



**KÜTLE SPEKTROMETRİSİ TEMELLİ GLİKOMİK  
VE MAKİNE ÖĞRENİMİ İLE BAL TIPLERİNİN  
SINIFLANDIRMASI**

**2023  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ**

**Saad MASRİ**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Hacı Mehmet KAYILI**

**KÜTLE SPEKTROMETRİSİ TEMELLİ GLİKOMİK VE MAKİNE  
ÖĞRENİMİ İLE BAL TİPLERİNİN SINIFLANDIRMASI**

**Saad MASRİ**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Hacı Mehmet Kayılı**

**T.C.  
Karabük Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalında  
Yüksek Lisans Tezi  
Olarak Hazırlanmıştır**

**KARABÜK  
Temmuz 2023**

Saad MASRİ tarafından hazırlanan “KÜTLE SPEKTROMETRİSİ TEMELLİ GLİKOMİK VE MAKİNE ÖĞRENİMİ İLE BAL TIPLERİNİN SINIFLANDIRMASI ” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Hacı Mehmet KAYILI

.....

Tez Danışmanı, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından **Oy Birliği** ile Anabilim Dalınız Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 13/07/2023

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Doç. Dr. Mehmet Emrah YAMAN (AÜ.)

... (Çevrimiçi) ..

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ahmet REŞİT KAVSAOĞLU (KBU)

.....

Üye : Doç. Dr. Hacı Mehmet KAYILI (KBU)

.....

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, **Yüksek Lisans** derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Müslüm KUZU

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

*“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”*

Saad MASRİ

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### KÜTLE SPEKTROMETRİSİ TEMELLİ GLİKOMİK VE MAKİNE ÖĞRENİMİ İLE BAL TİPLERİNİN SINIFLANDIRMASI

Saad MASRİ

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Dr.Öğr.Üyesi Hacı Mehmet KAYILI

Temmuz 2023, 48 sayfa

Bal, şekerler, amino asitler, vitaminler, proteinler ve minerallerin karmaşık bir karışımıdır ve bileşimi çiçek kaynağına göre değişebilir. Literatürde bal sınıflandırmasına yönelik çabalar bulunmakla beraber bal sınıflandırmasına yönelik glikomik profillerinin kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, kütle spektrometresi tabanlı glikomik ve makine öğrenimi kullanarak bal tipi sınıflandırması (çiçek-çam) için bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. İlk olarak, Türkiye'nin farklı bölgelerinden 6 adet çam ve 8 adet çiçek balı üreticilerden temin edildi. Bal örneklerine ait proteinler ekstrakte edildi ve glikanları enzimatik olarak salındı. Sonrasında glikanlar 2-AA etiketi ile etiketlendikten sonra MALDI-MS ile analiz edildi. Analizler sonucunda çam ve çiçek balına ait glikan profilleri belirlendi. Toplam 76 adet farklı *N*-glikan yapısı belirlendi. Yüksek oranda deneysel tekrarlar arasında varlığı belirlenen 13 adet *N*-glikan profili, analizlerde kullanılmıştır. Her bir

glikanın göreceli bolluğu belirlendikten sonra istatistiksel olarak anlamlı değişen glikan profilleri belirlendi. İstatistiksel sonuçlara göre anlamlı değişiklik gösteren *N*-glikanlar Hex5HexNAc2, Hex4HexNAc3 ve Hex5HexNAc3 olarak bulunmuştur. 13 adet *N*-glikan ve istatistiksel olarak anlamlı değişen glikan profillerine bağlı olarak (3 adet) makine öğrenmesi algoritmaları ile çiçek-çam balı sınıflandırılması gerçekleştirildi. Makine öğrenmesi modellerinin performansı, doğruluk, kesinlik, MCC ve F1 puanı gibi metrikler kullanılarak değerlendirildi. 13 adet *N*-glikan profilli kullanıldığında doğruluk oranı %93.5 olarak bulunurken, bu oran istatistiksel olarak anlamlı değiştii belirlenen glikanlar kullanıldığında %100 olarak belirlenmiştir. En başarılı model “subspace ve weighted KNN” olarak belirlendi. Sonuçlarımız, kütle spektrometresi tabanlı glikomiklerin makine öğrenimiyle birleştiiğinde bal türlerini doğru bir şekilde sınıflandırabildiğini ve potansiyel olarak bal ürünlerinin kalite kontrolü ve kimlik doğrulaması için bir araç olarak kullanılabilceğini göstermiştir.

**Anahtar Sözcükler** : Bal, Bal sınıflandırması, *N*-Glikan, MALDI, Makine öğrenmesi, Kütle spektrometresi.

**Bilim Kodu** 92504

## **ABSTRACT**

**Master Thesis**

### **MASS SPECTROMETRY-BASED GLYCOMICS AND MACHINE LEARNING FOR CLASSIFICATION OF HONEY TYPES**

**Saad MASRI**

**Karabük University**

**Institute of Graduate Programs**

**Department of Biomedical Engineering**

**Thesis Advisor:**

**Asist. Prof. Dr. Hacı Mehmet KAYILI**

**July 2023, 48 pages**

Honey is a complex mixture of sugars, amino acids, vitamins, proteins, and minerals, and its composition can vary depending on the source of the flowers. Although there have been efforts in the literature to classify honey, there is currently no study using glycomic profiles for honey classification. This study aims to develop a method for classifying honey types (flower-pine) using mass spectrometry-based glycomic analysis and machine learning. Initially, 7 samples of pine honey and 8 samples of flower honey were obtained from producers in different regions of Turkey. Proteins from the honey samples were extracted, and glycans were enzymatically released. Subsequently, the glycans were labeled with 2-AA and analyzed using MALDI-MS. The glycan profiles of pine and flower honey were determined through these analyses, and a total of 76 different N-glycan structures were identified. Among these, 13 N-glycan profiles were found to be consistently present in high levels of

experimental replicates and were used in the analyses. After determining the relative abundance of each glycan, statistically significant changes in glycan profiles were identified. According to the statistical results, the N-glycans Hex5HexNAc2, Hex4HexNAc3, and Hex5HexNAc3 showed significant differences. Based on the 13 N-glycan profiles and the statistically significant glycan profiles (3 in total), honey classification between flower and pine honey was performed using machine learning algorithms. The performance of the machine learning models was evaluated using metrics such as accuracy, precision, MCC, and F1 score. When using the 13 N-glycan profiles, the accuracy rate was found to be 93.5%, and this rate was determined as 100% when the identified significant glycans were used. The most successful model was determined to be "subspace and weighted KNN." Our results demonstrate that when mass spectrometry-based glycomics is combined with machine learning, it can accurately classify honey types and potentially be used as a tool for quality control and authentication of honey products.

**Key Word** : Honey, Honey classification, N-Glycan, MALDI, Machine learning, Mass spectrometry.

**Science Code** :92504



## TEŞEKKÜR

Öncelikle beni bu yüksek ilmi mertebeye ulaştıran ve önümü açan Yüce Allah'a hamdlar olsun.

Değerli zamanını ve engin deneyimini aktararak araştırma çalışmalarına büyük katkı sağlayan, Sayın Dr.Öğr.Üyesi Hacı Mehmet Kayılı hocama sabrı ve paha biçilmez yorumları için şükranlarımı ifade etmeye kelimeler yetmez.

Bilimsel kariyerimde en büyük destekçim olan sevgili eşime, da ayrıca sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bunun yanı sıra projemde başından beri desteğim ve yardımcım olan dostum Nabil'e çok teşekkür ederim. Kuzenim ve dostum Ahmed'e de desteği ve zorluklarda yanımda olduğu için teşekkür etmek istiyorum. Çalışmada standart MALDI analizlerinin elde edilmesinde Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Kütle spektrometresi Araştırma Laboratuvar imkanlarını kullanmamızı sağlayan tüm araştırmacılara teşekkür ederim.

Son olarak, ailemden, özellikle de annem, babam dr.mahmoud masri, kardeşlerimden bahsetmemekle ihmal etmiş olurum. Bana olan inançları bu süreçte moralimi ve motivasyonumu yüksek tuttu. Son birkaç yıldaki muazzam anlayışları ve cesaretlendirmeleri olmasaydı, çalışmamı tamamlamam imkansız olurdu.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL .....	ii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiv
BÖLÜM 1 .....	1
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2 .....	3
LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1. GLİKOZİLASYON.....	3
2.1.1. Glikozilasyon Amacı .....	4
2.2. KÜTLE SPEKTROMETRESİ.....	5
2.2.1. Tarihsel Bir Perspektiften Kütle Spektrometresi.....	7
2.2.2. İyonizasyon Yöntemleri.....	8
2.2.3. Kütle Analizörleri ve MS/MS.....	13
2.2.4. Proteomik Analizlerde MS İş Akışları .....	15
2.3. GLİKAN ANALİZLERİ İÇİN ÖRNEK HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ....	16
2.3.1. N-Glikanların Salınımı .....	17
2.3.2. N-Glikanların Etiketlenmesi.....	17
2.3.3. N-Glikanların Saflaştırılması.....	18
2.4. BAL PROTEİNLERİ .....	19
2.4.1. Baldaki Proteinler Ve Amino Asitler .....	20
2.4.2. Bal Proteinini Ekstraksiyonu .....	20

	<b><u>Sayfa</u></b>
2.5. BAL SINIFLANDIRMASI KULLANILAN TEKNİKLER .....	21
2.5.1. Balın Gerçekliği.....	21
2.5.2. Bal Tespit Yöntemleri Ve Teknolojileri .....	22
2.6. TÜRKİYEDEKİ BAL TÜRLERİ .....	23
2.7. MAKİNE ÖĞRENİMİ .....	23
BÖLÜM 3 .....	26
MATERYAL VE YÖNTEM .....	26
3.1. KULLANILAN MALZEMELER.....	26
3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER .....	27
3.2.1. Bal Proteinleri Ekstrasyonu .....	27
3.2.2. Bal Glikoproteinlerinden N-glikanların Salınımı ve 2-AA İle Etiketlenmesi .....	27
3.2.3. N-Glikanların Salınımı HILIC Ve PGC Temelli Saflaştırılmaları .....	28
3.2.4. MALDI-TOF/TOF-MS Analizleri .....	29
3.2.5. Veri Analizleri .....	29
3.2.6. İstatiksel ve Makine Öğrenmesi Analizleri .....	29
BÖLÜM 4 .....	31
BULGULAR.....	31
4.1. BAL ÖRNEKLERİNİN MALDI-MS İLE PROFİLENMESİ.....	31
4.2. GLİKANLARIN BAL ÖRNEKLERİNE BAĞLI OLARAK İSTATİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ.....	32
4.3. BAL ÖRNEKLERİNİN MAKİNE ÖĞRENİMİ İLE SINIFLANDIRILMASI .....	34
4.3.1. Bal Örneklerinin Sınıflandırılması .....	34
4.3.2. Sınıflandırılmanın Modelin Değerlendirilmesi.....	38
BÖLÜM 5 .....	40
SONUÇLAR .....	40
KAYNAKLAR .....	42

ÖZGEÇMİŞ ..... 48

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kütle spektrometrenin şematik diyagramı.....	5
Şekil 2.2. Kütle spektrometresi blok diyagramı .....	6
Şekil 2.3. ESI kaynağının şematik diyagramı .....	10
Şekil 2.4. Elektrosprey iyonizasyonu sırasında önerilen iyon oluşum mekanizmaları	11
Şekil 2.5. MALDI iyonizasyon süreci .....	12
Şekil 2.6. Tandem kütle spektrometrisi şeması .....	14
Şekil 2.7. MALDI/MS proteomiks analizinin iş akışı .....	16
Şekil 2.8. Bal kimlik doğrulaması için kullanılan geleneksel ve modern analitik yönteml.....	22
Şekil 2.9. Türkiyedeki bal türleri ile yöreleri .....	23
Şekil 2.10. Makine öğrenimi algoritmaları ve yaygın uygulamalar .....	25
Şekil 4.1. İş Akışı .....	31
Şekil 4.2. Çam ve çiçek balın bir örneğinin MALDI-MS analizi .....	32
Şekil 4.3. Çam balı ve Çiçek balı tüm glikanların temel bileşen analizi .....	33
Şekil 4.4. Çam balı ve çiçek balı arasındaki anlamlı farklılık gösteren glikanlar temel bileşen analizi .....	34
Şekil 4.5. Tüm glikanlar için KNN skoru oranı.....	35
Şekil 4.6. AUC değeri ve ROC eğrisi .....	36
Şekil 4.7. KNN skoru oranı .....	37
Şekil 4.8. AUC değeri ve ROC eğrisi .....	37
Şekil 4.9. AUC değeri ROC eğrisi ile ilişkisi .....	39

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Tablo 3. 1. Kullanılan çiçek ve çam ballarına ait bilgi .....	26
Tablo 4. 1. Sınıflandırma modellerinin değerleri.....	38

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

$\alpha$ -	: Alpha
m/z	: Mass-to-charge ratio
Torr	: Unit of pressure
kDa	: Unit of Kilodalton
$\mu$ l	: Symbol for microliter
$^{\circ}$ c	: Celsius
Dk	: Minute
Mm	:Millimeter

## KISALTMALAR

(PTM)	: Post-translational modification
GLCNAC	: N-Acetylglucosamine
GPI	: Glycosylphosphatidylinositol
IR	: Infrared spectroscopy
NMR	: Nuclear magnetic resonance spectroscopy
MS	: Mass spectrometry
GC-MS	: Gas chromatography-mass spectrometry
EI	: Elektron iyonizasyonu
HPLC-MS	: Liquid chromatography–mass spectrometry
CE-MS	: Capillary electrophoresis–mass spectrometry
FAB	: Fast atom bombardment
APCI	: Atmospheric-pressure chemical ionization
ESI	: Electrospray ionization
APPI	: Atmospheric pressure photoionization
LC-MS	: Liquid chromatography–mass spectrometry
DESI	: Desorpsiyon elektrosprey iyonizasyon
DART	: Direct analysis in real time
ICP	: Inductively coupled plasma
LMIS	: Liquid metal ion sources
SPE	: Samples by solid phase extraction
LLE	: Liquid-liquid extraction
Q	: Kuadropol kütle analizörü
QIT	: Quadrupole Ion Trap
ToF	: Time-of-flight
FT-ICR	: Fourier-transform ion cyclotron resonance
Asn-X-Ser/Thr	: Sequence of consecutive amino acids
PNGase F	: Peptide:N-glycosidase F
2-AA	: 2-Amino Acids
2-AB	: 2-aminobenzamide
2-AP	: 2-aminopyridine
C18	: Cyclo(18)carbon



SVM : Support vector machines  
SDS : Sodyum dodesil sülfat  
Rcf : Relative Centrifugal Force

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Bal, çiçeklerin nektarından arılar tarafından üretilen doğal bir tatlandırıcıdır. Balın bileşimi, botanik ve coğrafi orijinin yanı sıra işleme ve saklama koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterir. Bu nedenle, balın kalitesi ve orijinalliği konularında güvenilir analitik yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir. Bu tezde, kütle spektrometrisine dayalı glikomik ve makine öğrenimi kullanarak bal türleri sınıflandırması için yeni bir yaklaşım geliştirmeyi amaçlıyoruz.

Balın içeriğinde bulunan karbonhidratlar, amino asitler, vitaminler ve mineraller gibi bileşenler, balın besleyici ve terapötik özelliklerini belirleyen önemli faktörlerdir. Ancak, balın kalitesi ve orijinalliği, pazarda yaygın olarak görülen tağşiş ve yanlış etiketleme gibi sorunlar nedeniyle bir endişe kaynağı olmuştur.

Birçok analitik teknik arasında, kütle spektrometrisine dayalı glikomik yöntemler, balın karbonhidrat bileşenlerinin ayrıntılı analizi için etkili bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntem, bal örneklerindeki karmaşık karbonhidrat yapılarını tanımlamak ve miktarlarını belirlemek için kütle-yük oranlarını ve parçalanma modellerini analiz eder. Bu sayede, monosakkarit bileşimleri, bağlantı türleri ve dallanma modelleri gibi bilgilere erişilerek bal karbonhidratlarının detaylı bir profilini elde etmek mümkün olur.

Ancak, bu karmaşık verilerin yorumlanması, geleneksel istatistiksel yöntemlerin sınırlamaları nedeniyle zor olabilir. Bu noktada, makine öğrenimi gibi gelişmiş veri analiz yöntemleri devreye girer. Makine öğrenimi algoritmaları, büyük miktarda veriyi işleyebilir ve insan gözlemcilerin gözden kaçırabileceği kalıpları veya ilişkileri belirleyebilir. Bu bağlamda, makine öğrenimi, bal türlerinin sınıflandırılması ve temel özelliklerinin belirlenmesi için kullanılabilir.

