

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ET ÜRÜNLERİNDE HİDROKSİPROLİN TAYİNİ
METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gıda Müh. Huri İLYASOĞLU**

Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

MAYIS 2002

**ET ÜRÜNLERİNDE HİDROKSİPROLİN TAYİNİ
METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gıda. Müh. Huri İLYASOĞLU
(506991037)**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 13 Mayıs 2002
Tezin Savunulduğu Tarih : 27 Mayıs 2002**

**Tez Danışmanı : Prof.Dr. Dilek BOYACIOĞLU
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Kamil BOSTAN (İ.Ü.)
Yrd.Doç.Dr. Beraat ÖZÇELİK**

MAYIS 2002

ÖNSÖZ

Et biyolojik değeri yüksek hayvansal proteinleri, anorganik maddeleri ve vitaminleri içeren önemli bir besin maddesidir. Et ve işlenmiş et ürünlerinin diyetle en önemli katkısı protein kaynağı olmasıdır. Etin içerdiği bağ doku proteinleri etin yumuşaklığını azaltır. Kolajen bağ dokuda en çok bulunan proteindir. İşlenmiş et ürünleri üretiminde kolajen miktarı fazla et kullanıldığında son üründe istenmeyen jelatin oluşumu, taneli ve kırılmalı yapı meydana gelir. Bağ dokuda esansiyel amino asit miktarı az olduğundan ürünün beslenme değeri azalmaktadır.

Et ürünleri üretimde kullanılan hammaddenin içerdiği veya formülasyona ilave edilen bağ doku miktarı ürünün işleme özelliklerini, besleyici değerini ve fiyatını etkilediğinden et ürünlerinde bağ doku miktarı tespiti önemlidir.

Kolajen en önemli bağ doku proteindir. Et ürünlerindeki en önemli işlevi şekil verme ve doku deformasyonunu önlemesidir. Kolajen %23 prolin ve hidroksiprolin içerir. Hidroksiprolin diğer vücut proteinlerinde nadir bulunduğu için et ve et ürünlerinde kolajen veya bağ doku içeriği ölçümünde hidroksiprolinden yararlanılabilir.

Bu çalışmada; Türk tipi sucuk, salam ve sosis numunelerinde hidroksiprolin tayininde iki farklı yöntemin performansı ve uygunluğu karşılaştırılmış ve iki yöntemin birbirleri ile ilişkileri belirlenmiştir.

Çalışmamda fikirleri ile beni yönlendiren, yardımları ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sn. Prof. Dr. Dilek BOYACIOĞLU'na ve içten yardımlarından ötürü Sn. Araş. Gör. Dilara NİLÜFER'e teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmam boyunca gösterdikleri anlayış ve destekten dolayı sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Mayıs, 2002

Huri İLYASOĞLU

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÖZET	viii
SUMMARY	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Sucuk	3
2.2. Salam	4
2.3. Sosis	4
2.4. Bağ Doku	6
2.4.1. Kolajen	7
2.4.2. Bağ doku ve et sertliği arasındaki ilişki	9
2.5. Hidroksiprolin Analizi	11
2.5.1. Histolojik yöntemler	11
2.5.2. Fiziksel yöntemler	11
2.5.3. Kolorimetrik yöntemler	12
2.5.4. Kromatografik yöntemler	13
2.5.4.1. İyon değiş tokuş kromatografisi	14
2.5.4.2. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)	15
2.5.4.3. Gaz kromatografisi (GC)	22
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Materyal	23
3.2. Metot	23
3.2.1. Kolorimetrik yöntem ile analiz	23
3.2.2. HPLC ile analiz	23
3.2.2.1. Hidroksiprolin stok/çalışma çözeltilerinin hazırlanması	23
3.2.2.2. Türevlendirme	24
3.2.2.3. HPLC koşulları	24
3.2.2.4. Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması	26
3.2.2.5. Hidroliz	26
3.2.2.6. Örneklere hidroksiprolin ilavesi	28

4. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
4.1. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi ile Ön Çalışmalar	29
4.2. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi ile Hidroksiprolin Tayini	30
4.2.1. Geri Kazanım Değerleri	32
4.2.2. Varyasyon Katsayıları	34
4.3. Kolorimetrik Yöntemi ile Hidroksiprolin Tayini	35
4.3.1. Geri Kazanım Değerleri	36
4.3.2. Varyasyon Katsayıları	37
4.4. Analiz Metotlarının Karşılaştırılması	38
4.5. Analiz Metotlarının Birbirleriyle İlişkileri	41
5. SONUÇ	44
KAYNAKLAR	46
EKLER	51
ÖZGEÇMİŞ	61

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Numunelerde hidroksiprolin analiz sonuçları	ix
Table 1. Results of hidroxyproline analysis in samples	xi
Tablo 2.1. Kolajen tipleri.....	9
Tablo 2.2. HPLC ile hidroksiprolin analizi.....	16
Tablo 3.1. HPLC’de denenen çalışma koşulları	27
Tablo 3.2. HPLC ile hidroksiprolin analizinde çalışma koşulları.....	27
Tablo 4.1. HPLC ile ön çalışma sonuçları.....	29
Tablo 4.2. HPLC yöntemi ile elde edilen hidroksiprolin miktarları	31
Tablo 4.3. HPLC ile analiz sonuçlarının standart sapma, % geri kazanım değerleri ve % varyasyon katsayıları	32
Tablo 4.4. Kolorimetrik yöntem ile elde edilen hidroksiprolin miktarları.....	36
Tablo 4.5. Kolorimetrik yöntem ile analiz sonuçlarının standart sapma, geri kazanım değerleri ve % varyasyon katsayıları.....	36
Tablo B.1. Salam numunesinin analizinde kullanılan iki farklı metot için t-testi sonuçları	59
Tablo B.2. Sosis numunesinin analizinde kullanılan iki farklı metot için t-testi sonuçları	59
Tablo B.3. Sucuk numunesinin analizinde kullanılan iki farklı metot için t-testi sonuçları	59
Tablo B.4. Salam numunesinin analizinde kullanılan metotlar için regresyon varyans analiz tablosu	60
Tablo B.5. Sosis numunesinin analizinde kullanılan metotlar için regresyon varyans analiz tablosu	60
Tablo B.6. Sucuk numunesinin analizinde kullanılan metotlar için regresyon varyans analiz tablosu	60

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. : Salam üretimi akış şeması	5
Şekil 2.2. : Kas bağ dokusu.....	7
Şekil 2.3. : Tropokolajen molekülü.....	7
Şekil 2.4. : Kolajen yapısı.....	8
Şekil 2.5. : PITC ile amino asit türetme reaksiyonu.....	18
Şekil 2.6. : OPA ile amino asit türetme reaksiyonu.....	19
Şekil 2.7. : FMOC ile amino asit türetme reaksiyonu.....	20
Şekil 3.1. : Türevlendirme işlemi.....	25
Şekil 4.1. : Hidroksiprolin standart kromatogramı (10 ppm).....	30
Şekil 4.2. : Hidroksiprolin için HPLC kalibrasyon eğrisi.....	31
Şekil 4.3. : HPLC yönteminde % geri kazanım değerlerinin değişimi	33
Şekil 4.4. : HPLC yönteminde varyasyon katsayısının değişimi.....	34
Şekil 4.5. : Hidroksiprolin için kolorimetrik yöntem kalibrasyon eğrisi.....	35
Şekil 4.6. : Kolorimetrik yöntem % geri kazanım değerlerinin değişimi....	37
Şekil 4.7. : Kolorimetrik yöntemde varyasyon katsayısının değişimi.....	37
Şekil 4.8. : Salam numunesinde varyasyon katsayısının her iki yöntemde değişimi.....	38
Şekil 4.9. : Sosis numunesinde varyasyon katsayısının her iki yöntemde değişimi.....	39
Şekil 4.10. : Sucuk numunesinde varyasyon katsayısının her iki yöntemde değişimi.....	39
Şekil 4.11. : Salam numunesinde geri kazanım değerlerinin her iki yöntemde değişimi	40
Şekil 4.12. : Sosis numunesinde geri kazanım değerlerinin her iki yöntemde değişimi	40
Şekil 4.13. : Sucuk numunesinde geri kazanım değerlerinin her iki yöntemde değişimi	41
Şekil 4.14. : Salam numunesinde kolorimetri-HPLC regrasyon eğrisi.....	42
Şekil 4.15. : Sosis numunesinde kolorimetri-HPLC regrasyon eğrisi.....	42
Şekil 4.16. : Sucuk numunesinde kolorimetri-HPLC regrasyon eğrisi.....	42
Şekil A.1. : 1 nolu salam numunesinin HPLC kromatogramı.....	51
Şekil A.2. : 2 nolu salam numunesinin HPLC kromatogramı.....	52
Şekil A.3. : 3 nolu salam numunesinin HPLC kromatogramı.....	52
Şekil A.4. : 4 nolu salam numunesinin HPLC kromatogramı.....	53
Şekil A.5. : 5 nolu salam numunesinin HPLC kromatogramı.....	53
Şekil A.6. : 1 nolu sosis numunesinin HPLC kromatogramı.....	54
Şekil A.7. : 2 nolu sosis numunesinin HPLC kromatogramı.....	54
Şekil A.8. : 1 nolu sucuk numunesinin HPLC kromatogramı.....	55
Şekil A.9. : 2 nolu sucuk numunesinin HPLC kromatogramı.....	55
Şekil A.10. : 3 nolu sucuk numunesinin HPLC kromatogramı.....	56

Şekil A.11.	: % 0.050 düzeyinde hidroksiprolin aşıl原因an salam numunesinin HPLC kromatogramı.....	56
Şekil A.12.	: % 0.200 düzeyinde hidroksiprolin aşıl原因an salam numunesinin HPLC kromatogramı.....	57
Şekil A.13.	: % 0.050 düzeyinde hidroksiprolin aşıl原因an sosisnumunesinin HPLC kromatogramı.....	57
Şekil A.14.	: % 0.05 düzeyinde hidroksiprolin aşıl原因an sosis numunesinin HPLC kromatogramı.....	58
Şekil A.15.	: % 0.05 düzeyde hidrokisprolin aşıl原因an sosis numunesinin HPLC kromatogramı.....	58

ET ÜRÜNLERİNDE HİDROKSİPROLİN TAYİNİ METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

ÖZET

Et elzem amino asitleri, anorganik maddeleri ve vitaminleri içeren insan beslenmesinde önemli olan bir besin maddesidir. Et kalitesi beslenme ve yeme kalitesi olarak ikiye ayrılır. Yeme kalitesinde aroma, yumuşaklık ve renk önemli parametrelerdir. Et bağ doku proteinlerini içerir. Bağ doku proteinleri etin yumuşaklığını azaltır. Kolajen bağ dokuda en çok bulunan proteindir. İşlenmiş et ürünleri üretiminde kolajen miktarı fazla et kullanıldığında son üründe istenmeyen jelatin oluşumu, taneli ve kırılgan yapı meydana gelir. Bağ dokuda esansiyel amino asit miktarı az olduğundan ayrıca ürünün beslenme değeri azalmaktadır.

Kolajen yüksek miktarda hidroksiprolin amino asitini içermektedir. Kolajen analizinde hidroksiprolin tayininden yararlanılmaktadır. Asit hidrolizinden sonra kolorimetrik veya kromatografik yöntemler ile tayin yapılabilir. Hidroksiprolin tayininde kolorimetrik yöntemler en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Son yıllarda HPLC ekipmanlarında hızlı gelişmeler meydana gelmiş ve amino asit analizlerinde HPLC tekniklerine yönelme olmuştur.

Çalışmada Türk tipi sucuk, salam ve sosiste hidroksiprolin analizleri kolorimetrik ve HPLC tayin yöntemleri ile yapılmıştır. İki yöntem doğruluk, kesinlik, basitlik, süre ve kullanım kolaylığı açısından incelenmiş ve metotlar arası ilişkiler saptanmıştır.

Her iki yöntem ile analizlenen numunelerden elde edilen veriler Tablo 1’de verilmiştir.

Çalışmada kullanılan metotların doğruluğu ve kesinliğini ölçebilmek amacıyla, birer numuneye numunelerde %0.050 ve %0.200 düzeyleri elde edilecek şekilde standart hidroksiprolin çalışma çözeltisinden ilave edilmiştir. HPLC yönteminde % geri kazanım değerleri salam numunesi için % 24.5-41.3, sosis numunesi için %35.5-43.9 ve sucuk numunesi için %22.7 iken kolorimetrik yöntemde % geri kazanım değerleri ise salam için %99.8-101.9, sosis için %99.7-102 ve sucuk için % 84.9-86.6 aralığında olmuştur. Varyasyon katsayıları salam numunesinde HPLC yöntemi ile %34.4-34.8 ve kolorimetrik yöntem ile %1.69-6.91, sosis numunesinde HPLC yöntemi ile %10.9-25.5, kolorimetrik yöntem ile %0.57-1.13, sucuk numunesinde HPLC yöntemi ile %13.3, kolorimetrik yöntem ile %1.33-7.85 aralığında değişme göstermiştir.

Tablo 1. Numunelerde hidroksiprolin analiz sonuçları.

NUMUNE	% HİDROKSİPROLİN ^a	
	HPLC YÖNTEMİ	KOLORİMETRİK YÖNTEM
SALAM No. 1	0.198±0.038	0.259±0.031
SALAM No. 2	0.119±0.022	0.151±0.018
SALAM No. 3	0.166±0.012	0.169±0.010
SALAM No. 4	0.138±0.012	0.401±0.048
SALAM No. 5	0.045±0.017	0.110±0.010
SALAM No. 6	ND	0.085±0.001
SOSİS No. 1	0.108±0.016	0.218±0.007
SOSİS No. 2	0.062±0.011	0.192±0.005
SOSİS No. 3	ND	0.132±0.003
SUCUK No.1	0.061±0.005	0.207±0.007
SUCUK No.2	0.065±0.003	0.264±0.032
SUCUK No. 3	0.072±0.005	0.383±0.044

^a Sonuçlar 2 tekrarın ortalamasıdır.

Her iki analiz metodu ile elde edilen sonuçlar salam, sosis ve sucuk numuneleri için istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı bulunmuştur. Numunelerde HPLC ve kolorimetrik yöntem verileri arasında basit lineer regresyon analizi uygulanmış ve regresyon varyans analiz sonuçları metotlar arası ilişkilerin istatistiksel olarak önemsiz olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde kolorimetrik yöntem HPLC yöntemine göre doğruluk ve kesinlik açısından daha üstün bulunmuştur. HPLC yöntemi kolorimetrik yöntemine göre kullanım kolaylığı açısından daha üstündür.

COMPARISON OF HYDROXYPROLINE DETERMINATION METHODS IN MEAT PRODUCTS

SUMMARY

As meat consists of essential amino acids, inorganic substances and vitamins, it is an important foodstuff for human nutrition. There are two major aspects of meat quality; nutritional quality and eating quality. Flavor, tenderness and colour are important parameters of eating quality. Meat consists of connective tissue proteins, which decrease tenderness of meat. Collagen is the most common protein found in connective tissue. For the manufacture of processed-meat products, meat with high levels of collagen can result in detrimental effects on end-product quality, such as gelatin formation, grainy and brittle texture, which are all undesirable. The nutritive value of the product decreases as connective tissue is deficient in essential amino acids.

Collagen consists of high levels of hydroxyproline amino acid. Therefore, determination of hydroxyproline is generally accepted as a method of collagen analysis. After hydrolyzing with acid, 4-hydroxyproline content can be determined using chromatographic or colorimetric techniques. Colorimetric procedures are the most commonly preferred methods for hydroxyproline analysis. By the development of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) equipments in recent years, there is an increasing trend for analyzing amino acids with those instruments.

Hydroxyproline analysis in Turkish fermented soudjouk, salami and sausage samples were carried out both by HPLC and colorimetric procedures. Methods were evaluated by means of accuracy, precision, simplicity, time and ease of use, and correlations between the two methods were determined as well.

Results of the HPLC and colorimetric methods for sausage, salami and soudjouk samples are given in Table 1.

In order to determine the accuracy and precision of methods performed, one sample from each foodstuff was spiked at 0.050 % and 0.200 % levels with standard hydroxyproline solution. Percentage recovery for HPLC analysis of; salami was found to be between 35.5-43.9 %, sausage was found to be between 24.5-41.3 % and soudjouk was found to be 22.7 %. Recovery values for colorimetric analysis of salami, sausage and soudjouk samples were 99.8-101.9 %, 99.7-102 % and 84.9-86.6 %, respectively. Coefficient of variation values for HPLC analysis of salami was in the range of 34.4-34.8 %, sausage was in the range of 10.9-25.5, and soudjouk was 13.3 %. For colorimetric method, coefficient of variations were found to be 1.69-6.91 % for salami, 1.33-7.85 % for sausage, and 13.3 % for soudjouk samples.

Table 1. The results of hydroxyproline analysis for samples.

SAMPLE	% HYDROXYPROLINE	
	HPLC METHOD	COLORIMETRIC METHOD
SALAMI 1	0.198±0.038	0.259±0.031
SALAMI 2	0.119±0.022	0.151±0.018
SALAMI 3	0.166±0.012	0.169±0.010
SALAMI 4	0.138±0.012	0.401±0.048
SALAMI 5	0.045±0.017	0.110±0.010
SALAMI 6	ND	0.085±0.001
SAUSAGE 1	0.108±0.016	0.218±0.007
SAUSAGE 2	0.062±0.011	0.192±0.005
SAUSAGE 3	ND	0.132±0.003
SOUDJOUK 1	0.061±0.005	0.207±0.007
SOUDJOUK 2	0.065±0.003	0.264±0.032
SOUDJOUK 3	0.072±0.005	0.383±0.044

Statistical evaluation of data shows that there is a significant difference between the two analytical methods, for soudjouk and sausage, salami ($P < 0,05$). A simple linear regression analysis was performed between the results obtained from the methods for each sample. The regression analysis between methods for each of the samples showed statistically no significance.

Results showed that; accuracy and precision of colorimetric method is superior to that of HPLC method, while HPLC method's simplicity and ease of use is superior to that of colorimetric procedure.

1. GİRİŞ

Et biyolojik değeri yüksek hayvansal proteinleri, anorganik maddeleri (Fe, Zn) ve vitaminleri (A, B) içermektedir Et taze olarak tüketilebildiği gibi işlenerek de tüketilmektedir. Et ve işlenmiş et ürünlerinin diyetle en önemli katkısı protein kaynağı olmasıdır (Anon., 2001a).

Et miyofibril, sarkoplazmik ve bağ doku proteinlerini içermektedir. Bağ doku proteinleri çözünür olmayan et kalitesini etkileyen proteinler olup, et yumuşaklığının, etin emülsifiye kapasitesinin, su tutma kapasitesinin ve besleyici değerin azalmasına neden olur (Zayas, 1997).

Etin içerdiği bağ doku, et ürünlerinin üretimi esnasında ingrediyent olarak ilave edilebilir. Bağ doku elzem amino asitleri az miktarda içermesi nedeniyle ürünün beslenme değeri azaltmaktadır. Et ürünlerinde bağ doku miktarı fazla olduğunda son ürün kalitesi bozulmakta, taneli ve kırılkan yapı meydana gelmektedir. Ayrıca bağ doku ilavesiyle ürünün fiyatı düşmektedir. Kaliteli et ürünü eldesi ve haksız rekabetin önlenmesi için et ürünlerinde bağ doku miktarı tespiti önemlidir (Johnson, 1988; Wold ve diğ., 1999).

Kolajen en önemli bağ doku proteindir. Et ürünlerindeki en önemli işlevi şekil verme ve doku deformasyonunu önlemesidir. Et sertliğinde önemli rolü olan kolajen tropokolajen moleküllerinden meydana gelir. Tropokolajen üç polipeptid zincirinin heliks şeklinde birleşmesiyle oluşur. Polipeptid aminoasitlerinin % 23'ü prolin ve hidroksiprolindir. Hidroksiprolinin diğer vücut proteinlerinde nadir bulunması nedeniyle, et ve et ürünlerinde kolajen veya bağ doku içeriği ölçümünde hidroksiprolinden yararlanılabilir (Eskin, 1990; Cassens, 1994).

Hidroksiprolin tayininde kimyasal metotlar kullanılmaktadır. Kimyasal metotlar kolorimetrik ve kromatografik metotlar olmak üzere ikiye ayrılır (Kolar, 1990). Kolorimetrik yöntemde örnek asit ile ısıtılarak protein parçalanır ve protein hidrolizatı kloramin T ile reaksiyona sokulur. Hidroksiprolin-kloramin T reaksiyonu ile oluşan pirolun dimetilaminobenzaldehit ile reaksiyonu sonucu renkli bileşik

meydana gelir. Bu renkli bileşimin absorbanası ölçülerek, hidroksiprolin miktarı tahminlenir (Jones ve diğ., 1986).

Kromatografik yöntemler arasında iyon değiş-tokuş kromatografisinden amino asit analizinde yararlanılmıştır. İyon değiş-tokuş kromatografisi güvenilir bir yöntem olmasına karşın, analiz süresi uzun ve duyarlılığı düşüktür. Son yıllarda ise HPLC (High Performance Liquid Chromatography) cihazlarındaki hızlı gelişmeler sonucu, amino asit analizlerinde bu tekniklere yönelme olmuştur (Haynes ve diğ., 1991). HPLC tekniğinde protein hidrolizati türevlendirildikten sonra cihaza enjekte edilir ve pik alanı veya pik yüksekliği temel alınarak hidroksiprolin miktarı bulunur (Smith ve Judge, 1991).

Et ürünleri üretimde kullanılan hammaddenin içerdiği veya formülasyona ilave edilen bağ doku miktarı ürünün işleme özelliklerini, besleyici değerini ve fiyatını etkilediğinden son ürün için sınır değerler belirlenmiştir. Türk Standartları salam, sucuk ve sosis için bulunabilecek en yüksek hidroksiprolin miktarını 225 mg/100 g olarak belirlemiştir (Anon., 1992).

Bu çalışmanın amacı, Türk tipi sucuk, salam ve sosis numunelerinde hidroksiprolin tayininde HPLC ve kolorimetrik yöntemlerinin performansı ve uygunluğunun karşılaştırılması ve rutin analiz yöntemi olarak kullanılabilmesi için hız, basitlik, doğruluk ve tekrar edilebilirlik özellikleri dikkate alınarak değerlendirilmesidir.

