

**BADEM VE FINDIKTAKİ ALERJEN PEPTİDLERİN
PROTEOMİKS TEKNİĞİ KULLANILARAK TESPİTİ VE
ISIL İŞLEM SONRASI ALERJENLERİN
STABİLİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurcan AYŞAR GÜZELSOY



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BADEM VE FINDIKTAKİ ALERJEN PEPTİDLERİN PROTEOMİK
TEKNİĞİ KULLANILARAK TESPİTİ VE ISIL İŞLEM SONRASI
ALERJENLERİN STABİLİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurcan AYŞAR GÜZELSOY
0000-0002-6843-6076

Prof. Dr. Yasemin ŞAHAN
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2021
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Nurcan AYŞAR GÜZELSOY tarafından hazırlanan “BADEM VE FINDIKTAKİ ALERJEN PEPTİDLERİN PROTEOMİKS TEKNİĞİ KULLANILARAK TESPİTİ VE ISIL İŞLEM SONRASI ALERJENLERİN STABİLİTESİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Yasemin ŞAHAN
0000-0003-3457-251X

Başkan : Prof. Dr. Yasemin ŞAHAN
0000-0003-3457-251X
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
İmza

Üye : Prof. Dr. Ozan GÜRBÜZ
0000-0001-7871-1628
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
İmza

Üye : Doç. Dr. Asuman CANSEV
0000-0002-3353-846X
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
İmza

Üye : Dr.Öğr. Üyesi Dilek DÜLGER ALTINER
0000-0002-7043-2883
Kocaeli Üniversitesi, Turizm Fakültesi,
Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü
İmza

Üye : Dr.Öğr. Üyesi Emine AYDIN
0000-0001-9635-4791
Düzce Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi,
Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü
İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü

.././.....

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

06/07/2021

Nurcan AYŞAR GÜZELSOY

TEZ YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezin/raporun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma izni Bursa Uludağ Üniversitesi'ne aittir. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları ile tezin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları tarafımıza ait olacaktır. Tezde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederiz.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında, yönerge tarafından belirtilen kısıtlamalar olmadığı takdirde tezin YÖK Ulusal Tez Merkezi / B.U.Ü. Kütüphanesi Açık Erişim Sistemi ve üye olunan diğer veri tabanlarının (Proquest veri tabanı gibi) erişimine açılması uygundur.

Danışman Adı-Soyadı
Tarih

Öğrencinin Adı-Soyadı
Tarih

İmza

Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum
anladım yazmalı ve imzalanmalıdır.

İmza

Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum
anladım yazmalı ve imzalanmalıdır.

ÖZET

Doktora Tezi

BADEM VE FINDIKTAKİ ALERJEN PEPTİDLERİN PROTEOMİKS TEKNİĞİ KULLANILARAK TESPİTİ VE ISIL İŞLEM SONRASI ALERJENLERİN STABİLİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Nurcan AYŞAR GÜZELSOY

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yasemin ŞAHAN

Gıda alerjisi tüketilen besinlere karşı bağışıklık sistemi tarafından gösterilen aşırı duyarlılık reaksiyonudur. Fındık, badem gibi sert kabuklu meyveler sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı beslenmede önemli bir yere sahip olmakla birlikte gıda alerjisi reaksiyonlarına neden olabilmektedir. Günümüzde gıda alerjisinin önlenmesinin tek yolu kişilerin alerjen içeren gıdaları tüketmekten kaçınmasıdır. Tüm önlem ve yasal düzenlemelere rağmen yanlış etiketlenme sonucu geri çağırma veya çapraz bulaşmış ürünlerde alerjenlerin tespiti gıda güvenliği açısından önemli bir risk oluşturmaktadır. Bu sebeple gıdaların alerjen maddeler yönünden incelenmesi; ürün güvenilirliğinin sağlanması ve tüketici sağlığının korunması bakımından oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, fındık ve bademdeki alerjen proteinlere ait peptid dizilimlerinin proteomiks tekniği kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Kavrulmamış fındık ve badem örnekleri; protein ekstraksiyonu ve enzimatik parçalanma işlemleri sonrası sıvı kromatografisi kuadropol uçuş zamanlı kütle spektrometresi (LC-Q/TOF/MS) ile analiz edilmiştir. Analiz sonrası elde edilen kütle spektrumu verileri veri tabanlarında incelenerek fındık ve bademdeki alerjen peptid dizilimleri tespit edilmiştir. Alerjen peptidlerin ısıtılma işlemi sonrası stabilitesinin araştırılması amacıyla 130°C, 150°C, 170°C’de on beş ve otuz dakika kavurma işlemi uygulanmış olup, kavurma işlemi sonrası stabilitesini devam ettiren ikişer adet peptid dizilimi gıdalardaki fındık ve badem alerjenlerinin tespit edilmesi için marker olarak seçilmiştir. Kek ve dondurma örneklerinde fındık ve badem alerjenlerine ait marker peptid dizilimleri için minimum tespit seviyesi 10 ppm olarak belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca ülkemizde yetiştirilen önemli fındık ve badem çeşitlerinde alerjen proteinlerde farklılık olup olmadığı incelenmiş ve alerjen kompozisyonu açısından çeşitler arasında fark bulunmazken, marker olarak belirlenen peptid dizilimlerinin konsantrasyonlarında çeşitler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmiştir. (p<0.01).

Anahtar Kelimeler: Gıda alerjisi, LC-Q/TOF/MS, proteomiks, badem, fındık

2021, ix + 130 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF ALLERGEN PEPTIDES AND THEIR HEAT STABILITY USING PROTEOMICS IN ALMOND AND HAZELNUT

Nurcan AYŞAR GÜZELSOY

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Yasemin ŞAHAN

Food allergy is a hypersensitive reaction of the human immune system to consumed food. Although tree nuts such as hazelnuts and almonds have an important place in nutrition due to their positive effects on health, they can cause food allergy reactions. Today, the only way to prevent food allergy is to avoid consuming foods containing allergens. Despite all precautionary and legal regulations, misleading recall and detection of alerts in cross-contaminated products pose significant risks in food security. For this reason, investigation of allergens in food products is important in terms of ensuring food safety and protecting consumer health.

In this study, it is aimed to determine the peptide sequences of allergenic proteins in hazelnut and almond using proteomics technique. After protein extraction and enzymatic digestion, unroasted hazelnut and almond samples were analyzed by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-Q/TOF/MS). Mass spectrum data were searched in the databases and allergen peptide sequences were determined for almond and hazelnut. To investigate the thermal stability of allergen peptides, almond and hazelnut samples were roasted at 130°C, 150°C, 170°C for 15 and 30 minutes and two heat resistant peptides were selected to detect hazelnut and almond allergen in food samples. The analysis of spiked cake and ice cream samples gave limit of detection of 10 ppm for almond and hazelnut. Additionally variations of allergen peptides were investigated in various hazelnut and almond varieties growing in Turkey. Although no difference found in allergen composition of different varieties, concentration of marker peptides in hazelnut and almond varieties were found statistically different ($p < 0.01$).

Key words: Food allergy, LC-Q/TOF/MS, proteomics, almond, hazelnut

2021, ix + 130 pages.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince bilimsel katkıları ile beni yönlendiren, eğitimim süresince desteğini ve emeğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Yasemin ŞAHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca değerli bilgilerini paylaşarak tezime yapmış oldukları katkılardan dolayı Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Ozan GÜRBÜZ ve Sayın Doç. Dr. Asuman CANSEV hocalarıma,

TAGEM/HSGYAD/A/18/A3/P1/546 nolu proje ile tezimi mali olarak destekleyen Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne,

Tez çalışmama altyapı desteği sağlayan kurumum Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Çalışmam boyunca karşılaştığım tüm zorluklarda yardımını esirgemeyen ve destek olan sevgili arkadaşım Filiz ÇAVUŞ'a,

Her zaman sevgi ve destekleriyle bana güç veren annem Ayten AYŞAR ve babam Mesut AYŞAR'a,

Tez çalışmam sırasında yanımda olan ve beni destekleyen sevgili eşim Serkan GÜZELSOY ve canım oğlum Çağan GÜZELSOY'a teşekkürlerimi sunarım.

Nurcan AYŞAR GÜZELSOY
06/07/2021

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Gıda Alerjisi ve İntoleransı.....	3
2.2. Gıda Alerjisi Prevalansı.....	4
2.3. Yasal Düzenlemeler.....	5
2.4. Gıda Alerjenlerinin Sınıflandırılması.....	8
2.4.1. Hayvansal kaynaklı gıda alerjenleri.....	8
2.4.2. Bitkisel kaynaklı gıda alerjenleri.....	9
2.5. Sert Kabuklu Meyvelerde Alerjenler.....	13
2.5.1. Fındık alerjenleri.....	15
2.5.2. Badem alerjenleri.....	17
2.6 Gıdalardaki Alerjenlerin Tespitinde Kullanılan Yöntemler.....	18
2.6.1. İmmünokimyasal yöntemler.....	19
2.6.2. DNA yöntemleri.....	21
2.6.3. Biyosensörler.....	22
2.6.4. Kütle spektrofotometresi.....	22
2.7. Gıda İşleme Proseslerinin Alerjenler Üzerine Etkisi.....	29
2.7.1. Isıl işlem uygulamaları.....	29
2.7.2. Yüksek hidrostatik basınç (HHP).....	31
2.7.3. Vurgulu elektrik alan (PEF).....	32
2.7.4. Fermantasyon.....	33
2.7.5. Enzimatik hidroliz.....	34
2.7.6. Diğer ısıl olmayan işlemler.....	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	38
3.1. Materyal.....	38
3.1.1. Fındık ve badem örnekleri.....	38
3.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	41
3.2. Yöntem.....	42
3.2.1. Protein ekstraksiyonu.....	43
3.2.2. Bekleme süresinin optimizasyonu.....	44
3.2.3. LC-QTOF/MS analizleri için örnek hazırlanması.....	44
3.2.4. LC-QTOF/MS cihazı ile MS ve MSMS analizleri.....	45
3.2.5. Alerjen peptid dizilimlerinin belirlenmesi.....	50
3.2.6. Kek ve dondurma örneklerinin hazırlanması.....	52
3.2.7. Metod validasyonu.....	52
3.2.8. İstatistiksel analizler.....	55
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	56
4.1. Protein Ekstraksiyonu.....	56
4.2. Bekleme Süresinin Optimizasyonu.....	60
4.3. Örneklerdeki Alerjen Peptid Dizilimlerinin Belirlenmesi.....	62

4.4. Isıl İşlem Sonrası Alerjen Peptid Dizilimlerinin Stabilitesinin Araştırılması.....	70
4.4.1. Isıl işlem sonrası protein miktarlarının belirlenmesi.....	71
4.4.2. Isıl işlem sonrası örneklerde alerjen peptid dizilimlerinin belirlenmesi	75
4.5. Marker Olarak Belirlenen Peptid Dizilimlerinin Validasyonu	82
4.5.1. Kalitatif analiz için validasyon çalışması.....	82
4.5.2. Kantitatif analiz için validasyon çalışması.....	86
4.6. Farklı Fındık ve Badem Çeşitlerindeki Alerjen Peptid Dizilimlerinin Tespiti	87
5. SONUÇ.....	100
KAYNAKLAR	103
ÖZGEÇMİŞ	127

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
g	Gram
kDa	Kilodalton
μ L	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
M	Molar
mM	Milimolar
kg	Kilogram
$^{\circ}$ C	Santigrat Derece
W	Watt
%	Yüzde Değer

Kısaltmalar	Açıklama
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
EAACI	Avrupa Alerji ve Klinik İmmünoloji Akademisi
BCA	Bikinkoninik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTT	Ditiotreitol
WAO	Dünya Alerji Örgütü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzime Bağlı Bağışıklık Deneyi
ESI	Elektrosprey İyonizasyonu
FAO	Gıda ve Tarım Teşkilatı
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
HCl	Hidroklorik asit
TRIS	Hidroksimetil aminometan
IAA	İyodoasedamid
IgE	İmmüoglobulin E
MALDI	Matriks Yardımcılı Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu
PCR	Polimerize Zincir Reaksiyonu
LC-QTOF/MS	Sıvı Kromatografisi Kuadropol Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
nsLTP	Spesifik Olmayan Lipit Transfer Proteinleri
TBS	TRIS/HCl-tuz tamponu
TGK	Türk Gıda Kodeksi
IUIS	Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birliği
PEF	Vurgulu elektrik alan
HHP	Yüksek Hidrostatik Basınç

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Gıda kaynaklı reaksiyonlarının sınıflandırılması.....	4
Şekil 2.2. Sert kabuklu meyvelerde bulunan ana alerjen proteinlerin 3 boyutlu gösterimi	14
Şekil 2.3. Proteomiks tekniğinin özet gösterimi	24
Şekil 2.4. Tümevarımsal ve tümden gelişsel yöntemlerin akış şeması	24
Şekil 2.5. Kütle spektrometresinin ana bileşenleri.....	26
Şekil 2.6. Ovalbumine ait ELINSWVESQTNGIIR peptidinin MS/MS spektrumu	27
Şekil 3.1. Fındık çeşitleri (A: Tombul, B: Palaz, C: Foşa, D: Mincane, E: Çakıldak) ...	38
Şekil 3.2. Badem çeşitleri (A: Nonpareil, B: Laurene, C: Teksas, D: Ferraduel, E: Ferragnes).....	39
Şekil 3.3. Farklı süre ve sıcaklıklarda kavrulan badem örnekleri	40
Şekil 3.4. Farklı süre ve sıcaklıklarda kavrulan fındık örnekleri	41
Şekil 3.5. Çalışmada uygulanan yöntem	42
Şekil 3.6. Bradford kalibrasyon eğrisi	43
Şekil 3.7. Alerjen peptidlerin LC-QTOF/MS analizi için örnek hazırlama prosedürü ...	45
Şekil 3.8. LC-QTOF/MS cihazı (Agilent 6550).....	46
Şekil 3.9. Cor a 9.1 alerjeni kalibrasyon eğrisi	48
Şekil 3.10. Cor a 9.1 alerjenine ait MS/MS spektrumu	48
Şekil 3.11. Cor a 9.2 alerjenine ait kalibrasyon eğrisi	48
Şekil 3.12. Cor a 9.2 alerjenine ait MS/MS spektrumu	49
Şekil 3.13. Pru du 6.02.01 alerjenine ait kalibrasyon eğrisi.....	49
Şekil 3.14. Pru du 6.02.01 alerjenine ait MS/MS spektrumu.....	49
Şekil 3.15. Pru du 6.02 alerjenine ait kalibrasyon eğrisi.....	50
Şekil 3.16. Pru du 6.02 alerjeni MS/MS spektrumu	50
Şekil 3.17. Mascot yazılımında tarama için seçilen parametrelerin gösterimi	51
Şekil 4.1. Farklı ekstraksiyon çözeltilerinin verimi (%)	56
Şekil 4.2. Cor a 9.1 ve Cor a 9.2 peptidlerine ait pik alanları	57
Şekil 4.3. Pru du 6.02 ve Pru du 6.02.01 peptidlerine ait pik alanları	58
Şekil 4.4. Pru du 6.02 ve Cor a 9.1 peptidlerinin farklı sürelerdeki pik alanları	61
Şekil 4.5. Fındık numunesine ait toplam iyon kromatogramı	62
Şekil 4.6. Fındık numunesinden elde edilmiş peptidlerin LC-QTOF/MS ile elde edilen kütle spektrumu.....	63
Şekil 4.7. Fındık numunesinin Mascot yazılımındaki araştırma sonucu	63
Şekil 4.8. INTVNSNTLPVLR alerjenine ait peptid dizilimi.....	64
Şekil 4.9. Fındık numunesinde belirlenen alerjen peptid dizilimlerinin UNIPROT veritabanında doğrulanması	65
Şekil 4.10. Cor a 9 alerjenine ait amino asit dizisi.....	67
Şekil 4.11. Cor a 11.0101 alerjenine ait amino asit dizisi.....	67
Şekil 4.12. Prunin 2 alerjenine ait amino asit dizisi.....	68
Şekil 4.13. Prunin 1 alerjenine ait amino asit dizisi.....	68
Şekil 4.14. Pru du 6 alerjenine amino asit dizisi	69
Şekil 4.15. Farklı kavurma sıcaklıklarında INTVNSNTLPVLR peptid dizilimine ait iyon kromatogramı	76
Şekil 4.16. Farklı kavurma sıcaklıklarında VQVVNENGDPILNDEVVR peptid dizilimine ait iyon kromatogramı	77

Şekil 4.17. ALPDDVLANAFQISR peptid dizilimine ait iyon kromatogramları (A: Kavrulmamış fındık örneğine ait kromatogramı B: 170°C kavurma işlemi sonrası peptidin iyon kromatogramı).....	78
Şekil 4.18. Kek matriksine ait toplam iyon kromatogramı (LOD: 10 ppm).....	84
Şekil 4.19. Dondurma matriksine ait toplam iyon kromatogramı (LOD: 10 ppm).....	84
Şekil 4.20. INTVNSNTLPVLR (m/z= 720.9120) peptid dizilimine ait iyon kromatogramı (LOD seviyesi).....	85
Şekil. 4.21. VQVVDDNGNTVFDDELRL (m/z= 967.9582) peptid dizilimine ait iyon kromatogramı (LOD seviyesi).....	85
Şekil 4.22. ALPDEVLQNAFR (m/z= 686.8626) peptid dizilimine ait iyon kromatogramı (LOD seviyesi).....	85
Şekil 4.23. VQVVNENGDPILNDEVR (m/z= 955.4829) peptid dizilimine ait iyon kromatogramı (LOD seviyesi).....	86
Şekil 4.24. Foşa fındık çeşidine ait toplam iyon kromatogramı.....	88
Şekil 4.25. Tombul fındık çeşidine ait toplam iyon kromatogram.....	88
Şekil 4.26. Palaz fındık çeşidine ait toplam iyon kromatogram.....	88
Şekil 4.27. Mincane fındık çeşidine ait toplam iyon kromatogram.....	89
Şekil 4.28. Çakıldak fındık çeşidine ait toplam iyon kromatogram.....	89
Şekil 4.29. Ferroduel badem çeşidine ait toplam iyon kromatogramı.....	90
Şekil 4.30. Lourenne badem çeşidine ait toplam iyon kromatogramı.....	90
Şekil 4.31. Nonpareil badem çeşidine ait toplam iyon kromatogramı.....	90
Şekil 4.32. Teksas badem çeşidine ait toplam iyon kromatogramı.....	91
Şekil 4.33. Ferragnes badem çeşidine ait toplam iyon kromatogramı.....	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Ülkelere göre etiketleme zorunluluğu olan alerjen gıdalar.....	6
Çizelge 2.2. Alerjen maddeler / ürünler listesi.....	7
Çizelge 2.3. Yaygın olarak görülen bitki besin alerjenlerinin özellikleri	10
Çizelge 3.1. Çalışma sırasında uygulanan ısı işlem süre ve sıcaklıkları.....	40
Çizelge 3.2. HPLC hareketli faz akış programı	46
Çizelge 3.3. Alerjen analizleri için çalışma koşulları	47
Çizelge 3.4. Kalitatif validasyon parametreleri.....	53
Çizelge 3.5. Elde edilen sonuçlarla beklenen sonuçların karşılaştırılması	54
Çizelge 3.6. Kalitatif validasyon parametreleri.....	55
Çizelge 4.1. Farklı ekstraksiyon çözücüleri kullanılarak elde edilen ekstraksiyon verimleri (%).....	56
Çizelge 4.2. Farklı bekleme sürelerinden sonra elde edilen pik alanları	60
Çizelge 4.3. Kavrulmamış fındık ve badem örneklerinde ekstraksiyon sonrası marker olarak belirlenen peptid dizilimlerine ait veriler	66
Çizelge 4.4. Fındık ve badem ekstraktlarının protein miktarına ait varyans analizi.....	71
Çizelge 4.5. Badem çeşitlerinin protein miktarları (mg protein/ 30 mg örnek).....	72
Çizelge 4.6. Duncan çoklu karşılaştırma testine göre badem çeşitleri, kavurma sıcaklığı ve süresinin protein miktarına etkisi	72
Çizelge 4.7. Fındık çeşitlerinin protein miktarları (mg protein/ 30 mg örnek).....	73
Çizelge 4.8. Duncan çoklu karşılaştırma testine göre fındık çeşitleri, kavurma sıcaklığı ve süresinin protein miktarına etkisi	73
Çizelge 4.9. Marker olarak belirlenen petid dizilimlerine ait özellikler	79
Çizelge 4.10. Kalitatif validasyon çalışması sonuçları	83
Çizelge 4.11. Kantitatif analizlere ait validasyon parametreleri	86
Çizelge 4.12. Fındık çeşidi, kavurma sıcaklığı ve süresinin Cor a 9.1 ve Cor a 9.2 üzerine etkisine ait varyans analizi	92
Çizelge 4.13. Fındıklardaki Cor a 9.1 alerjeninin çeşit, süre ve kavurma sıcaklıklarına göre değişimi.....	93
Çizelge 4.14. Duncan çoklu karşılaştırma testine göre kavurma sıcaklığı, süresi ve çeşitlerin Cor a 9.1 miktarına etkisi	93
Çizelge 4.15. Fındıklardaki Cor a 9.2 alerjeninin çeşit, süre ve kavurma sıcaklıklarına göre değişimi.....	94
Çizelge 4.16. Duncan çoklu karşılaştırma testine göre kavurma sıcaklığı, süresi ve çeşitlerin Cor a 9.2 miktarına etkisi	94
Çizelge 4.17. Badem çeşidi, kavurma sıcaklığı ve süresinin Pru du 6.02.01 ve Pru du 6.02 üzerine etkisine ait varyans analizi	95
Çizelge 4.18. Bademlerdeki Pru du 6.02.01 alerjeninin çeşit, süre ve kavurma sıcaklıklarına göre değişimi (mg/kg)	96
Çizelge 4.19. Duncan çoklu karşılaştırma testine göre kavurma sıcaklığı, süresi ve çeşitlerin Pru du 6.02.01 miktarına etkisi.....	96
Çizelge 4.20. Bademlerdeki Pru du 6.02 alerjeninin çeşit, süre ve kavurma sıcaklıklarına göre değişimi.....	97
Çizelge 4.21. Duncan çoklu karşılaştırma testine göre kavurma sıcaklığı, süresi ve çeşitlerin Pru du 6.02 miktarına etkisi.....	97

1. GİRİŞ

Alerji; çeşitli kimyasal, polen, ev tozu veya gıda bileşenleri gibi çevremizde bulunan ve zararlı olmayan maddelere karşı, bazı duyarlı kişilerde oluşabilen aşırı duyarlılık reaksiyonu veya bağışıklık sisteminin anormal bir yanıtı olarak tanımlanmaktadır (Ring 2005). İnsan vücuduna giren ve kanda kendine özgü bir karşıt madde oluşturan yabancı maddelere "antijen" adı verilmektedir ve alerjik reaksiyonlara neden olan antijenler "alerjen" olarak adlandırılmaktadır. Alerjen olarak adlandırılan bu antijenler solunum yoluyla, deri, ağızdan ya da enjeksiyon ile vücudumuza girebilmektedir. Antijene karşı oluşturulan karşı maddeye ise "antikor" adı verilmektedir. Alerji toplumda birçok kişiyi etkileyen önemli bir sorundur. Yapılan araştırmalar ülkelere göre farklılık göstermekle birlikte alerji görülme sıklığının %7,5-40 arasında değiştiğini göstermektedir (Warner ve ark. 2006).

Gıda alerjisi ise bazı gıdalarda bulunan bazı proteinlere karşı bağışıklık sistemi tarafından verilen immünolojik bir reaksiyondur. Hassas bünyeli bireylerin bağışıklık sistemleri, gıdalarda bulunan ve çoğunlukla zararsız olan maddelere karşı alerjik reaksiyon gösterebilmektedir. Gıda alerjilerinin belirtileri bağırsak sisteminde, dil, dudak gibi temas noktalarında veya tüm vücutta görülebilmektedir (Johansson ve ark. 2001, Köksel ve ark. 2011). Olası alerjik reaksiyonlar arasında alerjik nezle, astım, kardiyovasküler bozukluklar, çarpıntı, nefes darlığı, kusma, ishal, ciltte tahriş, dudaklarda, dilde ve ağızda kaşıntı, baş ağrısı gibi rahatsızlıklar yer almaktadır (Nakamura ve Teshima 2013, Hoffmann-Sommergruber 2016).

Toplumların beslenme alışkanlıklarına göre ülkelerde besin alerjisi görülme sıklığı da değişiklik göstermektedir. İnek sütü, tavuk yumurtası, kabuklu deniz ürünleri, soya fasulyesi, buğday ve kabuklu yemişler alerjik reaksiyonlara sebep olan gıdaların başında yer almaktadır (Monaci ve ark. 2010, Petrulakova ve Valik 2015, Hoffmann ve ark. 2017). Fındığın (*Corylus avellana* L.) sebep olduğu alerjik reaksiyonlara fındıktaki farklı proteinler sebep olabilmektedir. Badem de ekonomik ve sağlık açısından önemli bir besin olmasına rağmen, fındığa benzer şekilde bazı kişilerde immünolojik reaksiyonları tetiklemektedir (Gaur ve ark. 2008, Jin ve ark. 2009).

Gıda alerjisinden korunmanın tek yolu sorun oluşturan gıda alerjenlerinin alerjik tepki gösteren kişilerin diyetinden çıkartılmasıdır. Bu sebeple gıdaların doğru bir şekilde etiketlenmesi büyük önem taşımaktadır. Ülkemizde Türk Gıda Kodeksi Etiketleme ve Tüketicileri Bilgilendirme Yönetmeliği'nde gıdaların etiketinde belirtilmesi zorunlu olan alerjenler 14 grup altında toplanmıştır. Bu yönetmeliğe göre alerjen bileşen ya da alerjen işlem yardımcılarının alerjen madde veya ürün adları açık bir şekilde kullanılarak bileşenler listesinde belirtilmesi zorunludur (Anonim 2017).

Gıdalardaki alerjen proteinlerin tespitinde kullanılan yöntemlerin başında Polimerize Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Enzime Bağlı Bağışıklık Deneyi (ELISA) testleri gelmektedir. Ancak bu yöntemlerle alerjen analizinde deoksiribonükleik asit (DNA) eksikliği ya da işleme sırasında protein yapısındaki değişikliklerden dolayı yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Bu yöntemlerdeki sıkıntılardan dolayı proteomiks tekniği kullanılarak gıdalardaki alerjenlerin tespitine yönelik çalışmalar oldukça önemlidir (Fu ve Maks 2013, Daly ve ark. 2018).

Bu çalışmada fındık ve bademde alerjen peptid dizilimleri proteomiks tekniği kullanılarak belirlenmiş ve ülkemizde ihracat açısından önemli olan farklı fındık ve badem çeşitlerinde alerjen peptid dizilimleri açısından farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. Isıl işlemin alerjen peptid dizilimlerine etkisinin incelenmesi amacıyla farklı sıcaklık ve sürede fındık ve badem örneklerine ısıl işlem uygulanmış ve ısıl işlem sonrası varlığını sürdüren alerjen peptid dizilimleri marker peptid dizilimi olarak belirlenmiştir. Bu dizilimler kullanılarak kek ve dondurma örneklerinde fındık ve badem alerjenleri tespit edilmiştir.

Çalışmada yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip LC-QTOF/MS cihazı ile fındık ve badem alerjenlerinin gıda örneklerinde tespit edilebilmesi, ELISA ve PCR teknikleriyle gerçekleştirilen alerjen analizinde karşılaşılabilecek yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçların ortaya çıkması engellenerek gıda güvenilirliğinin sağlanması, tüketici sağlığının korunması ve ekonomik kayıpların önüne geçilmesi hedeflenmiştir.

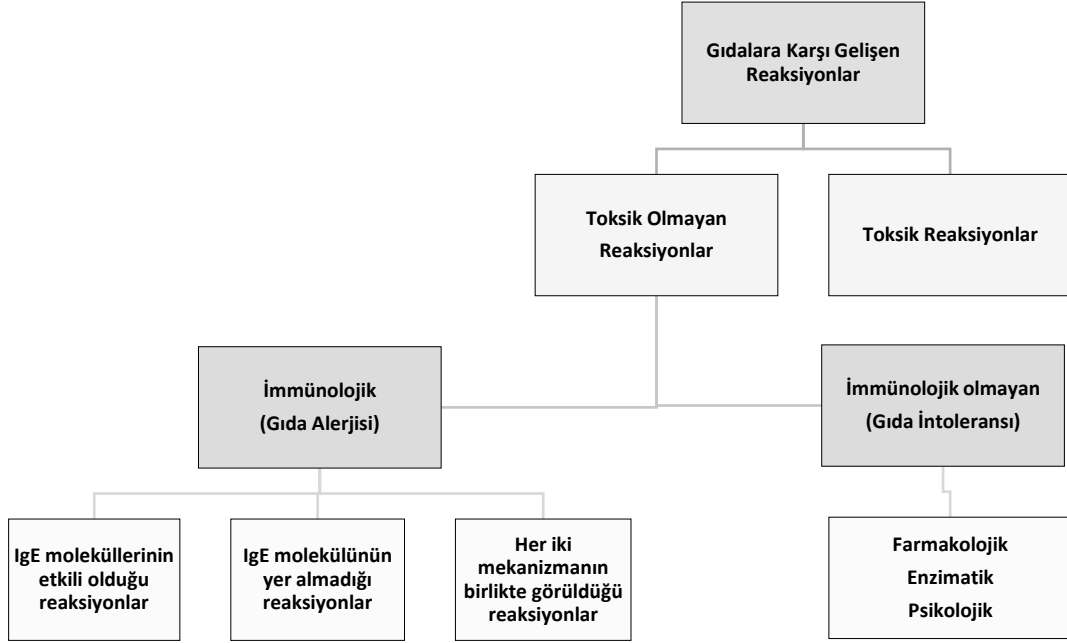
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Gıda Alerjisi ve İntoleransı

Günlük tükettiğimiz besinlere bağlı ortaya çıkan reaksiyonlar istenmeyen besin reaksiyonları olarak adlandırılmaktadır. Avrupa Alerji ve Klinik İmmünoloji Akademisi (EAACI), gıdaların sebep olduğu olumsuz reaksiyonları mekanizmalarına göre toksik ve toksik olmayan gıda reaksiyonları olarak iki gruba ayırmıştır (Bruijnzeel-Koomen ve ark. 1995). Toksik reaksiyonlar; yeterince yüksek miktarda toksin içeren gıdaların sebep olduğu reaksiyonlardır. Gıdalarda bulunan toksik maddeler gıdaların doğal bileşeni olabilmekte ya da üretimden tüketime kadar farklı aşamalarda gıdalarda oluşabilmektedir (Lattanzio 2020, Bhardwaj ve ark. 2021).