Bu tezde, farklı botanik ve coğrafi kökenlere sahip bal örneklerinin toplanması, bu örneklerin karbonhidrat bileşimlerinin kütle spektrometrisi tabanlı glikomik yöntemlerle analiz edilmesi ve bal türleri sınıflandırması için makine öğrenimi

modellerinin geliştirilmesi planlanmaktadır. Bu çalışmanın çıktıları, balın kalitesi ve orijinalliğinin değerlendirilmesi için güvenilir analitik yöntemlerin geliştirilmesine ve balın kimyasal çeşitliliğinin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

## BÖLÜM 2

### LİTERATÜR TARAMASI

#### 2.1. GLİKOZİLASYON

Glikosilasyon, karbonhidratların, özellikle şeker moleküllerinin (sakaritler) proteinlere, lipidlere veya diğer moleküllere eklendiği bir post-translasyonel modifikasyon işlemidir. Çeşitli biyolojik fonksiyonlarda ve hüresel süreçlerde kritik roller oynayan karmaşık ve oldukça düzenlenmiş bir süreçtir. Glikozilasyonda, hedef moleküllere şeker moleküllerinin eklenmesi, glikosiltransferazlar adı verilen spesifik enzimler tarafından katalize edilir. Genellikle aktive edilmiş nükleotid şeker vericileri şeklindeki şeker molekülleri, glikosidik bağlar yoluyla hedef molekül üzerindeki spesifik bölgelere bağlanır. [1] [2].

Glikosilasyon işlemi ile beş tip glikan üretebilir:

**N-bağlı glikanlar:** bir nitrojen atomuna bir glikan eklenmesi (genellikle asparajinin amid nitrojeni) Bu süreç, salgılanan veya hücre zarına bağlanan proteinlere özgüdür ve dolikol fosfatın varlığını gerektirir. Ökaryotlarda daha sık görülür [3].

**O-bağlı glikanlar:** bir proteindeki amino asit serin veya treoninin oksijen atomuna bir glikanın eklenmesi. Bu tip, protein sentezinden sonraki Çevrim sonrası değişimi olarak yapılır. Ökaryotlarda meydana gelir [4].

**C-Bağlı Glikanlar:** Triptofan zincirindeki bir karbon atomuna bir glikan eklenmesi. Bu tip çok nadirdir [5].

**Fosfoglikanlar:** Glikanların fosfat veya fosfoserine eklenmesi. Fosfoserin glikanlar ksiloz, fukoz, mannoz ve GlcNAc'ın tümü literatürde rapor edilmiştir. Sadece Dictyostelium discoideum'da fukoz ve GlcNAc bulunurken, Leishmania mexicana'da mannoz ve Trypanosoma cruzi'de ksiloz bulunur. Mannoz yakın zamanda bir omurgalı, fare Mus musculus'ta hücre yüzeyi laminin reseptörü alfa distroglikan4 üzerinde keşfedilmiştir. Alfa distroglikan'ın alt hayvanlardan memelilere kadar

dikkat çekici bir şekilde korunmuş olması, bu olağandışı keşif için olası bir açıklama olarak sunuldu [6].

**Glipiasyon:** glikolipidlere (GPI) glikanların eklenmesiyle yüzey proteinlerini lipidlere bağlayan bağların oluşturulması sürecidir. Bu tür bir post-translasyonel değişiklik, protein sentezinden sonra gerçekleşir ve ökaryotlarda daha sık görülür. Bununla birlikte, protein glikosilasyonu sadece belirli bir tipi ile sınırlı değildir, fakat glikosilasyon, glikosidik bağlar içindeki birçok farklı bölgede protein ile uğraşmak için kullanılır.

**kimyasal glikozilasyon:** sentetik organik kimya araçlarının kullanıldığı bir yöntemdir ve glikozilasyon elde etmek için kullanılır. Sentetik glikokimya, doğal süreçlerden farklı olarak istenen bölgesel seçiciliği elde etmek için koruyucu gruplara önemli ölçüde dayanır. Bir glikozidik bağın stereoseçiciliği, / veya cis/trans olmak üzere iki stereo-çıkıtıya sahip olması, başka bir kimyasal glikozilasyon sorunudur. Genel olarak,  $\alpha$ - veya cis-glikozitin sentezlenmesi daha zor olabilir. [7].

### 2.1.1. Glikozilasyon Amacı

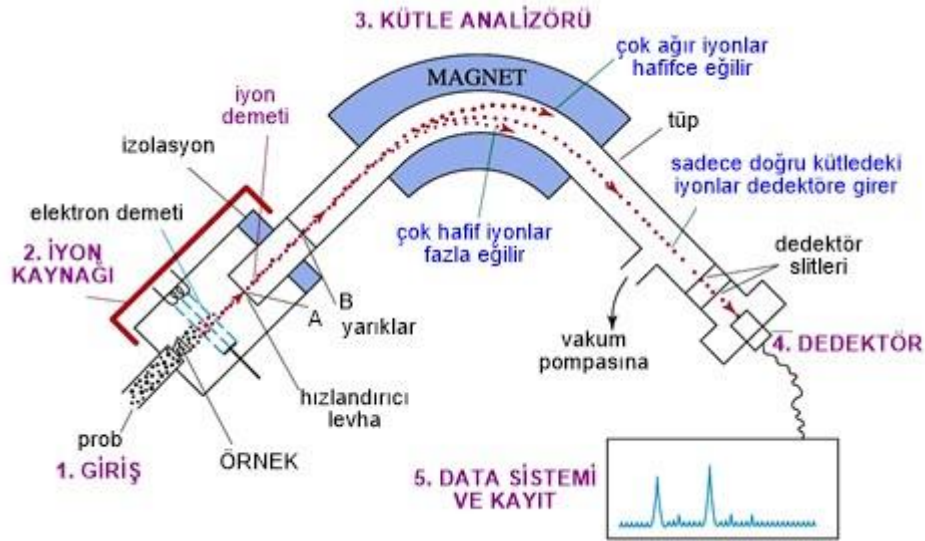
Glikosilasyon, bir karbonhidratın hedef bir makromoleküle bağlanması işlemidir. Katlama ve stabilite gibi çeşitli işlevlere hizmet eder. Glikosilasyonun, glikoproteinin stabilitesi ve katlanması üzerindeki etkileri iki yönlüdür. İlk olarak, N-bağlı glikanlar, endoplazmik retikulum için bir kalite kontrol noktası sağlayabilir. Glikosilasyon ayrıca hücreden hücreye yapışma sürecinde yer alır. Glikoproteinleri hedefleyen ilaçların geliştirilmesinde ve rafine edilmesinde önemli bir faktördür. ABO kan grubu sistemi, glikozilasyonun varlığı ile desteklenir. Bu süreç, antijenlerin tanımlanmasını ve özgünlüklerin sunulmasını içerir. Ayrıca virüsler, altta yatan viral proteini immün tanımlamadan korumak için sıklıkla glikosilasyon kullanır. İnsan immün yetmezlik virüsünün zarf sivri ucunun kalın glikan bariyeri buna iyi bir örnektir. Genel olarak, glikosilasyon, onu şekillendiren evrimsel baskılar nedeniyle anlaşılması gereken bir süreçtir. Bir teori, bunun, daha sonra çeşitlendirme yoluyla sömürülebilecek patojen enfeksiyonunun kaçmasıyla tetiklendiğini öne sürüyor [8].

## 2.2. KÜTLE SPEKTROMETRESİ

Kütle spektrometrisi (MS), kütle-yük oranlarına ( $m/z$ ) dayalı olarak molekülleri tanımlamak ve karakterize etmek için kullanılan analitik bir tekniktir. Proteomik, metabolomik, çevresel analiz ve ilaç keşfi dahil olmak üzere çeşitli bilimsel disiplinlerde mihenk taşı teknolojisi haline geldi. Kütle spektrometreleri, kütle spektrometresi analizini gerçekleştirmek için kullanılan aletlerdir. [9].

Kütle spektrometreleri, protein tanımlama ve karakterizasyonu, küçük molekül analizi, izotop kompozisyonunun belirlenmesi ve bileşiklerin yapı aydınlatması dahil olmak üzere geniş bir uygulama alanında kullanılabilir. Kompleks örneklerde bulunan analitlerin moleküler bileşimleri, yapıları ve bollukları hakkında değerli bilgiler sağlarlar.

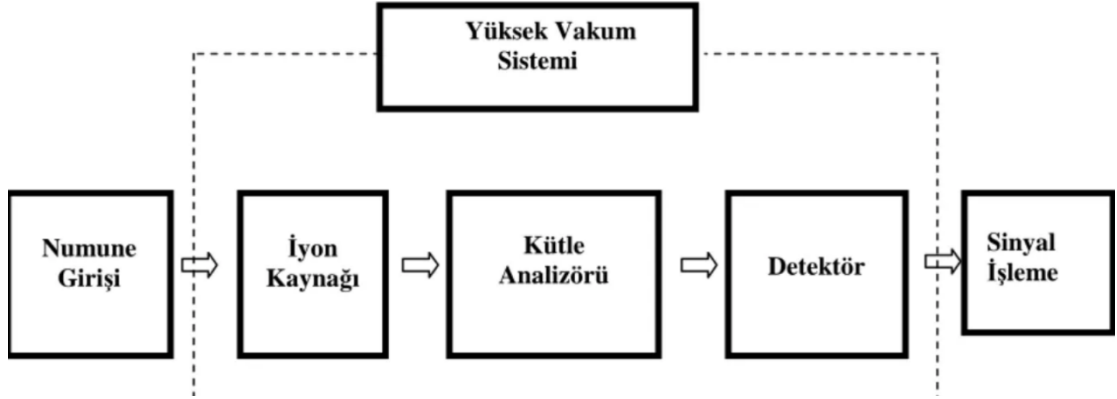
Yıllar içinde, kütle spektrometreleri hassasiyet, çözünürlük ve hız açısından önemli ilerlemeler kaydetmiştir. Bu gelişmeler, kompleks örneklerin daha doğru ve kapsamlı analizine olanak tanımış, araştırmacıların proteom, metabolom ve lipidomu daha detaylı şekilde keşfetmelerine olanak sağlamıştır [10].



Şekil 2. 1. Kütle spektrometrenin şematik diyagramı [11].

Bir kütle spektrometresinin temel bileşenleri şemada gösterilmiştir. Kütle analizörü, elektromanyetik ışını ayırmak için bir optik spektrometrede prizma veya ızgara işlevi gören bir ayırma cihazıdır; buradaki ayırma işlemi, numuneden partikül ayrılmasıdır.

Çoğu optik yöntemde bulunmayan kütle spektrometrisinde dedektöre kadar tüm sistemler düşük basınç (10<sup>-4</sup>–10<sup>-8</sup> torr) altındadır; hassas vakum sistemleri, kütle spektrometrelerinin en önemli parçasıdır [11].



Şekil 2. 2. Kütle spektrometresi blok diyagramı [12].

**Örnek Hazırlama:** 10<sup>-5</sup> torr'luk bir basınçta, bir mikromol (veya daha az) numune gazlaştırılır ve iyonizasyon odasına yavaşça beslenir [11].

**İyon Kaynağı:** Isıtılmış bir filamentten pozitif elektrota hareket eden bir elektron akımı, numunedeki partikülleri doğrudan veya dolaylı olarak iyonize eder (hem pozitif hem de negatif iyonlar iyonizasyon ile oluşturulur, ancak pozitif iyonlar baskındır ve analitik yöntemler çoğunlukla pozitif partiküllere dayanır). Pozitif iyonlar, A yarığında mütevazı bir negatif voltajla negatif iyonlardan ayrılır ve A ile B arasındaki birkaç yüz ila birkaç bin voltluk potansiyel farkla hızlandırılır. B yarığından, ayırma bölgesine paralel bir pozitif iyon demeti gelir [11].

**Kütle Analizörü:** Hızlı hareket eden iyonlar, 10<sup>-7</sup> torr basınçta tutulan analizör tüpünde güçlü bir manyetik alana girer ve alanın hareketinden dolayı eğri bir yol çizer. Yolun eğrisi (çapı), manyetik alanın gücüne, hızına ve iyonların kütlesine bağlı olarak değişir. Çeşitli kütlelerdeki parçacıklar, hızlanma potansiyeli veya alan kuvveti değiştirilerek çıkış yarığına odaklanır [11].

**Dedektör:** Çıkış deliğinden geçen iyonlar, toplayıcı elektrotla çarpışarak iyonik bir akım oluşturur. Ve iyon akışı geliştirilir [11].

**Data Sistemi ve Kayıt:** Güçlendirilmiş iyon akımı, alan kuvvetinin veya hızlanma potansiyellerinin bir fonksiyonu olarak ölçülür [11].

### 2.2.1. Tarihsel Bir Perspektiften Kütle Spektrometresi

Son 20 yılda, kütle spektrometresi (MS), yaşam ve sağlık bilimlerinde geniş bir uygulama alanına sahip olarak hızla gelişmiştir. İlk olarak 1880'lerin sonlarında fizikçiler tarafından tanımlanan kütle spektrometresi, çeşitli alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin, Wilhelm Wien 1898'de üst üste binen elektrik ve manyetik alanların pozitif iyonları saptırabileceğini göstererek önemli bir keşif yapmıştır. Bu keşif öncesinde fizikçi Eugen Goldstein, 1886'da "Kanalstrahlen" adını verdiği yeni bir radyasyon türünü keşfetmiş ve bu "yeni" ışınların basitçe pozitif yüklü parçacıklar olduğunu bulmuştur. Sir Joseph John Thomson ise Cambridge Üniversitesi'nde deneysel fizik profesörü olarak çalışmaktadır. Thomson, bu bulgulardan ilham alarak 1913'te ilk kütle spektrometri cihazlarını icat etmiş ve analitik kimya alanında önemli bir keşfin değerini ortaya koymuştur. Kütle spektrometresi, kararlı izotop/radyonükleotit araştırmaları için önemliydi ve petrol endüstrisinin talepleri sonucunda, organik molekülleri tanısal olarak tespit edebilen ticari kütle spektrometrik enstrümantasyon ilk olarak 1940'larda piyasaya sürülmüştür [13].

Gaz kromatografisi ile kütle spektrometrisinin birleşimi, biyokimyanın bu güçlü teknolojiye olan ilgisini artırmıştır. Yağ asitleri, steroidler, karbonhidratlar gibi termal olarak kararlı biyolojik bileşikler gaz kromatografisi kullanılarak ayrıştırılabilir. Bu analitik araç 1952'de icat edildi ve Holmes ve Morrell, 1957'de ilk kez gaz kromatografisini kütle spektrometresiyle (GC-MS) birleştiren kişiler olmuşlardır. İlk kütle spektrometrik cihazlar, sadece küçük moleküler ağırlığa sahip uçucu bileşikler (> 1000) analiz etmek için kullanılmıştır. Bununla birlikte, geleneksel iyonizasyon yöntemlerinden biri olan elektron etkisi (EI) sert bir yaklaşımdır ve karmaşık biyomolekülleri (örneğin, proteinler, nükleotitler, kompleks karbonhidratlar) tahrip eder. Ayrıca, biyokimya laboratuvarlarında kütle spektrometresi, uçucu karışımları ayıran GC-MS cihazlarıyla sınırlı kalmıştır. Proteinler gibi karmaşık biyolojik moleküller, bu koşullar altında ciddi hasar ve parçalanma olmadan gaz fazına taşınamazlar. Kütle spektrometresi, ancak yumuşak iyonizasyon tekniklerinin ortaya çıkmasıyla birlikte proteomik araştırmalar için kullanılmaya başlanmıştır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC-MS) ve kapiler elektroforez gibi diğer ayırma teknikleri, artık kütle spektrometresiyle (CE-



MS) arayüzlenebilmektedir. Saflaştırılmış materyallerin veya sentezlenmiş konjugatların kütle spektrometrisi analizi, ayırma tekniği kullanılmadan da sıklıkla gerçekleştirilmektedir [14] [15].

### 2.2.2. İyonizasyon Yöntemleri

MS aleti veya uygulaması ne olursa olsun, MS analizindeki ilk adım, hedef analitlerin sıvı veya katı fazdan gaz fazında iyonize türlere dönüştürülmesidir. Çeşitli iyonizasyon süreçleri bulunmakta olup her biri kendi yararları ve mükemmel kullanımlarıyla öne çıkmaktadır. Seçtiğiniz iyonizasyon kaynağı, Kütle spektrometrisi sonuçlarınız üzerinde büyük bir etkiye sahip olabilir.

Elektron etkisi (EI) ve Hızlı Atom Bombardımanı (FAB), çoğu kimyagerin aşına olduğu iki geleneksel prosedürdür. EI, çevresel çalışmalarda GC-MS kullanılırken, diğer teknikler nadiren tercih edilmektedir. Kütle spektrometri laboratuvarında, hava basıncında kimyasal iyonizasyon (APCI), elektrosprey iyonizasyon (ESI), air pressure photo ionization (APPI), matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) ve diğer türev yöntemler gibi daha karmaşık teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır. ESI ve MALDI gibi yumuşak iyonizasyon teknikleri analitleri çok az veya hiç parçalanma ile iyonize edebilme özelliğine sahiptir. ESI ve APCI, sıvı kromatografi kütle spektrometrisinde (LC-MS) kolay bir şekilde arayüz oluşturdukları için yaygın olarak tercih edilmektedir. APPI, son zamanlarda, APCI veya ESI ile zor iyonize edilebilen kimyasalların LC-MS'de iyonize edilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca, ESI ile birleştirilen MALDI, daha önce FAB ile elde edilmesi mümkün olmayan büyük moleküler ağırlıkların iyonizasyonunu ve ölçümünü mümkün kılmaktadır. İyonizasyon yönteminin değiştirilmesinin, nicelleştirmenin alt sınırını ve nicel verilerin lineer aralığını etkilediği gösterilmiştir. Benzer şekilde, Elektrosprey iyonizasyon (ESI), atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) veya matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) kullanıldığında, çeşitli serum metabolitlerinin tespit edildiği gözlemlenmiştir. Optimum iyonizasyon genellikle analitin yapısına ve kullanım amacına bağlı olarak seçilmektedir. Kütle spektrometrisi görüntüleme uygulamaları için, MALDI ve desorpsiyon elektrosprey iyonizasyonu (DESI) gibi desorpsiyon yöntemleri yaygın olarak tercih edilmektedir [16] [17].

