile Analizi

2.1.3.1 Materyal

Raman spektrumlarının elde edilmesi için InVia Raman Mikroskop sistemi (Renishaw, Wotton-under-Edge, İngiltere) birlikteliğindeki Leica DMLM mikroskop (50X objektif) ölçümlerde kullanılmıştır. Raman çalışmaları 785 nm dalgaboyuna sahip lazer kullanılarak yapılmıştır. Raman spektroskopi sistemi 1024x256 piksel çözünürlüğe sahip bir Renishaw CCD kameraya sahiptir. Cihaz kontrolü ve veri toplama işlemi WIRE (Renishaw, İngiltere) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.1.3.2 Raman Analizi Öncesi Saf Jelatinler İçin Numune Hazırlığı

Tez çalışmasında farklı jel gücüne sahip standart sığır ve domuz jelatinleri kullanılarak Raman çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Standart jelatin numuneleri Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır. Çizelge 2.2'de Raman çalışması kapsamında kullanılacak standart jelatin numuneleri detaylı olarak belirtilmektedir. Çalışma kapsamında farklı jel gücüne sahip standart jelatinlerin saf su kullanılarak aynı konsantrasyonda (% 6,67) çözeltileri hazırlanmıştır. Homojen jelatin çözeltilerinin hazırlanmasında ise ultrasonik su banyosundan yararlanılmıştır (Wisbath, Almanya). Raman ölçümleri mikroskop kullanılarak gerçekleştirildiği için numunenin yüzeyinin düz ve pürüzsüz olmasını

sağlamak gerekmektedir. Bu sebeple numuneler sıvı çözelti halinde iken 1 cm çapındaki plastik dairesel kalıplar içerisinde 1 mL eşit hacimde aktarılmış ve bir gün sonra numuneler jel haline geldiğinde Raman ölçümleri alınmıştır.

Çizelge 2. 2 Raman çalışmasında kullanılan standart sığır ve domuz jelatini numuneleri

Domuz Jelatini	(Sigma G2500)
Domuz Jelatini	(Sigma 04055)
Domuz Jelatini	(Sigma 48720)
Domuz Jelatini	(Sigma 48724)
Domuz Jelatini	(Sigma 48722)
Domuz Jelatini	(Sigma G2625)
Domuz Jelatini	(Sigma 39465)
Sığır Jelatini	(Sigma G9382)
Sığır Jelatini	(Sigma G9391)

2.1.3.3 Raman Çalışmaları İçin Ön Denemeler

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda öncelikle Raman spektrumlarının en güvenilir şekilde elde edilmesini sağlamak amacı ile ön değerlendirme çalışması gerçekleştirilmiştir. Burada ki amaç tekrarlı olarak en doğru, güvenilir ve detaylı Raman spektrumlarını elde edilmesidir. Ayrıca önemli bir konu sığır ve domuz jelatinlerinin birbirinden ayırt edilmesini sağlayacak markör bantların tespitinin sağlanmasıdır. Yapılan çalışmalarda en güvenilir spektrumların 785 nm lazer, %5 lazer gücü, 40 akümülyasyon ve 50x objektif ile elde edildiği tespit edilmiştir. Mikroskop kısmında yapılan çalışmalarda özellikle 50x objektifin tercih edildiği durumda 20x objektife nispeten daha fazla spektral ayrıntı içeren bir Raman spektrumu elde edilebilmiştir. Yapılan çalışmalar literatürde ilk olma özelliğini taşıdığı için bu çalışmalarda örnek alınan bir metot veya yayın bulunmamaktadır.

2.1.3.4 Kemometrik Analiz

Kemometrik analiz olarak HCA ve PCA analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler OPUS Version 7.2 (Bruker, Almanya) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. HCA analizi

için spektrumlar 25 nokta ile düzgünleştirilerek vektör normalizasyonu gerçekleştirilmiş ve spektrumların birinci türevi alınmıştır. 729–1777 cm^{-1} spektral bölge kemometrik analizlerde tercih edilmiştir. Aynı zamanda kemometrik analizlerde Öklit mesafesi üzerinden Ward's algoritması uygulanmıştır. Benzer şekilde kemometrik analiz olarak PCA (temel bileşen analizi) uygulanmıştır. HCA analizinde olduğu gibi 25 noktalı düzgünleştirme ve vektör normalizasyonu gerçekleştirilmiştir farklı olarak spektral mesafelerin hesaplanabilmesi için faktörizasyon algoritması uygulanmıştır. OPUS yazılımı kullanılarak iki ve üç boyutlu sınıflandırma analizi grafikleri elde edilmiştir. İlaveten, GADA (genetik algoritmalar ayırt edici analiz) olarak adlandırılan bir temel bileşen analizi ile ikinci kez temel bileşen skor grafikleri elde edilmiştir.

2.1.4 FTIR Çalışmaları için Farklı Konsantrasyonlarda Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerleme Üretimi

2.1.4.1 Materyal

Tez çalışması kapsamında toplam üç kez yumuşak şekerleme üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bu aşamasında %1, %5 ve %10 konsantrasyonda jelatin içerecek şekilde yumuşak şekerlemeler üretilmiştir. Kullanılan jelatin türleri Çizelge 2.3'te sunulmuştur. Sonuç grafiklerinde ve çıktılarında daha kolay yorumlanabilmeleri adına numuneler kodlanarak ifade edilmiştir.

2.1.4.2 Yöntem

Yumuşak şekerleme üretimi USDA tarafından önerilen standart şekerleme yapım prosedürüne gerçekleştirilmiştir [89]. Üretim detayları aşağıda sunulmuştur. Bu çalışma kapsamında farklı jelatin içerikli yumuşak şekerler üretilmeye çalışıldığı için oranlar Çizelge 2.3'te gösterilen jelatin içeriği oranlarını sağlayacak şekilde düzenlenmiştir. Tüm yumuşak şekerlemeler aynı prosedür ile hazırlanmıştır.

Kullanılan malzemeler:

- Jelatin tozu
- Limon suyu
- Toz şeker
- Doğal elma suyu

Çizelge 2. 3 FTIR çalışmasında kullanılan yumuşak şekerlemelere ait jelatin tür ve konsantrasyonları

Numune Kodu	Jelatin İçeriği	Jelatin Türü	Numune Kodu	Jelatin İçeriği	Jelatin Türü
D1	% 1	Domuz Jelatini/G1890-Sigma Aldrich	S1	% 1	Sığır Jelatini/G6650-Sigma Aldrich
D1	% 5	Domuz Jelatini/G1890-Sigma Aldrich	S1	% 5	Sığır Jelatini/G6650-Sigma Aldrich
D1	% 10	Domuz Jelatini/G1890-Sigma Aldrich	S1	% 10	Sığır Jelatini/G6650-Sigma Aldrich
D2	% 1	Domuz Jelatini/G2500-Sigma Aldrich	S2	% 1	Sığır Jelatini/G9382-Sigma Aldrich
D2	% 5	Domuz Jelatini/G2500-Sigma Aldrich	S2	% 5	Sığır Jelatini/G9382-Sigma Aldrich
D2	% 10	Domuz Jelatini/G2500-Sigma Aldrich	S2	% 10	Sığır Jelatini/G9382-Sigma Aldrich
D3	% 1	Domuz Jelatini/G2625-Sigma Aldrich	S3	% 1	Sığır Jelatini/G9391-Sigma Aldrich
D3	% 5	Domuz Jelatini/G2625-Sigma Aldrich	S3	% 5	Sığır Jelatini/G9391-Sigma Aldrich
D3	% 10	Domuz Jelatini/G2625-Sigma Aldrich	S3	% 10	Sığır Jelatini/G9391-Sigma Aldrich
D4	% 1	Domuz Jelatini/04055-Sigma Aldrich	S4	% 1	Sığır Jelatini/Halavet -Jel gücü 215
D4	% 5	Domuz Jelatini/04055-Sigma Aldrich	S4	% 5	Sığır Jelatini/Halavet -Jel gücü 215
D4	% 10	Domuz Jelatini/04055-Sigma Aldrich	S4	% 10	Sığır Jelatini/Halavet -Jel gücü 215
D5	% 1	Domuz Jelatini/6144-Sigma Aldrich	S5	% 1	Sığır Jelatini/Halavet -Jel gücü 222
D5	% 5	Domuz Jelatini/6144-Sigma Aldrich	S5	% 5	Sığır Jelatini/Halavet -Jel gücü 222
D5	% 10	Domuz Jelatini/6144-Sigma Aldrich	S5	% 10	Sığır Jelatini/Halavet -Jel gücü 222
D6	% 1	Domuz Jelatini/39465-Sigma Aldrich	S6	% 1	Sığır Jelatini/Halavet -Jel gücü 255
D6	% 5	Domuz Jelatini/39465-Sigma Aldrich	S6	% 5	Sığır Jelatini/Halavet -Jel gücü 255
D6	% 10	Domuz Jelatini/39465-Sigma Aldrich	S6	% 10	Sığır Jelatini/Halavet -Jel gücü 255
D7	% 1	Domuz Jelatini/48720-Sigm Aldrich	B	% 1	Balık Jelatini/7041-Sigma Aldrich
D7	% 5	Domuz Jelatini/48720-Sigm Aldrich	B	% 5	Balık Jelatini/7041-Sigma Aldrich
D7	% 10	Domuz Jelatini/48720-Sigm Aldrich	B	% 10	Balık Jelatini/7041-Sigma Aldrich
D8	1%	Domuz Jelatini/48722-Sigma Aldrich			
D8	5%	Domuz Jelatini/48722-Sigma Aldrich			
D8	10%	Domuz Jelatini/48722-Sigma Aldrich			
D9	% 1	Domuz Jelatini/48724-Sigma Aldrich			
D9	% 5	Domuz Jelatini/48724-Sigma Aldrich			
D9	% 10	Domuz Jelatini/48724-Sigma Aldrich			

Üretim prosedürü:

- Doğal elma suyu ve limon suyu içinde toz jelatin karıştırılarak eritilmiştir.

- Bir ısıtıcı kullanılarak hazırlanan karışım 2 dakika 100° C' de kaynatılmıştır.
- Kaynayan karışıma toz şeker ilave edilmiştir.
- ¼ inç tepe boşluğu olacak şekilde bir behere doldurulmuştur.
- Buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Hazırlanan yumuşak şekerlemeler sıcak halde iken ve kalıplara dökülmüş ve kalıplarda 1–2 gün süresince bekletilmiştir.

2.1.5 Farklı Konsantrasyonlarda Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemelerin FTIR Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

2.1.5.1 Materyal

Spektrumların elde edilmesi için Perkin Elmer Frontier (Perkin Elmer Instruments, Waltham, Massachusetts, ABD) FTIR/NIR spektrometre kullanılmıştır. Cihaz OptBr ışın bölücü ve MIR TGS dedektöre sahiptir. FTIR ölçümlerinde ATR aksesuarı kullanılmıştır ve ATR elemanı elmas kristale sahiptir.

2.1.5.2 FTIR Ölçümleri

Hazırlanan jelatin çözeltilerinin ATR-FTIR spektrumları 8 cm⁻¹ çözünürlükte, her bir spektrum için 4 tarama olacak şekilde toplanmıştır. Elde edilen dört taramanın ortalaması alınmıştır. Spektrumlar 4000-600 cm⁻¹ orta kızılötesi bölgede kaydedilmiştir. Her numune için aynı koşullarda üç ölçüm toplanmış ve spektrumların ortalaması alınmıştır. Her ölçüm öncesi saf su ile zemin taraması yapılmıştır. Herhangi bir ön hazırlık olmadan numuneler doğrudan ATR kristali üzerinde sıkıştırılarak ölçümleri alınmıştır. Kristal yüzeyi %100 saf etil alkol kullanılarak temizlenmiştir. Kristal yüzeyinin temizliğinin kusursuz şekilde sağlanması oldukça önemlidir. Bu sebeple sıcak suda çözünme özelliği olan jelatin, ılık saf su kullanılarak kristal yüzeyinden tamamen temizlenmiştir.

2.1.5.3 Kemometrik Analiz

Kemometrik analiz olarak GADA (Genetik algoritmalar diskriminant analiz) metodu kullanılarak sınıflandırma yapılmıştır. GADA (Matlab2017) analizi sonucunda temel

bileşen skor grafikleri, mesafe grafikleri, frekans dağılım grafiği ve PRESS grafiği sunulmuştur.

2.1.6 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerleme Üretimi

2.1.6.1 Materyal

Tez çalışması kapsamında toplam üç kez yumuşak şekerleme üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bu aşamasında aynı konsantrasyonda fakat farklı orijine sahip jelatinleri içerecek şekilde yumuşak şekerlemeler üretilmiştir. Kullanılan jelatin türlerine ait detaylı bilgi Çizelge 2.4'te sunulmuştur. Üretilen yumuşak şekerlemeler kompozisyonlarında üç farklı tür şeker ve farklı orijine sahip jelatinleri içermektedirler. Üretilen yumuşak şekerlemelere ait spektrumlar Perkin Elmer Frontier (Perkin Elmer Instruments, Waltham, Massachusetts, ABD) FTIR/NIR cihazı kullanılarak toplanmıştır.

2.1.6.2 Yöntem

Tez çalışmasının bu aşamasında yumuşak şekerleme üretim prosedürümüz değiştirilmiş olup sert ve uzun yapılı yumuşak şekerleme üretimime uygun prosedür tercih edilmiştir [91]. Bu prosedür de kullanılan malzemeler ve reçete aşağıdaki gibidir:

Malzemeler:

- 7g pektin
- 330g sükkroz
- 480g glikoz şurubu
- 200g, 1. su
- 120g, 2. su
- 50g jelatin
- Yaklaşık 25 mL sitrik asit çözeltisi (%50 v/v)

Reçete:

- Su banyosu içerisinde, 2. su kullanılarak jelatinin çözünmesi sağlanmıştır.
- Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı kullanılarak pektinin 1. su içerisinde çözünmesi

sağlanmıştır ve üzerine önce sükroz sonrasında ise glikoz şurubu ilave edilmiştir. Karışım 95 °C’ da ısıtılmıştır.

- Karışıma çözülmüş olan jelatin ilave edilmiş ve 10 dk süresinde pişirilmiştir.

Çizelge 2. 4 Farklı şeker ve jelatin içerikli yumuşak şekerlemelere ait içerik bileşimi

Yumuşak Şekerleme (YŞ)	Üretilen Yumuşak Şekerlemelerin İçerikleri				
YŞ1	Pektin	Sükroz	Fruktoz	Domuz jelatini (Sigma G2500)-300g jel gücü	Su
YŞ 2	Pektin	Sükroz	Glukoz	Domuz jelatini (Sigma G2500) -300g jel gücü	Su
YŞ 3	Pektin	Sükroz	Maltoz	Domuz jelatini (Sigma G2500) -300g jel gücü	Su
YŞ 4	Pektin	Sükroz	Fruktoz	Domuz jelatini (Sigma 04055)-180g jel gücü	Su
YŞ 5	Pektin	Sükroz	Glukoz	Domuz jelatini (Sigma 04055) -180g jel gücü	Su
YŞ 6	Pektin	Sükroz	Maltoz	Domuz jelatini (Sigma 04055) -180g jel gücü	Su
YŞ 7	Pektin	Sükroz	Fruktoz	Domuz jelatini (Sigma 48720)-70g jel gücü	Su
YŞ 8	Pektin	Sükroz	Glukoz	Domuz jelatini (Sigma 48720) -70g jel gücü	Su
YŞ 9	Pektin	Sükroz	Maltoz	Domuz jelatini (Sigma 48720) -70g jel gücü	Su
YŞ 10	Pektin	Sükroz	Fruktoz	Domuz jelatini (Sigma 48724)-250g jel gücü	Su
YŞ 11	Pektin	Sükroz	Glukoz	Domuz jelatini (Sigma 48724) -250g jel gücü	Su
YŞ 12	Pektin	Sükroz	Maltoz	Domuz jelatini (Sigma 48724) -250g jel gücü	Su
YŞ 13	Pektin	Sükroz	Fruktoz	Domuz jelatini (Sigma G6144)-100g jel gücü	Su
YŞ 14	Pektin	Sükroz	Glukoz	Domuz jelatini (Sigma G6144) -100g jel gücü	Su
YŞ 15	Pektin	Sükroz	Maltoz	Domuz jelatini (Sigma G6144) -100g jel gücü	Su
YŞ 16	Pektin	Sükroz	Fruktoz	Domuz jelatini (Sigma 48722)-170-195 g jel gücü	Su
YŞ 17	Pektin	Sükroz	Glukoz	Domuz jelatini (Sigma 48722) -170-195 g jel gücü	Su
YŞ 18	Pektin	Sükroz	Maltoz	Domuz jelatini (Sigma 48722)- 170-195 g jel gücü	Su
YŞ 19	Pektin	Sükroz	Fruktoz	Domuz jelatini (Sigma G2625)-175 g jel gücü	Su
YŞ 20	Pektin	Sükroz	Glukoz	Domuz jelatini (Sigma G2625) -175 g jel gücü	Su
YŞ 21	Pektin	Sükroz	Maltoz	Domuz jelatini (Sigma G2625) -175 g jel gücü	Su
YŞ 22	Pektin	Sükroz	Fruktoz	Domuz jelatini (Sigma 39465)-280-302 g jel gücü	Su
YŞ 23	Pektin	Sükroz	Glukoz	Domuz jelatini (Sigma 39465) -280-302 g jel gücü	Su
YŞ 24	Pektin	Sükroz	Maltoz	Domuz jelatini (Sigma 39465) -280-302 g jel gücü	Su
YŞ 25	Pektin	Sükroz	Fruktoz	Sığır jelatini (Sigma G9382) -225 g jel gücü	Su
YŞ 26	Pektin	Sükroz	Glukoz	Sığır jelatini (Sigma G9382) -225 g jel gücü	Su
YŞ 27	Pektin	Sükroz	Maltoz	Sığır jelatini (Sigma G9382) -225 g jel gücü	Su
YŞ 28	Pektin	Sükroz	Fruktoz	Sığır jelatini (Sigma G9391)- 225 g jel gücü	Su
YŞ 29	Pektin	Sükroz	Glukoz	Sığır jelatini (Sigma G9391)- 225 g jel gücü	Su
YŞ 30	Pektin	Sükroz	Maltoz	Sığır jelatini (Sigma G9391)- 225 g jel gücü	Su

- pH değerini 3,0-3,2 aralığına getirebilmek için yaklaşık 25 mL sitrik asit ilave edilerek, jellenme kuvvetlendirilmiştir.
- Son ürün kalıplara alınarak buzdolabında muhafaza edilmiştir.

2.1.7 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemelerin FTIR Analizinin Gerçekleştirilmesi

2.1.7.1 Materyal

Spektrumların elde edilmesi için Perkin Elmer Frontier (Perkin Elmer Instruments, Waltham, Massachusetts, ABD) FTIR/NIR spektrometre kullanılmıştır. Cihaz OptBr ışın bölücü ve MIR TGS dedektöre sahiptir. FTIR ölçümlerinde ATR aksesuarı kullanılmıştır ve ATR elemanı elmas kristale sahiptir.

2.1.7.2 FTIR Ölçümleri

Hazırlanan jelatin çözeltilerinin ATR-FTIR spektrumları 8 cm^{-1} çözünürlükte, her bir spektrum için 4 tarama olacak şekilde toplanmıştır. Spektrumlar $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ orta kızılötesi bölgede kaydedilmiştir. Her numune için aynı koşullarda üç ölçüm toplanmış ve spektrumların ortalaması alınmıştır. Her ölçüm öncesi saf su ile zemin taraması yapılmıştır. Her ölçüm üç kez alınmıştır ve analizlerde üç yansımali elmas kristal kullanılmıştır. Spektrumlar havaya göre zemin spektrumu taranarak elde edilmiştir. Herhangi bir ön hazırlık olmadan numuneler doğrudan ATR kristali üzerinde sıkıştırılarak ölçümleri alınmıştır. Kristal yüzeyi %100 saf etil alkol ve saf su kullanılarak temizlenmiştir.

2.1.7.3 Kemometrik Analiz

Kemometrik analiz olarak HCA, PCA ve PLS-DA) kullanılarak sınıflandırma yapılmıştır. Bu analizler sonucunda dendrogramlar, skor grafikleri ve sınıflandırma sonuçları elde edilmiştir.

2.1.8 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemelerin Raman Analizinin Gerçekleştirilmesi

2.1.8.1 Materyal

Raman çalışmaları 785 nm dalgaboyuna sahip lazer kullanılarak yapılmıştır.

Raman spektroskopi sistemi 1024x256 piksel çözünürlüğe sahip bir Renishaw CCD kameraya sahiptir. Cihaz kontrolü ve veri toplama işlemi WIRE (Renishaw, İngiltere) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.1.8.2 Raman Analizi Öncesi Yumuşak Şekerlemeler İçin Numune Hazırlığı

Tez çalışmasında farklı jel gücüne sahip standart sığır ve domuz jelatinleri kullanılarak Raman çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Standart jelatin numuneleri Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır. Kullanılan jelatin türlerine ait detaylı bilgi Çizelge 2.4'de sunulmuştur. Üretilen yumuşak şekerlemeler kompozisyonlarında üç farklı tür şeker ve farklı orijine sahip jelatinleri içermektedirler. Raman ölçümleri mikroskop kullanılarak gerçekleştirildiği için numunenin yüzeyinin düz ve pürüzsüz olmasını sağlamak gerekmektedir. Bu sebeple hazırlanan yumuşak şekerlemeler akışkan halde iken 1 cm çapındaki plastik dairesel kalıplar içerisine 2 ml eşit hacimde aktarılmış ve bir gün sonra numuneler jel haline geldiğinde Raman ölçümleri alınmıştır.

2.1.8.3 Raman Ölçümlerinin Gerçekleştirilmesi

Yapılan çalışmalarda en güvenilir ve düzgün spektrumların 785 nm lazer, %5 lazer gücü, 40 akümülyasyon ve 50x objektif ile elde edildiği tespit edilmiştir. Mikroskop kısmında yapılan önceki çalışmalarda özellikle 50x objektifin tercih edildiği durumda 20x objektife nispeten daha fazla spektral ayrıntı içeren bir Raman spektrumu elde edilebilmiştir. Raman ölçümleri seçilen parametreler ile extended olarak 3000-100 cm⁻¹ spektral aralığında gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar literatürde ilk olma özelliğini taşıdığı için bu çalışmalarda örnek alınan bir metot veya yayın bulunmamaktadır.

2.1.8.4 Kemometrik Analiz

Kemometrik analiz olarak detaylı bir şekilde değerlendirme imkânı sağlayan HCA (Hierarchical cluster analysis) gerçekleştirilmiştir.

2.2 Kromatografik Metotların Geliştirilmesi

2.2.1 Jelatinde Markör Peptitlerin Belirlenmesine Yönelik Nano LC-MS/MS Proteomiks Çalışması

Jelatinde markör peptitlerin belirlenmesini sağlamak amacı ile Thermo Scientific Q Exactive Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with nano Liquid Chromatography (n-LC MS/MS) sıvı kromatografisi cihazı kullanılmıştır. Tripsin (Promega), NH_4HCO_3 (Sigma-Aldrich, Almanya), Halavet sığır jelatini (Kazlıçeşme), B9382 kodlu sığır jelatini (Sigma-Aldrich, Almanya), P2500 ve P2625 (Sigma-Aldrich,Almanya) kodlu domuz jelatinleri çalışmalar kapsamında temin edilmiştir.

2.2.1.1 Triptik Parçalama İşlemi

Jelatinlerin triptik parçalama işlemi için literatürde uygulanan metottan yararlanılmıştır [29]. Bu metoda göre yaklaşık 10 mg jelatin örneği (sığır ve domuz) 5 mL NH_4HCO_3 (0,05 M) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Jelatin çözeltisi 22 μm filtreden geçirilerek süzlmüştür. 100 μL jelatin çözeltisini alınmış ve üzerine 50 μL tripsin (Promega) ilave edilmiştir. Karışım, 37 °C sıcaklıkta 18 saat süre inkübe edilmiştir. Parçalanmış olan jelatinler analiz öncesi -20 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Bu çalışma kapsamında dört farklı çeşit jelatin kullanılarak (Halavet sığır jelatini, B9382 kodlu sığır jelatini (Sigma-Aldrich), P2500 ve P2625 (Sigma-Aldrich) kodlu domuz jelatinleri) triptik parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.2.1.2 Nano LC-MS/MS çalışması

Triptik parçalama işlemi gerçekleştirilen jelatinlerin analizi Thermo Scientific Q Exactive Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with nano Liquid Chromatography (n-LC MS/MS) cihazı kullanılarak markör peptitlerin belirlenmesine yönelik analiz edilmiştir. Pozitif polarite için 300-1500 m/z aralığında tarama yapılmıştır. Nano LC-MS/MS analizinde kullanılan metot parametreleri aşağıdaki gibidir (Çizelge 2. 5)

2.2.1.3 Markör Peptitlerin Belirlenmesi

LC-MS/MS analizi sonucunda elde edilen veriler Maxquant (1.6.1.0) yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. Markör peptitlerin tespit edilebilmesi için sığır jelatini ve domuz jelatinine ait fasta dosyaları yazılımda önceden tanımlanmıştır. Yazılımda kullanılan fasta dosyaları National Center for Biotechnology Information (NCBI) web sitesinden alınmıştır. İlgili dosyalar aşağıdaki gibidir:

Metot parametreleri ise Çizelge 2.5'te sunulmuştur. Mobil faz gradientli olarak sisteme verilmiştir.

Çizelge 2. 5 Nano LC-MS/MS analizinde kullanılan metot parametreleri

Mobil faz gradienti:	%5 B-%25 B (25,0 dk), %25 B-% 40 B (15,0 dk), %40 B-%95 B(2,0 dk), %95 B (2,0 dk), %95 B- %5 B(2,0 dk), %5 B- %95 B (2,0 dk), %95 B (2,0 dk), % 95 B-% 5 B (2,0 dk), % 5 B (8,0 dk) A (mobil faz) : HPLC grade su %0,1 Formic acid B (mobil faz) : HPLC grade Acetonitrile % 0,1 Formic Acid
Akış Hızı:	300 nL/dk
Toplam metot süresi:	60 dk

- Collagen alpha-1(I) chain [Sus scrofa]
- Collagen alpha-1(I) chain-like partial [Sus scrofa]
- Collagen alpha-2(I) chain precursor [Sus scrofa]
- Colagen type I alpha 1[Bos taurus]
- Colagen type I alpha 2 [Bos taurus]

2.3 Gerçek Zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmaları

2.3.1 Materyal

PCR çalışmalarında DNA ekstraksiyonu ve çoğaltılması için ticari kitler kullanılmıştır. Yumuşak şekerlemelerden DNA ekstraksiyonu Sure Food® Prep Advanced kit (CONGEN, R-Biopharm, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonrası DNA çoğaltılması ise yine bir ticari kit (SureFood® Animal ID Pork SENS Plus) ile gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu cihazı (Applied Biosystems® 7500) çalışmalarda kullanılmıştır.

2.3.2 DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonunun tüm adımları kit talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. 200 mg yumuşak şekerleme örneği üzerine 600 µL lizis tamponu 40 µL proteinaz K ilave edilmiş ardından vortekslenmiştir. Karışım 65 °C sıcaklıkta 60 dk süresince ısıtıcı bir blok içinde çalkalanarak tutulmuştur. İki aşamalı santrifüj gerçekleştirilerek lizat uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonrasında tüp içerisine bir filtre yerleştirilmiş ve 12000 rpm de 1 dakika santrifüj gerçekleştirilmiştir. Filtre uzaklaştırılarak süzüntüye 250 µL bağlayıcı tampon eklenerek karıştırılmıştır. Süzüntü yeni bir filtreye aktarılarak oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilerek tekrar 1 dk süre ile 12000 rpm de santrifüjlenmiştir. Süzüntü uzaklaştırıldıktan sonra 550 µL ön yıkama tamponu filtreye eklenmiş ve 12000 rpm de 1 dk süreyle santrifüjlenmiştir. Bu aşama iki kez tekrar edilmiştir. Filtre uzaklaştırıldıktan sonra 12000 rpm değerinde 2 dk süre ile kalan etanolü uzaklaştırmak için santrifüjlenmiştir. Filtre üzerine 50 µL ön ısıtılmış (65 °C) elüsyon tamponu ilave edilmiş ve 65 °C sıcaklıkta 3 dk inkübasyona bırakılmıştır. En son olarak 10000 rpm de 1 dk santrifüjlenmiş ve saf DNA kullanılabilecek kadar muhafaza edilmiştir.