Toksik olmayan gıda reaksiyonları ise besinlerin veya besinlerle birlikte alınabilecek bazı maddelerin, immünolojik ya da immünolojik olmayan mekanizmalarla oluşturabileceği reaksiyonlardır ve iki grup altında incelenmektedir. Bu reaksiyonlar gıda intoleransı ve gıda alerjisi olarak adlandırılmakta olup son yıllarda değişen beslenme alışkanlıklarımıza da bağlı olarak her ikisinin de görülme sıklığı artmaktadır (Arıcan ve Hacımustafaoğlu 2002, Turnbull ve ark. 2015).

Gıda intoleransı ya da besin aşırı duyarlılığı immünolojik yani savunma sistemi aracılığıyla gerçekleşmeyen bir aşırı duyarlılık reaksiyonu iken; gıda alerjisi gıdanın içerdiği proteinlere karşı gelişen immünolojik bir reaksiyondur (Kırsaçlıoğlu ve Özden 2006, Sapan ve ark. 2013). Besin intoleransı reaksiyonları sindirilemeyen veya emilemeyen besin ya da besin bileşenlerinin etkisiyle meydana gelmekte olup laktoz intoleransı besin intoleransları arasında en yaygın olarak görülen reaksiyondur (Beyerlein ve ark. 2008). İmmünolojik reaksiyonlar ise savunma sisteminde önemli olan immünoglobulin E (IgE) moleküllerinin etkili olduğu reaksiyonlar sonucunda ya da IgE molekülünün yer almadığı reaksiyonlar sonucunda da gözlenebilmektedir. Ayrıca her iki mekanizmanın da rol aldığı reaksiyonlar da alerjiye sebep olabilmektedir (Ho ve ark. 2014). Şekil 2.1’de gıda kaynaklı reaksiyonlarının sınıflandırılması verilmiştir.



Şekil 2.1. Gıda kaynaklı reaksiyonlarının sınıflandırılması

2.2. Gıda Alerjisi Prevalansı

Son yıllarda diğer tüm alerjik hastalıklarda olduğu gibi gıda alerjisinin görülme sıklığında da özellikle sanayileşmiş ülkelerde hızlı bir artış görülmektedir (Hu ve ark. 2010, Obeng ve ark. 2011, Basera ve ark. 2015). Dünya Alerji Örgütü (WAO) tarafından gıda alerjisinin dünya nüfusunun yaklaşık %2,5'ini etkilediği kabul edilmektedir ancak bu veriler %1 ila %10 arasında değişmektedir. Gıda alerjisi teşhisi yapmak için farklı tekniklerin kullanılması, çalışma metodolojilerinin çeşitliliği, coğrafi varyasyon, yaş ve diyetlerdeki farklılıklar gıda alerjisi prevalansının doğru bir şekilde belirlenebilmesini güçleştirmektedir (Bartra ve ark. 2016, Loh ve Tang 2018, Messina ve Venter 2020).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde beş yaşından küçük çocuklarda gıda alerjisi prevalansı Birleşik Krallık'ta %4, Danimarka'da %3,6, Norveç'te %6,8 ve Avustralya'da 12 aylık bebeklerde %10'dan fazla iken, 4 yaşındaki çocuklarda yaklaşık %4 olduğu görülmektedir (Venter ve ark. 2006, Eller ve ark. 2009, Kvenshagen ve ark. 2009, Peters ve ark. 2017).

Almanya’da 0-17 yaş aralığında yapılan çalışmada prevalans %4,2 olarak tespit edilirken ülkemizde 11-15 yaş grubunda yapılan çalışmada %0,15 olarak tespit edilmiştir (Roehr ve ark. 2004, Kaya ve ark. 2013). Tayland’da yapılan diğer bir çalışmada 3-7 yaş aralığındaki çocuklarda gıda alerji prevalansı %1-3,8 aralığında rapor edilirken, Çin’de 2 yaş çocuklarında %7,7 olarak raporlanmıştır (Chen ve ark. 2011; Lao-araya ve Trakultivakorn 2012).

Gupta ve ark. (2019) tarafından Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) 40 443 yetişkin ile yapılan bir çalışmada katılımcıların %10,8’inin gıda alerjisi olduğu belirtilmiştir. ABD’de ciddi alerjik reaksiyonların %90’ını sekiz gıda veya gıda grubu oluşturmaktadır. Bunlar; süt, yumurta, balık, kabuklu deniz ürünleri, buğday, soya, ağaç fıstığı ve yer fıstığıdır. Silva ve ark. (2016) 18-65 yaş aralığında yaptıkları çalışmada ankete katılanların %10,8’inde başlıca inek sütü, domuz eti, meyve ve karides olmak üzere farklı gıda alerjilerine sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Farklı gıda veya gıda gruplarına karşı alerji görülme sıklığı da değişkenlik göstermektedir. Süt alerjisi en sık görülen gıda alerjisidir (Skripak ve ark. 2007, Fiocchi ve ark. 2010). Rona ve ark. (2007) süt alerjisi prevalansının %1,2-17 iken, yumurtaninkinin %0,2-7 arasında olduğunu belirtmişlerdir. Zuidmeer ve ark. (2008) meyve ve sert kabuklu kuruyemışlere karşı gıda alerjisi görülme sıklığının %0,1-4,3, sebzelere karşı ise %0,1-1,4 arasında değişim gösterdiği ifade etmişlerdir. Nwaru ve ark. (2014) sert kabuklu meyvelere, soya ve buğdaya karşı çocuklarda alerji görülme sıklığını sırasıyla %1,8, %4,2 ve %3,9 olarak bildirmiştir. ABD’de yapılan bir çalışmada deniz ürünlerine alerji görülme sıklığının çocuklara (%0,6) göre yetişkinlerde (%2,8) daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Sicherer ve ark. 2004).

2.3. Yasal Düzenlemeler

Gıda alerjisinden korunmanın tek yolu sorun oluşturan gıda alerjenlerinin alerjik tepki gösteren kişilerin diyetinden çıkartılması olduğundan, gıdaların doğru bir şekilde etiketlenmesi büyük önem taşımaktadır (Gendel 2012). 1999 yılında Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından ortaklaşa

kurulan Kodeks Alimentarius Komisyonu tarafından sekiz gıda/gıda grubu alerjen olarak tanımlanmış ve gıda etiketlerinde belirtilme zorunluluğu getirilmiştir. Bu gıdalar “Büyük Sekiz Alerjen” olarak tanımlanmakta ve süt, yumurta, yer fıstığı, sert kabuklu meyveler, balık, kabuklu deniz ürünleri, buğday ve soyaı kapsamaktadır (Allen ve ark. 2014). Ülkelere göre etiketleme zorunluluğu olan gıdalar Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Amerika Birleşik Devleti’ndeki yasal düzenlemeler 2004 yılında yayımlanan Gıda Alerjen Etiketlemesi ve Tüketicinin Korunması Yasası ile yapılmıştır. Bu yasa kapsamına giren tüm ambalajlı gıdalar, 1 Ocak 2006’dan itibaren Gıda ve İlaç İdaresi’nin (FDA) alerjenler listesindeki gerekliliklere uygun şekilde etiketlenmektedir. Alerjen listesinde yer alan ve etikette gösterilmesi gereken gıdalar süt, yumurta, balık, kabuklu deniz hayvanları, sert kabuklu meyveler, buğday, yer fıstığı ve soya fasulyesidir. Bu yasa ayrıca gıda alerjenlerinin kontrolü, izlenmesi ve analiz ile ilgili düzenlemeleri de kapsamaktadır (Anonim 2004).

Çizelge 2.1. Ülkelere göre etiketleme zorunluluğu olan alerjen gıdalar

Gıda	Kodeks Alimentarius	ABD	Avrupa Birliği	Avustralya	Kanada	Çin	Japonya	Kore
Kabuklular	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆
Yumurta	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆
Balık	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	
Süt	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆
Soya	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	
Yer fıstığı								
Sert kabuklu meyveler	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	
Tahıllar	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆
Susam			☆	☆	☆			
Yumuşakçalar			☆		☆			
Hardal			☆		☆			
Kereviz			☆					
Bakla			☆					
Kükürt dioksit ve sülfidler			☆					

Avrupa Birliği'nin EC/2003/89, EC/2007/68 ve EC/ 1169/2011 no'lu direktiflerinde de alerjen olan gıdaların listesi ve alerjenlerin gıda etiketlerinde belirtilmesine dair kurallar yer almaktadır. Bu direktiflerde alerjen gıdalar 14 grup olarak belirlenmiş ve Kodeks Alimentarius Komisyonu'nun önerileri doğrultusunda her alerjen gıda için kodlar belirlenmiştir (Koeberl ve ark. 2014).

Ülkemizde ise Türk Gıda Kodeksi (TGK) Etiketleme ve Tüketicileri Bilgilendirme Yönetmeliği'nde gıdalarda bulunan alerjenlerin belirtilmesine dair kurallar bulunmaktadır. Bu yönetmeliğin 9. Maddesine göre alerjen bileşenler veya alerjen işlem yardımcıları ile ilgili bilgilerin gıdaların etiketinde yer alması zorunludur. Yönetmelikte yer alan ve alerji veya intoleransa neden olan maddeler veya ürünler Çizelge.2.2'de 14 grup altında listelenmiştir (Anonim 2017).

Çizelge 2.2. Alerjen maddeler / ürünler listesi

1	Gluten içeren tahıl çeşitleri (buğday, çavdar, arpa, yulaf, kılçıksız buğday, kamut veya hibrit türleri) ve ürünleri
2	Kabuklular ve ürünleri
3	Yumurta ve ürünleri
4	Balık ve ürünleri
5	Yer fıstığı ve ürünleri
6	Soya fasulyesi ve ürünler
7	Süt ve süt ürünleri (laktoz dahil)
8	Yer fıstığı, fındık ve fıstık gibi sert kabuklu meyveler; badem (<i>Amygdalus communis</i> L.), fındık (<i>Corylus avellana</i>), ceviz (<i>Juglans regia</i>), cashew fıstığı (kaju) (<i>Anacardium occidentale</i>), pekan fındığı (<i>Carya illinoensis</i> -Wangenh.-K. Koch), brezilya fındığı (<i>Bertholletia excelsa</i>), antep fıstığı (<i>Pistacia vera</i>), macadamia fındığı ve Queensland fındığı (<i>Macadamia ternifolia</i>) ve bunların ürünleri
9	Kereviz ve ürünleri
10	Hardal ve ürünleri
11	Susam tohumu ve ürünler
12	Kükürt dioksit ve sülfidler, (SO ₂ cinsinden 10 mg/kg veya 10 mg/L'den fazla)
13	Acı bakla ve acı bakla ürünleri
14	Yumuşakçalar ve ürünleri

Yönetmeliğe göre, gıdaların üretiminde veya hazırlanmasında kullanılan ve alerjen listesinde yer alan bileşen ya da işlem yardımcılarının isimleri, bu bilgiyi listenin geri kalan bölümünden açıkça ayıran bir yazı dizgisi vasıtasıyla (örneğin, punto, stil veya arka plan rengi aracılığıyla) üreticiler tarafından bileşen listesinde vurgulanmak zorundadır. Gıdanın bileşenler listesi yok ise alerjiye veya intoleransa neden olan bileşenler veya işlem yardımcılara ilişkin bilgiler, alerjen madde veya ürün adlarını takiben “içerir” kelimesi kullanılarak belirtilmelidir.

2.4. Gıda Alerjenlerinin Sınıflandırılması

Günümüzde iki yüzden fazla gıdanın alerjiye sebep olabileceği tespit edilmiş olmasına rağmen toplumda görülme sıklığı ve sebep olduğu alerjik reaksiyonların şiddetine bağlı olarak bazı gıdalarla ilgili çalışmalar önem kazanmıştır (Løvik 2010, Sena-Torrallba ve ark. 2020). Çiğ olarak tüketilen gıdalar alerjiye sebep olabildiği gibi, öğütme, kurutma, dondurma, fermantasyon, hidroliz, pastörizasyon, sterilizasyon ve pişirme gibi farklı prosesler uygulanmış bazı gıdalar da alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir (van Hengel 2007).

2.4.1. Hayvansal kaynaklı gıda alerjenleri

Alerjiye sebep olan hayvansal gıdaların başında inek sütü, yumurta, balık ve kabuklu deniz ürünleri gelmektedir. İnek sütü alerjisi özellikle erken çocukluk döneminde karşılaşılan en önemli problemlerden biridir (Xiong ve ark. 2021). Kazein, β -laktoglobulin, alfa laktalbumin, sığır gamma globülin ve sığır albümin inek sütü içerisinde yer alan en önemli alerjen proteinlerdir (Wal 2002, El-Agamy 2007). Yapılan çalışmalar inek sütü proteini ile keçi, koyun sütü ve soya proteinleri arasında çapraz reaksiyon olduğunu göstermektedir (Ballabio ve ark. 2011, Viñas ve ark. 2014, Cong ve ark. 2020).

Yumurta da özellikle çocuklarda alerjiye sebep olan hayvansal gıdaların başında gelmektedir (Eggesbø ve ark. 2001, Samady ve ark. 2020). Ovomukoid, ovalbümin, ovotransferrin ve lizozim yumurta beyazında, alfalivetin (Gal d 5), glikoprotein (Gal d

6), apovitilinin 1 ise yumurta sarısında yer alan ana alerjen proteinlerdir (Bernhisel-Broadbent ve ark. 1994, Dona ve Suphioglu 2020). Yumurta alerjisi ciltte kızarıklık, kaşıntı, egzama, ishal veya mide ağrısı gibi kişiden kişiye değişen belirtiler gösterebilmektedir.

Balık ve kabuklu deniz ürünleri tüketim, deriyle temas ya da kokusunun solunması yoluyla alerjik reaksiyonlara sebep olabilmektedir (Ramirez ve Bahna, 2009, Prester 2016). Parvalbumin (Gad c 1) morina balığında ilk olarak tanımlanan ve birçok balık türünde tespit edilen ana alerjen hayvansal proteindir (Elsayed ve Aas 1971, Bugajska-Schretter ve ark. 2000). Parvalbuminler pH değişimlerine, ısı ve enzimatik bozulmaya karşı dayanıklıdır (Untersmayr ve ark. 2007). Parvalbuminlere ek olarak Hamada ve ark. (2001) yılında yaptıkları çalışmada balık jelatininin de alerjen olduğunu ortaya koymuştur. Tropomyozin (Pen a 1) ise kabuklu deniz ürünlerinde ve yumuşakçalarda bulunan alerjen bir proteindir (Faber ve ark. 2017). Bunun yanı sıra arginin kinaz (Pen m 2) ve miyozin hafif zinciri (Lit v 3) de deniz ürünlerinde bulunan başlıca alerjenlerdir (Yu ve ark. 2003, Ayuso ve ark. 2008).

2.4.2. Bitkisel kaynaklı gıda alerjenleri

Bitkisel gıda alerjenleri yapısal ya da işlevsel özelliklerine göre sınıflara ayrılabilir. Alerjik reaksiyonlara neden olan en yaygın bitki proteinleri prolaminler, globülinler ve bitki savunma mekanizmasında yer alan protein gruplarına ait olup bitkisel kaynaklı gıda alerjilerinin % 65'ten fazlasını oluşturmaktadır (Breiteneder ve Radauer 2004). Yaygın olarak görülen bitki besin alerjenlerine ait özellikler Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Yaygın olarak görülen bitki besin alerjenlerinin özellikleri

Ana grup	Alt grup	Fonksiyonu	Örnek
Prolaminler	2S albümin	Depo proteini	Sin a 1, Ber e 1
	Spesifik olmayan LTP	Bitki savunma mekanizması	Pru p 3, Mal d 3
	α -amilaz/ proteaz inhibitörü	Bitki savunma mekanizması	Hor v 15, Sec c 1
	Tahıl prolaminleri		
Globulinler	7S globulin (visilin)	Depo proteini	Ara h 1, Jug r 2
	11S globulin (legumin)	Depo proteini	Ara h 3, Cor a 9
Bet v 1		Depo proteini	Mal d 1, Pru av 1
Profilinler		Düzenleyici	Mal d 4, Pru av 4
Patogenez ile ilgili proteinler	Endokitinazlar	Bitki savunma mekanizması	Bra r 2, Tri a 18
	1,3- β Glukanaz	Bitki savunma mekanizması	Cas s 5, Mus xp 1
	Taumatın benzeri proteinler	Bitki savunma mekanizması	Mal d 2, Act d 2

Kaynak: Hoffmann-Sommergruber ve Mills 2009

Prolaminler

Prolaminler başlıca tahıllarda bulunan tohum depo proteinleridirler. Prolaminler genellikle %60-70 (v/v) alkol/su karışımında çözünmektedir. Glutamin ve prolin amino asitlerince zengin olup az miktarda lizin ihtiva etmektedirler. Prolaminler, dört ana bitki besin alerjen grubunu içermektedir. Bunlar sırasıyla; sert kabuklu meyve ve tohumlarında bulunan depo proteini 2S albümin, bitki savunma mekanizmasında görev alan spesifik olmayan lipit transfer proteinleri (nsLTP), tahıllardaki α -amilaz/proteaz inhibitörleri ve tahıl prolaminleridir (Hauser ve ark. 2008, Geiselhart ve ark. 2018).

2S albüminler tohum depo proteinleri olup bitkiye çimlenme ve fide büyümesi için ihtiyaç duyulan besin kaynağını sağlamaktadır. 2S albüminler anjiyo, ödem ve anafilaktik şok gibi ciddi alerjik semptomlara yol açabilmektedir (Moreno ve Clemene 2008). Brezilya fıstığındaki Ber e 1, cevizdeki Jug r 1 gibi sert kabuklu meyvelerdeki bazı alerjenler ve susam tohumundaki Ses i 2 alerjeni 2S albümin grubuna dahildir (Pastorello ve ark. 1998, Teuber ve ark. 1998, Pastorello ve ark. 2001).

Spesifik olmayan lipit transfer proteinleri (nsLTP) geniş bir lipit spektrumu için hücre içi ve hücre dışı taşıyıcılar olarak işlev görmektedir ve ayrıca bitkilerin abiyotik ve biyotik strese adaptasyonunda rol oynamaktadırlar (Kader 1996, Breiteneder ve Mills 2005). Isı, sert pH değişimleri ve sindirime dayanıklı proteinlerdir, dolayısı ile gıdaların pişirilmesi sonrası da alerjik reaksiyon vermeye devam ederler (Asero ve ark. 2001; van Ree 2002). Şeftalideki Pru p 3, elmada Mal d 3 ve kayısındaki Pru ar 3 alerjenleri bu gruba ait olup özellikle Akdeniz bölgesinde yaşayan kişilerin maruz kaldığı alerjik reaksiyonlarla ilişkilidirler (Pastorello ve ark. 1999, Pastorello ve ark. 2000).

α -amilaz inhibitörleri buğday ve pirinci de içeren tahıllarda bulunmakta olup, bağışıklık sistemini doğrudan uyarabilen maddelerdir. Tahıl tohumları ayrıca proteaz inhibitörü olarak adlandırılan kimyasallar da içerir, bunlar tahılları sindirmekle görevli proteaz enzimini inhibe etmekte ve insan vücudu tarafından sindirilmelerine engel olmaktadır. Buğdaydaki alfa amilaz/tripsin inhibitörleri albüminler ve globulinlerden oluşan gluten dışındaki fraksiyonu oluşturmaktadır (Sagu ve ark. 2020).

Tahıl prolamini tohumların içerisinde bulunan, yüksek miktarda prolin isimli aminoasit içeren depo proteinlerdir, tohumların çimlenmesinde önemli görevleri vardır. Buğdayda gliadin, çavdarda sekalin ve arpadaki hordeinler bu gruba girmektedir ve alerjiye sebep olmaktadır (Schalk ve ark. 2017, Urade ve ark. 2018). Özellikle buğdaydaki omega-5 gliadin proteini çocuklarda buğday içeren ürünlerin tüketiminden çok kısa bir süre sonra bulantı, karın ağrısı, ürtiker gibi klinik semptomlara yol açmaktadır (Palosua ve ark. 2001).

Globulinler

Globulinler sedimentasyon katsayılarına bağlı olarak visilin ve legumin olarak iki gruba ayrılmaktadır. Visilin ve legumin bazı sert kabuklu meyve ve baklagillerin sebep olduğu alerjen reaksiyonlarda rol almaktadır (Mills ve ark. 2002). Baklagil tohumlarının asıl depo proteini olan legumin baklanın toplam depo proteinlerinin %75'ini oluşturmaktadır. Fındıktaki Cor a 9 alerjeni de legumin ailesine aittir. Amino asit dizileri bakımından legumine benzerlik gösteren visilin ise genellikle tek peptid zincirinden meydana gelen

monomerlerin oluşturduğu trimerlerdir ve yer fıstığındaki Ara h 1, soyadaki β - konglisinin örnek olarak verilebilir (Shewry ve ark. 1995, Dunwell ve ark. 2004).

Bet v 1

Bet v 1 Kuzey Avrupa ülkelerinde yaygın bir şekilde yetişen huş ağacı (*Betula verrucosa*) polenlerinden izole edilen bir proteindir. Huş, çeşitli meyve ve sebzeye karşı aşırı duyarlılık ile ilişkili polen alerjilerinden birisidir. Bu alerjen, *Betula* poleni kaynaklı alerjilerin % 90'dan fazla bir kısmından sorumludur (Jarolim ve ark. 1989). Bet v 1 ve bir bitki türevi antijeni arasında çeşitli mekanizmalar aracılığı ile çapraz reaksiyonlar meydana gelmektedir. Bet v 1 alerjisi olan kişiler, özellikle erik, fındık, kivi, havuç, elma, ıspanak ve armut gibi gıdaları tükettiklerinde alerjik reaksiyonlar meydana gelebilmektedir (Sloane ve Sheffer 2001). Genellikle dudak veya ağızda uyuşma, kaşınma, rinit, konjunktivit ve yüzde kızarıklık gibi semptomlar ortaya çıkmaktadır (Carlson ve Coop 2019).

Profilinler

Profilinler 1-15 kDa molekül ağırlığına sahip proteinlerdir. Profilinlerin bitki hücreesindeki ana rolü sitokinez, sitoplazmik akış, polen tüplerinin ve kök kıllarının büyümesi gibi prosesler sırasında mikrofilamentlerin yeniden düzenlenmesini sağlamaktır (Ramachandran ve ark. 2000). Genelde ağaç polenlerine alerjisi olan hastaların %10-20'si profiline karşı alerjik semptomlar göstermektedir. Profilinler ısı ve enzimatik yollarla kolayca denatüre oldukları için hafif gıda alerjilerine yol açmaktadır (Jankiewicz ve ark. 1997). Fındıktaki Cor a 2, çilekteki Fra a 4, elmadaki Mal d 4, kiraz Pru av 4, şeftalideki Pru p 4 profilini Bet v 2 poleni ile çapraz reaksiyona girerek alerjiye sebep olabilmektedir (Valenta ve Duchene 1991).

Patogenez ilişkili proteinler

Bitki savunma sistemi, biyotik ve abiyotik strese direnmek için çok çeşitli bileşikler ve proteinler kullanmaktadır. Patogenez ilişkili proteinler mantarlar, bakteriler veya virüsler gibi patojenler veya olumsuz çevresel faktörler tarafından gelişen enfeksiyonlara karşı bir bitkide spesifik olarak indüklenen proteinler olarak tanımlanmaktadır (Breiteneder ve Radauer 2004).

Endokitinazlar patojen hücre duvarını yıkma ve diğer antifungal özelliklerinden dolayı bitki savunmasında önemli proteinlerdir. Fungus hücre duvarının %60'ını oluşturan temel yapı elemanı kitinin hidrolizini katalizlemede görev almaktadır ve bitkileri patojen ve böcek zararlılarına karşı korumada önemli bir rol oynamaktadır. Avakadoda Pers a 1, üzümde Vit v 5, kestanede Cas s 5 alerjenleri ile çapraz reaksiyona sebep olmaktadır (Díaz-Perales ve ark. 2003, Hassan ve Venkatesh 2015).

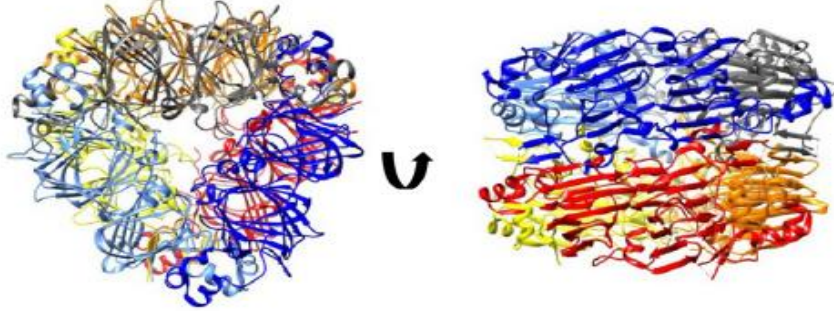
1,3- β Glukanaz proteini ise mantar hücre duvarındaki yapısal (1,3) β -glukanı hidrolize ederek hücre duvarının zayıflamasına yol açmaktadır. Mikrobiyel patojenlere karşı bitki savunmasında önemli bir rol oynamakta ve çimlenme, meyve olgunlaşması gibi farklı proseslerde de görev almaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar 1,3- β Glukanaz proteininin önemli bir alerjen olduğunu göstermektedir (Palomares ve ark. 2005). Bu protein grubuna ait alerjenler domates, muz, incir ve kivide tespit edilmiştir. Ayrıca zeytin polen alerjisi olan Ole e 9 da 1,3- β Glukanaz proteini olarak karakterize edilmiştir (Huecas ve ark. 2001).

Taumatın benzeri proteinler ise taumatının amino asit dizilimi ile benzerlik göstermekte olup molekül ağırlıkları 20 kDa civarındadır. Isıl işleme ve proteolitik bozunmaya karşı dayanıklıdır (Breiteneder 2004). Elmadaki Mal d 2, kirazdaki Pru av 2, biberdeki Cap a 1 ve kivideki Act d 2 alerjisi bu gruba aittir (Gavrović-Jankulović ve ark. 2002, Krebitz ve ark. 2003).

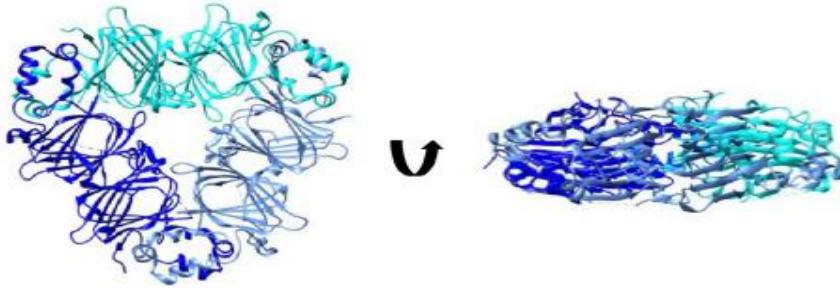
2.5. Sert Kabuklu Meyvelerde Alerjenler

Yer fıstığı, fındık, badem ve fıstık gibi sert kabuklu meyveler; protein, yağ, karbonhidrat, A, E vitamini ve doymamış yağ asitleri bakımından zengin gıdalardır. Bu meyveler kabuklu ya da kabuksuz olarak satışa sunulmaktadır. Ayrıca çiğ ve kavru olarak tüketiminin yanında gıda ürünleri içerisine bileşen olarak da eklenebilmektedirler. Sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı beslenmede önemli bir yere sahip olmakla birlikte IgE'nin aracılık ettiği besin alerjisi reaksiyonlarına da neden olabilmektedirler (Mcwilliam ve ark. 2015, Stiefel ve ark. 2017). Sert kabuklu meyvelerde alerjiye sebep olan başlıca proteinler 2S albümin, visilin, legumin ve spesifik olmayan lipit transfer proteinleri olup, bu

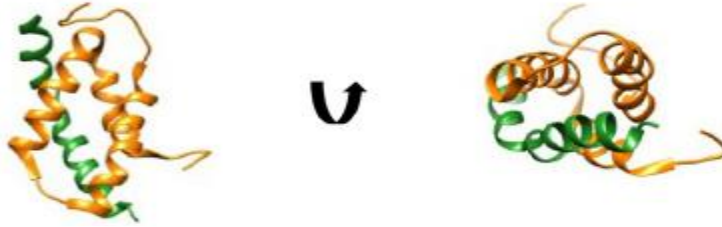
proteinlerin üç boyutlu yapısı Şekil 2.2’de verilmiştir. Bunlara ek olarak oleosinler ve taumatin benzeri proteinler de sert kabuklu meyvelerdeki önemli alerjenlerdir (Akkerdaas ve ark. 2003; Zuidmeer-Jongejan ve ark. 2014).