Bazı yaygın iyonizasyon teknikleri ve bunlara en uygun örnek türleri:

İyon kaynakları – gaz fazı yöntemleri [18]

- Elektron iyonizasyonu (EI)
- Kimyasal iyonizasyon (CI)
- Gerçek zamanlı olarak doğrudan analiz (DART)
- Endüktif olarak eşleştirilmiş plazma (ICP)

İyon kaynakları – desorpsiyon yöntemleri [18]

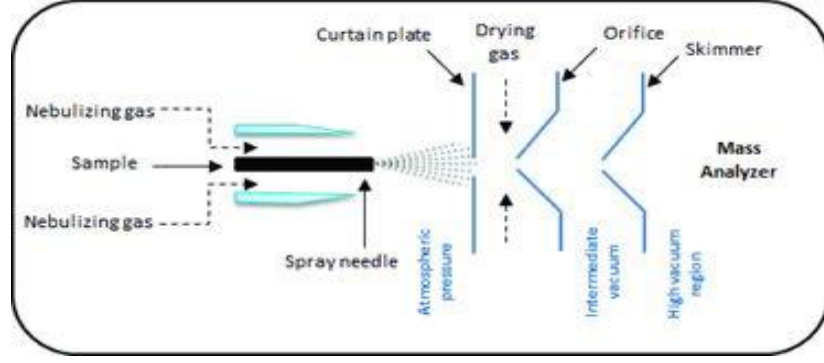
- Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI)
- Hızlı atom bombardımanı (FAB)
- Termal iyonizasyon kaynakları
- Plazma iyonizasyon kaynakları
- Sıvı metal iyon kaynakları (LMIS)

İyon kaynakları - püskürtme yöntemleri [18]

- Elektrosprey iyonizasyon (ESI)
- Desorpsiyonlu elektrosprey iyonizasyon (DESI)

### **2.2.2.1. Elektrospray İyonlaştırma(ESI)**

ESI'de numune, yüksek voltaj (örn., 3-6 kV) uygulanırken 1–1.000 L/dk'lık tipik bir akış hızında çözelti içinde bir spreyl iğnesi/kılcal damara iletilir. Analite bağlı olarak negatif veya pozitif olabilen voltaj, iğne ucundan atmosfere püskürtülen yüklü damlacıkların oluşmasına neden olur. Nebulizasyon işlemi sırasında, iğnenin etrafında akan bir kılıf gazının (azot) varlığı, kılcal uçtan damlacıkların yönünü destekler. Çözücünün tamamen buharlaşması için, yüklü damlacıklar ısıtılmış bir soy gaz (azot) perdesinden veya ısıtılmış bir kılcal damardan geçer. Şema 1'de gösterildiği gibi, atmosferik basınçta ESI tarafından üretilen iyonlar, kütle analizi için bir açıklıktan kütle spektrometresine giriş yapar [19].



Şekil 2. 3. ESI kaynağının şematik diyagramı [16]

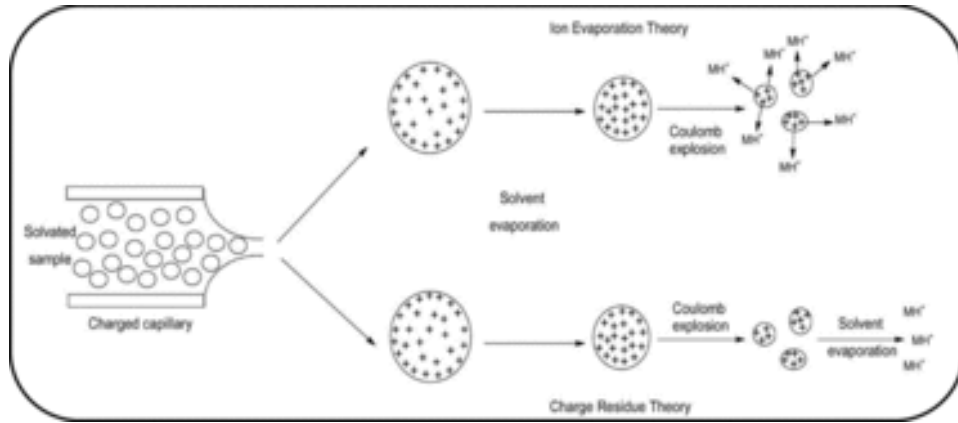
ESI'de, Şema 2'de gösterildiği gibi iyon oluşumu için iki farklı yöntem önerilmiştir. Çözücü buharlaşması ve yüklü damlacıkların Coulomb fisyonları, iyon buharlaşma mekanizmasında daha küçük damlacıklar oluşturur. Damlacık yüzeyindeki yükler arasındaki itme, yüzey geriliminin kohezif kuvvetini aştığında, gaz fazı iyonları, küçük damlacıkların yüzeyinden hemen salınır/bozular. Molekül, yük artık modelinde yüklü damlacıktan ayrılmayacaktır, ancak büyük moleküllerde olması daha muhtemel olan çözücünün tamamen buharlaşmasıyla serbest kalacaktır [20].

ESI, çeşitli moleküler ağırlığa ve yüksek ila orta polariteye sahip çok çeşitli kimyasallar için uygundur. ESI, proteinler gibi birkaç iyonlaşabilir bölgeye sahip büyük moleküller için, dört kutuplular gibi dar bir  $m/z$  aralığına sahip kütle analizörlerinde analiz edilebilen çok yüklü iyonlar üretir. Bununla birlikte, ESI kullanıldığında iyon bastırma önemli bir dezavantajdır, çünkü yüksek konsantrasyonda uçucu olmayan kimyasalların veya analitlerin mevcudiyeti damlacık oluşumunun veya buharlaşmanın etkinliğini değiştirerek gaz fazına iyon salınımını engelleyebilir. Sınırlı yükler veya damlacık yüzeyindeki alan için maddeler arasındaki rekabet, yüksek konsantrasyonlu numunelerde iyon üretiminin verimliliğini daha da azaltabilir [21], [22].

ESI sırasında iyon bastırmanın üstesinden gelmek için çeşitli stratejiler kullanılmıştır: numuneler katı faz ekstraksiyonu (SPE), sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE) veya protein çöktürmesi (PPT) kullanılarak saflaştırılır; kromatografik koşullar, mobil faz katkı maddeleri değiştirilerek veya analit tutma sürelerinin iyon bastırılmasından etkilenen ayrıştırma bölgesinden uzağa kaydırılmasıyla değiştirilir; ve iyonizasyon, negatif iyonizasyona geçilerek değiştirilir. Örneğin, nano-ESI, damlacık desolvasyon sürecini iyileştirirken kaynağa daha az analit ve uçucu

olmayan kimyasalların enjeksiyonuna izin vererek akış hızlarının önemli ölçüde düşürüldüğü bir yöntemdir [23], [24].

Başka bir yöntem, uygun bir dahili standart (IS) kullanarak matris etkisini ortadan kaldırmak yerine, bu durumda analite benzer yapısal ve fiziksel özelliklere sahip izotopik olarak etiketlenmiş bir IS kullanarak telafi eder. İkinci seçenek, tartışmasız en sık kullanılanıdır, çünkü yalnızca bir ESI kaynağı ile çalışmadan çalıştırmaya gözlemlenen iyon akımlarındaki farklılıkları değil, aynı zamanda ekstraksiyon gibi MS öncesi deneysel faaliyetlerdeki değişkenliği de ele alır. IS'nin ilgilenilen analitten farklı bir zamanda ayrıştırıldığı nadir durumlarda, döteryum (D) etiketli IS'ler ile izotopik etkiler kaydedilmiştir. IS, bu elüsyonun bir sonucu olarak ilgilenilen analitten farklı matris etkilerine maruz kalacaktır [24], [25].

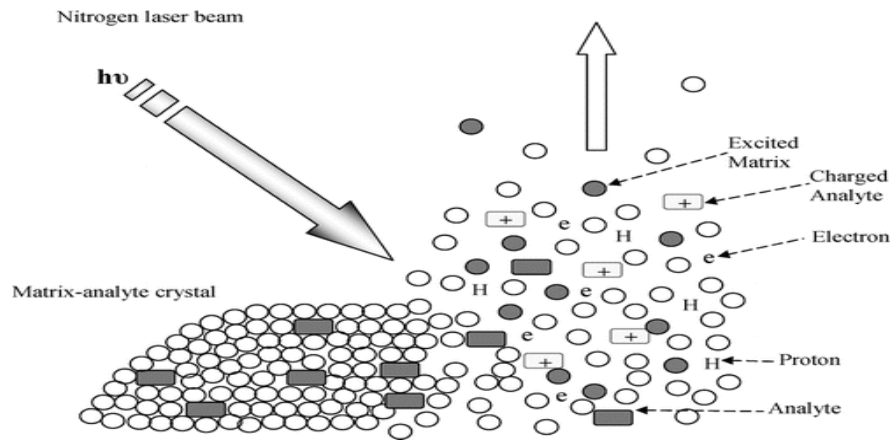


Şekil 2. 4. Elektrosprey iyonizasyonu sırasında önerilen iyon oluşum mekanizmaları [16].

#### 2.2.2.2. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)

MALDI, protein dizilimi ve proteomik araştırmalar için yaygın olarak kullanılan bir iyonizasyon kaynağıdır ve genellikle ESI teknolojisiyle birlikte kullanılır. Örneğin, Banoub'un grubu, bir balık biyobelirteci olan vitellogenin proteinini başarılı bir şekilde tanımlamak için ESI ve MALDI yöntemlerini kullanmıştır. MALDI, DNA, lipidler ve glikokonjugatlar gibi analizler için ESI'ye benzer şekilde kullanılabilir [26], [28].

İyonlar, MALDI (Matris Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu) yönteminde katı fazdan desorbe edilir. Numune önce uygun bir çözücü içinde çözülür ve daha sonra büyük miktarda uygun bir matris ile birleştirilir. Daha sonra, bu numune-matris karışımı bir MALDI plakasına lekelenir ve hava ile kurutulur. Bu koşullarda, numune matrisiyle birlikte kristalleşir. Sonrasında, bir lazer ışını numune matrisi kristaline çarpar ve lazer enerjisi matris tarafından emilir. Bu süreç, analitlerin desorpsiyonunu ve iyonlaşmasını tetikleyerek karışımdaki bileşenleri gaz fazına taşır. MALDI-MS sırasında iyon oluşumu Şekil 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2. 5. MALDI iyonizasyon süreci Bir UV lazer ışını, matrisi uyaran ve enerjiyi analitlere ileten matris-analit kristaline yönlendirilir. Bunun sonucunda analitler iyonize olur ve tek yüklü türler olarak desorbe olur. [15].

MALDI ilk olarak vakum altında kullanılmıştır, ancak 2000 yılında atmosferik basınç (AP) MALDI yöntemi geliştirilmiştir. Bu gelişme, değiştirilebilir MALDI ve ESI (Elektrosprey İyonizasyonu) kaynaklarına sahip kütle spektrometrelerinin maliyetini azaltmış, kullanım kolaylığını iyileştirmiş ve ticari yaygınlığını artırmıştır. MALDI'de hangi yöntemlerin iyon oluşumuna katkıda bulunduğu henüz tam olarak bilinmemektedir ve belirli bir matris seçimi genellikle deneme yanılma yöntemine dayanmaktadır. Matris seçimi, analitlerin doğasıyla birlikte pozitif veya negatif iyonizasyon moduna bağlı olarak belirlenebilir. Pozitif iyonizasyon modunda bazik matrisler tercih edilirken, negatif iyonizasyon modunda ise asidik matrisler daha verimli olabilir [29], [30].

### 2.2.2.3. MALDI ve ESI karşılaştırması

ESI (Elektrosprey İyonizasyonu) ve MALDI (Matris Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu), pikomolar seviyesinde düşük analit konsantrasyonlarıyla çalışabilen son derece hassas analitik yöntemlerdir. Numunenin iyon kaynağına tanıtılması, MALDI ve ESI arasındaki en büyük varyasyonlardan biridir. MALDI, katı faz kullanırken, ESI ise cihaza infüze edilen solvatlı bir numune kullanır. Bu nedenle, ESI, LC ile birlikte kullanıldığında etkili bir şekilde nicel ölçümler yapmak için kullanılabilir. Bununla birlikte, ESI'nin verileri MALDI'ye kıyasla daha iyi bir şekilde kopyalayabilse de, bir ESI spektrumundaki tek iyonların göreceli bolluğunun numune konsantrasyonunu tam olarak yansıtmadığı unutulmamalıdır [31]. MALDI'nin kullanımını nitel değerlendirmelerin ötesine taşımak ve nicel ölçümler yapmak için birkaç girişimde bulunulmuş ve yakın zamanda LC ile arayüz oluşturulmuştur. Ancak, MALDI kristalinin değişkenliği, böyle bir uygulama için önemli bir zorluk oluşturur. Gerçekte, lazer ışınının konumu, MALDI spektrumlarının kalitesi üzerinde büyük bir etkiye sahip olabilir, bu nedenle operatörün en bilgilendirici spektrumu üreten bir "tatlı nokta" bulması gerekmektedir [32].

MALDI'nin tuzlar ve/veya deterjanlar gibi kirleticilerle karşı sağlamlığı, MALDI ile LC arasında arayüz oluşturma girişimlerine bağlı olarak değişir. ESI kullanıldığında, örneğin ESI iğnesine enjekte edildiği tüplere adsorbe edilen kirleticiler, analitlerle rekabet edebilir ve sonuçları etkileyebilir. Ancak MALDI'de, analitler iyonizasyon sırasında matriksin büyük bir kısmından ayrıldığı için böyle bir sorunla karşılaşmaz [33], [34]. Son olarak, ESI, proteinler ve peptitler gibi biyomoleküller için çoklu yüklü türlerin oluşmasına eğilimlidir. Büyük proteinler daha düşük m/z değerlerinde görünebildiğinden, teorik olarak ESI sınırsız bir kütle aralığına sahip olabilir. Diğer yandan, MALDI, proteinlerin, polisakaritlerin ve lipidlerin moleküler iyonlarını belirlemek için tek yüklü türler üretme eğilimindedir [35].

### 2.2.3. Kütle Analizörleri ve MS/MS

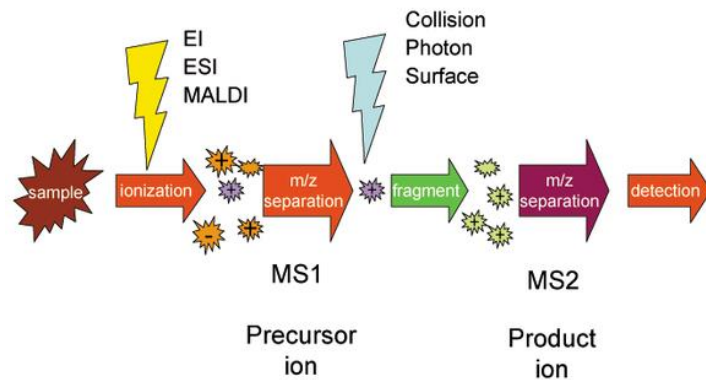
Kütle analizörü, iyonları m/z değerlerine göre ayıran bir aletin bileşenidir. Bir kütle spektrometresinde iyonların izolasyonu normalde elektrikle çalıştırılır, ancak

manyetik sektörler gibi klasik analizörler iyon ayrımını etkilemek için bir manyetik alan kullanır. Erişilebilir yaklaşımlar açısından iyonizasyon işlemine benzer şekilde, iyonları  $m/z$  değerlerine göre ayırabilen birçok sistem vardır.

Kütle spektroskopistleri şu anda dört ana analizör kullanmaktadır: dört kutuplu (Q), dört kutuplu iyon tuzağı (QIT), uçuş süresi (ToF) ve Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı (FT-ICR). Bu analizörlerin boyutu, fiyatı, çözünürlüğü, kütle aralığı ve tandem kütle spektrometrisi çalışmalarını (MS/MS) yürütme yeteneği farklıdır. FT-ICR, QIT birçok kütle spektrometrik deneyi (MS<sub>n</sub>) gerçekleştirebilse bile, doğru kütle ölçümleri açısından özellikle güçlüdür [36].