Çalışma, giriş, bağ doku ve önemini, hidroksiprolin analiz yöntemlerini içeren literatür özeti, kullanılan materyal ve metotlar, elde edilen bulgular, sonuçlar, kaynaklar listesi ve ekleri içermektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Sucuk

Sağlıklı kasaplık hayvan gövde etleri ve/veya manda etlerinden hazırlanan sucuk hamurunun, doğal veya yapay kılıflara doldurulması ve bir süre bekletilerek olgunlaştırılmasıyla elde edilen et ürünüdür. Sucuk hamuru, etlerin, et ve yağdan başka diğer unsurlarından ayıklandıktan ve çeşitli iriliklerde doğranıp içine yöresel alışkanlıklara göre aroma, kıvam ve lezzet verici maddeler ve izin verilen diğer katkı maddelerinden uygun bulunanların katılarak meydana gelen harmanın, gerektiğinde gövde ve kuyruk yağı konulduktan sonra kıyılması ile elde edilen karışımdır (Anon., 1983).

Sucuk üretiminde 4 kademe vardır (Girard, 1992; Varnam ve Sutherland, 1995) :

- Hamur hazırlama: Soğuk et, kuşbaşı doğranarak üzerine kürleme tuzları ve baharatlar eklenir. Karışım kıyma makinesinden geçirilir.
- Doldurma: Doğal veya yapay kılıflardan oluşan dolgu materyallerine doldurulur.
- Fermantasyon: Ürüne kendine özgü lezzeti kazandıran ve dayanıklılığı sağlayan aşamadır. Fermentasyon sırasında proteinler ve lipitler parçalanır. Bu değişimler üründe doku oluşumu, lezzet gelişimi, renk oluşumu ve ürünün kesilebilirlik niteliğini geliştirmektedir. Başlıca ürün laktik asittir. Fermentasyon sıcaklığı 10-38 °C olur.
- Kurutma: Fermentasyon devam ederken kurutma başlar. Normal koşullarda olgunlaştırmada, sucuk 16-20 °C’de 7 gün bekletilir. Hızlı olgunlaştırmada ise 60 °C’de 3-8 saat ısıtma uygulanır.

2.2. Salam

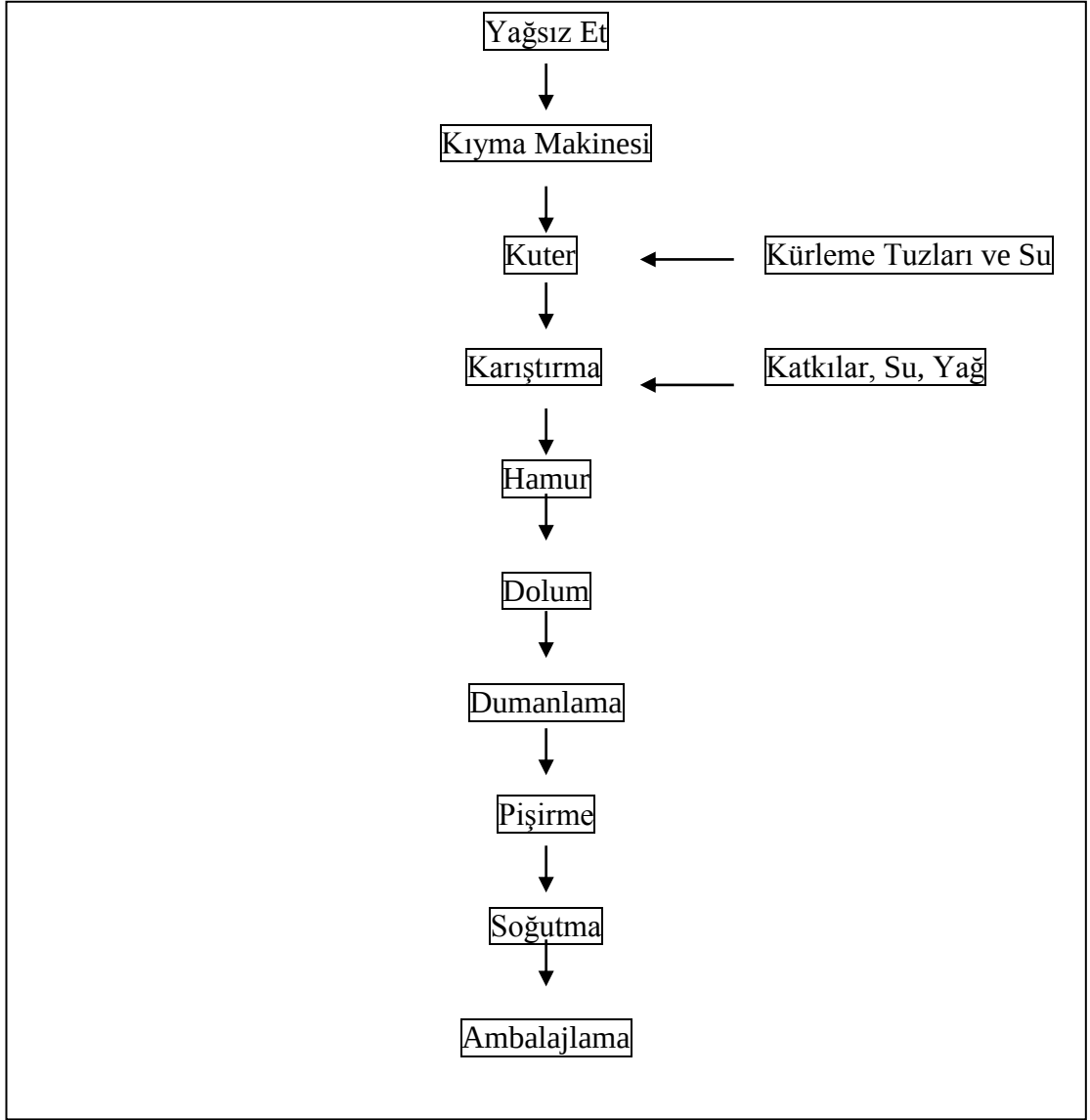
Kemik, tendo, kıkırdak, lenf yumrusu; büyük sinirlerinden ve kısmen yağlarından ayrılmış sadece sığır gövde eti veya bu ete yukarıda belirtilen işlem uygulanmış manda ve diğer kasaplık hayvan gövde etlerinden, bir veya birkaçının belirli oranlarda katılması ile hazırlanan kıymaya, gerekli baharat ve katkı maddeleri ilave edildikten sonra etin su ve yağı ile emülsiyon makinası veya kuterde emülsiyon haline getirilmesi ve gerektiğinde çeşidine göre çeşni maddeleri ile kuyruk ve gövde yağlarının da katılıp karıştırılmasıyla elde edilen salam hamurunun, tabii veya suni kılıflara doldurulması, dumanlanması, buhar veya suda haşlanması ile üretilen mamul gıdadır (Anon., 1992).

Salam et emülsiyonudur; diğer bir ifade ile birbiri içinde tam karışmayan iki sıvının kabaca karışımıdır. Et proteinleri salamı emülsiye ederken, stabiliteyi de sağlar. Emülsiyonun kesikli fazını yağ partikülleri, devamlı fazını ise su ve suda erimiş proteinler oluşturmaktadır. İyi bir et emülsiyonunda yağ globüllerinin tamamı suda erimiş proteinlerle çevrelenmiş olmalı ve serbest yağ globülleri bulunmamalıdır. Salam üretiminin akış şeması Şekil 2.1.'de verilmiştir (Varnam ve Sutherland, 1995; Kılıç, 1997).

Salam üretiminde kuru pişirme (tütsüleme odasında) tercih edilir. Pişirme kabinde ürünler yavaş yavaş alttan pişirilir. 50-60 °C'de işleme başlanır ve 75-80 °C'de işleme son verilir. Sıcaklık artışı 2 kademeli olup, saatte bir sıcaklık 10 °C artacak şekilde ayarlanır (Girard, 1992; Varnam ve Sutherland, 1995).

2.3. Sosis

Kasaplık hayvan gövde etleri ve/veya manda etlerinden veya bunların karışımlarından hazırlanan sosis hamurunun, kılıflara doldurulması ve belirli aralıklarla boğumlanarak dizi şekline sokulması, usulüne göre dumanlanması ve haşlanması ile elde edilen et mamulüdür. Sosis hamuru, sosis yapımında kullanılan etlerin veya bunların karışımlarının kıyılması ve yardımcı maddelerle homojen hale gelinceye kadar karıştırılmasıyla elde edilen et hamurudur (Anon., 1984).



Şekil 2.1. Salam üretimi akış şeması (Kılıç, 1997).

Sosis, salam gibi bir et emülsiyonudur. Salam ve sosiste aynı hamur karışımı kullanılmaktadır. Farklılıkları ise; katkı maddeleri, kuterleme süresi, hamura parça et katılıp katılmaması, katılan yağın yedirilmesi, iri parçalar halinde bırakılması ve doldurulan kılıfın yapı ve boyutlarıdır (Kılıç, 1997).

Tuz teknolojik olarak katılması gerekli katkıdır. Proteinleri çözer, ürüne lezzet kazandırır ve mikrobiyal korumayı sağlar. Nitrat ve nitrit tuzları parlak kırmızı et rengini kazandırır (Girard, 1992; Varnam ve Sutherland, 1995).

Pişirme işlemi, proteinleri kısmen denatüre ederek şekil kazandırmak, üründe kürlenmiş et rengini oluşturmak ve ürünü pastörize etmek için uygulanır. Sosis

retiminde haşlama işlemi uygulanır. rn 75-80 °C suya konularak, merkez sıcaklığı 75°C'ye ulaşana kadar bırakılır (Girard, 1992; Varnam ve Sutherland, 1995).

Dolum için doğal veya yapay kılıflar kullanılabilir. Doğal kılıf olarak sosislerde koyun ince bağırsağı ve salamlarda ise sığır ince bağırsağı kullanılmaktadır. Yapay kılıflar selulozik olup pişirmeye dayanıklıdır ve yaklaşık %65 kolajen içerir. Yapay kılıflar istenen çapta imal edilebilir ve çeşitli ürünler için uygundur. Yapay kılıflara etiket basılabilir ve renkli olabilirler (Girard, 1992; Walls ve diğ., 1993; Varnam ve Sutherland, 1995).

2.4. Bağ Doku

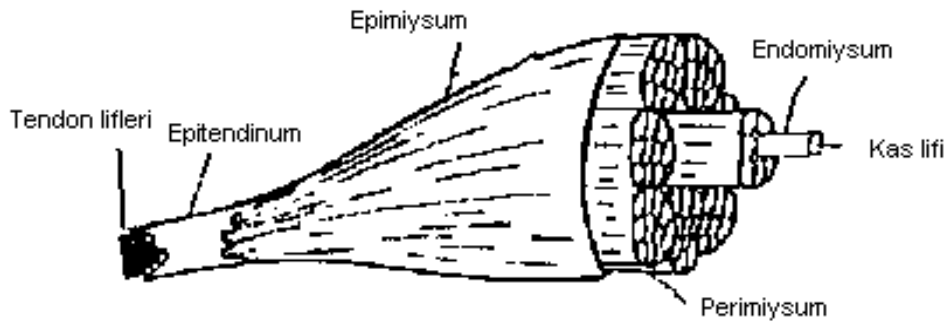
Kas proteinleri; miyofibril, sarkoplazmik ve bağ doku proteinleri olmak üzere üç sınıfa ayrılır. Bağ doku proteinleri vücutta; kıkırdak, kiriş, kemik matriksi ve idrar yollarında bulunmaktadır. Kolajen ve elastin proteinlerini içeren bağ doku, kas hücreleri arasındaki boşluğu doldurur. Bağ doku proteinleri kas boyunca yayılır; hücreleri birarada tutar; hücresel iskelet sağlar; ve genel şekile katkıda bulunur. Hücre dışı çözünmeyen lifin meydana gelmesi, bağ dokunun mekaniksel ve destekleyici özelliğidir. Bağ doku proteinleri çözünür değildir, dolayısıyla kas sertliğini etkiler. Bağ dokuda en fazla miktarda kolajen proteini bulunur. Elastin elastik yapıda olduğundan dokuda esneklik sağlar. Hücre dışı matriksin ana komponenti protoglikan olup; fibronektin hücre dışında az miktarda bulunan proteindir (Smith, 1983; Cassens, 1994).

Bağ doku proteinleri çözünür olmayan et kalitesini etkileyen proteinlerdir. (Zayas, 1997). Bu etkiler aşağıdaki şekildedir;

- Et yumuşaklığını azaltır, etkisi protein miktarına ve çapraz bağ sayısına bağlıdır.
- znr olmadığından etin emülsifiye etme kapasitesini azaltır.
- Hidrofilik iyon taşıyan amino asit içeriği az olduğundan, etin su tutma kapasitesini azaltır.
- Etin besleyici değerini azaltır.

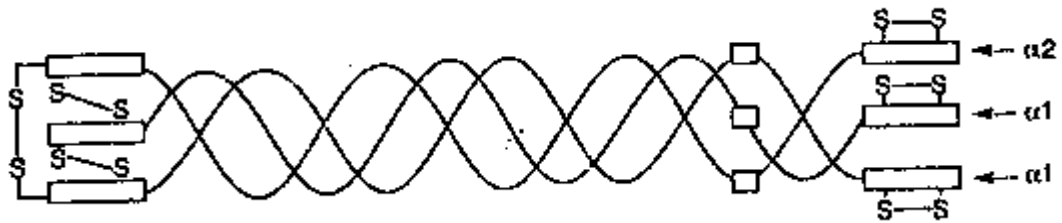
2.4.1. Kolajen

Vücutta en çok bulunan proteindir. Başlıca kemik, deri, kiriş ve kasta bulunur. Yağsız kuru kas kütleinin %1-9'u kolajendir. Lif ağı şeklindeki yapısı nedeniyle canlı kasta dokuya zarar verecek uzamalara karşı direnç gösterir. Kolajen yapısı morfolojik olarak üçe ayrılır. Endomiyum; lifleri çevreler, perimiyum; lif yığınlarını çevreler ve epimiyum; kası çevreler. Kastaki bağ doku Şekil 2.2.'de verilmiştir (Etherington ve Sims, 1981; Smith, 1983).



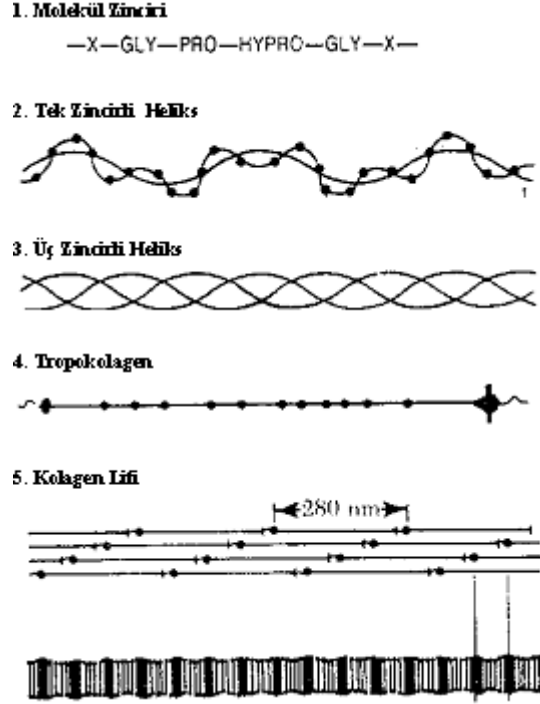
Şekil 2.2 . Kas bağ dokusu (Etherington ve Sims, 1981).

Bağ dokunun ana proteini kolajendir. Kolajen, üçlü sarmal yapıda iki polipeptid zincirinden (α_1 - α_2) oluşur. Bu şekilde oluşan amino asit kompozisyonu farklı olan en az 10 farklı zincir bilinmektedir ve farklı zincirler farklı tip kolajen oluşumuna yol açar. Primer yapı ve amino asit kompozisyonu farklıdır. Kolajenin alt ünitesi, monomer tropokolajen monomeridir. Tropokolajen birbiri üzerine katlanan üç α -zinciri içerir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Tropokolajen molekülü (Eskin, 1990).

Tropokolajen 1.5 μm çapında , 300 μm uzunluğunda ve 300.000 dalton ağırlığındadır. Tropokolajen molekülleri birbirlerine çapraz bağlar ile bağlanmaktadır. Kolajenin yapısı Şekil 2.4.'te verilmiştir (Etherington ve Sim, 1981; Anon., 2001b).



Şekil 2. 4. Kolajen yapısı (Lawrie, 1991).

Polipeptid zinciri tekrar eden bir dizilişe sahiptir. Diziliş glisin-prolin-hidroksiprolin-prolin-diğer bir amino asit şeklinededir.   zincirin birinde diğer ikisinden farklı amino asit kompozisyonu vardır; bu iki tip zincire α_1 ve α_2 adı verilmektedir. Bugüne kadar 10 farklı kolajen izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Her tip kolajende polipeptid zincirinin benzersiz amino asit dizilişi vardır ve farklı karbondhidrat molekülleri içerir. (Lawrie, 1991).

Kolajen tiplerinin dokulara göre dağılımı Tablo 2.1.'de verilmiştir. Kolajenin yapısındaki farklılıklar, polipeptid zincirlerinin farklı dizilişinden kaynaklanır. Her zincirin dizilişi ayrı bir gen tarafından kontrol edilir. Farklı alt ünitelerinin kombinasyonu ile 6 tip kolajen meydana gelir; her tip üç alt ünite, bazıları   benzer alt ünite ve diğerleri iki veya üç farklı alt ünite içerir (Smith, 1983). Bağ doku tipleri arasındaki fark kolajen tipiyle ilişkilidir. 4 tip kolajenin kas dokusunda önemli olduğuna inanılmaktadır. Tip 1 ve 3 kolajen epimisyal, perimisyal ve endomisyal bağ

dokuda bulunur. Epimisyum çoğunlukla Tip 1 kolajen, perimisyum ise çoğunlukla Tip 3 kolajen içerir (Eskin, 1990).

Tablo 2.1. Kolajen Tipleri (Smith, 1983).

TİP	ALT ÜNİTE	DOKUSAL DAĞILIM
1 ve 1 trimmer	α_1, α_2	Deri, kemik, kiriş, kan hücreleri
2	α_1	Kıkırdak
3	α_1	Kan hücreleri
4	α_1, α_2	Membran, kan hücreleri
5	$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$	Membran

Kolajen bağ dokunun ana komponenti olduğundan, et yapısını etkiler. Kabul edilebilir et yapısı kolajenin çapraz bağ sayısı ile ilişkilidir. Bağ sayısı az veya çok ise, et çok yumuşak veya çok sert olmaktadır. Yaşlı hayvanların etinin sertliği kolajen liflerindeki çapraz bağ sayısının fazla olmasından kaynaklanmaktadır (Eskin, 1990; Lawrie, 1991; Budras ve Katsaras, 1992).

Polipeptid zincirinde her üçüncü pozisyonda glisin bulunur. Kolajen % 35 glisin, % 11 alanin ve %23 prolin içerir. Prolinin yaklaşık yarısına hidroksil grubu (hidroksiprolin) bağlanmıştır. Kolajenin hidroksiprolin içeriği (%12,5) benzersiz bir özellik kazandırmaktadır (Etherington ve Sims, 1981; Anon., 2001c).

Kolajen lifleri floresans özellik gösterir. UV dalga boylarında radyasyona maruz kaldığında beyaz-mavi ışık yayar (335-370 nm’de uyarma, 385-440 nm’de ölçüm). Kolajenin floresans özelliğinin yaş ile artış göstermesi nedeniyle hayvanın yaşının tespitinde güvenilir göstergedir. Yaş-floresans ilişkisinin çapraz bağ ve polimerizasyonla ilgili olduğu sanılmaktadır. Moleküler seviyede floresans anlaşılmamakta, ancak farklı çapraz bağlarda gözlenmektedir (Swatland, 1989; Swatland, 1994; Swatland ve diğ., 1996; Wold ve diğ., 1999).

2.4.2. Bağ Doku ve Et Sertliği Arasındaki İlişki

Genç hayvanlarda epimisyum ısıya dayanıksız bağlar içerirken, perimisyum hem ısıya dayanıklı hem de dayanıksız ve endomisyum ise ısıya dayanıklı bağlar içermektedir. Hayvanın yaşı arttıkça ısıya dayanıksız bağların ısıya dayanıklı bağlara dönüşümü de artar. Isıya dayanıklı-dayanıksız bağ oranı pişmiş et yapısında önemlidir (Bracho ve Haard, 1990; Bailey ve diğ., 1996).

Hayvan yaşı arttıkça yumuşaklık azalmaktadır. Genç hayvanlarda bağ doku zayıf bağlara sahip olduğundan yumuşaktır. Onsekiz aydan daha yaşlı hayvanlarda yumuşaklık azalmaktadır. Yaş arttıkça tuz ve asitte çözünen kolajen oranı azalır. Kolajenin polipeptid zincirleri arasındaki çapraz bağ sayısında azalma olur. Ayrıca yaş arttıkça kolajenin ısı ile çözünürlüğü azalmaktadır. Alkalide çözünmeyen protein fraksiyonlarındaki hidroksiprolin ve yumuşaklık arasında ters ilişki vardır. Kas içi bağ doku fizyolojik yaş ile artmaz, fakat yaşla kas içi bağ dokusunun kompozisyonu ve özellikle kovalent çapraz bağ değişmektedir. Çözünmüş kolajen ve yumuşaklık arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada yaşlı ve genç hayvan etleri arasında %10 fark bulunmuştur (Lawrie, 1991; Anon., 2001d). Ayrıca hayvan hızlı geliyorsa bağ doku miktarı azdır ve et daha yumuşaktır (Hunter ve diğ., 1998).