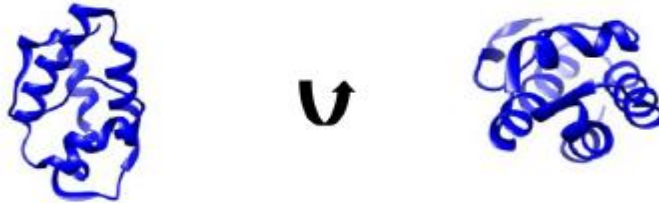
Legumin (Hindistan cevizi)



Visilin (Pecan cevizi)



2S albumin (Brezilya fıstığı)



Spesifik olmayan lipit transfer proteini (Fındık)

Şekil 2.2. Sert kabuklu meyvelerde bulunan ana alerjen proteinlerin 3 boyutlu gösterimi (Geiselhart ve ark. 2018)

2.5.1. Fındık alerjenleri

Dünyada tarımsal üretim açısından en önemli çeşitlerden biri olan fındık (*Corylus avellana* L.) *Betulaceae* familyasının, *Coryleae* alt familyasına aittir. 2019 verilerine göre Türkiye, Dünya fındık üretiminde 776 000 ton ile birinci sırada olup, onu İtalya, Azerbaycan, ABD ve Çin takip etmektedir (Anonim 2020). Ülkemizde fındık başta Giresun ve Trabzon olmak üzere Ordu, Samsun, Bolu, Sakarya, Zonguldak ve Bartın illerinde yetiştirilmektedir. Ülkemizde yetiştirilen fındık çeşitleri arasında Tombul, Çakıldak, Foşa, Mincane, Palaz, Uzunmusa, Kargalak, Cavcava, Allahverdi, Karafındık, İncekara, Sivri, Kalınkara, Acı, Kan, Yassı Badem, Yuvarlak Badem ve Kuş yer almaktadır. Ayrıca bir ıslah programı sonucunda elde edilen Okay 28 ve Giresun Melezi çeşitleri mevcuttur (Balık ve ark. 2015). Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü 2018 yılı Fındık Sektör Raporu'na göre ülkemizde kişi başı yıllık ortalama fındık tüketimi 1,25-1,50 kg civarındadır. Fındık çerezlik olarak tüketiminin yanı sıra çikolata, dondurmada, bisküvi, yağ ve şekerleme gibi sektörlerde hammadde olarak kullanılmaktadır (Anonim 2019).

Fındık E, B1, B6 vitaminleri, demir, çinko, bakır gibi mineraller, protein, lif ve yağ bakımından zengin bir besin maddesidir. İçerdiği yüksek orandaki doymamış yağ asitleri nedeniyle, kalp ve damar sistemini olumlu yönde etkilemekte ve kandaki kolesterol düzeyini azaltarak, kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu etki yapmaktadır (Orem ve ark. 2013).

Sağlık ve beslenme açısından yararlı bir besin olmasına karşın fındık bazı kişilerde alerjik reaksiyonlara neden olabildiği için Türk Gıda Kodeksi (TGK) Etiketleme ve Tüketicileri Bilgilendirme Yönetmeliği'ndeki alerjen maddeler veya ürünler listesi içerisinde yer almaktadır. Avrupa'da alerjiye neden olan sert kabuklu meyveler içerisinde fındık önemli bir yere sahipken, Amerika'da ise yer fıstığı, badem, ceviz ve kajuya bağlı alerjik reaksiyonlar daha sık görülmektedir (Ortolani ve ark. 2000, Sicherer ve ark. 2003).

Burney ve ark. (2010) Amerika, Avustralya ve 13 Avrupa ülkesini içeren bir çalışmada araştırmaya katılanların %7,2'sinde fındık alerjisi görüldüğü bildirmişlerdir. Fındık

alerjisi gösteren kişilerde bazen yalnızca fındığa karşı alerjik reaksiyon tespit edilirken bazen de huş poleniyle çapraz kontaminasyonlar gözlenmiştir (Roux ve ark. 2003). Fındığın sebep olduğu alerjik reaksiyonlara fındıktaki farklı proteinler sebep olabilmektedir. Fındıkta günümüze kadar tanımlanmış ve Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birliği (IUIS) alerjen listesinde yer alan 8 alerjen protein grubu (Cor a 1, Cor a 2, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 11, Cor a 12, Cor a 13, Cor a 14) bulunmaktadır (Anonim 2021).

Cor a 1; 17 kDa ağırlığına sahip, düşük pH'larda stabil ve proteolize dayanıklı olmakla birlikte, ısıl işlem uygulandığında protein yapısı bozularak alerjenitesini kaybetmektedir (Schocker ve ark. 2000). Cor a 2 (14 kDa), profilin ailesine ait olup polenlerde ve tohumda bulunmaktadır (Hauser ve ark. 2010). Isıl işlem uygulamaları ve sindirim enzimlerine karşı dayanıklı değildir (Lauer ve ark. 2008).

Cor a 8 (9 kDa), fındıklara karşı ciddi alerjik reaksiyonlarla ilişkili olan prolamin ailesinden spesifik olmayan bir lipit transfer proteindir (Rigby ve ark. 2008). Cor a 8 alerjenine karşı görülen semptomlar coğrafik özelliklere göre değişmekle beraber Orta ve Kuzey Avrupa'ya kıyasla Akdeniz Bölgesinde daha ciddi semptomlar görülmektedir (Asero ve ark. 2011).

Fındıkta bulunan diğer önemli gıda alerjeni Cor a 9 (59 kDa) ise 11S globulin protein ailesine aittir (Beyer ve ark. 2002). Isıya dayanıklı olup birçok gıda işleme yönteminden sonra stabilitesini korumaktadır (Mills ve ark. 2002). Cor a 11 (48 kDa) de globulin ailesine ait olan 7S tohum depolama proteindir (Lauer ve ark. 2004). Cor a 9, bebeklerde baskın iken Cor a 11 ise yetişkinler arasında baskın olan bir alerjendir (Verweij ve ark. 2012).

Cor a 12 (17kDa) ve Cor a 13 (14-16kDa) oleosin protein ailesine aittir ve lipit metabolizmasında görev almaktadır (Akkerdaas ve ark. 2006). 2S albümin protein ailesine dahil olan Cor a 14 (15-16kDa) ise bitkinin gelişmesi için gerekli besin maddelerinin depolanmasında görev almakta olup ısıya ve sindirime karşı dirençli

olduğundan alerjik semptomların tespitinde önemli bir marker proteindir (Garino ve ark. 2010, Masthoff ve ark. 2013, Pfeifer ve ark. 2015).

2.5.2. Badem alerjenleri

Badem (*P. amygdalus* Batch., synonym. *P. dulcis* Miller) *Rosaceae* familyasının *Prunus* cinsine bağlı bir sert kabuklu meyvedir. Anavatanı Batı ve Orta Asya olup, ülkemizde ise Ege ve Akdeniz Bölgeleri başta olmak üzere birçok bölgede yetişmektedir (Küden ve ark. 2014). FAOSTAT 2018 verilerine göre Amerika 1 872 500 ton ile dünya badem üretiminde birinci sırada yer alırken Türkiye 100 000 ton ile 5'inci sırada bulunmaktadır (Eldoğan 2020). Hacı Alibey, Akbadem, Dokuzoğuz, Gülcan-1, Teksas, Padre, Ferraduel, Ferragnes, Nonpareil, Ferrastar, Cristomorto çeşitleri ticari olarak yetiştirilen bazı çeşitlerdir (Eldoğan ve ark. 2014).

Badem tekli doymamış yağ asitleri özellikle linoleik ve oleik asit bakımından zengin, değerli bir yağ kaynağı olarak kabul edilmektedir (Kodad 2011). Ayrıca, protein, diyet lifi, vitaminler, mineraller, fenolik bileşikler ve fitosteroller açısından da zengindir (Bolling ve ark. 2011, Yada ve ark. 2011, Fernández-Cuesta ve ark. 2012). Badem kavrulmadan ve kavrularak çerezlik olarak tüketilmekte ve bunun yanı sıra yağ, kimya ve gıda sanayinde hammadde olarak da kullanılmaktadır.

Ekonomik ve sağlık açısından önemli bir besin olmasına rağmen, bazı kişilerde immünolojik reaksiyonları tetiklemektedir. Sert kabuklu meyvelere karşı alerjik reaksiyon görülme sıklığı ile ilgili çalışmalarda badem genellikle dördüncü sırada yer almaktadır (McWilliam ve ark. 2015, Elizur ve ark. 2018). Pru du 1, Pru du 2, Pru du 2S albümini, Pru du 3, Pru du 4, Pru du 5, Pru du 6 ve Pru du-konglutin bademde belirlenmiş olan alerjen proteinleridir. Bu proteinlerden yalnızca dört tanesi, Pru du 3, Pru du 4, Pru du 5, Pru du 6, IUIS alerjen listesinde yer almaktadır (Anonim 2021).

Pru du 1 (17 kDa) hücreyi patojenlere karşı koruma ve strese karşı dayanıklılık geliştirmeden sorumludur ve tek başına genellikle hafif alerjik semptomlara sebep olmaktadır (Costa ve ark. 2012a). Kaynatma işlemi sonrası konformasyonel epitopların

yok olmasıyla birlikte IgE reaktivitesi ve duyarlı kişilerde alerjik reaksiyonları tetikleme yetenekleri azalmaktadır (Mills ve ark. 2007).

Pru du 2 (23-27 kDa) taumatin benzeri proteinler ailesine dahil olup, patojenlere ve ozmotik strese karşı verilen tepkilerde rol almaktadır. 8 disülfür köprüsüne bağlı 16 korunmuş sistein kalıntısının varlığından dolayı proteazlara, pH'ya ve ısıya karşı gelişen denatürasyona çok dirençlidir ve gıda işleme yöntemleriyle yok edilmesi zordur (Breiteneder 2004).

Pru du 3 (9 kDa) lipit transfer proteinidir ve pH değişimleri, ısı işlem ve enzimatik reaksiyonlara karşı dayanıklıdır (Chen ve ark. 2008a). Pru du 4 (14 kDa) profilin ailesinde yer almakta olup ısı işlem sırasında stabilitesini kaybetmektedir. Pru du 4 proteininin kararsız olması ve bademdeki az miktarda bulunması immünoblot testlerle tespitini oldukça zorlaştırmaktadır (Tawde ve ark. 2006). Pru du 5 (10 kDa) ise protein sentezinde görev almaktadır ve henüz stabilite ya da sebep olduğu alerjik reaksiyonlarla ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır (Costa ve ark. 2012b).

Amandin veya prunin olarak da adlandırılan Pru du 6 (360 kDa) bademdeki toplam çözümlü proteinlerin yaklaşık % 70'ini oluşturmaktadır olup ana badem proteini bileşenidir (Roux ve ark. 2001, Sathe ve ark. 2002). Pru du 6, toplamda altı alt birim içeren bir heksamerik proteindir ve 350 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Prunin 90°C'ye kadar olan ısı işlemlere karşı dayanıklı olup, daha yüksek sıcaklıklarda kısmi olarak parçalanmakta ve özellikle suyun olduğu ortamlarda stabilitesini ısıyla birlikte kaybetmektedir (Albillos ve ark. 2009).

Pru du-konglutin (45 kDa) visilin benzeri 7S tohum depo globülin ailesine üye olan ve badem alerjisi olarak kabul edilen bir proteindir ancak henüz stabilite ve sebep olduğu semptomlara yönelik yeterli çalışma bulunmamaktadır (Mandalari ve Mackie 2018, Zhang ve Jin 2020).

2.6 Gıdalardaki Alerjenlerin Tespitinde Kullanılan Yöntemler

Gıdalarda bulunan alerjenleri tespitine yönelik çalışmalar özellikle son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Gıda işletmeleri ürettikleri ürünleri mevzuata uygun bir şekilde piyasaya sunabilmek için gıda ürünlerinde bulunan alerjenleri etikette bildirilmek

zorundadır ve bu sebeple gıdalarda bulunan alerjenlerin tespit edilebilmesi hem üreticiler hem de tüketici sağlığı açısından oldukça önemlidir. Gıdalarda bulunan alerjenlerin tespitinde kullanılan başlıca yöntemler immünokimyasal yöntemler, DNA yöntemleri ve kütle spektrometresine dayalı yöntemlerdir.

2.6.1. İmmünokimyasal yöntemler

Gıdalardaki alerjenlerin belirlenmesinde kullanılan immünoanalitik yöntemler, antijenle antikor arasındaki spesifik ve duyarlı reaksiyonlara dayanmaktadır. En sık kullanılan yöntemler arasında Enzime Bağlı Bağışıklık Deneyi (ELISA), Western blot yöntemi ve immünokromatografik kart test yer almaktadır.

ELISA testi hem araştırma amaçlı hem de gıda üretiminde farklı numune matrislerinde alerjenik bileşenlerin tespiti için en yaygın olarak kullanılan yöntem olup; direkt, dolaylı, rekabetçi ve sandviç ELISA gibi farklı yöntemleri bulunmaktadır (L'Hocine ve ark. 2007). ELISA testinde ilk olarak antijen ya da antikorlar mikrotitrasyon plakalarına immobilize edilmekte ve ortama antikor ya da antijene bağlı olan enzimin reaksiyonunda renk değişikliği oluşturabilecek substrat maddeler ilave edilmektedir. Eklenen substrat, bağlanmış enzim konjugatı ile hidroliz olduğunda renkli ürünler ortaya çıkmakta ve oluşan renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (Immer ve Lacorn 2015). En sık kullanılan enzimler peroksidaz, alkalen fosfataz ve beta galaktozidazdır. Özellikle sandviç ve rekabetçi ELISA yöntemleri gıdalardaki proteinlerin miktarsal tayininde kullanılmaktadır (Schubert-Ullrich ve ark. 2009).

Peng ve ark. (2014) yumurta alerjisi olan ovalbümini tespit etmek için oldukça hassas bir sandviç ELISA yöntemi geliştirmiştir. Alerjene ve gıda matrisine bağlı olarak tespit limiti 0,05 ila 10 ppm arasında değişen gluten, soya, süt, yumurta gibi farklı gıda alerjenlerinin tespiti için kullanılan ticari test kitleri mevcuttur.

Török ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada gıdalarda ELISA yöntemiyle alerjen analizini etkileyen faktörleri incelemişlerdir. Gliadin, süt, yumurta veya soya proteinleri eklenerek kurabiye hamuru hazırlanmış ve hem hamur hem de pişirilen kurabiyeler ticari olarak

temin edilebilen ELISA test kitleri ile analiz edilmiştir. Sonuçta gıda matrisinin türü, uygulanan işlemler ve kullanılan ELISA kitinin türünün, geri kazanım sonuçlarının belirsizliğinde rol oynayan üç ana faktör olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca protein kaynaklarının ısı stabilitesine bağlı olarak, geri kazanım değerlerine ısıl işlemin etkilerinin de farklı olduğunu ancak araştırılan ELISA testlerinin doğruluğu üzerinde ısıl işlemin en yüksek etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

ELISA kitleri ile gıdalardaki yumurta alerjeninin tespitine yönelik olarak yapılan diğer bir çalışmada referans materyal (NIST referans madde (RM) 8445) ve yumurta eklenerek hazırlanmış ve farklı sürede pişirme işlemi uygulanmış kurabiye örnekleri farklı ELISA test kitleri kullanılarak analiz edilmiştir. Yapılan değerlendirmede ELISA test kitleri ile elde edilen sonuçların birimlerinin farklılığının test kitlerini ve elde edilen sonuçları kıyaslamada zorluğa yol açtığı ve ayrıca ısıl işlem görmüş ürünlerde geri kazanımların daha düşük olduğu bildirilmiştir (Diaz-Amigo 2010).

Western blot yönteminde ise gıda örneğindeki proteinler önce Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) yöntemiyle molekül ağırlıklarına göre ön ayırma tabii tutulup; ayrılan proteinlerin membrana aktarımı, bloklama, birincil antikor uygulanması, ikincil antikor uygulanması ve görüntüleme basamaklarını kapsamaktadır. Gıdalardaki alerjenlerin Western blot yöntemiyle analizi ELISA yöntemine göre daha düşük hassasiyete sahip olmasına rağmen özellikle işlenmiş gıdaların protein-peptid profilleri hakkında ayrıntılı bilgi edinilmesine olanak sağladığından diğer yöntemlerle birlikte kullanılarak tercih edilmektedir (Sena-Torralba ve ark. 2020).

Chassaing ve ark. (2009) yer fıstığındaki alerjenlerin tespiti için 2D-PAGE, Western blot ve kütle spektrometresi tekniğini kullanarak Ara h 1, Ara h 2 ve Ara h 3/4 alerjenlerinin hassas bir şekilde tanımlamasını gerçekleştirmişlerdir. 2D Western blot ve kütle spektrometresi tekniği birlikte kullanılarak buğday alerjenlerinin tespitinin amaçlandığı çalışmada 2D Western blot tekniği kullanımının klinik semptomlarla bağlantılı spesifik alerjenlerin kesin olarak tanımlanmasına olanak tanıdığı ve buğday alerjisi teşhisinde hassasiyeti artırdığı belirtilmektedir (Courtois ve ark. 2020).

İmmünokromatografik kart testleri diğerk adıyla kalitatif yanal akış testleri de özellikle gıda işletmelerinde alerjen bulaşısının tespitinde taşınabilir olması, cihaza ihtiyaç duyulmaması, hızlı ve doğru sonuç vermesi sebebiyle tercih edilmektedir (Schubert-Ullrich ve ark. 2009, Zheng ve ark. 2012). Bu testler gözlem penceresindeki kontrol ve test çizgilerinde gözle görülebilen renkli çizgi bulunup bulunmamasına göre sonuç vermektedir (Akata ve ark. 2014).

Masiri ve ark. (2016) badem sütü, kaju sütü, hindistan cevizi sütü ve soya sütündeki alerjenlerin tespiti için panel tipi çoklu immünokromatografik kart testi geliştirmişlerdir. Özellikle soya, gliadin, yumurta, süt gibi birçok alerjenin tespitine yönelik ticari kitler mevcuttur.

İmmünokimyasal tekniklerin uygulanmasında bazı zorluklarla karşılaşılabilir (Monaci ve ark. 2011, Marzano ve ark. 2020). Fermentasyon sırasında mikroorganizmalar proteinleri kısmi olarak parçaladığından fermente gıdalarda alerjen proteinlerin ELISA yöntemi ile analiz edilmesinin mümkün olmadığı bildirilmiştir (Battaglia 2008). Maillard reaksiyonları gibi muhtemel reaksiyonlardan dolayı protein yapısında değişiklik olabilmekte ve ELISA ile alerjen proteinlerin tespitinde problemler yaşanmaktadır (Cucu ve ark. 2012a, 2012b). Ayrıca farklı antikorların kullanılması, örnek hazırlama aşaması, test kitlerinde kullanılan birimlerin farklı olması ve kullanılan standartlardaki farklılıklar sonuçlar arasında farklılıklara sebep olmaktadır (Ahsan ve ark. 2016). Çoklu alerjen analizi için oluşturulacak kitler yüksek maliyetli olduğundan genelde her alerjene özel ayrı kitler üretilmektedir (Hoffmann ve ark. 2017).

2.6.2. DNA yöntemleri

DNA tespitine dayanan Polimerize Zincir Reaksiyonu (PCR) testleri gıdalardaki alerjenlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Isıl işlem, pH değişimi gibi uygulamalar protein yapısını bozarak yanlış negatif sonuçlara sebebiyet verirken DNA proteine göre daha stabildir, ayrıca alerjenlerin ekstraksiyonu sırasında da bozulmaya uğramaz. Literatürde alerjenlerin PCR tekniği ile belirlendiği çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Suh ve ark. (2019) domates, elma, şeftali ve kivi'deki alerjen genlerin belirlenmesi için PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada işlenmiş et ürünlerindeki soya alerjini 10 mg/kg seviyesinde RT-PCR yöntemi kullanılarak belirlenebilmiştir (Costa ve ark. 2017). Ancak bu çalışmalarda işlenmiş ürünlerinde DNA izolasyonu için özel ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmelidir. ELISA kitlerinde olduğu gibi balık, kabuklu deniz ürünleri, yer fıstığı, soya, gluten gibi gıda alerjenlerinin tespit edilmesi amacıyla ticari olarak satışa sunulan PCR kitleri de bulunmaktadır. PCR tekniğiyle alerjenler proteinlerden değil DNA üzerinden dolaylı olarak tespit edilmeye çalışılmaktadır. Bu teknikle yumurta ve süt gibi çok az DNA içeren gıdalarda yanlış negatif sonuçlar elde edilebilmektedir (Lee ve Kim 2010).

2.6.3. Biyosensörler

Biyosensörler gıda güvenliği ve kalitesinin izlenmesinde hızlı, taşınabilir, yatırım maliyeti gerektirmeyen bir yöntem olduğundan özellikle pestisit kalıntıları, mikrobiyolojik bulaşanlar, mikotoksinler ve alerjenlerin analizinde son yıllarda tercih edilmeye başlanmıştır (Thakur ve Ragavan 2013, Baş ve Deniz 2015). Optik ve elektrokimyasal biyosensörler gıda alerjenlerinin tespitinde en çok kullanılan sensörlerdir.

Yuan ve ark. (2018) gıda ürünlerinde yer fıstığı, susam ve soya alerjenlerinin 0,4 mg/kg seviyesine kadar tespit edebilen biyosensör geliştirmişlerdir. Fu ve ark. (2018) ise ovalbumin alerjenini tespit etmek amacıyla optik biyosensör geliştirmişlerdir. Geliştirilen biyosensör 0,5 -15 mg/mL aralığında ovalbümin tespitine olanak sağlamıştır, ayrıca yumurta beyazında %99,25-118,90 geri kazanım sağlanmıştır. Yapılan diğer bir çalışmada gıda ürünlerindeki Sola I 7 domates alerjenini 90 dakikada tespit edebilen bir elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir (Pereira-Barros ve ark. 2019).

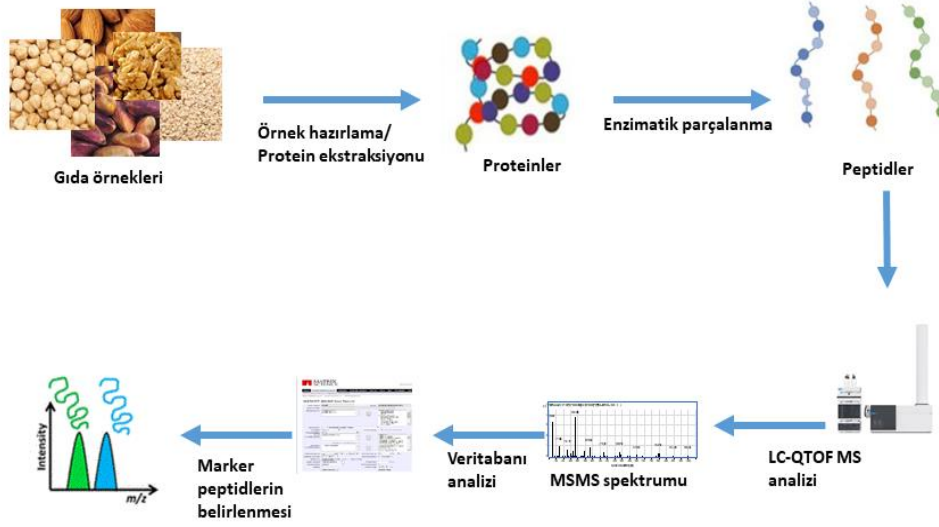
2.6.4. Kütle spektrofotometresi

Gıda matrisinin kompleks yapısı veya gıdanın işlenmesi sırasında meydana gelen yapısal değişikliklerden dolayı immünokimyasal veya DNA esaslı tekniklerle alerjen proteinlerin

tanımlanmasında bazı problemler ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca gıda sanayinde yeni gıda formülasyonlarının geliştirilmesinin yanı sıra yeni işleme yöntemlerinin de kullanılmaya başlanması alerjenler ile ilgili sürekli çalışmalar yapılması zorunluluğunu da beraberinde getirmektedir. Doğru, hassas ve hızlı analitik araçlar gıdalarda alerjen kontrolü için giderek daha fazla talep edilmekte olup omik teknolojileri özellikle de proteomiks gıda alerjenlerinin tespiti ve miktar tayininde yüksek doğruluk sağladığından son yıllarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Carrera ve ark. 2018, Dhondalay ve ark. 2018).

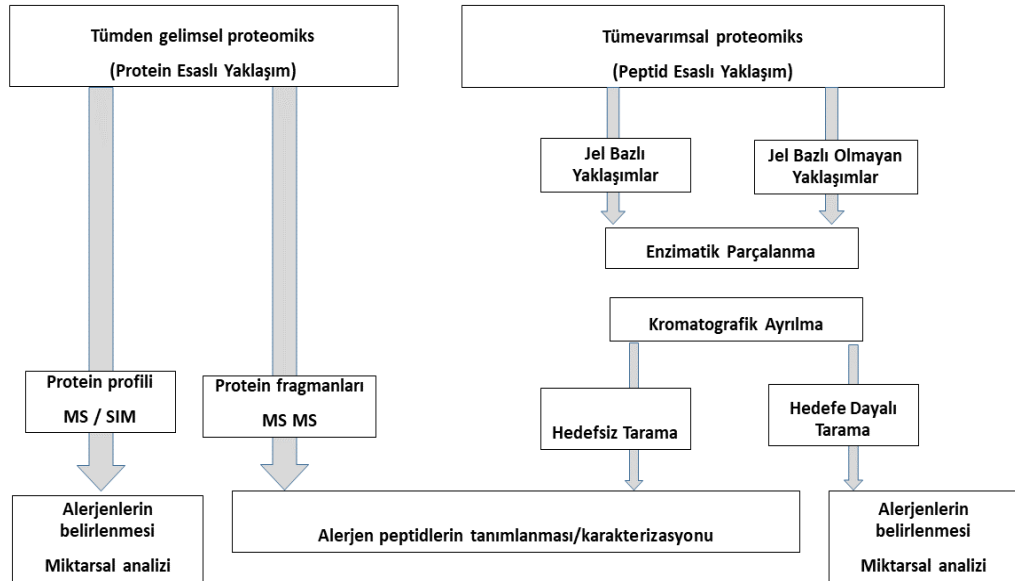
Proteomiks bir organizma, doku veya hücrede herhangi bir anda bulunan proteinlerin, izoformlarının, modifikasyonlarının, birbirleriyle etkileşimlerinin, proteolitik parçalanma ürünlerinin çeşitli ayırma teknikleri kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonunu inceleyen bir bilim dalıdır. Günümüzde proteomik teknolojisi, özellikle kütle spektrometrisi ve ayırma tekniklerindeki önemli ilerlemelerden dolayı gıda gibi karmaşık matrislerde proteinlerin analizine ve karakterizasyonuna olanak sağladığından gıda kimlik belirleme, gıda güvenilirliği ve kalitesinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda tercih edilmektedir.

Proteomiks tekniği sahip olduğu yüksek hassasiyet ve seçicilikten dolayı diğer tekniklerin doğrulanması amacıyla ve alerjenlerin çoklu tespitinde kullanımı hızla yaygınlaşan bir tekniktir (Lu ve ark. 2009). Bu teknik ile proteinler çok büyük bir hassasiyetle tanımlanabilmekte ve dizi analizleri, kısa zamanda, yüksek bir doğrulukla ve proteinlerin yapısından kaynaklanan pek çok sınırlamadan etkilenmeksizin yapılabilmektedir (Hanash 2003, Phizicky ve ark. 2003, Zhu ve ark. 2003). Proteomiks tekniğinin uygulaması Şekil 2.3'te şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Proteomiks tekniğinin özet gösterimi

Gıda alerjenlerinin tanımlanmasında, çoklu analizinde ve miktarsal tayininde üçlü kuadrupol, orbitrap ya da uçuş zamanı kütle spektrometrisi gibi yüksek çözünürlüklü kütle spektrofotometreleri yüksek cihaz maliyeti ve deneyimli personel ihtiyacına rağmen tercih edilmektedir (López-Pedrouso ve ark. 2020). Proteomiks tekniği uygulanırken tümevarımsal proteomik (Bottom-up) ve tümden gelimsel (Top down) proteomik olarak iki farklı yaklaşım kullanılmaktadır (Şekil 2.4).



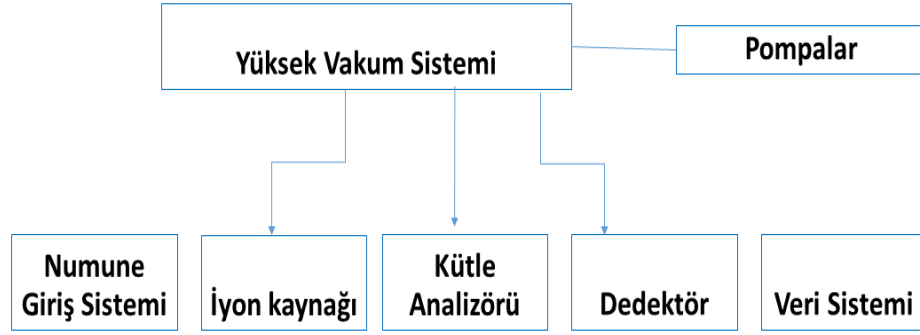
Şekil 2.4. Tümevarımsal ve tümden gelimsel yöntemlerin akış şeması

Tümden gelimsel proteomik tekniğinde kütleleri ölçülen intakt proteinlerin moleküler ağırlıkları standart ile veya protein dizi veri tabanlarında eşleştirilerek tanımlama yapılmaktadır (Chen 2008b). Bu yöntemde MS analizi öncesi proteinlere enzimatik parçalama işlemi uygulanmamakta, intakt protein ve bu proteine ait dizilim incelenmektedir. Basit protein karışımlarının analizinde tercih edilen bir yöntem olmasına rağmen molekül ağırlığı 200 kDa'dan büyük moleküllerin analizi zordur (Han ve ark. 2006).

Tümevarımsal proteomik tekniği günümüzde kütle spektrometresi tabanlı protein tanımlanması için en çok tercih edilen yöntem olup proteinlerin tanımlanması, peptidler üzerinden gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemde jelle dayalı veya kromatografik ön ayırımlar ile proteinlerin ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmektedir (Cosette ve ark. 2012). Jel bazlı yaklaşımlarda 2-boyutlu jel elektroforezi ya da tek boyutlu sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılmakta olup, jelsiz yaklaşımlarda iyon değişim kromatografisi, affinite kromatografisi, ters faz kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, membran kromatografisi, yüksek performans sıvı kromatografisi kullanılmaktadır (Abdallah ve ark. 2012).