### 2.2.3.1. Tandem Kütle Spektrometrisi (MS/MS)

Tek aşamalı ESI-MS (Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektrometrisi) ve MALDI-MS (Matris Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu Kütle Spektrometrisi), moleküler iyonların tespiti için kullanışlıdır ve belirli durumlarda yapısal bilgi sağlayabilir. MALDI ve ESI durumunda, "koşullar" terimi, iyon kaynağında parçalanmanın indüklenmesine atıfta bulunur. Tandem kütle spektrometrisi, belirli bir  $m/z$  değerini izole ederek çalışır ve ardından bu izole edilen iyon parçalanabilir ve parça veya ürün iyonları üretebilir. Kullanıcının görevi, analitin moleküler yapısı hakkında önemli bilgiler ortaya çıkaran bir MS/MS (Tandem Kütle Spektrometrisi) spektrumu tarafından oluşturulan "bulmacayı" çözmektir [37], [38].

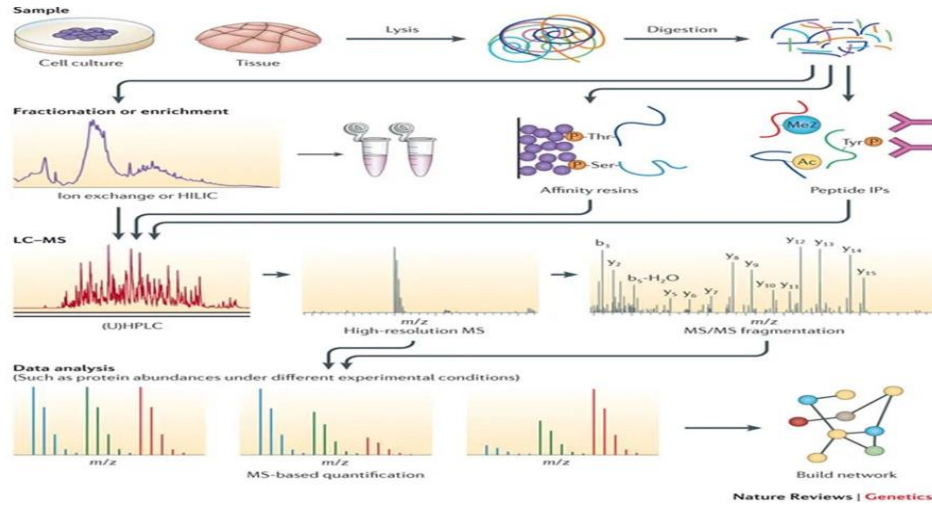


Şekil 2. 6. Tandem kütle spektrometrisi şeması [39].

#### 2.2.4. Proteomik Analizlerde MS İş Akışları

Proteinleri oluşturan peptitlerin tanımlanmasından elde edilen kütle/yük oranlarını kullanan bu teknik, birden fazla kütle spektrometri aleti gerektirir. GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi), MALDI-TOF (Matris Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu-Kütle Zaman Uçuşu) ve LC-MS/MS (Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi/Tandem Kütle Spektrometrisi) en iyi bilinenleridir, ancak farklı kullanımlar için farklı ekipmanlara sahip olan diğer satıcılar da bulunmaktadır. Proteomikte güncel altın standart olan LC-MS/MS'de, sıvı kromatografi ve kütle spektrometrisi ekipmanları birlikte çalışmaktadır. Ön ayırma yapılmadan, çoğu peptit kombinasyonu, kütle spektrometrisi tarafından incelenemeyecek kadar karmaşıktır. Sonuç olarak, LC (Sıvı Kromatografi) bölümünde peptidler önce sıvı kromatografi prensiplerine göre ayrıştırılır. Sağlam peptitlerin kütleleri daha sonra bir öncü iyon seçilmeden ve parçalanmadan önce sıralı kütle spektrometrisinin ilk MS (Kütle Spektrometrisi) fazı için ölçülür ve kaydedilir. Parçalanma, genellikle argon veya nitrojen gibi gazlarla çarpışarak yapılan ikinci MS fazında indüklenir. Çarpışma ile indüklenen fragmanlar bir MS/MS spektrumunda kaydedilir ve peptitteki her amino asidin spesifik kütlesi ölçülerek fragman modeli ortaya çıkar. Bu yöntem, proteomik araştırmalarda protein tanımlaması ve yapısal analiz için önemli bir araçtır. Kütle spektrometrisi teknikleri, yüksek hassasiyetleri ve seçicilikleri sayesinde peptitlerin tanımlanması, post-translasyonel modifikasyonların belirlenmesi ve protein-protein etkileşimlerinin incelenmesi gibi birçok uygulama alanında kullanılmaktadır. LC-MS/MS, peptit analizinde güvenilir sonuçlar elde etmek için etkili bir strateji olarak kabul edilmektedir [40], [41].





Şekil 2. 7. LC-MS/MS proteomiks analizinin iş akışı [40].

### 2.3. GLİKAN ANALİZLERİ İÇİN ÖRNEK HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

Biyoterapötiklerin *in vivo* biyoaktivitesi, stabilitesi, çözünürlüğü ve metabolik kaderi, protein glikosilasyonundan etkilenebilir. Glikosilasyon, transkripsiyondan farklı olarak, yapısal durum esas olarak üretim yöntemlerine ve koşullarına bağlı olan, şablon güdümlü olmayan bir enzim modifikasyon işlemi olan translasyon sonrası bir modifikasyondur. Sonuç olarak, bitmiş ürün biraz farklı olabilir [42].

Glikanın tripeptit konsensüs dizisi Asn-X-Ser/Thr'deki bir Asn tortusuna bağlandığı N-glikosilasyon ve glikanın bir Ser veya Thr tortusuna bağlandığı O-glikosilasyon iki ana türdür. protein glikosilasyonu. Glikanlar, çeşitli hücre içi, hücre-hücre ve hücre-matris tanıma olaylarında yer alır ve bu nedenle önemli biyolojik ilgiye sahiptir. Fonksiyonel yönleri yerleşik yapısal parametrelerle ilişkilendirmek için glikan zincirlerinin ayrıntılı yapısal araştırmaları gereklidir. Protein glikozilasyonunu karakterize etmek için aşağıdaki prosesler kullanılır: ilk olarak, bağlanan glikanlar enzimatik veya kimyasal olarak salınır; ikinci olarak, salınan glikanlar, aromatik veya alifatik aminler ile indirgeyici aminasyon veya permetilasyon yoluyla türevlendirilir; ve üçüncü olarak, glikanlar analiz edilir [43]. Bu bölüm, analiz için N-glikosilasyon tipi glikanları hazırlamak için hangi hazırlıkların yapıldığını tartışacaktır.

### 2.3.1. N-Glikanların Salınımı

Enzimler, N-bağlı glikanları peptitlerinden ayırmak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Tamamen bozulmamış N-bağlı glikanları salma yetenekleri nedeniyle, peptit:N-glikosidaz F (PNGase F) gibi glikoamidazlar, N-bağlı glikanların salınımı için uzun yıllardır en sık tercih edilen tekniklerdir. Glikoamidazlar, iki şeker arasındaki glikozidik bağlantıyı kesen endoglikozidazlara kıyasla, bir glikozamidin amid bağını hidrolize eder. En içteki N-asetilglukozamin (GlcNAc) ve asparagin kalıntısı, PNGase F ve glikopeptidaz A (PNGase A) gibi glikoamidaz enzimleri tarafından kesilen bir bağlantı ile birleşir. PNGase A daha az sıklıkla kullanılmasına rağmen, tüm yüksek mannoz, hibrit ve kısa kompleks glikanları parçalayabilir. Ayrıca, 1,3 çekirdekli fukoz içeren glikanları da parçalayabilir. PNGase A, daha küçük ve daha basit glikanları parçalayabilirken, sialik asit kalıntısı gibi daha büyük ve karmaşık glikanları parçalayamaz. PNGase F, hemen hemen tüm N-bağlı glikanları parçalayabilme yeteneği nedeniyle PNGase A'ya benzer şekilde peptit omurgalarını koruyabilir. Ancak, PNGase F, genellikle bitkilerde bulunan 1,3 çekirdekli fukozillenmiş türleri parçalayamaz. Son olarak, PNGase F ve PNGase A gibi enzimlerin kullanımı için gereken maliyet ve zaman faktörlerine rağmen, glikanların enzimatik salınımı, peptid omurgasını veya amino asit yan zincirlerini bozmadan bozulmamış glikanları salma kapasitesi ve basitliği nedeniyle mekanik salınımın yerini almıştır [44].

### 2.3.2. N-Glikanların Etiketlenmesi

N-glikanlar, protein dizisindeki asparagin kalıntılarında bir amid bağlantısı aracılığıyla bağlanan karmaşık karbonhidrat yapılarıdır. Bu glikanlar, protein katlanmasında, stabilitesinde ve işlevinde önemli roller oynar. N-glikanların analizi, glikobiyoloji, biyoteknoloji ve biyotıp gibi çeşitli alanlarda büyük ilgi görmektedir. N-glikan analizi için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri, N-glikanların floresan veya kromojenik etiketlerle etiketlenmesidir. N-glikanların etiketlenmesi, jel elektroforezi, kromatografi ve kütle spektrometrisi gibi çeşitli analitik tekniklerle glikanların saptanmasını, ayrılmasını ve miktarının belirlenmesini sağlar [45].

N-glikanlar için bazı yaygın etiketleme stratejileri şunlardır:

- Floresan etiketleme: Bu yöntem, N-glikanların 2-aminobenzoik asit (2-AA), 2-aminobenzamid (2-AB) veya 2-aminopiridin (2-AP) gibi bir floresan boya ile etiketlenmesini içerir. İşaretli N-glikanlar, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) veya kapiler elektroforez (CE) ile ayrılabilir ve floresan algılama ile saptanabilir.
- Kromojenik etiketleme: Bu yöntem, N-glikanların 2-aminobenzoik asit hidrazit (ABH), 4-(4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin-2-il)- gibi bir kromojenik reaktif ile etiketlenmesini içerir. 4-metilmorfolinyum klorür (DMTMM) veya 2-kloro-4,6-dinitrofenol (CDNP). İşaretli N-glikanlar, HPLC veya CE ile ayrılabilir ve UV-Vis spektrofotometri ile tespit edilebilir.
- İzotopik etiketleme: Bu yöntem, N-glikanların  $^{13}\text{C}$  veya  $^{15}\text{N}$  gibi kararlı izotoplarla etiketlenmesini içerir. İşaretli N-glikanlar, kütle spektrometresi ile ayrılabilir ve kütle spektrometresi ile saptanabilir [46].

Özetle, N-glikanların etiketlenmesi, N-glikanların analizinde önemli bir adımdır ve çeşitli analitik tekniklerle glikanların saptanmasını, ayrılmasını ve miktarının belirlenmesini sağlar. Etiketleme stratejisinin seçimi, spesifik analitik tekniğe, hassasiyete ve maliyet hususlarına bağlıdır.

### 2.3.3. N-Glikanların Saflaştırılması

N-glikanların saflaştırılması, aşağı akış analizlerine müdahale edebilecek tuzlar, proteinler ve diğer safsızlıklar gibi istenmeyen kirleticileri ortadan kaldırdığı için glikanların analizinde önemli bir adımdır. N-glikanların saflaştırılması için çeşitli yöntemler vardır ve yöntemin seçimi spesifik uygulamaya, başlangıç malzemesi miktarına ve istenen saflık düzeyine bağlıdır [47].

N-glikanların saflaştırılması için bazı yaygın yöntemler şunlardır:

- Jel filtrasyon kromatografisi: Bu yöntem, numuneyi bir jel filtrasyon kolonundan geçirerek N-glikanları boyutlarına göre ayırır. Daha küçük glikanlar daha geç, daha büyük glikanlar ise daha erken ayrışır. Bu yöntem, karmaşık N-glikan karışımlarının saflaştırılması için basit ve etkilidir, ancak yüksek saflık sağlamayabilir.
- Katı faz ekstraksiyonu: Bu yöntem, bir numuneden N-glikanları seçici olarak bağlamak ve ayırıştırmak için bir katı faz reçinesi kullanır. Reçine, glikanları

hidrofobikliklerine, polaritelerine veya yüklerine göre seçici olarak bağlamak için C18, silika veya grafitleştirilmiş karbon gibi farklı kimyalarla modifiye edilebilir. Bu yöntem, yüksek saflıkta N-glikan sağlar ve küçük ila orta ölçekli saflaştırmalar için uygundur.

- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC): Bu yöntem, N-glikanları, iyon değişimi, ters faz veya boyut- dışlama. Bu yöntem, yüksek saflıkta N-glikan sağlar, ancak diğer yöntemlere göre daha karmaşık ve zaman alıcıdır.
- Lektin afinite kromatografisi: Bu yöntem, N-glikanları spesifik karbonhidrat yapılarına göre seçici olarak bağlamak ve ayırtmak için bir lektin reçinesi kullanır. Lektinler, mannoz, fukoz veya sialik asit gibi spesifik karbonhidrat yapılarına yüksek afiniteye sahip proteinlerdir. Bu yöntem, kütle spektrometresi gibi akış aşağı analizler için uygun olan yüksek oranda saflaştırılmış N-glikanları sağlar.

Özetle, N-glikanların saflaştırılması, glikanların analizinde kritik bir adımdır ve bu amaç için çeşitli yöntemler mevcuttur. Yöntem seçimi, spesifik uygulamaya, başlangıç malzemesinin miktarına ve istenen saflık seviyesine bağlıdır. Saflaştırılmış N-glikanlar, kütle spektrometrisi, kapiler elektroforez veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi gibi çeşitli alt analizler için kullanılabilir [48].

## **2.4. BAL PROTEİNLERİ**

Baldaki protein miktarının düşük olması (%0,1-0,5), balı şeker açısından zengin bir ortamdan ayırmanın zorluğu ve geleneksel yöntemlerle protein karakterizasyonunun zorlukları nedeniyle, bal numunelerinin protein içeriği üzerine sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Farklı türlerdeki bal örnekleri, mekanik ve kimyasal prosedürler de dahil olmak üzere çeşitli protein ekstraksiyon yöntemlerine tabi tutulmuştur. Bu çalışmaların çoğu, bal proteininin miktarını ve moleküler boyutunu jel elektroforezi kullanarak belirlemiştir, ancak proteinin tanımlanması konusunda sınırlı başarı elde etmişlerdir. Çeşitli çöktürücüler kullanılmış olsa da, bunların tümü kütle spektrometrik analiz yöntemleriyle uyumlu değildir. Sonuç olarak, bal proteinini güvenle karakterize etmek için düşük ve değişken protein miktarının olduğu numunelerin hazırlanması aşamasının büyük önem taşıdığı görülmektedir [49], [50].

#### **2.4.1. Baldaki Proteinler Ve Amino Asitler**

Protein, balda sadece küçük miktarlarda (%0,1-0,5) bulunur ve moleküler ağırlıkları 22 ila 75 kDa arasında değişir. Protein miktarı genellikle Kjeldahl yönteminden elde edilen toplam azot içeriğinin 6,25 faktörü ile çarpılmasıyla hesaplanır. Proteinin varlığı, balın daha düşük bir yüzey gerilimine sahip olmasına neden olur, bu da köpük oluşumuna ve köpük/hava kabarcıkları oluşumuna belirgin bir eğilim gösterir. Bal proteini, içerisindeki tağşişin tespiti için kararlı karbon izotop oranlarının kullanılmasında dahili bir standart olarak da kullanılmıştır. Karbon izotop oranı, saf balın düşük maliyetli karbonhidratlarla karıştırıldığında değişir, ancak protein bileşimi değişmez. Arılar, doğal olarak polen ve nektarı enzimler kullanarak parçalayarak bal proteini oluştururlar. Bu nedenle, sentetik şeker eklenmediği sürece, bal ve proteinin karbon izotop değerleri hemen hemen benzer olmalıdır. Bal ve protein arasındaki karbon izotop oranı farkı, tağşişin derecesini değerlendirmek için kullanılabilir [51].

Bal örneklerinde toplam bal ağırlığının %0,3-1'ini (a/a) oluşturan yirmi altı amino asit keşfedildi. Çoğunluğu bağlı formdadır. Prolin, fenilalanin ve glutamik asit, çiçek balında en yaygın amino asitler gibi görünmektedir. Tüm amino asit içeriği, prolin miktarı ile temsil edilebilir. Sonuçları şekerle beslenen kolonilerin ürettiği bal ile karşılaştırdıktan sonra, prolinin bal arılarından geldiği de kanıtlandı. Sonuç olarak, balın amino asit profili, coğrafi veya botanik kökenini tespit etmek için kullanılabilir. Amino asit içeriği bazen gıda ürünü kokusu ve aroması için önemli bir öncüdür [51], [52].