2.3.3 DNA Çoğaltılması

Yumuşak şekerlemelerden ekstrakte edilen DNA'nın çoğaltılması ticari kit (SureFood® Animal ID Pork SENS Plus) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kit domuz reaksiyon karışımını (primerler), Taq-polimeraz enzimini içermektedir. Başlangıç denatürasyonu 95 °C sıcaklıkta 5 dk süre ile, 45 döngü denatürasyon 95 °C sıcaklıkta, primer bağlanması 15 s ve uzama 55 °C de 30 saniye olacak şekilde programlanmıştır. Floresan yoğunluğu 522 nm (FAM) ve 553 nm (VIC) değerlerinde ölçülmüştür.

2.4 Renk ve Tekstür Analizleri

2.4.1 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemelerin Tekstür Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

2.4.1.1 Materyal ve Metot

Tekstür analizi öncesi üretilen yumuşak şekerlemeler sıcak halde iken Petri kaplarına dökülmüş ve katı hale gelinceye kadar +4'de bekletilmiştir. Tez çalışması kapsamında üretilen yumuşak şekerlemelerin tekstür analizi (TA.HD Plus, Stable Micro Systems,

Godalming, İngiltere) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tekstür analizi cihaz yazılımında bulunan “gummy confectionery” metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu metot parametrelerine göre, test öncesi hız 1 mm/s, test hızı 1 mm/s, test sonrası hız 10 mm/s olarak tanımlanmıştır. Gerilme değeri %20 olarak belirlenmişken analiz süresi ise 60 saniyedir. Tekstür analizinde, ölçümler sırasında 35 mm silindir prob kullanılmıştır. Tekstür analizleri oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Tekstür analizince sertlik ve elastikiyet değerlerine bakılmıştır. Analizler 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir.

2.4.1.2 İstatiksel Analiz

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen tekstür analizleri 2 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Sonuçlar, ortalama \pm standard sapma olarak ifade edilmiştir. Kullanılan jelatin türünün yumuşak şekerlemenin tekstür özelliklerine etkisi iki yönlü ANOVA yöntemiyle değerlendirilmiştir. Söz konusu istatistiksel analizler, JMP 6 kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.4.2 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemelerin Renk Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

2.4.2.1 Materyal ve Metot

Laboratuvar ortamında üretilen yumuşak şekerlemelerin renk analizleri petri içerisine dökülerek hazırlanmış yumuşak şekerlemeler üzerinden üç tekrarlı olarak farklı noktalar üzerinden ölçüm alınmıştır. El tipi bir kolorimetre cihazı (Chroma Meter CR-400, Konica Minolta, Japonya) kullanılarak L (parlaklık), a (kırmızı-yeşil), b (sarı-mavi) renk değerleri tespit edilmiştir.

2.4.2.2 İstatiksel analiz

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen tekstür analizleri 4 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Sonuçlar, ortalama \pm standard sapma olarak ifade edilmiştir. Kullanılan jelatin türünün yumuşak şekerlemenin tekstür özelliklerine etkisi iki yönlü ANOVA yöntemiyle değerlendirilmiştir. Söz konusu istatistiksel analizler, JMP 6 kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

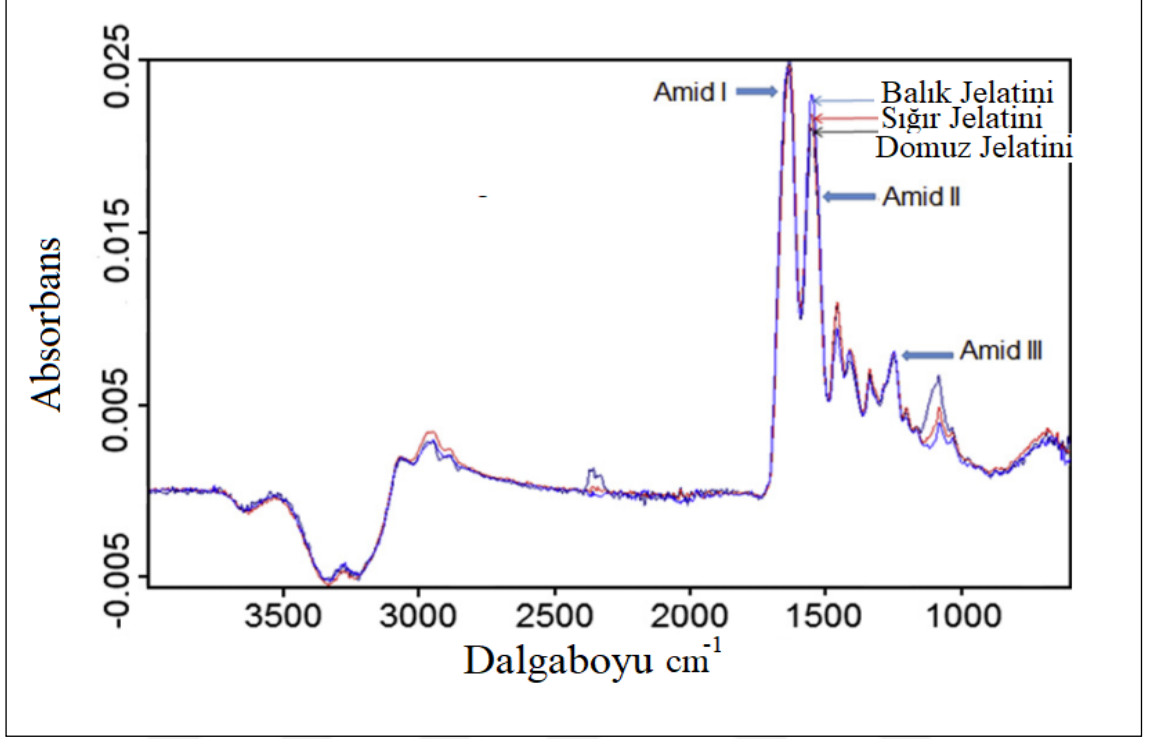
BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Spektroskopik Metotlar Kullanılarak Elde Edilen Bulgular

3.1.1 Standart Jelatinlerin FTIR Çalışmalarına İlişkin Spektral Bulgular

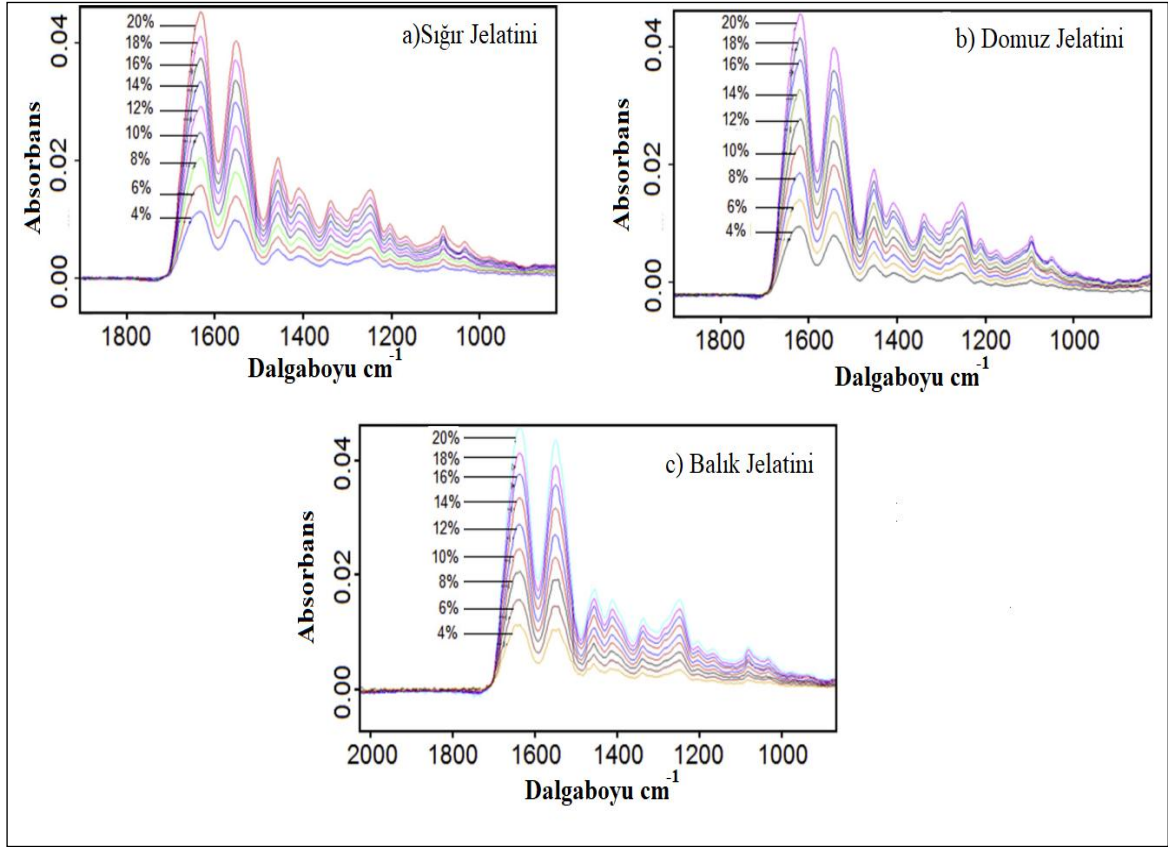
Balık, sığır ve domuz jelatinlerine ait FTIR spektrumları Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Jelatinler benzer karakteristik özelliklerdeki FTIR spektrumlarına sahiptirler. Başka bir deyişle tüm jelatinlerde benzer spektral özellikler görülmüştür. Jelatinlere ait FTIR spektrumlarında belirgin şekilde Amid bölgeleri görülmüştür. Temel olarak sırasıyla $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ (Amid-I), $1565-1520\text{ cm}^{-1}$ (Amid-II) ve $1240-670\text{ cm}^{-1}$ (Amid-III) olmak üzere üç temel Amid bağı FTIR spektrumlarında bulunmaktadır. Elde edilen veriler literatürde tespit edilmiş olan bulgular ile uyumludur [31, 92]. Sığır, domuz ve balık jelatinlerinden elde edilen FTIR spektrumları doğrudan jelatinde bulunan proteinlerin ikincil yapısı ile ilişkili olan güçlü ve keskin pikleri içermektedir. Amid I absorpsiyonu C=O bağı gerilme titreşimleri ve az miktarda C-N gerilme titreşimlerinden ileri gelmektedir. Amid II bandı ise N-H eğilme ve C-N gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Birçok çalışmada belirtildiği gibi neredeyse tamamen C=O gerilme vibrasyonlarından kaynaklanan Amid I bandı proteinlerin ikincil yapısının belirlenmesinde daha yararlıdır [93]. Amid III bandı ise genel olarak C-N gerilme vibrasyonları, N-H düzlem içi eğilme titreşimleri ve zayıf şekilde C-C gerilme C=O düzlem içi eğilme titreşimlerini kapsamaktadır. Amid III bandı çok iyi tanımlanan bir titreşimsel mod olmamasına ve farklı yapısal özelliklerden kaynaklanmasına rağmen literatürde belirtildiğine göre proteinlerin ikincil yapısı Amid III absorpsiyonu baz alınarak tahmin edilebilir [93]. $1000-1100\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki spektral bölge

karbonhidratlara ait C-O ve C-O-C gerilme vibrasyonlarını içermektedir. Özellikle 1083-1031 cm^{-1} arasındaki bantlar karbonhidrat kalıntılarının C-O gerilme titreşimleri ile ilişkilidir [7, 94, 95].



Şekil 3. 1 Balık, sığır ve domuz jelatinlerine ait FTIR spektrumu

Tez çalışması kapsamında %4-%20 konsantrasyon aralığında saf jelatin çözeltileri hazırlanmıştır. Şekil 3.2’de sığır, domuz ve balık jelatinlerine ait FTIR spektrumlarının gösterilmiştir. Şekilde açıkça görüldüğü üzere farklı konsantrasyonlarda tüm jelatinleri için benzer karakteristik özellikler görülmüştür. Başka bir deyişle jelatin türlerinin birbirinden ayrılmasını sağlayacak herhangi bir markör pik veya bant mevcut değildir. Sığır jelatini, domuz jelatini ve balık jelatini için aynı spektral bölgelerde benzer titreşimsel bantlar görülmüştür. FTIR spektroskopisi tekniği ile tespit edilen bulgulara göre Şekil 3.2’de görüldüğü gibi sığır, domuz ve balık jelatinlerinin konsantrasyonu arttıkça Amid I ve Amid II bantlarının absorpsiyon şiddeti yüksek korelasyonlu bir şekilde artmıştır. Başka bir deyişle, absorbans olarak y ekseninde gösterilen değerler jelatin konsantrasyonu arttıkça artmıştır. Sığır, domuz ve balık jelatinlerinin her üçünde de benzer sonuçlar ile karşılaşılmıştır. FTIR tekniğinde sinyal/gürültü oranı yüksektir. Dolayısıyla, FTIR tekniğinden yararlanarak hem kalitatif olarak madde tanımlanmasına yönelik hem de kantitatif olarak miktar belirlenmesine yönelik çalışmaların gerçekleştirilmesi mümkündür.



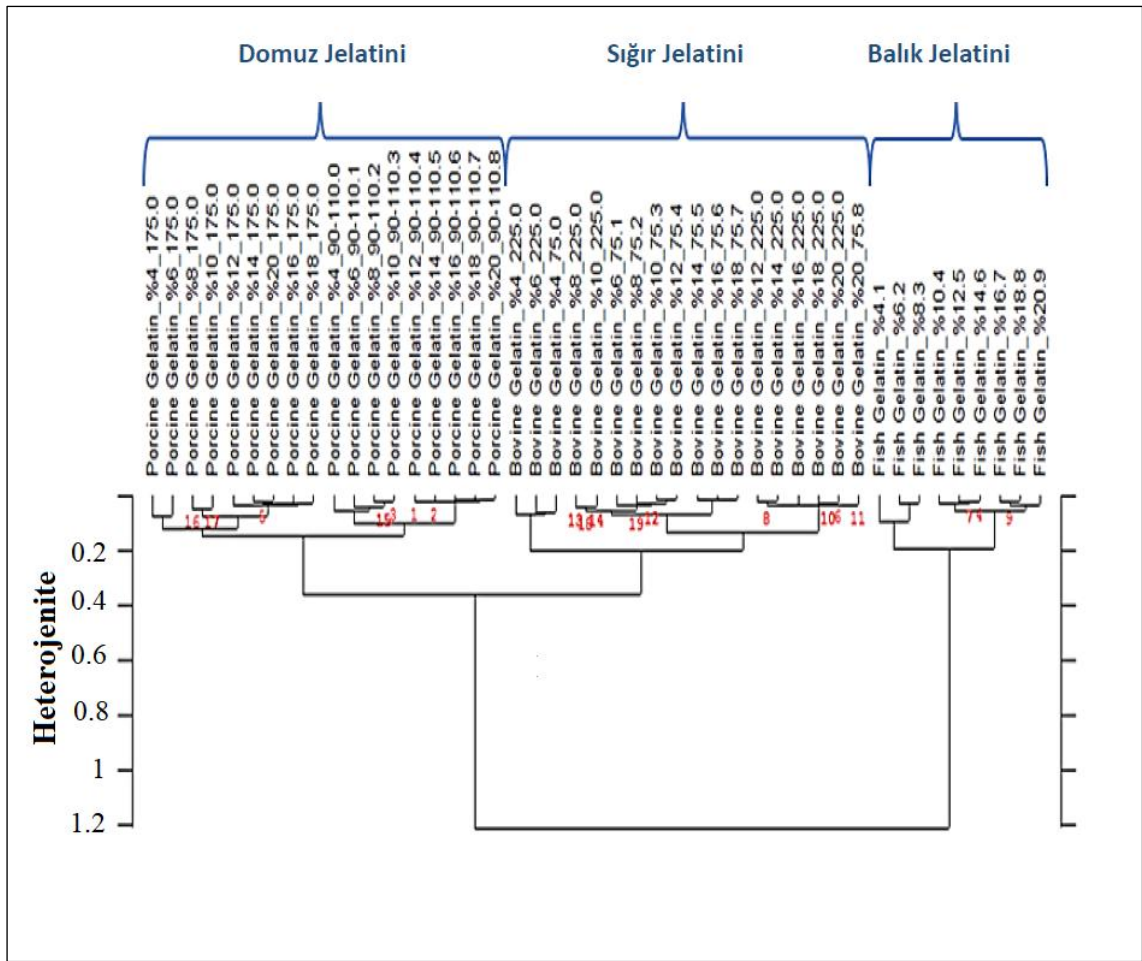
Şekil 3. 2 Konsantrasyon ile ilişkili FTIR spektrumları. Sığır jelatini (a), domuz jelatini (b), balık jelatini (c).

3.1.2 Standart Jelatinlerin FTIR Çalışmalarına İlişkin Kemometrik Bulgular

3.1.2.1 Saf Standart Jelatinlerin FTIR Çalışmalarına İlişkin Kemometrik Bulgular

Jelatin standart numunelerinin FTIR spektrumları tespit edildikten sonra spektral benzerlik temelinde kümeleme analizi yapılarak jelatin örneklerinin sınıflandırılması gerçekleştirilmiştir. Jelatinlerin ayırt edilmesi ve sınıflandırılması türler arasındaki spektral çeşitlilik ve farklılık ile alakalıdır. Sığır, domuz ve balık jelatinlerinin muhtemel sınıflandırmasını gerçekleştirmek amacı ile sınıflandırma analizlerinde Öklit mesafesi ve Ward algoritmasından yararlanılmıştır. Önişlem olarak tüm numunelere ait spektrumların birinci türevi alınmış ve vektör normalizasyonu gerçekleştirilmiştir. Dalga boyu aralığı olarak $1722-1487 \text{ cm}^{-1}$ spektral bölge tercih edilmiştir. Farklı jelatinlerindeki ve farklı konsantrasyondaki (%4-20) sığır, domuz ve balık jelatinlerinin sınıflandırılmasını içeren hiyerarşik kümeleme analizi sonucu Şekil 3.3'te sunulmuştur. Dendrogram da görüldüğü üzere farklı konsantrasyon ve jelatinlerindeki jelatinler (Çizelge 2.1) sığır, domuz ve balık kökenli olmaları durumuna göre %100 doğruluk ile

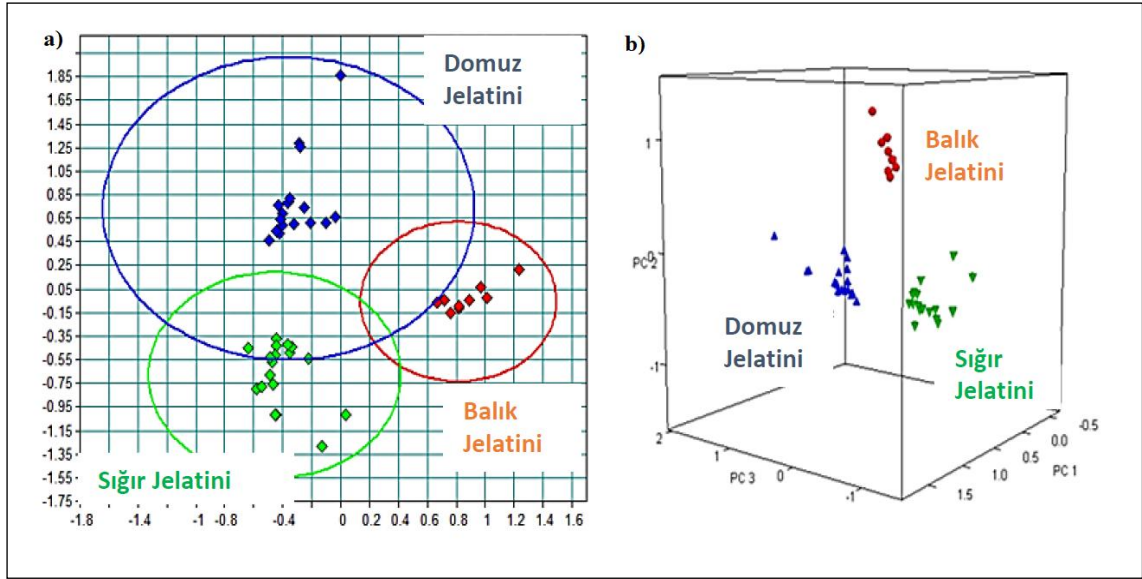
sınıflandırılabilmiştir. Açıkça görülmektedir ki, jelatin örneklerinin sınıflandırılmasında jel gücünden ziyade jelatin kökeni anahtar bir faktördür. HCA analiz sonuçlarına göre, iki temel grup görülmüştür. Kümelerden biri farklı konsantrasyondaki balık jelatini numunelerinden oluşurken diğer grup farklı konsantrasyondaki sığır ve domuz jelatini numunelerini içeren birbirinden jelatin kökenine göre belirgin şekilde ayrılmış sığır ve domuz olmak üzere iki kümeden oluşmaktadır. Şekil 3.3'te görüldüğü üzere tüm jelatinler elde edildikleri kaynağa göre doğru şekilde kümelenmişlerdir. Elde edilen bulgular ATR-FTIR tekniğinin jelatinin kökeni belirlemek amacı ile kolay ve rahat bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 3. 3 Sığır, domuz ve balık standart jelatin numunelerine ilişkin hiyerarşik kümeleme analizi dendrogramı.

Hiyerarşik sınıflandırma analizine ilaveten PCA (temel bileşen analizi) gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.4'te standart jelatinler için PCA analiz sonuçları gösterilmiştir. Çizelge 2.1'de sunulan jelatinler kullanılarak PCA analizi gerçekleştirilmiştir ve bu analizle jelatinlerin sığır, domuz ve balık kökenli olmaları

durumuna göre sınıflandırılması yapılmıştır. Şekil 3.4'te iki ve üç boyutlu PCA analiz sonuçları sunulmuştur. Grafikte görüldüğü üzere belirgin bir şekilde jelatinleri kökenlerine göre ayırmak PCA analizi ile mümkündür.



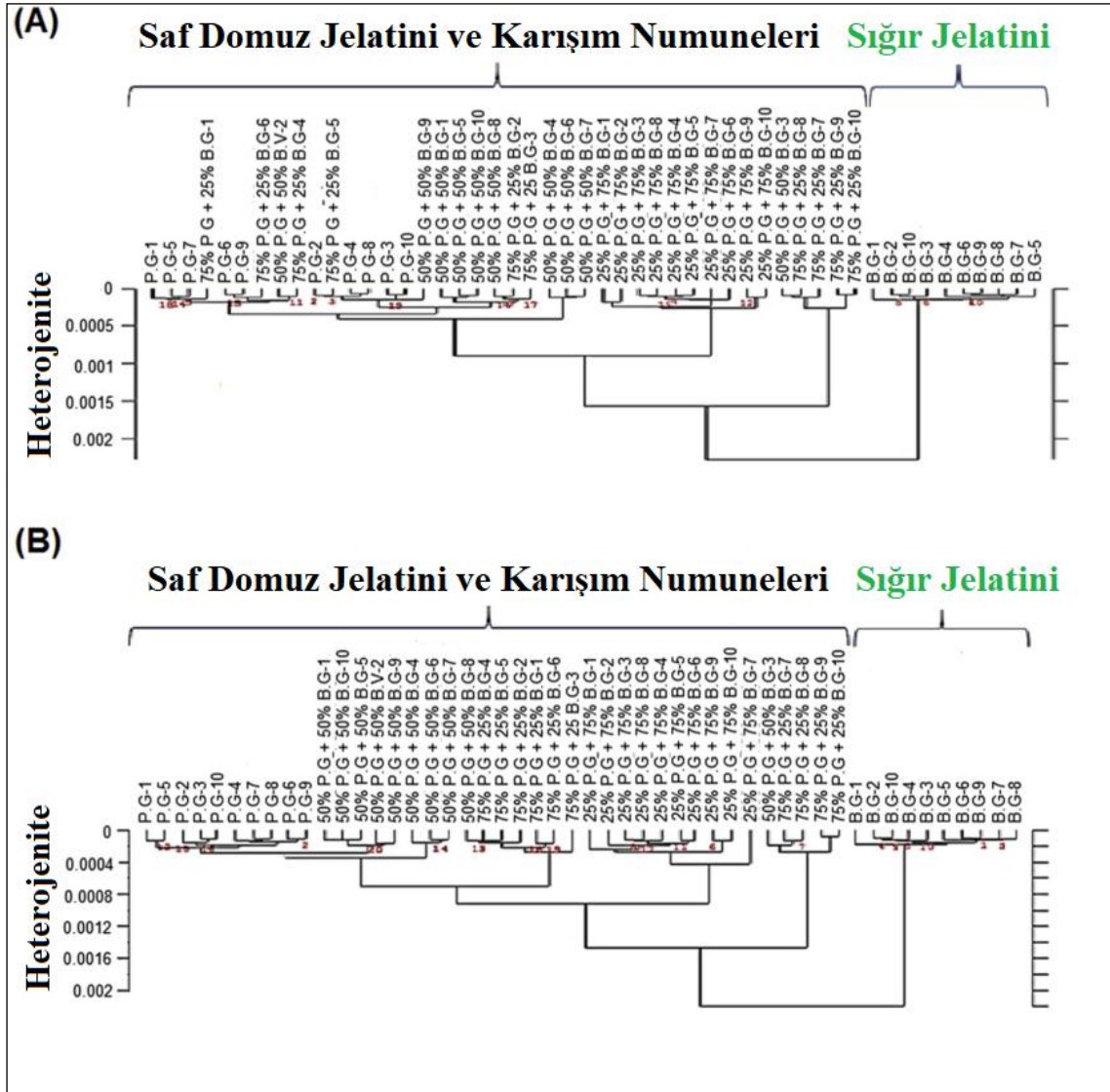
Şekil 3. 4 Sığır, domuz ve balık standart jelatin numunelerine ilişkin PCA kümeleme analizi sonuçları. a) İki boyutlu PCA grafiği, b) Üç boyutlu PCA grafiği

HCA analiz sonuçlarında görüldüğü gibi sığır ve domuz jelatinleri birbirleri ile daha yakın ilişkili görünürken balık jelatini daha uzak bir bölgede gruplanarak belirgin şekilde ayrılmıştır. Literatürde benzer şekilde sığır ve domuz jelatinlerinin PCA analizi kullanılarak ayırt edilebildiği tespit edilmiştir [31].

3.1.2.2 Karışım Standart Jelatinlerin FTIR Çalışmalarına İlişkin Kemometrik Bulgular

Çalışma kapsamında sığır, domuz ve balık jelatinleri değerlendirilmiştir fakat balık jelatini daha kolay ayrılabilirdiği için karışım numuneleri sığır ve domuz jelatinleri için hazırlanmıştır. Sığır ve domuz jelatini oranları 3:1, 1:1 ve 1:3 olarak toplam jelatin konsantrasyonu %10 olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışmanın bu aşamasında saf sığır jelatininin karışım halindeki numunelerden ayırt edilmesi amaçlanmıştır. Hazırlanan karışım numuneleri farklı konsantrasyonlarda (%25 sığır jelatini ve %75 domuz jelatini, %50 sığır jelatini ve %50 domuz jelatini, %25 domuz jelatini ve %75 sığır jelatini) sığır ve domuz jelatinleri içermektedir. Sığır jelatini numunelerinin karışım numunelerinden ayırt edilmesini sağlamak amacı ile önışlem olarak spektrumların birinci türevi alınmıştır, Ward algoritması ve öklit mesafesi, Amid I ve Amid II bantlarını içeren

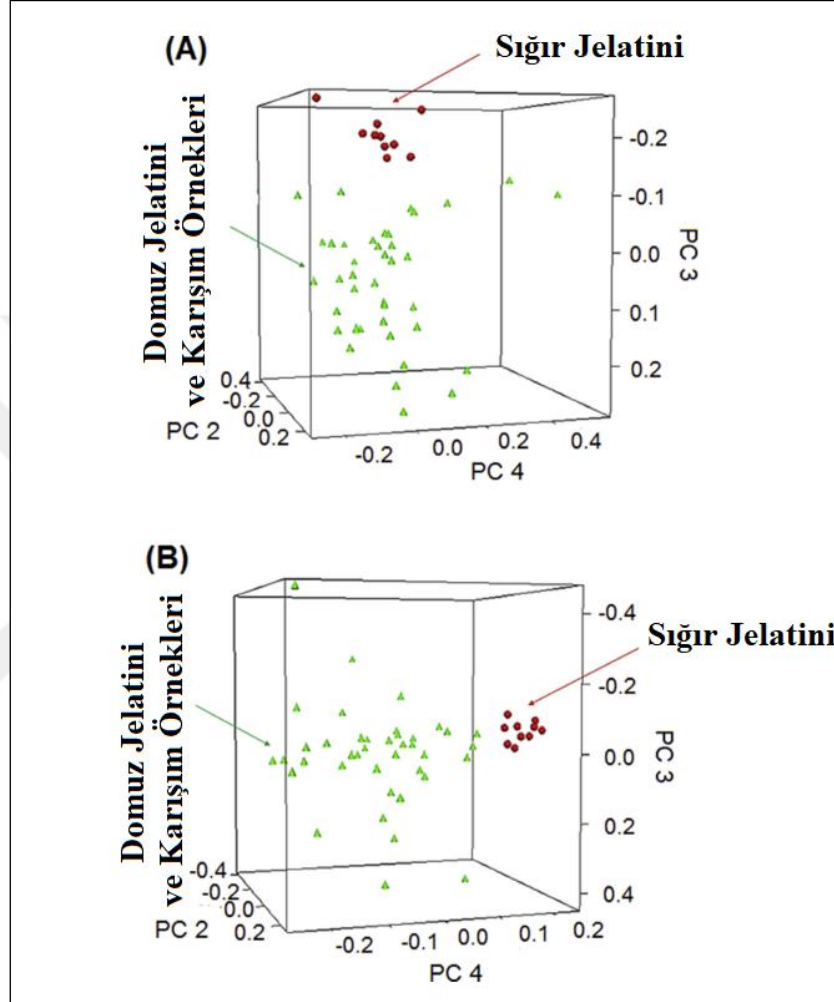
1722-1487 cm^{-1} spektral aralığında uygulanmıştır. Sonuç olarak standart sığır jelatininin açıkça ayırt edildiğini gösteren bir HCA dendrogramı elde edilmiştir (Şekil 3.5 (a)).