Ekstraksiyon sonrası proteindeki amino asit zinciri çeşitli enzimler kullanılarak belirli noktalarından kesilmekte ve proteinlerin tanımlanması kısmi sekans analizine dayanılarak gerçekleştirilmektedir. Tripsin, hem uygun kütle tayin aralığı bakımından hem de polipeptid bağlarını lizin ve arjinin amino asitlerinden keserek tripsin ile muamele edilmiş olan polipeptidten oluşan parçaların tahmin edilebilir olmasından dolayı sıklıkla tercih edilmektedir. Enzimatik parçalanma sonrası oluşan parçalanma ürünleri kütle spektrometresi ile analiz edilerek elde edilen MS ve MS/MS spektrumları tarama motorları aracılığı ile uygun veri tabanında taratılarak proteinlerin tanımlanması yapılmaktadır (Downs ve Johnson 2018).

Proteomiks çalışmalarda kullanılan kütle spektrometreleri örnek girişi, iyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör ve veri sistemi olmak üzere beş ana kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.5).



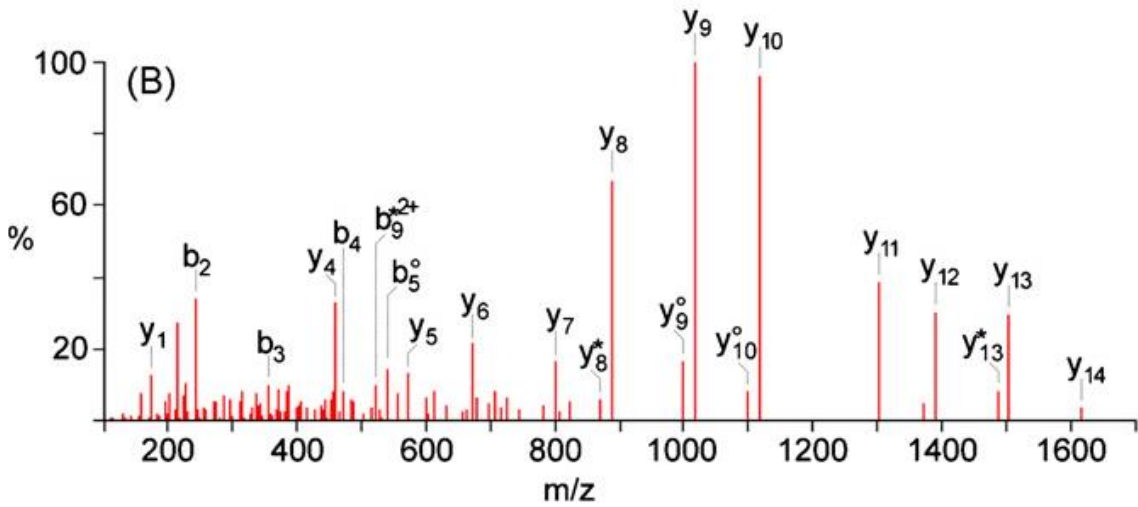
Şekil 2.5. Kütle spektrometresinin ana bileşenleri

Kütle spektrometresi öncesi kompleks karışımlardaki proteinler genellikle asetonitril gibi gradient organik çözücüler ile sıvı kromatografisi cihazı kullanılarak ayrılmaktadır. Ayrım sonrası örneklerden elektrosprey iyonizasyonu (ESI) veya matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) gibi iyonlaştırıcılar kullanılarak üretilen pozitif veya negatif iyonlar, kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılmak üzere kütle analizörüne gönderilmektedir. ESI iyonlaştırma tekniğinde iyonlar atmosferik basınç altında oluşturulurken, MALDI tekniğinde ise atmosferik basınç veya vakum altında oluşturulmaktadır. ESI ve MALDI iyonlaştırma teknikleri yüksek hassasiyete sahip olup özellikle proteinler gibi büyük, uçucu olmayan, yüklü moleküllerin analizinde ve peptid karışımlarının analizinde tercih edilmektedir (Mann ve ark. 2001).

İyon kaynağında üretilen iyonlar, kütle-yük oranlarına göre; uçuş zamanlı analizörler, kuadrapol, iyon tuzaklı analizörler, gibi farklı kütle analizörleri kullanılarak ayrılmaktadır (Peterson ve ark. 2012). Uçuş zamanlı analizörlerde değişik kütleli iyonların aynı gerilimle hızlandırıldıkları zaman aynı sürede değişik hızlar kazanmaları özelliğinden yararlanılmaktadır. Uçuş tüpüne gönderilen iyonlar burada uçuş zamanlarına bağlı olarak kütle/yük oranlarına göre ayrılmaktadır. Kuadrapol analizörler ise birbirine paralel ve karşılıklı olarak aynı polaritede olan dört silindirik çubuktan oluşmaktadır. Bu çubuklara uygulanan doğru akım ve radyo frekansı voltajı değiştirilerek sadece bazı kütle/yük oranındaki taneciklerin geçmesi sağlanarak spektrum elde edilmektedir. İyon kapalı analizörlerinde merkez elektrot halka; üst ve taban elektrotlar yarım küre olacak şekilde

üç elektrot bulunmaktadır. Bu tuzığa çeşitli radyo frekans uygulamaları yapılarak tuzakta biriken iyonların seçimli olarak detektöre fırlatılması sağlanmaktadır.

Dedektörde farklı m/z değeriine sahip iyonların göreceli yoğunluklarına göre verdikleri bir spektrum elde edilmektedir. En yaygın olarak kullanılan dedektör elektron çoğaltıcıdır. Son olarak veri sisteminde m/z değeriilerinin x ekseninde, bağılı yoğunluklarının da y ekseninde yer aldığı pikler şeklinde kütle spektrumu elde edilmektedir (Thomas 2011). (Şekil 2.6)



Şekil 2.6. Ovalbumine ait ELINSWVESQTNGIIR peptidinin MS/MS spektrumu (Fremout ve ark. 2010)

Peptidlere ait kütle spektrumları veri tabanlarına yüklenerek peptidlerin tanımlaması yapılmaktadır. MS/MS spektrumlarını pek çok farklı algoritmaya göre veri tabanında bulunan aynı proteinin aynı enzimle bilgisayar simülasyonu ile hazırlanmış teorik kütle profilleri ile karşılaştırıp sonuç üreten çeşitli yazılımlar bulunmaktadır. UniProtKB/Swiss-Prot ve NCBI veri tabanları protein verilerini içeren başlıca veri tabanları olup bu veri tabanlarındaki bilgilerden faydalanarak tarama yapılmasına olanak sağlayan SEQUEST, MASCOT, X!Tandem gibi farklı yazılımlar mevcuttur. Veri tabanlarında tanımlanmış olan peptidlerden gıdalarda alerjenlerin belirlenmesine yönelik belirleyici peptidler seçilirken peptidin parçalanma ürünlerinin tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, güçlü sinyaller vermesi ve alıkonma zamanlarının kararlı ve hedeflenen alerjen için spesifik olması mutlaka göz önünde bulundurulması gereken faktörlerdir (Johnson ve ark. 2011). Peptidlerin uzunluğunun 7-25 amino asit aralığında

sınırlandırılması öncü ve ürün iyonların kütle aralığını kapsayacak geniş bir çalışma aralığı sağlamakta ve seçilen peptidlerin seçiciliğini artırmaktadır (Gallien ve ark. 2011).

Proteomiks tekniği kullanılarak gıdalardaki alerjenlerin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda bazen tek bir proteine ait peptid alerjenlerin tespitinde marker olarak seçilirken bazı çalışmalarda ise farklı proteinlere ait birden çok peptid dizilimi marker olarak seçilmektedir. Shefcheck ve Musser (2004) yaptığı çalışmada dondurmaya eklenen yer fıstığına spesifik alerjenlerin tespiti amaçlanmıştır. LC-MSMS kullanılarak Ara h 1 yer fıstığına özgü alerjen olarak tespit edilmiştir. Daha sonra Ara h 1 alerjeninin dondurma matriksinde 10 mg/kg seviyesinde belirleyebilmişlerdir.

Pedreschi ve ark. (2012) bisküvilerdeki eser düzeydeki yer fıstığı alerjenlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bisküvideki proteinin SDS-PAGE ile ayrılması sonrası enzimatik parçalama gerçekleştirilmiş ve LC-QTOF/MS cihazı ile analiz edilerek MS/MS spektrumları elde edilmiştir. Elde edilen spektrumlar MASCOT programı yardımıyla Swiss-Prot veri tabanında analiz edilmiştir. Yapılan çalışmada bisküvilerdeki yer fıstığı alerjeninin 10 mg/kg seviyesinde tespit edilmesi amacıyla Ara h ³/₄ alerjenine ait AHVQVVDSNGNR ve SPDIYNPQAGSLK peptid dizilimleri marker olarak belirlenmiştir.

Ansari ve ark. (2012) fındığa özgü marker peptid dizilimlerinin LC-MS/MS ile tespitini hedeflemişler ve Cor a 8, Cor a 9 ve Cor a 11 fındık alerjeni için ilk olarak 8 adet marker peptid dizilimi tespit etmişlerdir. Daha sonra peptidlerin seçiciliğini kontrol etmek amacıyla BLAST programı kullanmışlar ve peptid dizilimlerinden birinin diğer sert kabuklu meyvelerde de bulunduğunu belirlemişlerdir.

Planque ve ark. (2016) süt, kazein ve peynir altı suyu, yumurta (beyazı ve sarısı), soya fasulyesi ve yer fıstığı alerjenlerinin kompleks gıda matrikslerinde proteinlerin tripsinle parçalama ve saflaştırma sonrası UHPLC–MS/MS ile tespitini amaçlamışlardır. Çalışmada çikolata, dondurma, domates sosu ve bisküvi matrisleri seçilerek alerjen proteinlerin minimum tespit edilme düzeyleri belirlenmiştir. Alerjen proteinlerin tespit limitleri kazein (0,5 mg/kg), peynir altı suyu (5 mg/kg), yumurta beyazı (3,4 mg/kg),

yumurta sarısı (30,8 mg/kg), soya (5 mg/kg) ve yer fıstığı için 2,5 mg/kg olarak belirlenmiştir.

2.7. Gıda İşleme Proseslerinin Alerjenler Üzerine Etkisi

Çoğu gıda alerjisi, molekül ağırlığı 10 ila 70 kDa arasında değişen, proteolitik reaksiyonlara, ısı ve asit işlemlerine karşı stabil olan suda çözünür glikoproteinlerdir (Sicherer ve Sampson 2010). Bu alerjenik proteinler gıda işleme sırasında değişikliklere uğrayabildiğinden, gıdaların alerjenitesinde değişikliklere sebep olabilmektedir.

Gıdalara kalite ve güvenilirliğini artırmak, bozulma sürecini yavaşlatmak, uzun süre güvenli bir şekilde depolayabilmek, tüketiciler için daha sağlıklı, lezzetli gıda alternatifleri sunmak amacıyla çeşitli işleme yöntemleri uygulanmaktadır. Güneşte kurutma, ısı işlem, tuzlama, tütsüleme, dondurma ve konserve yapma gibi geleneksel işleme yöntemlerinin yanında pastörizasyon, sterilizasyon, basınçlı pişirme, kızılötesi işleme, mikrodalga işleme, modifiye atmosferde ambalajlama, sprey kurutma, ultrasonifikasyon gibi modern yöntemler de günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Gıda işleme prosesleri sırasında işleme yöntemi ve uygulama parametrelerine bağlı olarak gıdalardaki proteinlerin alerjen özellikleri değişikliğe uğrayabilmektedir (Sathe ve Sharma 2009).

2.7.1. Isıl İşlem Uygulamaları

Gıdalara ısı işlem uygulanması ile birlikte peptid bağlarının hidrolizi, disülfid bağlarının yeniden yapılandırılması, denatürasyon ve karbonhidrat, lipit gibi diğer bileşenlerle etkileşimlerin olması gibi farklı reaksiyonlar gerçekleşmektedir. Isıl işlem proteinlerde ikincil ve üçüncül yapıların bozulmasına da neden olmakta ve tüm bu reaksiyonlar alerjen peptidlerin bazılarını yok ederek ya da yeni etkileşimler sonucu farklı alerjenlerin oluşmasına sebebiyet vererek gıdaların alerjen özelliklerinin azalmasına ya da alerjenitenin artmasına neden olmaktadır (Wal 2003, Jimenez-Saiz ve ark. 2015).

Ayrıca ısı işlem sırasında proteinler şeker ve aminoasitler gibi diğer gıda bileşenleriyle etkileşime girebilmekte ve Maillard reaksiyonları gibi farklı reaksiyonlara sebep olmaktadır. Maillard reaksiyonları gıdada bulunan serbest amino asitlerin, proteinlerin veya peptidlerin serbest amino grupları ile indirgen şekerler veya lipit oksidasyon ürünleri arasında gerçekleşen ve enzimatik olmayan kahverengileşme reaksiyonlarıdır. Maillard reaksiyonu sonucunda pişirilen gıdalarda çeşitli aroma bileşikleri oluşarak gıdanın duyu özellikleri gelişmektedir ancak bu reaksiyon sırasında alerjen özelliklerinde de değişimler meydana gelebilmektedir. Şekerler ile etkileşim, proteinlerin üçüncül yapısını değiştirebilmekte, böylece konformasyonel epitoplarını değiştirebilmekte, yeni IgE bağlanma bölgeleri yaratabilmekte, alerjenik yapıyı maskeleyebilmekte veya önceden mevcut olmayan bölgeleri açığa çıkarabilmektedir (Maleki ve Hurlburt 2004).

Literatürde, ısı işlem sonrası farklı gıda alerjenlerinin stabilitesinin değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur. Uygulanan ısı işlem türü, sıcaklık, ısı işlem süresi, pH gibi faktörler alerjen proteinlerinin fizikokimyasal özelliklerinde değişikliklere sebep olabilmektedir. Ancak, ısı işlemin proteinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerine olan etkileri ile ilgili belirsizlikler özellikle alerjen proteinlerin tespiti ile ilgili metotların oluşturulmasını zorlaştırmaktadır (Parker ve ark. 2015).

Chassaigne ve ark. (2007) kavrulmamış ve 140°C'de kavurma işlemi uygulanmış yer fıstığında Ara h1, Ara h2 ve Ara h 3 alerjenlerinin değişimini LC-QTOF MS ile incelemişler ve bu alerjene ait ısı işlem sonrası da stabilitesini devam ettiren beş peptid dizilimini marker olarak belirlemişlerdir.

Van Boxtel ve ark. (2008b) Brezilya cevizi ekstraktlarını farklı pH (2, 5, 7) seviyelerinde 120 °C'ye kadar sıcaklıklarda ısıttıklarında, Ber e 1 alerjeninin yüksek ısı direncine sahip olduğunu ancak çok düşük pH'larda 80 °C'de bile denatüre olduğunu ortaya koymuşlardır. pH değişimi ile birlikte protein yapısında meydana gelen değişiklikler ısıya karşı duyarlılıkta da değişime sebep olmaktadır.

Antep fıstığı alerjenitesinin sıcaklığa bağlı değişiminin incelendiği çalışmada, kuru kavurmanın IgE bağlanma kapasitesine etkisinin olmadığı, buharla kavurmanın ise

sıcaklığa bağlı kaynaklanan protein kümelenmesinden dolayı IgE bağlanma kapasitesinde düşüşe sebep olduğu bildirilmiştir (Noorbakhsh ve ark. 2010).

Cabanillas ve ark. (2014) cevizlere uygulanan basınç ve sıcaklığın Jug r 4 ceviz alerjenine etkisini immunoblot testlerle incelemiştir. 256 kPa, 138°C basınç ve sıcaklık uygulamasının Jug r 4 ceviz alerjenine IgE' nin bağlanma kapasitesini azalttığını ortaya koymuşlardır.

Sudha ve ark. (2016) buğday ununa 30 dakika atmosferik basınçta buhar uygulaması gerçekleştirmişler ve ELISA testi sonuçlarına göre gliadin alerjeni sonuçlarında %40'lık bir düşüş tespit etmişlerdir.

Ayrıca ısı ile birlikte Maillard reaksiyonlarına bağlı olarak alerjen-spesifik IgE düzeylerinde düşüş olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Taheri-Kafrani ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada inek sütü alerjeni olan Beta-Laktoglobulinin (β -Lg) lineer epitoplarını Maillard reaksiyonu sonucu modifiye ederek IgE bağlama kapasitesini düşürdüğünü belirlemiştir.

Yer fıstığı alerjenleri olan Ara h1 ve Ara h2'nin Maillard reaksiyonu sonrası alerjenitesinin arttığını gösteren bazı çalışmalar da bulunmaktadır (Chung ve Champagne 2001; Gruber ve ark. 2005). Nakamura ve ark. (2005) kurutulmuş deniz ürünlerinin Maillard reaksiyonu sonrası alerjenitesi üzerine yaptıkları çalışmada kabuklu deniz ürünleri olan tropomiyosinin IgE bağlama kapasitesinin arttığını belirtmişlerdir. Clare ve ark. (2007) ise Maillard reaksiyonu sonrası yer fıstığı örneklerinin IgE bağlama kapasitelerinin kontrol örneklerine benzer olduğunu ortaya koymuşlardır.

2.7.2. Yüksek hidrostatik basınç (HHP)

Yüksek hidrostatik basınç (HHP) uygulamaları gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmaları yok ederek gıdaların raf ömürlerini arttıran ve gıdaların renk, lezzet ve besin değeri gibi özelliklerinde minimum değişikliğe sebep olan bir yöntemdir. HHP; basınca, sıcaklığa ve kimyasal koşullara bağlı olarak proteinin biyolojik işlevinin kısmen

veya tamamen inaktivasyonuna yol açabilmektedir. Elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler kovalent olmayan bağlarda değişikliklere sebep olmakta ve bu durum proteinlerin yapılarında tersinir veya geri döndürülemez değişikliklere yol açmaktadır (Meyer-Pittroff ve ark. 2007). HHP uygulaması gıdalardaki alerjen proteinlerin yapısını değiştirerek alerjenitede değişime sebep olmaktadır.

Yamamoto ve ark. (2010), 100 MPa üzerindeki HHP uygulamasının başlıca sığır alerjenlerinden biri olan sığır γ -globulinin üçüncül yapısında bir değişikliğe yol açtığını ve alerjenitesinin azaldığını göstermiştir. Ancak HHP uygulaması tüm gıda alerjenlerini farklı şekilde etkilemektedir. Yapılan bazı çalışmalar 300-600 MPa'lık uygulamanın havuç, yer fıstığı ve domatesteki ana alerjenlerde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığını göstermektedir (Germini ve ark. 2007; Heroldova ve ark. 2009; Johnson ve ark. 2010).

HHP uygulamasının ısı ile birlikte uygulandığı bir çalışmada elmadaki ısıya karşı stabil olan Mal d 3 alerjeninin 700 MPa, 115 °C uygulama sonrası IgE bağlama kapasitesi azalmıştır (Husband ve ark. 2011). Buna karşın diğer bir çalışmada elmadaki ana alerjenlerden biri olan Mal d 1'in ısı ile birlikte uygulanan HHP uygulaması sonrası alerjenitesini koruduğu ifade edilmektedir (Fernández ve ark. 2009).

2.7.3. Vurgulu elektrik alan (PEF)

PEF uygulaması ile gıdalara saniyeden daha kısa sürelerde 20-50 kV/cm gibi yüksek elektriksel alan şiddetlerinde elektrik vurguları uygulanarak, gıdaların ve mikroorganizmaların hücre zarlarının mekaniksel olarak parçalanması ve mikroorganizmaların inaktive edilmesi sağlanmaktadır. Böylece gıdaların besin içeriğine zarar vermeden duyu özellikleri yüksek ve raf ömrü uzun gıdalar üretilebilmektedir. PEF uygulamaları gıdaların alerjenitesinin azaltılması amacıyla da kullanılmaktadır ancak PEF uygulamalarının gıdalardaki alerjen proteinler üzerine etkisiyle ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır.

Tobajas ve ark. (2020) PEF uygulamasının şeftalideki ana alerjenlerden biri olan Pru p3 üzerine etkisini araştırmışlar ve 25 kV/cm 50°C’de PEF uygulaması sonucunda Pru p3 alerjeninin denatüre olduğunu ELISA testi ile tespit etmişlerdir. Ancak in vitro yapılan testlerde PEF uygulamasının Pru p3 alerjeninin IgE molekülüne bağlanma kapasitesini etkilemediğini ortaya koymuşlardır. Bu sebeple PEF uygulamasının gıdalardaki alerjen proteinleri nasıl etkilediği ile ilgili kesin bir sonuca varamamışlardır. Johnson ve ark. (2010) ise yer fıstığı ve elma örneklerine 2Hz frekansta 0–35 kV/cm aralığında PEF uygulaması gerçekleştirmiş ancak bitki alerjenlerinde herhangi bir modifikasyon gözlemlenmemişlerdir.

2.7.4. Fermantasyon

Gıdalar tat, yapı, besin değeri ve raf ömrünün iyileştirilmesi amacıyla; bitkisel ve hayvansal kökenli ürünlerin doğal florasında bulunan çeşitli mikroorganizmalar tarafından veya fonksiyonel mikroorganizmaları içeren starter kültür ilavesi ile fermente edilmektedir. Fermente gıda ürünleri, biyoaktif peptidler ve fenolik bileşikler bakımından zengin olup, antioksidan aktiviteleri yüksektir (Rizello ve ark. 2012, Tamang ve ark. 2016). Fermantasyon sırasında doğrusal ve konformasyonel epitoplara modifikasyonu veya parçalanması yoluyla gıdalardaki alerjen proteinlerde değişiklikler meydana gelebilmektedir.

Süt proteinlerinin *Lactobacillus* ile fermantasyonu β -Lg ve α -La alerjenitesini azaltmakta ve IgE bağlama kapasitesini düşürmektedir (Yao ve ark. 2015). *Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactobacillus helveticus* suşlarının birlikte kullanılmasıyla gerçekleşen fermantasyon sonucunda da suşların tekli olarak kullanıldığı fermantasyona göre β -Lg ve α -La alerjenitesinde azalma meydana gelmiştir (Bu ve ark. 2010).

Soya sütünün *Lactobacillus helveticus* ve *Enterococcus faecalis* suşları tarafından fermantasyonunun, iki ana soya alerjeni olan Gly m 5 ve Gly m 6 alerjenlerine karşı hastaların IgE immünoreaktivitesinin azaldığını göstermektedir (Meinlschmidt ve ark. 2016a, Biscola ve ark. 2017).

Yang ve ark. (2018) tarafından gerçekleştirilen diğerk bir çalışmada ise in vitro ve in vivo olarak yapılan testler *L. casei*, maya ve *Bacillus subtilis* içeren başlangıç kültürü ile soya fasulyesi ksyesinin katı hal fermentasyonu sonucu alerjenitenin azaldığı ifade edilmiştir.

2.7.5. Enzimatik hidroliz

Enzimatik hidrolizde esas olarak, proteolitik veya hücresel enzimlerle alerjenleri peptidlere ve / veya amino asitlere kısmen veya büyük ölçüde hidrolize ederek doğrusal epitoplar parçalanmaktadır. Hidroliz sonrası alerjenite üretilen peptidlerin türü, pH, sıcaklık, hidrolizin derecesi ve enzim-substrat oranı gibi işlem koşullarına bağlı olarak değişmektedir.

Cabanillas ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada alkalaz ve flavourzyme enzimlerini ard arda ekleyerek ve birlikte kullanarak hidroliz edilen mercimek örneklerinin bu enzimleri tek tek kullanarak hidroliz edilen örneklerle göre daha düşük IgE bağlama kapasitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Hidroliz ısıl işlemle birlikte uygulandığında alerjen proteinleri parçalama etkisi artmaktadır. Örneğin süt proteinleri ısıl işlemle birlikte hidroliz edildiğinde β -lactoglobulin alerjenitesinde düşüş tespit edilmiştir (Peyron ve ark. 2006).

Kulis ve ark. (2012) kaju proteinlerinin pepsin ile parçalanması sonrası kajunun farelerde daha düşük bir alerjenik aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Diğerk bir çalışmada da yer fıstığının tripsin ile hidrolizi sonucu alerjenitenin etkili bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (Hazebrouck ve ark. 2012).

Pushpa ve ark. (2018) tarafından yürütülen çalışmada peynir altı suyunda β -lactoglobulin alerjenitesi ELISA testi ile ölçülmüş ve yalnızca 75-125°C aralığında farklı sürelerde ısıl işlem uygulandığında antijen konsantrasyonunda maksimum %12'lik bir azalma bulunurken ısıl işlem ve hidroliz birlikte uygulanan örneklerde antijen konsantrasyonunda %50'ye varan düşüş tespit edilmiştir. Günümüzde hidrolize peynir altı suyu veya kazein kullanılarak üretilen süt bazlı ürünler başta olmak üzere çok sayıda

hipoalerjenik gıda bulunmaktadır ve bu ürünler süt alerjisi olan çocuklar tarafından da tüketilebilmektedir.

2.7.6. Diğer ısı olmayan işlemler

Işınlama, ultrases ve soğuk plazma teknolojisi gibi ısı olmayan yöntemler gıdalardaki alerjen özellik gösteren proteinlerin yok edilmesi ya da azaltılması amacıyla kullanılmaktadır.

Gıda ışınlama; ışınlama dozuna, protein konsantrasyonuna, oksijen varlığına ve moleküler yapıya bağlı olarak gıda proteinlerinin immünoaktivitesinde değişiklikler yaratabilmektedir. 10 kGy'lik bir ışınlama dozu, hem saflaştırılmış Ara h6 alerjeninin hem de fıstık proteini ekstraktının antiijenitesini azaltarak yalnızca %5'lik IgG bağlanma kabiliyeti sağlamıştır (Luo ve ark. 2013).

Kasera ve ark. (2012) 25 kGy'lik ışınlama dozu ve kaynatmanın baklagil proteinlerinde çözünürlüğü azalttığı ve buna bağlı olarak alerjenitenin de azaldığını belirlemişlerdir. Buna karşılık, Gomaa ve Boye (2015) tarafından yapılan çalışmada 10 kGy dozunda γ -ışınlamanın buğdaydan yapılan ekmek hamurunun ve makarnanın yanı sıra yumurta proteinlerinin (ovalbümin ve ovomukoid) antiijenitesinde önemli bir azalmaya sebep olmadığını bildirmişlerdir.

Ultrases uygulamaları; uygulama maliyetinin düşük olması, çevre dostu olması, gıdanın tat ve koku gibi duyu özelliklerine etkisinin sınırlı olması sebebiyle kurutma, sterilizasyon, enzim inaktivasyonu, ekstraksiyon ve homojenizasyon gibi birçok farklı amaçlarla gıda sanayinde kullanılmaktadır (Onwude ve ark. 2017). Ultrases uygulaması proteinlerin doğal yapısında, örneğin konformasyon değişiklikleri, ikincil yapıya hasar, diğer molekül içi/moleküler etkileşimlerin oluşumu, disülfür bağının yeniden yapılandırılması gibi birçok değişikliğe neden olmaktadır. Buna göre, ultrases alerjenik özellikleri de etkileyebilmektedir ancak uygulanan işlemin şiddeti, süresi, çevresel koşullar ve protein yapısına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir.

Yapılan bir çalışmada 50°C ve 1.5 saatlik yüksek şiddetli ultrases uygulaması karides ekstraktlarının ve çiğ karideslerde bulunan başlıca alerjen olan Pen a 1'in alerjenitesini azalttığı ifade edilmiştir (Zhenxing ve ark. 2006).

Li ve ark. (2013) kavrulmuş yer fıstığında ultrases uygulaması sonrası tripsin ve kimotripsin ile enzimatik hidrolize tabi tutulmuş örneklerde Ara h 1 ve Ara h 2 alerjenlerinin konsantrasyonunda azalma ve buna bağlı olarak IgE bağlanma kapasitesinde düşüş tespit etmişlerdir.

Diğer bir çalışmada soya fasulyesi tohumlarına farklı güç seviyelerinde (0-300 W) ultrases işlemi uygulamışlardır. Daha sonra 5 gün çimlenmeye bırakılan tohumlardan en yüksek güçte ultrases uygulamasına tabi tutulanlarda IgE bağlama kapasitesinde yaklaşık %51,39 azalma tespit edilmiştir (Yang ve ark. 2015).

Soğuk plazma teknolojisi özellikle gıdalarda bulunan mikroorganizmaların inaktive edilmesi, gıda ambalaj materyallerinin modifikasyonu, pestisit ve mikotoksinlerin parçalanması gibi amaçlarla son yıllarda kullanılmaya başlanan bir yöntemdir. Maddenin dördüncü hali olarak da tanımlanan plazma; foton, iyon, elektron, serbest radikaller ve moleküller gibi reaktifler içermekte olup proteinlerin yapısında ve buna bağlı olarak gıdanın alerjen özelliklerinde değişikliğe sebep olabilmektedir.

Tammineedi ve ark. (2013) kazein, β -laktoglobulin ve alfa laktalbumin süt alerjenlerinin azaltılmasında soğuk plazma uygulamasının etkinliğini araştırmışlardır. Kontrol örneği ve işlem uygulanan örneklerin SDS-PAGE analizi sonucunda alerjen proteinlere ait jel bant yoğunluğunda ve IgE bağlama kapasitesinde önemli bir fark tespit edilememiştir.

Meinlschmidt ve ark. (2016b) soya alerjeni olan β -konglisinin ve glisinine doğrudan veya indirekt olarak soğuk plazma uygulamış ve soğuk plazmanın mevcut protein bantlarının yoğunluğunun azalmasına, ayrıca 50 kDa'da yeni protein bantlarının oluşumuna neden olduğunu tespit etmiştir. SDS-PAGE profilinde protein bantlarının kaybolmasına paralel olarak ELISA analizi sırasında soya proteini örneklerinin immünoreaktivitesinde %89-100'e varan azalma tespit etmişlerdir.