#### **2.4.2. Bal Proteini Ekstraksiyonu**

Genellikle bal, arı kovanlarından hasat edildikten sonra polen içermektedir. Polen varlığı, baldaki protein içeriğini artırabilir. Bu nedenle, protein ekstraksiyonu öncesinde polenin baldan çıkarılması gerekmektedir. Fiziksel veya kimyasal olarak sınıflandırılacak birçok protein ekstraksiyon yöntemi mevcuttur. Ancak, jel elektroforezi ve kütle spektrometrisi verilerini etkileyebilecek kirleticilerin varlığı nedeniyle, protein ekstraksiyon prosedürleri, proteinin uygun analizi konusunda bir

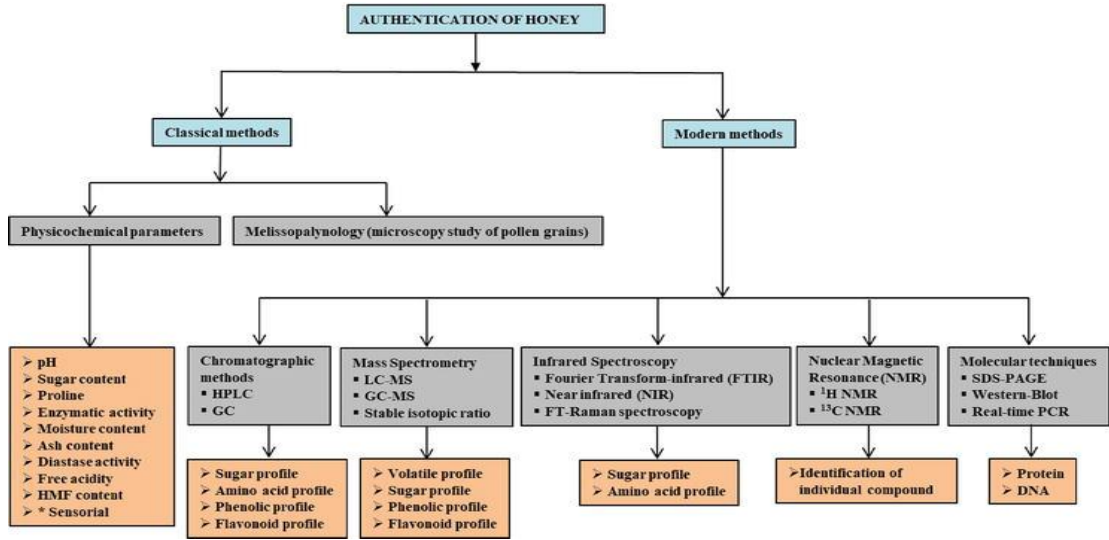
zorluk oluşturmaktadır. Bununla birlikte, optimal ekstraksiyon yöntemi, sıvı kromatografisi (LC) ve kütle spektrometrisi (MS) kullanılarak aşağı akış analizine uyumlu olmalı ve en yüksek miktarda proteini yakalayabilmelidir. Belirgin bir şekilde, protein ekstraksiyonu, saflaştırma ve tanımlama prosedürlerindeki ilerlemeler, çeşitli biyolojik sorunların anlaşılmasına yardımcı olmuştur [53], [54].

## **2.5. BAL SINIFLANDIRMASI KULLANILAN TEKNİKLER**

Bal, nereden geldiğine, nasıl hasat edildiğine ve nasıl hazırlandığına göre sınıflandırılabilir. Bal, kökenine göre dört türe ayrılır: çiçek, özsu, monofloral ve multifloral ballar. Çiçek balı çoğunlukla çiçek nektarından yapılırken, genellikle orman balı olarak bilinen özsu, arılar tarafından bitki özlerinden "tatlı özsu" toplandıktan sonra yapılır. Narenciye, manuka ve akasya balı gibi monofloral bal, esas olarak aynı bitki türünden toplam polen içeriği yüzde 45'in üzerinde olan tek bir botanik orijinden elde edilir ve bu bitki için adlandırılır. Polyfloral bal, multifloral balın diğer adıdır. Çayır çiçeği balı ve orman balı gibi hiçbirinin baskın olmadığı sayısız biyolojik kaynak vardır [55].

### **2.5.1. Balın Gerçekliği**

Saf balın tespiti ve orijinalliği balın özelliklerine göre yapılmıştır. Önemli bir görev haline geldiğinden, balın gerçekliğini ölçmek için çeşitli analitik yöntemler kullanılmıştır (Şekil 2.8).



Şekil 2. 8. Bal kimlik doğrulaması için kullanılan geleneksel ve modern analitik yöntemler.

### 2.5.2. Bal Tespit Yöntemleri Ve Teknolojileri

Bal doğrulama araştırmalarında, botanik kökeni belirlemek için geleneksel yaklaşım kullanılır. Monofloral balın kökenini belirlemek için duyuşal ve fizikokimyasal testler kullanılırken, balda bulunan çiçek polen taneciklerini mikroskopik inceleme yoluyla tanımlamak için tipik olarak melissopalinojik analiz kullanılır. Öte yandan melissopalinojik teknik, polen içeriği değişkenlik gösterdiği ve tipik olarak düşük olduğu için narenciye gibi diğer bal türleri için faydalı olmayabilir. Erkek ve dişi çiçeklerdeki polen miktarı bitki türüne, toplama mevsimine ve nektar çıkışına bağlı olarak değişir. Polen, bir arının bal kesesinden elenebilir ve bazı durumlarda bala hileli olarak eklenebilir. Bu prosedür, polen içeriğindeki büyük doğal dalgalanma nedeniyle duyuşal analiz ve belirli fizikokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi ile tamamlanmaktadır.

Balın botanik ve coğrafi kökenlerini belirlemek için geleneksel doğrulama tekniklerinin sınırları nedeniyle daha güvenilir güncel analitik yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Kromatografik teknikler, kütle spektrometrisi (MS) tabanlı teknikler, kızılötesi (IR) ve Raman teknikleri gibi titreşim spektroskopisi, nükleer manyetik rezonans (NMR), kararlı izotop analizi ve alev iyonizasyon dedektörleri (FID) gibi

gelişmiş analitik araçlar veya sensör dizileri, karbonhidrat (şeker) profilleri, mineral içeriği, fenolik ve flavonoid bileşimleri, aroma profili ve amino asit bileşimini ölçmek için çalışmalarda kullanılır [56].

## 2.6. TÜRKİYEDEKİ BAL TÜRLERİ

Bal Çeşidi	Yöresi
Kekik Balı	Ege ve Doğu Anadolu Bölgesi
Keçiboynuzu Balı	Türkiye Geneli
Ihlamur Balı	Artvin, Rize, Yalova, Bursa
Lavanta Balı	Isparta ve Burdur
Narenciye (Anavarza) Balı	Akdeniz Bölgesi
Anzer Balı	Rize (Ayder Yaylası)
Akasya Balı	Artvin
Çiçek Balı	Türkiye Geneli
Deli Bal (Ormangülü Balı)	Doğu Karadeniz
Çam Balı	Ege ve Akdeniz Bölgesi
Ayçiçek Balı	Trakya
Karabaş Otu Balı	Türkiye Geneli
Hayıt Balı	Akdeniz Bölgesi
Karabuğday Balı	Türkiye Geneli
Kestane Balı	Türkiye Geneli
Karakovan Balı	Karadeniz Bölgesi
Keven (Geven) Balı	Bitlis ve Doğu Anadolu Bölgesi
Meşe Balı	Trakya
Püren Balı	Akdeniz, Ege, Trakya ve Karadeniz Bölgeleri
Yüksekova Balı	Hakkari

Şekil 2. 9. Türkiyedeki bal türleri ile yöreleri.

## 2.7. MAKİNE ÖĞRENİMİ

Makine öğrenimi adı verilen bir yapay zeka biçimi, yapay zeka ilkelerini bilgi işlem sistemlerine uygulamak için algoritmalar kullanır ve çeşitli matematiksel ve istatistiksel süreçleri kullanarak verilerden sonuçlar çıkarır. Özellikle tıp mühendisliği ve biyomedikal mühendisliği uygulamaları düzenli olarak makine öğrenimini içerir. Bireyin çeşitli hastalıklar için risk faktörlerinin belirlenmesi, kanser teşhisi, görüntü işleme yazılımları, konuşma tanıma, nesne tanımlama vb.



Makine öğrenimi, bal türlerinin kütle spektrometresi tabanlı glikomik verilerine dayalı olarak sınıflandırılması için güçlü bir araç olabilir. Makine öğreniminin bu bağlamda nasıl uygulanabileceği hakkında bazı bilgiler aşağıda verilmiştir:

Makine öğrenimi algoritmaları, farklı bal türlerinin karakteristiği olan kütle spektrometresi tabanlı glikomik verilerdeki kalıpları öğrenmek için eğitilebilir. Algoritma, her numunenin belirli bir bal türüyle ilişkilendirildiği bir dizi etiketli veri üzerinde eğitilmiştir. Algoritma daha sonra yeni, etiketlenmemiş numunelerin bal tipini tahmin etmek için bu kalıpları kullanır.

Bal türü sınıflandırması için makine öğrenimini kullanmaya yönelik bir yaklaşım, destek vektör makineleri (SVM), rastgele ormanlar veya yapay sinir ağları gibi denetimli öğrenme algoritmalarını kullanmaktır. Bu algoritmalar, her numunenin belirli bir bal türüyle ilişkilendirildiği bir dizi etiketli veriden öğrenir. Algoritma bu veriler üzerinde eğitilir ve daha sonra yeni, etiketlenmemiş numunelerin bal tipini tahmin etmek için kullanılır [57], [58].

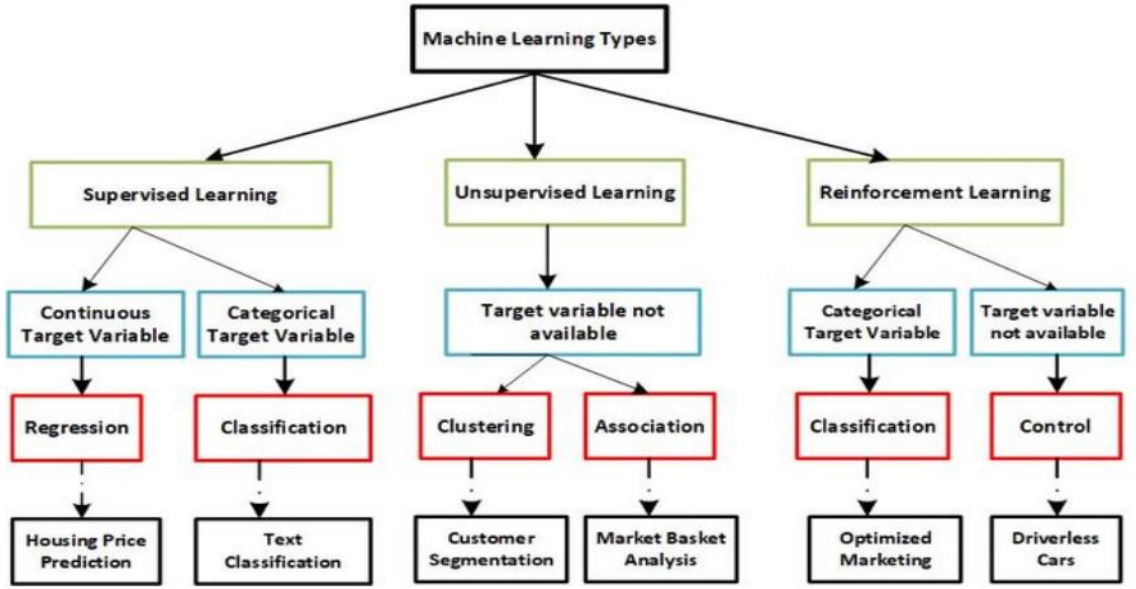
Başka bir yaklaşım, örnekleri glikomik verilerdeki benzerliklerine göre gruplandıran kümeleme algoritmaları gibi denetimsiz öğrenmedir. Bu algoritmalar, önceden bilinmeyen verilerdeki örüntüleri keşfetmek için kullanılabilir ve yeni bal türleri veya alt türleri keşfetmek için kullanılabilir.

Her iki durumda da makine öğrenimi yaklaşımının başarısı, algoritmayı eğitmek için kullanılan verilerin kalitesine ve temsil edilebilirliğine bağlıdır. Veriler çeşitli olmalı ve farklı bal türlerini ve alt türlerini temsil etmelidir ve glikomik veriler yüksek kalitede olmalı ve balda bulunan glikan yapılarını doğru bir şekilde yansıtmalıdır.

Özetle, makine öğrenimi, bal türlerinin kütle spektrometresi tabanlı glikomik verilerine dayalı olarak sınıflandırılması için güçlü bir araç olabilir. Bal türlerinin doğru ve hızlı bir şekilde sınıflandırılmasını sağlayabilir ve potansiyel olarak yeni bal türleri veya alt türleri keşfedebilir. Ancak, algoritmayı eğitmek için kullanılan verilerin kalitesi ve temsil edilebilirliği, bu yaklaşımın başarısı için kritik öneme sahiptir [59].

Makine öğrenmesinde;

- Gözetimli
- Gözetimsiz
- Takviyeli olmak üzere üç çeşit öğrenme türü vardır [60] (Şekil 2.10).



Şekil 2. 10. Makine öğrenimi algoritmaları ve yaygın uygulamalar [61].

Bu çalışmada sınıflandırmak için gözetimli öğrenme grubuna ait sınıflandırma algoritmaları kullanılmaktadır.

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. KULLANILAN MALZEMELER

Tez kapsamında kullanılan tüm kimyasallar aksi belirtilmedikçe Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. PNGase F enzimi Promega firmasından temin edilmiştir. Çiçek ve çam balları Türkiye'nin farklı yörelerinde bal üretimi yapan üreticilerden temin edilmiştir. Tablo 3.1'de bal örneklerinin temin edildiği bölgeler gösterilmiştir.

Tablo 3. 1. Kullanılan çiçek ve çam ballarına ait bilgi

Bal No	Bal Türü	Temin Edilen Yer / Marka /Yöre	Üretimde Kullanılan Arıların Irkı
1	Çiçek Balı	Gökçeada-Çanakkale	Gökçeada Arısı (Apis Mellifera Anatoliaca)
2	Çam Balı	Gökçeada-Çanakkale	Gökçeada Arısı (Apis Mellifera Anatoliaca)
3	Çiçek Balı	Söke	Muğla Sarısı, Kafkas Melezi
4	Çam Balı	Güzelçamlı	Muğla Kafkas Kırığı
5	Çiçek Balı	Bayramiç-Çanakkale	Kafkas Arısı
6	Çam Balı	Bayramiç-Çanakkale	Kafkas Arısı
7	Çiçek Balı	Sığırlı Köyü- Çanakkale	Çanakkale yerli arısı (Kafkas ve karniyo)
8	Çam Balı	Sığırlı Köyü- Çanakkale	Çanakkale yerli arısı (Kafkas ve karniyo)

Tablo 3.1 Kullanılan çiçek ve çam ballarına ait bilgi(devam ediyor)

9	Çiçek Balı	Köyceğiz-Muğla	Karniyo
10	Karakovan Çiçek Balı	Köyceğiz-Muğla	Karniyo
11	Çam Balı	Köyceğiz-Muğla	Muğla Arısı Kökeni İtalyan
12	Karakovan Çam Balı	Köyceğiz-Muğla	Muğla Arısı Kökeni İtalyan
13	Çiçek Balı	Mersin	Kafkas Arısı
14	Çam Balı	Mersin	Kafkas Arısı
15	Karakovan Çiçek Balı 1	Mersin	Kafkas Arısı
16	Çam Balı	Yunanistan	İtalyan Melezi ve trakya arısı

## 3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

### 3.2.1. Bal Proteinleri Ekstrasyonu

Her bir bal türünden (çam ve çiçek kaynaklarından) 100 µl örnek alındı. Örnekler 100 µl kloroform eklenerek karıştırıldı. Ardından üzerine 300 µl deiyonize su ve 400 µl metanol ilave edildi. Hazırlanan örnekler 14000 rcf (relatif santrifüj kuvveti) değerinde santrifüj edildi ve elde edilen sıvı faz, pelete zarar vermeden uzaklaştırıldı. 400 µl metanol eklenerek tekrar 14000 rcf'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Yine üsteki fazı uzaklaştırıldı ve son adımda örnekler 45°C'de hızlı bir vakum altında kurutuldu.

### 3.2.2. Bal Glikoproteinlerinden N-glikanların Salınımı ve 2-AA İle Etiketlenmesi

Protein ekstraktları, 50 µL %1 SDS içinde çözüldükten sonra denatürasyon işlemi için 90°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından, çözeltiye 25 µL %2 Igepal-CA630 ve 25 µL 5X PBS eklenerek karıştırıldı. Enzimatik deglikozilasyon

gerçekleştirmek için 1 U PNGase F enzimi eklenerek örnekler 37°C'de bir gece boyunca bekletildi.

N-glikanlar glikoproteinlerden uzaklaştırıldıktan sonra, örnekler 2-aminobenzoik asit (2-AA) ile etiketlendi. Bu işlem için öncelikle 48 mg/mL konsantrasyonda 2-AA (dimetil sulfoksit/asetik asit içinde, 10:3, v:v) ve 63 mg/mL sodyum siyanoborhidrür (NaCNBH<sub>3</sub>) (DMSO içinde) çözeltileri hazırlandı. Ardından, bu çözeltilerden sırasıyla 50 µL 2-AA ve 50 µL NaCNBH<sub>3</sub> alınarak glikan salınımı gerçekleştirilen bal örneklerine ilave edildi. Etiketleme işlemi, örneklerin 65°C'de 2 saat inkübe edilmesiyle gerçekleştirildi.