Şekil 3. 5 Standar sığır jelatini, standart domuz jelatini ve farklı oranlarda standart sığır-domuz jelatini karışım numuneleri için HCA dendrogramı (a) 1722-1487 cm^{-1} spektral bölgesi (b) 1722-1487 cm^{-1} ve 1313-1124 cm^{-1} spektral bölgesi.

Yalnız standart domuz jelatinleri, sığır-domuz karışım numunelerinden ayırt edilememiştir. Bu durumun üstesinden gelmek için 1246 cm^{-1} civarındaki Amid III bantı, Amid I ve Amid II bantlarına ilaveten HCA kümeleme analizine dâhil edilmiştir. Şekil 3.5 (b)'de görüldüğü üzere Amid III bandında ki spektral bilginin HCA analizine dahil edilmesi durumunda standart domuz jelatinleri karışım numunelerinden başarılı şekilde ayırt edilebilmiştir. Hiyerarşik sınıflandırma analizine (HCA) ilaveten temel bileşen analizi (PCA) gerçekleştirilmiştir. PCA analizi sonuçları HCA analizi sonuçları ile tamamen uyumludur. Elde edilen HCA ve PCA analizi sonuçları (Şekil 3.6)

değerlendirildiğinde HCA sonuçlarının sınıflandırma çalışmalarında daha yararlı olduğunu söylemek mümkündür çünkü sınıf elemanları arasındaki yakınlık ilişkisi hakkında detaylı olarak bilgi vermektedir. Başka bir deyişle küme elemanları arasındaki benzerlik veya farklılık ilişkisi dendrogram üzerindeki konumlanmalarına göre başarılı bir şekilde değerlendirilebilmektedir.



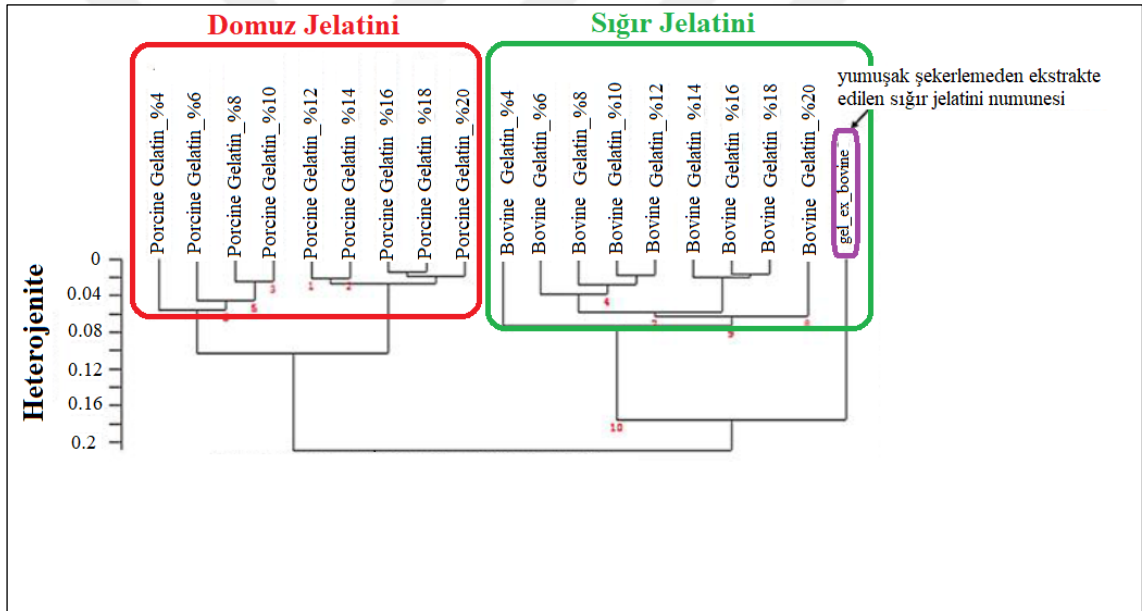
Şekil 3. 6 Standar sığır jelatini, standart domuz jelatini ve farklı oranlarda standart sığır-domuz jelatini karışım numuneleri için üç boyutlu PCA grafikleri (a) 1722-1487 cm⁻¹ spektral bölgesi (b) 1722-1487 cm⁻¹ ve 1313-1124 cm⁻¹ spektral bölgesi.

Çalışma kapsamındaki bulguları literatür ile karşılaştırdığımızda tamamen literatür ile uyumlu sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda proteinlerin ikincil yapısının 1600-1700 cm⁻¹ aralığında ki Amid I bandına karşılık gelen spektral bölge kullanılarak değerlendirilebileceği tespit edilmiştir [95]. Hashim vd. [31] yaptıkları bir çalışmada sığır ve domuz jelatinlerinin ayrımı için 3290–3280 cm⁻¹ ve 1660–1200 cm⁻¹ spektral aralığındaki N-H bağlarından yararlanmışlardır. Tez çalışmasında elde edilen bulgulara göre, sığır, domuz ve balık jelatinlerinin kökenine

göre ayırt edilmesi geliştirilen FTIR temeli metot ile mümkün olmaktadır. HCA ve PCA teknikleri ile gerçekleştirilen sınıflandırma çalışmaları ile %100 doğrulukta sonuçlar elde etmek mümkündür. Başka bir deyişle FTIR spektroskopisinin kemometri ile birlikte uygulanması, jelatinde köken tespiti için oldukça faydalı bir gelişme sağlamıştır.

3.1.3 Yumuşak Şekerlemelerden Ekstrakte Edilen Jelatinin Kemometrik Olarak Değerlendirilmesi

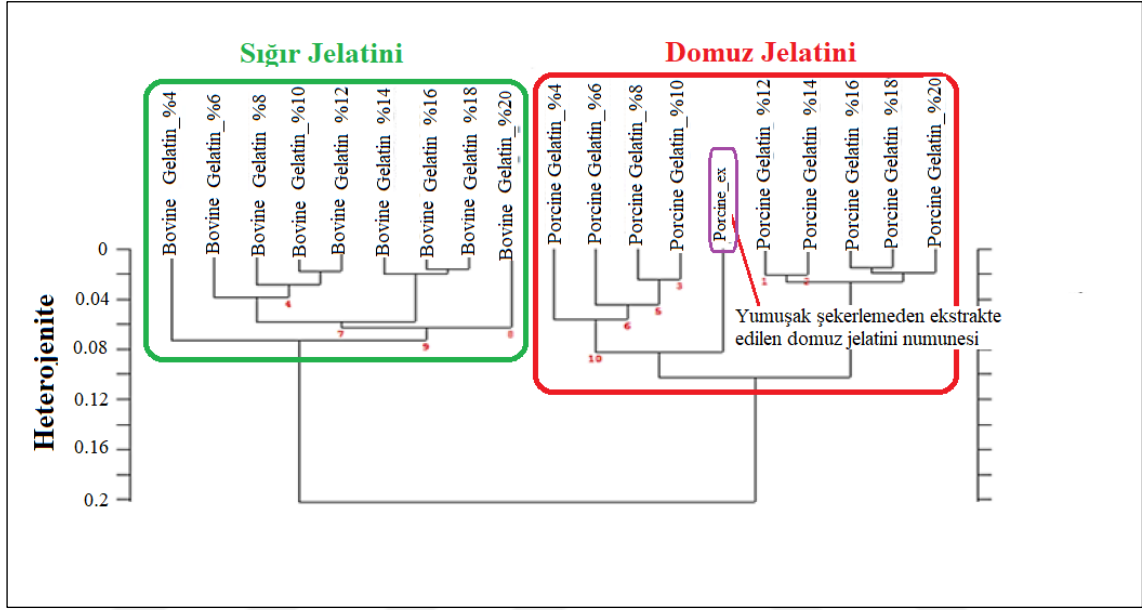
Tez çalışması kapsamında Bölüm 2.1.2’de belirtildiği şekilde farklı orijine sahip jelatinler (sığır, domuz) kullanılarak yumuşak şekerleme üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen yumuşak şekerlemelerden ekstrakte edilen jelatin standart jelatinler kullanılarak oluşturulmuş kemometrik model üzerinde test edilmiştir. Şekil 3.7’de ekstrakte edilen jelatinin HCA dendrogramı üzerindeki lokasyonu gösterilmiştir.



Şekil 3. 7 Yumuşak şekerlemelerden ekstrakte edilen sığır jelatini numunesinin dahil edildiği hiyerarşik kümeleme analizi dendrogramı.

Şekil üzerinde görüldüğü üzere standart jelatinler ile oluşturulan metodoloji kullanılarak şekerleme numunesinden ekstrakte edilen jelatin test edildiğinde bu örneğin sığır jelatini numunelerinin bulunduğu sınıfta yer aldığı görülmektedir. Ekstrakte edilen jelatin dendrogram üzerinde mor renk ile işaretlenmiştir. Görüldüğü üzere numunenin sığır kökenli jelatin olduğunu söylemek mümkündür. Benzer şekilde domuz jelatini kullanılarak üretilen yumuşak şekerlemelerden jelatin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Üretilen yumuşak şekerlemelerden ekstrakte edilen jelatin standart jelatinler

kullanılarak oluşturulmuş kemometrik model üzerinde test edilmiştir. Şekil 3.8’de ekstrakte edilen jelatinin HCA dendrogramı üzerindeki lokasyonu gösterilmiştir. Ekstrakte edilen jelatin dendrogram üzerinde mor renk ile işaretlenmiştir. Görüldüğü üzere numunenin domuz kökenli jelatin olduğunu söylemek mümkündür çünkü ekstrakte edilen jelatin kemometrik analiz sonucunda domuz jelatini numunelerinin bulunduğu sınıfa dâhil olmuştur.

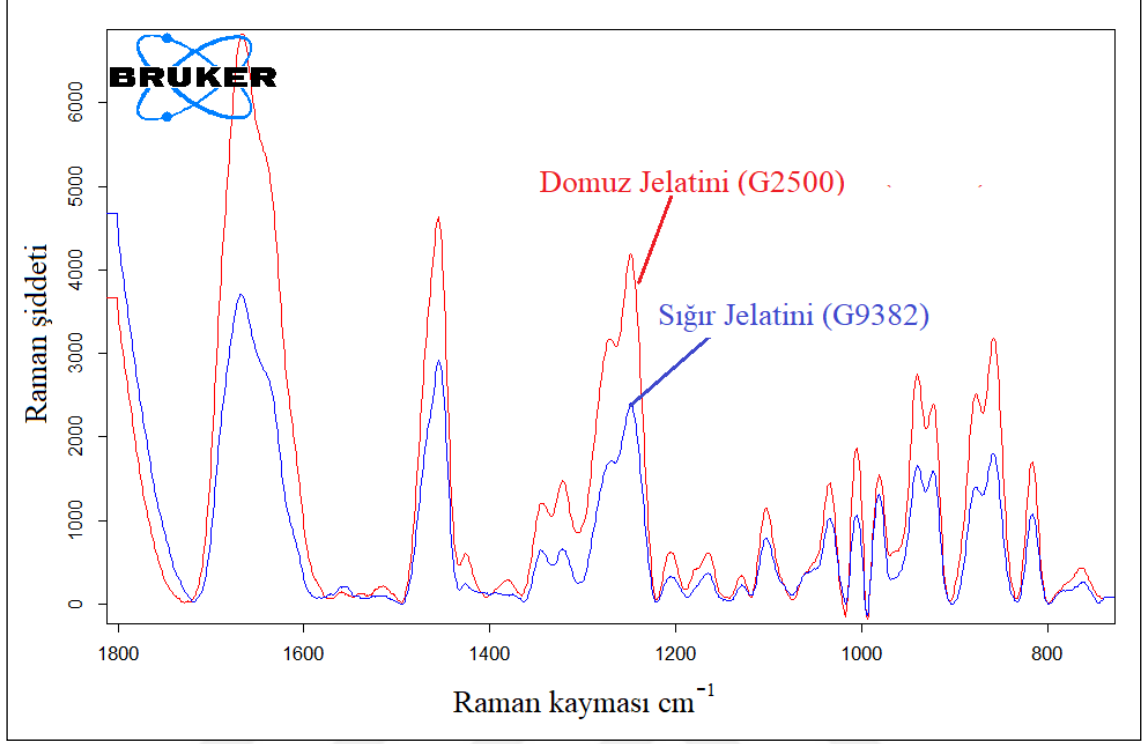


Şekil 3. 8 Yumuşak şekerlemeden ekstrakte edilen domuz jelatini numunesinin dahil edildiği hiyerarşik kümeleme analizi dendrogramı.

3.1.4 Standart Jelatinlerin Raman Çalışmalarına İlişkin Spektral ve Kemometrik Bulgular

Tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalarda bölüm 2.1.3’ te bahsedilen materyal ve metodoloji kullanılarak Raman çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Aslında Raman çalışmalarında temel amaç FTIR tekniği kullanılarak tespit edilemeyen markör spektral bilgiyi bulabilmektir. FTIR tekniği kullanılarak kemometri yardımı ile jelatinler orijinlerine göre ayırt edilebilse de domuz jelatinine ait markör özellikte bir spektral bant tespit edilememiştir. Standart sığır ve domuz jelatinlerine ait Raman spektrumları Şekil 3.9’da gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi $1800-700\text{ cm}^{-1}$ spektrum aralığında her iki jelatin türü içinde spektral özellikler birebir aynıdır. Markör spektral bilgiyi elde edebilmek amacı ile ölçümlerin alındığı Raman mikroskopta ön değerlendirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarında 20x ve 50x objektifler farklı lazer gücü, süre ve akümülyasyon ile denenmiştir. Deneme sonuçlarına göre 50x objektif

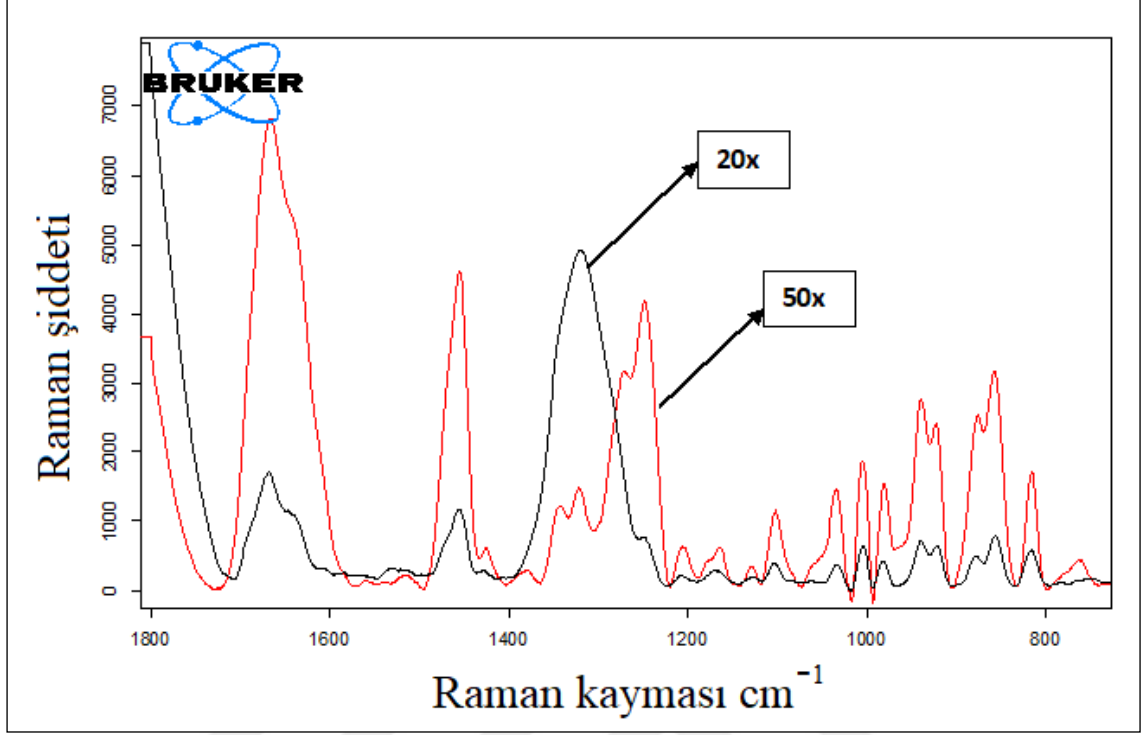
tercih edildiği durumda girişim yapmış bantların açıldığı ve 1400-1300 cm^{-1} dalgaboyu aralığında yeni piklerin ortaya çıktığı tespit edilmiştir.



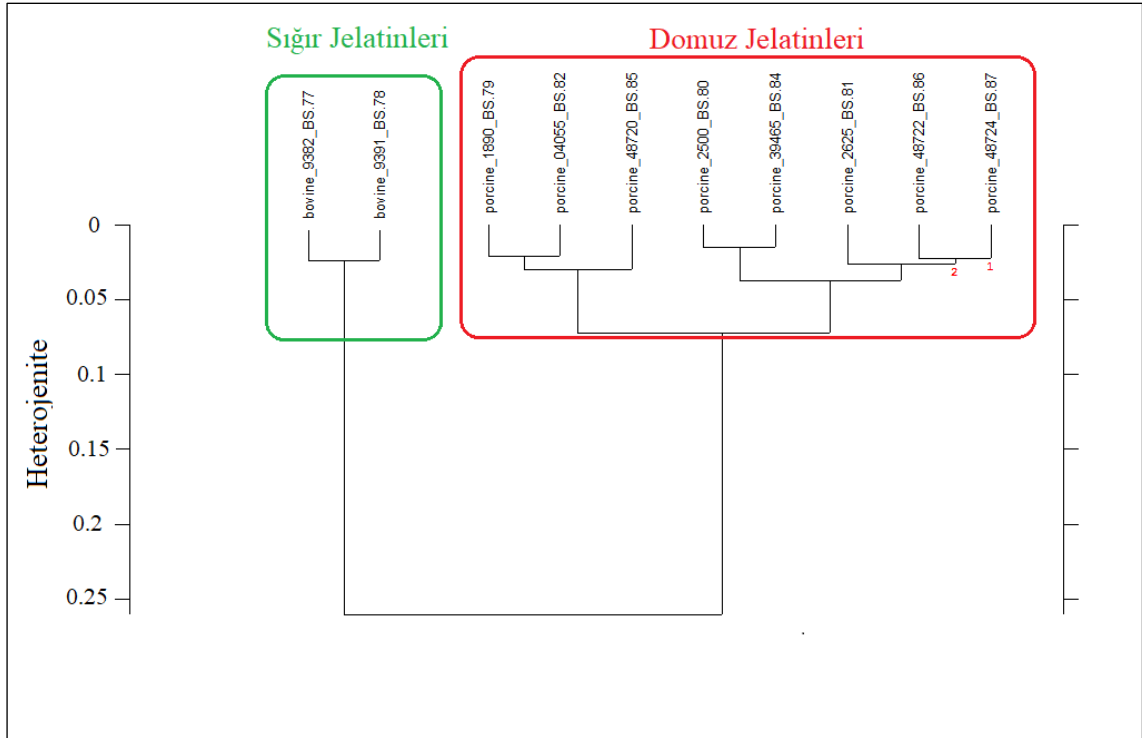
Şekil 3. 9 Standart sığır ve domuz jelatinlerine ait Raman spektrumları

Fakat söz konusu spektral özellikler hem sığır hem domuz jelatininde ortak olarak görülmüştür. Dolayısıyla tüm ölçümler 785 nm lazer kullanılarak, %5 lazer gücü ile 1800-700 cm^{-1} dalgaboyu aralığında toplanmıştır. Sinyal/gürültü oranını artırmak ve gürültünün spektrum üzerindeki olumsuz özelliklerinden kaçınmak amacı ile 50 akümülyasyon olacak şekilde tarama yapılmıştır. Mikroskop kısmında yapılan çalışmalarda özellikle 50X objektifin tercih edildiği durumda daha fazla spektral ayrıntı içeren bir Raman spektrumu elde edilebilmiştir. Şekil 3.10'da karşılaştırmalı olarak spektral farklılık gösterilmiştir. Görüldüğü üzere 50X objektifin tercih edildiği durumda 1400-1200 cm^{-1} dalga boyu aralığındaki pik örtüşmesi açılarak bantlar ayırık ve belirgin şekle gözlemlenebilmiştir. Her ne kadar 50x objektif kullanılarak daha detaylı spektral bilgi elde edilse de farklı türdeki jelatinler arasında ayırt edici bir özellik olmadığından. Jelatinlerin kökenine göre ayırt edilebilmesi için kemometri kullanılmasına gerek duyulmuştur. Kemometri çalışmaları bölüm 2.1.3'te izah edildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Çizelge 2.2'de belirtilen jelatinler çalışma kapsamında kullanılmıştır. Kemometrik analiz olarak HCA ve PCA analizleri gerçekleştirilmiştir.

İlaveten Matlab yazılımı kullanılarak GADA kemometrik tekniği kullanılarak sınıflandırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

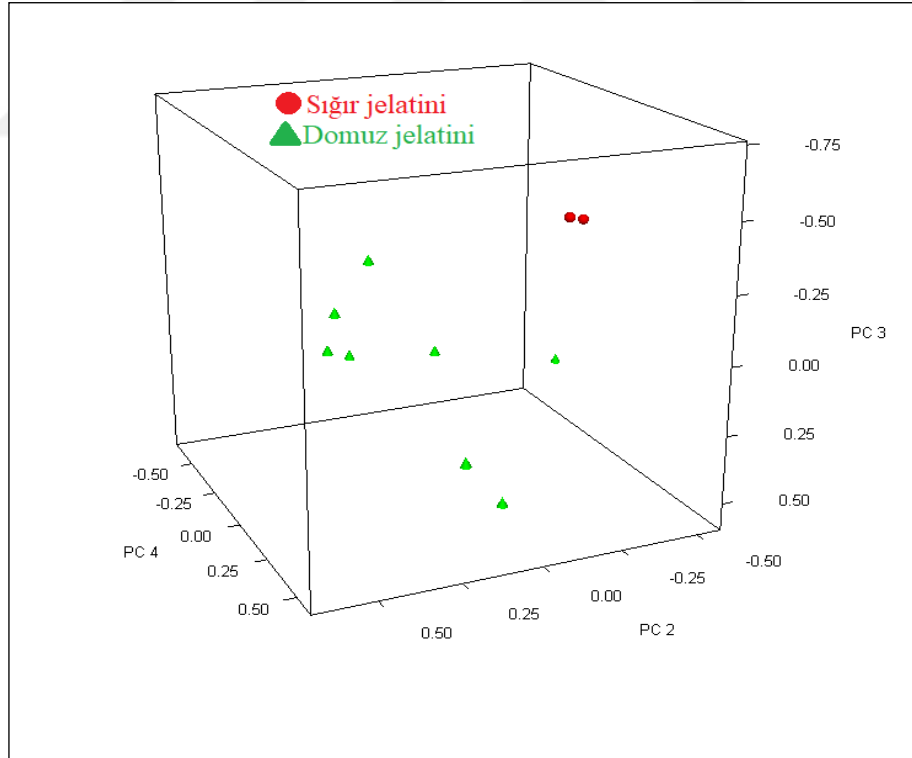


Şekil 3. 10 50x ve 20x objektifler kullanılarak elde edilen jelatine ait Raman spektrumları



Şekil 3. 11 Sığır ve domuz standart jelatin numunelerine ilişkin hiyerarşik kümeleme analizi Raman dendrogramı.

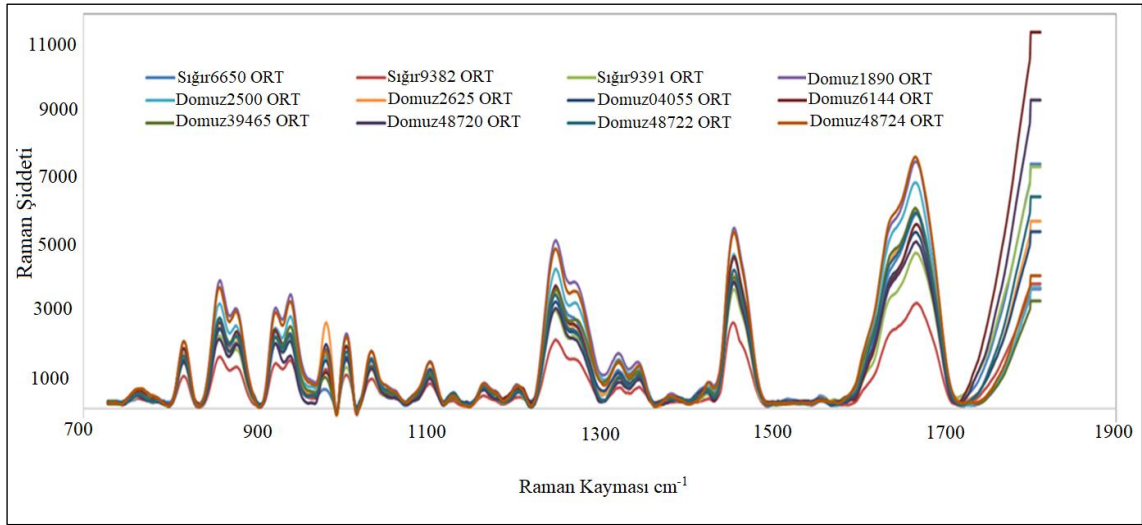
Çalışmanın ilk aşamasında %6,67 konsantrasyonda sığır ve domuz jelatini çözeltileri hazırlanmıştır. Tüm jelatin tipleri için konsantrasyonlar aynıdır. Jelatin numunelerinin sınıflandırılmasında hiyerarşik kümeleme analizi ve temel bileşen analizi uygulanmıştır. Şekil 3.11'deki dendrogramda görüldüğü üzere, sığır ve domuz jelatinleri yüksek doğruluk ile ayırt edilmiştir. Sınıflandırma işlemlerinde ham spektrumların birinci türevleri alınmış ve Ward algoritması uygulanmıştır. Kümeleme analizinde tercih edilen spektral bölge ise $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ bant aralığıdır. Daha önce de belirtildiği gibi $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ aralığında ki spektral bölge Amid I bandından kaynaklanan vibrasyonları içermektedir ve bu bölge proteinlerin ikincil yapılarının tahmin edilmesinde kullanılabilir [95]. Aynı zamanda temel bileşen analizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen grafik Şekil 3.12'de sunulmuştur. Temel bileşen analizinde de benzer şekilde sığır ve domuz jelatinleri yüksek doğruluk ile ayırt edilerek sınıflandırılabilir. Şekil 3.12'de PCA analizinin bir çıktısı olan üç boyutlu skor grafiği sunulmuştur ve grupların belirgin şekilde ayrıldığı üç boyutlu PCA grafiği üzerinde açıkça görülmektedir.