Bağ doku kalitesi ve miktarı hayvan beslenmesiyle değiştirilebilir. Beslenme faktörleri (yüksek karbonhidratlı diyet, glikoz yerine fruktoz ve düşük protein) ve kesim öncesi beslenmedeki sınırlamalar, dayanıklı çapraz bağ oranını azaltır. Kolajenin dönüşüm oranı %10'dur. Dönüşüm süresi kolajenin lif çapıyla ters ilişkilidir. Kesim sonrası kolajenin et sertliğine olumlu etkisi vardır (Anon., 2001d).

Olgunlaşma et dokusunu etkileyen en önemli faktördür. Rigor mortis esnasında sertlik kas yapısının proteolizine bağlıdır. Kas tipi, teknolojik faktörler, hayvan yaşı ve cinsi, olgunlaşma hızı ve boyutunu etkiler. Miyofibriler proteinlerin çözünürlüğü artar. Uzun süre olgunlaştırma (2-4 hafta) ile yumuşamada bağ doku etkisi vardır (Takahshi ve diğ., 1995; Feidt ve diğ., 1996). Bağ dokunun içerdiği elastin ve kolajen çözünmüş hidroksiprolin olmaması nedeniyle olgunlaşma sırasında denatüre olmaz. Bağ doku proteinleri proteolize uğramamasına karşın, çapraz bağlar lizozomal enzimler tarafından parçalanmaktadır (Lawrie, 1991).

Kolajen ısıtılırsa jelatine dönüşür. Uzun süre ısıtma ile kolajen jelatine dönüşerek yumuşama meydana gelir (Zayas ve Naewbanu, 1986). Kolajenin çözünürlüğü, pişmiş etin çözünür ve çözünmeyen fraksiyonlarının hidrolizatlarının hidroksiprolin konsantrasyonu ölçülerek tahminlenebilir. Kolajenin çözünürlüğü post-mortem enjeksiyon (enzim ilavesi) ile az miktarda artmaktadır. Pişme sonrası çözünür formda toplam kolajen miktarı artış gösterir. Kolajenin çözünürlüğünün artması et yumuşaklığını ve yapıyı geliştirir. Elastin çözünür değildir ve enzimlere karşı dirençlidir. Ancak düşük miktarda bulunması nedeniyle (< %1) et sertliğinde önemli

rol oynamaz (Zayas, 1997). Etin yapısı ve kalitesi açısından kolajen içeriği önemlidir. Diğer memeli proteinlerine göre kolajen yüksek miktarda hidroksiprolin içermektedir. Kolajen tespitinde hidroksiprolin tayini yaygın kabul görmüş bir metottur (Kolar, 1990).

2.5. Hidroksiprolin Analizi

Kolajenin yüksek miktarda hidroksiprolin içermesi nedeniyle bağ doku tespitinde hidroksiprolin tayini yaygın olarak kabul edilmiştir (Bergman ve Loxley, 1963; Berg, 1982; Jones, 1985; Anon., 1987; Asworth, 1987a; Johnson, 1988; Kolar, 1990; Oh ve Grobklaus, 1995).

Hidroksiprolin tayininde histolojik, fiziksel (NMR) ve kimyasal metotlar kullanılmaktadır. NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) rutin analizlere adapte edilemediğinden rutin analizlerde tercih edilmemektedir. Kolorimetrik yöntemler en yaygın kullanılan kimyasal metotlardır. Kromatografik yöntemler ise kolorimetrik yöntemlere alternatif diğer kimyasal metotlardır (Etherington ve Sims, 1981; Cserhati ve Forgacs, 1999).

2.5.1. Histolojik Yöntemler

Histolojik metotta, et mikroskop altında incelenir. Boyanmış dokuların renk ve yapısındaki farklılıklardan yararlanarak dokuların bağıl alanı hesaplanır. Fraksiyonların bağıl alanı, bağıl hacimle orantılıdır. Ön işlemlerden geçirilmiş et (0.5*2*2.5 cm) anilin- blue orange II solüsyonu ile boyandığında çizgili kas sarımsı, kahverengi, kolajenli bağ doku ise mavi renk göstermektedir (Bijker ve Koolmees, 1985).

2.5.2. Fiziksel Yöntemler

Bağ doku proteinlerinin, UV ışıktaki floresans veren liflerden oluşması nedeniyle optik prob kullanarak ette bağ doku dağılımı tespit edilebilir ve yayılan floresans ölçülerek kolajen miktarı tayin edilebilir (Swatland, 1989; Swatland, 1994; Swatland ve diğ., 1996).

Bağ dokunun floresans verme özelliği ticari et ürünlerinde bağ doku içeriğinin ölçülmesinde kullanılabilir. Ayrıca floresans emisyon spektrası ve bağ doku lifleri çapı arasında ilişki tespit edilmiştir (Swatland, 1994 ve Swatland ve diğ., 1996).

2.5.3. Kolorimetrik Yöntemler

Kolorimetrik yöntemler hidroliz; oksidasyon, renk gelişimi ve absorbands ölçümü olmak üzere 4 aşamadan oluşur. Örnek asit ile ısıtılarak protein parçalanır. Hidroliz asiti olarak hidroklorik asit yaygın olarak kullanılmaktadır. Hidroliz 6N HCl ile 110 °C'de 18-24 saat sürmektedir. Hidroklorik asit ile hidroliz için soğutucu sistem veya vakum gerekmele beraber sülfirik asit kullanıldığında soğutucu sistem ve vakum gereksinimi ortadan kalkmıştır (Kolar, 1990; White ve Hart, 1992). Hidrolizi takiben açığa çıkan hidroksiprolin kloramin T ile pirole okside edilir ve serbest kalan pirol, 4-dimetilaminobenzaldehit ile reaksiyona sokulur. Oluşan kırmızı bileşiğin 558 nm'de absorbandsı ölçülmektedir (Jones ve diğ., 1986).

Hidroksiprolinin kolorimetrik analizi için Neuman ve Logan tarafından geliştirilen metot temel alınmıştır. Bu metotun güvenilir olmayan noktalarında Stegeman tarafından modifikasyonlar geliştirilmiştir; kromojen gelişiminin stabil olması sağlanmış ve tirozin ve diğer maddelerden kromojen ile girişim yapan maddeler oluşumu önlenmiştir. Hidroksiprolin içeren örneğin diğer amino asitleri de yüksek miktarda içermesi kromojen (renkli bileşik) oluşumunu engellemekte ve %10 dan fazla hataya neden olabilmektedir. Bu hatanın önlenmesi için tirozin ile girişim önlenmelidir. Stegeman metodu üzerinde değişiklik yapılarak; öncelikle kromojen duyarlılığı ve stabilitesi artırılmış ve sonra diğer amino asitlerin kromojene dahil olması önlenmiştir (Woessner, 1961).

Hidroksiprolinin spektrofotometrik tayini için çok sayıda metot bulunmaktadır. Bu metotlar hidroksiprolinin pirole oksidasyonu ve ürünün Ehrlich ayırıcı (*p*-dimetilaminobenzaldehit) ile kırmızı renk vermesini üzerine dayanmaktadır. Renk şiddeti ve rengin stabilitesi birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörler üzerinde çalışılarak daha iyi sonuç veren metotlar geliştirilmiştir. Bergman ve Loxley (1963), Neuman ve Logan ile Stegeman metotları üzerinde bu iki özelliği temel alarak daha stabil ve kolayca uygulanan, geri kazanımı yüksek bir metot geliştirmiştir; metoksi-etanol ve *n*-propanol, isopropanol ile değiştirilmiş ve oksidasyon ile renk gelişimi için sıcaklık

ve süre ile birlikte, organik çözücü ve kimyasalların konsantrasyonları değiştirilmiştir (Bergman ve Loxley, 1963).

Et ürünlerinde hidroksiprolin tayini için AOAC (Association of Official Analytical Chemists) 990.26 resmi metodu kabul edilmiştir. Bu metotta örnek 105 °C’de sülfirik asit ile hidroliz edildikten sonra hidroksiprolin kloramin T ile pirole okside edilir ve 4-dimetilaminobenzaldehit ilave edilerek oluşan kırmızı renkli bileşiğin absorbansı 560 nm’de ölçülür (AOAC, 1998).

2.5.4. Kromatografik Yöntemler

Kromatografik yöntemlerde amino asitler kromatografik ayırım öncesi veya sonrası uygun türevlere dönüştürülmektedir. Kolon sonrası türevlendirme tekniğinde serbest amino asitler kromatografik kolonda ayrıldıktan sonra uygun bir türev kimyasalı ile reaksiyona girerek türevlenmektedir. Kolon öncesi türevlendirme yönteminde ise amino asitler türevlendirici kimyasal ile kolana girmeden önce reaksiyon sokulur (White ve Hart, 1992).

İyon değiş-tokuş kromatografisi ile amino asit analiz metodu 1950’li yıllarda geliştirilmiş ve takip eden 20 yıl süresince en yaygın kullanılan metot olmuştur (Irvine, 1994). Amino asitler iyon değiş-tokuş kromatografisinde ayrıldıktan sonra ninhidrin ile reaksiyona girer ve türevler görünür bölgede tayin edilir. Bu metot güvenilir olup, yüksek ayırım sağlamaktadır. Ancak analiz süresi uzun ve duyarlılığı sınırlıdır ve ayrıca daha geniş pikler vermektedir (Schuster, 1988; Haynes ve diğ., 1991).

Son yıllarda HPLC ekipmanlarında hızlı gelişmeler olmuş ve yeni kolonlar amino asit analizlerinde önemli değişikliklere yol açmıştır. Kolon öncesi türevlendirme ile HPLC tayin yöntemleri artış göstermiştir. Yöntemlerin hızı, basitliği ve duyarlılığı nedeniyle kullanımı son yıllarda artmaktadır. Ters fazlı HPLC tekniğinin geliştirilmesiyle amino asit türevlerinin daha hızlı ayırımı sağlanmıştır. Kolon öncesi türevlendirme ile piklerin seyrelme probleminin ortadan kaldırılması nedeniyle duyarlılık artmaktadır (Einarsson ve diğ., 1983; Betner ve Földi, 1986; Haynes ve diğ., 1991; Irvine, 1994).

Amino asitler uçucu olmadıklarından gaz kromatografisi (GC) tekniği ile analiz edilebilmeleri için uçucu forma dönüştürülmelidir. Gaz kromatografisi ile analiz öncesi uygulanan işlemlerin HPLC metotlarına göre daha uzun ve karmaşık olması

nedeniyle HPLC teknikleri, GC tekniklerine tercih edilmektedir (Cserhati ve Forgacs, 1999).

2.5.4.1. İyon Değiş Tokuş Kromatografisi

Amino asitlerin sülfonatlı polistiren reçine ve Dowex-50 sentetik iyon değiş-tokuş reçine kolonlarıyla ayrımını sağlayan teknikler geliştirilmiştir. Bu reçineler ilk olarak amino asitleri asidik, bazik ve nötral gruplarına ayırmak için kullanılmış, ancak sonra birden fazla amino asidin kromatografik ayrımı amacıyla kullanılmıştır. Bu ayırım, amino asitlerin yükleri ve yan zincirlerinin fonksiyonu ile amino asitlerin reçine ile iyonik olmayan etkileşmelerinin sonucudur (Moore ve Stein, 1951).

Amino asitler yüksek sıcaklıkta ninhidrinle reaksiyona girdiğinde oluşan renkli bileşik, kromatografik ayırım sonrası amino asit miktarını ölçmede kullanılmaktadır. Renkli bileşiğin absorbansı spektrofotometre ile de ölçülebilmektedir (Regeistein, 1984). Moore ve Stein (1954) tarafından ninhidrin–pozitif bileşiklerin kromatografik ayrımı 15*0.9 cm kolon ile yapılmış ve pH= 3.1-5.1 sodyum asetat-sitrat tampon çözelti kullanılarak, %3 geri kazanım oranında birçok amino asit ayrılmıştır. Küçük peptidlerin ayrımı pH ve iyonik gücü artırarak Dowex 50-X8 reçinesi ile sağlanmıştır (Moore ve Stein, 1954).

Moore ve Stein tarafından geliştirilen iyon değiş-tokuş kromatografisi ile amino asit analizinde, 1980’den sonra kolon teknolojisindeki değişmeler ile analiz süresi kısalmıştır. Ayırma tekniği standart kalmış ve yeni metotlar için temel alınmıştır. Klasik amino asit analizleyicisi Speckman tarafından geliştirilmiş, tüm amino asitleri ayırmak için uzun kolon nötral ve asidik amino asitler için, kısa kolon bazik amino asitleri ayırmak için kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda ise tek kolonlu amino asit analizleyicisi geliştirilerek, analiz süresi 24 saatten 90 dakikaya indirilmiştir (Asworth, 1987 a).

İyon değiş-tokuş kromatografisiyle son geliştirilen metotta, hidroksprolin kolonda ayrıldıktan sonra, sodyum hipoklorit ile okside edilmekte ve ortofitaldehit ile reaksiyona sokularak, floresans detektör ile floresans ölçülmektedir (Asworth, 1987 b).

2.5.4.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analiz

Modern HPLC hızlı sonuç veren ve kimyasal olarak benzer moleküller arasında yüksek duyarlılıkta ayırım sağlayan bir cihazdır. Amino asit analizlerinde kolon öncesi türevlendirmeyi takiben ters fazlı HPLC’de ayırım tercih edilmektedir. Ön kolon türev oluşumu elverişsiz ve pahalı son kolon reaktörlerine olan ihtiyacı kaldırmış ve hidrofobik amino asit türevlerinin kolaylıkla ayırımını sağlamıştır. Günümüzde 3-5 µm çaplı silika materyalden yapılmış kolon ile 10 dk gibi kısa sürede ayırım yapılmakta ve yüksek duyarlılıktaki floresans detektör ile düşük tayin limitlerine ulaşılmaktadır (White ve Hart, 1992). HPLC ile hidroksprolin analizi yapılmış olan çalışmalardan örnekler, koşulları ile birlikte Tablo 2.2.’de verilmiştir.

Ters fazlı HPLC tekniğinde, hidrofilik ve lipofilik çözücü karışımında çözünürlüğüne bağlı olarak amino asitler kısımlara ayrılır. İki faz arasında örnek komponentlerinin ayırımı çözünürlük özelliklerine bağlıdır. Daha az hidrofilik olan komponent öncelikle hidrofilik fazla birleşir ve hidrofobik komponentler lipofilik fazda bulunur. Proses hidrofilik fazın ekstraksiyon gücüne bağlı olup, hidrofilik fazda çözünen organik çözücü ile de ilgilidir. Organik çözücü konsantrasyonu arttıkça hidrofobik komponentin ekstraksiyon gücü artar. Ters fazlı kromatografide C₁₈ (oktadesil) kolon dolgu materyali yaygın olarak kullanılmaktadır (White ve Hart, 1992).

HPLC ile amino asit analizinde kontrol altında tutulması gereken parametreler: hareketli faz, durağan faz, akış hızı, sıcaklık ve türevlendirme için kullanılan kimyasaldır. Genelde örnek difüzyonu piklerde genişlemeye, yassılaşmaya ve sıçramaya neden olarak duyarlılığı ve pik ayırımı azaltır (White ve Hart, 1992).

Tablo 2.2. HPLC ile hidroksiprolin analizi.

Türevlendirme	Ürün	Kolon	Hareketli Faz	Akış (ml/dk)	Kaynak
NBD-Cl (4-kloro-7-nitrobenzo-2-okza-1,3 diazol)	Kolajen	Lichrosorb RP18	Fosfat buffer (pH= 1.9)	1	Anhoff ve diğ., 1981
NBD-Cl (4-kloro-7-nitrobenzo-2-okza-1,3 diazol)	Tavuk ve domuz eti	ODS, 5 µm LiChrosorb Si-100	Asetat buffer-asetonitril (85:15)	1.5	Jones ve diğ., 1986
PITC (fenil izostiyoiyanat)	Kolajen	Nova-Pak C18 ODS, 5µm	Asetonitril: su: asetat buffer (pH= 6.3) (6:4:90)	1	Dunphy ve diğ., 1987
FMOC-OPA (9-fluometil kloroformat-ortafitaldehit)	Tavuk, sığır ve koyun kası	5 µm Spherisorb C-8	Asetonitril Fosforik asit	2	Smith ve Judge, 1991
PITC (fenil izotiyosiyanat)	Kolajen	3 µm VeloSep C ₁₈	Eluent 1: asetonitril: Trietilamoyumasetat:Na-asetat: su Eluent 2: Asetonitril: metanol: su	1-1.5	Reagen ve Green., 1992
FMOC (9-fluometil kloroformat)	Kahve	Kromasil C8 5 µm	Asetat buffer Asetonitril	1	Arnold ve diğ., 1994
PITC (fenil izotiyosiyanat)	Şarap	5 µm C ₁₈	Asetonitril: su Na-asetat:TEA: sodyumpentasülfonat	1	Buxaderas ve diğ., 1994
FMOC (9-fluometil kloroformat)	Şarap	HP C18	Na-asetat: metanol: asetonitril (1:2:2)	0.45	Alves ve diğ., 2000

Amino asitler görünür veya UV bölgede absorbands vermediği için HPLC’de görünür veya UV detektör direkt olarak kullanılamaz. Bu nedenle bu bölgede tayinini mümkün kılmak için türevlendirme prosedürleri geliştirilmiştir. Türevlendirmeyle (Cserhati ve Forgacs ,1999):

- Ürün UV ve görünür bölgede absorbands gösterir veya fluoresans detektör ile tayin edilebilir.
- Türevlendirme prosedürü hızlıdır ve verim yüksektir.
- Ayırma ve tayin esnasında ürün stabildir.

Türevlendirme için kullanılan kimyasallarda aranan özellikler aşağıdaki gibidir (White ve Hart, 1992):

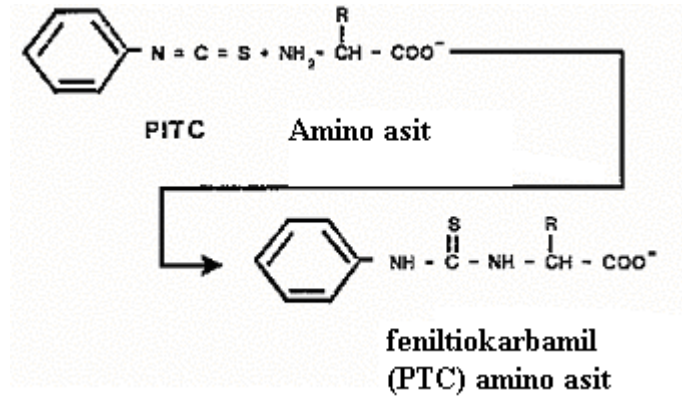
- Oda sıcaklığında reaksiyona girmeli ve nicel verim sağlamalıdır.
- Oluşan türevler birkaç gün dayanıklı olmalıdır (oda sıcaklığı tercih edilir).
- Girişim yapmamalıdır.
- Türevleri aynı molar cevap faktörüne sahip olmalıdır.
- Verdiği yanıt doğrusal olmalıdır.

Hidroksiprolin analizlerinde ön kolon türetme için PITC (fenil izotiyosiyanat), OPA (orto-fitalaldehit), NBD-Cl (4-kloro-7-nitrobenzo-2-okza-1,3-diazol) ve FMOC (9-fluometil kloroformat) reaktifleri kullanılmaktadır (Einarsson ve diğ., 1983; Gustavsson ve Betner, 1990; Malmer ve Shroeder, 1990).

PITC, türevlendirme ajanı olarak Edman prosesinde 30 yıldan fazla kullanılmakta iken amino asit analizlerinde 1984 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır. PITC amino asit ile reaksiyona girdiğinde, PTC (feniltiyokarbamil) amino asit meydana gelir (Şekil 2.5.). PTC amino asitlerinin fluoresans vermemesi nedeniyle UV detektör ile tayin edilir. PITC hem primer hem de sekonder amino asitler ile reaksiyona girer. PITC’ın dezavantajları ise aşağıdaki gibidir (Betner ve Földi, 1986; Schuster, 1988; Haynes ve diğ., 1991):

- Türev oluşturma prosedürü uzundur.
- Türev oluşturma da vakum sistemine gereksinim vardır.
- Örnekteki iz miktardaki tuz ve diğer matriks komponentleriyle girişim yapabilir.
- UV detektör kullanılması nedeniyle duyarlılık diğer metotlara göre daha düşüktür.

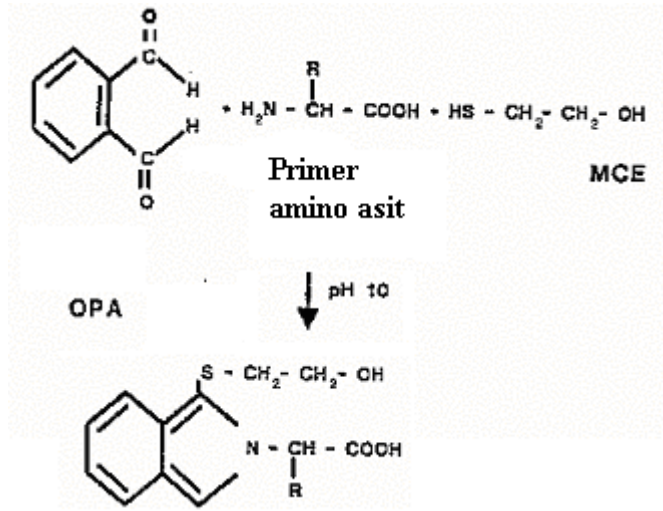
Waters firması tarafından türevlendirme için PITC kullanılan bir metot geliştirilmiş ve bu metoda Pico-Tag metodu adı verilmiştir. Vakum altında kurutulmuş örnek, 10-20 µl etanol:triethylamin:su (2:1:2) karışımında çözülüp tekrar kurutularak, 20 µl etanol:PITC:triethylamin:su (7:1:1:1) karışımı ile türevlendirilir. HPLC sistemine enjekte edilmeden önce karışım asetondilinde çözülür (Reagen ve Green, 1992; Irvine, 1994).



Şekil 2.5. PITC ile amino asit türetme reaksiyonu (White ve Hart, 1992).