### **3.2.3. N-Glikanların Salınımı HILIC Ve PGC Temelli Saflaştırılmaları**

2-AA etiketli N-glikanlar, önce selüloz içeren katı faz ekstraksiyonu kullanılarak saflaştırıldı. Örnekler, son hacimlerinde %85 ACN içerecek şekilde %100 ACN ile ilave edildi. Yaklaşık 20 mg selüloz katı faz ekstraksiyon kartuşlarına aktarıldı. Kartuşlar, önce 1 mL %100 su ve ardından %85 ACN ile 2 kez yıkandı. Örnekler kartuşlara eklenip malzemeye etkileşmesi için 5 dakika bekletildi. Sonra, selüloz içeren kartuşlar, %1 TFA içeren %85 ACN ve %85 ACN çözeltileri ile 3 kez yıkandı, böylece fazla etiket ve diğer kimyasallar uzaklaştırıldı. 2-AA etiketli N-glikanların elüsyonu, 0.75 mL su kullanılarak gerçekleştirildi. Örnekler 0.75 µL TFA eklenerek daha sonra gözenekli grafitize karbon ile saflaştırma işlemi yapıldı. Yaklaşık 20 mg karbon içeren malzeme, kartuş içine yerleştirildi. İlk olarak, karbon içeren kartuşlar, %80 ACN içeren %0.1 TFA ve su içeren %0.1 TFA ile 1 mL olmak üzere 2 kez yıkandı. Daha sonra, selülozla saflaştırılan örnekler, karbon içeren kartuşlara eklenerek örneklerin malzemeye etkileşebilmesi için 5 dakika inkübe edildi. Sonra, karbon içeren kartuşlar, %0.1 TFA içeren su ile 5 kez yıkandı. 2-AA etiketli glikanların elüsyonu, %0.1 TFA içeren %80 ACN kullanılarak gerçekleştirildi. Daha sonra örnekler, 45°C'de hızlı vakum kurutucu kullanılarak kurutuldu.

### 3.2.4. MALDI-TOF/TOF-MS Analizleri

Elüsyon çözeltisinin 1 µL'si, MTP 384 Anchor örnek tutucusuna damlatılarak kurutuldu. Bu aşamadan sonra, hacimsel olarak 1/1 oranında asetonitril/H<sub>2</sub>O içinde çözülmüş ve %0.1 orto-fosforik asit içeren 5 mg DHB matriksi (2-5 dihidroksi benzoik asit) çözeltisinden 1 µL alınarak bu örneğin üzerine ilave edildi. Kristalleşme oluşuncaya kadar bekletildikten sonra analizler, Bruker rapifleXTM MALDI TissuetyperTM (Almanya, Bremen) cihazı kullanılarak MALDI kütle spektrometrisi ile gerçekleştirildi. Analizler negatif iyonlaşmada refletron modunda en az 8000 lazer atışı toplanarak gerçekleştirildi. Her analiz öncesi, Bruker rapifleXTM MALDI TissuetyperTM kütle spektrometrisi bir peptit karışımı ile kütle kalibrasyonu gerçekleştirildi. Hızlandırma voltajı (25kV) uygulanarak 1000-4000 kütle aralığında kütle spektrumları elde edildi.

### 3.2.5. Veri Analizleri

Analizleri gerçekleştirilen N-glikanların tanımlanması için elde edilen veriler Protein Scape yazılımına aktarıldı. Glycoquest algoritması kullanılarak her bir pikin hangi glikan bileşimini tespit ettiği belirlendi. Taramalardan CarbBank veritabanı kullanıldı. Kütle hata toleransı olarak 100 ppm ayarlandı. Elde edilen glikan bileşenlerinin alanı FlexAnalysis yazılımı ile elde edildi ve her bir N-glikanın göreceli alanı toplam alan normalizasyon yaklaşımı kullanılarak elde edildi. Her bir örnek 2 deneysel tekrar ile analiz edildi. Spektrum kalitesine göre 17 adet çam balı ve 14 adet çiçek balı örneklerine ait spektrumlar analizlerde kullanılmıştır.

### 3.2.6. İstatiksel ve Makine Öğrenmesi Analizleri

İstatiksel analizlerde Perseus yazılımı kullanılmıştır. İlk olarak normalizasyonu gerçekleştirilmiş veriler yazılıma tanıtıldı. Gerekli gruplandırmalar yapıldıktan sonra her bir grup için %80 göreceli alan değeri içerecek şekilde veriler sınıflandırıldı. Göreceli alanı belirlenmeyen glikan değerleri 0 olarak girildi. İstatiksel analizlerde klasik t testi kullanıldı ve anlamlı olarak değişim oranı p<0.05 kabul edildi. Volkan grafikleri oluşturularak anlamlı değişiklik gösteren bileşenler belirlendi.

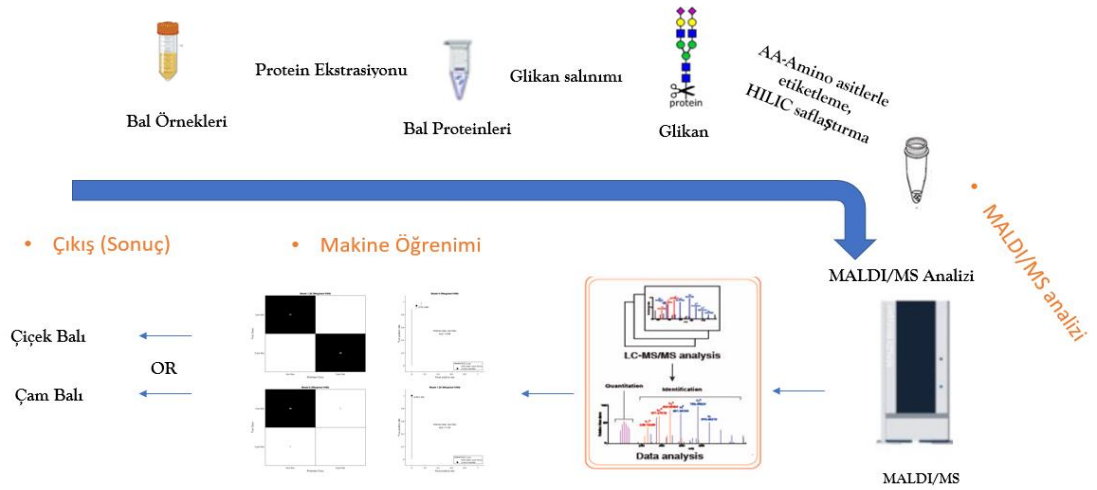
Makine öğrenmesi analizlerinde iki farklı veri seti kullanıldı. Birinci veri seti 13 farklı N-glikan bileşimini içerirken, ikinci veri seti istatistiksel olarak anlamlı değiştiği bulunan 3 farklı N-glikanı kapsamaktadır. Her iki veri seti de MatLab yazılımında bulunan classification learner uygulamasına yüklendi. Çapraz doğrulama oranı “5” olarak ayarlandı ve uygulamada bulunan tüm algoritmaların sınıflandırma performansı test edildi. Sonrasında doğruluk, kesinlik, geri çağırma ve F1 puanı gibi metrikleri kullanarak makine öğrenimi modellerinin performansını değerlendirildi.

## BÖLÜM 4

### BULGULAR

#### 4.1. BAL ÖRNEKLERİNİN MALDI-MS İLE PROFİLLENMESİ

Bu projede, farklı bal kaynaklarından (çam balı ve çiçek balı) 16 numune aldıktan sonra, bir önceki bölümde bahsedilen bir protokol kullanarak proteinleri ekstraksiyon edildi, ardından bal örnekleri profillenme amacıyla glikanların salınımını gerçekleştirip 2-AA etiketi ile etiketlendi. Daha sonra 2-AA etiketli glikanların saflaştırılması gerçekleştirildi. MALDI kütle spektrometresi (MALDI/MS) ile glikanlar analiz edildi. Sonrasında tespit edilen glikanlara ait kütle alan bilgileri ekstrete edildi ve her bir glikanın göreceli bolluğu tespit edildi. Son olarak istatistiksel ve makine öğrenmesi analizleri gerçekleştirildi (Şekil 4.1).

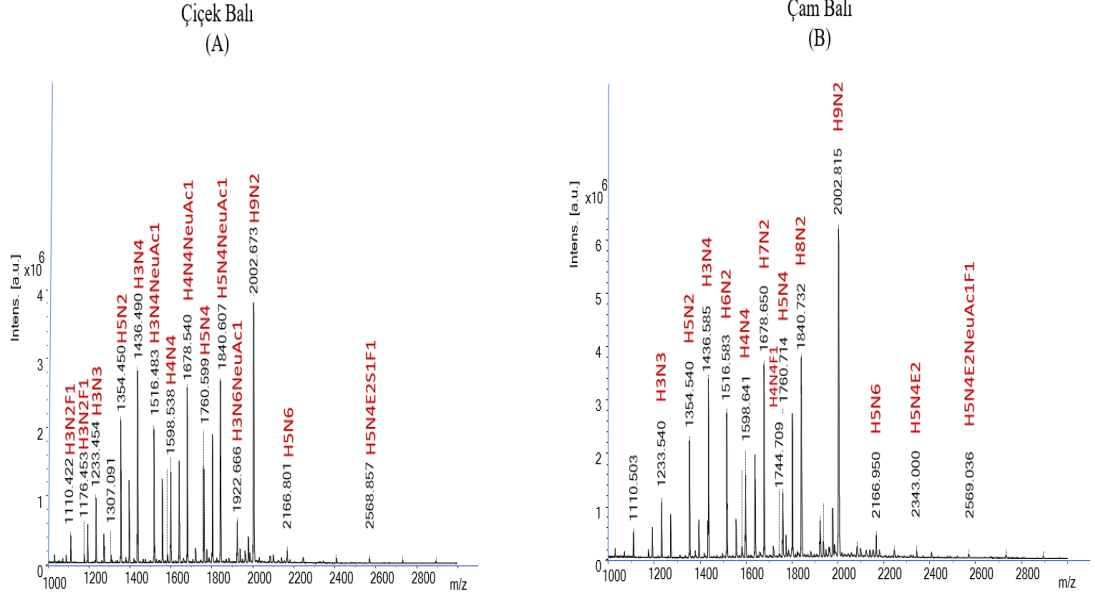


Şekil 4. 1. İş Akışı.

Glikanlar 2-AA etiketi ile etiketlendikten sonra MALDI-MS ile analiz edildi. Şekil 4.2. de çiçek ve çam ballarına ait MALDI kütle spektrumları görülmektedir. Analizler sonucunda çam ve çiçek balına ait glikan profilleri belirlendi. Toplam 76 adet farklı N-glikan yapısı belirlendi. Yüksek oranda deneysel tekrarlar arasında



varlığı belirlenen 13 adet *N*-glikan profili, analizlerde kullanılmıştır. Her bir glikanın göreceli bolluğu belirlendikten sonra istatistiksel olarak anlamlı değişen glikan profilleri belirlenmiştir.



Şekil 4. 2. Çiçek (A) ve Çam (B) balın bir örneğinin MALDI-MS analizi.

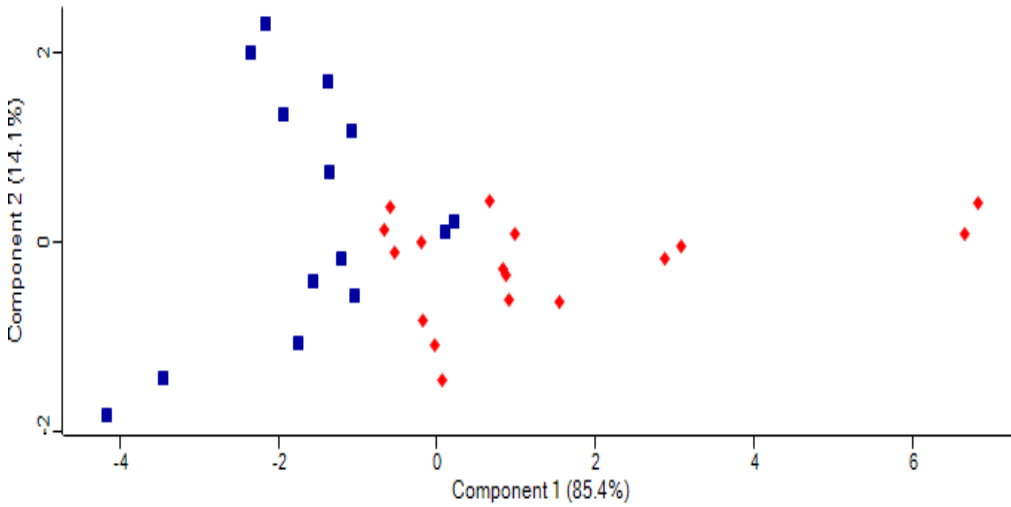
## 4.2. GLİKANLARIN BAL ÖRNEKLERİNE BAĞLI OLARAK İSTATİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmanın temel amacı bal örneklerini sınıflandırmak ve örnekleri mümkün olan en düşük hata oranıyla sınıflandırabilen ideal yöntemi incelemek olduğundan, makine öğreniminin analizi yapmadan önce çiçek ve çam ballarına ait glikanların birbirini arasındaki farklılıkların daha net anlaşılması için istatistiksel testler yapıldı.

Şekil 4.3'teki temel bileşen analizi, ballara ait tespit edilen tüm ortak glikanların kullanarak çam ve çiçek ballarını ayırt etme yeteneğini göstermektedir. Kırmızı noktalar çiçek balı örneklerine ait glikanları temsil ederken, mavi noktalar çam balını temsil etmektedir. İki boyutlu analizde, Component 1 varyansın %85.4'ünü, Component 2 ise %14.1'ini açıklamaktadır. Bu analiz, çam ve çiçek ballarının tüm *N*-glikan profillerine dayanarak yüksek bir ayırım gösterdiğini ortaya koymaktadır. Çam ve çiçek balları arasındaki ayırım, *N*-glikan profillerindeki belirgin miktarsal

farklılıklara bağlanabilir. Çizelgede görülen örneklerin kümelendiği, iki bal türünün glikan kompozisyonlarının önemli ölçüde farklı olduğunu göstermektedir. Verilerdeki en büyük varyansı yakalayan Component 1, muhtemelen iki bal türü arasındaki glikan bolluğundaki temel farklılıkları yansıtmaktadır. Benzer şekilde, Component 2, çam ve çiçek balları arasındaki ayrımada katkıda bulunan ek farklılıkları göstermektedir.

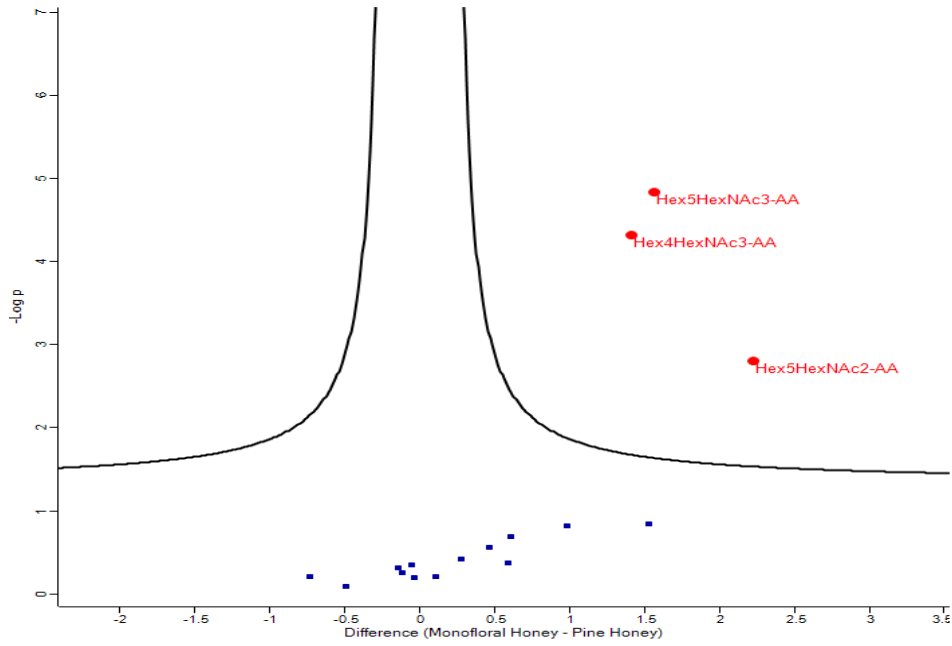
Bu bulgular, kapsamlı N-glikan profillemesinin temel bileşen analizi ile birleştirilerek bal sınıflandırma ve doğrulama için güçlü bir araç olarak kullanma potansiyelini vurgulamaktadır. Farklı glikan imzalarını değerlendiren bu yaklaşım, çam ve çiçek balları arasında ayrım yapmak için nicel bir yöntem sunarak, kökenleri hakkında değerli bilgiler sağlayabilir ve sahtekarlık veya yanlış etiketleme tespitini mümkün kılacaktır.



Şekil 4. 3. Çam balı ve Çiçek balı tüm glikanların temel bileşen analizi.