Şekil 3. 12 Sığır ve domuz standart jelatin numunelerine ilişkin Raman PCA kümeleme analizi üç boyutlu grafiği

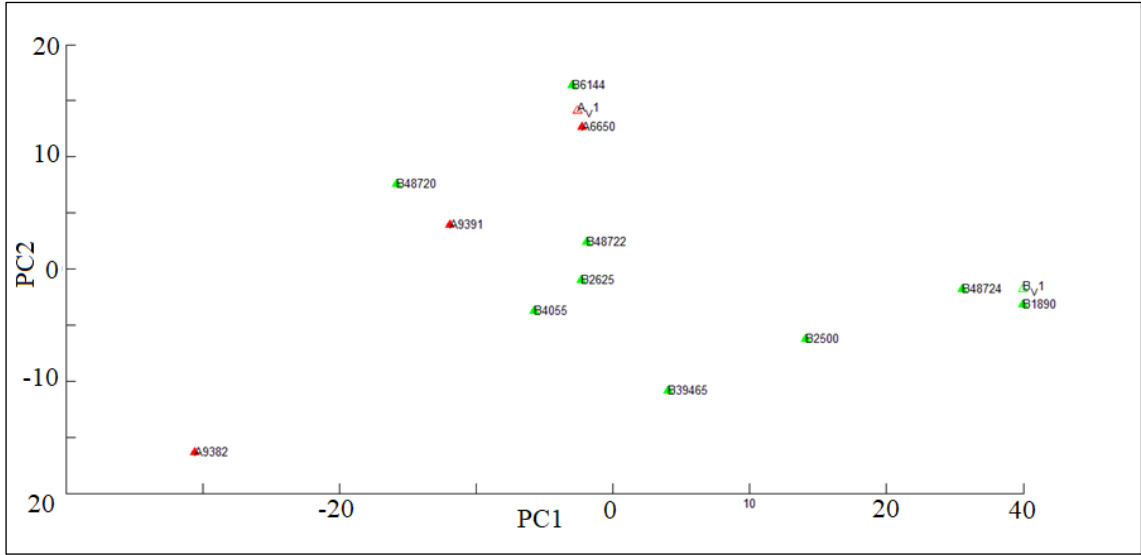
Bölüm 2.1.3'te bahsedilen materyal ve metot kullanılarak üretilen yumuşak şekerlemeler için ayrıca Matlab yazılımı (2017) kullanılarak kemometrik çalışmalar

gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar kapsamında GADA analizi uygulanarak başarılı bir şekilde yumuşak şekerlemelerin kökenine göre ayırt edilebilmesi sağlanmıştır. Standart jelatin örneklerinin her biri 3 tekrarlı olmak üzere Raman ölçümleri yapılmış 12 adet jelatin örneğine (3'ü sığır, 9'u domuz) ait verilere öncelikle zemin düzeltmesi yapılmış ve bu örneklerin ortalaması alınmıştır.12 adet jelatin örneğine ait Raman spektrum grafiği şekil 3.13'de gösterilmektedir. Grafik üzerinde gösterilen isimler jelatin numunelerinin orijinal isimleridir. Ayrıca bu jelatinler ile ilgili detaylı bilgi Çizelge 2.2' de verilmiştir.

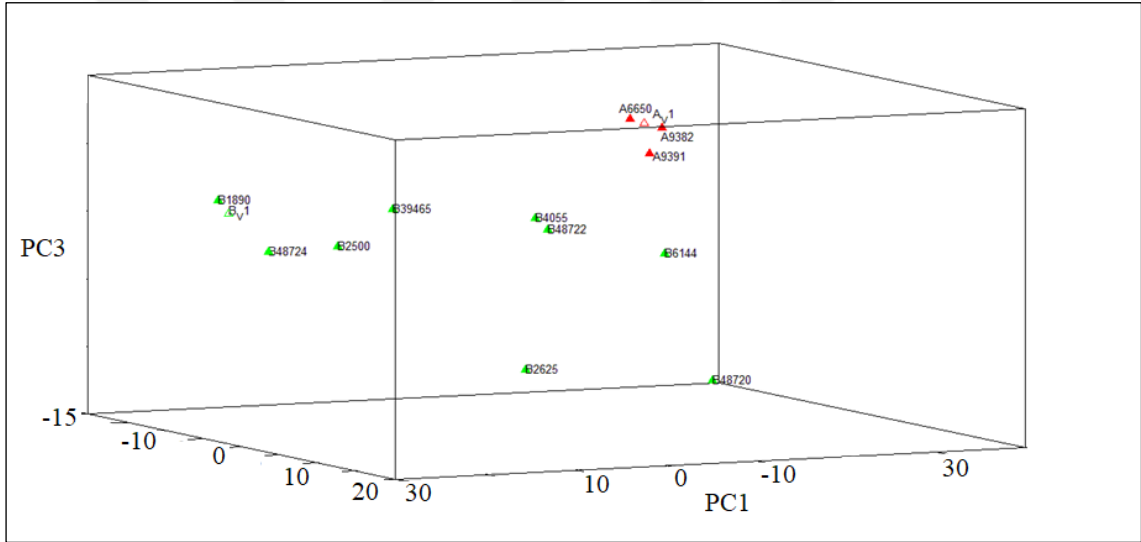


Şekil 3. 13 Ortalama değerleri alınan on iki adet (3'ü sığır, 9'u domuz) jelatin örneğine ait Raman spektrum grafiği.

Şekil 3.13'de Raman spektrumları gösterilen jelatin örnekleri ile GADA metodu kullanılarak sınıflandırma yapılmıştır. Yapılan analiz sonucu elde edilen ilk iki temel bileşene (PC1 ve PC2) ve ilk üç temel bileşene (PC1, PC2 ve PC3) ait skor grafikleri şekil 3.14 ve 3.15'te verilmektedir. Yapılan analiz sonucu elde edilen ilk üç temel bileşen toplam varyansın %76'sını açıklamaktadır. Sınıflandırmaya dahil edilen 12 adet örneğe ek olarak, her gruptan birer adet toplamda 2 adet bağımsız validasyon da modele eklenmiştir. Skor grafiklerinin üzerinde ki numaralar numunelerin orijinal numaralarını göstermektedir. Şekil 3.14 ve 3.15'de PCA analizinden gelen skor grafiklerine bakıldığında, sığır (kırmızı) ve domuz (yeşil) jelatin örneklerinin birbirlerinden ayrımı net bir şekilde gözlenmektedir. Ayrıca sınıflandırma analizinde kullanılan GADA metodunda verilerin tamamına uygulanan temel bileşen analizinden elde edilen skorlara mahalanobis uzaklık hesabı yapılmış ve elde edilen uzaklıklar aşağıda ki grafikte gösterilmiştir.

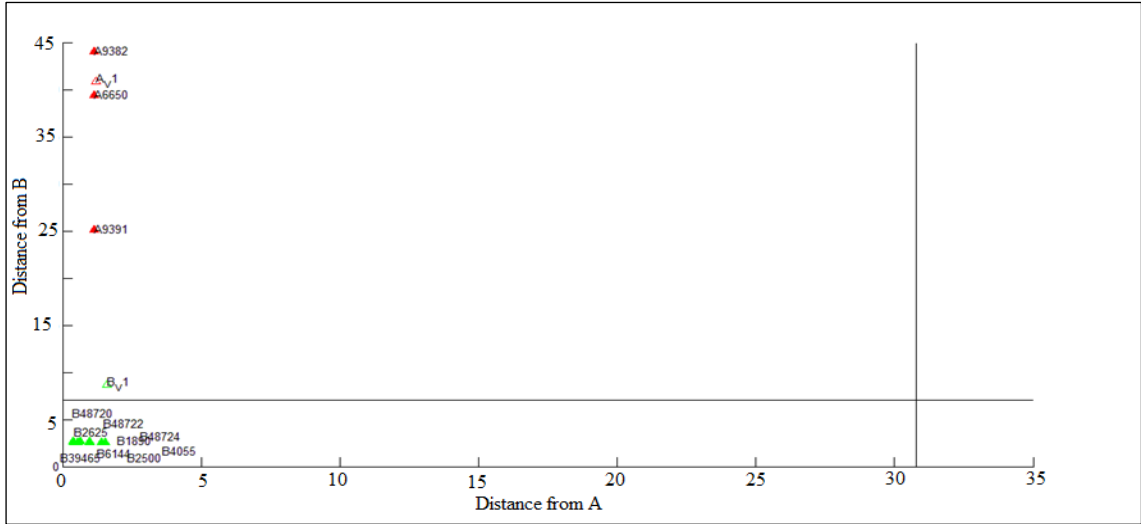


Şekil 3. 14 Raman ölçümleri alınmış sığır (kırmızı) ve domuz (yeşil) jelatininin ilk iki temel bileşenine (PC1 ve PC2) ait skor grafiği.

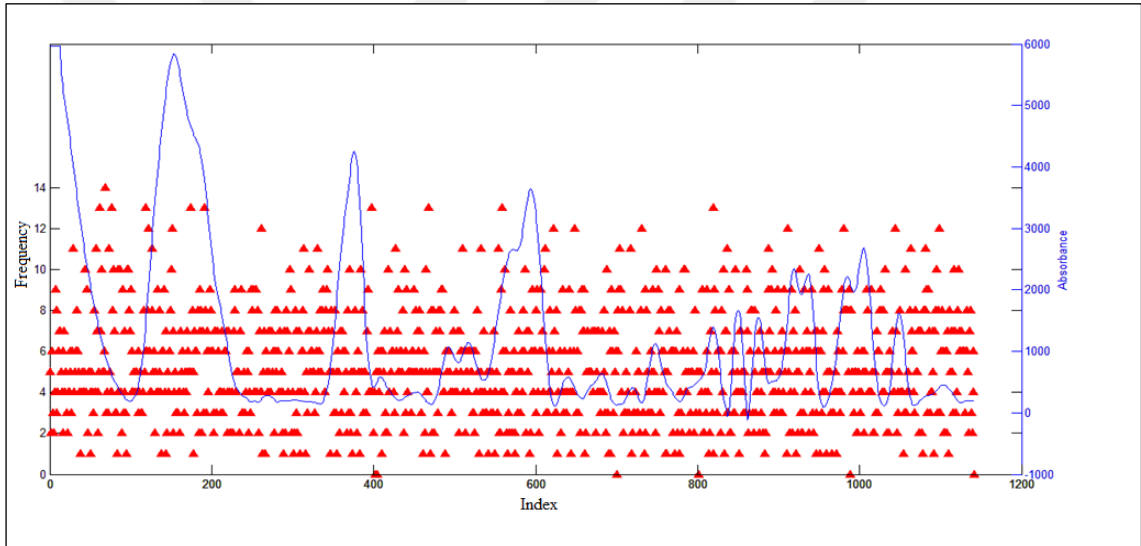


Şekil 3. 15 Raman ölçümleri alınmış sığır (kırmızı) ve domuz (yeşil) jelatininin ilk üç temel bileşenine (PC1,PC2 ve PC3) ait skor grafiği

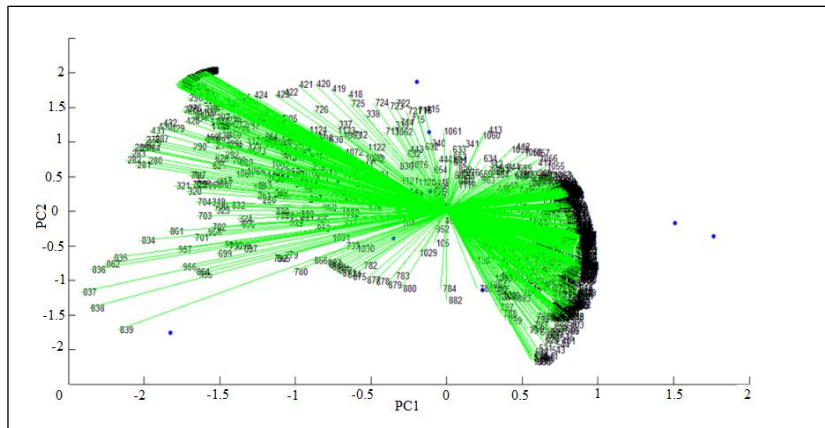
Şekil 3.16’da sınıflandırma sonucu elde edilen 2 farklı grubun (A ve B) birbirlerine olan uzaklık grafiği yer almaktadır. Şekil 3.16’de gösterilen uzaklık grafiğinde, x eksenini A (sığır jelatini) grubuna olan uzaklığı, y eksenini ise B (domuz jelatini) grubuna olan uzaklığı temsil etmektedir. Grafikte görüldüğü gibi, A ve B grubuna ait örnekler %95 güven aralığında birbirlerinden ayrıldığı görülmektedir. Bunlara ek olarak genetik algoritma tarafından spektrum üzerinde seçilen noktaların frekans dağılım grafiği Şekil 3.17’de verilmiştir. Ayrıca PCA analizinden gelen skor ve yükleme (loadings) grafiklerinin üst üste gösterildiği “biplot” Şekil 3.18’de verilmiştir.



Şekil 3. 16 Raman ölçümleri alınmış sığır (kırmızı) ve domuz (yeşil) jelatinine ait iki grubun (A ve B) birbirlerine uzaklık grafikleri



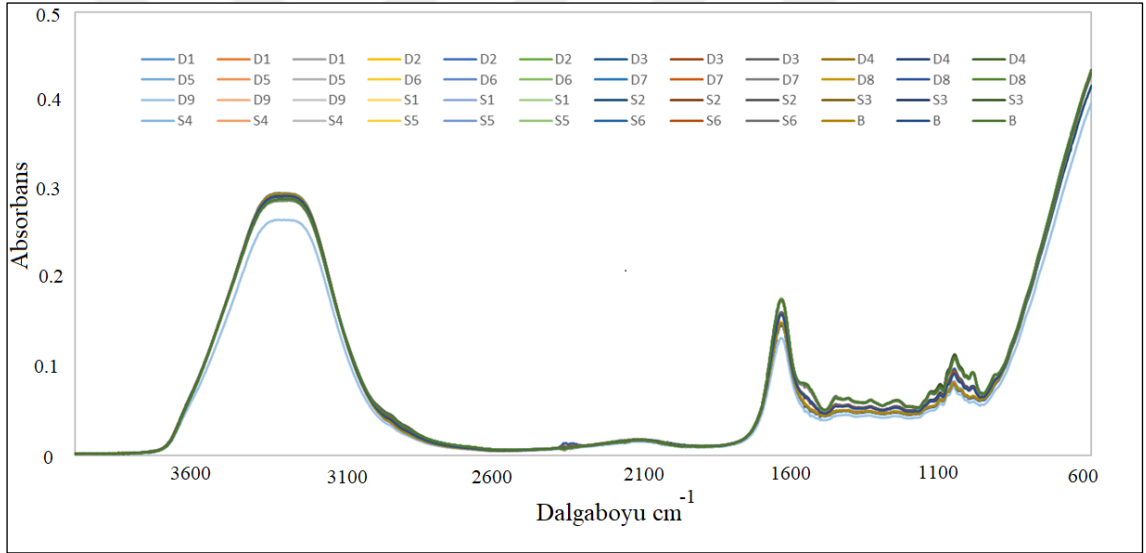
Şekil 3. 17 Seçilen dalga boylarının frekans dağılım grafiği



Şekil 3. 18 Skor ve yükleme vektörlerinin (PC1 vs PC2) biplot grafiği

3.1.5 Farklı Konsantrasyonlarda Üretilen Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerleme için FTIR ve Kemometri Bulguları

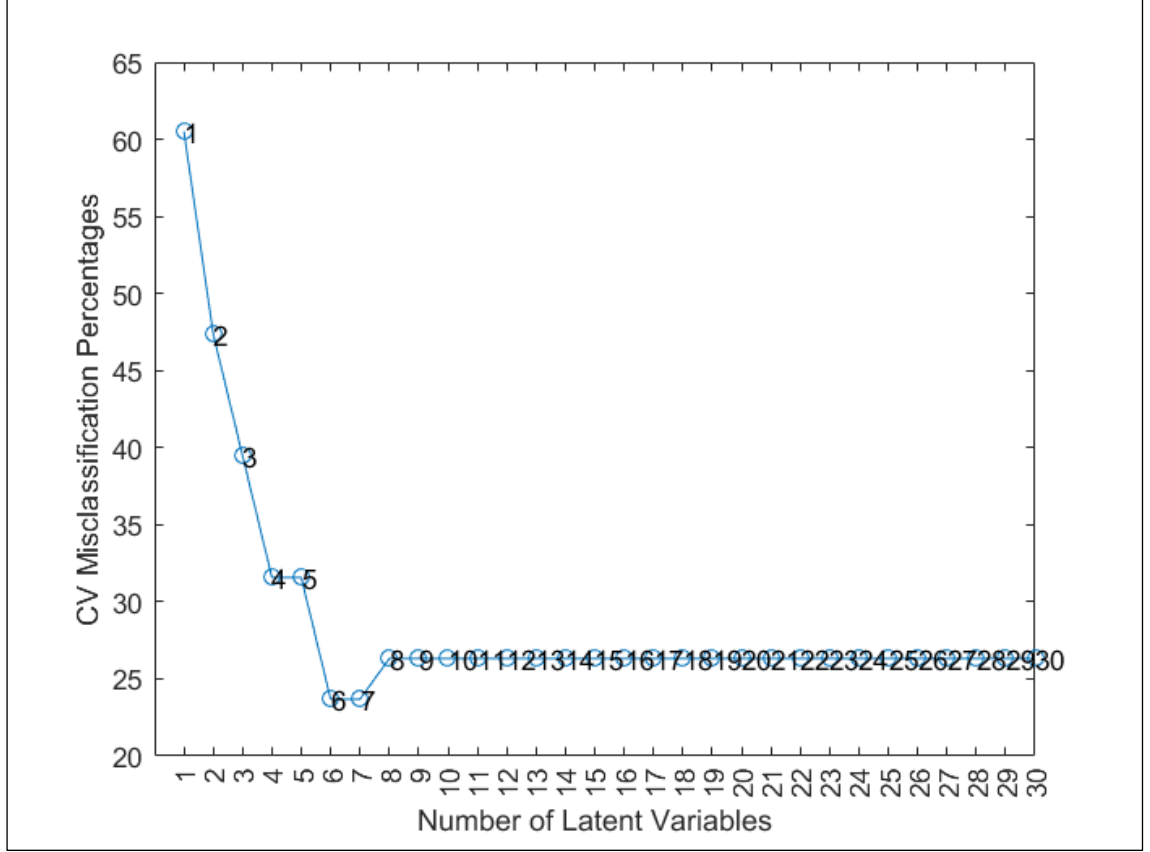
Tez çalışması kapsamında bölüm 2.1.4'te detaylı olarak anlatılan materyal ve metot kullanılarak farklı konsantrasyonlarda jelatin içeren yumuşak şekerleme üretimi laboratuvar koşullarında gerçekleştirilmiştir. Üç farklı yüzdede (%1, %5, %10) jelatin içeriğine sahip, dokuz farklı türde domuz, altı adet farklı türde sığır ve bir adet balık yumuşak şekerlemelerinin FTIR spektrumlarına ait veriler her bir örnek için 3 tekrarlı şekilde alınmıştır. Her bir yüzde jelatin için alınan 3 tekrarlı ölçümlerin ortalaması alınmış olup, elde edilen verilere ait FTIR spektrumları aşağıda yer alan Şekil 3.19'da gösterilmektedir. Üst üste açılmış toplam 48 adet yumuşak şekerlemenin detaylı bilgisi Çizelge 2.3'te detaylı olarak sunulmuştur ve şekil üzerindeki kodların hangi jelatine karşılık geldiği tabloda gösterilmiştir.



Şekil 3. 19 Üç farklı yüzde (%1, %5, %10) jelatin içeriğine sahip 48 adet yumuşak şekerleme numunesine (dokuz farklı tür domuz, altı farklı türde sığır ve bir tür balık) ait FTIR spektrumları.

Şekil 3.19'da verilen FTIR spektrumlarına bakıldığında, 48 adet örneğin spektral olarak büyük farklılıklar içermemesine rağmen, 1 adet örneğin (%1 jelatin içeren 9. domuz yumuşak şekerleme numunesi) özellikle 3700-3000 cm⁻¹ aralığında diğer örneklerden farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Sınıflandırma çalışmasında öncelikle unsupervised bir metot olan PCA metodu ile çalışılmış olup, çok başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Daha sonrasında, supervised metotlar denenmeye başlanmış olup, PLS-DA metodu ile sınıflandırma çalışması yapılmıştır. İlk çalışmada, 48 adet örnekte yer alan 27 adet domuz örneğinden 21'i kalibrasyon, 6'sı bağımsız validasyon, 18 adet sığır örneğinden

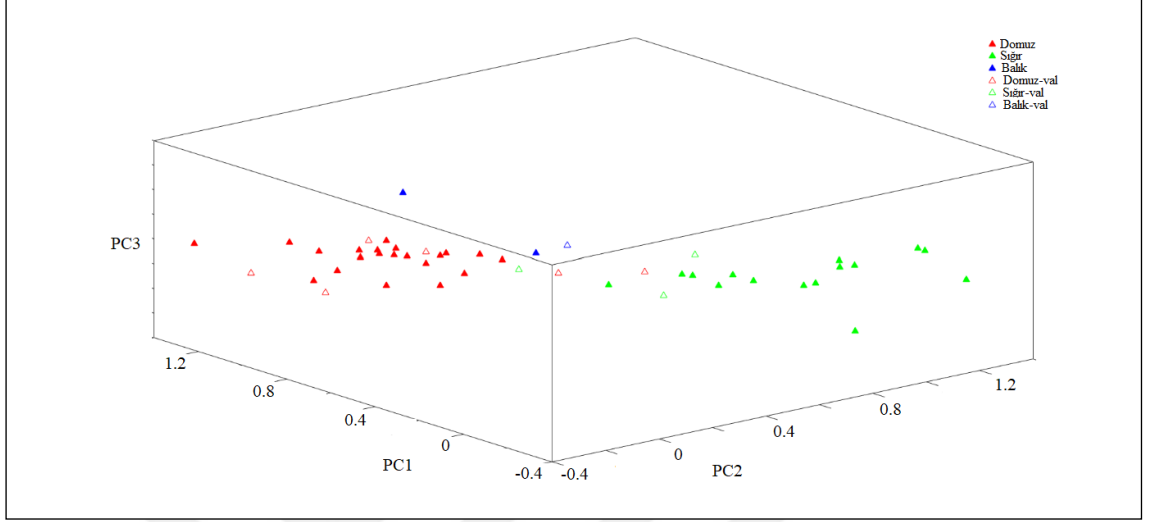
15'i kalibrasyon, 3'ü validasyon ve 3 adet balık örneğinden 2'si kalibrasyon 1'i validasyon olarak seçilmiş olup, PLS-DA metodu ile sınıflandırma çalışması yapılmıştır. PRESS (predicted residual error of standard residual) değerleri Şekil 3.20'de yer almaktadır.



Şekil 3. 20 Model oluşturmada kullanılan 21 adet domuz, 15 adet sığır ve 2 adet balık yumuşak şekerlemelere ait PRESS grafiği.

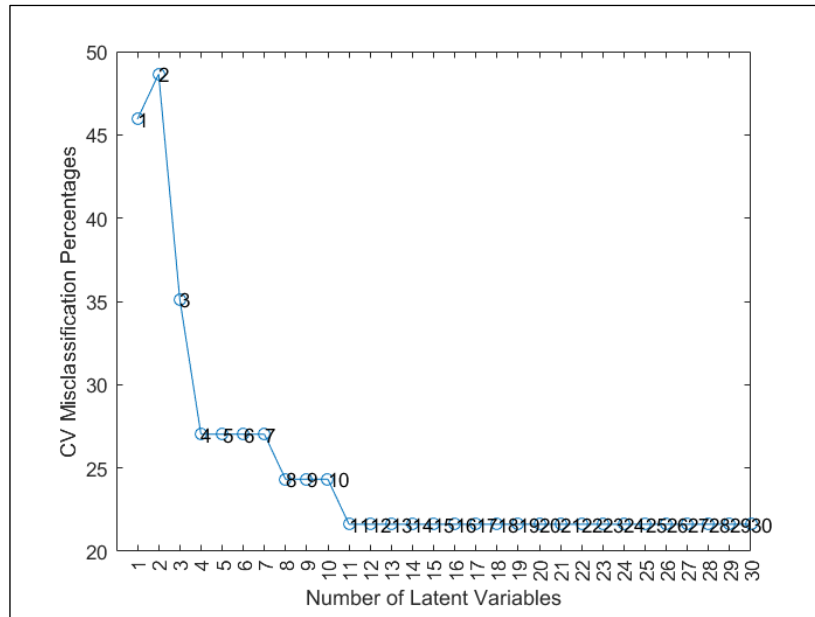
Şekil 3.20'de verilen PRESS değerlerine bakıldığında görülebileceği gibi, en düşük hatanın 6. Temel bileşenle elde edildiği görülmüş olup, modeli oluşturup validasyon setini kurarak modeli test etme amacıyla 6 PC seçilmiştir. Elde edilen model sonucu ilk üç temel bileşene (PC1, PC2 ve PC3) ait üç boyutlu grafik Şekil 3.21'de verilmektedir. Şekil 3.21'de verilen üç boyutlu uzaklık grafiğine bakıldığında, domuz (kırmızı dolu üçgen), sığır (yeşil dolu üçgen) ve balık (mavi dolu üçgen) yumuşak şekerlemelerin büyük ölçüde birbirlerinden ayrıldıkları görülmektedir. Ancak, her gruba ait validasyon örneklerine bakıldığında, kurulan modelin tahmin etme gücünün yeterinde iyi olmadığı görülmektedir. Sınıflandırma sonucu validasyon tahmin başarısı %70'dir. Şekil 3.19'da verilen FTIR spektrumlarında bahsedildiği üzere, 9'nolu %1 domuz jelatini içeren yumuşak şekerleme örneği spektral olarak gözle görülür bir farklılık içerdiğinden, bir

sonraki çalışma bu numune verisi çıkartılarak gerçekleştirilmiştir. 20'si domuz, 15'i sığır ve 2'si balık yumuşak şekerleme örneğinden oluşan kalibrasyon verileri ile PLS-DA sonucu elde edilen PRESS değerleri Şekil 3.22'de verilmektedir.

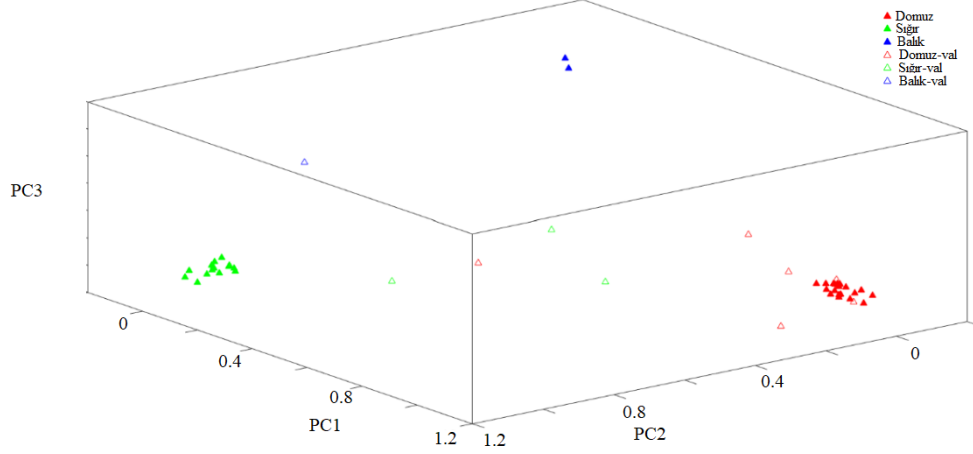


Şekil 3. 21 adet yumuşak şekerleme örneğinin ilk üç temel bileşenine (PC1, PC2 ve PC3) ait skor grafiği.

Şekil 3.22'de verilen PRESS değerleri grafiğine bakıldığında, en az hata oranı 11. PC de gözlemlenmiş olup, model ve validasyon tahminlemede 11 PC kullanılmıştır. Şekil 3.23'te sınıflandırma sonucu elde edilen ilk üç temel bileşene ait skor grafiği verilmektedir.



Şekil 3. 22 Model oluşturmada kullanılan 20 adet domuz, 15 adet sığır ve 2 adet balık yumuşak şekerlemelerine ait PRESS grafiği.