Primer amin ayracı olan OPA, 1971 yılında türevlendirme ajanı olarak tanımlanmıştır. Primer amino asit 2-merkaptotanol (2-ME) veya etantiyol varlığında yüksek fluoresans veren türevler meydana getirir (Şekil 2.6.). Türev oluşturma prosedürü kısa ve duyarlılık yüksektir. OPA'nın bazı dezavantajları aşağıdaki gibidir vardır (Einarsson, 1985; Betner ve Földi, 1986; Asworth, 1987b;):

- Primer amino asitler ile sınırlıdır ve sekonder amino asitler (prolin, hidroksiprolin) için kullanılamaz.
- Türevlerin stabil olmaması türev oluşturma prosedürünü zorlaştırır.



Şekil 2.6. OPA ile amino asit türetme reaksiyonu (White ve Hart, 1992).

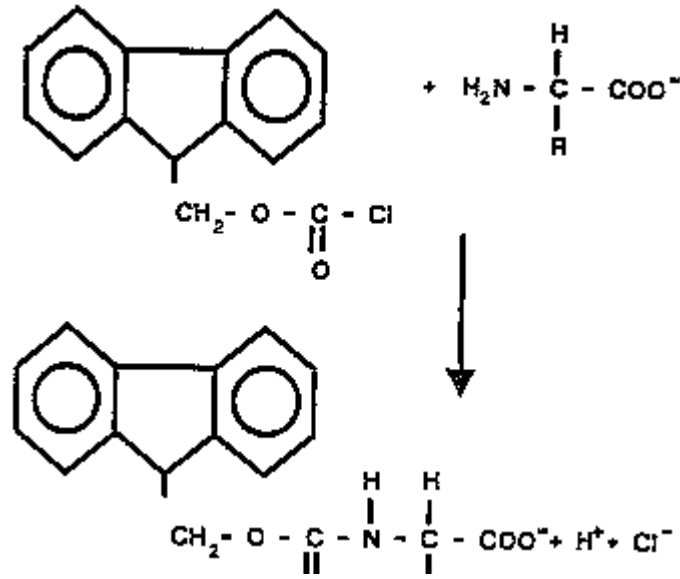
Türev oluşturma işleminde 50 mg OPA asetonitrilde çözülür ve 26 µl 2-mercaptoethanol ilavesiyle asetonitril ile hacim mililitreye tamamlanır. 100 µl OPA-2-ME hidroliz ürüne ilave edilerek primer amino asit türevlendirilir (Einarsson,1985; Smith ve Judge, 1991).

Fluorojenik ayraç NBD-Cl sekonder aminlerle primer aminlere göre daha hızlı reaksiyona girer. Böylece diğer amino asitlerin girişimleri azalır. Bu reaksiyon 60 °C’de 3 dakikada tamamlanabilir ve duyarlılık pikomol düzeyindedir. NBD-Cl ile etkileşime giren maddelerin ayrımı zorlaştırması nedeniyle iyon çifti kullanımı gerekir. (Jones, 1985; Einarsson, 1985; Jones ve diğ., 1986). Bu metotta hidrolize örnekten 100 µl alınır ve 100 µl potasyum tetraborat (0.4 M) ilavesiyle karıştırılır. 100 µl NBD-Cl (25 mM, metanolde çözünmüş) ilave edilip, 3 dk su banyosunda 60 °C’de 3 dakika bekletilir. 50 µl HCl (1 M) ilavesiyle türevlendirme tamamlanmış olur (Anhoff ve diğ., 1981).

FMOC peptid sentezinde amino gruplarını koruyucu olarak kullanılmaya başlanmış ve primer ve sekonder aminlerin fluoresans etiketlenmesi için uygun olduğu anlaşılmıştır. FMOC türevlendirme kimyasalı olarak 1983 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Şekil 2.7.’de FMOC ile amino asit ile türev oluşturma reaksiyonu verilmiştir. OPA’ya zıt olarak FMOC kimyasalı yüksek miktarda fluoresans verir. Türev oluşumu 1 dakikadan daha kısa sürede olup, oluşan türevler stabildir. Türevlerin tayini fluoresans veya UV detektör ile yapılabilir. Türev verimi reaksiyona giren karışımın pH’ına duyarlıdır (pH= 8’de yüksek verim). Amino asit

türevlerinin ve kimyasalın uyarma ve yayma spektrası özel olduğundan aşırı kimyasal kolona enjeksiyondan önce uzaklaştırılmalıdır. Fmoc ile türev oluşturmada karşılaşılan sorunlar aşağıdaki gibidir (Schuster, 1988, Haynes ve diğ., 1991) :

- Etkili türev oluşumu sağlamak için kullanılan aşırı kimyasal hidrolize olur ve amino asit türevleriyle girişim yapabilen Fmoc-OH oluşur.
- Aşırı kimyasal kolon performansına zarar verir.



Şekil 2.7. Fmoc ile amino asit türetme reaksiyonu (White ve Hart, 1992)

Aşırı miktardaki kimyasal, organik çözücüye (dietil eter, pentan) ekstrakte edilerek uzaklaştırılabilir. Ekstraksiyon süresi uzun olup, hidrofobik amino asit tayininde probleme yol açabilir. Ekstraksiyona alternatif yöntem olarak aşırı kalan Fmoc'nin hidrofobik amin 1-aminoadamantan (ADAM) ile reaksiyona sokmaktır. Fmoc-ADAM kompleksinin amino asit türevleriyle girişim yapmaması nedeniyle kromatogramda en son çıkan bileşiktir (Einarsson ve diğ., 1983; Gustavsson ve Betner, 1990; Malmer ve diğ., 1990; Haynes ve diğ., 1991).

Hewlett-Packard tarafından Amino Quant adı verilen metot ile farklı matrisler de (protein hidrolizatları, bitki ekstraktları, bira) amino asit analizinde hızlı ve hassas bir metot ve geliştirilmiştir. Bu metotta primer amino asitler OPA ile ve sekonder amino asitler Fmoc-Cl ile türevlendirilir (White ve Hart, 1992).

FMOC ile türevlendime işleminde önce OPA ile primer amino asitler türevlendirilir. İyodoasetamid ilavesinden sonra, asetonda çözülmüş 4 mM FMOC'den 200 µl ilave edilir. Bu karışıma ADAM çözeltisi ilave edildikten sonra kolona enjeksiyon yapılır (Einarsson, 1985; Smith ve Judge, 1991).

Hidroksiprolin sekonder bir amino asittir. Hidroksiprolin tayininde kullanılan kimyasalların avantaj ve dezavantajları değerlendirildiğinde FMOC-OPA kullanımı en uygun görülmektedir. Türev oluşumu iki aşamada yapılmaktadır. İlk aşamada primer amino asitler OPA ile, ikinci aşamada sekonder amino asitler FMOC ile reaksiyona sokulur (Schuster, 1988; Smith ve Judge, 1991).

Kolajen hidrolizatında hidroksiprolin tayininde türevlendirici olarak NBD-Cl kullanılan çalışmada %95 geri kazanım, %5 standart sapma elde edilmiştir (Anhoff ve diğ., 1981). Kolajen hidrolizatında hidroksiprolin tayininde türevlendirici olarak PITC kullanılan çalışmada ise doğruluk %3.7-4.2, tekrar edilebilirlik %2.6-5.4 olarak bulunmuş ve kolajen hidrolizatlarının rutin analiz için uygun olduğuna karar verilmiştir (Dunphy ve diğ., 1987). Türev oluşturma için PITC kullanılan kolajen hidrolizatının HPLC ile analiz sonuçları kolorimetrik yöntem sonuçları ile karşılaştırıldığı çalışmada HPLC metodunun kesinliği daha iyi bulunmuştur (Reagen ve Green, 1992).

Jones ve diğ. (1986) tavuk eti ve domuz eti hidrolizatlarını NBD-Cl ile türevlendirip HPLC ile analiz etmiş ve %90-102 aralığında geri kazanım ile %2 varyasyon katsayısı elde etmiştir. Geniş aralıkta hidroksiprolin miktarı içeren et ve bağ dokuya uygulanabilir bir metot geliştirilmiştir.

Buxaderas ve Deu-Puig, (1994) tarafından şarapta amino asit analizi yapılan çalışmada hidroksiprolin için %100.7 geri kazanım, %1.72 elde edilmiş ve sonuçlar türevlendirici olarak PITC kullanılan metotun şarapta amino asit analizi için yeterli duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde şarapta amino asit analizinde FMOC-Cl türev oluşturma için kullanıldığında ortalama %108.3 geri kazanım ve %13.8 varyasyon katsayısı elde edilmiştir (Alves ve diğ., 2000).

FMOC metodu amino asitler için doğru sonuç veren bir metot olup çok farklı örnek matrislerine uygulanabilir (Haynes ve diğ., 1991). Betner tarafından geliştirilen hızlı, hassas ve tekrar edebilir sonuçlar veren HPLC metodu kas hidrolizatında hidroksiprolin tayininde kullanılmıştır. Bu metotta FMOC-ADAM kullanılmaktadır.

Tavuk, sığır ve koyun kasında yapılan çalışmada %100-107 aralığında geri kazanım değerleri elde edilmiştir. (Smith ve Judge, 1991).

Kahvede amino asit analizinde türev oluşturma için FMOC-Cl'in kullanıldığı çalışmada varyasyon katsayısı %5.4 ve kalibrasyon grafiğinin korelasyon katsayısı 0.998 olarak bulunmuştur. Hidroksiprolin kahvede minor amino asittir, bu metotla hidroksiprolin de analiz edilebilmektedir (Arnold ve diğ., 1994).

2.5.4.3. Gaz Kromatografisi İle Analiz

Amino asitler uçucu olmadıklarından GC ile analiz edilebilmeleri için uçucu forma türev yapıcı kimyasallar kullanılarak dönüştürülebilir (Cserhatti ve Forgacs, 1999).

Hidroksiprolin içeren hidrolizat azot atmosferinde kurutulduktan sonra izobutanol-3 N HCl ile esterifiye edilir. Esterifikasyondan sonra azot atmosferinde kurutma yapılır. Heptafluorobütirik asit ilave edilerek hidroksiprolin, N-heptafluorobütiril izobutil estere dönüştürülür ve GC'de analiz edilir (Berg, 1982).

Ayrıca hidroksiprolin N-(O)-trifluoroasetil *n*-propil estere dönüştürülerek gaz kromatografide analizlenebilir (Johnson, 1988; Lüpke ve Brückner, 1988).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan salam, sosis ve sucuk numuneleri Marmara Bölgesinde ticari olarak satışa sunulan, Ocak-Mart 2002 tarihleri arasında üretilmiş ve rastgele seçilmiş 7 firmaya ait üründür. Çalışmada 6 salam, 3 sosis ve 3 sucuk numunesi kullanılmıştır. Numuneler vakumlu ambalaj içerisinde ve analize kadar 4 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Kolorimetrik Yöntem ile Analiz

Hidroksiprolinin kolorimetrik yöntem ile analizinde AOAC 990.26 resmi metodu kullanılmıştır (AOAC, 1998). Her örnek için 2 ayrı hidrolizat hazırlanmış ve her hidrolizatın absorbans ölçümleri Philips UV-VIS spektrofotometre ile 560 nm dalga boyunda yapılmıştır. Konsantrasyona karşılık ölçülen absorbans değerleri ile kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve eğri denklemi belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi günlük olarak hazırlanmıştır.

3.2.2. HPLC ile Analiz

Hidroksiprolin analizleri Waters Model 501 Çözgen Dağıtım Sistemi, 7010 enjeksiyon sistemi, 810 Baseline Software, Bilgisayar Sistemi, Powersonic Art 1000 kesintisiz güç kaynağı, Star LC Dot Matriks Yazıcı ve HP 1046 A floresans detektörden oluşan kombine sisteminde gerçekleştirilmiştir. Nova-pak C₈ (4*75mm, 4 µ) ve Waters Bondapak C₁₈ (3.9*300 mm, 10µ) HPLC kolonları kullanılmıştır.

3.2.2.1. Hidroksiprolin Stok/Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

100 mg toz hidroksiprolin standardı (Merck 104506) tartılmış ve saf su ilavesiyle 100 ml’ye tamamlanmıştır. Hazırlanan 1000 ppm’lik stok çözelti 4 °C’de saklanmıştır.

Çalışma stok çözeltisi (20 ppm), stok çözeltiden alınan 1 ml saf su ile 50 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Çalışma stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan standart çözeltileri kalibrasyon eğrilerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.2.2.2. Türevlendirme

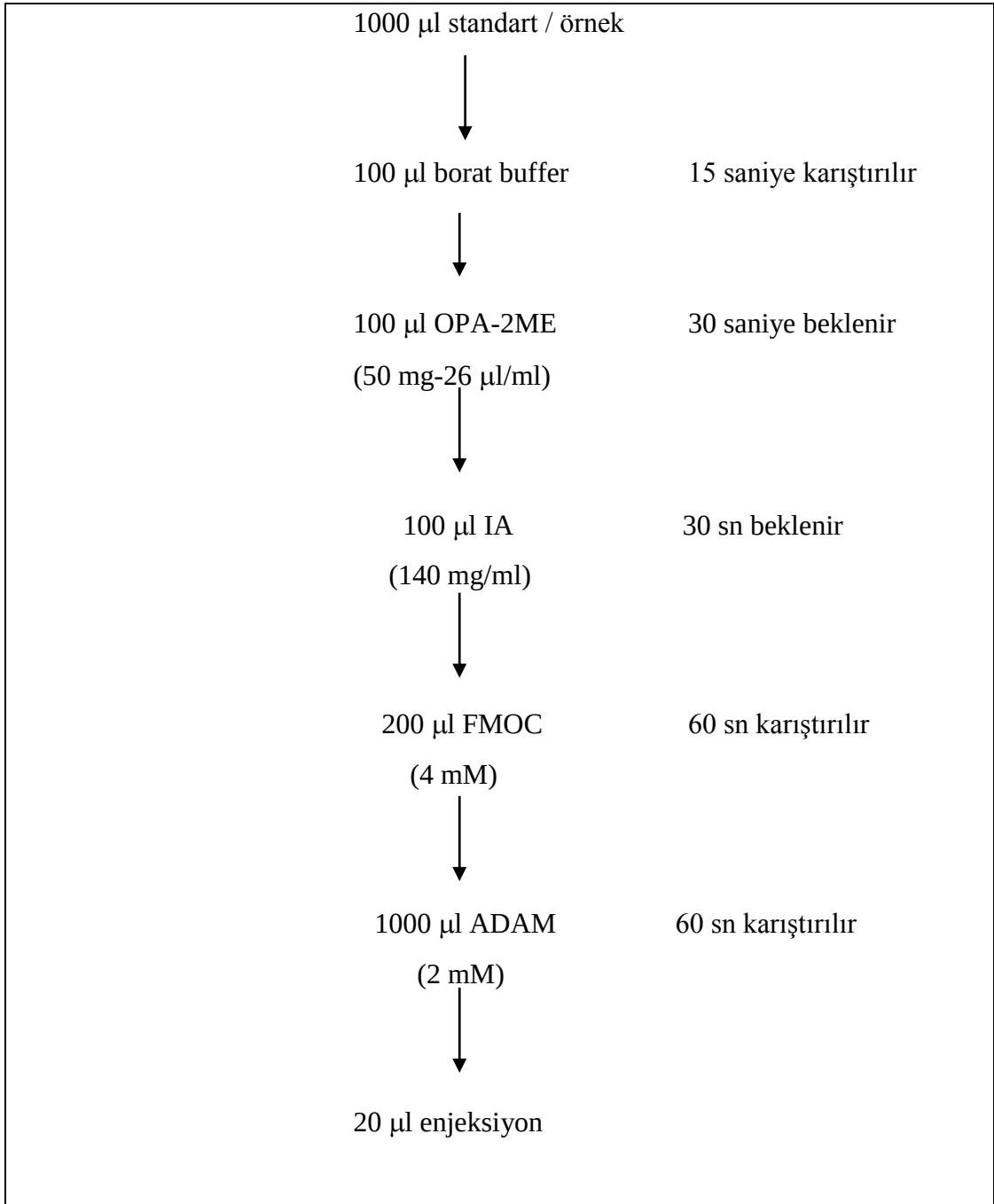
Türevlendirme için OPA (Merck 821027), 2-ME (Merck 115433), IA (Merck 804744), FMO (Merck 818203) ve ADAM (Fluka 06649) kullanılmıştır. Türevlendiriciler HPLC sınıfı asetonitrilde çözülmüştür. Borat tampon çözeltisi 0,5 M borik asiti 5 N NaOH ile pH 9.5'a ayarlanarak hazırlanmıştır. Türevlendirme prosedürü Şekil 3.1.'de verilmiştir (Smith ve Judge, 1991).

3.2.2.3. HPLC Koşulları

Literatürde mevcut hidroksprolin analizi için uygulanmış yöntemlerin uygunluğu denenmiştir. Hareketli faz sistemindeki her çözgen HPLC sınıfıdır. Hazırlama aşamasında çözgen sistemi 0.45 µm gözenekli Millipore Durapore membran filtreden Millipore OM109 vakum pompası yardımıyla süzülüp, Azaklı ultrasonik banyoda 90 dakika degaze edilmiştir. Enjeksiyon yapılmadan önce HPLC kolonu basınç sabitlenene kadar yaklaşık 30 dakika çözgen sistemi ile koşullandırılmıştır.

C₈ kolon denemesinde hareketli faz olarak 0,1 M Fosforik asit (A) ve Asetonitril (B), 0.8 ml/dk akış hızında kullanılmıştır. Gradyent programı 0-6 dk: %0-37 B, 6-12 dk : %37-42 B, 12-16 dk: %42-100 B, 16-20 dk: %100-37 B'dir (Smith ve Judge, 1991).

Standart konsantrasyonu 1.0-2.0-3.0-4.0-5.0-6.0-7.0-10.0 ppm aralığında analizlenerek, standarta ait pik belirlenememiş olması nedeniyle C₁₈ kolon kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.1. Türevlendirme işlemi.

C₁₈ kolonu kullanılarak yapılan denemelerde hareketli faz 30 mM Sodyum Asetat (A), (pH= 7.2) ve Asetonitril: 100 mM Sodyum Asetat(4:1) (B) olup, 0.8 ml/dk akış hızı kullanılmıştır. Gradyent programı 0-9 dk %0-30 B, 9-11 dk %30-50 B, 11-13 dk % 0 B, 13-14 dk %50-100 B, 14-18 dk %100 B, 18-20 dk %100-0 B'dir. (Schuster, 1988). Çalışmada Tablo 3.1.'de verilen koşulları denenmiş ve standarta ait pik belirlenememiştir.

Bu çalışmaların sonucunda, tüm denemelerde hareketli faz A: 30 mM Na-Asetat, pH =7.2, B: 100 mM Na-Asetat, pH= 7.2 :Metanol: Asetonitril (1:2:2) 1 ml/dk akış hızında kullanılmıştır. Uygulanan gradiyent programı: 0-17 dk, % 0-60 B, 17-18 dk % 60-100 B, 18-25 dk %100 B, 25-30 dk %100-0 B, kolon sıcaklığı 40 °C'a ayarlanmıştır (Rothaupt., 1993, Alves, 2000). Bu koşullarda 16. dakikada çıkan pikin standarta ait olduğu saptanmış, kullanılan sıcaklıktan kolonun zarar görmemesi için oda sıcaklığında denenmiş ve standarta ait pik 16.5 dakikada çıkmıştır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile hidroksiprolin analizinde kullanılmaya karar verilen çalışma koşulları Tablo 3.2'de verilmiştir.

Floresans detektör parametreleri eksitasyon dalga boyu (λ_{ex}) 266, emisyon dalga boyu (λ_{em}) 310 nm, pmtgain : 8, response time: 4, lamba no: 1'dir.

3.2.2.4. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Çalışma stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak 1.0 - 2.5 – 5.0 – 10.0 – 20.0 ppm konsantrasyonlarında standart serisi hazırlanmıştır. Her standard 2 tekrarlı olarak türevlendirilmiş ve türevler 2 kez HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Kromatogramlarda pik alanları esas alınarak konsantrasyona karşılık alan eğrisi çizilmiş ve bu eğrinin denklemi belirlenmiştir.

3.2.2.5. Hidroliz

HPLC enjeksiyonundan önce hidrolizatlar türevlendirilmiştir. Spektrofotometrik ve HPLC metotlarında aynı örnek hidrolizatları kullanılmıştır (AOAC, 1998). 10 ml hidrolizatın pH'sı 1 N NaOH ile 6.5'a ayarlandıktan sonra 25 ml'lik balonjojeye alınmıştır ve su ile hacim 25 ml'ye tamamlanarak karıştırılmıştır. Örnek çözeltisi 3.2.2.2.'de belirtildiği gibi türevlendirilmiştir.

Tablo 3.1. Denenen Çalışma Koşulları.

Hareketli Faz	Akış Hızı (ml/dk)	Gradyent Programı	Hidroksiprolin Konsantrasyonu (ppm)
A : 30 mM Na-Asetat (pH= 7.2) B: 100 mM Na-Asetat:asetonitril	0.8	0-9 dk % 0-30 B 9-11 dk % 30-50 B 11-13 dk % 50 B 13-14 dk % 50-100 B 14-18 dk % 100 B 18-20 dk % 100-0 B	0.5 1 5
A : 30 mM Na-asetat (pH= 7.2) B: 100 mM Na-asetat:asetonitril (4:1)	0.8	0-12 dk %20-50 B 12-18 dk %50 B 18-40 dk % 50-20 B	5 50
A : 30 mM Na-Asetat (pH= 7.2) B: 100 mM Na-Asetat:Asetonitril (4:1)	0.8	0-14 dk % 30-50 B 14-21 dk %50 B 21-35 dk % 50-30 B	5 50
A : 30 mM Na-Asetat (pH= 7.2) B: Asetonitril	1	0-12 dk % 30-60 B 12-18 dk % 60 B 18-30 dk %60-30 B	1 5 10
A : 30 mM Na-Asetat (pH= 7.2) B: Asetonitril	1	0-12 dk % 30-60 B 12-18 dk % 60 B 18-30 dk %60-30 B	1 5 10

Tablo 3.2 . HPLC ile Hidroksiprolin Analizinde Çalışma Koşulları.