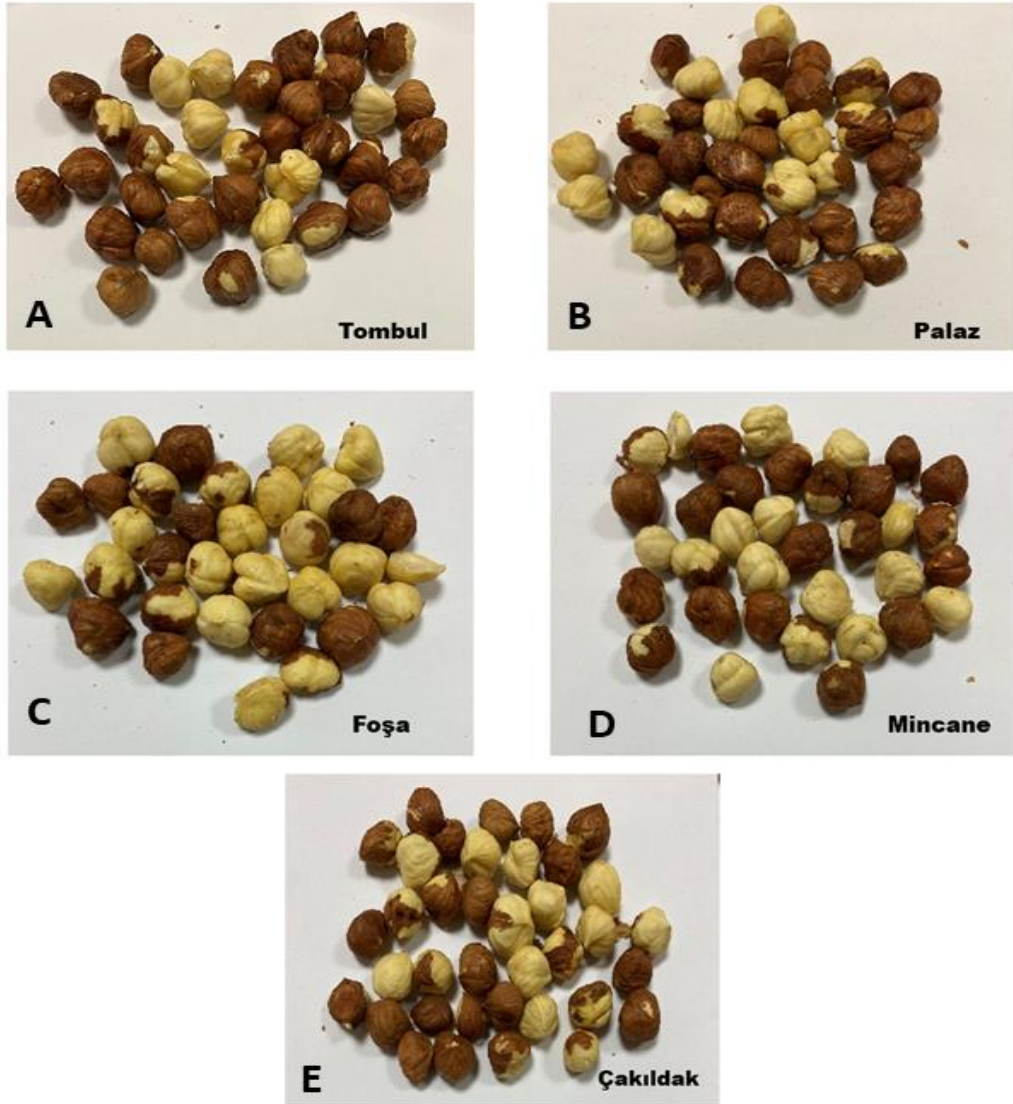
Venkataratnam ve ark. (2020) ise yer fıstığı alerjisi olan Ara h 1 ve Ara h 2 üzerine soğuk plazma uygulamasının etkisini incelemişler ve SDS-PAGE ile analizde proteinlerin çözünürlüğünde azalma tespit etmişlerdir. Ayrıca soğuk plazma uygulaması ile alerjen proteinlerin ikincil yapıları modifikasyona uğrayarak alerjenitede %60'ların üzerinde azalma belirlemişlerdir. Karıyada bulunan başlıca alerjen olan tropomyosini hedefleyen benzer bir araştırmada, 30 kV voltaj ve 60 Hz frekansta 5 dakika doğrudan soğuk plazma uygulamasının alerjenitede %76 azalma gösterdiği belirtilmiştir (Shriver 2011).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

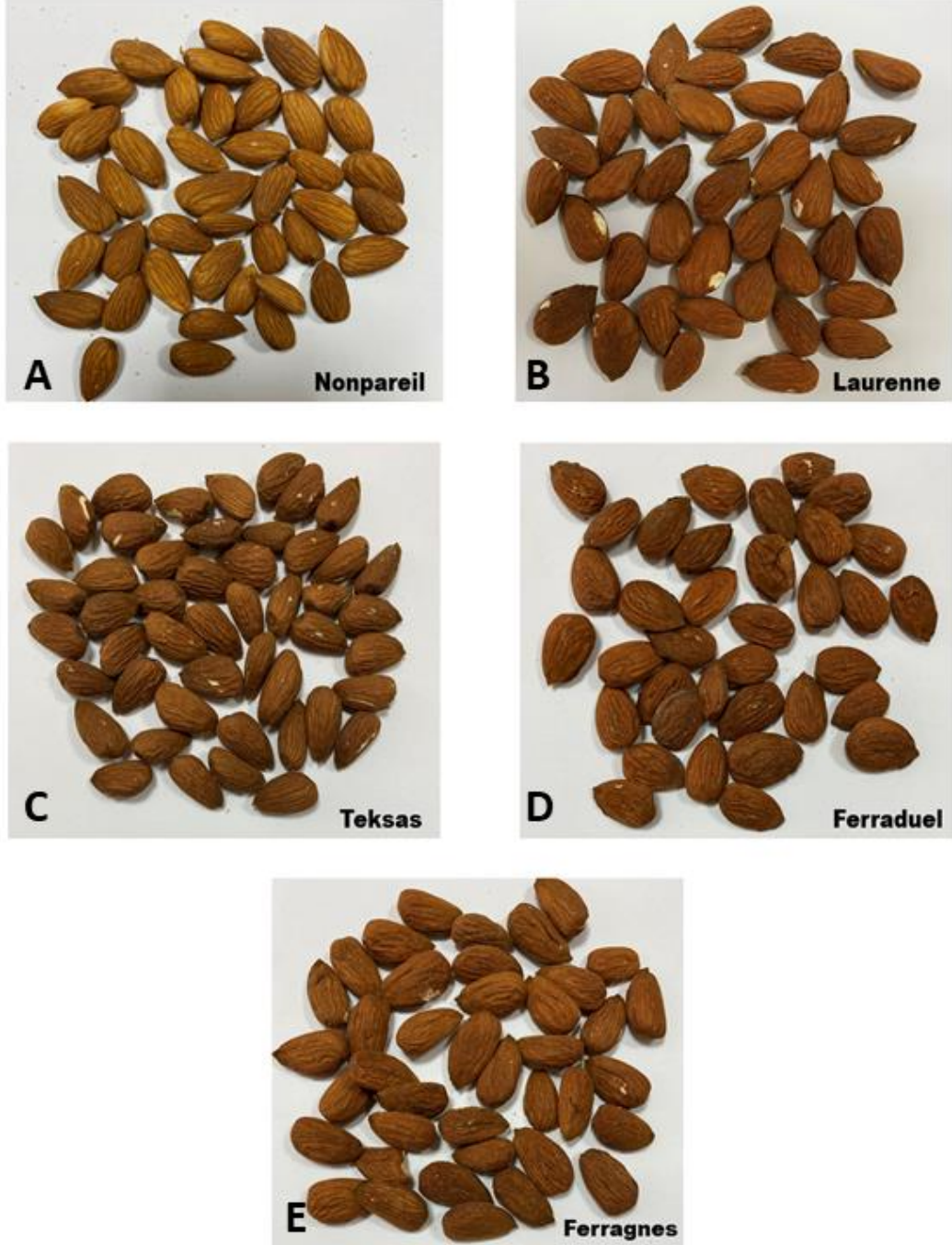
3.1.1. Fındık ve badem örnekleri

Bu çalışmada materyal olarak badem (*Prunis dulcis* L.) ve fındık (*Corylus avellana* L.), kullanılmıştır. Çeşitler arasında alerjen proteinler açısından farklılıkların araştırılması amacıyla Giresun Fındık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden Tombul, Palaz, Foşa, Mincane ve Çakıldak fındık çeşitleri temin edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Fındık çeşitleri (A: Tombul, B: Palaz, C: Foşa, D: Mincane, E: Çakıldak)

Badem ile ilgili çalışmalarda Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilen Nonpareil, Laurene, Teksas, Ferraduel ve Ferragnes çeşitleri kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Badem çeşitleri (A: Nonpareil, B: Laurene, C: Teksas, D: Ferraduel, E: Ferragnes)

Çalışmada kullanılan fındık ve badem çeşitlerine Çizelge 3.1’de belirtilen süre ve sıcaklıklarda ısıl işlem uygulaması yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışma sırasında uygulanan ısıl işlem süre ve sıcaklıkları

Süre (dk)	Kavurma Sıcaklığı (°C)
15	130
	150
	170
30	130
	150
	170

Farklı süre ve sıcaklıklarda ısıl işlem uygulaması yapılmış badem örnekleri Şekil 3.3’te, fındık örnekleri ise Şekil 3.4’te gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Farklı süre ve sıcaklıklarda kavruşan badem örnekleri



Şekil 3.4. Farklı süre ve sıcaklıklarda kavrulan fındık örnekleri

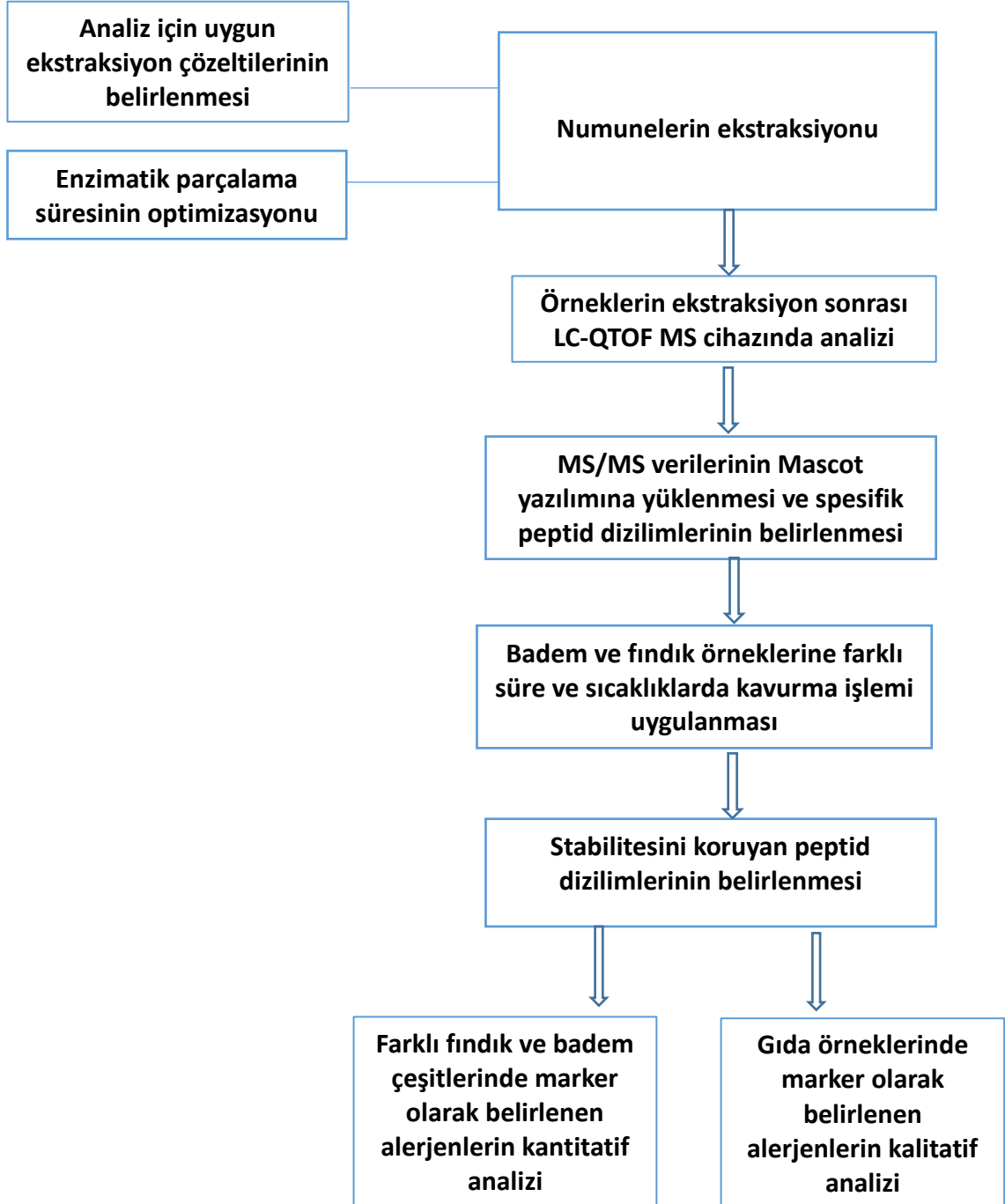
3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Asetonitril (%99,9), metanol (%99,9), amonyum bikarbonat (Bioultra, %99,5), dibazik sodyum fosfat (%99), TRIS (Hidroksimetil) aminometan (%99,9), fosforik asit (Bioultra, %85), sığır serum albümini (analitik saflıkta), ditiotreitol (%98), iyodoasedamid (Bioultra), tripsin enzimi (sığır pankreas) ve Bradford belirteci (0,1-1,4 mg/ml protein) Sigma Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Hidroklorik asit (HCl; %37) ve formik asit (%98-100) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Ultra saf su Milli-Q System (USA) cihazı kullanılarak elde edilmiştir.

INTVNSNTLPVLR (Cor a 9.1; %98,1), VQVVDDNGNTVFDDELRL (Cor a 9.2; %98,0), ALPDEVLQNAFR (Pru du 6.02; %98,4) ve VQVVNENGDPILNDEVRL (Pru du 6.02.01; %98,1) sentetik peptid standartları Biomatik (Delaware, USA, LLC) firmasından alınmıştır.

3.2. Yöntem

Badem ve fındıkta bulunan alerjen peptidlerin belirlenmesi ve farklı çeşitlerdeki marker peptid dizilimlerindeki farklılıkların araştırılması amacıyla uygulanan yöntem Şekil 3.5'te verilmiştir.



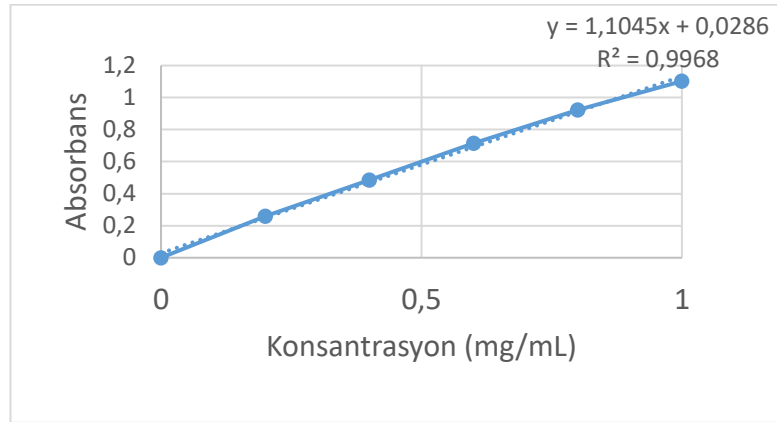
Şekil 3.5. Çalışmada uygulanan yöntem

3.2.1. Protein ekstraksiyonu

Fındık ve badem örneklerinde protein ekstraksiyonu ile ilgili çalışmalarda kullanılmak üzere beş farklı fındık ve badem çeşidi karıştırılıp öğütülerek fındık ve badem numuneleri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu örneklerde ilk olarak LECO FP-528 cihazı kullanılarak AOAC 990.03 (2002) yöntemine göre protein tayini yapılarak örneklerdeki azot miktarı belirlenmiştir. Örneklerde 6,25 çevirme faktörü kullanılarak protein miktarı hesaplanmıştır.

Proteinlerin ekstraksiyonu için en uygun ekstraksiyon çözeltisinin belirlenebilmesi amacıyla ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Literatür taraması sonrası TRIS/HCl, amonyum karbonat, dibazik sodyum fosfat ve 0,01 M HCl tamponları ön denemeler için seçilmiştir. Homojenize edilmiş örnekten 90 mg tartıldıktan sonra üzerine 3 mL ekstraksiyon çözeltisi eklenerek 60 dakika vortekste karıştırılmıştır. 4000 rpm'de 5 dk santrifüj sonrası 0,45 µm'lik PVDF filtrelerden geçirilerek (Millipore Millex-HV, Merck) ekstraktlar hazırlanmıştır.

Badem ve fındık örneklerinden elde edilen ekstraktlardaki protein miktarı ise Bradford yöntemine (Kruger 2009) göre yapılmıştır. Analizlerde 1 mg/mL sığır serum albümini (Merck 112018) farklı konsantrasyonlarda seyreltilerek 595 nm'ye ayarlanmış spektrometrede absorbans değerleri okunmuş ve kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 3.6). Elde edilen standart grafiği kullanılarak örneklerdeki protein derişimi belirlenmiştir.



Şekil 3.6. Bradford kalibrasyon eğrisi

3.2.2. Bekleme süresinin optimizasyonu

Çalışmada proteinlerin peptidler halinde parçalanması için tripsin enzimi ilavesi yapıp 37°C’de etüvde bekletme işlemi gerçekleştirilmiştir. Etüvde en uygun bekleme süresinin belirlenebilmesi amacıyla 2-24 saat aralığında etüvde bekletilen örneklerin LC-QTOF/MS ile analizi gerçekleştirilmiş ve farklı sürelerde bekletilen örneklerdeki peptidlerin pik alanları karşılaştırılmıştır.

3.2.3. LC-QTOF/MS analizleri için örnek hazırlanması

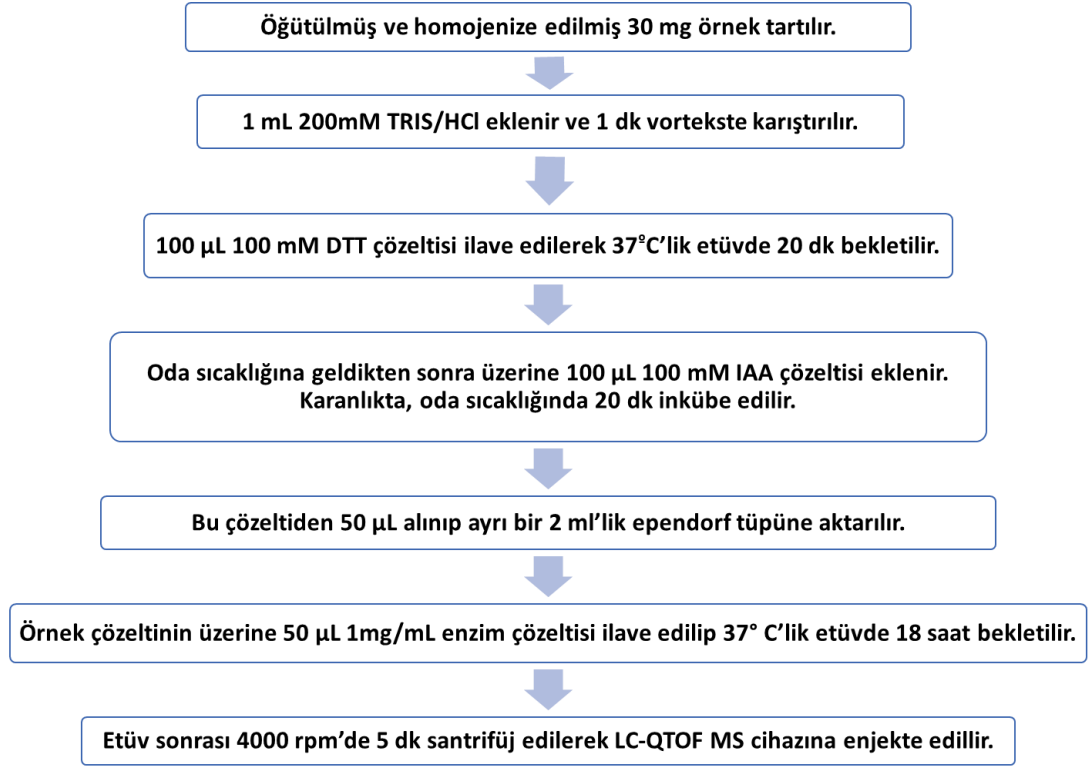
200 mM TRIS/HCl (pH=7,5) çözeltisinin hazırlanması: 0,6058 g TRIS tartılarak ultra saf su ile 100 mL’ye tamamlanmıştır. Çözeltinin pH’sının 7,5 değerine ayarlanması 0,1M HCl ilavesi ve pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilmiştir.

100 mM ditiotreitol (DTT) çözeltisinin hazırlanması: 0,15 g DTT tartılarak ultra saf su ile 100 mL’ye tamamlanmıştır.

100 mM iyodoasedamid (IAA) çözeltisinin hazırlanması: 0,036 g IAA tartılarak ultra saf su ile 100 mL’ye tamamlanmıştır. Analizden hemen önce hazırlanmış ve ışıktan korunmuştur.

1 mg/mL enzim çözeltisinin hazırlanması: 1mg tripsin, 1 mL 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde çözümlenerek enzim çözeltisi hazırlanmıştır.

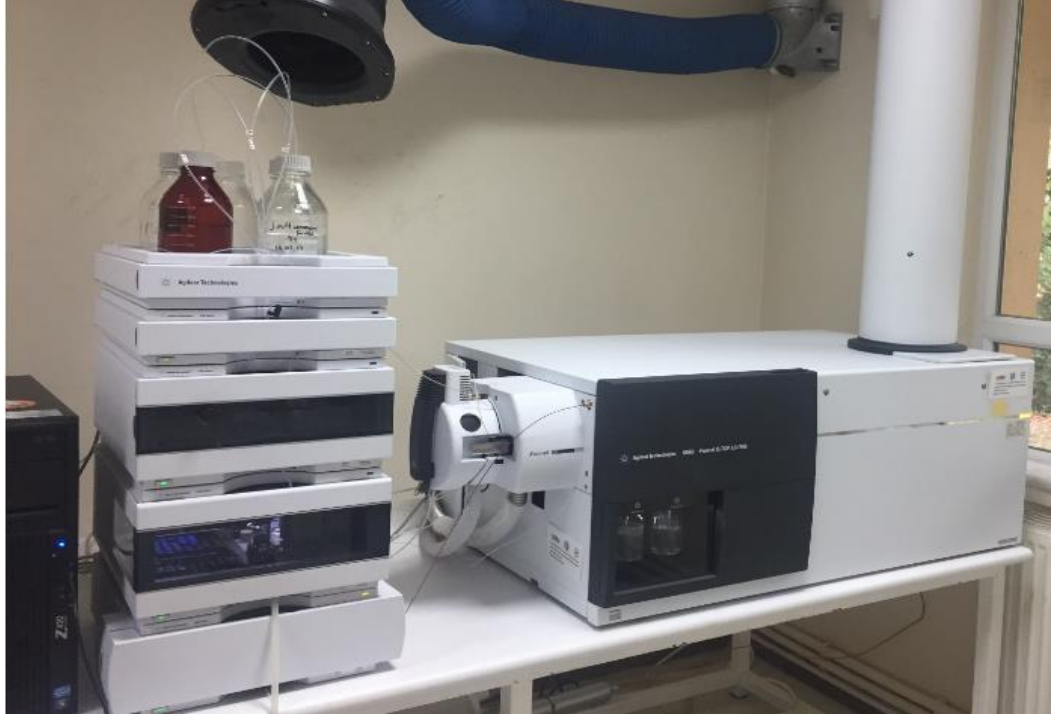
Homojenize edilmiş 30 mg örnek tartıldıktan sonra üzerine TRIS/HCl çözeltisi eklenerek vortekste karıştırılmıştır. Daha sonra disülfid bağlarının kırılmasını kolaylaştırmak amacıyla DTT çözeltisi ilave edilerek 37°C’lik etüvde bekletilmiştir. Etüvden alınan örnek oda sıcaklığına geldikten sonra IAA ile alkilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından 1 mg/mL tripsin enzimi ilave edilip 37°C’lik etüvde 18 saat bekletilerek proteinlerin peptidlere parçalanması sağlanmıştır. Etüvden alınan örnekler 4000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek LC-QTOF/MS cihazında analiz edilmiştir. Örnek hazırlama işlemine ait ayrıntılı akış şeması Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.7. Alerjen peptidlerin LC-QTOF/MS analizi için örnek hazırlama prosedürü

3.2.4. LC-QTOF/MS cihazı ile MS ve MSMS analizleri

MS ve MS/MS analizleri Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Gıda Kimlik Belirleme ve Alerjen Laboratuvarı'nda bulunan sıvı kromatografisi uçuş zamanlı kütle spektrometresi (LC-QTOF/MS Agilent 6550, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8). İlk olarak tarama modunda örneklerin MS toplam iyon kromatogramları, daha sonra da MS/MS modunda kütle spektrumları elde edilmiştir.



Şekil 3.8. LC-QTOF/MS cihazı (Agilent 6550)

Analizlerde 4,6x100mm, 2.7 μ C18 kolon kullanılmıştır. 5 μ L numune cihaza enjekte edilmiş ve akış hızı 0,5 mL/dk olarak belirlenmiştir. Mobil faz olarak ultra saf su (%0,1'lik formik asit ilaveli) ve asetronitril (%0,1'lik formik asit ilaveli) kullanılmıştır. Mobil faz akış programı Çizelge 3.2'de verilmiştir. Kolon fırın sıcaklığı 40°C tutularak, analiz süresi 23 dakika olarak belirlenmiştir. Analizler pozitif iyonlaştırma modu kullanılarak yapılmıştır. 121.0509 ve 922.0098 m/z oranına sahip olan iyonlar analizlerde referans iyon olarak kullanılmıştır. LC-QTOF/MS çalışma koşulları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.2. HPLC hareketli faz akış programı

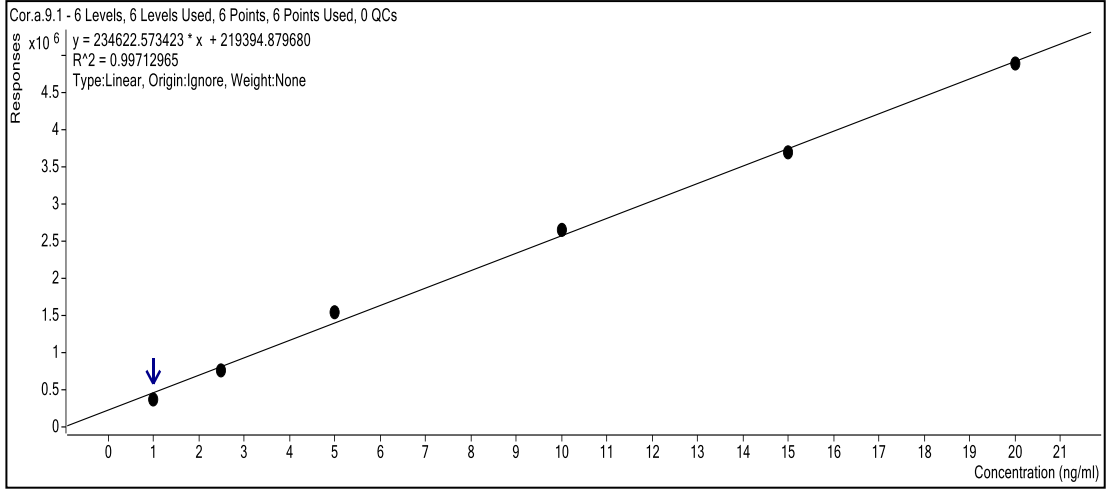
Zaman(dakika)	A (%)	B (%)
0.0	95.0	5.0
2.0	95.0	5.0
20.0	40.0	60.0
22.0	5.0	95.0
23.0	5.0	95.0

Çizelge 3.3. Alerjen analizleri için çalışma koşulları

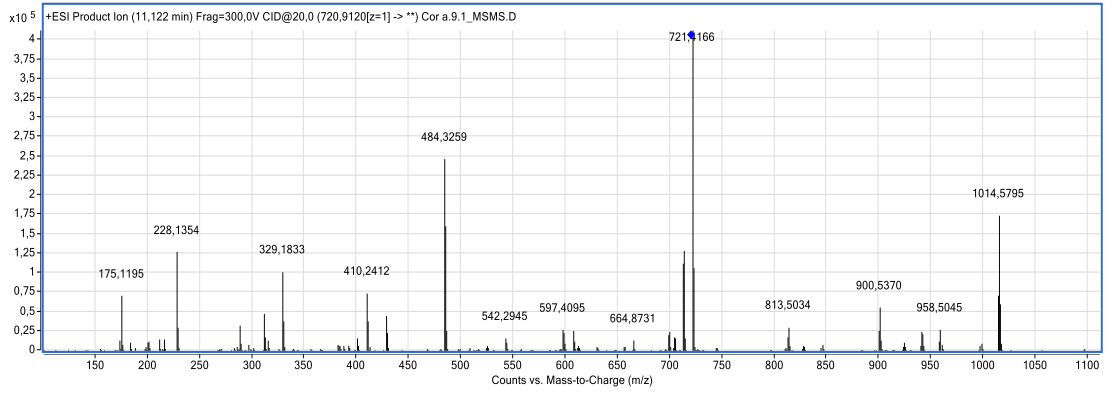
LC-QTOF/MS çalışma şartları	
İyon kaynağı	ESI
Gaz sıcaklığı	200°C
Kurutma gaz akışı	14 L/dk
Nebulizer basıncı	30 psig
Yardımcı gaz sıcaklığı	350°C
Yardımcı gaz akışı	11 L/dk
Fragmentor voltajı	300 V
OCT 1 RF V _{pp}	750 V
Skimmer voltajı	65 V
Nozzle voltajı	300 V
MS Şartları	
Kütle aralığı	100-2500 m/z
Tarama hızı	2000 ms/spektrum
MS/MS Şartları	
Kütle aralığı	100-2500 m/z
Tarama hızı	333 ms/spektrum
İzotop modeli	Peptid

Fındık ve badem çeşitlerinde Cor a 9.1 (INTVNSNTLPVLR), Cor a 9.2 (VQVVDDNGNTVFDDELRL), Pru du 6.02.01 (VQVVNENGDPILNDEVR) ve Pru du 6.02 (ALPDEVLQNAFR) alerjenlerinin kantitatif analizleri için her bir alerjen standardından 0,01 mg hassasiyetle 1 mg tartılmış ve ultra saf su ile 1 mL'ye tamamlanarak 1000 mg/L derişime sahip ana stok standart çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 40'ar mikrolitre alıp 1000 µL'ye tamamlanarak ara stok çözeltisi hazırlanmış ve bu çözelti kullanılarak 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 mg/L konsantrasyonlarında kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır.