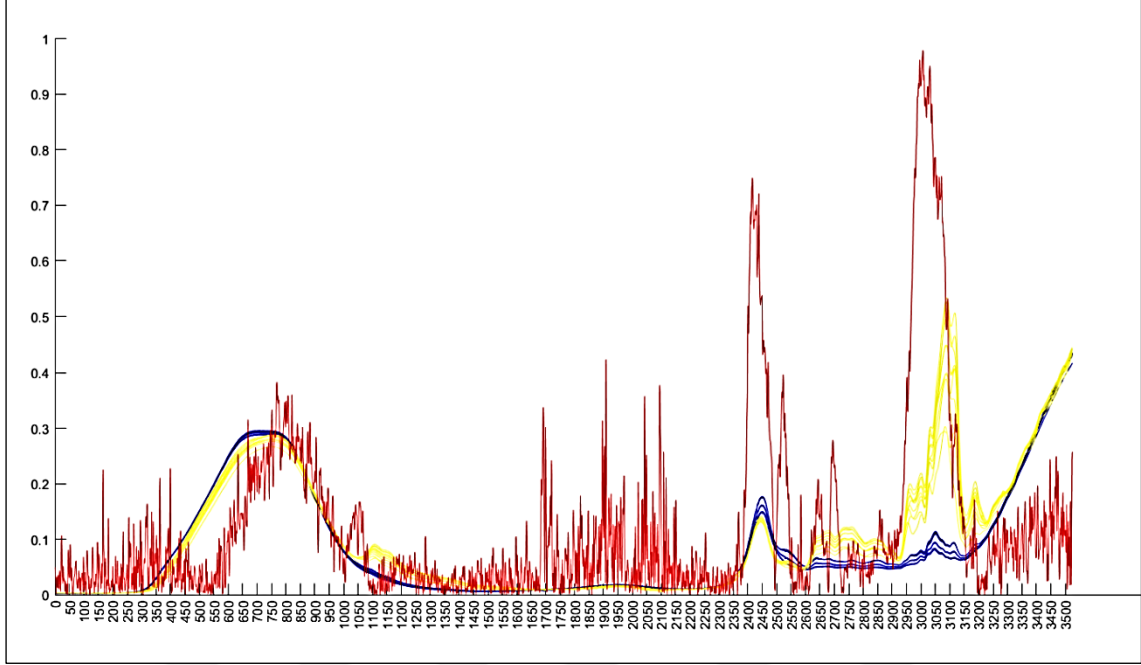


Şekil 3. 23 47 adet yumuşak şekerleme örneğinin ilk üç temel bileşenine (PC1, PC2 ve PC3) ait skor grafiği.

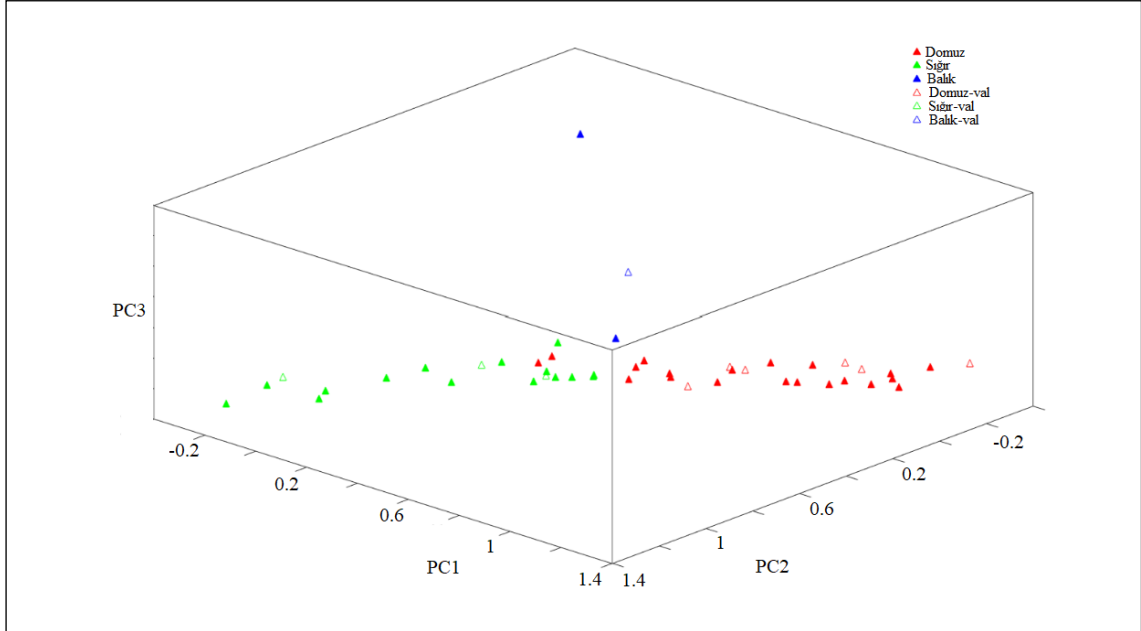
Şekil 3.23’de verilen üç boyutlu skor grafiğine bakıldığında, domuz-sığır ve balık örneklerinin bir önceki çalışmaya göre grafik üzerinde daha iyi ayırt edildikleri görülmeye rağmen, sınıflandırma sonucu elde edilen validasyon tahmin başarıları %60’dır. Bunun sebebi sınıflandırma esnasında domuz, sığır ya da balık ile ilgili bir bilgi taşımayan su pikinin PLS-DA algoritmasıyla model kurulumundaki yükünü azaltmasından kaynaklanmaktadır.

Sınıflandırma çalışmasının esas amacının bilinmeyen örneklerin tahmini olmasından ötürü, validasyon tahmin hatalarına dikkat edilmektedir. Domuz, sığır ve balık jelatinli 48 yumuşak şekerleme örneğine ek olarak 10 adet içeriği bilinmeyen numune verisi oluşturulan metotlar ile test edilmiştir. İkinci çalışmada çıkarılan 9’ncü domuz örneği yine çıkartılmış olup, 47 yumuşak şekerleme örneği ve 10 adet içeriği bilinmeyen ticari yumuşak şekerleme örneğinin FTIR spektrumları Şekil 3.24’de verilmektedir. Şekil 3.24’e bakıldığında, model ile bilinmeyen örnekler arasında farkın en çok olduğu ve benzerlik gösterdiği bölge olarak $2350-2600\text{ cm}^{-1}$ seçilmiştir. Modelleme çalışmasında en az hata bulunan 4 PC kullanılmış olup, sınıflandırma sonucu elde edilen kalibrasyon ve validasyon setinin ilk üç temel bileşenine ait skor grafiği şekil 3.25’te verilmiştir. Bilinmeyen örneklerinde içinde bulunduğu skor grafiği Şekil 3.26’da verilmektedir. Şekil 3.25’te verilen skor grafiğinden görüldüğü üzere, kalibrasyon setinde bulunan iki adet domuz örneği dışında 3 grup birbirinden büyük anlamda ayrılmış olup, validasyon tahmin başarıları %100 olarak elde edilmiştir. Bilinmeyen örneklerin tahminiyle birlikte bir grafik oluşturulduğunda, Şekil 3.26’da görüldüğü üzere, her ne kadar örnek

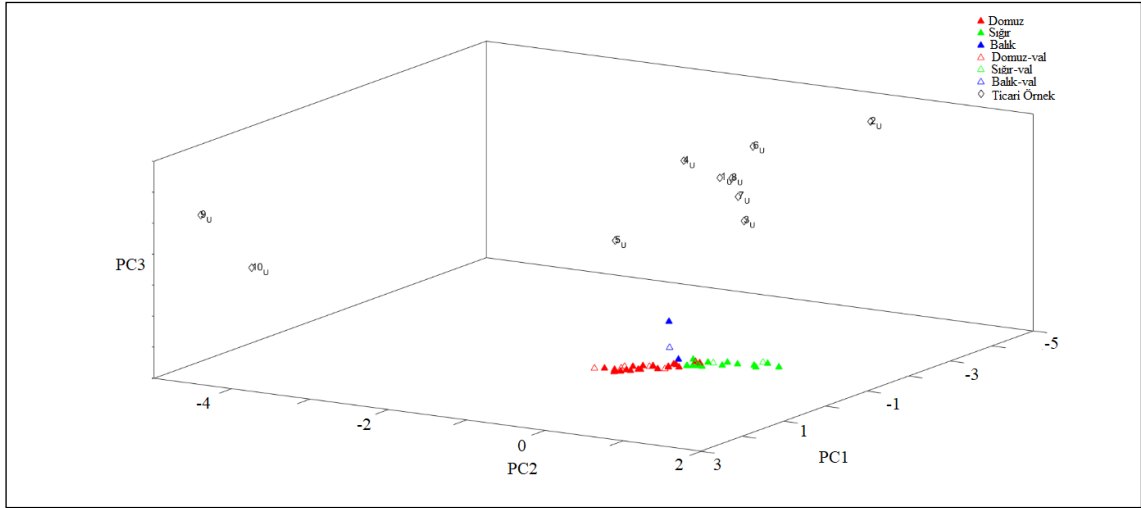
verilerinde ki en benzer nokta bulunmaya çalışılmış ve ona göre model oluşturulmuş olsa da, ticari örnekler ve laboratuvar ortamında hazırlanan örnek farklılıklarından dolayı bilinmeyen örnek tahminleri model oluşturulan verilerden çok uzakta çıkmaktadır.



Şekil 3. 24 Kalibrasyon setini oluşturan örnek spektrumları (mavi), bilinmeyen ticari örnek spektrumları (sarı), mavi ve sarı spektrumlar arasındaki fark (kırmızı).



Şekil 3. 25 Daraltılmış FTIR spektrumu kullanılarak 47 adet yumuşak şekerleme örneğinin ilk üç temel bileşenine (PC1, PC2 ve PC3) ait skor grafiği.

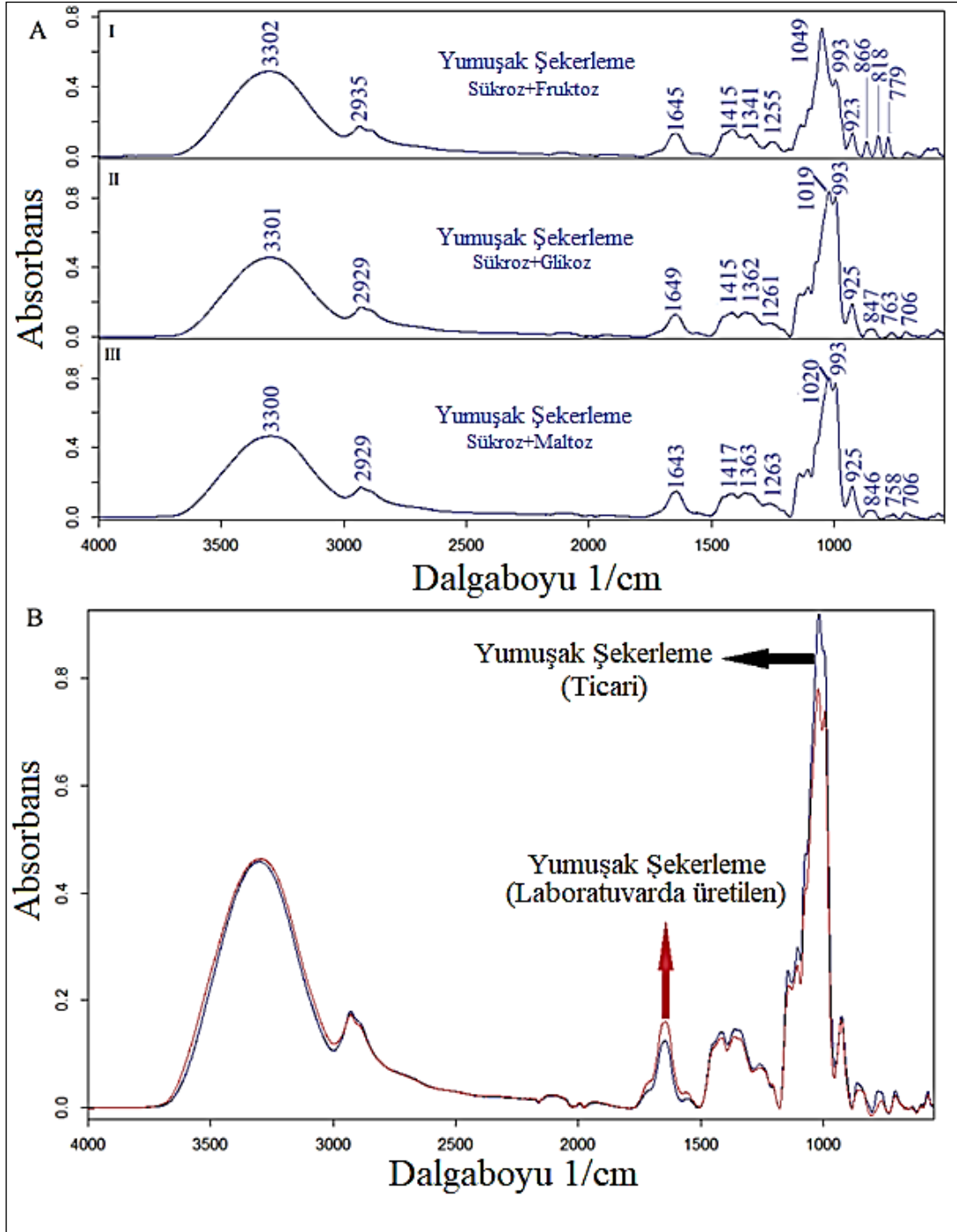


Şekil 3. 26 Daraltılmış FTIR spektrumu kullanılarak 47 adet yumuşak şekerleme örneğinin ve 10 adet bilinmeyen örneğin ilk üç temel bileşenine (PC1, PC2 ve PC3) ait skor grafiği.

Bunun yanı sıra ticari örneklerle laboratuvar ortamında hazırlanan örneklerin içerikleri ve dolayısıyla verileri arasında ki ciddi fark sınıflandırma çalışmaları açısından problem yaratmıştır. Başka bir deyişle kemometrik model laboratuvar ortamında üretilen yumuşak şekerlemeler ile oluşturulmuştur fakat test numuneleri piyasadan satın alınmıştır. Laboratuvar ortamında üretilen yumuşak şekerlemeler hem kompozisyon olarak hem de üretim şekli olarak ticari olarak satılan yumuşak şekerlemelerden farklı olduğu için gerçek test numuneleri için oluşturulan kemometrik model çalışmamıştır.

3.1.6 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemeler için FTIR ve Kemometri Bulguları

Tez çalışması kapsamında daha önceki bölümlerde farklı konsantrasyonlarda jelatin içeren yumuşak şekerleme üretimi gerçekleştirilmiştir fakat yapılan çalışmalarda ticari numuneler ile üretilen yumuşak şekerlemeler arasında kemometrik analizde sorun oluşturacak nitelikte uyumsuzluk mevcuttur. Bu sebeple farklı formülasyonda ve farklı reçeteye göre yumuşak şekerleme üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapısında üç farklı şeker bileşimi içeren yumuşak şekerlemeler literatürde belirtilen bir reçeteye [91] göre üretilmiştir. Bölüm 2.1.6’da detaylı olarak üretim yönteminden ve materyalden bahsedilmiştir. Çizelge 2.4’te kullanılan jelatinler ve üretilen yumuşak şekerlemelerin şeker bileşimi detaylı şekilde sunulmuştur. Laboratuvarda üretilen yumuşak şekerlemelerin FTIR spektrumları Şekil 3.27’de gösterilmiştir. Yumuşak şekerlemelerin başlıca bileşenleri su, şeker (glikoz, fruktoz, maltoz ve sükrozdur), pektin ve jelatindir.



Şekil 3. 27 (A) Laboratuvarda üretilen yumuşak şekerlemelerin FTIR spektrumu (Sükroz+Fruktoz) (I), Laboratuvarda üretilen yumuşak şekerlemelerin FTIR spektrumu (Sükroz+Glikoz) (II) Laboratuvarda üretilen yumuşak şekerlemelerin FTIR spektrumu (Sükroz+Maltoz)(III) (B) Laboratuvarda üretilen ve ticari yumuşak şekerlemeleri temsil eden FTIR spektrumları

Şekil 3.27 (A)'da sunulan FTIR spektrumları yumuşak şekerlemelerin kompozisyonunda bulunan temel bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Başka bir deyişle, spektral bantlar yumuşak şekerlemelerin yapısında bulunan kimyasal gruplarla

ilişkilidir. Üretilen yumuşak şekerlemeler genel olarak benzer spektral özelliklere sahiptirler.

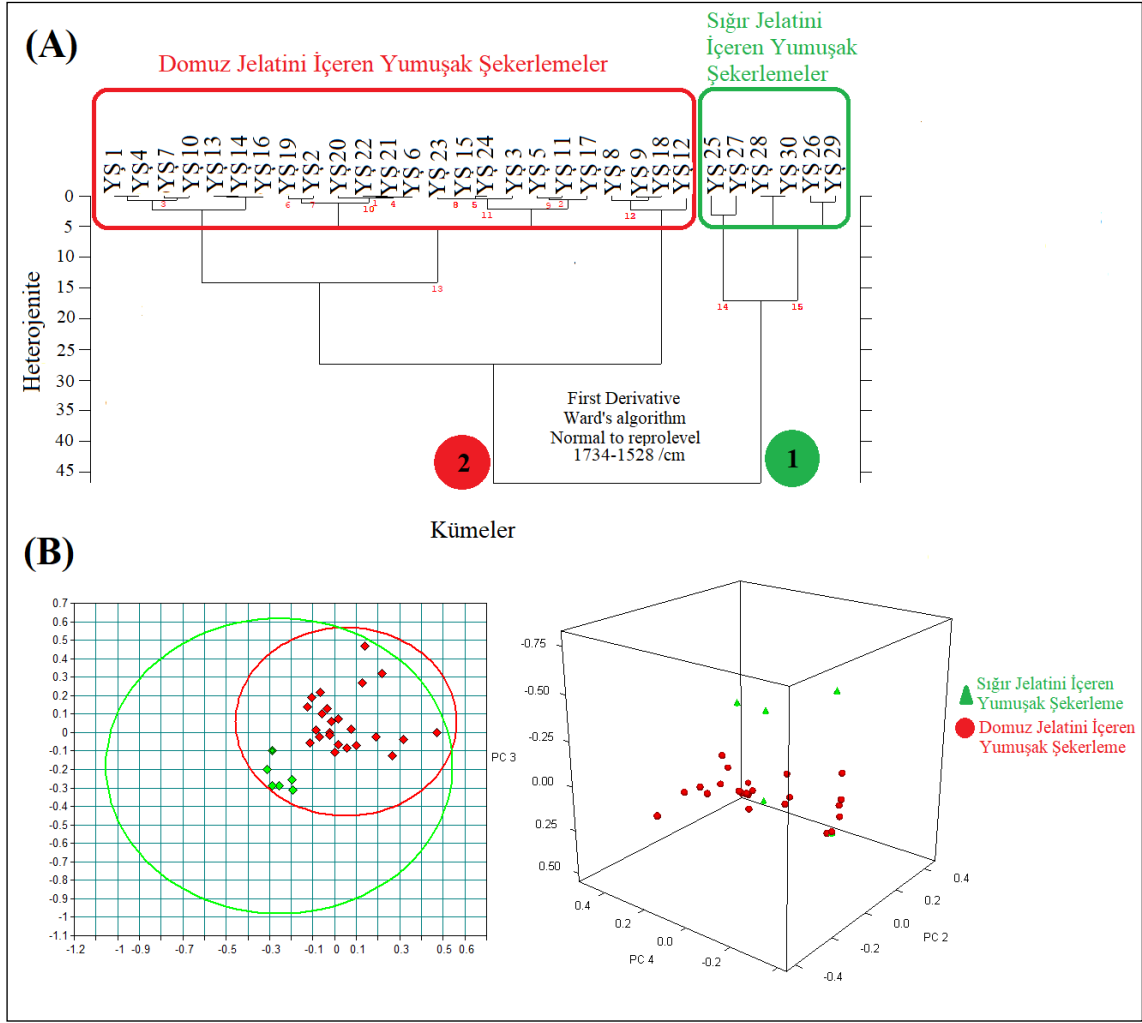
3300 cm^{-1} civarındaki büyük pik genel olarak su moleküllerinden kaynaklanan OH gerilme titreşimleri ile ilişkilidir. 2930 cm^{-1} civarındaki pikler ise karboksilik asitlerin C-H gerilme titreşimleri ve serbest amino asitlerin NH_3^+ gerilme vibrasyonlarından kaynaklanmaktadır [59]. Şekerler ile ilişkili olan bantlar genel olarak 750-1500 cm^{-1} spektral aralığında bulunmaktadır [96]. Sakkaritlerden ileri gelen spektral özellikler ise daha çok 900-750 cm^{-1} spektral aralığında görülmektedir [97]. 993 cm^{-1} civarında görülen bant ise sükrozdaki karakteristik glikozit bağı ile ilişkilidir. Üretilen tüm yumuşak şekerlemelerin kompozisyonunda sükroz bulunmaktadır. 1049 cm^{-1} civarındaki pik fruktoz içeriğinden kaynaklanmaktadır [98]. 1100-1000 cm^{-1} aralığındaki spektral bölge ise karbonhidratların (C-O) ve (C-O-C) absorpsiyonlarından kaynaklanmaktadır [27]. 925 cm^{-1} , 1255 cm^{-1} ve 1415 cm^{-1} civarında görülen pikler sırasıyla karbonhidratların C-H eğilme, C-O gerilme ve O-H gerilme/eğilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [96]. 1500-1200 cm^{-1} spektral aralığında üç temel bant (1261, 1362, 1415 cm^{-1}) görülmüştür. 1500-1200 cm^{-1} aralığındaki spektral bölge proteinlerin $>\text{CH}_2$ and $-\text{CH}_3$ eğilme titreşimlerinden etkilenen karışık bölge olarak bilinmektedir [54]. İlâveten, sükroz ile birlikte fruktoz şekerinin kullanıldığı yumuşak şekerlemelerde farklı pikler görülmüştür bu pikler yumuşak şekerleme içerisinde fruktoz varlığını işaret etmektedir. 866, 818 and 779 cm^{-1} noktalarındaki pikler fruktoz varlığını göstermekle birlikte sırasıyla (δCH^+ νCC^+ δCCH), δCH , (δCCO^+ δCCH) titreşimlerine karşılık gelmektedirler [99].

Yumuşak şekerlemelere ilişkin spektrumlarda jelatin ile ilişkili olan en belirgin pik 1700-1600 cm^{-1} aralığında bulunan Amid I bantıdır [27]. Şekil 3.27 (A)' da açıkça görüldüğü üzere tüm şeker kompozisyonlarında genel olarak benzer spektral özellikte ve belirtilen kompozisyona uygun nitelikte yumuşak şekerleme spektrumları elde edilmiştir. Şekil 3.27 (B)'de laboratuvarında üretilen yumuşak şekerleme ile ticari yumuşak şekerlemenin karşılaştırma spektrumu sunulmuştur. Şekilde görüldüğü üzere hem laboratuvarında üretilen hem de ticari yumuşak şekerleme oldukça benzer ve karşılaştırılabilir FTIR spektrumlarına sahiptirler. Bahsedilen spektral bölgeler ve tekabül eden fonksiyonel grupların hepsi laboratuvarında üretilen ve ticari olarak satın alınan yumuşak şekerlemelerde görülmüştür. Buradan yola çıkarak elde edilen spektral bilgi ile kemometri uygulanacak yumuşak şekerleme örnekleri için oldukça uygun bir

üretim reçetesi ve yöntemi tercih edilmiştir. Başka bir deyişle ticari yumuşak şekerlemeye en yakın laboratuvar üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın temel amacı yumuşak şekerlemelerin içeriğindeki jelatin orijinine göre ayırt edilmesini ve sınıflandırılmasını sağlayacak bir FTIR metodu geliştirmektir. Bu amaçla ATR-FTIR tekniği ile birlikte kemometri uygulanmıştır. Öncelikli olarak laboratuvarında üretilen yumuşak şekerlemelerin bölüm 2.1.7’de belirtildiği şekilde FTIR spektrumları alınmıştır. Sonraki aşamada örneklerin benzerlik veya farklılıklarına göre belirgin bir sınıflandırma gerçekleştirilmesi amacı ile kemometri uygulanmıştır. Sınıflandırma işlemi spektrumların birinci türevi alınarak replevel ve Ward algoritması ile gerçekleştirilmiştir. HCA ve PCA analizler için $1734-1528\text{ cm}^{-1}$ spektral aralığı tercih edilmiştir. Seçilen bölge Amid I ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$) ve Amid II ($1565-1520\text{ cm}^{-1}$) piklerinden kaynaklanan spektral özellikleri içermektedir. Daha önceki bölümlerde Amid I pikinin proteinlerin ikincil yapısı hakkında bilgi sağlayan peptit bağlarının C=O gerilme titreşimlerinden ileri geldiği belirtilmiştir [27]. Sınıflandırma sonuçları şekil 3.28’de sunulmuştur. HCA dendrogramında görüldüğü üzere iki tane belirgin şekilde ayrılmış sınıf oluşmuştur. Başka bir deyişle, tüm yumuşak şekerlemeler orijinleri ile ilişkili olarak doğru şekilde sınıflandırılmıştır. Üretilen şekerlemeler oldukça kompleks bir matriks olarak düşünülebilir. İlaveten yumuşak şekerleme örneklerine herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Buna rağmen örnekler herhangi bir hata veya yanlış tahmin olmadan ayırt edilebilmiştir. Şekil 3.28’de sunulan PCA analizine göre belirgin biçimde sığır ve domuz jelatini içerikli yumuşak şekerlemelerin ayırt edilebildiği görülmektedir. Bu durum Ward algoritmasının uygulanması ile ilişkilendirilebilir. Ward algoritması birçok algoritmaya göre üstün özelliklere sahiptir. Ward bir çalışmada hiyerarşik gruplama prosedürünün en büyük miktardaki bilgi üzerine kurgulandığını sınıflandırma işlemlerinde karşılaşılan problemler ile sınırlanmadığını ve birçok farklı uygulama şekli bulunduğunu ifade etmiştir [100, 101, 102, 103].

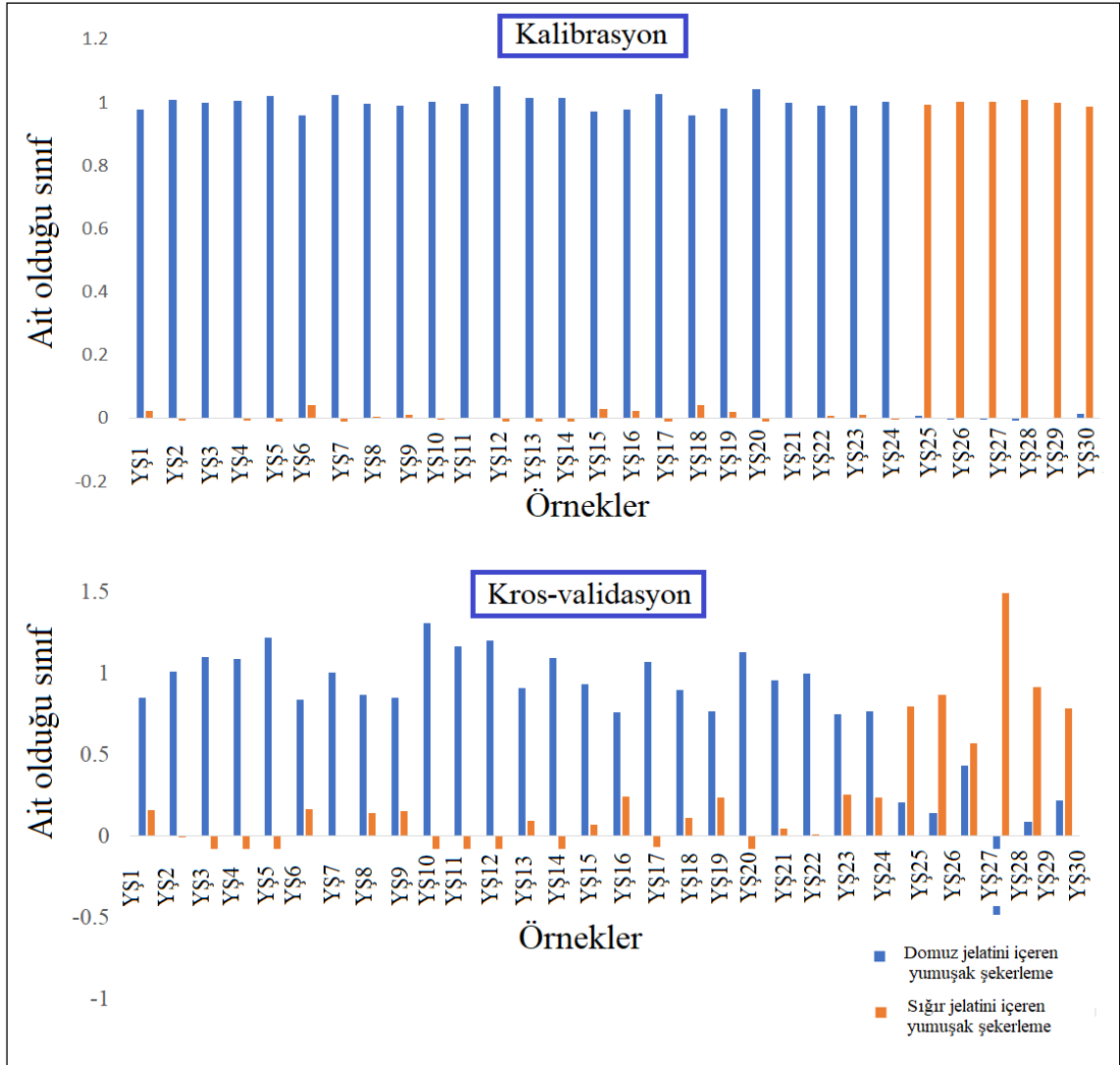
Ayrıca literatürde, otantisite ve taşış ile ilgili problemlerde HCA analizi ile birlikte Ward algoritmasının etkin ve başarılı bir şekilde kullanıldığı ve çözüm imkanı sunduğu görülmektedir [58, 80–82]. Ayırmadaki üstünlüğün bir diğer sebebi çok yansımali ATR kristalinin kullanılmasıdır. Çok yansımali ATR kristali tek yansımali kristale göre çok daha yüksek kalitede spektrum elde edilmesini sağlar bunun sebebi örnek çoklu şekilde uyarıldığı için sinyal/gürültü oranının artmış olmasıdır.