Hareketli Faz	Akış Hızı	Kolon	Gradyent Programı
A: 30 mM Na-Asetat (pH= 7.2) B: 100 mM Na-Asetat (pH= 7.2): Metanol : Asetonitril (1:2:2)	1 ml/dk	C ₁₈	0-17 dk, % 0-60 B 17-18 dk, %60-100 B 18-25 dk, %100 B 25-30 dk, %100-0 B

3.2.2.6. Örneklere Hidroksiprolin İlavesi

Analizlenen numuneler içinde en düşük miktarda hidroksiprolin bulunan numuneler geri kazanım çalışması için (5 numaralı salam, 2 numaralı sosıs ve 1 numaralı sucuk) seçilmiştir. Örnek çözeltilerinin pH ayarı yapıldıktan sonra numunede %0.050 ve % 0.200 düzeyi elde edilecek şekilde standart hidroksiprolin çözeltisinden ilave edilerek geri kazanım çalışması yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi(HPLC) Yöntemi ile Ön Çalışmalar

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile hidroksiprolin tayini için yapılan ön çalışmalardan elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.'de verilmiştir.

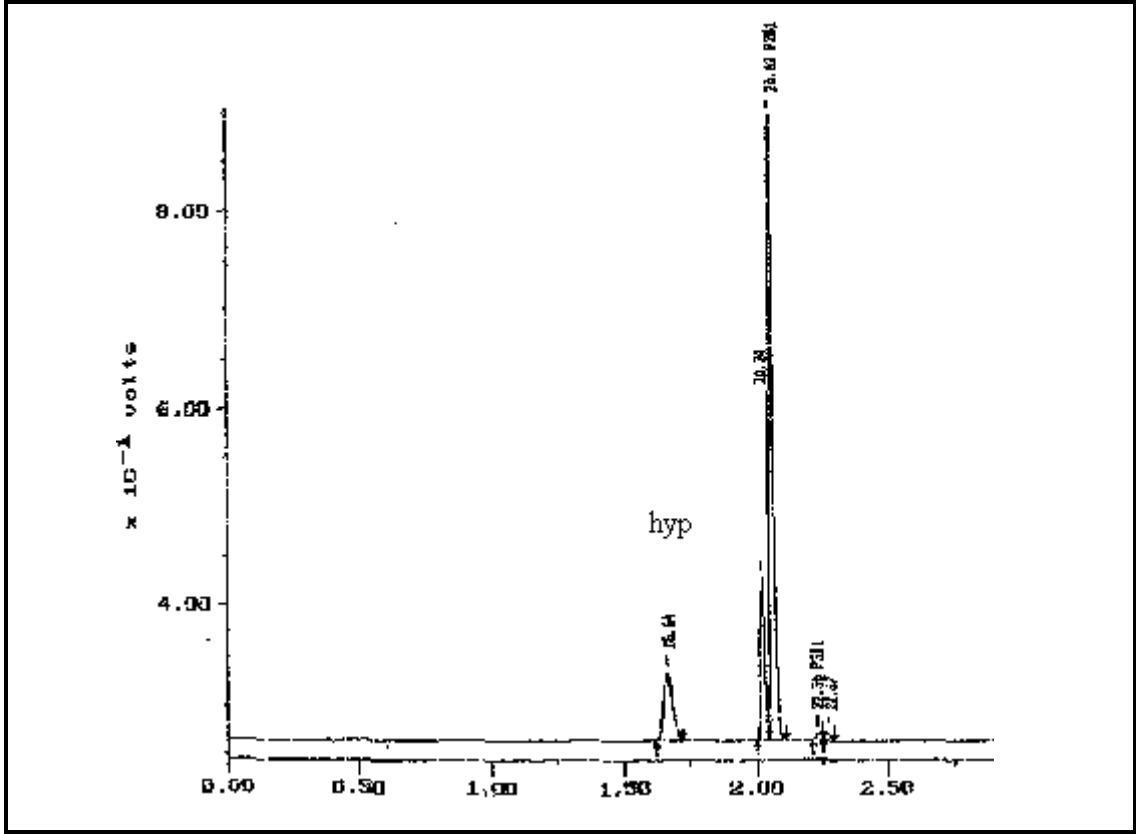
Tablo 4.1. HPLC ile Ön Çalışma Sonuçları.

Hareketli Faz	Hidroksiprolin Konsantrasyonu (ppm) ^a	Sonuç
A : 30 mM Na-Asetat (pH= 7.2) B: 100 mM Na-Asetat:Asetonitril (4:1)	0.5 1 5	Her üç enjeksiyonda floresans yoğunluğu aynı pik elde edildi. Pik çakışması olabileceğinden gradiyent programının değiştirilmesine karar verildi.
A : 30 mM Na-Asetat(pH= 7.2) B: 100 mM Na-Asetat:Asetonitril (4:1)	5 50	İlk enjeksiyonda 2 pik elde edilirken 2. enjeksiyonda ilk ikisi yanyana çıkan 3 pik elde edildi. İlk iki piki ayırmak için gradiyent programının değiştirilmesine karar verildi.
A : 30 mM Na-Asetat(pH= 7.2) B: 100 mM Na-Asetat:Asetonitril (4:1)	5 50	İlk 2 pik birbirinden ayrıldı. Standarta ait pik belirlenemediğinden gradiyent programı ve B fazında değişiklik yapılmasına karar verildi.
A : 30 mM Na-Asetat(pH= 7.2) B: Asetonitril	1 5 10	Standarta ait pik belirlenemediğinden kolon sıcaklığı denenmeye karar verilmiştir.
A : 30 mM Na-Asetat(pH= 7.2) B: Asetonitril	1 5 10	Standarta ait pik belirlenememiştir. Türev reaktifinden ortaya çıkan piklerin floresans yoğunluğu çok yüksek olduğundan standarta ait pikin belirlenemediği düşünülmektedir.

^a Her deneme iki tekrarlıdır.

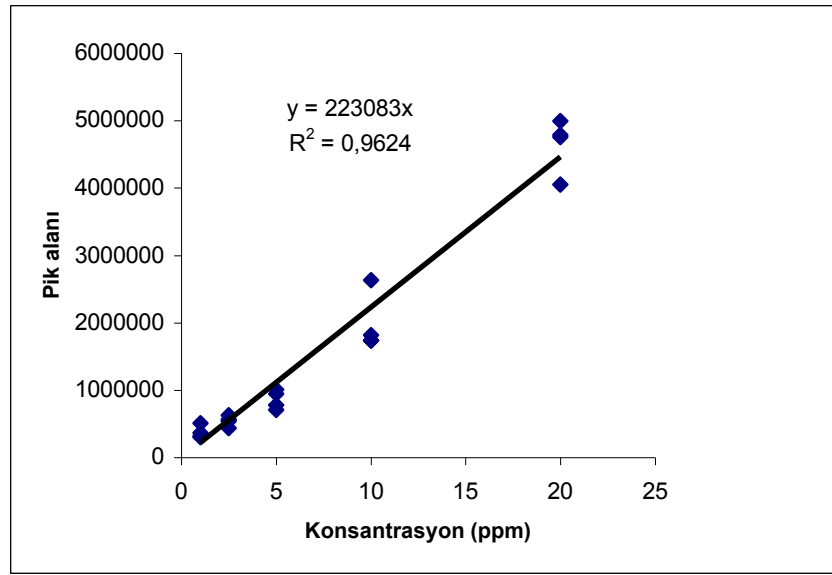
4.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi(HPLC) Yöntemi ile Hidroksiprolin Tayini

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisiyle hidroksiprolin tayini yapılabilmesi için öncelikle hidroksiprolin pikinin en iyi ayırtedilebildiği ve en yüksek floresans şiddetini verdiği koşulların seçimi gereklidir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi çalışma koşulları hidroksiprolin pikinin Şekil 4.1.'de verilen kromatogramdaki ayırımına göre ayarlanmıştır. Hidroksiprolinin kolonda alıkonma süresi 16.5 dakikadır.



Şekil 4.1. Hidroksiprolin standart kromatogramı (10 ppm).

HPLC ile analiz öncesi standart hidroksiprolin çalışma çözeltileri kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi standart hidroksiprolin çalışma çözeltileri konsantrasyonuna karşılık pik alanı alınarak çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin determinant katsayısı (R^2) 0,9624 olarak bulunmuştur ($P<0.05$). Bu eğrinin denklemi ve numunelerden elde edilen pik alanı değerleri hidroksiprolin miktarının tahminlenmesinde kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Hidroksiprolin için HPLC kalibrasyon eğrisi (n= 2 tekrar ve her tekrar için 2 enjeksiyon).

Salam, sosis ve sucuk numunelerinde HPLC yöntemi ile elde edilen hidroksiprolin miktarları Tablo 4.2.’de verilmiştir. Hidroksiprolin miktarı salam numunelerinde %0.045-0.198 aralığında, sosis numunelerinde %0.062-0.108 aralığında ve sucuk numunelerinde ise %0.061-0.072 aralığında değişmektedir. HPLC yönteminden elde edilen sonuçlara göre numunelerde bulunan hidroksiprolin miktarı standartın izin verdiği maksimum değer altındadır.

Tablo 4.2. HPLC yöntemi ile elde edilen hidroksiprolin miktarları (%)

NUMUNE NO	SALAM	SOSİS	SUCUK
1	0.198±0.038	0.108±0.016	0.061±0.005
2	0.119±0.022	0.062±0.011	0.065±0.003
3	0.166±0.012	ND ^a	0.072±0.005
4	0.138±0.012		
5	0.045±0.017		
6	ND ^a		

^aTayin edilemeyen miktar “not detected”

Salam, sosis, sucuk numunelerine ait kromatogramlardan örnekler EK A (Şekil A.1.-A.10.)’da verilmiştir.

4.2.1. Geri Kazanım Değerleri

Analizlenen numunelerde çalışmada kullanılan hidroksiprolin tayin metotunun doğruluğunun değerlendirilebilmesi için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Numunelere bilinen miktarda hidroksiprolin ilave edilerek ortalama %geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Analizlenen numuneler içinde en düşük miktarda hidroksiprolin bulunan numuneler geri kazanım çalışması için (5 numaralı salam, 2 numaralı sosis ve 1 numaralı sucuk) seçilmiştir. Numunelere %0.050 ve %0.200 iki düzeyde hidroksiprolin ilave edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.3.'de verilmiştir.

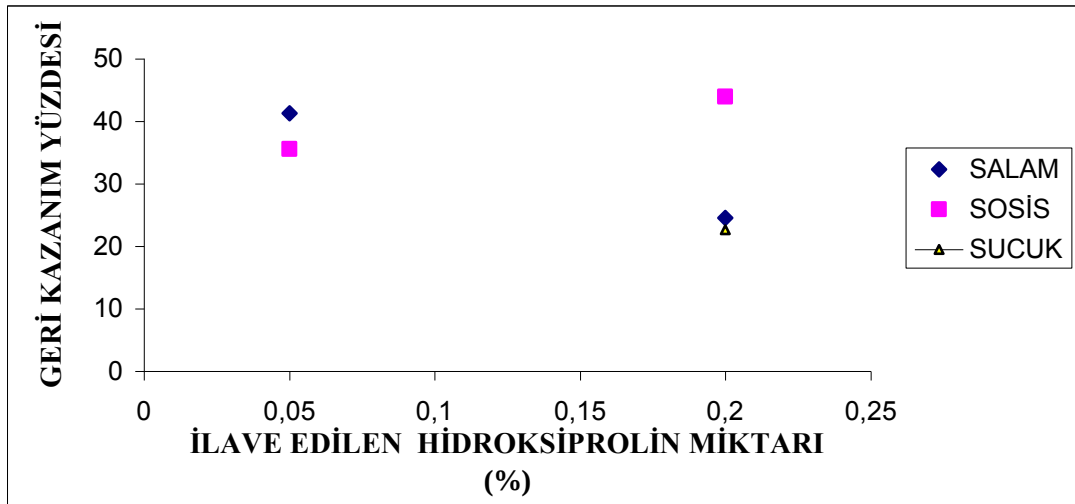
Tablo 4.3. HPLC ile analiz sonuçlarının standart sapma, % geri kazanım değerleri ve % varyasyon katsayıları.

Numune	Aşıl原因an Miktar (%)	Tayin Edilen Miktar (%) ^a	Standart Sapma	Geri Kazanım (%)	Varyasyon Katsayısı (%)
Salam No. 5	0.050	0.0207	0.0720	41.32	34.80
	0.200	0.0498	0.1688	24.50	34.40
Sosis No. 2	0.050	0.0178	0.0445	25.10	25.54
	0.200	0.0878	0.0957	43.91	10.90
Sucuk No. 1	0.050	ND			
	0.200	0.04534	0.0602	22.67	13.30

^a Tablodaki değerler 2 tekrarın ve 2'şer enjeksiyonun ortalamasını temsil etmektedir.

İki farklı düzeyde hidroksiprolin ilave edilen numunelere ait kromatogramlar EK A (Şekil A.11.- A.15.)'da verilmiştir.

Metot doğruluğunu belirlemek için incelenen %geri kazanım değerleri; salam numunesinde %24.50-41.32, sosis numunesinde %35.54-43.91 ve sucuk numunesinde %22.67 olarak bulunmuştur. Numuneler için % geri kazanım değerlerinin aşılama düzeyleri ile değişimi Şekil 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.3. HPLC yönteminde % geri kazanım değerlerinin değişimi (n= 2 tekrar ve her tekrar için 2 enjeksiyon).

Smith ve Judge (1991) kas hidrolizatlarına iki düzeyde hidroksiprolin ilave etmiş ve tavuk kasında %100-105, sığır kasında %100-102 ve koyun kasında %102-107 aralığında geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Alves ve diğ.(2000) tarafından yapılan çalışmada şarap numunelerinde ortalama %108.3 geri kazanım değeri bulunmuştur. Einarsson(1985) serum örneğinde geri kazanım yüzdesini 98 olarak bulmuştur.

Şarapta PITC ile türevlendirme sonrası HPLC ile analiz yapılmış ve hidroksiprolin için %100.7 geri kazanım elde edilmiştir (Buxaderas ve Deu-Pig, 1994). Jones ve diğ. (1986), hidroksiprolin analizi için türevlendirici olarak NBD-Cl kullanmış ve tavuk eti hidrolizatları için %90-102 geri kazanım ve domuz eti hidrolizatları için %100-102 aralığında geri kazanım değerleri bulmuştur.

Geri kazanım değerlerinin düşük olması numunede mevcut primer amino asitlerin miktarının yüksek olması ile ilişkili olabilir. Türevlendirme iki aşamada yapılmaktadır. İlk aşamada primer amino asitler OPA ile, ikinci aşamada sekonder amino asitler FMOC-Cl ile reaksiyona girmektedir. Kimyasallar ve 1. reaksiyon ürünlerinin 2. reaksiyon ile girişim yapmaması gerekir. Primer amino asitlerin FMOC-Cl ile reaksiyona girmesi ile sekonder amino asit (hidroksiprolin, prolin) – FMOC-Cl reaksiyonunun verimi düşmüş olabilir (Einarson, 1985).

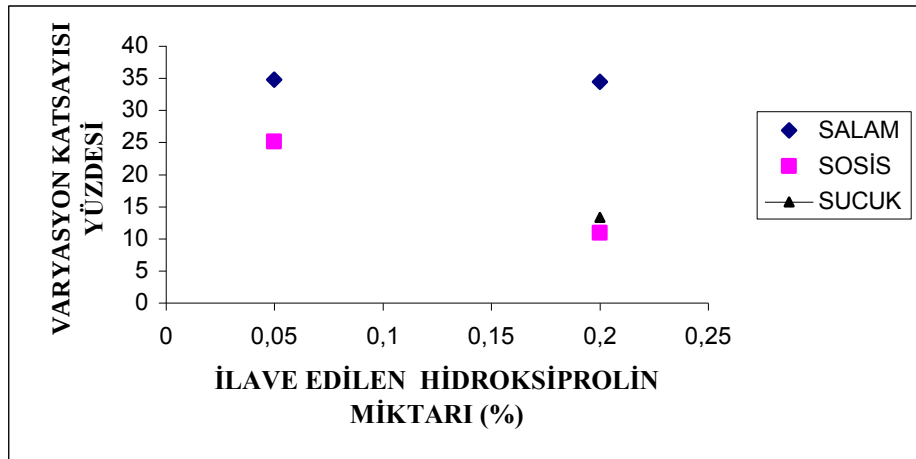
Sosiste geri kazanım yüzdesi daha yüksek bulunmuştur. Et ürünlerinde uygulanan ısıl işlem kolajenin çözünürlüğünü etkilemekle birlikte sosis hamuru prosesinde uygulanan ısıl işlem ile kolajen çözünmez (Zayas, 1997).

4.2.2. Varyasyon Katsayıları

Metotların kesinliği tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik terimleri ile ifade edilmektedir. Tekrar edilebilirlik istatistik olarak laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası varyasyon katsayılarının hesaplanması ile bulunmaktadır. Çalışma laboratuvarlar arası araştırma olmadığından, metotların kesinliği yalnızca laboratuvar içi % varyasyon katsayıları hesaplanarak bulunmuştur.

HPLC analiz sonuçlarının %varyasyon katsayıları (Tablo 4.3.); salam numunesinde %34.4-34.8, sucuk numunesinde %13.3 ve sosis numunesinde %10.9-25.1 aralığında olmuştur. Salam numunesinde hidroksiprolin ilave düzeyi arttıkça varyasyon katsayısında çok az bir azalma görülürken, sosis numunesinde %50'den fazla bir azalma gözlenmiştir.

Salam numunesinde her iki düzeyde ve sosis numunesinde düşük düzeyde yüksek varyasyon gözlenirken, sosis ve sucuk numunelerinde yüksek düzeyde düşük düzeye göre varyasyon katsayısında azalma gözlenmiştir. HPLC yönteminin analitik varyasyonu Şekil 4.4.'de verilmiştir.



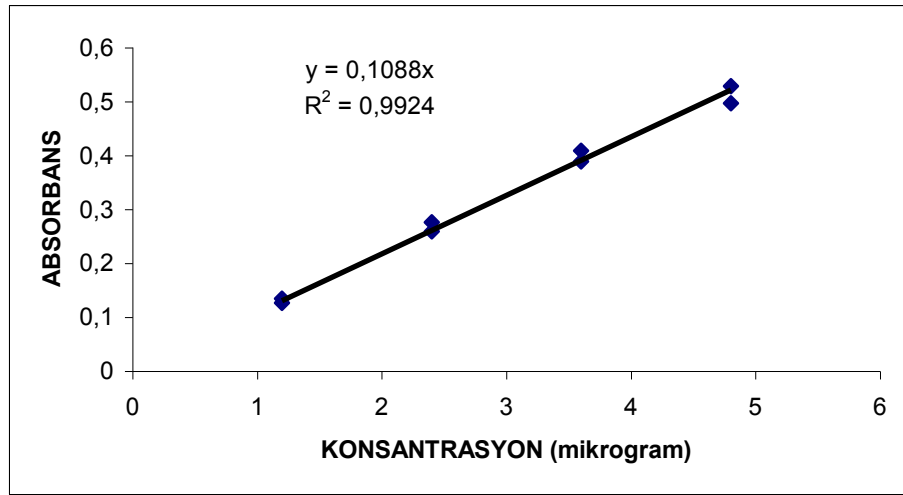
Şekil 4.4. HPLC yönteminde varyasyon katsayısının değişimi (n= 2 tekrar ve her tekrar için 2 enjeksiyon).

Alves ve diğ. (2000) şarapta yaptığı çalışmada varyasyon katsayısı %13.8, Arnold ve diğ.(1994) kahvede yaptığı çalışmada varyasyon katsayısı % 5.4 olarak bulunmuştur.

Sucuk numunesinin %0.05 düzeyinde hidroksiprolin ilavesinden sonra HPLC’de tayin edilememesi varyasyon katsayısının yüksekliği ile ilişkili olabilir. HPLC metodunda varyasyon katsayısının yüksek çıkması primer amino asit türevlerinin sekonder amino asit türevleriyle girişim yapması ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir.

4.3. Kolorimetrik Yöntem İle Hidroksiprolin Tayini

Kolorimetrik yöntem ile analizde standart hidroksiprolin çalışma çözeltileri kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi her konsantrasyon için 2 tekrar ile standart hidroksiprolin konsantrasyonuna karşılık absorbans değerleri alınarak günlük olarak hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi günlük hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi denklemi, numuneye ait absorbans değerleri hidroksiprolin miktarlarının tahminlenmesinde kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi Şekil 4.5.’te verilmiştir.



Şekil 4.5. Hidroksiprolin için kolorimetrik yöntem kalibrasyon grafiği.

Kolorimetrik yöntem ile salam, sosıs, sucuk numunelerinde elde edilen hidroksiprolin miktarları Tablo 4.4.’te verilmiştir. Salam numunelerinde hidroksiprolin miktarı %0.085-0.401, sosıs numunelerinde %0.132-0.218 ve sucuk numunelerinde ise %0.207-0.264 aralığında değişmektedir. Bir ve 4 nolu salam

numunesi, 2 ve 3 nolu sucuk numunesinin hidroksiprolin miktarları standartın izin verdiği maksimum değerin üzerindedir.