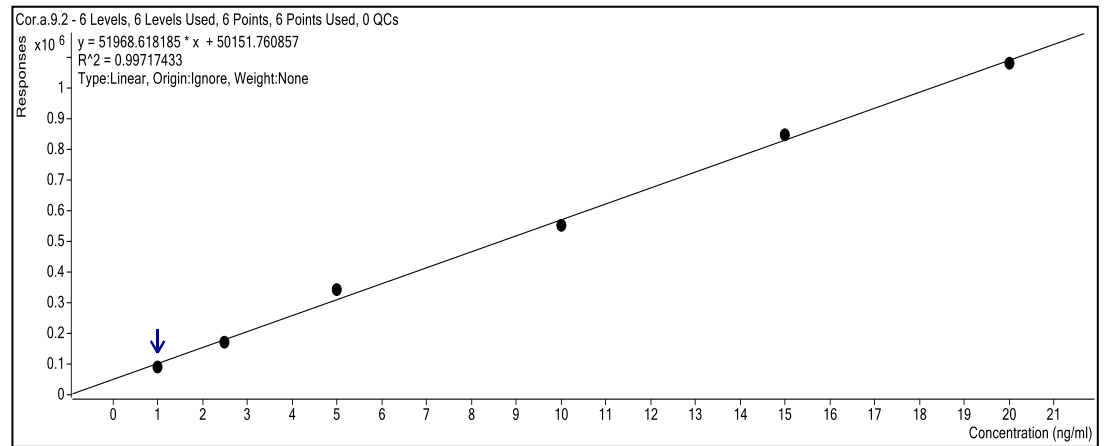
Fındık alerjenlerinin kantitatif analizinden elde edilen Cor a 9.1 peptidine ait kalibrasyon eğrisi ve kütle spektrumu Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da, Cor a 9.2 peptidine ait kalibrasyon eğrisi ve kütle spektrumu ise Şekil 3.11 ve Şekil 3.12'de verilmiştir.



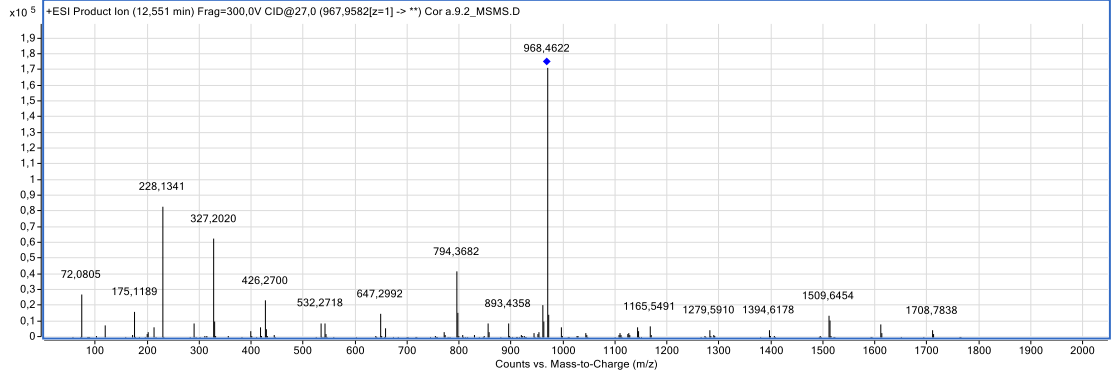
Şekil 3.9. Cor a 9.1 alerjeni kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.10. Cor a 9.1 alerjenine ait MS/MS spektrumu

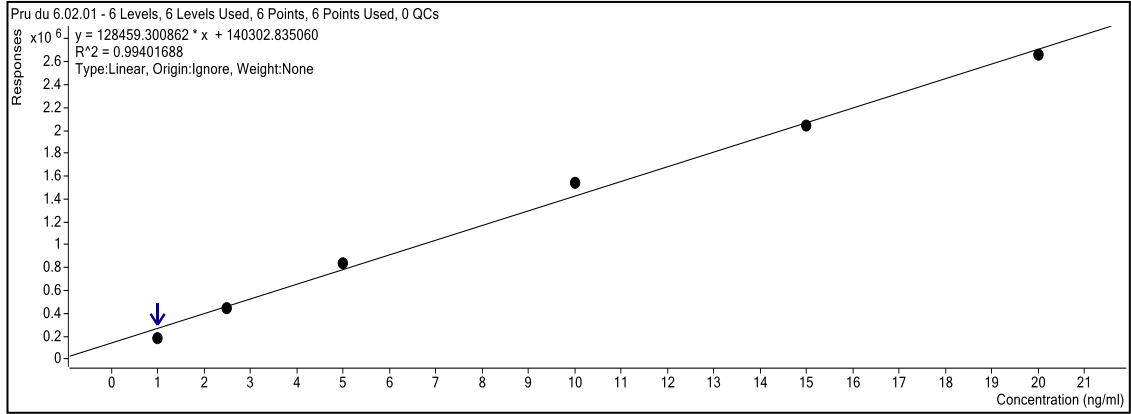


Şekil 3.11. Cor a 9.2 alerjenine ait kalibrasyon eğrisi

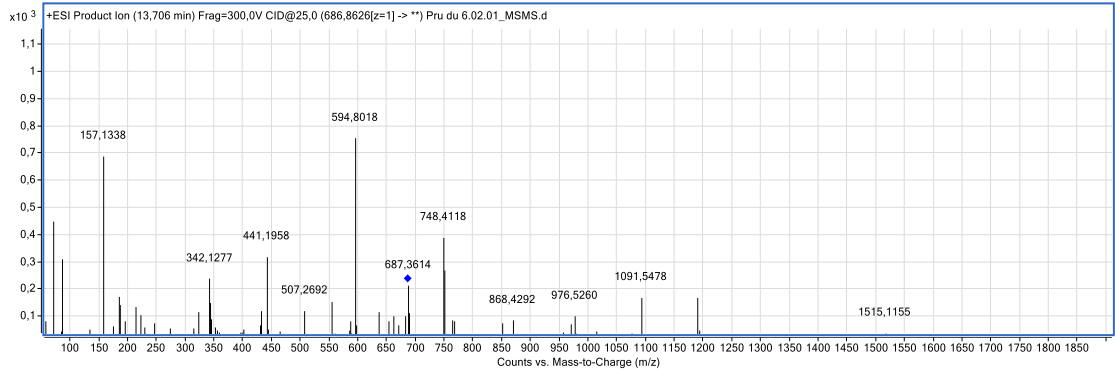


Şekil 3.12. Cor a.9.2 alerjenine ait MS/MS spektrumu

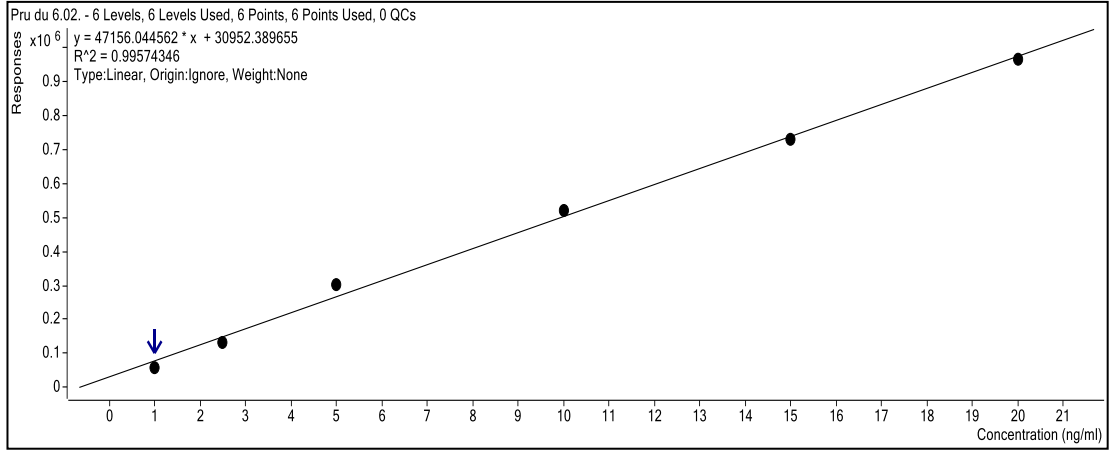
Badem alerjenlerinin kantitatif analizinde kullanılan Pru du 6.02.01 alerjen peptidine ait kalibrasyon eğrisi ve kütle spektrumu Şekil 3.13 ve Şekil 3.14'te, Pru du 6.02 peptidine ait kalibrasyon eğrisi ve kütle spektrumu Şekil 3.15 ve Şekil 3.16'da verilmiştir.



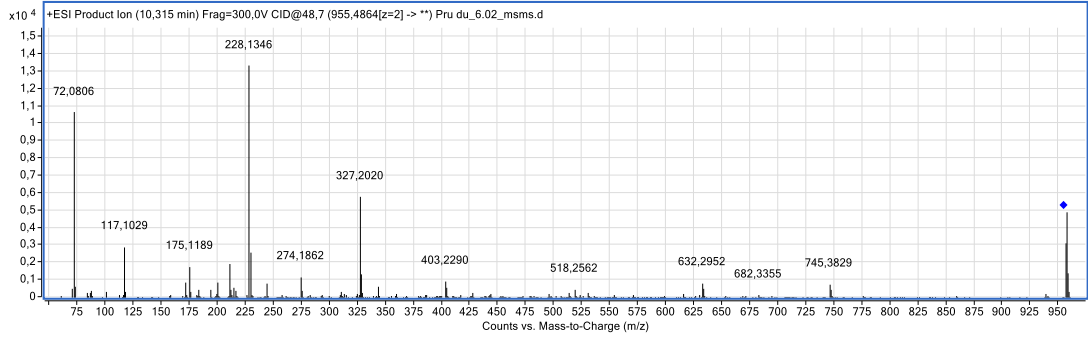
Şekil 3.13. Pru du 6.02.01 alerjenine ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.14. Pru du 6.02.01 alerjenine ait MS/MS spektrumu



Şekil 3.15. Pru du 6.02 alerjenine ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.16. Pru du 6.02 alerjeni MS/MS spektrumu

3.2.5. Alerjen peptid dizilimlerinin belirlenmesi

Fındık ve badem örneklerinde alerjen peptid dizilimlerinin belirlenebilmesi amacıyla örnekler ekstraksiyon ve enzimatik parçalanma sonrası LC-QTOF/MS cihazı ile analiz edilerek MS/MS spektrumları elde edilmiştir. MS/MS spektrumunda yer alan parçalanma ürünlerinin kütlelerine ait bilgilerden peptidin sekansını belirlemek için örneklere ait veriler mgf. formatına çevrilerek Mascot arama motoruna (<http://www.matrixscience.com/cgi/search>) yüklenmiş ve örneklerdeki peptid dizilimlerinin tanımlanması yapılmıştır.

Mascot veri tabanında tanımlama yapılırken uygulanan işlemler aşağıdaki şekildedir;

- Peptid örneklerinde veri tabanlarının birbiri ile tutarlılığını sağlamak ve karşılaştırma kolaylığı elde etmek için enzimatik reaksiyonda kullanılan tripsin sabit modifikasyon olarak seçilmiştir.
- Yazılımda taksonomi bölümü Green plants olarak seçilmiş ve örnekteki m/z değerleri ile eşleşen peptidlerden bitkileri kapsayan familyanın listelenmesi sağlanmıştır. Peptid toleransı ± 1.2 , MS/MS tolerans değeri ± 0.6 Da aralığında seçilmiştir.
- Aminoasit kütüphanesi olarak en sık kullanılan SwissProt (AA) ve NCBIprot (AA) kütüphaneleri seçilmiştir (Şekil 3.17).

The screenshot displays the Mascot MS/MS Ions Search web interface. The page header includes the Matrix Science logo and navigation links such as Home, Mascot database search, Products, Technical support, Training, News, Blog, Newsletter, and Contact. The main content area is titled "MASCOT MS/MS Ions Search" and contains a search form with the following parameters:

- Your name:** nurcan
- Email:** nurcanaysar@yahoo.com
- Search title:** (empty)
- Database(s):** NCBIprot (AA), SwissProt (AA)
- Taxonomy:** Viridiplantae (Green Plants)
- Enzyme:** Trypsin
- Allow up to:** 1 missed cleavages
- Quantitation:** None
- Fixed modifications:** Carboxymethyl (C)
- Variable modifications:** none selected
- Peptide tol. #:** 1.2 Da
- Peptide charge:** 2+, 3+ and 4+
- MS/MS tol. #:** 0.6 Da
- Data file:** Dosya Sec findik_COR ..._150819.mgf
- Data format:** Mascot generic
- Instrument:** Default
- Decoy:** (unchecked)
- Monoisotopic:** (checked)
- Average:** (unchecked)
- Precursor:** (empty) m/z
- Error tolerant:** (unchecked)
- Report top:** AUTO hits

Buttons for "Start Search ..." and "Reset Form" are visible at the bottom of the form. The footer contains copyright information: ©2014 Matrix Science | Links | Site map | Terms of use | Design: Gibson.

Şekil 3.17. Mascot yazılımında tarama için seçilen parametrelerin gösterimi

3.2.6. Kek ve dondurma örneklerinin hazırlanması

Fındık ve badem örneklerinde belirlenen alerjen peptilerin gerçek gıda örneklerinde saptanabilirliğini araştırmak amacıyla, üretiminde fındık ve bademin yaygın olarak kullanıldığı kek ve dondurma tercih edilmiştir. Ayrıca, gıda örneklerinin seçilmesinde örneklerin farklı işlem ve termal proseslere sahip olmasına dikkat edilmiştir.

Kek üretimi için şeker, yumurta, yağ, süt, kabartma tozu, vanilya ve un kullanılmıştır. İlk olarak şeker ve yumurta çırpılmıştır. Daha sonra bu karışıma yağ ve süt eklenip karıştırmıştır. Son olarak un, kabartma tozu, vanilya ve farklı oranlarda (10 ppm, 100 ppm, 1000 ppm, 10000 ppm) fındık ve badem ilave edilerek homojen bir karışım elde edilmiştir. Elde edilen karışım muffin kalıplarına doldurularak 180°C’de 30 dakika pişirilmiştir. Pişirilen örnekler öğütülerek analiz için -20 °C’de saklanmıştır.

Dondurma üretiminde; süt, şeker ve salep karışımı kullanılmıştır. Süt ve şeker karıştırılıp kısık ateşte yaklaşık yarım saat kadar kaynatılmıştır. Daha sonra bu karışıma sahlep ilave edilerek 10 dakika daha kaynatılmaya devam edilmiştir. Hazırlanan dondurma miksi 4°C’ye kadar soğutulup sıcaklığı -18°C’ye ayarlanan dondurucuya boşaltılmıştır. Dondurucu yaklaşık 5 dakika kadar çalıştırılmış ve elde edilen dondurmalar analiz için -20°C’de saklanmıştır. Dondurmalara farklı oranlarda (10 ppm, 100 ppm, 1000 ppm, 10000 ppm) fındık ve badem ilave edilerek minimum tespit sınırının belirlenmesi için analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Metod validasyonu

Kalitatif analiz için validasyon çalışması

Çalışmada fındık ve bademde alerjen proteinlere ait marker peptidlerin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesi için iki ayrı validasyon çalışması yapılmıştır. Gıda örneklerinde badem ve fındık alerjenlerinin varlığının kalitatif tespiti için Çizelge 3.4’te belirtilen validasyon parametreleri ile çalışılmıştır.

Çizelge 3.4. Kalitatif validasyon parametreleri

1 Hassasiyet (SE)	Pozitif olarak elde edilmesi beklenen sonuçlardan pozitif olanların, toplam pozitif olarak elde edilmesi beklenen sonuçlara oranıdır. $SE = N_{11}/N_{1_}$ Rölatif SE (%) = $100 \times N_{11}/N_{1_}$
2 Doğruluk (RA)	İki farklı metot ile elde edilen sonuçların, çalışmaların veya beklenen sonuçlar ile elde edilen sonuçların uyum derecesidir. $RA = (N_{11} + N_{22})/N$ Rölatif RA (%) = $100 \times (N_{11} + N_{22})/N$
3 Yanlış Negatif Oranı (FN)	Pozitif olarak beklenirken negatif olarak elde edilen sonuçların, pozitif olarak elde edilmesi beklenen sonuçlara oranıdır. $FN = N_{12}/N_{1_} = 1 - SE$
4 Özgüllük (SP)	Negatif olarak elde edilmesi beklenen sonuçlardan negatif olarak elde edilenlerin, toplam negatif olarak beklenenlere oranıdır. $SP = N_{22}/N_{2_}$ Rölatif SP = $100 \times N_{22}/N_{2_}$
5 Yanlış Pozitif Oranı (FP)	Negatif olarak elde edilmesi beklenen sonuçlardan pozitif olarak elde edilenlerin, toplam negatif olarak elde edilmesi beklenen sonuçlara oranıdır. $FP = N_{21}/N_{2_} = 1 - SP$
6 Gözlenen ve Beklenen Sonuçların Uyumu	Beklenen sonuçlar ile gözlenen sonuçların istatistiksel olarak %90 güven aralığında ne oranda uyumlu olduğunu belirlemek için Cohen's Kappa Coefficient Test kullanılır.
7 Minimum Tespit Sınırı (LOD)	Metodun hedef analiti doğru ve güvenilir olarak saptayabildiği en küçük seviyedir.

Gözlenen ve beklenen sonuçların uyumunu belirlemek için Cohen's Kappa Coefficient Test yapılırken Kappa değeri %90 güven aralığında aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$Kappa (K) = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e} \quad P_0 = \frac{N_{11} + N_{22}}{N} \quad P_e = \frac{(N_{1_} \times N_{-1}) + (N_{2_} \times N_{-2})}{N^2} \quad (3.1)$$

N_{11} : Gerçekte pozitif olup, analiz sonucunda da pozitif saptanan örnek sayısı

N_{22} : Gerçekte negatif olup, analiz sonucunda da negatif saptanan örnek sayısı

$N_{1_}$: Gerçekte pozitif olan toplam örnek sayısı

$N_{2_}$: Gerçekte negatif olan toplam örnek sayısı

N_{1} : Analiz sonucunda pozitif saptanan toplam örnek sayısı

N_{2} : Analiz sonucunda negatif saptanan toplam örnek sayısı

N : Çalışmada kullanılan toplam örnek sayısı

N_{12} : Çalışma 1 ile negatif, çalışma 2 ile pozitif bulunan numune sayısı

N_{21} : Çalışma 1 ile pozitif, çalışma 2 ile negatif bulunan numune sayısı

Alerjenlerin kalitatif olarak belirlenmesine yönelik validasyon çalışmaları Çizelge 3.5'te verilen plana göre yapılmıştır.

Çizelge 3.5. Elde edilen sonuçlarla beklenen sonuçların karşılaştırılması

		Çalışma1/ Elde Edilen Sonuç		Toplam
		Pozitif (Tespit Edildi)	Negatif (Tespit Edilemedi)	
Çalışma2/ Elde Edilen Sonuç	Pozitif (Tespit Edildi)	N_{11}	N_{12}	$N_{1_}$
	Negatif (Tespit Edilemedi)	N_{21}	N_{22}	$N_{2_}$
Toplam		N_{1}	N_{2}	$N_T=N_{1_}+N_{2_}$

Kantitatif analiz için validasyon çalışması

Farklı badem ve fındık çeşitlerinde marker olarak belirlenen peptid dizilimlerinin miktarsal olarak analizlerinin yapılabilmesi amacıyla kantitatif analizler için validasyon çalışması yapılmıştır. Kantitatif analiz validasyon parametreleri Çizelge 3.6'da verilmiştir. Kantitatif validasyon çalışmalarında Cor a 9.1, Cor a 9.2, Pru du 6.02.0 ve Pru du 6.02 peptidlerine ait sentetik peptid standartları kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. Kalitatif validasyon parametreleri

1	Tespit Limiti (LOD)
2	Ölçüm Limiti (LOQ)
3	Doğrusallık
4	Tekrarlanabilirlik
5	Tekrar Üretilirlik
6	Geri Kazanım
7	Doğruluk

3.2.8. İstatistiksel analizler

Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş ve verilerin istatistiki analizleri SPSS. 21.0 istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır. Analiz öncesi verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kalmogrov-Simirnov ve Shapiro Wilk testleri, varyansların homojenliği varsayımı Levene testi ile test edilmiştir. Önemli bulunan varyasyon kaynaklarına ait ortalamalar LSD ve Duncan Çoklu Karşılaştırma testine tabi tutularak karşılaştırılmıştır (Çimen 2015).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

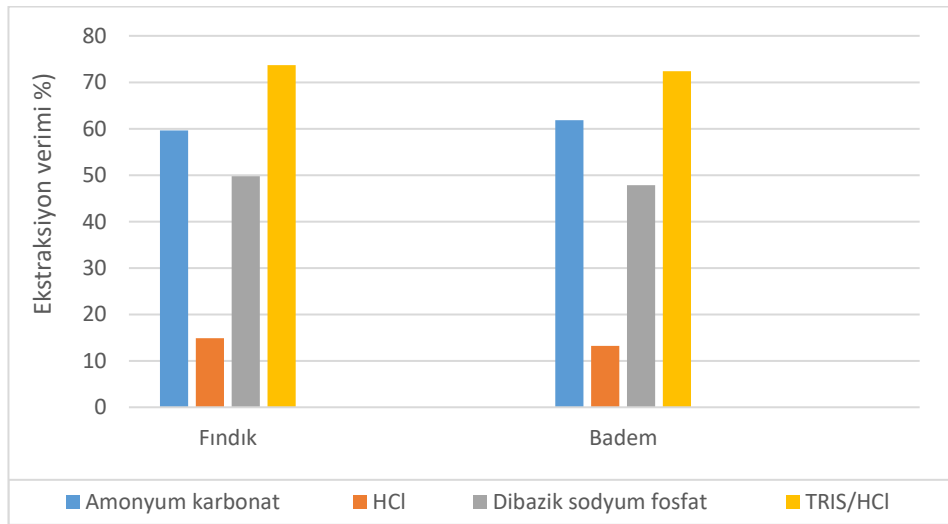
4.1. Protein Ekstraksiyonu

Fındık ve badem örneklerinde ortalama protein değeri $13,62 \pm 0,38$ g/100g ve $20,57 \pm 0,95$ g/100g olarak belirlenmiş ve ekstraksiyon verimliliği hesaplamalarında bu değerler kullanılmıştır. TRIS/HCl, amonyum karbonat, dibazik sodyum fosfat ve 0,01 M HCl tamponları kullanılarak ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonrası protein tayinleri Bradford yöntemine göre yapılmış ve yüzde ekstraksiyon verimlerine ait sonuçlar Çizelge 4.1’de verilerek, Şekil.4.1’de grafiksel olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı ekstraksiyon çözücülerini kullanılarak elde edilen ekstraksiyon verimleri (%)

	50 mM Amonyum karbonat	0,01 M HCl	50 mM Dibazik sodyum fosfat	50 mM TRIS/HCl (pH 7,5)
Fındık	$59,63 \pm 1,54b$	$14,85 \pm 0,95d$	$49,76 \pm 1,57c$	$73,67 \pm 1,67a$
Badem	$61,85 \pm 1,57b$	$13,23 \pm 1,35d$	$47,80 \pm 1,39c$	$72,38 \pm 0,84a$

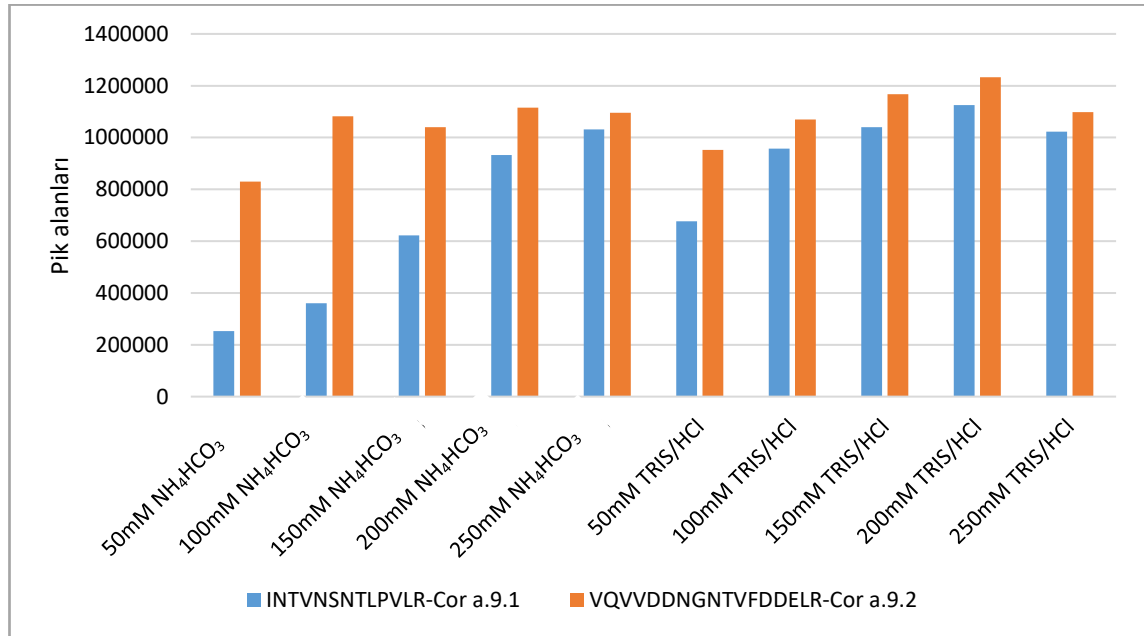
Her ekstraksiyon 3 tekrarlı yapılmış ve veriler ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir. Satırlardaki farklı harfler, ortalamalar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıkları ifade etmektedir ($p \leq 0,05$)



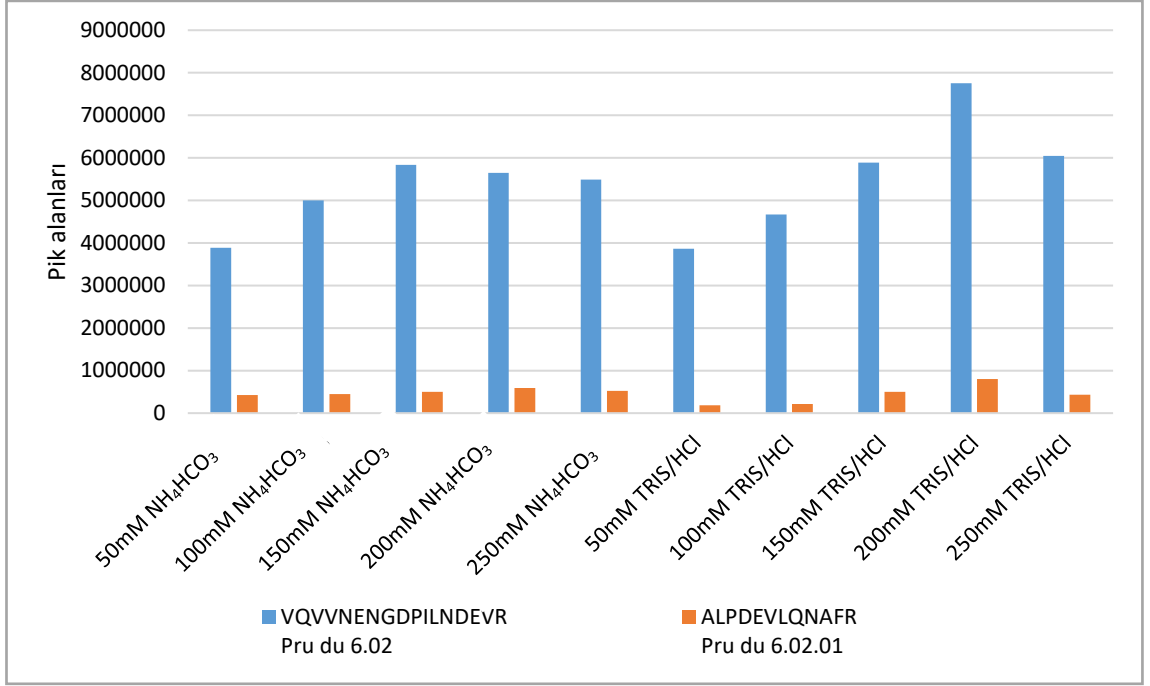
Şekil 4.1. Farklı ekstraksiyon çözücülerinin verimi (%)

Çalışmada badem ve fındık örnekleri için farklı ekstraksiyon çözeltileriyle elde edilen verimler arasında istatistiksel olarak önemli fark olduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$). Fındıkta en yüksek ekstraksiyon verimi 50 mM TRIS/HCl (pH 7,5) tamponu kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon denemelerinde %73,67 olarak tespit edilmiş, en düşük verim ise %14,85 ile 0,01 M HCl tamponu kullanılarak bulunmuştur. Badem örneklerinde de fındığa benzer şekilde en yüksek ekstraksiyon verimi 50 mM TRIS/HCl (pH 7,5) tamponu ile %72,38 olarak bulunmuş, en düşük verim ise 0,01 M HCl tamponu ile %13,23 olarak tespit edilmiştir.