Şekil 3. 28 (A) 30 farklı yumuşak şekerleme örneği için HCA analizi (Ward algoritması) denrogramı (B) Toplam 30 yumuşak şekerleme örneği için iki ve üç boyutlu PCA analizi grafikleri

Ayrıca Şekil 3.29'da PLS-DA analiz sonuçları sunulmuştur. PLS-DA tahminleri çubuk grafikleri ile sunulmuştur. Şekilde görüldüğü üzere her bir örnek için iki çubuk bulunmaktadır. Mavi çubuklar domuz jelatini içeren yumuşak şekerlemeleri ifade ederken, turuncu çubuklar sığır jelatini içeren yumuşak şekerlemeleri ifade etmektedir. PLS-DA analizi laboratuvarında üretilen ve Çizelge 2.4'te sunulan yumuşak şekerlemelere ait FTIR spektrumları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. $1734-1528 \text{ cm}^{-1}$ spektral aralığı analizlerde kullanılmıştır. Şekil 3.29'da gösterildiği gibi her yumuşak şekerleme örneği için iki çubuk bulunmaktadır. İki çubuktan daha yüksek değere sahip olanı yumuşak şekerlemelerin ait olduğu grubu göstermektedir. Örneğin YŞ1 (Yumuşak Şekerleme 1) için kalibrasyon modelindeki sınıf domuz orijini olarak belirlenmiştir çünkü en yüksek olan çubuk mavidir, benzer şekilde kros-validasyonda bu numune domuz jelatini olarak tespit edilmiştir. PLS-DA sonuçlarına göre hem kalibrasyon hem

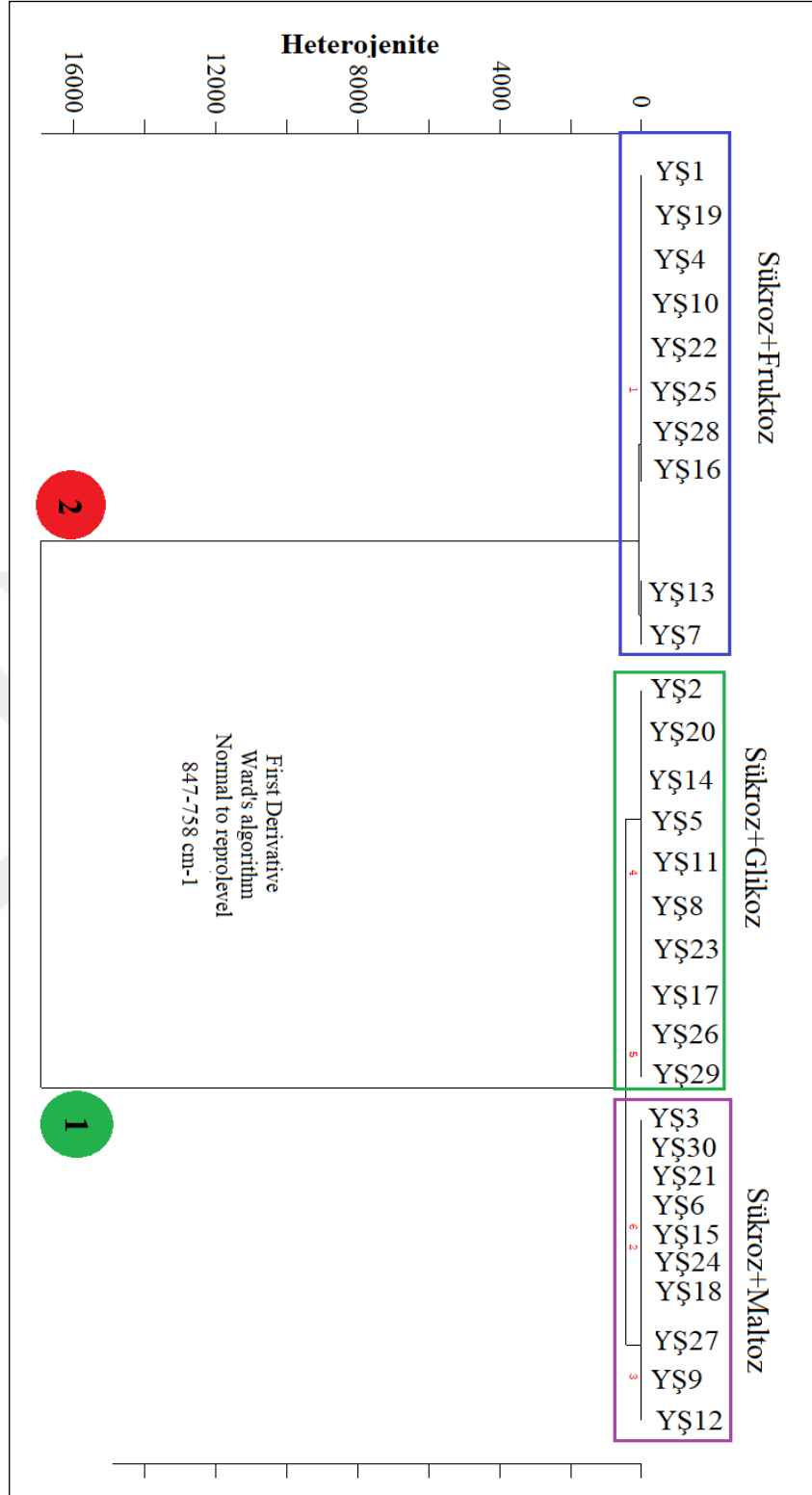
kros-validasyon modelinde %100 başarı elde edilmiştir. Tüm domuz jelatini içerikli yumuşak şekerlemeler domuz olarak tespit edilirken sığır jelatini içerikli yumuşak şekerlemeler sığır olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3. 29 Yumuşak şekerlemeler (YŞ) için PLS-DA sınıf tahmin (kalibrasyon-kros validasyon) grafikleri

Tez çalışması kapsamında asıl amaç farklı şeker kompozisyonuna ve farklı türde jelatin içeriğine sahip olan yumuşak şekerlemeleri sınıflandırmaktır. Önceki kısımlarda bahsedildiği üzere HCA, PCA ve PLS-DA kemometrik analizleri gerçekleştirilerek jelatin kökenine göre yumuşak şekerlemelerin sınıflandırılması başarı ile gerçekleştirilmiştir. İlaveten yapılan kemometrik çalışmalar kapsamında üç farklı şeker kompozisyonuna sahip yumuşak şekerlemelerin şeker içeriğine göre sınıflandırılabilirliği görülmüştür. Şekil 3.30'da kemometrik analize ilişkin hiyerarşik sınıflandırma analizi sonucu sunulmuştur. Üretilen yumuşak şekerlemelerin şeker ve jelatin içerikleri Çizelge 2.4'te detaylı olarak sunulmuştur. Tekrar bahsetmek gerekirse, her jelatin türü için

Sükroz+Fruktoz, Sükroz+Glikoz ve Sükroz+Maltoz olmak üzere üç farklı şeker bileşiminde yumuşak şekerleme üretimi yapılmıştır. Bahsedilen yumuşak şekerlemelerin örnek olacak nitelikte temsili FTIR spektrumları Şekil 3.27 (A)'da sunulmuştur. FTIR spektrumlarını değerlendirdiğimizde özellikle sakkaritlerden ileri gelen spektral özellikler $900-750\text{ cm}^{-1}$ spektral aralığında görülmektedir. Bu bölgedeki spektral farklılıklar gözle görülür şekilde belirgindir. Özellikle Sükroz+Fruktoz içeriğine sahip olan yumuşak şekerlemeler $900-750\text{ cm}^{-1}$ spektral aralığında çok belirgin farklılıklara sahiptir ve bu farklılıklar sükroz bütün yumuşak şekerlemelerde ortak olduğu için fruktoz şekerinden ileri gelmektedir. Detaylı olarak ifade etmek gerekirse, $866, 818$ and 779 cm^{-1} noktalarındaki pikler fruktoz varlığını göstermekle birlikte sırasıyla ($\delta\text{ CH} + \nu\text{ CC} + \delta\text{ CCH}$), $\delta\text{ CH}$, ($\delta\text{ CCO} + \text{CCH}$) titreşimlerine karşılık gelmektedirler [99]. Glikoz ve fruktoz izomerdirler. Glikoz bir aldoz ve fruktoz ise bir ketoz olup aynı atomlara farklı düzenleniş ile sahiptirler. Şekil 3.30'da kemometrik analize ilişkin hiyerarşik sınıflandırma analizi sonucu sunulmuştur. Bu sınıflandırma sonucuna göre yumuşak şekerlemeler temel olarak iki gruba ayrılmıştır. Numaralandırma ile ifade edilen tüm yumuşak şekerlemelerin (YŞ) kompozisyonel bileşimi Çizelge 2.4'te detaylı olarak verilmiştir. Sınıflandırma analizindeki heterojenite değeri 16000'dir ve oldukça yüksek bir değer olup sınıflandırmanın güçlü bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Kemometrik analiz kapsamında Ward algoritması ve birinci türevi alınmış spektrumlar kullanılmıştır. Dendrogram üzerinde iki ile isimlendiren dallanma yapılarında sükroz+fruktoz şekerini ihtiva eden yumuşak şekerlemeleri içermektedir. Bu örnekler diğer yumuşak şekerlemelerden belirgin şekilde grup olarak ayrılmışlardır. Bir ile numaralandırılmış dallanma ise birbirinden ayrılmış iki farklı grubu içermektedir. Bu gruplardan biri sükroz+glikoz şeker içeriğine sahip iken diğer grup sükroz+maltoz şeker içeriğine sahiptir. Dendrogram üzerindeki gruplanma incelendiğinde aynı şeker kompozisyonuna sahip yumuşak şekerlemelerin aynı grupta kümelendiği açıkça görülmektedir. Ürünün şeker içeriğine göre sınıflandırılabilmesi oldukça önemli bir gelişmedir. Buradan yola çıkarak FTIR-ATR tekniği ve kemometrinin birlikte uygulanması ile saf haldeki farklı şeker türlerinin ayırt edilmesi ve taşıyıcı veya taklit ile ilgili problemlerin aydınlatılması oldukça muhtemeldir. Elde edilen FTIR verilerinin kemometri ile birlikte uygulanması sonucunda başarılı şekilde yumuşak şekerlemelerin kökenine göre ayırt edilebildiği görülmektedir. Literatürde şekerleme türlerinde jelatinin kökeninin tespiti için çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir.



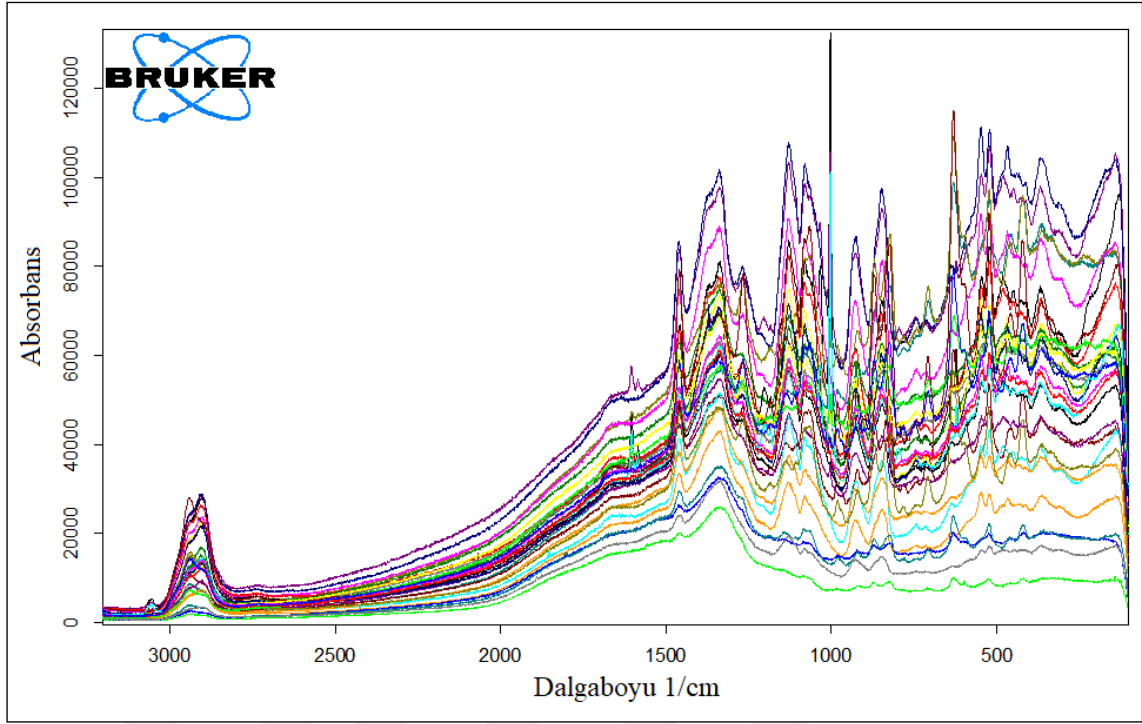
Şekil 3. 30 Yumuşak şekerleme örneklerinin HCA analizi (Ward algoritması) ile şeker kompozisyonuna göre sınıflandırılması

Örneğin aminoasit profili ve kemometri yardımı ile yumuşak şekerlemelerde jelatin kökeni belirlenmiştir [40]. Başka bir çalışmada ticari şekerleme türlerinde hayvana spesifik DNA tespiti ile jelatin kökeni tespit edilmiştir [88]. LC-MS/MS tekniği

kullanılarak yumuşak şekerlemelerde domuz kökenli ekstrakt olup olmadığı başarılı şekilde tespit edilmiştir [41]. Bu çalışmaların tümü başarılı olmakla birlikte dezavantajları uzun süren numune hazırlığı, toksik kimyasal gerektirmeleri ve zahmetli olmalarıdır. FTIR temelli geliştirilen metodolojide bahsedilen dezavantajlar söz konusu değildir. Numune hazırlığı olmaksızın hızlı ve etkin şekilde yumuşak şekerlemelerin kökeni tespit edilebilmektedir.

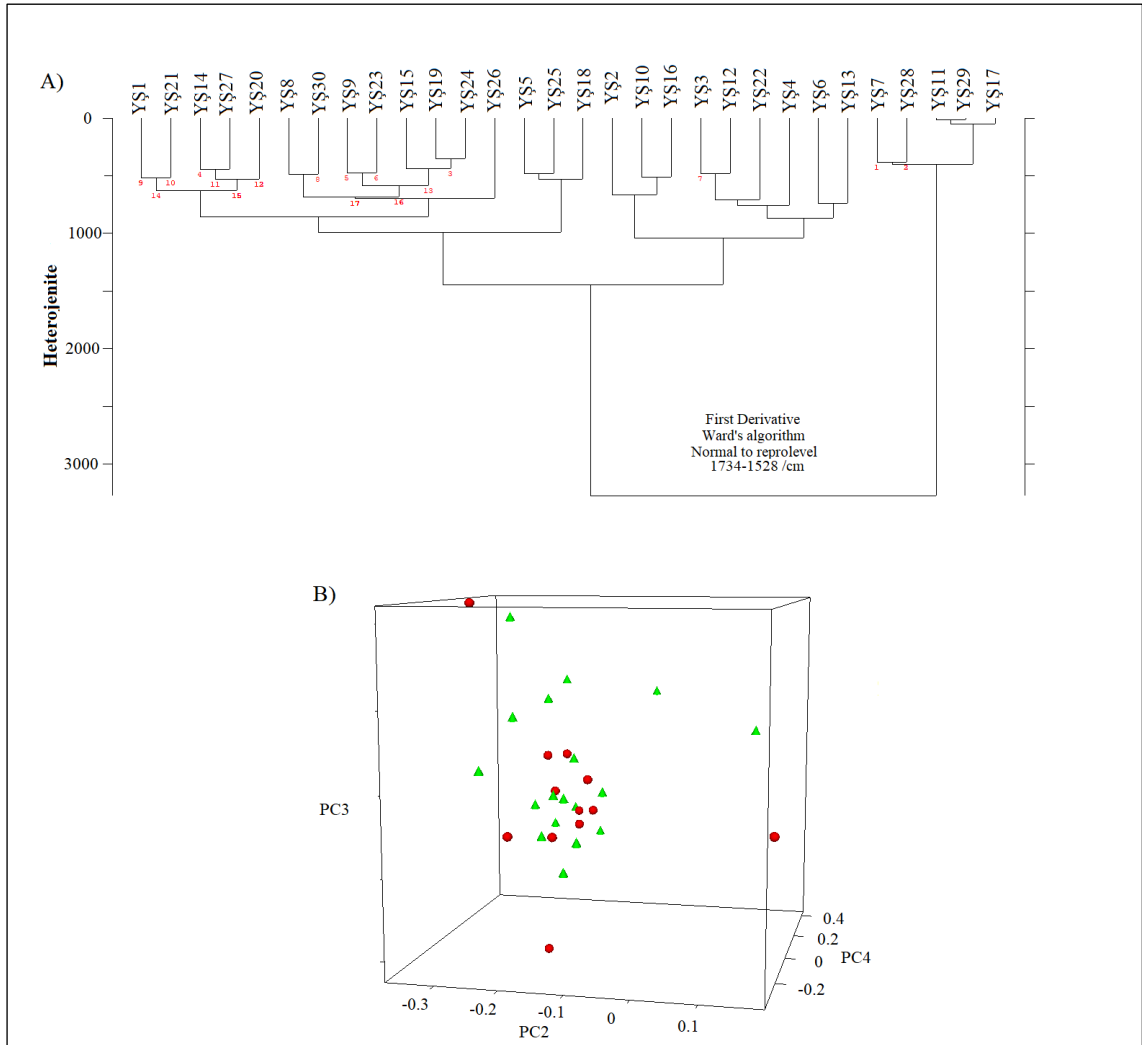
3.1.7 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemeler için Raman ve Kemometri Bulguları

Şekil 3.31'de laboratuvarında üretilen üç farklı şeker içeren yumuşak şekerlemelerin Raman spektrumları üst üste gösterilerek sunulmuştur. Tüm yumuşak şekerlemeler genel olarak benzer karakteristik özellikte Raman spektrumuna sahiptir. Çizelge 2.4'te yumuşak şekerlemelerin kompozisyonu ayrıntılı olarak sunulmuştur. Şekil 3.31'de görüldüğü üzere spektral veri $100-4000\text{ cm}^{-1}$ spektral aralığında elde edilmiştir. Bir maddenin kızılötesi spektrumu kimyasal yapısını yansıtmakla birlikte örnekteki moleküllerin üç boyutlu oryantasyonu hakkında bilgi vermektedir. Raman IR bölgenin geniş bir aralığında ($100-4000\text{ cm}^{-1}$) elde edildiği için bölgelere ayırarak spektral özelliklerden bahsetmek uygun olacaktır. Genel olarak değerlendirdiğimizde, $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ spektral aralığı $-\text{CH}_3$ ve $>\text{CH}_2$ fonksiyonel gruplarının gerilme titreşimlerinden ileri gelen C-H gerilme titreşimlerini içermektedir. $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ proteinler ve peptitler ile ilişkili olan Amid I ve Amid II gruplarından kaynaklanan pikleri içermektedir. $1500-1200\text{ cm}^{-1}$ arası ise yağ asitlerindeki, proteinlerdeki ve fosfat içeren bileşenlerdeki $>\text{CH}_2$ and $-\text{CH}_3$ gruplarının eğilme titreşimlerinden kaynaklanan karışık bir bölgedir. $1200-900\text{ cm}^{-1}$ aralığında genel olarak nükleik asitlerde bulunan PO_2^- gruplarından, karbonhidrat ve polisakkaritlerden kaynaklanan titreşimsel bantlar görülmektedir. Son olarak $900-600\text{ cm}^{-1}$ aralığı oldukça önemlidir ve bu bölge gerçek parmakizi bölgesi olarak bilinmektedir. İlaveten aromatik aminoasitler ve nükleotidler ile ilişkili olan çok spesifik titreşimler bu bölgede görülür [54]. Elde edilen spektral verilerin kemometrik olarak değerlendirilebilmesi için HCA ve PCA analizleri uygulanmıştır. FTIR analizlerinde tespit edilen Amid I ve Amid II titreşimlerini içeren spektral bölge kemometrik analizde kullanılmıştır.



Şekil 3. 31 Laboratuvarında üretilen yumuşak şekerlemelerin (30 adet) Raman spektrumu HCA ve PCA analizler için 1734-1528 cm^{-1} spektral aralığı tercih edilmiştir. Seçilen bölge Amid I (1700-1600 cm^{-1}) ve Amid II (1565-1520 cm^{-1}) piklerinden kaynaklanan spektral özellikleri içermektedir. Daha önceki bölümlerde Amid I pikinin proteinlerin ikincil yapısı hakkında bilgi sağlayan peptit bağlarının C=O gerilme titreşimlerinden ileri geldiği belirtilmiştir [27]. Şekil 3.32’de hiyerarşik kümeleme analizi ve temel bileşen analizi sonuçları sunulmuştur. Dendrogram üzerinde sunulan tüm yumuşak şekerlemelere ait detaylı bilgi Çizelge 2.4’te sunulmuştur. Dendrogramı incelediğimizde iki temel küme oluşumu görülmektedir. Fakat yumuşak şekerlemeler sığır veya domuz jelatini olmalarıyla ilişkili şekilde düzgün olarak kümelenmemiştir. Benzer şekilde temel bileşen analizinde de yumuşak şekerlemeler jelatin kökenini ile ilişkili olarak sınıflandırılmamıştır. Hem hiyerarşik sınıflandırma dendrogramında hem de temel bileşen analizine ait üç boyutlu grafikte yumuşak şekerlemelerin kökenine göre ayrılması sağlanamamıştır. Tüm spektrumların birinci türevi alınarak Ward algoritması ile 1734-1528 cm^{-1} spektral aralığında kemometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Kemometrik analizlerde FTIR verilerinin işlenmesinde tercih edilen parametreler için tercih edilen değerlerin aynıları Raman verilerinin işlenmesinde tercih edilmiştir. Şekil 3.32’de görüldüğü üzere düzgün bir sınıflandırma gerçekleştirilememiştir. Bu durumun sebebi Raman analizlerinde sıklıkla karşılaşılan zemin fluoresans etkisinden kaynaklanabilir. Fluoresans etki elde edilen verilerde zemin çizgisinde yükselmeye

sebeple birlikte numuneden numuneye farklılık göstererek ölçümler arasında değişkenliğe sebep olmaktadır. FTIR spektrumlarında olduğu gibi sabit ve düzgün bir zemin çizgisi elde edilmesi mümkün olamamaktadır. Diğer bir sebep ise FTIR spektrumlarında Raman spektrumlarına nispeten daha yüksek çözünürlük elde edilmektedir. Sinyal/gürültü oranı FTIR spektrumlarında daha yüksek seviyededir. Raman verilerinde karşılaşılan gürültü çoklu akümülyasyon ile elimine edilmeye çalışılsa da FTIR spektrumlarında olduğu kadar yüksek çözünürlükte ve yüksek pürüzsüzlükte spektrumlar elde etmek mümkün olmamaktadır.



Şekil 3. 32 (A) 30 farklı yumuşak şekerleme örneğinin Raman analizi için HCA (Ward algoritması) denrogramı (B) Toplam 30 yumuşak şekerleme örneği için iki ve üç boyutlu PCA analizi grafikleri (Raman Analizi)

3.2 Gerçek Zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmalarına İlişkin Bulgular

PCR çalışması test örneklerinin jelatin kökeninin belirlenmesi amacı ile kullanılmıştır. Türkiye’den ve yurt dışından toplam 20 adet olacak şekilde yumuşak şekerleme örneği satın alınmıştır. İçerisindeki jelatinin kökeni bilinmeyen numuneler Bölüm 3.4’te geliştirilen metot ile test edilmiştir. Oluşturulan HCA dendrogramları üzerinde test numunelerinin konumlanmasına göre jelatinin kökeni hakkında karar verilmiştir. Ayrıca bahsedilen test numunelerinin Bölüm 2.3’te anlatıldığı şekilde PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Domuz pozitif jelatin numuneleri literatürde yer alan bir PCR metodu kullanılarak tespit edilmiştir [42]. Yirmi test örneğinin HCA kemometrik analizi sonuçları ile PCR analiz sonuçlarının karşılaştırması Çizelge 3.1’de sunulmuştur. PCR sonuçlarına göre 20 test numunesinden üç tanesi domuz pozitif olarak tespit edilmiştir. HCA analizi sonuçlarına göre benzer şekilde 20 test numunesinin üç tanesi domuz jelatinlerine ait küme içerisinde yer almaktadır. Domuz tespit edilen yumuşak şekerlemeler kırmızı renk ile işaretlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, HCA analiz sonuçları %100 doğruluk ile PCR sonuçları ile eşleşmiştir. Bu durumda FTIR-ATR temelli kemometrik modelin yumuşak şekerlemelerdeki jelatinin kökeninin tespit için mükemmel şekilde çalıştığını söylemek mümkündür. Tez çalışması kapsamında, üretilen yumuşak şekerlemelerdeki jelatinin kökeninin tespiti için daha önce literatürde uygulanmış olan ticari kit kullanılarak gerçekleştirilen bir metot uygulanmıştır. Üretilen yumuşak şekerlemelerin hepsi aynı konsantrasyonda jelatin içermektedir. Jelatin konsantrasyonu yaklaşık %4 değerindedir. Demirhan vd. aynı metodu ve kitleri kullanarak %1 dedeksiyon limiti ile yumuşak şekerlemelerde, türk lokumunda ve marşmelovda domuz jelatini tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında, yirmi tane numune test amaçlı olarak kullanılmıştır ve PCR tekniği sadece bu numunelerde köken tespiti için kullanılmıştır. FTIR sonuçlarının doğruluğu PCR tekniği kullanılarak test edilmiştir. Değerlendirilen test numunelerinde PCR tekniği FTIR tekniği ile benzer sonuçlar vermiştir. Çizelge 3.1’de görüldüğü üzere FTIR spektrumlarının kemometrik olarak analizlenmesi ile elde edilen hiyerarşik kümeleme analizine göre 8,9 ve 10 numaralı ticari jelatinler domuz jelatini kümesinde yer almıştır. Test numunelerinin validasyonu için gerçekleştirilen PCR analizinde ise aynı numunelerin domuz pozitif olduğu tespit edilmiştir. Açıkça görülmektedir ki FTIR spektroskopisi ile PCR sonuçları birbirini destekleyen niteliktedir. Böylece test numuneleri için FTIR tekniği PCR metodu ile doğrulanmıştır.