Tablo 4.4. Kolorimetrik yöntem ile elde edilen hidroksiprolin miktarları (%)

NUMUNE NO	SALAM	SOSİS	SUCUK
1	0.259±0.031	0.218±0.007	0.207±0.007
2	0.151±0.018	0.192±0.005	0.264±0.032
3	0.169±0.010	0.132±0.003	0.383±0.044
4	0.401±0.048		
5	0.110±0.010		
6	0.085±0.001		

4.3.1. Geri Kazanım Değerleri

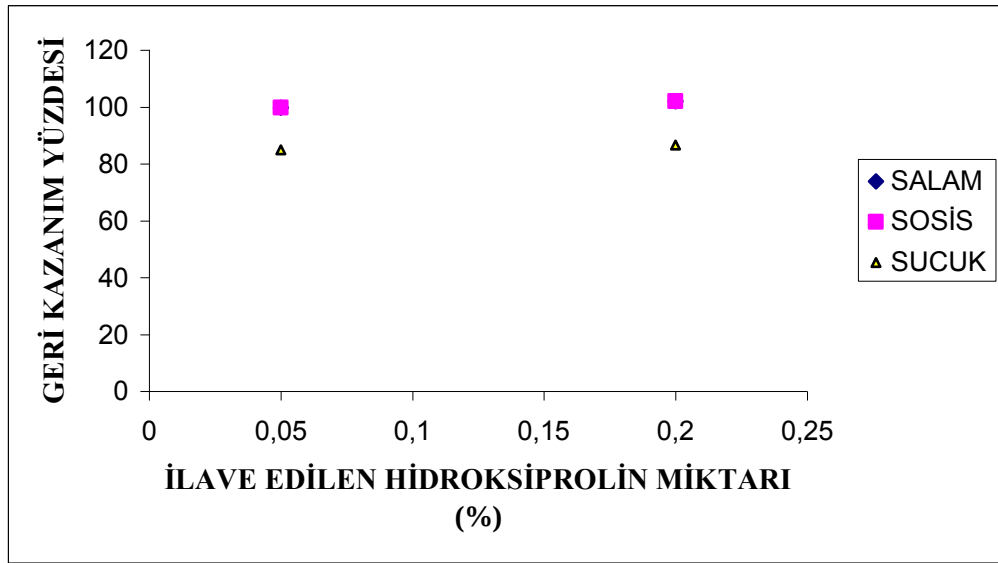
Seçilmiş olan sosıs, salam ve sucuk %0.050 ve % .200 düzeylerinde hidroksiprolin ilave edilerek ortalama % geri kazanım değerleri hesaplanmış, elde edilen verilerden yapılan istatıksel hesaplamalar Tablo 4.5.'te verilmiştir.

Tablo 4.5. Kolorimetrik yöntem ile analiz sonuçlarının standart sapma, % geri kazanım değerleri ve % varyasyon katsayıları.

Numune	Aşılana Miktar (%)	Tayin Edilen Miktar (%) ^a	Standart Sapma	Geri Kazanım (%)	Varyasyon Katsayısı (%)
Salam No. 5	0.050	0.0499	0.0035	99.8	6.91
	0.200	0.2038	0.0035	101.9	1.69
Sosis No. 2	0.050	0.0498	0.0003	99.7	0.57
	0.200	0.2041	0.0023	102	1.3
Sucuk No. 1	0.050	0.0424	0.0033	84.9	7.85
	0.200	0.1731	0.0029	86.6	1.33

^aTablodaki değerler 2 tekrarın ortalamasını temsil etmektedir.

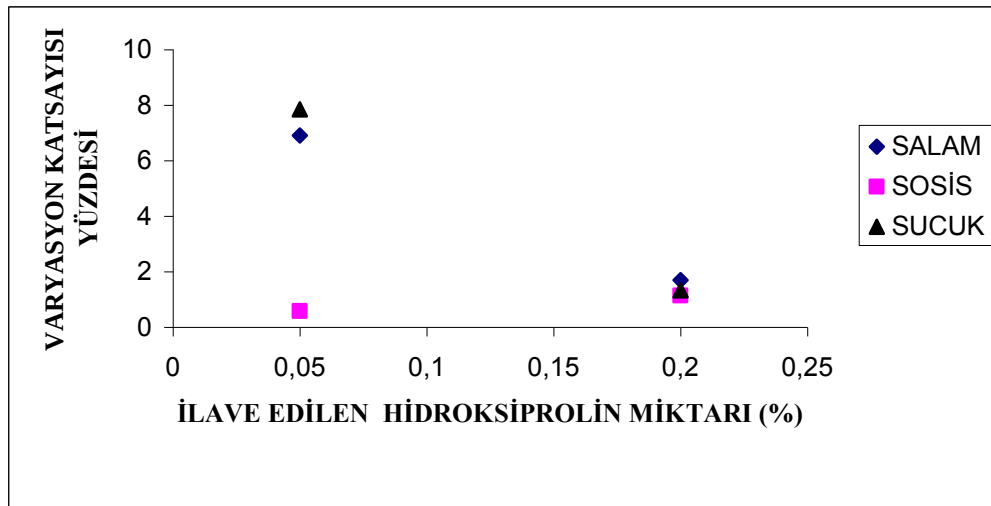
Salam numunesinde %99.8-101.9, sosıs numunesinde %99.7-102 ve sucuk numunesinde %84.9-86.6 aralığında geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Geri kazanım değerleri üç numunede de dar bir aralıkta değişmekte, ilave düzeyi arttıkça geri kazanım değeri çok az artmaktadır. Geri kazanım değerlerinin hidroksiprolin ilave düzeyleri ile değişimi Şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Kolorimetrik yöntem % geri kazanım değerlerinin değişimi (n= 2 tekrar).

4.3.2. Varyasyon Katsayıları

Salam numunesinde %1.69-6.91, sosis numunesinde %0.57-1.13 ve sucuk numunesinde %1.33-7.85 aralığında varyasyon katsayısı değerleri elde edilmiştir. Varyasyon katsayıları değerleri önemli bir değişkenlik göstermemektedir. Varyasyon katsayısı ilave edilen düzey arttıkça salam ve sucuk numunelerinde azalmakta, sosis numunesinde artmaktadır. Kolorimetrik yöntemin analitik varyasyonu Şekil 4.7.'te verilmiştir.

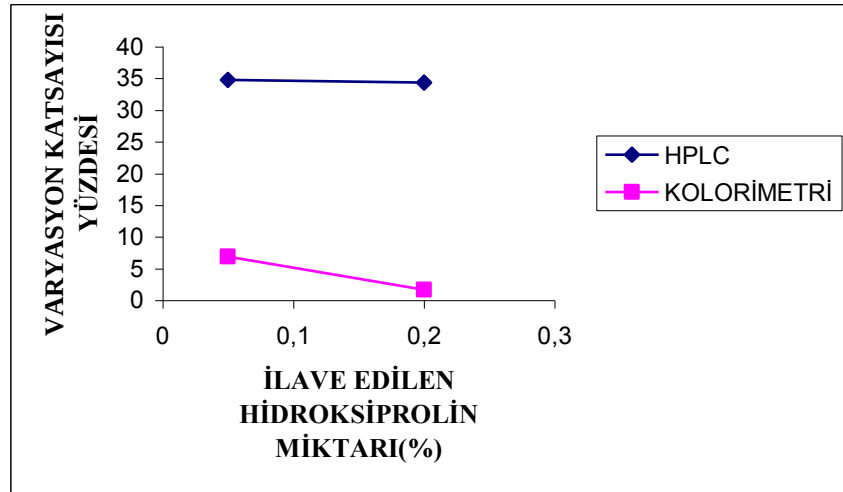


Şekil 4.7. Kolorimetrik yöntemde % varyasyon katsayısı değişimi (n= 2 tekrar).

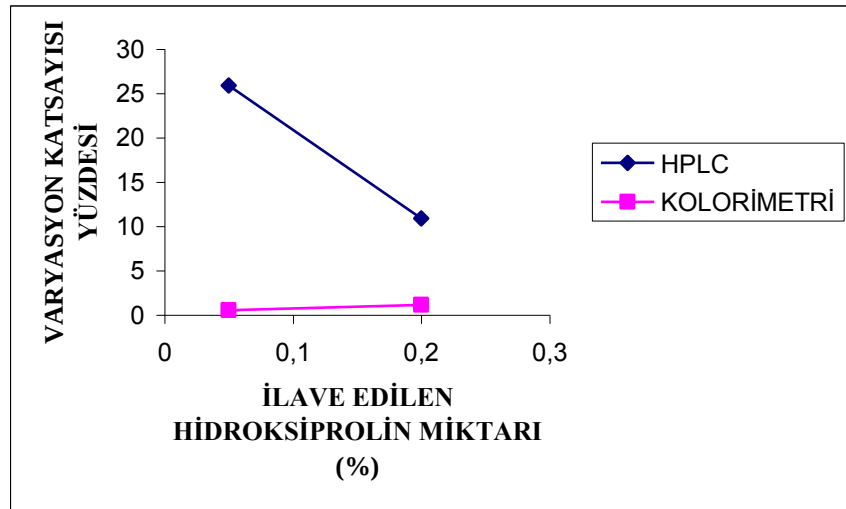
AOAC 990.26 metodu geliştirilirken sosis, jambon ve sığır eti kullanılmış ve varyasyon katsayısı %1.2-5.6 arasında değişkenlik göstermiştir (Kolar, 1990). Bu çalışmada kullanılan salam, sosis ve sucuk numunesinde elde edilen varyasyon katsayıları bu değerlere yakındır.

4.4. Analiz Metotlarının Karşılaştırılması

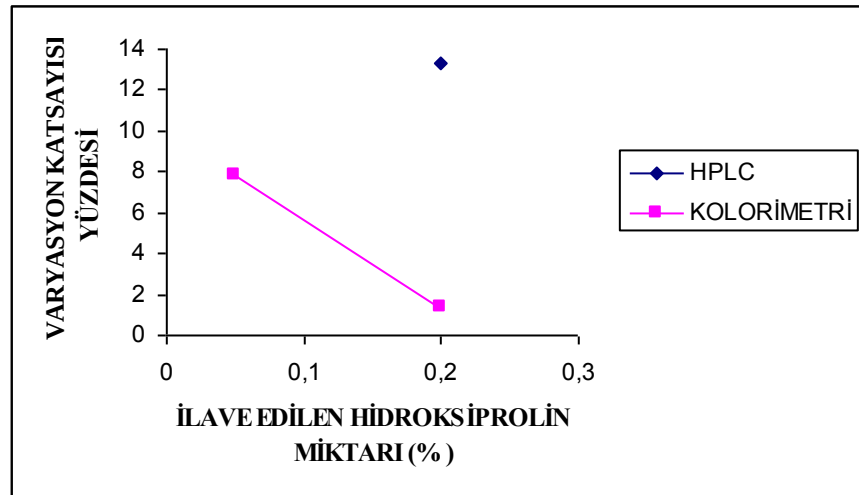
Salam numunesinde HPLC yönteminde aşılama düzeyi arttıkça varyasyon katsayısı çok az azalırken, kolorimetrik yöntemde daha fazla azalma görülmektedir. Sosis numunesinde HPLC yönteminde aşılama düzeyi artışıyla varyasyon katsayısı %50 fazla azalırken, kolorimetrik yöntemde artış görülmektedir. Sucuk numunesinde kolorimetrik yöntemde ilave düzeyi arttıkça varyasyon katsayısı azalmaktadır. İki yöntemde varyasyon katsayısı değişimleri salam için Şekil 4.8.'te, sosis için Şekil 4.9.'da, sucuk için Şekil 4.10.'da verilmiştir.



Şekil 4.8. Salam numunesinde varyasyon katsayısının iki yöntemde değişimi (n= 2 tekrar).

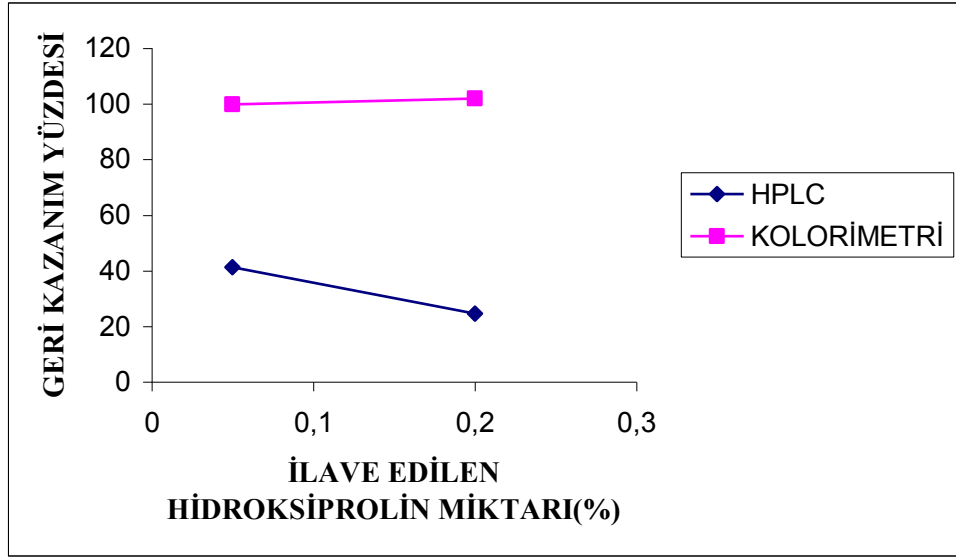


Şekil 4.9. Sosis numunesinde varyasyon katsayısının iki yöntemde değişimi (n= 2 tekrar).

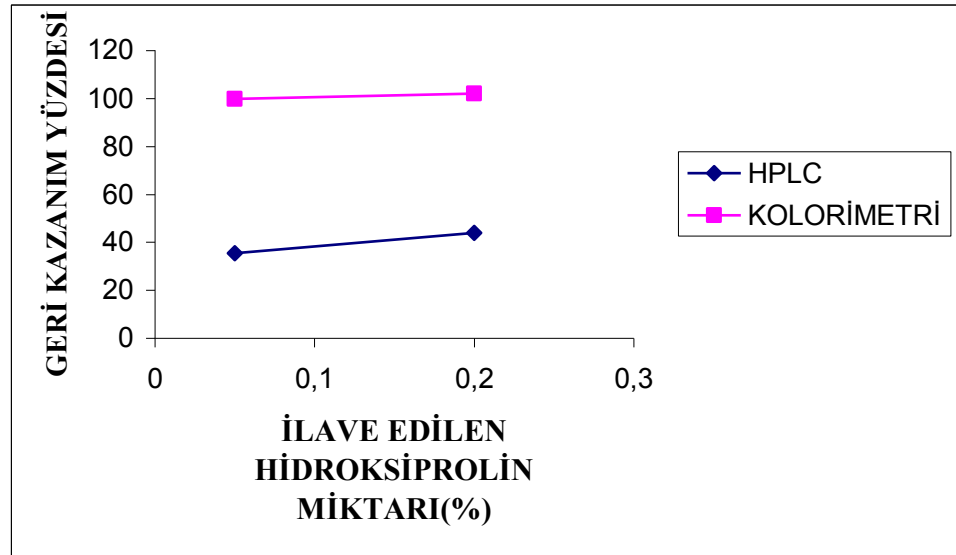


Şekil 4.10. Sucuk numunesinde varyasyon katsayısının iki yöntemde değişimi (n= 2 tekrar).

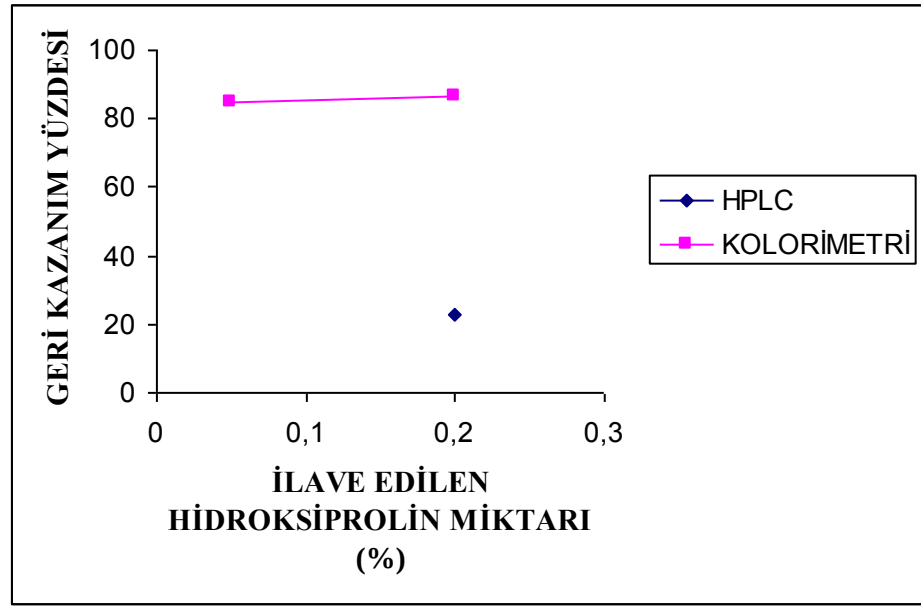
Geri kazanım değerlerinin aşılama düzeylerinde iki yöntemde değişimi salam numunesi için Şekil 4.11.'de., sosis numunesi için Şekil 4.12.'de ve sucuk numunesi için Şekil 4.13.'de verilmiştir. Kolorimetrik yöntemde her üç numunede aşılama düzeyi arttıkça geri kazanım değerlerinde çok düşük bir artış görülürken, HPLC yönteminde aşılama düzeyi artarken geri kazanım değerlerinde salam numunesinde azalma ve sosis numunesinde artış görülmektedir.



Şekil 4.11. Salam numunesinde geri kazanım değerlerinin her iki yöntemde değişimi (n= 2 tekrar).



Şekil 4.12. Sosis numunesinde geri kazanım değerlerinin her iki yöntemde değişimi (n= 2 tekrar).



Şekil 4.13. Sucuk numunesinde geri kazanım değerlerinin her iki yöntemde değişimi (n= 2 tekrar).

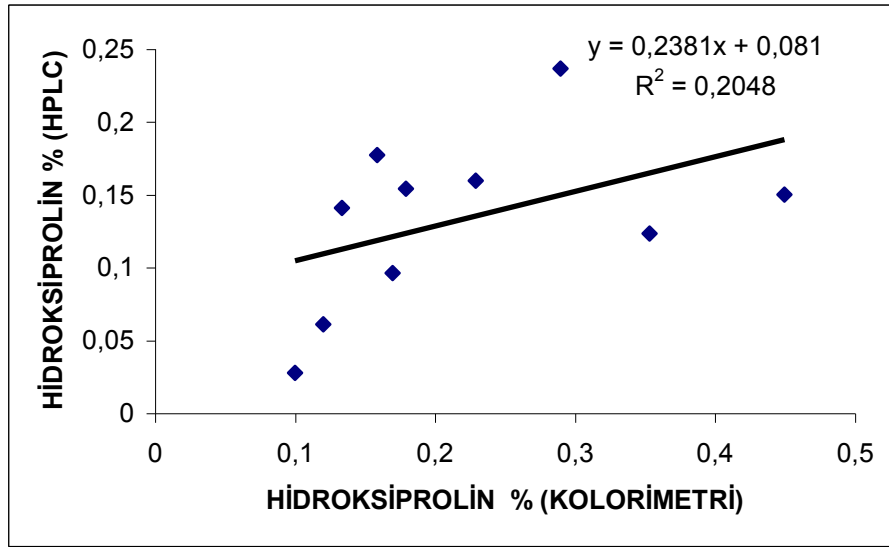
Hidroksiprolin tayininde kullanılan iki metot arasında farklılık eşli karşılaştırmalar yapılarak t-testi ile değerlendirildiğinde, $P < 0.05$ olasılık düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Ek B Tablo B.1, B.2. ve B.3.)

Smith ve Judge (1991)'nin tavuk, sığır ve koyun kasında FMOC-HPLC metodu ve kolorimetrik metodu (Bergman & Loxley metodu) karşılaştırdığı çalışmada metotlar arasında farklılık bulunmamıştır.

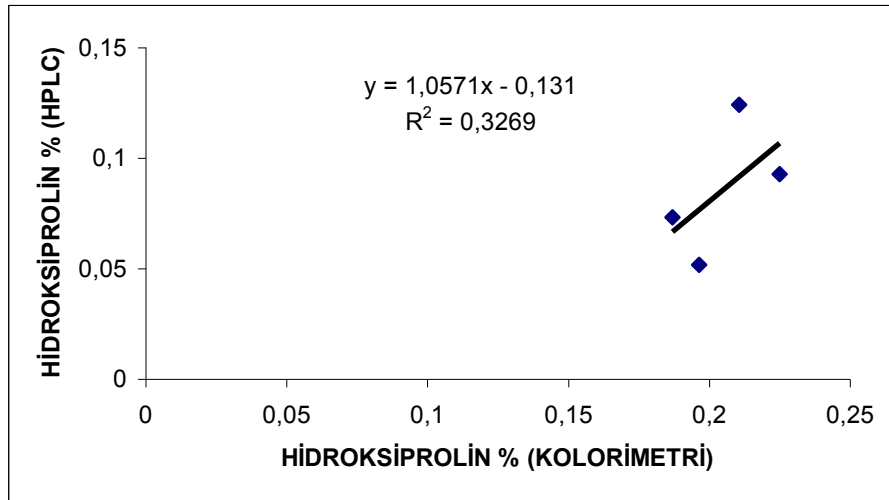
Jones ve diğ. (1986), tavuk etinde NBD-HPLC metodu ile kolorimetrik yöntemi (Stegemann metodu) karşılaştırmış ve metotlar arası farklılık bulmamıştır.

4.5. Analiz Metotlarının Birbirleriyle İlişkileri

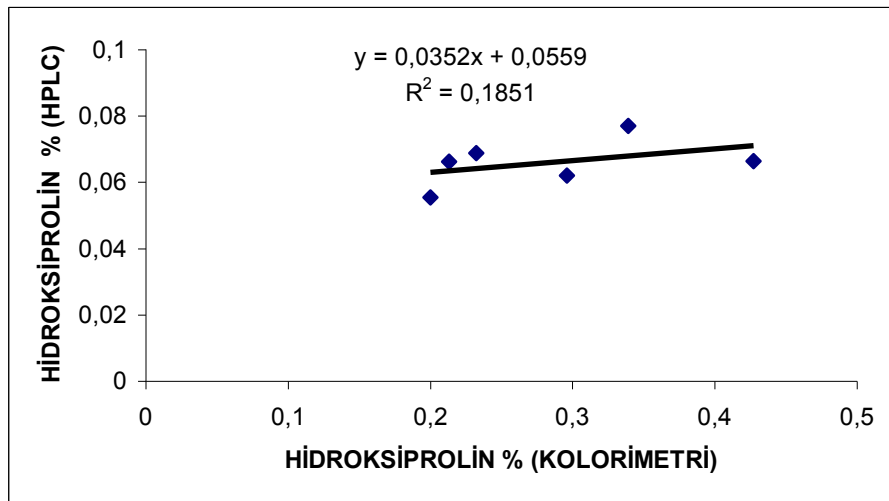
Salam, sosis, sucuk numunelerinde uygulanan iki farklı analiz metodu arasında regresyon denklemi ve eğrileri, HPLC bağımlı değişken kabul edilerek, salam için Şekil 4.14.'de, sosis için Şekil 4.15.'de ve sucuk için Şekil 4.16.'da verilmiştir.