Badem ve fındık örneklerindeki protein ekstraksiyonunda en yüksek verim TRIS/HCl ve amonyum karbonat çözeltileri ile elde edildiğinden 50-250 mM aralığında TRIS-HCl ve amonyum karbonat çözeltileri kullanılarak numuneler hazırlanmış ve LC-QTOF/MS ile analiz edilmiştir. Elde edilen spektrumlarda fındık ve badem için seçilmiş olan peptid dizilimlerinin alanları belirlenmiş ve en yüksek pik alanlarının hem fındık hem de badem örneklerinde 200 mM TRIS/HCl (pH 7,5) çözeltisi kullanılarak elde edildiği saptanmıştır (Şekil 4.2. ve Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Cor a 9.1 ve Cor a 9.2 peptidlerine ait pik alanları



Şekil 4.3. Pru du 6.02 ve Pru du 6.02.01 peptidlerine ait pik alanları

Literatürde, gıdalardaki proteinlerin ekstraksiyon verimliliği ile ilgili olarak çeşitli ekstraksiyon çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiş çalışmalar bulunmaktadır. Sze-Tao ve Sathe (2000) yaptıkları çalışmada amonyum bikarbonat, etanol, TRIS/HCl, NaOH ve NaCl çözeltileri kullanarak elde ettikleri ekstraktlarda en yüksek protein miktarını 0,1 M NaOH çözeltisi kullanarak tespit etmişlerdir. Ayrıca pH 4 olduğunda çözünürlüğün en düşük olduğunu, pH<3 ve pH>6 iken ise çözünürlüğün arttığını belirtmişlerdir.

Poms ve ark. (2004) yer fıstığındaki alerjenlerin tespitinde protein ekstraksiyonu aşamasında farklı ekstraksiyon çözeltilerinin verimliliğini karşılaştırmışlardır. Bu amaçla on yedi farklı ekstraksiyon çözeltisi kullanarak protein ekstraksiyonu gerçekleştirmişler ve Bikinkoninik (BCA) asit yöntemi kullanarak ekstraktlardaki protein miktarını belirlemişlerdir. Araştırma sonuçlarında ekstraksiyon çözeltilerindeki tuz konsantrasyonunun verime önemli bir etkisi bulunmazken, pH değerinin verime etkisinin önemli olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle TRIS/HCl-tuz tamponu (TBS), sodyum borat ya da sodyum karbonat tamponları gibi pH 8-12 aralığında çalışan tampon çözeltileri ile yüksek verim elde ettiklerini ifade etmişlerdir.

Dooper ve ark. (2008) fındık örneklerinde iki farklı ekstraksiyon prosedürünün ekstraktlardaki protein profiline etkisini SDS-PAGE yöntemi ile incelemişlerdir. 0,05 M TRIS (pH 7,5) tamponu ile oda sıcaklığında 5 dakika kuvvetli karıştırma sonrası elde edilen protein bantlarının 0,01 M TRIS - 0,5 M glisin tamponu ile 45°C'de 16 saat hafif karıştırma sonucu elde edilen bantlara göre daha az ve düşük yoğunluğa sahip olduğunu ve protein ekstraksiyonu için oda sıcaklığında ve kısa süreli ekstraksiyon prosedürünün yeterli olduğunu ifade etmişlerdir.

Sealey-Voyksner ve ark. (2016) sert kabuklu meyvelerde alerjenlerin LC-QTOF/MS ile analizi öncesi proteinlerin ekstraksiyonu amacıyla 50 mM TRIS/HCl, 50 mM sodyum fosfat ve 0,01 M HCl tamponlarını kullanmışlardır. LC-QTOF/MS ile elde ettikleri toplam iyon kromatogramlarının yoğunluklarının birbirine oranını 1:0.87:0,12 olarak bulmuşlardır ve 50 mM TRIS/HCl tamponunu çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde ekstraksiyon çözeltisi olarak seçmişlerdir. Yer fıstığı, badem, fındık ve ceviz örneklerinden 50 mM TRIS/HCl tamponu ile elde ettikleri ekstraktlarda elde edilen verimlerini sırasıyla %83, %80, %92 ve %85 olarak tespit etmişlerdir.

Calinoiu ve ark. (2013) fındık proteinlerinin farklı çözeltilerle ekstraksiyonuna yönelik yaptıkları araştırmada, tez çalışmasında elde edilen sonuçlara paralel olarak TRIS/HCl (pH 7,5) çözeltisini kullanarak en yüksek ekstraksiyon verimini elde etmişlerdir.

De Angelis ve ark. (2018a) yer fıstığı ve fındıkta protein ekstraksiyonu için fosfat tamponlu tuz çözeltisi, Tris/HCl, Üre/TBS (50 mM Tris/Cl, 150 mM NaCl) ve amonyum bikarbonat çözeltileri ile ekstraksiyon denemeleri gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada en yüksek ekstraksiyon verimini Üre/TBS tamponu ile kavrulmamış yer fıstığı örneklerindeki %53, fındıkta ise %52 olarak bulmuşlardır.

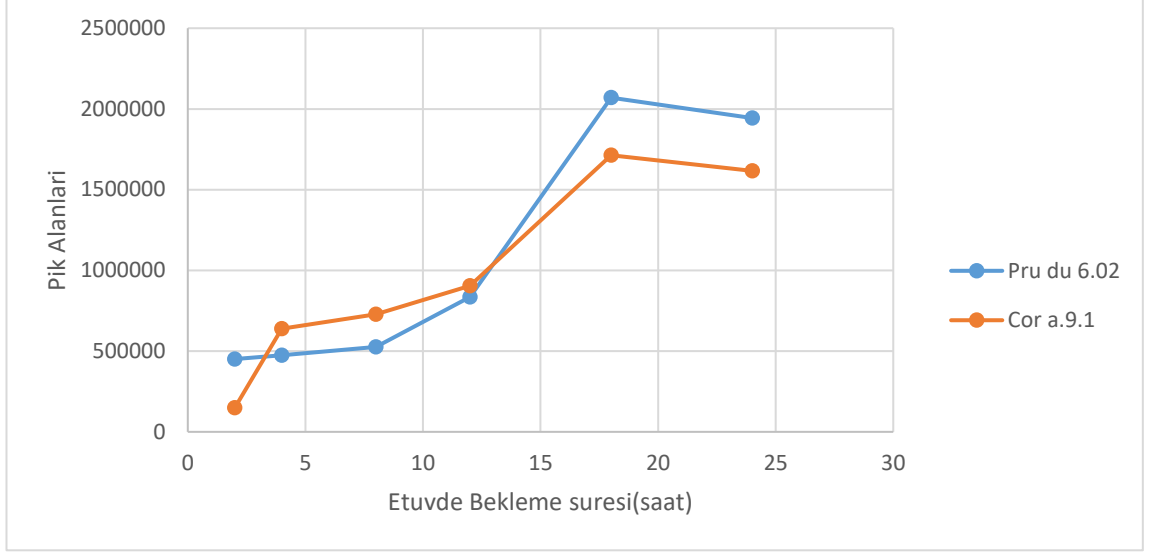
4.2. Bekleme Süresinin Optimizasyonu

Çalışmada proteinlerin peptidlere parçalanması amacıyla tripsin enzimi ilavesi yapıp 37°C’de etüvde bekletme işlemi gerçekleştirilmiştir. Etüvde en uygun bekleme süresinin belirlenebilmesi amacıyla literatür araştırması sonucu fındık ve badem için iki ayrı peptid belirlenmiş ve etüvde farklı sürelerde bekletme sonrası bu peptidlerin pik alanları karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı bekleme sürelerinden sonra elde edilen pik alanları

Marker iyonlar	Etüvde Bekleme Süresi (Saat)					
	2	4	8	12	18	24
VQVVNENGDPILNDEVR (Pru du 6.02)	450808	474350	526254	835477	2069797	1942698
INTVNSNTLPVLR (Cor a 9.1)	149716	639868	727825	904045	1713201	1616165

Peptidlerin pik alanlarına ait veriler incelendiğinde enzimatik parçalanmanın en iyi gerçekleştiği süre 18 saat olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4). 18 saatten sonra peptidlerin pik alanlarında azalma meydana gelmiştir.



Şekil 4.4. Pru du 6.02 ve Cor a 9.1 peptidlerinin farklı sürelerdeki pik alanları

Proteazlar sınıfından sindirim sistemi enzimi tripsin; polipeptid bağlarını lizin ve arjinin amino asitlerinden kesmektedir. Bu sebeple tripsin ile muamele edilmiş olan polipeptidten oluşan parçalar kromatografik yöntemlerle tayin edilebilmektedir.

Bisküvideki, yumurta, süt ve yer fıstığı alerjenlerinin LC-MS/MS ile analizinin yapıldığı bir çalışmada protein/tripsin oranı ve 2-16 saat aralığında farklı parçalanma süreleri incelenmiştir. Tüm alerjen peptidler için optimum parçalanma süresi dört saat olarak belirlenmiştir (Boo ve ark. 2008).

Korte ve Brockmeyer (2016) ekmek ve çikolata gibi farklı gıda matrikslerinde alerjenleri proteomiks tekniği kullanarak belirlemişlerdir. Protein ekstraksiyonu sonrası enzimatik parçalanmanın tamamlanabilmesi amacıyla ekstraktları çalışmamızda kullandığımız süreye benzer şekilde 37°C’de 14 saat inkübe etmişlerdir.

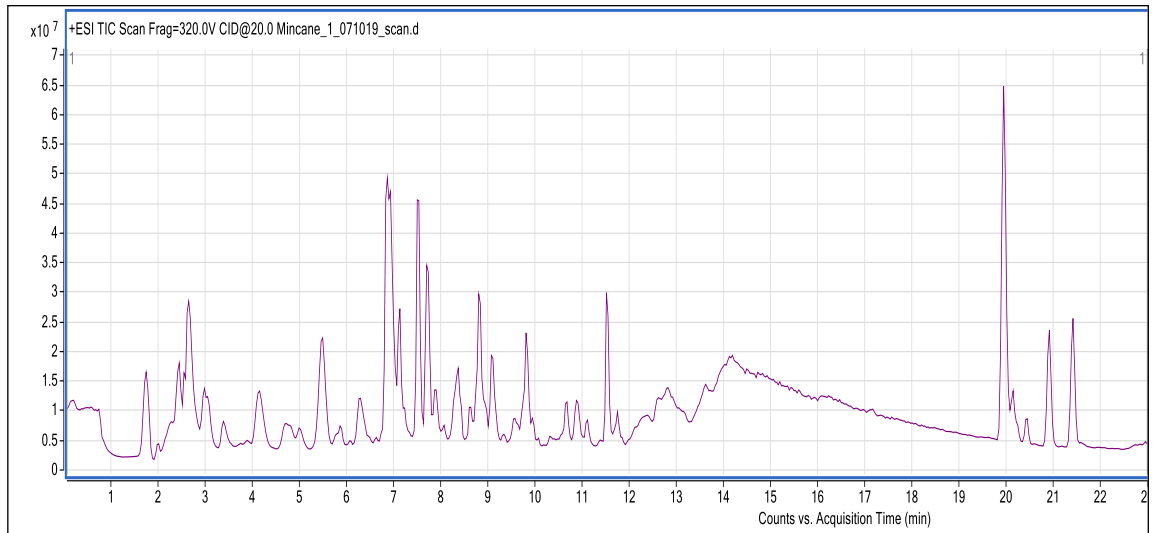
Nitride ve ark (2019) yumurta ve süt alerjenlerinin kütle spektrometresi ile miktarsal olarak belirlenmesinde ekstraksiyon ve enzimatik parçalanma işlemlerinin etkisini araştırdıkları çalışmada; lizozim ve ovalbuminin enzimatik parçalanması işleminde 16 saatten sonra peptid yoğunluğunun arttığını, kazeinin enzimatik parçalanması işleminde ise ilk dört saatte peptid yoğunluğu maksimuma ulaştığını ortaya koymuşlardır.

İşlenmiş gıda ürünlerinde susam alerjenlerinin LC-MS/MS ile tespiti için yapılan çalışmada örneklere 0,5-16 saat arası tripsinle parçalanma işlemi uygulanmış ve marker olarak belirlenmiş olan peptidlerin alanları karşılaştırılmıştır. Yapılan değerlendirmede 4 saatlik parçalanma süresi ile 8 ve 12 saatlik parçalanma süresi sonrası peptidlerin alanları benzer bulunduğundan numune hazırlama işlemleri için dört saat optimum olarak belirlenmiştir (Ma ve ark. 2020).

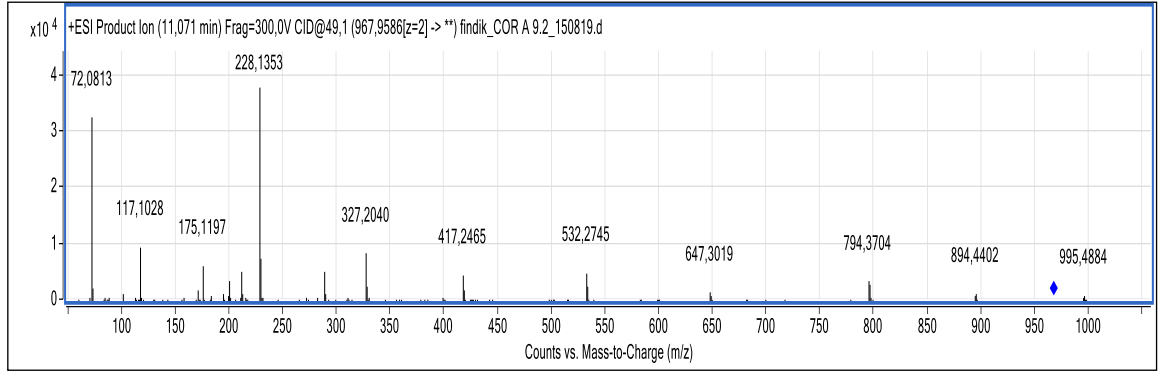
Proteinin yapısına bağlı olmakla birlikte genellikle 4-20 saat arası bir süre proteinlerin enzimatik parçalanması için yeterli olmaktadır ancak en iyi parçalanma süresinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda stabilitesini koruyan peptidlerin seçimi de önemlidir.

4.3. Örneklerdeki Alerjen Peptid Dizilimlerinin Belirlenmesi

Fındık ve badem örneklerinde alerjen peptid dizilimlerinin belirlenebilmesi amacıyla ekstraksiyon ve enzimatik parçalanma sonrası elde edilen numunelerin LC-QTOF/MS (Agilent 6550, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) cihazı kullanılarak MS ve MSMS spektrumları elde edilmiştir. Örnek olarak fındığa ait toplam iyon kromatogramı ve MSMS spektrumu sırasıyla Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

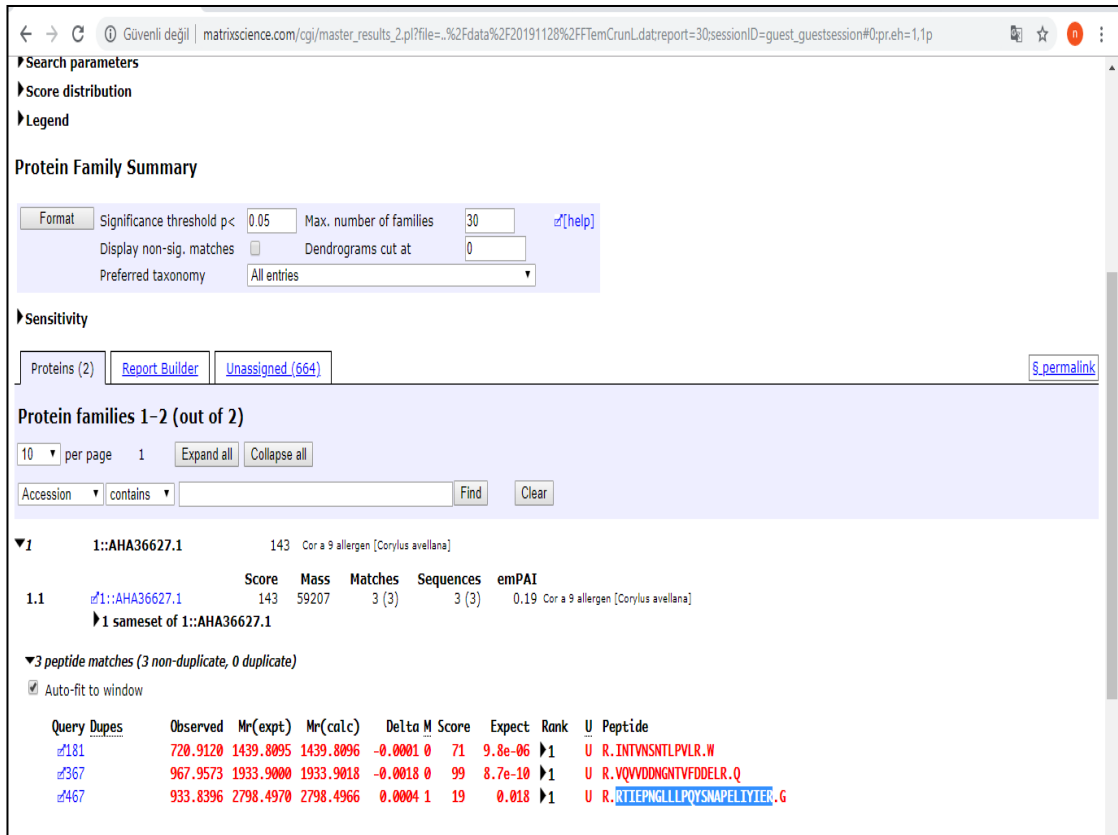


Şekil 4.5. Fındık numunesine ait toplam iyon kromatogramı



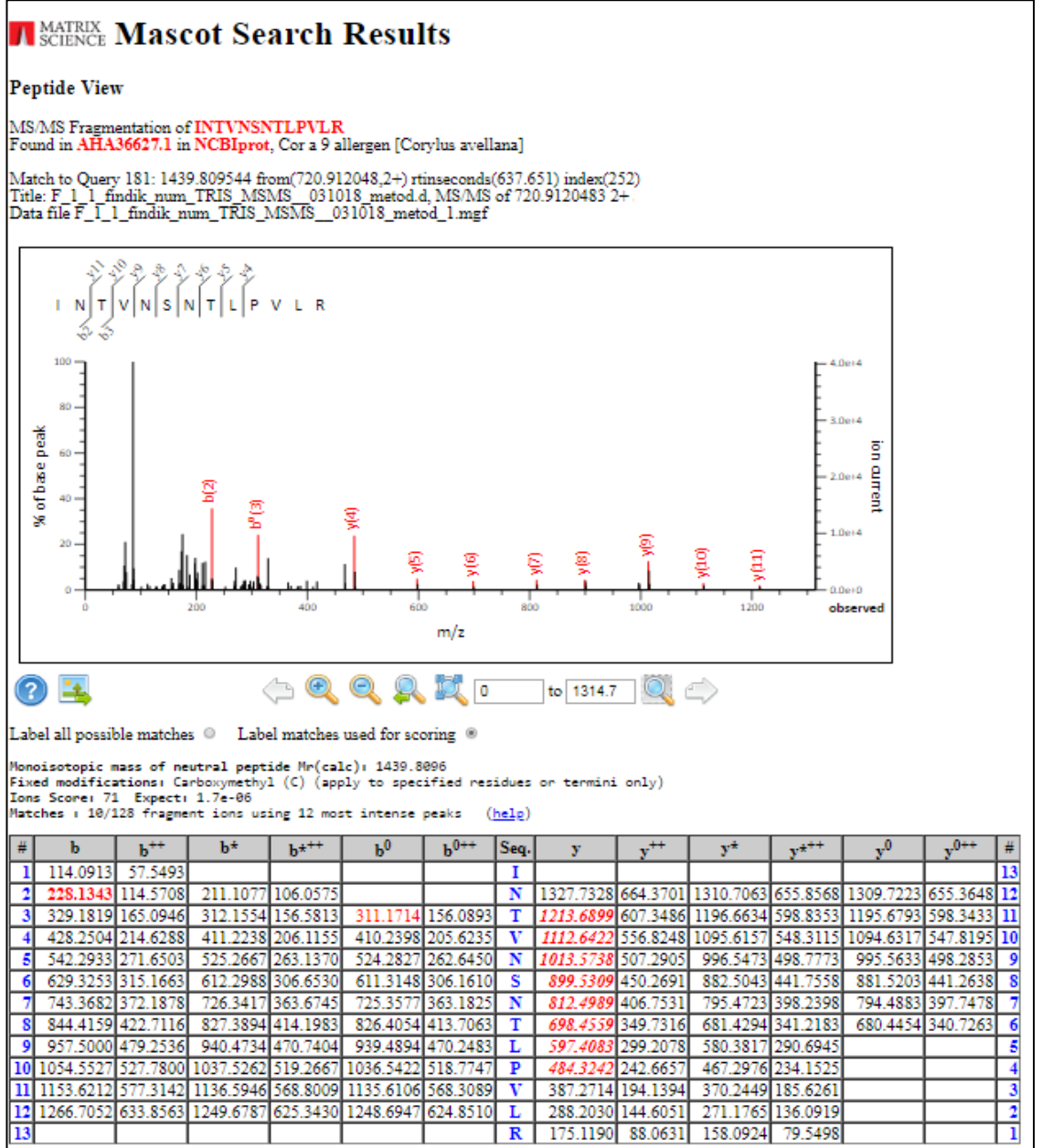
Şekil 4.6. Fındık numunesinden elde edilmiş peptidlerin LC-QTOF/MS ile elde edilen kütle spektrumu

LC-QTOF/MS cihazından elde edilen MS/MS verileri mgf. dosya formatına dönüştürüldükten sonra Mascot yazılımına yüklenmiş ve SwissProt/NCBIprot kütüphaneleri seçilerek proteinlerin tanımlanması yapılmıştır. Mascot yazılımından elde edilen sonuçların örnek gösterimi Şekil 4.7’de verilmiştir.




Şekil 4.7. Fındık numunesinin Mascot yazılımındaki araştırma sonucu

Mascot yazılımındaki araştırma sonuçlarına göre findıktaki Cor a 9 alerjenine ait INTVNSNTLPVLR peptid diziliminde tripsin enzimi ile parçalanma işlemi sırasında yükün amino terminali tarafında kalması ile oluşan b türü iyonlar ile karboksi terminali tarafında kalması ile oluşan y türü iyonlar Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8. INTVNSNTLPVLR alerjenine ait peptid dizilimi

Fındık örneklerinde Mascot yazılımı kullanılarak alerjen peptid dizilimleri belirlendikten sonra peptid dizilimleri <https://www.uniprot.org/peptideseach/> adresinde BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Şekil 4.9).



The screenshot displays the UniProtKB search results for the peptide sequence P201911285C475328CEF75220C360D524E9D456CE00F04BK. The search was performed using BLAST. The results table shows one entry for Corylus avellana (European hazel) with a match to the peptide sequence INTVNSNTLPVLR at position 349.

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism	Length	Peptide search: ...0F04BK
<input checked="" type="checkbox"/>	A0A0A0P7E3	A0A0A0P7E3_CORAV	Cor a 9 allergen	Corylus avellana (European hazel) (Corylus maxima)	514	Match to INTVNSNTLPVLR at 349

Şekil 4.9. Fındık numunesinde belirlenen alerjen peptid dizilimlerinin UNIPROT veritabanında doğrulanması

Fındık ve bademdeki alerjen peptid dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla tüme varımsal proteomiks tekniği kullanılarak yukarıda açıklanan tüm aşamalar her bir örnek için tekrarlanmıştır. Çizelge 4.3'te kavrulmamış fındık ve badem örneklerinde belirlenen peptid dizilimlerinin kütle/yük (m/z) oranları, alıkonma zamanları ve UniProt veritabanındaki tanımlamaları verilmiştir.

Çizelge 4.3. Kavrulmamış fındık ve badem örneklerinde ekstraksiyon sonrası marker olarak belirlenen peptid dizilimlerine ait veriler

Örnek	Peptid Dizilimi	Kütle/yük (m/z)	Alıkonma zamanı	UniProt veritabanı sonuçları
Fındık	INTVNSNTLPVLR	720,9121	11,283	Cor a 9
	ALPDDVLANAFQISR	815,4344	9,567	Cor a 9
	TNDNAQISPLAGR	678,8461	6,946	Cor a 9
	VQVVDDNGNTVFDDEL	967,9582	12,227	Cor a 9
	AFSWEVLEAALK	682,7123	13,716	Cor a 11.0101
	VQVLENFTK	539,3021	4,231	Cor a 11.0101
Badem	ALPDEVLQNAFR	686,8626	13,524	Prunin 2
	TDENGFTNTLAGR	698,3254	9,688	Prunin 2
	TEENAFINTLAGR	718,3596	6,569	Prunin 1
	VQVVNENGDPILNDEVR	955,4829	10,579	Prunin 2
	QEGGQGQQFQGEDQLDR	1024,4575	8,517	Pru du 6
	ISTLNShnLPILR	493,2874	4,752	Prunin 1

Kavrulmamış fındık örneklerinde belirlenen peptid dizilimlerinin ait olduğu Cor a 9 alerjenine ait amino asit dizisi Şekil 4.10'da, Cor a 11.0101 alerjenine ait amino asit dizisi ise Şekil 4.11'de gösterilmiş olup, marker olarak belirlenen dizilimler kırmızı ile işaretlenmiştir.

10	20	30	40	50
MAKLILVSFS	LCLLVLFNGC	LGIDVGLRRQ	QQRHFGECNL	DRLNALEPTN
60	70	80	90	100
RIEAEAGQIE	SWDHNDQQFQ	CAGVAVIRRRT	IEPNGLLLPQ	YRNAPELIYI
110	120	130	140	150
ERGRGITGVL	FPGCPETFED	PQQQSQQGQG	QQQSQRSEQD	RHQKIRYFQE
160	170	180	190	200
GDIIALPAGV	AHWCYNDGDS	PVVAVSLLHT	NNYANQLDEN	PRHFYLAGNP
210	220	230	240	250
DDEHQROGQQ	QFGQRRRQQQ	HSRGKEGEQE	QQGEGNNVFS	GFDAEFLADA
260	270	280	290	300
FNVDVDTARR	LQSNQDKRRN	IVKVEGRLQM	VRPERSRQEW	ERQERQERES
310	320	330	340	350
EQERERQRRQ	GGRGRDVNGF	EETICSLRLM	ENIGSRSRAD	IYTEQVGR IN
360	370	380	390	400
TVNSNTLPVL	RWLQLSAERG	DLQREGLYVP	HWNLNAHSVV	YAIRGRARVQ
410	420	430	440	450
VVDDNGNTVF	DDEL	RQGQVL	TIPQNF	AVAK
460	470	480	490	500
SPLAGRTSAI	RALPDDVLAN	AFQISREEAR	RLKYNRQETT	LARSSRSSE
510				
RMRRRSESEG	RAEA			

Şekil 4.10. Cor a 9 alerjenine ait amino asit dizisi

10	20	30	40	50
MLPKEDPELK	KCKHKCRDER	QFDEQQRDGD	KQICEEKARE	RQOEEGNSSE
60	70	80	90	100
ESYGKEQEEN	PYVFQDEHFE	SRVKTEEGRV	QVLENFTKRS	RLLSGIENFR
110	120	130	140	150
LAILEANPHT	FISPAHFDAE	LVLVFAKGRA	TITMVREEKR	ESFNVEHGDI
160	170	180	190	200
IRIPAGTPVY	MINRDENEKL	FIVKILQPVS	APGHFEAFYG	AGGEDPESFY
210	220	230	240	250
RAFSWEVLEA	ALKVRREQL	KVFGEQSKGS	IVKASREKIR	ALSQHEEGPP
260	270	280	290	300
RIWPFGGESS	GPINLLHKHP	SQSNQFGRLY	EAHPDDHKQL	QDLMLVMSFA
310	320	330	340	350
NITKGS MAGP	YNSRATKIS	VVVEGEGFFE	MACPHLSSSS	GSYQKISARL
360	370	380	390	400
RRGVV FVAPA	GHPVAVIASQ	NNNLQVLCFE	VNAHGNSRFP	LAGKGNIVNE
410	420	430	440	
FERDAKELAF	NLPSREVERI	FKNQDQAFF	PGPNKQOEEG	GRGGRAFE

Şekil 4.11. Cor a 11.0101 alerjenine ait amino asit dizisi

Kavrulmamış badem örneklerinde veri tabanında tanımlanmış olan peptid dizilimlerinin ait olduğu Prunin 2, Prunin 1 ve Prunin 6 alerjenine ait amino asit dizileri sırasıyla Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te verilmiş olup, marker olarak belirlenen peptid dizilimleri kırmızı ile gösterilmiştir.