Çizelge 3. 1 Yirmi test örneği için ATR-FTIR sonuçlarının ve PCR sonuçlarının karşılaştırması

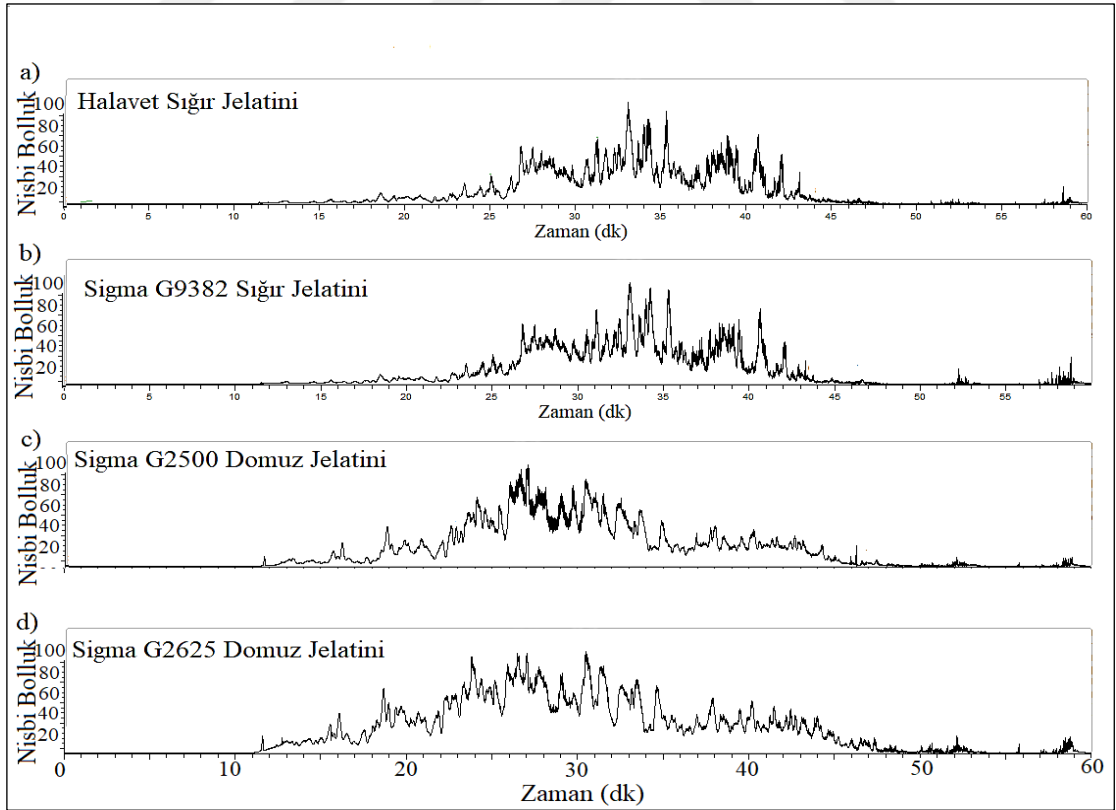
Test Numuneleri	FTIR- HCA sonuçları	PCR sonuçları
1	Sığır jelatini	Domuz negatif
2	Sığır jelatini	Domuz negatif
3	Sığır jelatini	Domuz negatif
4	Sığır jelatini	Domuz negatif
5	Sığır jelatini	Domuz negatif
6	Sığır jelatini	Domuz negatif
7	Sığır jelatini	Domuz negatif
8	Domuz jelatini	Domuz pozitif
9	Domuz jelatini	Domuz pozitif
10	Domuz jelatini	Domuz pozitif
11	Sığır jelatini	Domuz negatif
12	Sığır jelatini	Domuz negatif
13	Sığır jelatini	Domuz negatif
14	Sığır jelatini	Domuz negatif
15	Sığır jelatini	Domuz negatif
16	Sığır jelatini	Domuz negatif
17	Sığır jelatini	Domuz negatif
18	Sığır jelatini	Domuz negatif
19	Sığır jelatini	Domuz negatif
20	Sığır jelatini	Domuz negatif

3.3 Kromatografik Metotlara İlişkin Bulgular

3.3.1 Jelatinde Markör Peptitlerin Belirlenmesine Yönelik Nano LC-MS/MS Proteomiks Çalışması Bulguları

Proteomiks çalışmaları bölüm 2.2’de detaylı şekilde belirtilen materyal ve metot kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dört farklı jelatin ikisi sığır diğer ikisi domuz olmak üzere nano LC-MS/MS çalışmasında kullanılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen toplam iyon kromatogramları Şekil 3.33’te sunulmuştur. Bölüm 2.2’de numune hazırlığı detaylı olarak anlatılmıştır. Buradaki amaç enzimatik parçalama ile sığır ve domuz jelatinlerine spesifik olan markör peptitlerin tespit edilebilmesidir. Nano LC-MS/MS cihazı ile analiz edilen numuneler jelatinlerin triptik parçalama ürünleridir. Başka bir deyişle, Şekil 3.33’te sunulan iyon kromatogramları jelatinin parçalanması sonucu oluşan peptit karışımına ilişkin alıkonma süresi ve kütlelerinin nisbi bolluklarına dair

bilgiyi içermektedir. Detaylı olarak incelendiği zaman Şekil 3.33’de sunulan iyon kromatogramlarında her iki sığır ve her iki domuz jelatini için benzer karakteristikte LC-MS/MS iyon kromatogramlarının elde edildiği görülmektedir. Başka bir deyişle görsel olarak sığır ve domuz jelatinine ait kromatogramların aralarındaki farklılık açıkça görülmektedir. Dolayısıyla enzimatik parçalanma sonucu oluşan peptitlerin değerlendirilmesi durumunda jelatinlerin kökenine göre ayırt edilmesinin mümkün olacağı söylenebilir. Kesin sonuç elde etmek amacı ile çalışma sonucunda elde edilen LC-MS/MS verileri Maxquant (1.6.1.0) yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. Yazılıma sığır ve domuz kollajenlerinde bulunan peptitler fasta dosyası olarak tanımlanmış akabinde analiz sonucu elde edilen LC-MS/MS verileri Maxquant yazılım ile incelenmiştir. Yazılımdan çıktı olarak eşleşen peptitlerin listesini alınmış ve literatürle karşılaştırılmıştır. Ayrıca literatürde benzer çalışmalar daha önce yapılmış ve jelatinler için markör peptitlerin tespiti konusunda önemli gelişmeler kaydedilmiştir ve markör peptitler sunulmuştur [26, 29]. Çizelge 3.2’de her iki sığır ve her iki domuz jelatini için ortak olan ve literatürdeki çalışmalar ile ortak olan markör peptitler sunulmuştur.



Şekil 3. 33 Nano-LC-MS/MS çalışması standart jelatin toplam iyon kromatogramları. a) Halavet sığır jelatini, b) Sigma 9282 sığır jelatini, c) Sigma G2500 domuz jelatini, d) Sigma 2625 domuz jelatini.

Çizelge 3. 2 Enzimatik olarak parçalanmış sığır ve domuz jelatinleri için tanımlanan markör peptitler

Sığır Jelatini Markör Peptitler (Halavet, Sığır G9382)	Domuz Jelatini Markör Peptitler (Domuz G2500, Domuz G2625)
AGVMGPAGSR	EGPAGLPGIDGR
GATGPAGVR	GAPGPDGNNGAQGPPGPQGVQGGK
GDIGSPGR	GEPGPAGSVGPAGAVGPR
GEAGPSGPAGPTGAR	GESGPAGPPGAPGAPGAPGPVGPAGK
GEGGPQGPR	GETGPSGPAGPTGAR
GESGNKGEPGAVGQPGPPGPSGEEGK	GIPGEFGLPGPAGPR
GETGPAGPAGPIGPVGAR	GPNGEVGSAGPPGPPGLR
GETGPAGPPGAPGAPGAPGPVGPAGK	GPPGESGAAGPAGPIGSR
GPPGSAGSPGK	GPTGDPGK
GSTGEIGPAGPPGPPGLR	GPTGPAGVR
IGQPGAVGPAGIR	GSPGADGPAGAPGTPGPQGIAGQR
PGAPGPAGAR	PGPPGPAGAR
QGPSGASGER	QGPSGPSGER
SGETGASGPPGFVGEK	TGETGASGPPGFAGEK
STGISVPGPMGPPSGPR	TGQPGAVGPAGIR

3.4 Renk ve Tekstür Analizlerine İlişkin Bulgular

3.4.1 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak Şekerlemeler için Tekstür Analizi Bulguları

Yumuşak şekerlemelerde özellikle önem taşıyan iki tekstür özelliği sertlik ve elastiklidir. Sertlik terimi, tamamen sıkıştırmak için gerekli olan güç miktarı olarak tanımlanabilmektedir. Başka bir deyişle ise sertlik, malzemenin deformasyonunu sağlayacak gerekli olan güç miktarı olarak ifade edilebilir. Çizelge 2.4'te belirtilen tüm yumuşak şekerlemelere ait tekstür analizleri gerçekleştirilmiş olup, analiz sonuçlarına ilişkin bulgular Çizelge 3.3'te sunulmuştur. Tekstür analizlerinde sertlik ve elastikiyet değerlendirilmiş olup ölçümler iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Tüm yumuşak şekerlemelerin sertlik (g) değerleri 1174,3 ile 3842,9 arasında değişim göstermektedir. Yumuşak şekerlemelerin sertlik değerleri birbirlerine belirgin farklılıklar göstermektedir. Bunun sebebi kullanılan jelatinlerin jel gücü değerlerinin farklı olmasıdır. Tüm jelatinlerin jel gücü hakkında detaylı bilgi Çizelge 2.4'te sunulmuştur.

Çizelge 3.3 detaylı olarak incelendiği zaman üç farklı şeker türü içinde en yüksek sertlik değerlerinin görüldüğü yumuşak şekerlemeler jel gücü en yüksek olan jelatinler kullanılarak hazırlanmış olanlardır. YŞ1, YŞ2, YŞ3, YŞ10, YŞ11, YŞ12, YŞ22, YŞ23, YŞ24, YŞ25, YŞ26, YŞ27, YŞ28, YŞ29, YŞ30 yumuşak şekerlemelerinin hazırlanmasında jel gücü 200 g üzerinde olan jelatinler kullanılmıştır. En yüksek sertlik değerleri bu yumuşak şekerlemelerde görülmüştür. Benzer şekilde YŞ7, YŞ8 ve YŞ9 jel gücü en düşük olan (70 g) jelatin ile hazırlanmıştır ve Çizelge 3.3'te detaylı olarak görüldüğü gibi en düşük sertlik değerlerine bu yumuşak şekerlemeler sahiptir. Diğer bir bulgu ise aynı jelatinlerin kullanıldığı fakat farklı şeker kompozisyonlarını içeren yumuşak şekerlemelerin sertlik değerlerinde farklılık görülmüştür. Belirgin büyük farklılıklar olmasa da şeker içeriği sertlik değerinde değişikliğe sebep olmuştur. Diğer incelenen parametre ise elastikiyet değeridir. Üretilen yumuşak şekerlemelerin elastikiyet değerleri 44,7 (mm) ile 80,5 (mm) değeri arasında değişim göstermiştir. Benzer şekilde aynı jelatin türünü fakat farklı şeker kompozisyonunu içeren yumuşak şekerlemelerin elastikiyet değerleri birbirinden farklı olarak tespit edilmiştir. Genel olarak hem sertlik hem de elastikiyet bulguları incelendiğinde, ürün içeriğindeki farklılıklar sebebi ile söz konusu parametrelerin ürünler arasında farklılık gösterdiğini söylemek mümkündür fakat asıl amacımız olan jelatinin kökeninin tespit edilmesi yönünden değerlendirildiğinde, tekstürel bulguların yardımcı olacak nitelikte sonuç vermediği görülmektedir. Başka bir deyişle sertlik ve elastikiyet değerlerinden yola çıkarak ürünlerdeki jelatinin kökeni hakkında yorum yapabilmek mümkün değildir.

Sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde sertlik tekstür özelliğinin jelatin türünden önemli derecede etkilendiği görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda $p<0,001$ olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda iki yönlü-ANOVA analizinde üç farklı şeker kompozisyonunun etkisinin respons (sertlik) üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Üç farklı şeker kompozisyonu (sükroz+fruktoz, sükroz+glikoz, sükroz+maltos) belirgin şekilde farklı olarak tespit edilmiştir. ANOVA sonuçlarına göre sırasıyla, B, A ve C harflendirmesine sahiptirler. Benzer şekilde sertlik tekstür özelliğinin şeker kompozisyonundan önemli derecede etkilendiği tespit edilmiştir ($p<0,001$). Elastikiyet değerleri için sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde elastikiyet tekstür özelliğinin jelatin türünden önemli derecede etkilendiği görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda $p<0,001$ olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda iki yönlü-ANOVA analizinde üç farklı şeker kompozisyonunun etkisinin respons (sertlik) üzerine etkisi

değerlendirilmiştir. Üç farklı şeker kompozisyonu (sükroz+fruktoz, sükroz+glukoz, sükroz+maltöz) belirgin şekilde farklı olarak tespit edilmiştir. ANOVA sonuçlarına göre sırasıyla, A, B ve C harflendirmesine sahiptirler. Benzer şekilde elastikiyet tekstür özelliğinin şeker kompozisyonundan önemli derecede etkilendiği tespit edilmiştir ($p<0,001$).

Çizelge 3. 3 Yumuşak şekerleme örnekleri için tekstür analizi sonuçları

Jelatin Türü	Yumuşak Şekerleme	Sertlik (g)	Ortalama Sertlik (g)	Elastikiyet (mm)	Ortalama Elastikiyet (mm)
Domuz G2500	YŞ1	3842,9±129,7	3609 ^a	78,5±1,6	64,20 ^{bcd}
	YŞ2	3464,6±63,9		55,0±1,8	
	YŞ3	3519,5±91,9		59,1±0,6	
Domuz 04055	YŞ4	3156,9±98,1	2775 ^d	74,7±0,7	63,47 ^{cd}
	YŞ5	2580,0±113,0		70,6±0,5	
	YŞ6	2587,8±102,0		45,1±9,9	
Domuz 48720	YŞ7	1174,3±45,8	1659 ^h	68,8±2,5	72,60 ^a
	YŞ8	1932,4±11,3		68,5±1,4	
	YŞ9	1871,2±11,3		80,5±0,2	
Domuz 48724	YŞ10	2789,2±24,8	2600 ^e	70,9±0,3	66,67 ^b
	YŞ11	2884,7±112,8		65,3±0,0	
	YŞ12	2143,2±108,5		63,8±0,7	
Domuz 6144	YŞ13	2143,2±32,5	2111 ^g	65,0±0,8	61,20 ^d
	YŞ14	2098,1±96,3		63,8±0,6	
	YŞ15	2092,0±23,4		54,8±0,1	
Domuz 48722	YŞ16	2308,5±72,9	2837 ^d	52,8±0,6	54,97 ^e
	YŞ17	3746,4±211,1		60,0±2,8	
	YŞ18	2456,5±180,3		52,1±2,2	
Domuz 2625	YŞ19	2182,8±181,0	2305 ^f	58,9±3,2	63,33 ^{cd}
	YŞ20	2330,0±42,4		65,7±0,6	
	YŞ21	2405,1±63,8		65,5±0,7	
Domuz 39465	YŞ22	3569,4±52,0	3246 ^{bc}	52,3±1,0	49,57 ^f
	YŞ23	3300,6±141,5		51,8±0,3	
	YŞ24	2869,3±6,9		44,7±3,9	
Sığır9382	YŞ25	2880,0±84,9	3137 ^c	53,9±0,4	55,45 ^e
	YŞ26	3442,4±132,0		60,1±6,5	
	YŞ27	3089,2±157,0		52,4±0,7	
Sığır9391	YŞ28	3449,3±373,4	3296 ^b	72,1±1,4	64,68 ^{bc}
	YŞ29	3157,8±70,7		54,7±0,4	
	YŞ30	3281,2±79,2		67,1±0,8	

*Farklı harfler örnekler arasındaki önemli istatistiksel farklılıkları gösterir ($p<0,05$)

3.4.2 Üç Farklı Şeker İçeren Sığır ve Domuz Jelatini Katkılı Yumuşak

Şekerlemeler için Renk Analizi Bulguları

Çizelge 2.4'te belirtilen tüm yumuşak şekerlemelere ait renk analizleri gerçekleştirilmiş olup, analiz sonuçlarına ilişkin bulgular Çizelge 3.4'te sunulmuştur. Renk özelliklerinin değerlendirilmesi (L^*, a^*, b^*) modeli ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarında renk üç boyut ile ifade edilmektedir: L^* : Rengin parlaklığı (0: Siyah, 100: Beyaz), a^* : Kırmızılık Yeşillik (-60: Yeşil, +60: Kırmızı), b^* : Sarılık Mavilik (-60: Mavi, +60: Sarı).

Çizelge 3. 4 Yumuşak şekerleme örnekleri için renk analizi sonuçları

Yumuşak Şekerleme	L^*	L^*_{ort}	a^*	a^*_{ort}	b^*	b^*_{ort}
YŞ1	57,61±0,26	58,03 ^b	-0,67±0,04	-0,48 ^d	6,82±0,22	6,65 ^f
YŞ2	68,78±0,27		-0,58±0,05		10,13±0,06	
YŞ3	47,70±0,11		-0,20±0,01		3,00±0,08	
YŞ4	70,76±0,39	64,96 ^a	-1,06±0,07	-0,47 ^d	10,44±0,51	7,72 ^d
YŞ5	62,86±0,60		-0,14±0,05		7,16±0,35	
YŞ6	61,25±0,75		-0,19±0,03		6,92±0,28	
YŞ7	51,32±0,80	50,70 ^f	-0,35±0,07	0,08 ^b	7,32±0,31	7,05 ^e
YŞ8	48,89±0,61		0,39±0,04		6,31±0,92	
YŞ9	51,90±0,82		0,22±0,08		7,54±0,39	
YŞ10	54,81±0,71	48,99 ^h	-0,84±0,03	-0,005 ^c	6,59±0,38	4,94 ^h
YŞ11	45,39±0,92		0,46±0,05		4,98±0,78	
YŞ12	46,77±0,96		0,37±0,07		3,26±0,24	
YŞ13	53,95±0,35	52,72 ^d	-0,85±0,03	-0,49 ^d	8,31±0,98	9,04 ^b
YŞ14	51,52±0,36		-0,04±0,09		10,31±0,93	
YŞ15	52,69±0,67		-0,60±0,09		8,52±0,32	
YŞ16	51,82±0,56	48,20 ⁱ	-0,27±0,01	-0,003 ^c	6,03±0,33	6,48 ^f
YŞ17	48,94±0,71		0,21±0,09		8,66±0,18	
YŞ18	43,84±0,50		0,05±0,04		4,76±0,22	
YŞ19	51,67±0,24	46,74 ^j	-0,24±0,07	0,08 ^b	7,48±0,38	6,04 ^g
YŞ20	41,78±0,22		0,63±0,06		5,40±0,15	
YŞ21	46,76±0,20		-0,15±0,01		5,26±0,18	
YŞ22	53,34±0,69	51,47 ^e	-0,06±0,03	0,134 ^a	3,51±0,11	3,22 ⁱ
YŞ23	46,08±0,17		0,45±0,09		3,88±0,88	
YŞ24	54,98±0,83		0,01±0,07		2,28±0,18	
YŞ25	60,23±0,83	49,78 ^g	-1,16±0,05	-0,48 ^d	10,84±0,15	8,34 ^c
YŞ26	44,03±0,70		-0,13±0,07		8,93±0,27	
YŞ27	45,09±0,64		-0,16±0,02		5,27±0,50	
YŞ28	54,82±0,35	54,4 ^c	-1,10±0,03	-0,69 ^e	10,37±0,17	11,84 ^a
YŞ29	51,71±0,78		-0,45±0,05		12,16±0,19	
YŞ30	56,69±0,22		-0,54±0,04		13,00±0,21	

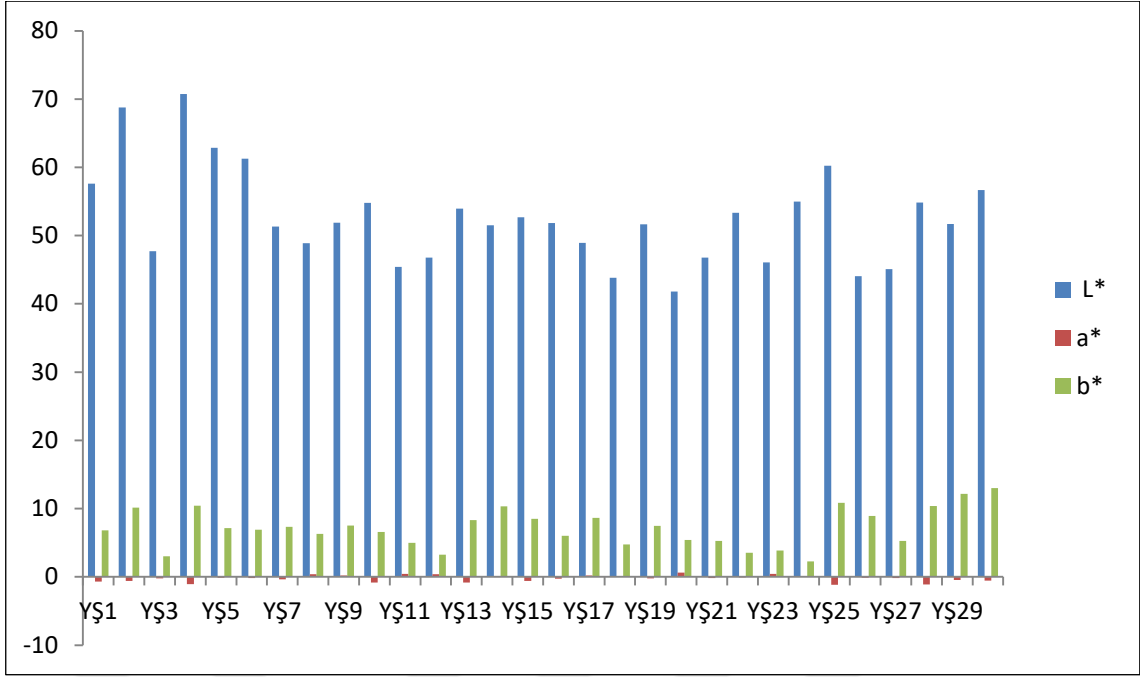
*Farklı harfler örnekler arasındaki önemli istatistiksel farklılıkları gösterir ($p < 0,05$)

Sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde L^* renk özelliğinin jelatin türünden önemli derecede etkilendiği görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda $p<0,001$ olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda iki yönlü-ANOVA analizinde üç farklı şeker kompozisyonunun etkisinin respons L^* renk üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Üç farklı şeker kompozisyonu (sükroz+fruktoz, sükroz+glikoz, sükroz+maltoz) değerlendirilmiş ve birinci şeker kompozisyonu belirgin şekilde farklı olarak tespit edilmiştir. ANOVA sonuçlarına göre sırasıyla, A, B ve B harflendirmesine sahiptirler. Benzer şekilde L^* renk özelliğinin özelliğinin şeker kompozisyonundan önemli derecede etkilendiği tespit edilmiştir ($p<0,001$).

Sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde a^* renk özelliğinin jelatin türünden önemli derecede etkilendiği görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda $p<0,001$ olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda iki yönlü-ANOVA analizinde üç farklı şeker kompozisyonunun etkisinin respons a^* renk üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Üç farklı şeker kompozisyonu (sükroz+fruktoz, sükroz+glikoz, sükroz+maltoz) değerlendirilmiş ve üç şeker kompozisyonunun belirgin şekilde farklı olduğu tespit edilmiştir. ANOVA sonuçlarına göre sırasıyla, C, A ve B harflendirmesine sahiptirler. Benzer şekilde a^* renk özelliğinin özelliğinin şeker kompozisyonundan önemli derecede etkilendiği tespit edilmiştir ($p<0,001$).

ANOVA sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde b^* renk özelliğinin jelatin türünden önemli derecede etkilendiği görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda $p<0,001$ olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda iki yönlü-ANOVA analizinde üç farklı şeker kompozisyonunun etkisinin respons b^* renk üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Üç farklı şeker kompozisyonu (sükroz+fruktoz, sükroz+glikoz, sükroz+maltoz) değerlendirilmiş ve üçüncü şeker kompozisyonunun belirgin şekilde farklı olduğu tespit edilmiştir. ANOVA sonuçlarına göre sırasıyla, A, A ve B harflendirmesine sahiptirler. Benzer şekilde b^* renk özelliğinin özelliğinin şeker kompozisyonundan önemli derecede etkilendiği tespit edilmiştir ($p<0,001$).

Çizelge 3.4'te görüldüğü üzere üretilen yumuşak şekerlemelerin renk değerleri L^* , a^* , b^* farklılık göstermektedir. Renk değerlerine bakılarak ürünlerdeki jelatinin orijini (sığır, domuz) hakkında yorum yapabilmek mümkün değildir. Ayrıca Şekil 3. 34'te yumuşak şekerlemeler (YŞ) için L^* , a^* , b^* değerlerine karşılık sütun grafiği sunulmaktadır. Sütun grafiğinde de görüldüğü üzere değerlendirilen renk değerleri temelinde jelatin kökeni hakkında yorum yapabilmek mümkün değildir.



Şekil 3. 34 Yumuşak şekerlemeler (YŞ) için renk değerlerine (L^* , a^* , b^*) karşılık sütun grafikleri

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde jelatinin orijininin hem saf halde iken hem de gıda ürünlerinin içerisinde iken belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Toplumların konu hakkında süregelen tartışmaları ve çekinceleri mevcuttur. Özellikle bazı toplulukların jelatin tüketimi ile ilgili hassasiyetleri söz konusudur. Birçok açıdan değerlendirildiğinde gıda ürünlerindeki jelatinin kökeninin belirlenmesi gerektiği görülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında FTIR ve Raman spektroskopi teknikleri kemometrik yaklaşımlar ile birleştirilerek saf haldeki sığır, domuz ve balık jelatinlerinin ayırt edilmesi amacı ile kullanılmıştır. Farklı orijine sahip saf standart jelatinler başarılı bir şekilde FTIR ve Raman teknikleri kullanılarak ayırt edilebilmiştir. Karışım halindeki jelatinlerin kökeninin tespiti için ayrıca FTIR temelli metot geliştirilmiştir. Farklı türdeki jelatinlerin kimyasal yapıları FTIR ve Raman teknikleri kullanılarak değerlendirilmiş ve konu hakkında literatüre katkıda bulunulmuştur. Proteomiks çalışmalarında nano LC-MS/MS tekniği kullanılarak standart sığır ve domuz jelatinlerine ait markör peptitler belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında standart jelatinlerin kökeninin belirlenmesi hususunda önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Özellikle ATR-FTIR tekniğinin ve Raman tekniğinin kemometri ile birlikte uygulanması sonucunda standart jelatinlerin sığır veya domuz kökenli olmalarına göre sınıflandırılabilceği ve ayırt edilebileceği tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasının amacı yaygın olarak tüketilen yumuşak şekerlemelerin yapısında bulunan jelatinin kökeninin belirlenmesidir. Bu bağlamda çalışma kapsamında farklı kompozisyonda ve farklı reçetelere göre yumuşak şekerlemeler üretilmiş ve yapılarındaki jelatinin kökeninin belirlenmesine yönelik FTIR ve Raman teknikleri

uygulanmıştır. Yumuşak şekerlemelerin spektral özellikleri hakkında bilgiler literatüre kazandırılmış ve jelatin kökenine yönelik sınıflandırılması hususunda kemometrik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar kapsamında PCA, HCA, PLS-DA, GADA gibi etkin sınıflandırma yöntemleri yumuşak şekerlemelerinin kökeninin belirlenmesi amacı ile ilk defa uygulanmıştır. FTIR ve Raman tekniği birlikteliğinde kemometrik metotların oluşturulması metot geliştirme aşamasında zaman alıcı olsa da uygulanma aşamasında oldukça basit ve pratik şekilde bu metotlardan yararlanılabilmektedir. FTIR-ATR temelli pratik, güçlü, güvenilir ve etkin metotlar geliştirilmiştir. Yumuşak şekerlemeler için elde edilen bulgular RT-PCR tekniği kullanılarak valide edilmiştir. FTIR-ATR sonuçları ile RT-PCR sonuçları karşılaştırılmıştır ve birbirini destekleyen benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Ülkemizde jelatinin gıda ürünlerindeki kökeninin tespitine yönelik araştırmalar helal gıda kapsamında helal gıda kontrolü için arttırılmalı ve oluşturulan metotlar daha ileri boyuta taşınmalıdır. Özellikler helal gıda tüketiminde hassasiyetleri olan toplumların şüpheleri ve kaygıları azaltılmalıdır.