Şekil 4.14. Salam numunesinde kolorimetri-HPLC yöntemleri regresyon eğrisi



Şekil 4.15. Sosis numunesinde kolorimetri-HPLC yöntemleri regresyon eğrisi



Şekil 4.16. Sucuk numunesinde kolorimetri-HPLC yöntemleri regresyon eğrisi

Metotlar arasında ilişkinin regresyon varyans analizi sonuçlarına göre (Ek B Tablo B.4., B.5., B.6.), üç numune için iki metot arasındaki ilişki $P < 0.05$ olasılık düzeyinde istatistiksel olarak önemsizdir. Sucuk numunesinde regresyon ilişkisi diğer numunelere göre daha zayıftır.

5. SONUÇ

Et ürünlerinin biyolojik değeri yüksek protein içeriği nedeniyle beslenmede önemli bir yeri vardır. Etin içerdiği ve proses esnasında ilave edilen bağ doku ürünün beslenme değerini ve kalitesini düşürmektedir. Bağ doku ilavesi ile ürünün fiyatı düştüğünden haksız rekabet meydana gelmektedir. Haksız rekabetin önlenmesi ve kaliteli et ürünü üretimi için bağ doku tespiti önemlidir. Bağ doku tespitinde hidroksiprolin tayininden yararlanılmaktadır. Türk Standartlarında salam, sucuk, sosis için bulunabilecek en yüksek hidroksiprolin miktarı verildiğinden bu ürünlerde hidroksiprolin analizi yapılması gerekmektedir.

Analiz metodunun kullanışlılığı; maliyet, zaman, ekipman ihtiyacı, eğitim düzeyi ve uygulanabilirlik parametrelerinden etkilenir. Metodun güvenilirliğini ise doğruluk, geri kazanabilirlik, tekrar edilebilirlik, duyarlılık, spesifiklik gibi karakteristikler tayin eder.

Hidroksiprolin tayini için kolorimetrik yöntem en yaygın kullanılan metottur. Kolorimetrik yöntem duyarlı ve güvenilir sonuçlar vermesine karşın uzun ve uygulanışı zordur. Kolorimetrik yönteme alternatif olarak kromatografik teknikler kullanılabilir. Bu nedenle son yıllarda amino asit analizlerinde HPLC tekniklerine yönelme olmuştur.

Çalışmada, Türk tipi sucuk, salam ve sosis numunelerinde HPLC ve kolorimetrik yöntem ile hidroksiprolin tayini yapılmıştır. Metotların performansları doğruluk, kesinlik, basitlik, hız ve kullanım kolaylığı açısından incelenerek, yöntemler arası ilişkiler istatistiksel olarak saptanmıştır.

Yapılan istatistiksel hesaplamalar ile $P < 0.05$ önem düzeyinde salam, sosis ve sucuk numunelerinde iki farklı analiz metodu arasında önemli farklılık bulunmuştur.

Geri kazanım çalışması sonuçları kolorimetrik yöntemin doğruluk ve tekrar edilebilirlik açısından HPLC yöntemine göre üstün olduğunu göstermiştir. HPLC yöntemi uygulanabilirlik, kolaylık, basitlik açısından kolorimetrik yöntemden üstündür. Her iki yöntemde de yetişmiş elemana gereksinim vardır. İki metot

arasında hız açısından bir fark görülmemiştir. Ekipman maliyeti açısından değerlendirildiğinde HPLC yönteminin maliyeti daha yüksektir.

Analizlenen 6 salam numunesinin 2 tanesi, 3 sucuk numunesinin 2 tanesi kolorimetrik analiz sonuçlarına göre standartta verilen miktarın üzerinde hidroksiprolin içermektedir.

HPLC yöntemi bağımlı değişken kabul edilip HPLC-kolorimetri yöntemleri arasında regresyon analizi yapıldığında ($P<0.05$) üç numunede de iki yöntem arasında ilişki istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- Alves, A., Ratola, N., Barros, P., and Herbert, P. 2000. HPLC Determination of Amino Acids in Musts and Port Wine Using OPA/FMOC Derivatives. *Journal of Food Science*, **65 (7)**, 1130-1133.
- Anhoff, M., Grundevik, I., Artvidsson, A., Fonselius, J., Persson, B.A., 1981. Derivization With 4-Chloro-7-Nitrobenzofuran for Liquid Chromatographic Determination of Hydroxyproline in Collagen Hydrolysate, *Analytical Chemistry*, **53**, 485-489.
- Anonim, 1983 .TS 1070. Sucuk Standardı, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara
- Anonim, 1984 . TS 980. Sosis Standardı, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- Anonim, 1987. Hydroxyproline in Pork, *Analyst*, **112**, 1169-1170
- Anonim, 1992. TS 979. Salam Standardı, Türk Standartları.Enstitüsü, Ankara.
- Anonim, 2001a. [http: // www.fao.org/docrep/](http://www.fao.org/docrep/)
- Anonim, 2001b. [http:// www.aps.uoguelp.ca/-swatland/ch2-3.htm](http://www.aps.uoguelp.ca/-swatland/ch2-3.htm)
- Anonim,2001c. [http:// www.clas.ufl.edu/users/tmullins/BCH3023/lecturenotes11](http://www.clas.ufl.edu/users/tmullins/BCH3023/lecturenotes11)
- Anonim, 2001d. [http:// www.aps.uoguelp.ca/-swatland/rep235nr.htm](http://www.aps.uoguelp.ca/-swatland/rep235nr.htm)
- AOAC, 1998. Meat and Meat Products: Method 990.26, Hydroxyproline in Meat and Meat Products, Chp. 39 in Official Methods of Analysis , pp. 13-15, 16th ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, USA.
- Arnold, U., Ludwig, E., Kühn, R., and Möschwitzer, U. 1994. Analysis of Free Amino Acid In Green Coffee Beans, *Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, **199**, 22-25.
- Asworth, R.B. 1987a. Amino Acid Analysis for Meat Protein Evaluation, *Journal of AOAC Int.*, **70 (1)**, 80-84.
- Asworth, R.B. 1987b. Ion-Exchange Separation of Amino Acids with Postcolumn OPA Detection, *Journal of AOAC Int.*, **70 (2)**, 248-252.
- Bailey, A.J., Warkup, C., Sims, T.J. and Avery, N.C.1996. Collagen Cross-linking in Porcine M. Longissimus lumborum: Absence of a Relationship With Variation in Texture at Pork Weight, *Meat Science*, **42 (3)**, 335-369.

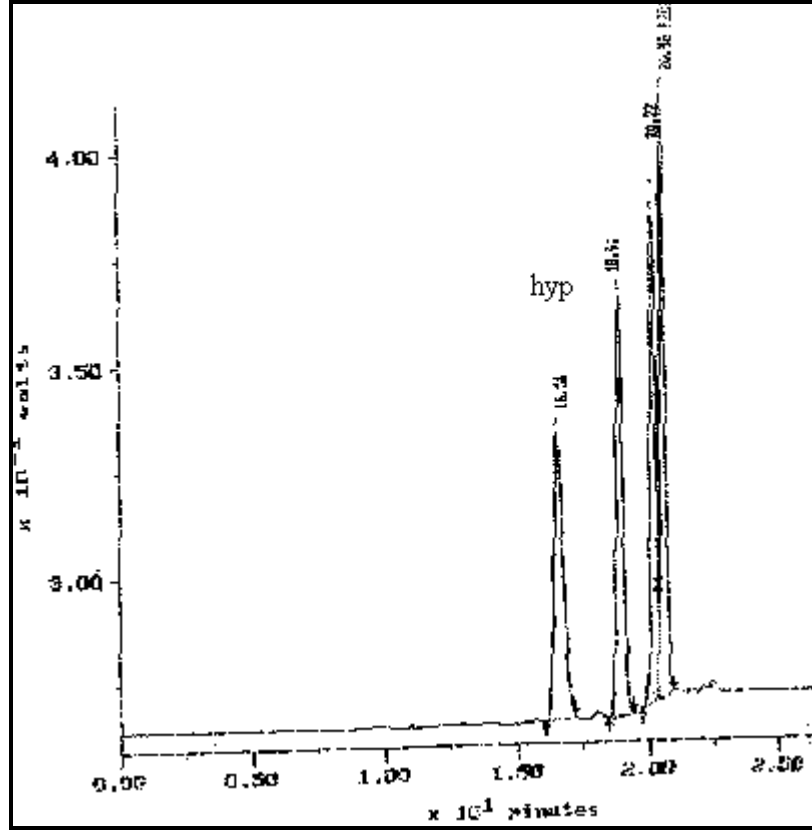
- Berg, B.S. 1982. Capillary Gas Chromatographic Determination of Meat Protein Amino Acids, *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **33 (1)**, 20-22.
- Bergman, I. and Loxley, R.1963. Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline, *Analytical Chemistry*, **35 (12)**, 1961-1965.
- Betner, I. and Földi, P. 1986. New Automated Amino Acid Analysis by HPLC Precolumn Derivatization with Fluorenylmethyloxycarbonylchloride, *Chromatographia*, **22 (7-12)**, 381-387.
- Bijker, P.G.H. and Koolmees, P.A., 1985. Histometric and Chemical Methods for Determining Collagen in Meats, *The Veterinary Quarterly*, **7(2)**, 84-89.
- Bracho, G.E. and Haard, N.F. 1990. Determination of Collagen Crosslinks in Rockfish Skeletal Muscle, *Journal of Food Biochemistry*, **14**, 435-451.
- Budras, K.D. and Katsaras, K. 1992. Microstructure of Fermented Sausage, *Meat Science*, **31**, 121-134.
- Buxaderas, S. and Deu-Puig, M 1994. Analytical Conditions for the Determination of 23 Phenylthiocarbamyl Amino Acids and Ethanolamine in Musts and Wines by HPLC, *Journal of Chromatography A*, **685**, 21-30.
- Cassens, R.G. 1994. Understanding Muscle and Meat, in *Meat Preservation, Preventing Losses and Assuring Safety*, pp. 19-23, Food & Nutrition Press, Inc., Connecticut.
- Cserhatti, T. and Forgacs, E. 1999. Macrocomponents in Food, in *Chromatography in Food Science and Technology*, pp.159-196, Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster.
- Dunphy, M.J., Bhide, M.V., Smith, D.J. 1987. Determination of Hydroxyproline in Tissue Collagen Hydrolysate by Derivatization and Isocratic Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, **420**, 394-397.
- Einarsson, S., Josefsson, B., and Lagerkvist, S. 1983. Determination of Amino Acids With 9-Fluorenylmethyl Chloroformate and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, **282**, 609-618.
- Einarsson, S. 1985. Selective Determination of Secondary Amino Acids Using Precolumn Derivatization with 9-Fluorenylmethylchloroformate and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, **348**, 213-220.
- Eskin, M. 1990. Biochemical Changes in Raw Foods: Meat and Fish in *Biochemistry of Foods*, pp. 1-10. Academic Press, Inc., New York.

- Etherington, D.J. and Sims, T.J. 1981. Detection and Estimation of Collagen, *Journal of Food Science and Agriculture*, **32**, 539-546.
- Feidt, C., Petit, A., Bruas-Reignier, F., and Brun-Bellut, J. 1996. Release of Free Amino-acids During Aging in Bovine Meat, *Meat Science*, **44** (1-2), 19-25.
- Girard, J.P. 1992. Cooking, Salting and Curing, Smoking, in *Technology of Meat and Meat Products*, pp. 32-72, 115-132, 165-201, Ellis Harwood Ltd., New York.
- Gustavsson, B. and Betner, I. 1990. Fully Automated Amino Acid Analysis for Protein and Peptide Hydrolysates by Precolumn Derivatization With 9-Fluorenylmethylchloroformate and 1-Aminoadamantane, *Journal of Chromatography*, **507**, 67-77.
- Haynes, P.A., Sheumack, D., Kibby, J., and Redmond, J.W. 1991. Amino Acid Analysis Using Derivatization With 9-Fluorenylmethyl Chloroformate and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, **540**, 177-185.
- Hunter, R.A., Harper, G.S., and Allingham, P.G. 1998. Effect of Growth Path on the Tenderness of the Semitendinosus Muscle of Brahman-cross steers, *Meat Science*, **48** (1/2), 65-73.
- Irvine, G.B., 1994. Amino Acid Analysis, in *Basic Protein and Peptide Protocols*, pp. 257-265, Ed. Walker, J.M., Humana Press, New Jersey.
- Johnson, S.K. 1988. The Determination of Hydroxyproline in Meat Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Meat Science*, **22**, 221-227.
- Jones, A.D. 1985. The Application of Reversed-Phase High-performance Liquid Chromatography in the Food Analysis Laboratory, *Analytical Proceedings*, **22**, 295-296.
- Jones, A.D., Homan, A.C., Favell, D.J. and Hitchcock, C.H. 1986. High-Performance Liquid Chromatographic Column Switching Method For The Determination of Hydroxyproline in Meat and Meat Products, *Journal of Chromatography*, **353**, 153-161.
- Kılıç, Z.E. 1997. Et Sektörü Üzerine, *Gıda ve Teknoloji*, **2** (3), 52-54.
- Kolar, K. 1990. Colorimetric Determination of Hydroxyproline as Measure of Collagen in Meat and Meat Products: NMKL Collaborative Study, *Journal of AOAC Int.*, **73**(1), 54-57.
- Lawrie, R.A. 1991. The Structure and Growth of Muscle, The Conversion of Muscle to Meat, Eating Quality of Meat, Meat and Human Nutrition in *Meat Science*, pp.30-33, 91-98, 200-213, 225, Pergamon Press, New York.

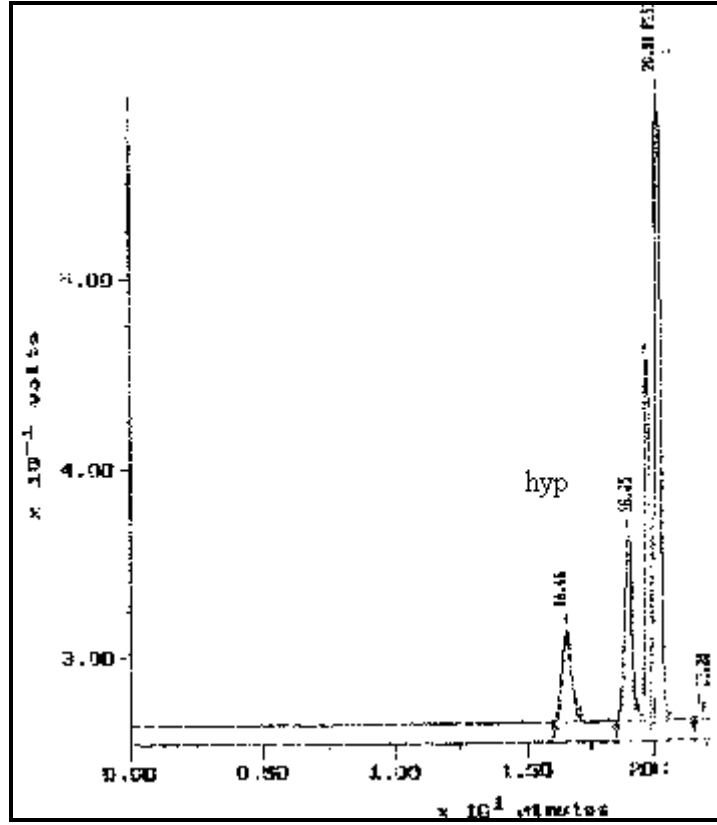
- Lüpke, M. and Brückner, H. 1998. Gas Chromatographic Evaluation of Amino Acid Epimerisation in the Course of Gelatin Manufacturing and Processing, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, **206**, 323-328.
- Malmer, M.F. and Schroeder, L.A. 1990. Amino Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography with Methanesulfonic Acid Hydrolysis and 9-Fluorenylmethylchloroformate Derivatization, *Journal of Chromatography*, **514**, 227-239.
- Moore, S. and Stein, W.H., 1951. Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins, *Journal of Biological Chemistry*, 663-681.
- Moore, S. and Stein, W.H. 1954. Procedures for The Chromatographic Determination of Amino Acids on Four Percent Cross-Linked Sulfonated Polystyrene Resins, *Journal of Biological Chemistry*, 893-906.
- Oh, E.K. and Grobklaus, O. 1995. Measurement of the Components in Meat Patties by Near Infrared Reflectance Spectroscopy, *Meat Science*, **41 (2)**, 157-162.
- Reagan, K. and Green, G.D. 1992. Determination of Hydroxyproline by High Pressure Liquid Chromatography, *Analytical Biochemistry*, **201**, 265-269.
- Regenstein, J.M. 1984. Primary Structure and Related Topics in *Food Protein Chemistry*, pp.71-72, Academic Pres, Inc., New York.
- Rothaupt, M. 1993. Food Analysis Introduction and Applications, pp. 82, Hewlett-Packard, Waldbrom.
- Schuster, R. 1988. Determination of Amino Acids in Biological, Pharmaceutical, Plant and Food Samples by Automated Precolumn Derivatization and High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, **431**, 271-284.
- Smith, E.L. 1983. Connective Tissue in *Principles of Biochemistry*, pp. 211-217 McGraw-Hill Book Company, New York.
- Smith, S.H. and Judge, M.D. 1991. An HPLC Method Using FMOC-ADAM for Determination of Hydroxyproline in Muscle, *Meat Science*, **30**, 351-357.
- Swatland, H.J. 1989. A Review of Meat Spectrophotometry, *Canadian Institute of Food Science and Technology*, **22 (4)**, 390-402.
- Swatland, H.J. 1994. Physical Measurements of Meat Quality: Optical Measurements, Pros and Cons., *Meat Science*, **36**, 251-259.
- Swatland, H.J., Madsen, N.T., and Nielsen, T. 1996. Fluorometry of Connective Tissue in Beef, Relative to Direction of Measurement, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **29**, 536-541.

- Takashi, K., Hattori, A., and Nismura, T. 1995. Structural Weakening of Intramuscular Connective Tissue During Conditioning of Beef, *Meat Science*, **39 (1)**, 127-133.
- Varnam, A. and Sutherland, J.P. 1995. Cured Meats, Cooked Meat and Cooked Meat Products, Cooked Cured Meats, in *Meat and Meat Products Technology, Chemistry and Technology*, pp.167-197, 224-258, Chapman & Hall, London.
- White, J.A. and Hart, R.J. 1992. Derivatization Methods for Liquid Chromatographic Separation of Amino Acids, HPLC Analysis of Amino Acids, in *Food Analysis by HPLC*, pp.53-73, 75-112, Ed. Nollet, L.M.L., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Wold, J.P., Lundby, F. and Egelanddal, B. 1999. Quantification of Connective Tissue (Hydroxyproline) in Ground Beef by Autofluorescence Spectroscopy, *Journal of Food Science*, **64(3)**, 377-383.
- Woosner, J.F. 1961. The Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of This Imino Acid, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **93**, 440-447.
- Zayas, J.F. and Naewbanu, J.O. 1986. The Influence of Microwave Heating on The Textural Properties of Meat and Collagen Solubilization, *Journal of Food Processing and Preservation*, **10**, 203-214.
- Zayas, J.F. 1997. Solubility of Proteins in *Functionality of Proteins in Food*, 11-12, 334-335, Springer, New York.