Çam ve çiçek balları arasındaki ayrımada en fazla katkıda bulunan belirli glikanları belirlemek için volkan grafik yöntemi kullanıldı. Bu istatistiksel analiz tekniği, iki bal türü arasındaki glikan bolluğundaki istatistiksel olarak anlamlı değişiklikleri belirlemeye olanak sağlar. Şekil 4.4'te görülen volkan grafiği, Hex5HexNAc3, Hex4HexNAc3 ve Hex5HexNAc2 glikanlarının çiçek ve çam balları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Hex5HexNAc3, Hex4HexNAc3 ve Hex5HexNAc2 glikanları, bolluk açısından dikkate değer farklılıklar göstermiştir ve bir bal türünde diğerine göre önemli ölçüde yüksek seviyelerde bulunmuştur. Bu belirli glikanlar, çam ve çiçek balları arasında ayrımı sağlayan temel ayırt ediciler olarak ortaya çıkmaktadır. bu glikanların farklı bolluk düzeylerine katkıda bulunan temel faktörlerin, enzimatik aktiviteler veya çiçek kaynakları gibi, araştırılması, iki bal türü arasındaki glikan kompozisyonundaki gözlenen farklılıkların mekanizmalarını anlamamızı derinleştirebilir.



Şekil 4. 4. Çam balı ve çiçek balı arasındaki anlamlı farklılık gösteren glikanlar temel bileşen analizi.

### 4.3. BAL ÖRNEKLERİNİN MAKİNE ÖĞRENİMİ İLE SINIFLANDIRILMASI

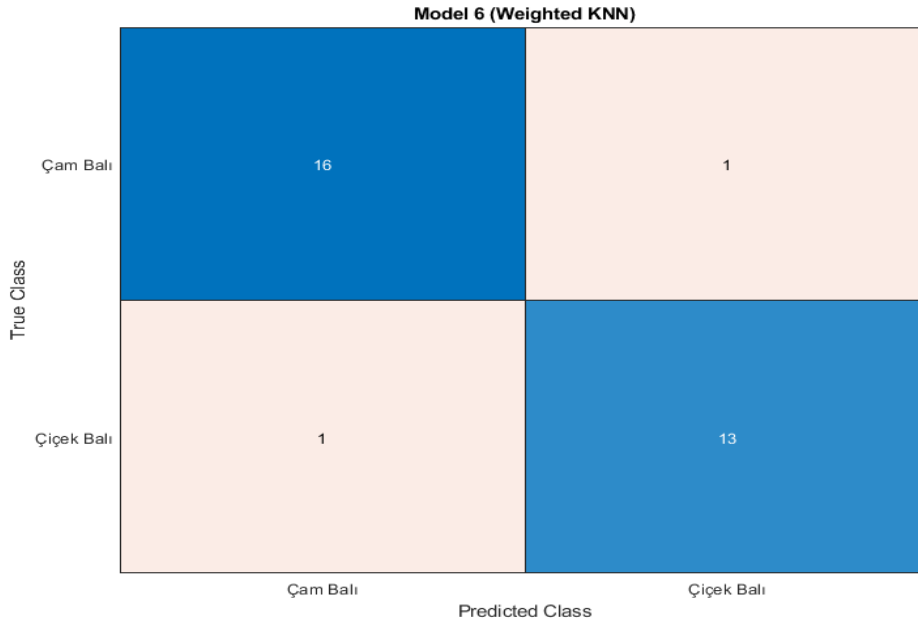
#### 4.3.1. Bal Örneklerinin Sınıflandırılması

Makine öğrenimi adımında, glikanlara ait göreceli alanlar kütle spektrometrik verilere bağlı olarak elde edildi. MATLAB kullanılarak makine öğrenme modelleri oluşturuldu ve optimize edildi (5% çapraz doğrulama yöntemiyle). MATLAB

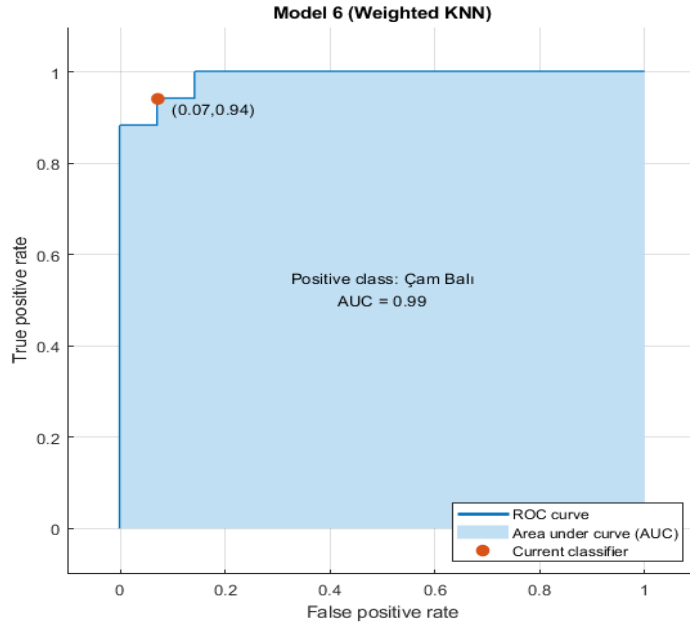
sınıflandırma uygulamasında bulunan tüm modellerin performansı çalışmada değerlendirilmiştir. Ayrıca, doğruluk (accuracy), f1 skor, ROC eğrisi ve AUC gibi ölçütler hesaplanarak makine öğrenimi modellerinin performansını değerlendirilmiştir.

Şekil 4.5, çam ve çiçek proteinlerinden elde edilen tüm glikanların kullanıldığı makine öğrenmesi sınıflandırmasının sonuçlarını gösteren bir karmaşa matrisini sunmaktadır. Şekilde görüldüğü gibi, gerçek pozitif skoru 16'dır, bu da 16 çam balı örneğinin doğru bir şekilde sınıflandırıldığını gösterir. Ancak, bir adet yanlış pozitif skoru vardır, yani bir çam balı örneği yanlış şekilde sınıflandırılmıştır. Benzer şekilde, çiçek balı örnekleri için 13 tanesi doğru bir şekilde sınıflandırılırken bir tanesi yanlış sınıflandırılmıştır. Elde edilen karmaşa matrisi, tüm glikanlar temel alındığında sınıflandırma modelinin doğruluğu hakkında bilgi sağlar.

Şekil 4.6'da bu modele ait ROC eğrisi analizi sunulmuş olup, eğrinin altında kalan alan (AUC) gösterilmektedir. Elde edilen AUC değeri 0.99'dur ve yüksek bir sınıflandırma performansını işaret eder. ROC eğrisinin çoğunlukla diyagonal çizginin üzerinde yer alması, modelin çam ve çiçek ballarını ayırt etme konusunda başarılı olduğunu göstermektedir. Yüksek AUC değeri, seçilen glikanlara dayalı olarak örneklerin doğru bir şekilde sınıflandırılmasındaki etkinliği daha da doğrulamaktadır.



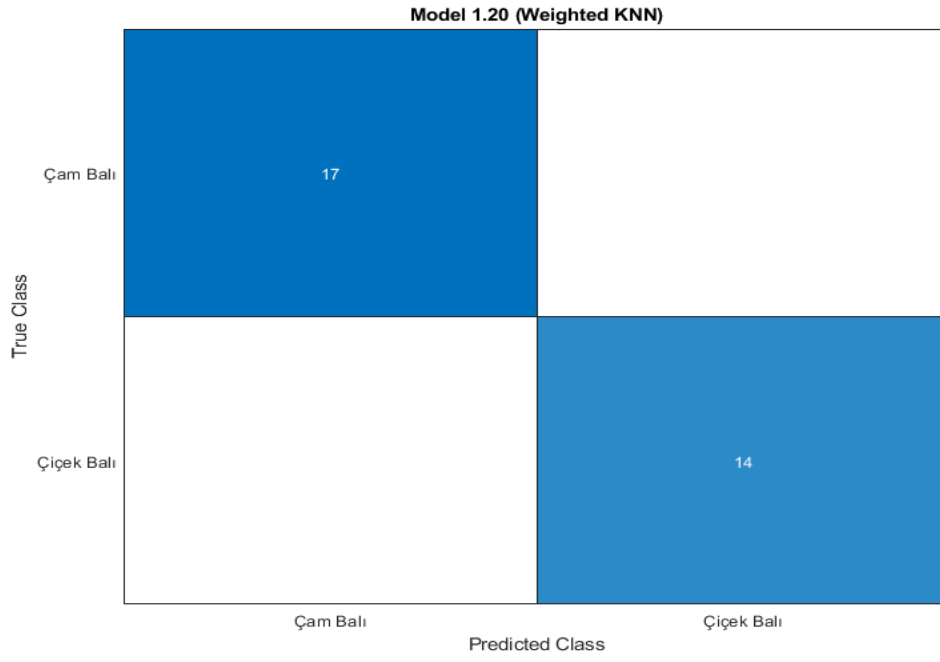
Şekil 4. 5. Tüm glikanlar için KNN skoru oranı.



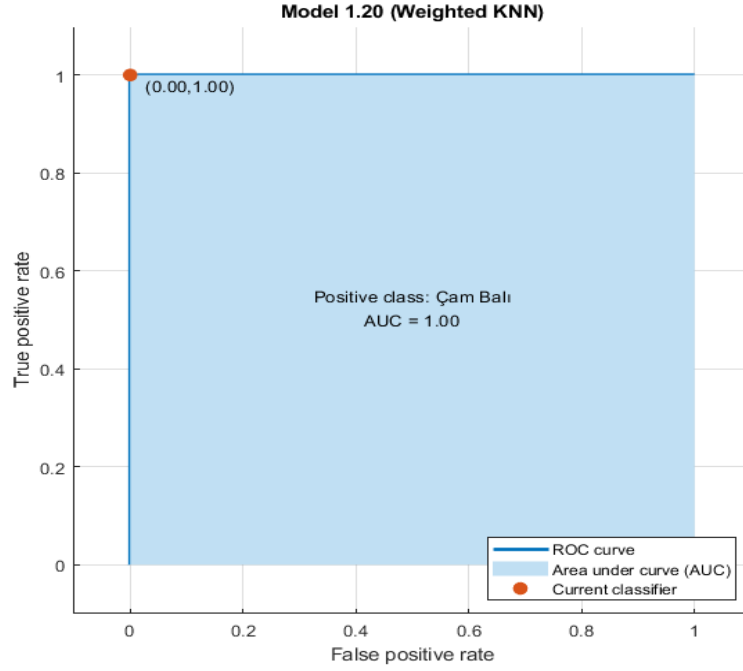
Şekil 4. 6Şekil 4.6. AUC değeri ve ROC eğrisi.

Şekil 4.7 ise üç istatistiksel olarak anlamlı glikan kullanılarak elde edilen makine öğrenmesi sınıflandırması sonuçları için bir karmaşa matrisini sunmaktadır. Bu durumda, 17 çam balı örneği ve 14 çiçek balı örneği tamamen ve kesin bir şekilde birbirinden ayırt edilmiştir, bu da %100 doğrulukla sonuçlanmıştır. İki bal türü arasındaki başarılı ayırım, üç seçilen glikanın ayırt etme gücünü göstermektedir.

Şekil 4.8, bu üç istatistiksel olarak anlamlı glikanın kullanıldığı sınıflandırma modeli için ROC eğrisi analizini göstermektedir. ROC eğrisi tamamen diyagonal çizginin üzerinde yer almakta ve AUC değeri 1,00 olarak rapor edilmektedir, bu da yüksek bir sınıflandırma performansını işaret etmektedir. Bu analizde kullanılan algoritma ve modelin, seçilen glikanlara dayalı olarak örnekleri doğru bir şekilde sınıflandırmada son derece etkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 7. KNN skoru oranı.



Şekil 4. 8. AUC değeri ve ROC eğrisi.

### 4.3.2. Sınıflandırılmanın Modelin Değerlendirilmesi

**Recall (Duyarlılık):** glikanların doğru tespit etme oranını ifade etmektedir.

Formülü: 
$$\text{Duyarlılık} = \frac{TP}{TP+FN}$$

**Precision (Kesinlik):** bal türü tahmin edilen gerçekte ne kadar başarılı tahmin edildiğini göstermektedir.

Formülü: 
$$\text{Kesinlik} = \frac{TP}{TP+FP}$$

**Accuracy:** Accuracy değeri modelde doğru tahmin ettiğimiz alanların toplam veri kümesine oranı ile hesaplanmaktadır.

Formülü: 
$$\text{Accuracy} = \frac{TP+TN}{TP+FP+TN+FN}$$

**F1 skoru:** Kesinlik ve duyarlılık değerlerinin harmonic ortalamasını göstermektedir.

Formülü: 
$$\text{F1 skoru} = \frac{2 \cdot \text{duyarlılık} \cdot \text{kesinlik}}{\text{duyarlılık} + \text{kesinlik}}$$

**ROC / AUC:** ROC eğrisi sınıflandırma problemleri için önemli bir performans ölçümüdür.

AUC ise modelin sınıfları ne kadar başarılı ayırt edebildiğini anlatır. Şekil 4.10'da ROC eğrisi ve AUC arasındaki ilişki göstermektedir.

En iyi f1 skoru elde edildiğinde en iyi ROC eğrisi de tespit edilmektedir.

**TP, FN, TN, FP tanımları:**

TP: Gerçek Pozitif (True Positive) : Model, pozitif sınıfı doğru olarak pozitif bir sınıf olarak öngördü.

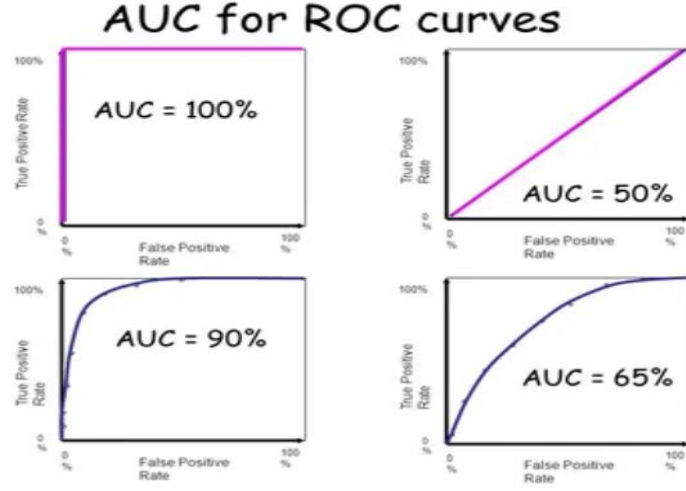
FP: Yanlış Pozitif (False Positive) : Model, negatif sınıfı yanlış, pozitif bir sınıf olarak öngördü.

FN: Yanlış Negatif (False Negative): Model, pozitif sınıfı yanlış, negatif sınıf olarak öngördü.

TN: Gerçek Negatif (True Negative): Model, negatif sınıfı doğru olarak negatif sınıfı öngördü.

Tablo 4. 1. Sınıflandırma modellerinin değerleri

Glikan	Duyarlılık	Kesinlik	Accuracy	F1 skoru
Tümü	0,941	0,941	0,935	0,941
Anlamli 3 tanesi	1	1	1	1



Şekil 4. 9. AUC değeri ROC eğrisi ile ilişkisi.

Sunulan sonuçlar, farklı glikan setlerini kullanarak çam ve çiçek balları arasındaki ayrımı yapabilen makine öğrenmesi algoritmalarının yeteneklerini vurgulamaktadır. Glikanların kapsamlı analizi, doğru ve güvenilir sınıflandırma modellerinin geliştirilmesine olanak tanır ve bu da balın doğrulama ve kalite kontrolü alanında önemli sonuçlar doğurabilir.



## BÖLÜM 5

### SONUÇLAR

Çam ve çiçek ballarının glikan sınıflandırması, MALDI/MS tekniği kullanılarak farklı bölgelerden elde edilen örnekler üzerinde gerçekleştirildi.

Makine öğrenmesi algoritmaları, tüm glikanlara dayalı olarak örnekleri sınıflandırmak için kullanıldı. Çam balı sınıflandırması için 16 doğru pozitif ve 1 yanlış pozitif sonucu elde edildi, yani 16 çam balı örneği doğru şekilde sınıflandırıldı ancak 1 tanesi yanlış olarak sınıflandırıldı. Çiçek balı sınıflandırması için ise 13 örnek doğru şekilde sınıflandırılırken, 1 örnek yanlış olarak sınıflandırıldı.

Üç istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren glikan dikkate alındığında, makine öğrenmesi algoritmaları çam ve çiçek balları arasında tam bir ayırım sağladı. 17 çam balı örneği ve 14 çiçek balı örneği tamamen doğru şekilde ayrıldı, böylece %100 doğruluk elde edildi.

Makine öğrenmesi modellerinin performansı ROC eğrileri ve AUC değerleri kullanılarak değerlendirildi. Tüm glikanlar dahil edildiğinde, AUC değeri 0,99 olarak hesaplandı.

Yalnızca istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren üç glikan dikkate alındığında, ROC eğrisi doğru pozitif oranında 1 değerini yakaladı ve AUC değeri 1 olarak raporlandı. Bu sonuçlar, kullanılan algoritma ve modelin daha yüksek bir başarı düzeyini temsil ettiğini göstermektedir.

İstatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren üç glikanı kullanan makine öğrenmesi algoritmaları, çam ve çiçek balları arasındaki ayırımı daha iyi bir şekilde gerçekleştirdi. Bu glikan temelli sınıflandırma modeli, iki bal türü arasındaki ayırımı doğru bir şekilde yapma konusunda üstün performans sergiledi.