Bu amaçla var olan kontrol yöntemlerine ek olarak kolay, pratik, ucuz ve teknik bilgi gerektirmeden yapılabilecek yöntemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Baziwane, D., ve He, Q., (2003). "Gelatin: The Paramount Food Additive", *Food Reviews International*, 19(4):423–435.
- [2] Karim, A. A., ve Bhat, R., (2008). "Gelatin Alternatives for the Food Industry: Recent Developments, Challenges and Prospects", *Trends in Food Science & Technology*, 19(12):644–656.
- [3] Mariod, A. A., (2013). "Review: Gelatin, Source, Extraction and Industrial Applications", *Acta Scientiarum Polonorum Technol. Aliment.*, 12(2):135–147.
- [4] GMIA (2012). *Gelatin Handbook*, Gelatin Manufact. Inst. Am, New York.
- [5] Boran, G., (2011). "Bir Gıda Katkısı Olarak Jelatin:Yapısı, Özellikleri, Üretimi, Kullanımı ve Kalitesi", *Gıda*, 36:97–104.
- [6] Yetim, H., (2011). "Jelatin Üretimi, Özellikleri ve Kullanımı", 1. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, 19-20 Kasım 2011, Ankara.
- [7] Belbachir, K., Noreen, R., Gouspillou, G., ve Petibois, C., (2009). "Collagen Types Analysis and Differentiation by FTIR Spectroscopy", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(3):829–837.
- [8] Karim, A. A., & Bhat, R., (2009). "Fish Gelatin: Properties, Challenges, and Prospects as an Alternative to Mammalian Gelatins", *Food Hydrocolloids*, 23(3): 563–576.
- [9] Cooper, K., Nathan, A., ve Vyakarnam, M., (2011). "Poly(ϵ -Caprolactone-Co-Glycolide): Biomedical Applications of a Unique Elastomer", *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development*, Hoboken, NJ:John Wiley & Sons
- [10] Boran, G., Lawless, H. T., ve Regenstien, J. M., (2010). "Effects of Extraction Conditions on the Sensory and Instrumental Characteristics of Fish Gelatin Gels", *Journal of Food Science*, 75(9):469-476
- [11] Meena, C., Mengi, S. A, ve Deshpande, S. G., (1999). "Biomedical and Industrial Applications of Collagen", *Proceedings Indian Academy of Sciences*, 111(2):319–329.
- [12] Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., ve Mulligan, C. N., (1999). "Encapsulation in the Food Industry: A Review", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3):213–224.
- [13] Sam, T., (2000). "Regulatory Implications of Excipient Changes in Medicinal Products", *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*, 34(3):875–894.

- [14] Nhari, R. M. H. R., Ismail, A., ve Che Man, Y. B., (2012). "Analytical Methods for Gelatin Differentiation from Bovine and Porcine Origins and Food Products", *Journal of Food Science*, 77(1):42-46
- [15] Kobayashi, T., (1996). "Properties and Functions of Gelatin", *Food and Food Ingredients Journal of Japan*, 170:82–88.
- [16] Schrieber, R., ve Gareis, H., (2007). "Gelatine Handbook", *Wiley-VCH Verlag GmbH&Co*, Weinheim.
- [17] Haug, I. J., Draget, K. I., ve Smidsrød, O., (2004). "Physical and Rheological Properties of Fish Gelatin Compared to Mammalian Gelatin", *Food Hydrocolloids*, 18(2):203–213.
- [18] MEGEP, (2006). Jöleler, şekerlemeler, çikolatalar. Ankara.
- [19] Charoen, R., (2015). "Development of Antioxidant Gummy Jelly Candy Supplemented with Psidium guajava Leaf Extract", *KMUTNB International Journal of Applied Science and Technology*, 8(2):145–151.
- [20] Lubbers, S., ve Guichard, E., (2003). "The effects of Sugars and Pectin on Flavour Release From a Fruit Pastille Model System", *Food Chemistry*, 81(2): 269–273.
- [21] Rohman, A., ve Che Man, Y. B., (2012). "Analysis of Pig Derivatives for Halal Authentication Studies", *Food Reviews International*, 28(1):97–112.
- [22] Şimşek, M., (2013). "Helal Belgelendirme ve SMIIC Standardı", *İslam Hukuku Araştırmaları Dergisi*, (22):19–44.
- [23] Gündüz, M. Ö., (2013). "TS OIC / SMIIC 1 Helal Gıda Genel Kılavuzunun Uygulanması", *Uluslararası 2.Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi* (pp. 396–400).
- [24] Gelatin Manufacturers of Europe, <https://www.gelatine.org/en/gelatine/overview/127.htm>, (2006), 10 Ekim 2016
- [25] Eryılmaz, H. S., Işık, B. Ş., Demircan, E., Memeli, Z., Erdil, D. N., ve Çapanoğlu, E., (2017). "Origin Determination and Differentiation of Gelatin Species of Bovine , Porcine , and Piscine through Analytical Methods", *Turkish Journal of Agriculture Food Science and Technology*, 5(5):507–517.
- [26] Zhang, G., Liu, T., Wang, Q., Chen, L., Lei, J., Luo, J., ve Su, Z., (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(7):2001–2007.
- [27] Cebi, N., Durak, M. Z., Toker, O. S., Sagdic, O., ve Arici, M., (2016). "An Evaluation of Fourier Transforms Infrared Spectroscopy Method for the Classification and Discrimination of Bovine, Porcine and Fish Gelatins", *Food Chemistry*, 190(February):1109–1115.
- [28] Nemati, M., Oveisi, M. R., Abdollahi, H., ve Sabzevari, O., (2004). "Differentiation of Bovine and Porcine Gelatins Using Principal Component Analysis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(3):485–492.
- [29] Zhang, G.-F., Liu, T., Wang, Q., Lei, J.-D., Ma, G.-H., ve Su, Z.-G., (2008). "Identification of Marker Peptides in Digested Gelatins by High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry", *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36(11):1499–1504.
- [30] Venien, A., ve Levieux, D., (2005). "Differentiation of Gelatins Using Polyclonal

Antibodies Raised Against Tyrosylated Bovine and Porcine gelatins", *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 26(3):215–29.

- [31] Hashim, D. M., Man, Y. B. C., Norakasha, R., Shuhaimi, M., Salmah, Y., ve Syahariza, Z. A., (2010). "Potential use of Fourier transform Infrared Spectroscopy for Differentiation of Bovine and Porcine Gelatins", *Food Chemistry*, 118(3):856–860.
- [32] Doi, H. I. D., Atanabe, E. R. W., Hibata, H. A. S., ve Anabe, S. O. T., (2009). "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.
- [33] Tukiran, N. A., Ismail, A., Mustafa, S., ve Hamid, M., (2016). "Development of Antipeptide Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Determination of Gelatin in Confectionery Products", *International Journal of Food Science and Technology*, 51(1):54–60.
- [34] Nur Azira, T., Che Man, Y. B., Raja Mohd Hafidz, R. N., Aina, M. A., ve Amin, I., (2014). "Use of Principal Component Analysis for Differentiation of Gelatine Sources Based on Polypeptide Molecular Weights", *Food Chemistry*, 151: 286–292.
- [35] Azilawati, M. I., Hashim, D. M., Jamilah, B., ve Amin, I., (2015). "RP-HPLC Method Using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate Incorporated with Normalization Technique in Principal Component Analysis to Differentiate the Bovine, Porcine and Fish Gelatins", *Food Chemistry*, 172:368–376.
- [36] Cheng, X. L., Wei, F., Xiao, X. Y., Zhao, Y. Y., Shi, Y., Liu, W., ve Lin, R. C., (2012). "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.
- [37] Flaudrops, C., Armstrong, N., Raoult, D., ve Chabrière, E., (2015). "Determination of the Animal Origin of Meat and Gelatin by MALDI-TOF-MS", *Journal of Food Composition and Analysis*, 41:104–112.
- [38] Hidaka, S., ve Liu, S. Y., (2003). "Effects of Gelatins on Calcium Phosphate Precipitation: A Possible Application for Distinguishing Bovine Bone Gelatin from Porcine Skin Gelatin", *Journal of Food Composition and Analysis*, 16: 477–483.
- [39] Yilmaz, M. T., Kesmen, Z., Baykal, B., Sagdic, O., Kacar, O., Yetim, H., ve Baykal, A. T., (2013). "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(3):2450–2458.
- [40] Raraswati, M. A., Triyana, K., ve Rohman, A. (2014). "Differentiation of Bovine and Porcine Gelatins in Soft Candy Based on Amino Acid Profiles and Chemometrics", *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 2:1–6.
- [41] Tan, C. T., ve Lock, S., (2014). *Are Pork Extracts Present in My Gummy Bears? Gelatin Speciation by LC-MS/MS*. USA.
- [42] Demirhan, Y., Ulca, P., ve Senyuva, H. Z., (2012). "Detection of Porcine DNA in Gelatine and Gelatine-Containing Processed Food Products—Halal/Kosher Authentication", *Meat Science*, 90(3):686–689.
- [43] Tanabe, S., Hase, M., Yano, T., Sato, M., Fujimura, T., ve Akiyama, H., (2007). "A Real-Time Quantitative PCR Detection Method for Pork, Chicken, Beef, Mutton, and Horseflesh in Foods", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(12):3131–

3135.

- [44] Cai, H., Gu, X., Scanlan, M. S., Ramatlapeng, D. H., ve Lively, C. R., (2012). "Real-time PCR Assays for Detection and Quantitation of Porcine and Bovine DNA in Gelatin Mixtures and Gelatin Capsules", *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(1):83–87.
- [45] Mutalib, S. A., Muin, N. M., Abdullah, A., Hassan, O., Wan Mustapha, W. A., Abdullah Sani, N., ve Maskat, M. Y., (2015). "Sensitivity of Polymerase Chain Reaction (PCR)-Southern Hybridization and Conventional PCR Analysis for Halal Authentication of Gelatin Capsules", *LWT - Food Science and Technology*, 63(1):714–719.
- [46] Aina, M. A., Amin, I., Raja Mohd Hafidz, R. N., ve Yaakob, C. M., (2013). "Identification Polypeptide Biomarkers of Porcine Skin Gelatin by Two-Dimensional Electrophoresis", *International Food Research Journal*, 20(3):1395–1399.
- [47] Hermanto, S., Sumarlin, L. O., ve Fatimah, W., (2013). "Differentiation of Bovine and Porcine Gelatin Based on Spectroscopic and Electrophoretic Analysis", *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 1:68–73.
- [48] Sivakesava, S., ve Irudayaraj, J., (2001). "Prediction of Inverted Cane Sugar Adulteration of Honey by Fourier Transform Infrared Spectroscopy", *Journal of Food Science*, 66(7):972–978.
- [49] Sivakesava, S., ve Irudayaraj, J., (2002). "Classification of Simple and Complex Sugar Adulterants in Honey by Mid-Infrared Spectroscopy". *International Journal of Food Science and Technology*, 37(4):351–360.
- [50] Ibañez, E., ve Cifuentes, A., (2001). "New Analytical Techniques in Food Science", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41(6):413–450.
- [51] Lohumi, S., Lee, S., Lee, H., ve Cho, B. K., (2015). "A Review of Vibrational Spectroscopic Techniques for the Detection of Food Authenticity and Adulteration", *Trends in Food Science and Technology*, 46(1):85–98.
- [52] Rodes, A., Perez, J. M., ve Aldaz, A., (2004). "Vibrational Spectroscopy", *Handbook of Fuel Cells: Fundamentals, Technology and Applications*, 2:191–219.
- [53] Rohman, A., Nugroho, A., Lukitaningsih, E., ve Sudjadi., (2014). "Application of Vibrational Spectroscopy in Combination with Chemometrics Techniques for Authentication of Herbal Medicine", *Applied Spectroscopy Reviews*, 49(8):603–613.
- [54] Alvarez-Ordóñez, A., ve Prieto, M., (2012). "Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Food Microbiology". New York: Springer.
- [55] Boyaci, I. H., Temiz, H. T., Uysal, R. S., Velioglu, H. M., Yadegari, R. J., ve Rishkan, M. M., (2014). "A Novel Method for Discrimination of Beef and Horsemeat using Raman Spectroscopy", *Food Chemistry*, 148:37–41.
- [56] Cebi, N., Dogan, C. E., Develioglu, A., Yayla, M. E. A., & Sagdic, O., (2017). "Detection of L-Cysteine in Wheat Flour by Raman Microspectroscopy Combined Chemometrics of HCA and PCA", *Food Chemistry*, 228:116-124
- [57] Cozzolino, D., Cozzolino, D., Murray, I., Murray, I., Chree ve Scaife, J., (2005). "Multivariate Determination of Free Fatty Acids and Moisture in Fish Oils by Partial Least-squares Regression and Near-infrared Spectroscopy", *LWT - Food Science and Technology*, 38(8):821–828.

- [58] Downey, G., (1998). "Food and Food Ingredient Authentication by Mid-Infrared Spectroscopy and Chemometrics", *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 17(7): 418–424.
- [59] Gallardo-Velazquez, T., Osorio-Revilla, G., Loa, M. Z. de, ve Rivera-Espinoza, Y., (2009). "Application of FTIR-HATR Spectroscopy and Multivariate Analysis to the Quantification of Adulterants in Mexican Honeys". *Food Research International*, 42(3):313–318.
- [60] Mahesar, S. A., Kandhro, A. A., Khaskheli, A. R., Talpur, M. Y., ve Sherazi, S. T. H. (2014). "SB-ATR FTIR Spectroscopic Monitoring of Free Fatty Acids in Commercially Available *Nigella sativa* (Kalonji) Oil", *Journal of Spectroscopy*, 2014:1–5.
- [61] Moros, J., Garrigues, S., ve Guardia, M., (2010). "Vibrational Spectroscopy Provides a Green Tool for Multi-component Analysis", *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29(7):578–591.
- [62] Özkan, E. (2011). FT-IR spektroskopisi kullanılarak tahribatsız tereyağı kalitesi değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Teknik Üniversitesi.
- [63] Ismail, A. A., van de Voort, F. R., ve Sedman, J., (1997). "Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Principles and Applications", *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, 18:93–139.
- [64] Çebi, N., (2012). Beyaz Peynirlerde Kimyasal Kompozisyonun Mikro Ölçekte Dağılımının Mikro-FTIR ile Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Teknik Üniversitesi.
- [65] Rodriguez-Saona, L. E., ve Allendorf, M. E., (2011). "Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food", *Annual Review of Food Science and Technology*, 2(1):467–483.
- [66] Yang, D., ve Ying, Y., (2011). "Applications of Raman Spectroscopy in Agricultural Products and Food Analysis: A Review", *Applied Spectroscopy Reviews*, 46(7):539–560.
- [67] Banger, J. M. R., Par, J. R. J., ve Sigouin, M., (1997). *Instrumental Methods in Food Analysis*. Elsevier, Ottawa.
- [68] Rodriguez-Saona, L. E., Pujolras, M. P., ve Giusti, M. M., (2015). "Targeted and Non-Targeted Analysis", *Analytical Separation Science*, 1:1401–1436.
- [69] Cebi, N., Dogan, C. E., Olgun, E. O., ve Sagdic, O., (2018). "A Survey of Free Glutamic Acid in Foods Using a Robust LC–MS/MS Method", *Food Chemistry*, 248:8–13.
- [70] Xie, F., Liu, T., Qian, W. J., Petyuk, V. A., ve Smith, R. D., (2011). "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Quantitative Proteomics", *Journal of Biological Chemistry*, 286(29):25443–25449.
- [71] Günel, T., ve Aydınli, K. (2009)., " Real-Time PCR ve Uygulama Alanları", *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2(2):43–45.
- [72] Bustin, S. A., (2005). "Real-Time PCR", *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*, 1117–1125.
- [73] Granato, D., Putnik, P., Kovačević, D. B., Santos, J. S., Calado, V., Rocha, R. S., ve Pomerantsev, A., (2018). "Trends in Chemometrics: Food Authentication,

Microbiology, and Effects of Processing", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17: 663–677.

- [74] Cebi, N., Yilmaz, M. T., ve Sagdic, O., (2017). "A rapid ATR-FTIR Spectroscopic Method for Detection of Sibutramine Adulteration in Tea and Coffee Based on Hierarchical Cluster and Principal Component Analyses", *Food Chemistry*, 229:517-526.
- [75] Karoui, R., Downey, G., ve Blecker, C., (2010). "Mid-infrared Spectroscopy Coupled with Chemometrics: A Tool for the Analysis of Intact Food Systems and the Exploration of Their Molecular Structure-Quality Relationships-A Review", *Chemical Reviews*, 110(10):6144–6168.
- [76] Murtagh, F., ve Legendre, P., (2011). "Ward's Hierarchical Clustering Method: Clustering Criterion and Agglomerative Algorithm", *Journal of Classification*, 31: 274-295.
- [77] Wold, S., Sjöström, M., ve Eriksson, L., (2001). "PLS-regression: A Basic Tool of Chemometrics", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2):109–130.
- [78] Cebi, N., Yilmaz, M. T., Sagdic, O., Yuce, H., ve Yelboga, E., (2017). "Prediction of Peroxide Value in Omega-3 Rich Microalgae Oil by ATR-FTIR Spectroscopy Combined with Chemometrics", *Food Chemistry*, 225:188-196
- [79] Bulut, E., ve Alın, A., (2009). "Kısmi En Küçük Kareler Regresyon Yöntemi Nipals ve PLS-Kernel Algoritmalarının Karşılaştırılması ve Bir Uygulama", *Dokuz Eylül Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi*, 24(2):127–138.
- [80] Hirri, A., Bassbasi, M., Platikanov, S., Tauler, R., & Oussama, A., (2016). "FTIR Spectroscopy and PLS-DA Classification and Prediction of Four Commercial Grade Virgin Olive Oils from Morocco", *Food Analytical Methods*, 9(4):974–981.
- [81] Chiang, L. H., ve Pell, R. J., (2004). "Genetic Algorithms Combined with Discriminant Analysis for Key Variable Identification", *Journal of Process Control*, 14(2):143–155.
- [82] Carolina, S., (1996). "Genetic Regression as a Calibration Technique for Solid-Phase Extraction of Dithizone-Metal", *Metal Chelates*, 50(6):753–758.
- [83] Baranska, M., Baranski, R., Schulz, H., ve Nothnagel, T. (2006). "Tissue-Specific Accumulation of Carotenoids in Carrot Roots", *Planta*, 224:1028–1037.
- [84] Marfil, P. H. M., Anhô, A. C. B. M., ve Telis, V. R. N., (2012). "Texture and Microstructure of Gelatin/Corn Starch-Based Gummy Confections", *Food Biophysics*, 7(3):236–243.
- [85] Yuan, S., ve Chang, S. K. C., (2007). "Texture Profile of Tofu as Affected by Instron Parameters and Sample Preparation, and Correlations of Instron Hardness and Springiness with Sensory Scores", *Journal of Food Science*, 72(2).
- [86] Wu, D., ve Sun, D. W., (2013). "Colour Measurements by Computer Vision for Food Quality Control - A review", *Trends in Food Science and Technology*, 29(1): 5–20.
- [87] Pathare, P. B., Opara, U. L., ve Al-Said, F. A. J., (2013). "Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review", *Food and Bioprocess Technology*, 6(1):36–60.
- [88] Keskin, M., Setlek, P., ve Demir, S., (2017). "Use of Color Measurement Systems in Food Science and Agriculture". In *International Advanced Researches & Engineering Congress* (pp. 2350–2359), Osmaniye.

- [89] United States Department of Agriculture. Preparing and Canning Jams and Jellies. *National Institute of Food and Agriculture*.
- [90] Ferris, L., (1922). "A Method for the Quantitative Determination of Gelatin in Ice Creams 1", *Journal of Dairy Science*, 5(6):555–564.
- [91] Herbstreith & Fox. (2004). *Confectionery Gum and Jelly Products*.
- [92] Nagarajan, M., Benjakul, S., Prodpran, T., Songtipya, P., ve Kishimura, H., (2012). "Characteristics and Functional Properties of Gelatin from Splendid Squid (*Loligo formosana*) Skin as Affected by Extraction Temperatures", *Food Hydrocolloids*, 29(2):389–397.
- [93] Jackson, M., ve Mantsch, H. H., (1995). "The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure", *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(2):95–120.
- [94] Kohler, A., Bertrand, D., Martens, H., Hannesson, K., Kirschner, C., ve Ofstad, R., (2007). "Multivariate Image Analysis of a Set of FTIR Microspectroscopy Images of Aged Bovine Muscle Tissue Combining Image and Design Information", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(4):1143–1153.
- [95] Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., ve Duodu, K. G., (2004). "Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Study of Acid Soluble Collagen and Gelatin from Skins and Bones of Young and Adult Nile Perch (*Lates niloticus*)", *Food Chemistry*, 86(3):325–332.
- [96] Tewarii, J., ve Irudayaraj, J., (2004). "Quantification of Saccharides in Multiple Floral Honeys Using Fourier Transform Infrared Microattenuated Total Reflectance", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:3237–3243.
- [97] Anjos, O., Campos, M. G., Ruiz, P. C., ve Antunes, P., (2015). "Application of FTIR-ATR Spectroscopy to the Quantification of Sugar in Honey", *Food Chemistry*, 169: 218–223.
- [98] Wang, J., Kliks, M. M., Jun, S., Jackson, M., ve Li, Q. X., (2010). "Rapid Analysis of Glucose, Fructose, Sucrose, and Maltose in Honeys from Different Geographic Regions using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis", *Journal of Food Science*, 75(2):208–214.
- [99] Ibrahim, M., Alaam, M., El-Haes, H., Jalbout, A. F., ve Leon, A. De., (2006). "Analysis of the Structure and Vibrational Spectra of Glucose and Fructose", *Eclética Química*, 31(3):15–21.
- [100] Ward, J. H., (1963). "Hierarchical grouping to optimize an objective function", *Journal of the American Statistical Association*, 58:236–244
- [101] Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., ve Severcan, F., (2015). "Differentiation of Anatolian Honey Samples from Different Botanical Origins by ATR-FTIR Spectroscopy Using Multivariate Analysis", *Food Chemistry*, 170: 234–240.
- [102] Ropodi, A. I., Pavlidis, D. E., Mohareb, F., Panagou, E. Z., ve Nychas, G. J. E., (2015). "Multispectral Image Analysis Approach to Detect Adulteration of Beef and Pork in Raw Meats", *Food Research International*, 67:12–18.
- [103] Fabian, H., Thi, N. A. N., Eiden, M., Lasch, P., Schmitt, J., ve Naumann, D., (2006). "Diagnosing Benign and Malignant Lesions in Breast Tissue Sections by Using IR-Microspectroscopy", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(7):874–882.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Nur ÇEBİ
Doğum Tarihi ve Yeri :18.07.1986-Tekirdağ
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :nur.cebi@gmail.com, nurcebi@yildiz.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Kimya Mühendisliği	İstanbul Teknik Üniversitesi	2012
Lisans	Kimya Mühendisliği	İstanbul Üniversitesi	2009
Lise	Fen Bilimleri	Tekirdağ Anadolu Lisesi	2004

YAYINLARI

Makale

- 1. Cebi, N., Durak, M. Z., Toker, O. S., Sagdic, O., & Arici, M. (2016).** An evaluation of Fourier transforms kızılötesi spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins. *FOOD CHEMISTRY*, 190, 1109-1115.
- 2. Cebi, N., Yılmaz, M.T., Sagdic, O., Yuce, H., & Yelboga, E. (2017).** Prediction of peroxide value in omega-3 rich microalgae oil by ATR-FTIR spectroscopy combined with chemometrics. *FOOD CHEMISTRY*.
- 3. Cebi, N., Yılmaz, M.T., & Sagdic, O. (2017).** A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for detection of sibutramine adulteration in tea and coffee based on hierarchical cluster and principal component analyses. *FOOD CHEMISTRY*.
- 4. Cebi, N., Dogan, C., Develioglu, A., Yayla, M., & Sagdic, O. (2017).** Detection of l-cysteine in wheat flour by raman microspectroscopy combined chemometrics of HCA and PCA. *FOOD CHEMISTRY* .
- 5. Cebi, N., Dogan, C., Olgun, E., Sagdic, O. (2017).** A new and robust LC-MS/MS method for simultaneous quantification of MSG in foodstuffs. *FOOD CHEMISTRY*

Bildiri

- 1. Cebi, N., & Kizil, R. 2015.** Determination of chemical composition distribution at micro-scale in ezine cheeses by micro-FTIR, The 3rd International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, 1-4 October 2015, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. (accepted).
- 2. Cebi, N, Yılmaz, M.T., Dertli, E., Sagdic, O. 2015.** Orijinleri Farklı Balların FTIR-ATR Spektroskopisi Kullanılarak Sınıflandırılması. Uluslararası Arı Ürünlerinin Gıda Güvenliği ve Otantisitesi Kongresi, 21-22 Mayıs 2015, İstanbul, Türkiye. (Kabul edildi).
- 3. Yılmaz, M.T., Muslu, A., Dertli, E., Kara, H.H., Dertli, E., Cebi, N., Bozkurt, F. 2015.** Bayburt'un değişik bölgelerinden elde edilen balların bazı fizikokimyasal ve termal özelliklerinin değerlendirilmesi. Uluslararası Arı Ürünlerinin Gıda Güvenliği ve Otantisitesi Kongresi, 21-22 Mayıs 2015, İstanbul, Türkiye. (Kabul edildi).

4. Mese, A.E., Ozdemir, D., **Cebi, N.**, Develioglu, A., Ozturk, T., Dogan, C.E., Yayla, M.E., Sagdic, O. 2016. Helal Gıda Denetiminde Jelatin, Glutamat ve L-Sisteinin Kaynağına Yönelik Hızlı, Ekonomik ve Pratik Tespit Metotlarının Geliştirilmesi, Uygulanması ve Yaygınlaştırılması, 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 30 Mayıs-3 Haziran 2016, Isparta, Türkiye. (Kabul edildi).

5. Yılmaz, M.T., **Cebi, N.**, Bozkurt, F., Sagdic, O. 2016. Fourier Transform Kızılötesi (Kızılötesi) Spektroskopisi Kullanılarak Bal Ürünlerindeki Arı Sütünün Varlığının ve Miktarının Belirlenmesine Yönelik Metot Geliştirilmesi, Türkiye 12. Gıda Kongresi, 05-07 Ekim 2016, Edirne, Türkiye. (Kabul edildi).

Bursiyer Olarak Çalıştığı Projeler

1. Tübitak Ar-Ge Projesi: Tahribatsız gıda kalite ve mikroyapı testleri: Micro-FTIR çalışması-İstanbul Teknik Üniversitesi.

2. Tübitak Ar-Ge Projesi: Altın nanopartikül tabanlı biyosensör geliştirilmesi-İstanbul Teknik Üniversitesi.

3. TAGEM Projesi: Gıdalara Normal veya Tağşiş Amaçlı Katılan Jelatin Kaynağının Tespiti İçin Yeni Yöntemlerin Geliştirilmesi-Yıldız Teknik Üniversitesi.

4. TAGEM Projesi: Ekşi Hamurdan Starter Kültür Olarak Kullanılabilecek Mayaların İzolasyonu, Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Bu Mayaların Ekmek Üretiminde Kullanılması-Yıldız Teknik Üniversitesi.

5. TÜBİTAK Projesi: Lale Soğanı Üretiminde Atık Olarak Ortaya Çıkan Lale Çiçeklerinden Doğal Gıda Boyası ve Biyoaktif Madde Üretimi-Yıldız Teknik Üniversitesi.

6. TÜBİTAK Projesi: Helal Gıda Denetiminde Jelatin, Glutamat ve L-Sistein Kaynağına Yönelik Hızlı, Ekonomik ve Pratik Tespit Metodlarının Geliştirilmesi, Uygulanması ve Yaygınlaştırılması.

Yürüttüğü Projeler:

1. TEKNOGİRİŞİM Projesi (Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı): Antidiyabetik Instant fonksiyonel çay üretimi Başlangıç Tarihi: 01.06.2015 Bitiş Tarihi: 31.07.2016 /TGSD NO: 1850.TGSD.2015