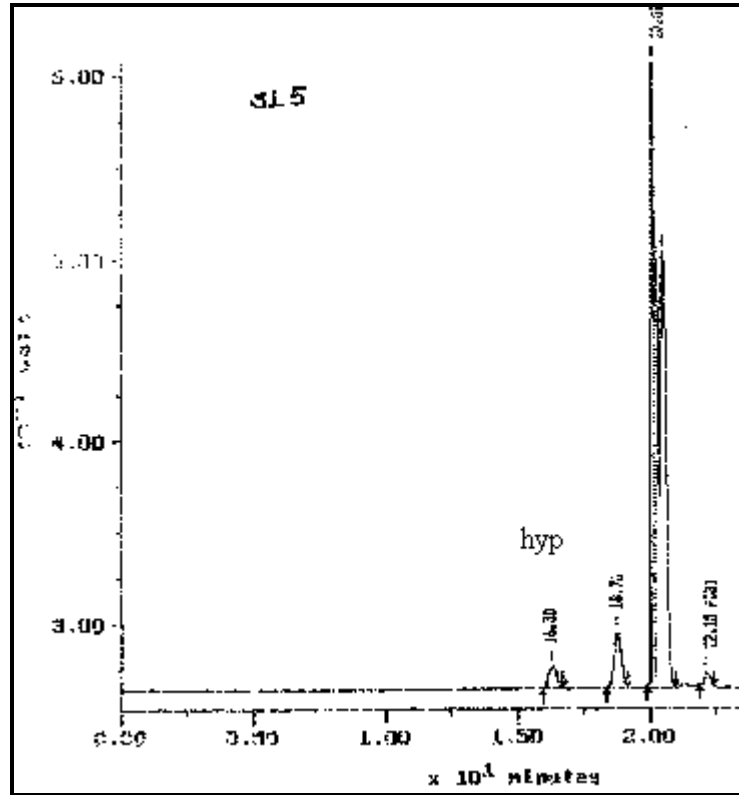
**EK A: YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ METODU SONUÇ
KROMATOGRAMLARI**



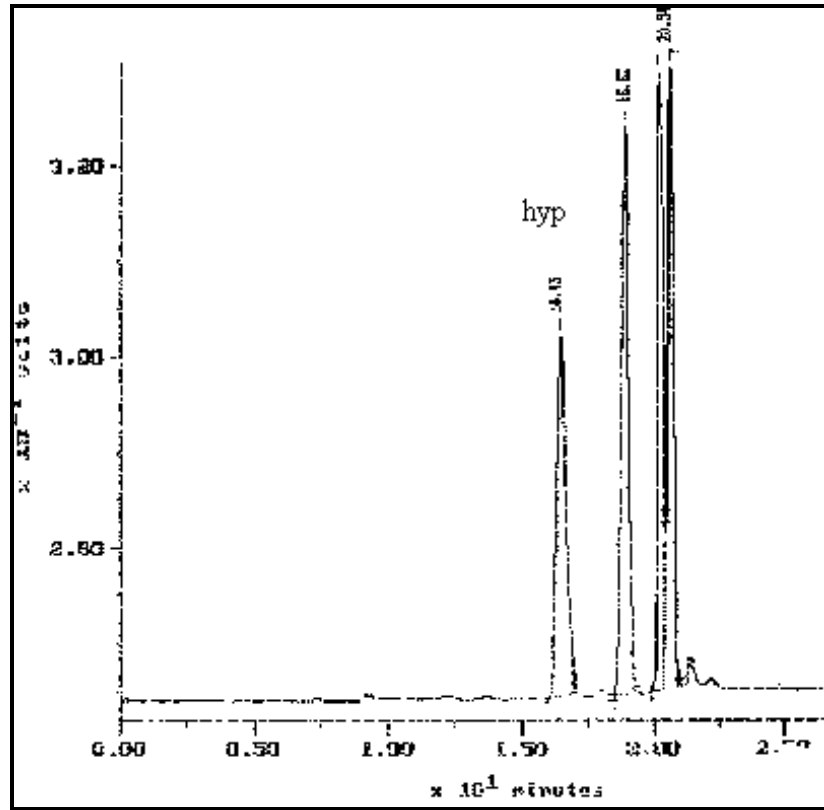
Şekil A.1. 1 nolu salam numunesinin HPLC kromatogramı



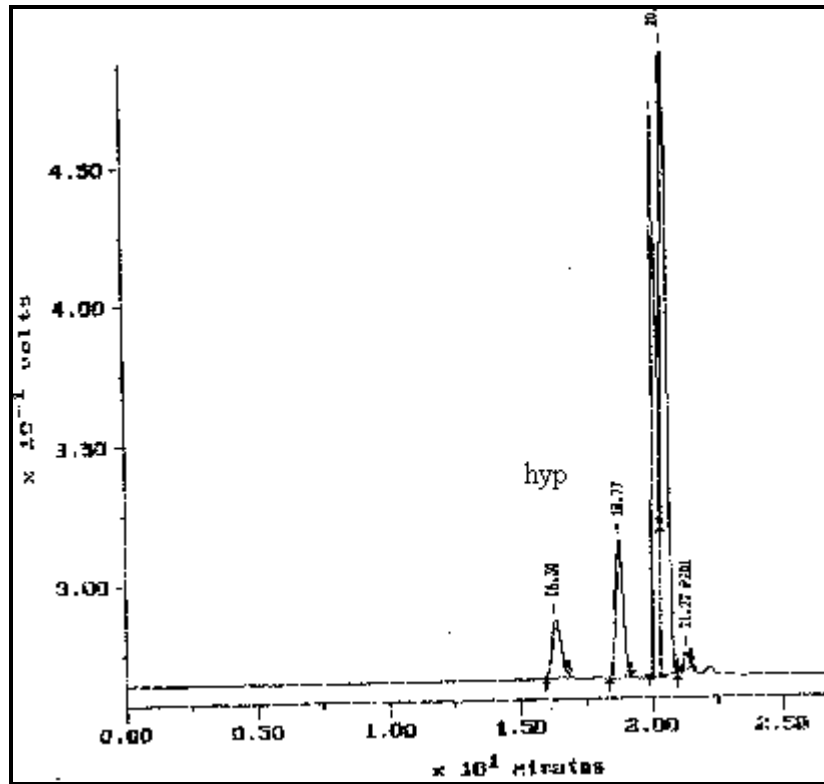
Şekil A.4. 4 nolu salam numunesinin HPLC kromatogramı



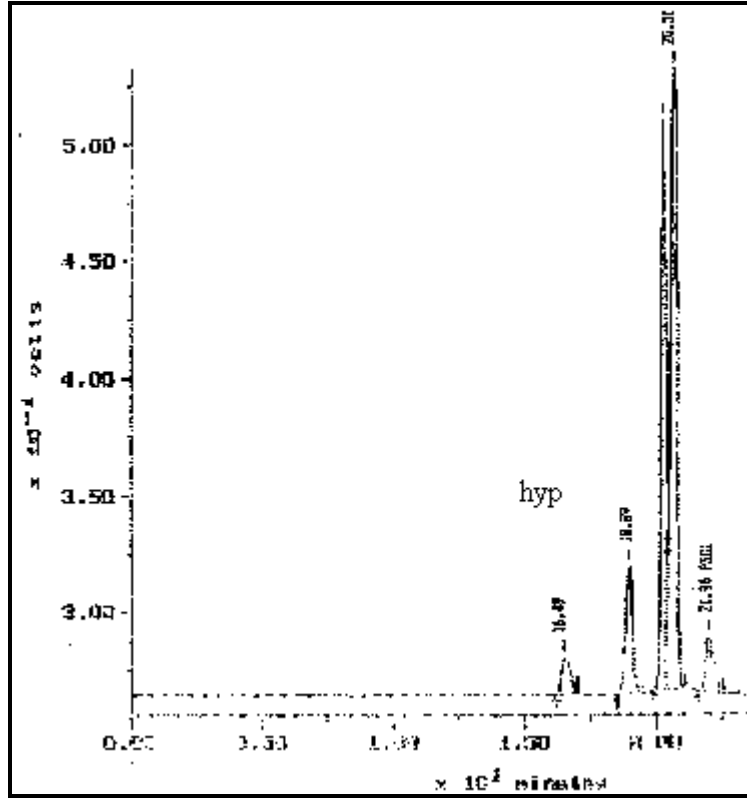
Şekil A.5. 5 nolu salam numunesi HPLC kromatogramı



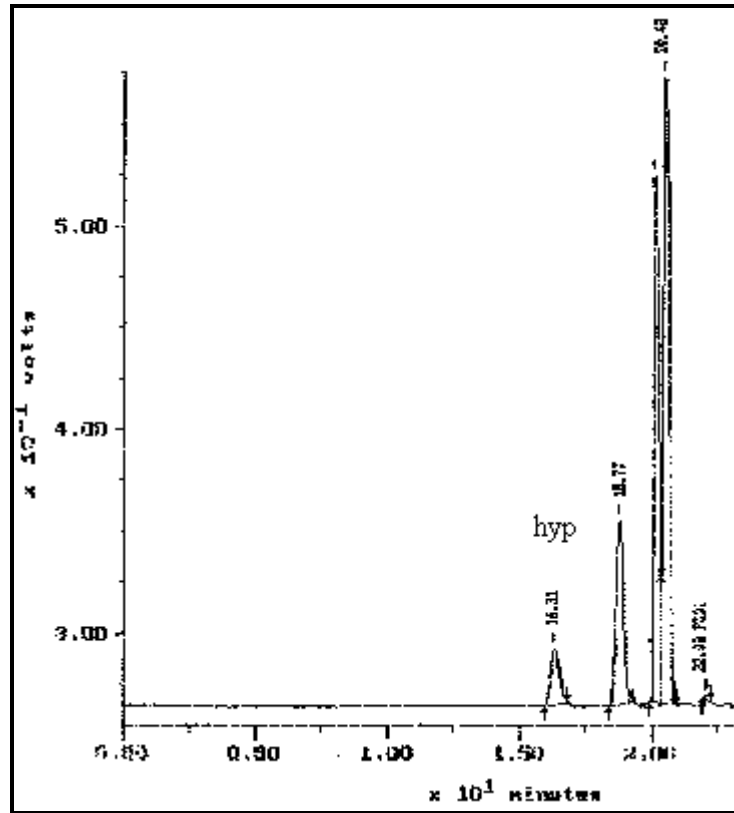
Şekil A.6. 1 nolu salam numunesinin HPLC kromatogramı



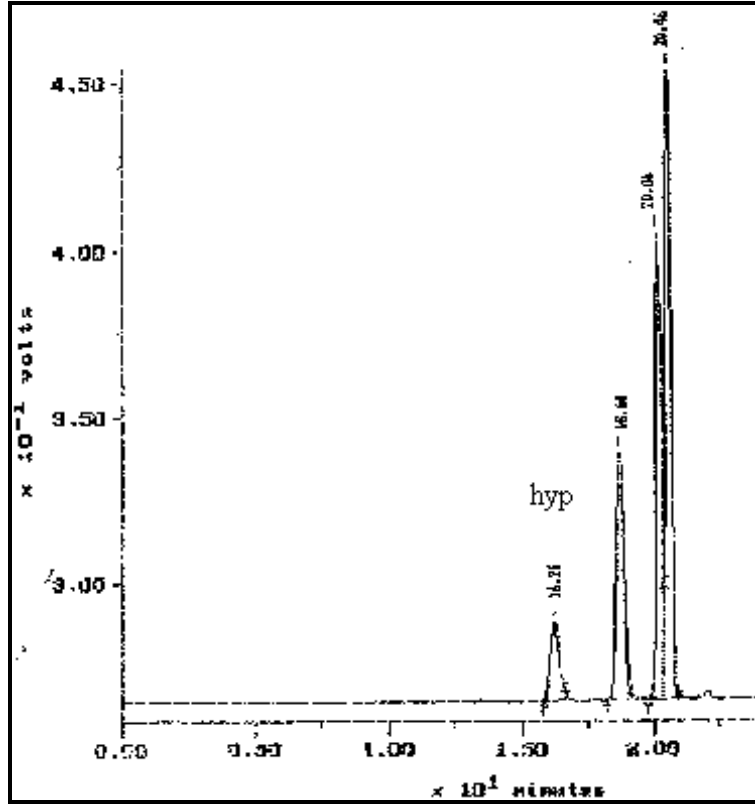
Şekil A.7. 2 nolu sosis numunesinin HPLC kromatogramı



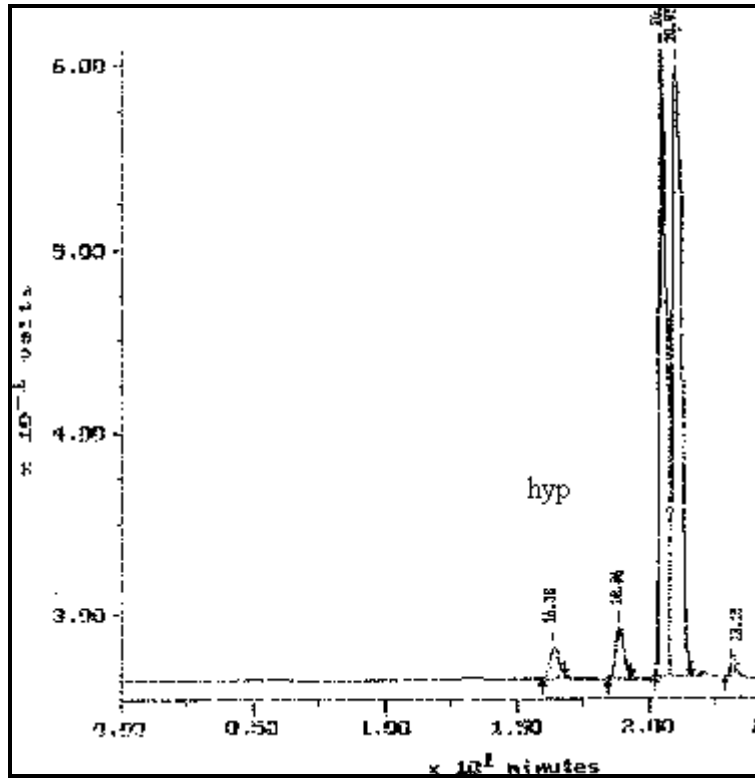
Şekil A.8. 1 nolu sucuk numunesinin HPLC kromatogramı



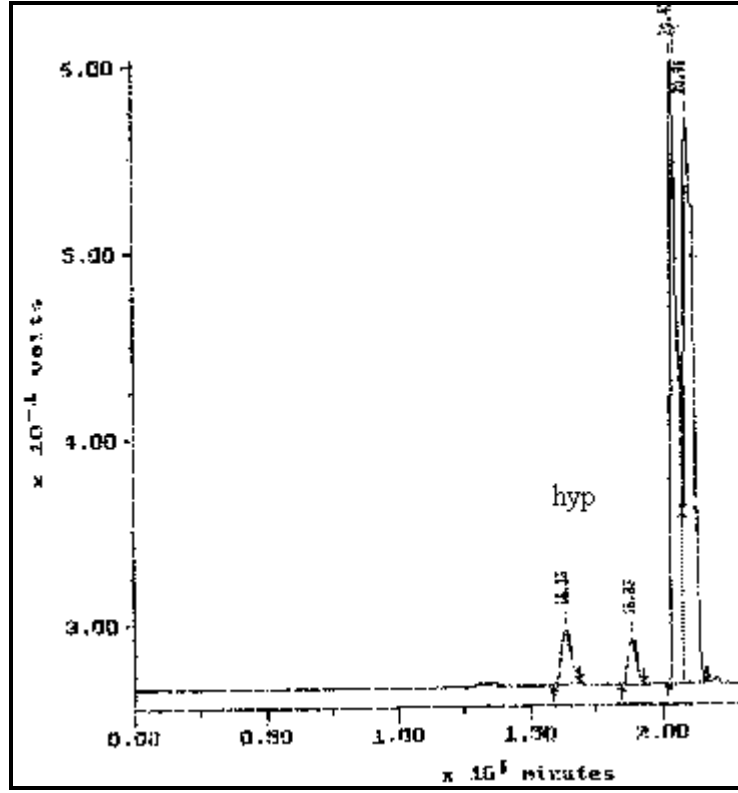
Şekil A.9. 2 nolu sucuk numunesinin HPLC kromatogramı



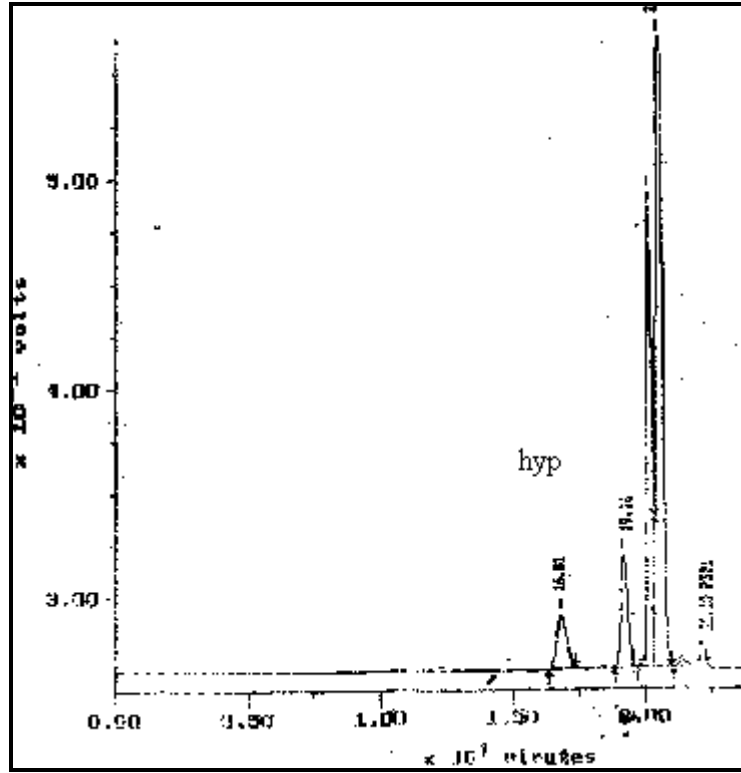
Şekil A.10. 3 nolu sucuk numunesinin HPLC kromatogramı



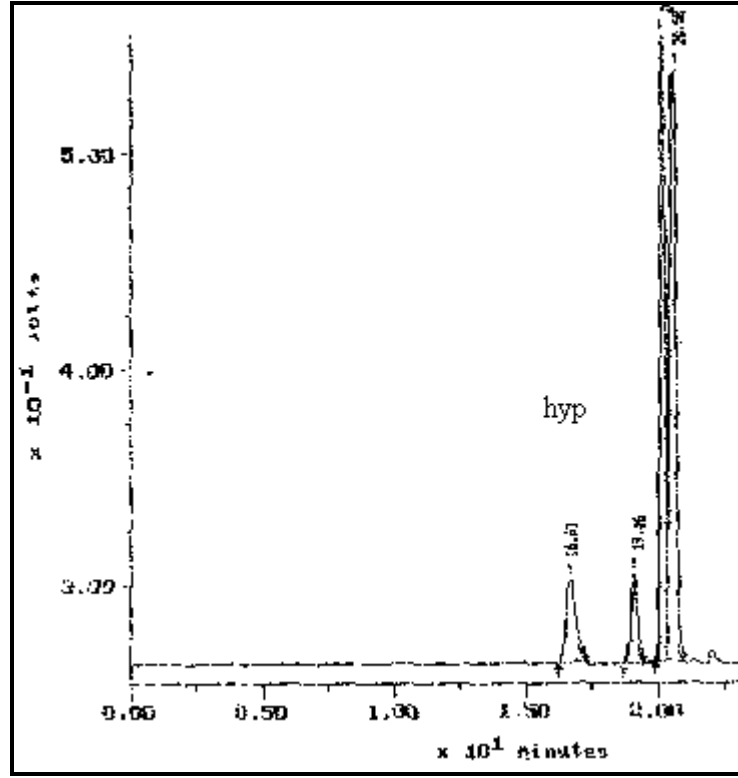
Şekil A.11. % 0.05 düzeyinde hidroksiprolin aşıl原因an salam numunesi HPLC kromatogramı



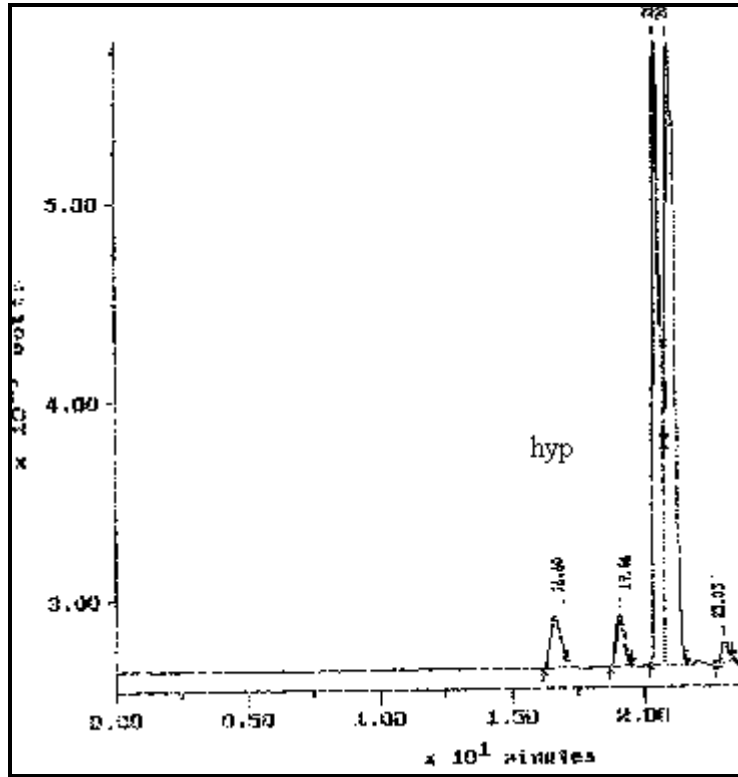
Şekil A.12. % 0.200 düzeyinden hidroksiprolin aşıl原因an salam numunesinin HPLC kromatogramı



Şekil A.13. % 0.050 düzeyinde hidroksiprolin aşıl原因an sosıs numunesi HPLC kromatogramı



Şekil A.14. % 0.200 düzeyinde hidroksiprolin aşıl原因 sosis numunesinin HPLC kromatogramı



Şekil A.15. % 0.200 düzeyinde hidroksiprolin aşıl原因 sucuk numunesinin HPLC kromatogramı

EK B. İSTATİSTİKSEL ANALİZ TABLOLARI

Tablo B.1. Salam numunesinin analizinde kullanılan iki farklı metot için t testi sonuçları

Ortalamalar Farkı	Std. Hata Farkı	S.D.	Önem Düzeyi	t değeri	Farkın % 95 güven aralığı	
					Alt	Üst
0.08504	0.03201	9	0.026*	2.657	0.01262	0.1575

Tablo B.2. Sosis numunesinin analizinde kullanılan iki farklı metot için t testi sonuçları

Ortalamalar Farkı	Std. Hata Farkı	S.D.	Önem Düzeyi	t değeri	Farkın % 95 güven aralığı	
					Alt	Üst
0.1064	0.02587	3	0.026*	4.112	0.02404	0.1887

Tablo B.3. Sucuk numunesinin analizinde kullanılan iki farklı metot için t testi sonuçları

Ortalamalar Farkı	Std. Hata Farkı	S.D.	Önem Düzeyi	t değeri	Farkın % 95 güven aralığı	
					Alt	Üst
0.2167	0.03461	5	0.001*	6.318	0.1297	0.3076

* P<0.05 olasılık düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir.

Tablo B.4. Salam numunesinin analizinde kullanılan metotlar için regresyon varyans analiz tablosu

VK	KT	S.D.	KO	F	Önem Düzeyi
Regresyon	0.00653	1	0.00653	2.061	0.189
Hata	0.17700	8	0.00883		
Toplam	0.19800	9			

Tablo B.5. Sosis numunesinin analizinde kullanılan metotlar için regresyon varyans analiz tablosu

VK	KT	S.D.	KO	F	Önem Düzeyi
Regresyon	0.000014	1	0.000014	0.010	0.930
Hata	0.002818	2	0.000141		
Toplam	0.002830	3			

Tablo B.6. Sucuk numunesinin analizinde kullanılan metotlar için regresyon varyans analiz tablosu

VK	KT	S.D.	KO	F	Önem Düzeyi
Regresyon	0.00006	1	0.00006	0.965	0.189
Hata	0.00021	4	0.00005		
Toplam	0.000258	5			

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında İstanbul’da doğdu. 1993 yılında İTÜ Kimya-Metalurji Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde lisans öğrenime başladı ve 1997 yılında mezun oldu. Yüksek lisansına aynı bölümün Gıda Mühendisliği Programı’nda 1999 yılında başladı. 2000 yılında gıda kontrol uzmanı olarak başladığı Milli Savunma Bakanlığı İstanbul Kalite Yönetim Bölge Başkanlığı Laboratuvar Müdürlüğü’nde görevini sürdürmektedir.