Sonuç olarak, MALDI/MS tekniği ve makine öğrenmesi algoritmaları kullanılarak yapılan çam ve çiçek balı glikan sınıflandırması başarılı sonuçlar ortaya koymuştur. Tüm glikanların dahil edilmesi yüksek bir başarı oranı sağlarken, istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren üç glikana odaklanmanın performansı artırdığı ve bal

türleri arasında tam bir ayırım sağladığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, glikan temelli sınıflandırmanın balın kimlik doğrulama ve kalite kontrol uygulamalarında etkin bir araç olarak kullanılabilme potansiyelini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. M. Lima and J. W. Baynes, "Glycation," *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, pp. 405–411, Jan. 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-378630-2.00120-1.
2. "Glycosylation - PMC." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3047787/> (accessed Mar. 28, 2022).
3. "N-Linked Glycans Overview." [https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-labeling-and-modification/n-glycans?gclid=CjwKCAjwoduRBhA4EiwACL5RP\\_j4Y-M8wZ3SLDPXww-hk\\_mkBA1YQvwoAuiPqJQC5tCvyFXTmdgqERoC\\_X0QAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-labeling-and-modification/n-glycans?gclid=CjwKCAjwoduRBhA4EiwACL5RP_j4Y-M8wZ3SLDPXww-hk_mkBA1YQvwoAuiPqJQC5tCvyFXTmdgqERoC_X0QAvD_BwE) (accessed Mar. 29, 2022).
4. "Biotechnology and Bioengineering - William G. Flynne - Google Kitaplar." [https://books.google.com.tr/books?id=WEBBP5IYqJQC&pg=PA45&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.tr/books?id=WEBBP5IYqJQC&pg=PA45&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false) (accessed Mar. 29, 2022).
5. K. Julenius, "NetCGlyc 1.0: prediction of mammalian C-mannosylation sites," *Glycobiology*, vol. 17, no. 8, pp. 868–876, Aug. 2007, doi: 10.1093/GLYCOB/CWM050.
6. T. Yoshida-Moriguchi et al., "O-Mannosyl Phosphorylation of Alpha-Dystroglycan is Required for Laminin Binding," *Science*, vol. 327, no. 5961, p. 88, Jan. 2010, doi: 10.1126/SCIENCE.1180512.
7. D. Crich, "Mechanism of a chemical glycosylation reaction," *Acc Chem Res*, vol. 43, no. 8, pp. 1144–1153, Aug. 2010, doi: 10.1021/AR100035R.
8. M. Ząbczyńska and E. Pocheć, "[The role of protein glycosylation in immune system].," *Postepy Biochem*, vol. 61, no. 2, pp. 129–137, Jan. 2015, Accessed: Mar. 29, 2022. [Online]. Available: <https://europepmc.org/article/med/26689005>
9. B. Domon and R. Aebersold, "Mass spectrometry and protein analysis," *Science*, vol. 312, no. 5771, pp. 212–217, Apr. 2006, doi: 10.1126/SCIENCE.1124619.
10. J. R. Yates, "Mass spectrometry from genomics to proteomics," *Trends in Genetics*, vol. 16, no. 1, pp. 5–8, 2000, doi: 10.1016/S0168-9525(99)01879-X.

11. “Prof. Dr. Bilsen Beşergil: Kütle Spektrometresi (mass spectrometer).” [http://bilsenbesergil.blogspot.com/p/blog-page\\_701.html](http://bilsenbesergil.blogspot.com/p/blog-page_701.html) (accessed Mar. 29, 2022).
12. “Lineer uçuş zamanlı kütle spektrometresinde çözünürlüğün artırılması için iyon optiklerinin teorik olarak dizaynı ve bilgisayar simülasyonu.” <https://9lib.net/document/oy83182q-zamanli-spektrometresinde-coezuenerlueguen-artirilmasi-optiklerinin-dizayni-bilgisayar-simuelasyonu.html> (accessed Mar. 30, 2022).
13. J. H. Banoub, R. P. Newton, E. Esmans, D. F. Ewing, and G. Mackenzie, “Recent Developments in Mass Spectrometry for the Characterization of Nucleosides, Nucleotides, Oligonucleotides, and Nucleic Acids,” *Chem Rev*, vol. 105, no. 5, pp. 1869–1915, May 2005, doi: 10.1021/CR030040W.
14. J. C. Holmes and F. A. Morrell, “Oscillographic Mass Spectrometric Monitoring of Gas Chromatography;,” <http://dx.doi.org/10.1366/000370257774633394>, vol. 11, no. 2, pp. 86–87, Aug. 2016, doi: 10.1366/000370257774633394.
15. A. El-Aneed, A. Cohen, and J. Banoub, “Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers,” <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>, vol. 44, no. 3, pp. 210–230, 2009, doi: 10.1080/05704920902717872.
16. H. Awad, M. M. Khamis, and A. El-Aneed, “Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization,” <http://dx.doi.org/10.1080/05704928.2014.954046>, vol. 50, no. 2, pp. 158–175, Feb. 2014, doi: 10.1080/05704928.2014.954046.
17. “Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry - Alison E Ashcroft - Google Kitaplar.” [https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=CG0oDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=mass+spectrometry+Ionization+Methods&ots=mOdSRCpFr8&sig=au6oZVX\\_1CzUx59mohIupO1gNtc&redir\\_esc=y#v=onepage&q=mass%20spectrometry%20Ionization%20Methods&f=false](https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=CG0oDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=mass+spectrometry+Ionization+Methods&ots=mOdSRCpFr8&sig=au6oZVX_1CzUx59mohIupO1gNtc&redir_esc=y#v=onepage&q=mass%20spectrometry%20Ionization%20Methods&f=false) (accessed Mar. 29, 2022).
18. G. Siuzdak, “ An Introduction to Mass Spectrometry Ionization: An Excerpt from The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology , 2nd ed.; MCC Press: San Diego, 2005 ,” *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation*, vol. 9, no. 2, pp. 50–63, Apr. 2004, doi: 10.1016/J.JALA.2004.01.004.
19. E. de Hoffmann and V. Stroobant, “Mass Spectrometry Principles and Applications.”
20. M. Dole, R. L. Hines, L. L. Mack, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, and M. B. Alice, “Gas Phase Macroions,” *Macromolecules*, vol. 1, no. 1, pp. 96–97, Jan. 2002, doi: 10.1021/MA60001A017.

21. T. M. Annesley, "Ion Suppression in Mass Spectrometry," *Clin Chem*, vol. 49, no. 7, pp. 1041–1044, Jul. 2003, doi: 10.1373/49.7.1041.
22. R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, and T. Olah, "Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization," *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 11, no. 11, pp. 942–950, 2000, doi: 10.1016/S1044-0305(00)00163-X.
23. A. van Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, and Y. Michotte, "Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects," *Journal of Chromatography B*, vol. 877, no. 23, pp. 2198–2207, Aug. 2009, doi: 10.1016/J.JCHROMB.2009.01.003.
24. F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, and M. C. Gennaro, "Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry," *J Chromatogr A*, vol. 1217, no. 25, pp. 3929–3937, Jun. 2010, doi: 10.1016/J.CHROMA.2009.11.060.
25. S. Wang, M. Cyronak, and E. Yang, "Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response?: A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 43, no. 2, pp. 701–707, Jan. 2007, doi: 10.1016/J.JPBA.2006.08.010.
26. D. J. Harvey, "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates and glycoconjugates," *Int J Mass Spectrom*, vol. 226, no. 1, pp. 1–35, Mar. 2003, doi: 10.1016/S1387-3806(02)00968-5.
27. M. Balazy, "Eicosanomics: targeted lipidomics of eicosanoids in biological systems," *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, vol. 73, no. 3–4, pp. 173–180, Apr. 2004, doi: 10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2004.03.003.
28. I. G. Gut, "DNA analysis by MALDI-TOF mass spectrometry," *Hum Mutat*, vol. 23, no. 5, pp. 437–441, May 2004, doi: 10.1002/HUMU.20023.
29. W. Henderson and J. S. McIndoe, "Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds: Tools - Techniques - Tips," *Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds: Tools - Techniques - Tips*, pp. 1–271, Nov. 2005, doi: 10.1002/0470014318.
30. M. A. Baldwin, "Mass Spectrometers for the Analysis of Biomolecules," *Methods Enzymol*, vol. 402, pp. 3–48, Jan. 2005, doi: 10.1016/S0076-6879(05)02001-X.
31. A. M. Cohen, A. A. H. Mansour, and J. H. Banoub, "Absolute quantification of Atlantic salmon and rainbow trout vitellogenin by the 'signature peptide' approach using electrospray ionization QqToF tandem mass spectrometry," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 41, no. 5, pp. 646–658, May 2006, doi: 10.1002/JMS.1023.

32. K. Y. C. Fung, S. Askovic, F. Basile, and M. W. Duncan, "A simple and inexpensive approach to interfacing high-performance liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry," *Proteomics*, vol. 4, no. 10, pp. 3121–3127, Oct. 2004, doi: 10.1002/PMIC.200300843.
33. G. A. Breaux, K. B. Green-Church, A. France, and P. A. Limbach, "Surfactant-Aided, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Hydrophobic and Hydrophilic Peptides," *Anal Chem*, vol. 72, no. 6, pp. 1169–1174, Mar. 2000, doi: 10.1021/AC9907282
34. U. Kallweit, K. O. Bornsen, G. M. Kresbach, and H. M. Widmer, "Matrix Compatible Buffers for Analysis of Proteins with Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry," *RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY*, vol. 10, pp. 845–849, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1097-0231(199605)10:7.
35. M. Karas, M. Gö, and J. Jürgen Schäfer, "Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors," *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY* *J. Mass Spectrom*, vol. 35, pp. 1–12, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1096-9888(200001)35:1.
36. L. Paša-Tolić, C. Masselon, R. C. Barry, Y. Shen, and R. D. Smith, "Proteomic analyses using an accurate mass and time tag strategy," *Biotechniques*, vol. 37, no. 4, pp. 621–639, Jun. 2004, doi: 10.2144/04374RV01/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE7.JPEG.
37. A. W. Purcell and J. J. Gorman, "The use of post-source decay in matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry to delineate T cell determinants," *J Immunol Methods*, vol. 249, no. 1–2, pp. 17–31, Mar. 2001, doi: 10.1016/S0022-1759(00)00361-6.
38. N. Joly, A. el Aneed, P. Martin, R. Cecchelli, and J. Banoub, "Structural determination of the novel fragmentation routes of morphine opiate receptor antagonists using electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 19, no. 21, pp. 3119–3130, Nov. 2005, doi: 10.1002/RCM.2179.
39. J. F. J. Todd, "Recommendations for nomenclature and symbolism for mass spectroscopy (including an appendix of terms used in vacuum technology)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 63, no. 10, pp. 1541–1566, Jan. 1991, doi: 10.1351/PAC199163101541.
40. A. F. M. Altelaar, J. Munoz, and A. J. R. Heck, "Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics," *Nat Rev Genet*, vol. 14, no. 1, pp. 35–48, Jan. 2013, doi: 10.1038/NRG3356.

41. J.-L. Ren, A.-H. Zhang, L. Kong, and X.-J. Wang, “Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites,” 2018, doi: 10.1039/c8ra01574k.
42. “NIBSC - Glycan analysis.” [https://www.nibsc.org/science\\_and\\_research/analytical\\_sciences/glycan\\_analysis.aspx](https://www.nibsc.org/science_and_research/analytical_sciences/glycan_analysis.aspx) (accessed Mar. 31, 2022).
43. W. Morelle and J. C. Michalski, “Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry,” *Nature Protocols* 2007 2:7, vol. 2, no. 7, pp. 1585–1602, Jun. 2007, doi: 10.1038/nprot.2007.227.
44. D. A. Fischler and R. Orlando, “N-linked Glycan Release Efficiency: A Quantitative Comparison between NaOCl and PNGase F Release Protocols,” *J Biomol Tech*, vol. 30, no. 4, p. 58, 2019, doi: 10.7171/JBT.19-3004-001.
45. L. R. Ruhaak, G. Zauner, C. Huhn, C. Bruggink, A. M. Deelder, and M. Wuhrer, “Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 397, no. 8, p. 3457, Aug. 2010, doi: 10.1007/S00216-010-3532-Z.
46. K. Stavenhagen et al., “Quantitative mapping of glycoprotein micro-heterogeneity and macro-heterogeneity: an evaluation of mass spectrometry signal strengths using synthetic peptides and glycopeptides,” *J Mass Spectrom*, vol. 48, no. 6, pp. i–i, Jun. 2013, doi: 10.1002/JMS.3189.
47. K. R. Anumula and P. B. Taylor, “A comprehensive procedure for preparation of partially methylated alditol acetates from glycoprotein carbohydrates,” *Anal Biochem*, vol. 203, no. 1, pp. 101–108, May 1992, doi: 10.1016/0003-2697(92)90048-C.
48. L. R. Ruhaak et al., “Optimized workflow for preparation of APTS-labeled N-glycans allowing high-throughput analysis of human plasma glycomes using 48-channel multiplexed CGE-LIF,” *J Proteome Res*, vol. 9, no. 12, pp. 6655–6664, Dec. 2010, doi: 10.1021/PR100802F.
49. P. Gallmann, “Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects,” *J Apic Res*, pp. 269–275, Dec. 2007, doi: 10.3896/IBRA.1.46.4.11.
50. N. Gheldof, X. H. Wang, and N. J. Engeseth, “Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources,” *J Agric Food Chem*, vol. 50, no. 21, pp. 5870–5877, Oct. 2002, doi: 10.1021/JF0256135.
51. Md. M. Hossain, D. N. Barman, and Md. A. Rahman, “Amino Acids, Proteins, and Enzymes,” *Honey*, pp. 50–65, Mar. 2023, doi: 10.1002/9781119113324.CH5.

52. S. Kowalski, M. Kopuncová, Z. Ciesarová, and K. Kukurová, “Free amino acids profile of Polish and Slovak honeys based on LC–MS/MS method without the prior derivatisation,” *J Food Sci Technol*, vol. 54, no. 11, p. 3716, Oct. 2017, doi: 10.1007/S13197-017-2838-7.
53. P. Yiou et al., “Evaluation of extraction procedures for 2-DE analysis of aphid proteins,” *J Sep Sci*, vol. 36, no. 3, pp. 532–539, Feb. 2013, doi: 10.1002/jssc.201200642.
54. F. S. Wu and M. Y. Wang, “Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis from protease-rich plant tissues,” *Anal Biochem*, vol. 139, no. 1, pp. 100–103, May 1984, doi: 10.1016/0003-2697(84)90394-4.
55. C. Pita-Calvo and M. Vázquez, “Differences between honeydew and blossom honeys: A review,” *Trends Food Sci Technol*, vol. 59, pp. 79–87, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.TIFS.2016.11.015.
56. T. Voyslavov, E. Mladenova, and R. Balkanska, “A new approach for determination of the botanical origin of monofloral bee honey, combining mineral content, physicochemical parameters, and self-organizing maps,” *Molecules*, vol. 26, no. 23, Dec. 2021, doi: 10.3390/MOLECULES26237219.
57. F. Mateo, A. Tarazona, and E. M. Mateo, “Comparative study of several machine learning algorithms for classification of unifloral honeys,” *Foods*, vol. 10, no. 7, Jul. 2021, doi: 10.3390/FOODS10071543/S1.
58. M. Al-Awadhi and R. R. Deshmukh, “Classification of Honey Botanical and Geographical Sources using Mineral Profiles and Machine Learning,” *SSRN Electronic Journal*, Nov. 2022, doi: 10.2139/SSRN.4332757.
59. V. Bisutti et al., “Multivariate and machine learning approaches for honey botanical origin authentication using near infrared spectroscopy,” *J Near Infrared Spectrosc*, vol. 27, no. 1, pp. 65–74, Feb. 2019, doi: 10.1177/0967033518824765/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\_0967033518824765-FIG3.JPEG.
60. “Makine Öğrenmesi Nedir ?. Herkese merhabalar, | by Halil İbrahim ŞAFAK | Türkçe Yayın | Medium.” <https://medium.com/t%C3%BCrkiye/makine-%C3%B6%C4%9Frenmesi-nedir-20dee450b56e> (accessed Jun. 13, 2023).
61. H. U. Dike, Y. Zhou, K. K. Deveerasetty, and Q. Wu, “Unsupervised Learning Based On Artificial Neural Network: A Review,” 2018 IEEE International Conference on Cyborg and Bionic Systems, CBS 2018, pp. 322–327, Jan. 2019, doi: 10.1109/CBS.2018.8612259.



## ÖZGEÇMİŞ

Saad MASRI Lisans eğitimine 2016 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'nde başladı ve 2020 yılında Onur öğrencisi olarak tamamladı. Yüksek Lisans eğitimini 2020 yılında Karabük Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı'nda başladı ve 2023 yılında "KÜTLE SPEKTROMETRİSİ TEMELLİ GLİKOMİK VE MAKİNE ÖĞRENİMİ İLE BAL TİPLERİNİN SINIFLANDIRMASI" adlı tezini savunarak tamamladı.