10	20	30	40	50
CLLLLFNGCL	ASRQHIFGQN	KEWQLNQLEA	REPDNHIQSE	AGVTESWNPS
60	70	80	90	100
DPQFQLAGVA	VVRRTIEPNG	LHLPSYVNAP	QLIYIVRGRG	VLGAVFPGCA
110	120	130	140	150
ETFEDSQPQQ	FQQQQQQQQF	RPSRQEGGQG	QQQFQGEDQQ	DRHQKIRHIR
160	170	180	190	200
EGDIIALPAG	VAYWSYNNGE	QPLVAVSLLD	LNNDQNQLDQ	VPRRFYLAGN
210	220	230	240	250
PQDEFNPQQQ	GRQQQQQQQG	QQGNGNNIFS	GFDTQLLAQA	LNVPNPETARN
260	270	280	290	300
LOGQDDNRNE	IVRVQGQLDF	VSPFSRSAGG	RGDQERQQEE	QQSQREREK
310	320	330	340	350
QREQEQQGGG	GQDNGVEETF	CSARLSQNIG	DPSRADFYNP	QGGRISVVNR
360	370	380	390	400
NHLPILRYLR	LSAEKGVLYN	NAIYTPHWHT	NANALVYAIR	GNAR VQVVNE
410	420	430	440	450
NGDPILDDEV	REGQLFLIPQ	NHAVITQASN	EGFEYISFR	T DENGFTNTLA
460	470	480	490	500
GRTSVLRALP	DEVLQNAFR	SRQEARNLKY	NRQESRLLSA	TSPPRGRILMS
ILGY				

Şekil 4.12. Prunin 2 alerjenine ait amino asit dizisi

10	20	30	40	50
MAKAFVFSLC	LLLVFNGCLA	ARQSQLSPQN	QCQLNQLQAR	EPDNRIQAEA
60	70	80	90	100
GQIETWNFNQ	EDFQCAGVAA	SRITIQRNGL	HLPSYSNAPQ	LIYIVQGRGV
110	120	130	140	150
LGAVFSGCPE	TFEESQQSSQ	QGRQEQEQEQ	RQQQQQGEQG	RQQGQQEQQQ
160	170	180	190	200
ERQGRQQGRQ	QQEEGRQQEQ	QQGQQGRPQQ	QQQFRQFDRH	QKTRRIREGD
210	220	230	240	250
VVAIPAGVAY	WSYNDGDQEL	VAVNLFHVSS	DHNQLDQNP	KFYLAGNPEN
260	270	280	290	300
EFNQQGQSQP	RQQGEQGRPG	QHQQPFGRPR	QQEQQGSNN	VFSGFNTQLL
310	320	330	340	350
AQALNVNEET	ARNLQGQNDN	RNQIIRVRGN	LDFVQPPRGR	QEREHEERQQ
360	370	380	390	400
EQLQQERQQQ	GGQLMANGLE	ETFCSLRLKE	NIGNPERADI	FSPRAGR IST
410	420	430	440	450
LNSHNLPILR	FLRLSAERGF	FYRNGIYSPH	WNVNAHSVVY	VIRGNARVQV
460	470	480	490	500
VNENGDAILD	QEVQQQLFI	VPQNHGVIQQ	AGNQGFEYFA	FK TEENAFIN
510	520	530	540	550
TLAGRTSFLR	ALPDEVLANA	YQISREQARQ	LKYNRQETIA	LSSSQQRRAV

Şekil 4.13. Prunin 1 alerjenine ait amino asit dizisi

10	20	30	40	50
DNHIQSEAGV	TESWNPSPDQ	FQLAGVAVVR	RTIEPNGLHL	PSYVNAPQFI
60	70	80	90	100
YIVRGRGVLG	AVFPGCAETF	EDSQPQQFQQ	QQQQQQQFRP	SR QEGGQGGQ
110	120	130	140	150
QFQGEDQLDR	HQKIRHIREG	DIIALPAGVA	YWSYNNGEQP	LVAVSLLDLS
160	170			
NDQNQLDQVP	RRFYLAGNPQ	DEFNPQQQ		

Şekil 4.14. Pru du 6 alerjenine amino asit dizisi

Careri ve ark. (2007) gıdalardaki yer fıstığı alerjenlerinin belirlenebilmesi amacıyla 50°C’de 20 saat inkübasyon sonrası örnekleri LC-QTOF/MS ile analiz etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada CCNELNEFENNQR ve SPDIYNPQAGSLK peptid dizilimlerini yer fıstığı alerjenleri olan Ara h 2 ve Ara h 3/4 alerjenlerinin tespit edilmesinde marker olarak belirlemişlerdir.

Ansari ve ark. (2012) fındık örneklerinde ekstraksiyon ve tripsin ile enzimatik parçalanma sonrası LC-MS/MS ile marker peptid dizilimleri belirlemişlerdir. ALPDDVLANAFQISR ve INTVNSNTLPVLR dizilimleri her iki çalışmada da ortak bulunan Cor a 9 alerjenine ait peptidlerdir. Çalışmamızda fındıktaki Cor a 11.0101 alerjenine ait VQVLENFTK dizilimi marker olarak belirlenmiş olup, Ansari ve ark. (2012) ise Cor a 11 alerjenine ait AFSWEVLEAALK ve LLSGIENFR peptid dizilimlerini marker olarak belirlemişlerdir. Fındık örneklerinde belirlenmiş olan marker dizilimlerdeki farklılığın çalışmalarda kullanılan fındık örnekleri, ekstraksiyon çözeltileri ve cihazlardaki farklılıktan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Korte ve ark. (2016) tümevarımsal proteomiks tekniği kullanarak badem, kaju, yer fıstığı, fındık ve ceviz alerjenlerinin çikolata, dondurma ve ekmek matrikslerinde belirlenmesi için yaptıkları araştırmanın ilk aşamasında badem için sekiz, fındık için ise altı adet peptid dizilimini validasyon çalışmaları öncesi belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlara paralel olarak fındıkta INTVNSNTLPVLR ve VQVVDDNGNTVFDDELRLR peptid dizilimleri, bademde ise ALPDEVLQNAFR ve TDENGFTNTLAGR peptid dizilimleri araştırmanın ilk aşamasında ortak olarak belirlenen peptid dizilimleridir.

Planque ve ark. (2016) gıda örneklerindeki yer fıstığı alerjenlerini tespit edebilmek için 200 mM TRIS-HCl, pH 9.2, 2 M üre ekstraksiyon çözeltisi kullanarak elde ettikleri protein ekstraktlarını 37°C'de 16 saat inkübe ettikten sonra LC-MSMS ile analiz etmişler ve peptid dizilimlerinin Uniprot veri tabanında tanımlamasını yapmışlardır. Çalışmada yer fıstığı alerjenlerinin tespit edilmesinde kullanılmak üzere NTLEAAFNAEFNEIR, RPFYSNAPQEIFIQQGR, FNLAGNHEQEFLR ve FNLAGNHEQEFLR dizilimlerini marker olarak belirlemişlerdir.

Pilolli ve ark. (2021) çikolata ve et suyu tozu matrikslerine süt, yumurta, yer fıstığı, soya, fındık ve badem alerjenlerini ekleyerek model gıdalar oluşturmuşlar ve LC-MSMS ile analiz ederek herbir alerjen için marker peptid dizilimlerini belirlemeyi hedeflemişlerdir. Gıda örneklerinde alerjenlerin belirlenmesi için marker peptid dizilimlerinin seçiminde stabiliteyi artırmak ve tekrarlanabilir sinyaller elde edilmesini kolaylaştırmak için peptidin 7-20 arasında amino asit içermesi koşulunu göz önünde bulundurmuşlardır. Ayrıca modifikasyona uğrayan peptid dizilimlerini de elimine etmişlerdir. Fındık alerjenlerinin tespiti için marker olarak belirledikleri INTVNSNTLPVLR, ALPDDVLANAFQISR, TNDNAQISPLAGR peptid dizilimleri ve badem alerjenlerinin tespiti için marker olarak belirledikleri ALPDEVLQNAFR, ISTLNSHNLPILR, TEENAFINTLAGR peptid dizilimleri, çalışmamızda belirlediğimiz peptid dizilimleri ile uyumludur.

4.4. Isıl İşlem Sonrası Alerjen Peptid Dizilimlerinin Stabilitesinin Araştırılması

Kavrulmamış badem ve fındık örneklerindeki alerjen peptid dizilimleri belirlendikten sonra, örneklere farklı sıcaklık ve sürelerde kavurma işlemi uygulanarak kavrulmamış örneklerde belirlenmiş olan peptid dizilimlerinin ısıl işlem sonrası stabilitesi araştırılmıştır. Öncelikle farklı süre ve sıcaklıklardaki kavurma işlemi uygulanmış örnek ekstraktlarının protein miktarları belirlenmiş ve numunelerin LC-QTOF/MS cihazında analizleri sonrası MS/MS spektrumları elde edilmiştir. MS/MS verileri Mascot yazılımına yüklenerek ısıl işlem uygulanmış örneklerde bulunan alerjen peptid dizilimlerinin tanımlaması yapılmıştır. Isıl işlem sonrası stabilitesini devam ettiren peptid dizilimleri gıdalarda badem ve fındık alerjenlerinin tespit edilmesinde marker olarak seçilmiştir.

4.4.1. Isıl işlem sonrası protein miktarlarının belirlenmesi

Kavrulmamış ve kavrulmuş fındık ve badem örneklerindeki peptidlerin intensitelerindeki farklılıklara protein çözünürlüğünün etkisinin araştırılabilmesi amacıyla ilk olarak kavrulmuş olan örneklerin Bradford yöntemiyle protein analizleri gerçekleştirilmiştir. Farklı sıcaklık ve sürelerde kavurma işlemi uygulanmış olan farklı fındık ve badem çeşitlerine ait ekstraktlardaki protein değerlerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Fındık ve badem ekstraktlarının protein miktarına ait varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	Badem			Fındık	
	SD	KO	F değeri	KO	F değeri
Çeşit	4	,623	264,267**	1,781	571,657**
Sıcaklık	3	,644	273,168**	,821	263,575**
Süre	2	1,543	654,153**	1,322	424,244**
Sıcaklık * Süre	6	,134	56,862**	,123	39,355**
Çeşit * Sıcaklık * Süre	24	,006	2,376**	,019	6,178**
Hata	40	,002		,003	

** : $p < 0,01$

Varyans tablosu incelendiğinde badem ve fındık örneklerinde çeşit, kavurma sıcaklığı ve sürenin protein miktarına etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,01$). Ayrıca sıcaklık*süre ve sıcaklık*süre*çeşit etkileşimleri de $p < 0,01$ seviyesinde önemli bulunmuştur. Çizelge 4.5'de badem çeşitlerinin protein değerleri ve Çizelge 4.6'da Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Veriler değerlendirildiğinde Ferraduel çeşidine ait kontrol örneğinde en yüksek protein değeri tespit edilmiş, sıcaklık ve süreye bağlı olarak istatistiksel olarak önemli farklılık gözlenmiştir.

Çizelge 4.5. Badem çeşitlerinin protein miktarları (mg protein/ 30 mg örnek)

Kavurma Sıcaklığı (°C)	Süre (dk)	Ferragnes	Ferraduel	Nonpareil	Teksas	Laurenne
Kontrol		5,20±0,27	5,23±0,33	4,80±0,28	4,90±0,20	4,78±0,31
130	15	4,88±0,25	4,96±0,31	4,56±0,24	4,66±0,18	4,54±0,27
	30	4,76±0,22	4,81±0,27	4,46±0,22	4,57±0,17	4,42±0,23
150	15	4,67±0,18	4,68±0,25	4,45±0,18	4,53±0,19	4,36±0,21
	30	4,56±0,18	4,58±0,22	4,33±0,16	4,42±0,18	4,23±0,19
170	15	4,48±0,17	4,57±0,22	4,29±0,14	4,34±0,16	4,17±0,17
	30	4,42±0,15	4,47±0,18	4,19±0,14	4,27±0,14	4,15±0,16

±: standart sapma (n=3)

Çizelge 4.6. Duncan çoklu karşılaştırma testine göre badem çeşitleri, kavurma sıcaklığı ve süresinin protein miktarına etkisi

Çeşit	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
Ferragnes	4,76 b	Kontrol 5,00 a
Ferraduel	4,84 a	130 4,71 b
Nonpareil	4,50 d	150 4,56 c
Teksas	4,58 c	170 4,44 d
Laurenne	4,44 e	
Standart hata	0,011	0,009

Aynı sütundaki farklı harfler sonuçların Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir (p≤0.05).

Çizelge 4.7’de fındık çeşitlerinin protein miktarları ve Çizelge 4.8’de Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Veriler değerlendirildiğinde Çakıldak çeşidine ait kontrol örneğinde en yüksek protein değeri tespit edilmiş ve protein değerlerinde sıcaklık ve süreye bağlı olarak istatistiksel olarak önemli farklılık belirlenmiştir. En düşük değer ise Foşa çeşidine 170°C ve 30 dakika kavurma işlemi uygulandığında tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Fındık çeşitlerinin protein miktarları (mg protein/ 30 mg örnek)

Kavurma Sıcaklığı (°C)	Süre (dk)					
		Tombul	Çakıldak	Foşa	Mincane	Palaz
Kontrol		3,90±0,21	4,34±0,19	3,55±0,22	4,21±0,23	3,99±0,25
130	15	3,85±0,18	4,12±0,18	3,42±0,19	4,18±0,20	3,63±0,19
	30	3,82±0,19	4,04±0,17	3,29±0,20	3,88±0,17	3,48±0,19
150	15	3,80±0,15	3,91±0,19	3,10±0,18	3,71±0,16	3,41±0,17
	30	3,70±0,16	3,82±0,17	2,98±0,17	3,62±0,16	3,25±0,15
170	15	3,68±0,14	3,72±0,15	2,93±0,16	3,53±0,15	3,19±0,13
	30	3,56±0,11	3,53±0,18	2,84±0,14	3,41±0,14	3,08±0,12

±: standart sapma (n=3)

Çizelge 4.8. Duncan çoklu karşılaştırma testine göre fındık çeşitleri, kavurma sıcaklığı ve süresinin protein miktarına etkisi

Çeşit	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
Tombul	3,78 c	Kontrol 4,03 a
Çakıldak	3,95 a	130 3,81 b
Foşa	3,20 e	150 3,60 c
Mincane	3,89 b	170 3,44 d
Palaz	3,52 d	
Standart hata	0,011	0,011
		0,009

Aynı sütundaki farklı harfler sonuçların Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir (p<0.05).

Sealey-Voyksner ve ark. (2016) sert kabuklu meyvelerde gerçekleştirdikleri Bradford testi sonuçlarında kavrulmuş örneklerde protein miktarında bir düşüş olduğunu ve bu düşüşün, çözünürlükte azalma ya da analiz sırasında glikozilasyonun neden olduğu girişimlerden kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Protein miktarlarında 137°C’de kavurma sonrası; cevizde %2, bademde %9 ve fındıkta %6’lık bir düşüş tespit etmişlerdir.

Zaffran (2016) tarafından yapılan çalışmada badem örneklerine farklı sürelerde otoklavda bekletme, mikrodalga uygulaması ve fırında kavurma işlemleri uygulanmıştır. 30 dakika 121°C otoklav uygulaması sonrası ve 140°C'de 30 dakika fırında kavurma sonrası ekstraktların çözünebilir protein değerlerinde kontrol örneğine göre istatistiksel olarak $p \leq 0,05$ seviyesinde önemli bir fark tespit edilmiştir.

Zhang ve ark. (2016) sıcaklık ve yüksek basınç uygulamasının badem proteinlerinin çözünürlüğü ve immünreaktivitesi üzerine etkisini incelemiştir. Bu çalışmada 250°C'nin altındaki sıcaklıklarda badem proteinlerinin stabilitesini koruduğunu ancak 400°C'de kavurma ya da kaynatma gibi işlemlerin protein çözünürlüğünde azalmaya sebep olduğunu belirtmişlerdir.

De Angelis ve ark. (2018a) İtalya'dan temin ettikleri Campana, Romana, Georgia fındık çeşitlerinde ve Virginia, Zambia, China yer fıstığı çeşitlerinde protein profili ve alerjenite açısından farklılıkları araştırmışlardır. Jel elektroforez ile ayrılan protein bantlarının LC-MSMS ile analizi sonrası fındık çeşitlerinde protein profilleri ve alerjenitede farklılık bulunmazken yer fıstığı çeşitleri içerisinde Zambia çeşidinde bazı protein bantlarının ısı işlem sonrası yok olması sebebiyle alerjen özelliğinde azalma olduğunu ifade etmişlerdir.

De Angelis ve ark. (2018b) ısı ve basınç uygulamalarının badem proteinlerinin stabilitesi üzerine etkisini inceledikleri diğer bir araştırmanın sonuçları da bu çalışmada elde edilen verilerle paralellik göstermektedir. Araştırmada 134°C, 2 atm basınçta 10 ve 20 dakikada otoklavda bekletme sonrası Bradford tayini ile elde edilen protein değerlerinde kontrol örneğine göre %30'luk bir azalma tespit etmişlerdir. Bu azalmanın sıcaklık ve basınç etkisi ile proteinde meydana gelen biyokimyasal ve yapısal değişikliklerden kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Proteinlerin basınç ve sıcaklık uygulaması sonrası ikincil ve üçüncül yapısının zarar gördüğünü, ayrıca proteinler ve gıda matriksi arasında meydana gelen etkileşimler sebebiyle de çözünürlüğünün azaldığını belirtmişlerdir.

Isıl işlemin gıdalardaki protein miktarı üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde, çalışma sonuçlarımıza paralel olarak ısı işlemlerin, protein

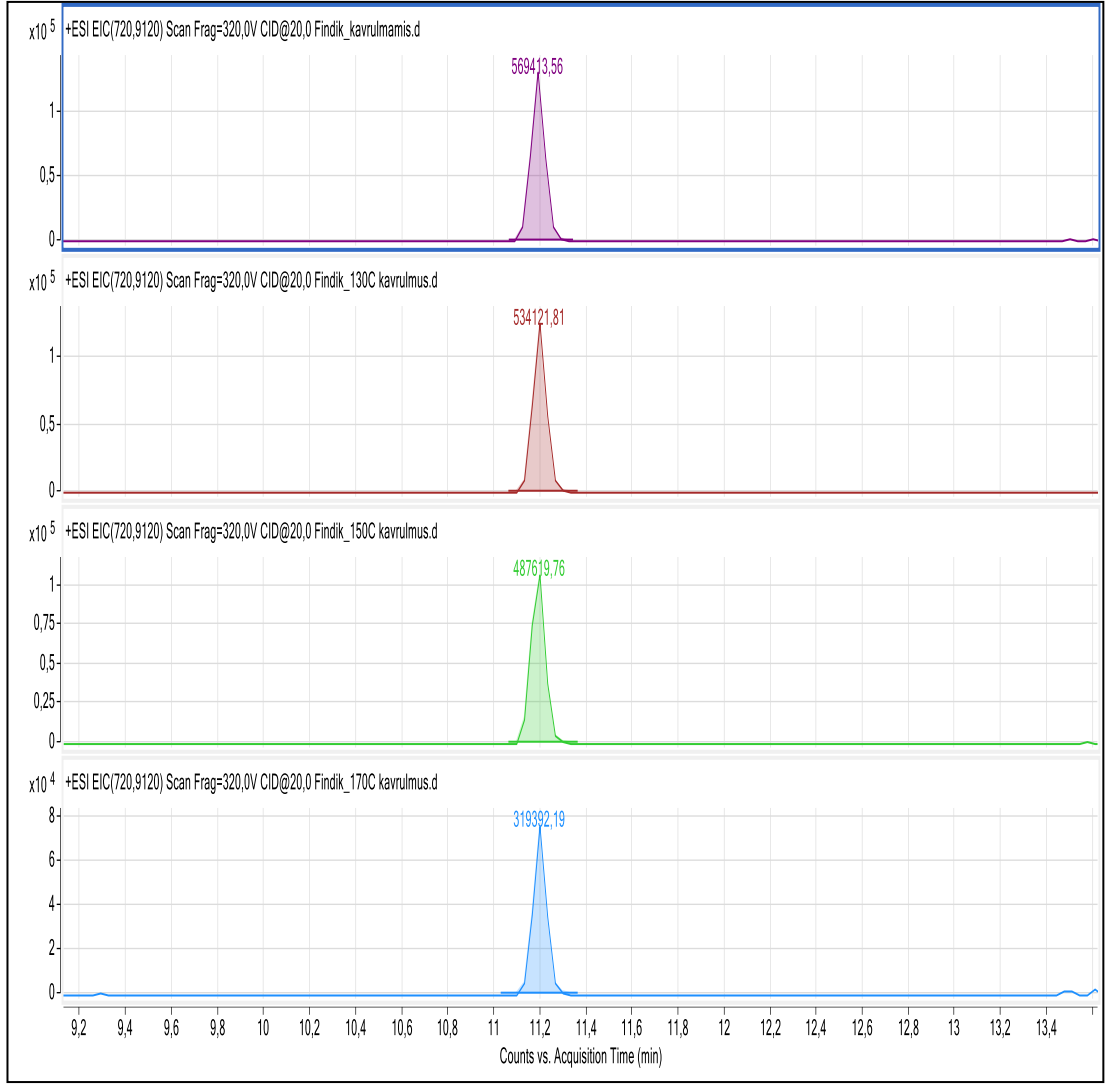
çözünürlüğünü azaltması ve denatürasyona neden olması sebebiyle protein değerinde azalmaya sebebiyet verdiği görülmektedir.

4.4.2. Isıl işlem sonrası örneklerde alerjen peptid dizilimlerinin belirlenmesi

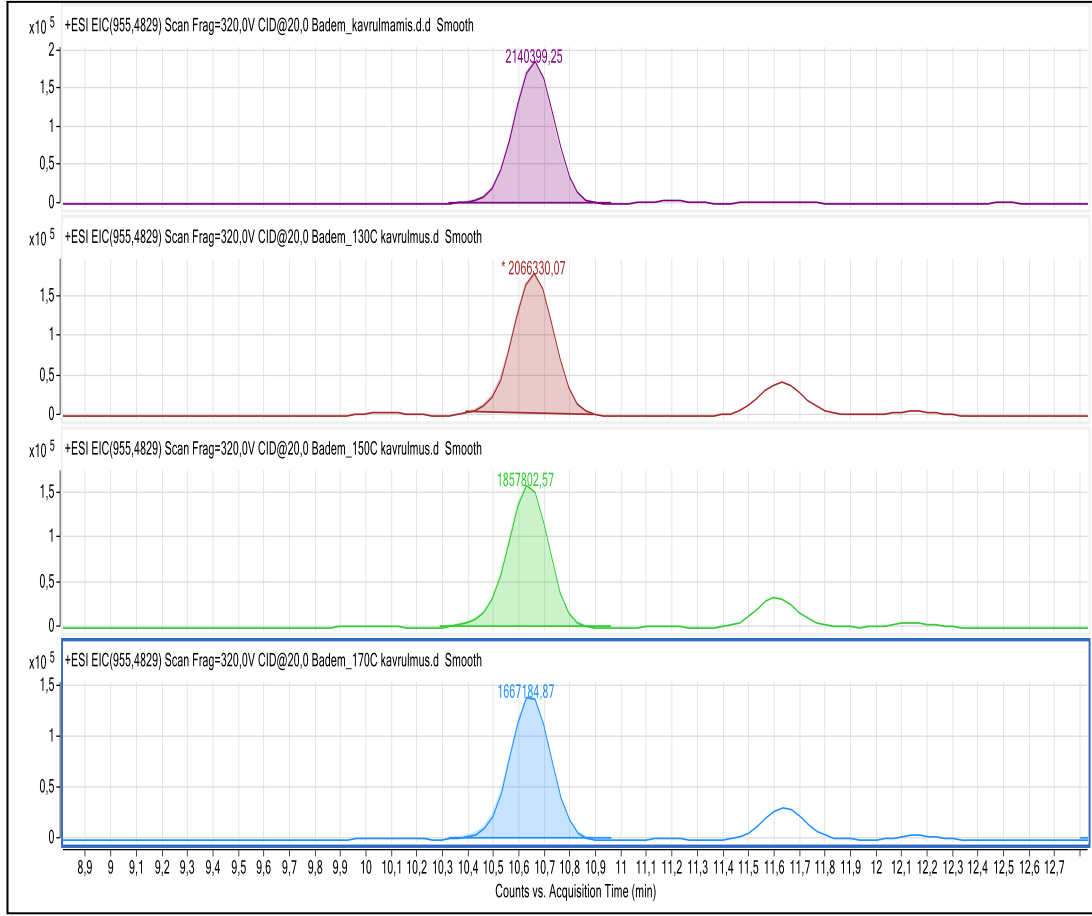
Kavrulmamış örneklerde tespit edilmiş olan alerjen peptid dizilimlerinin kavurma sonrası stabilitesini devam ettirip ettirmediğinin araştırılması amacıyla kavurma işlemi uygulanan badem ve fındık örneklerinin LC-QTOF/MS ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Badem ve fındık örnekleri için kavrulmamış örneklerde tespit edilmiş olan ve kavurma işlemi sonrası stabilitesini devam ettiren peptid dizilimleri gıda örneklerinde alerjenlerin tespit edilebilmesi amacıyla marker dizilim olarak belirlenmiştir.

İlk olarak farklı süre ve sıcaklıklarda kavurma sonrası LC-QTOF/MS ile analiz edilen örneklere ait MS/MS spektrumları Mascot yazılımına yüklenmiş ve SwissProt/NCBIprot kütüphaneleri seçilerek peptidlerin tanımlaması yapılmıştır. Fındık ve badem için marker olan alerjen peptid dizilimlerinin belirlenmesinde SwissProt/NCBIprot kütüphanelerindeki proteinlerle en iyi eşleşen peptid dizilimlerinin seçimine özen gösterilmiştir. Ayrıca amino asit sayısı 6'dan az olan peptid dizilimlerinin özgünlüğü düşük kabul edilerek marker olarak seçilmemiştir. Benzer şekilde amino asit sayısı 20'den daha fazla olan peptid dizilimleri de kütlelerinin büyük olması ve parçalanma iyonlarının tanımlanmasındaki güçlüklerden dolayı elimine edilmiştir.

Badem ve fındık için ikişer adet dizilim marker olarak belirlenmiştir. Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da farklı kavurma sıcaklıklarının fındık alerjeni INTVNSNTLPVLR ve badem alerjeni VQVVNENGDPILNDEVR peptid dizilimlerine ait iyon sinyalleri üzerine etkisi görülmektedir. İyon kromatogramları incelendiğinde pik alanlarının sıcaklıkla birlikte azalsa da 170°C'de hala varlığını devam ettirdiği görülmektedir. Sinyallerde meydana gelen azalmanın kavurma sonrası ekstraktların protein miktarındaki düşüş ve protein yapısında meydana gelen denatürasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir.

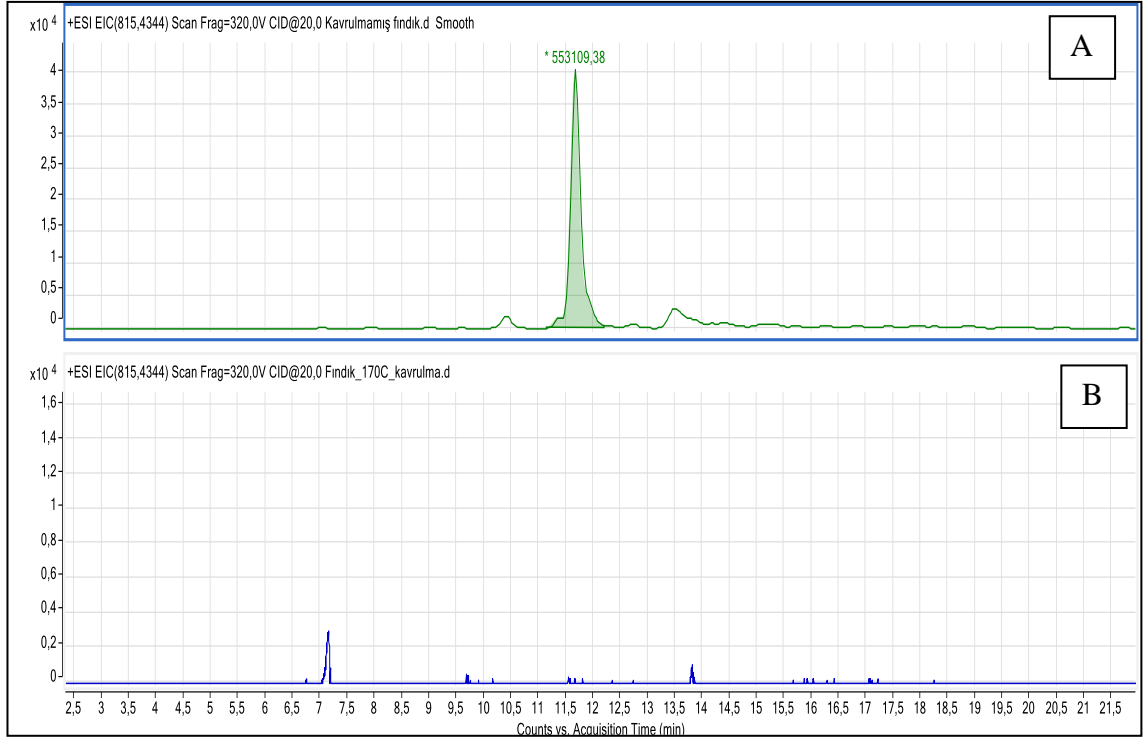


Şekil 4.15. Farklı kavurma sıcaklıklarında INTVNSNTLPVLR peptid dizilimine ait iyon kromatogramı



Şekil 4.16. Farklı kavurma sıcaklıklarında VQVVNENGDPILNDEVR peptid dizilimine ait iyon kromatogramı

Mascot sonuçları incelendiğinde stabilitesini koruyan peptid dizilimlerinin yanı sıra bazı peptid dizilimlerinin, protein yapısında meydana gelen değişikliklerden dolayı ısı işlem sonrası stabiliteyi kaybettikleri gözlemlenmiştir. Bu sebeple ancak ısı işlem sonrası varlığını sürdüren peptid dizilimleri gıda örneklerinin analizinde marker olarak kullanılmıştır. Şekil 4.17’de kavrulmamış fındık örneklerinde tespit edilmiş olan 815,4344 kütle/yük oranına sahip ALPDDVLANAFQISR peptid dizilimine ait iyon kromatogramları gösterilmektedir. Bu peptid diziliminin 170°C ısı işlem sonrası stabilitesini kaybettiği görülmektedir.



Şekil 4.17. ALPDDVLANAFQISR peptid dizilimine ait iyon kromatogramları (A: Kavrulmamış fındık örneğine ait kromatogramı B: 170°C kavurma işlemi sonrası peptidin iyon kromatogramı)

Çalışmada gıda örneklerinde fındık ve badem alerjenlerinin belirlenebilmesi amacıyla ikişer adet peptid dizilimi marker olarak seçilmiş olup, aminoasit dizilerine ait bilgiler Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Isıl işlem, fermantasyon, hidroliz, yüksek basınç uygulamaları gibi farklı gıda işleme prosesleri gıdalardaki proteinlerin alerjik özelliklerinde değişikliklere sebep olabilmektedir. Isıl işlem sonrası proteinlerin denatüre olmasıyla birlikte konformasyonel yapı değişikliğe uğramakta ve IgE reaktif olan epitoplar yok olarak alerjenitesinde azalma meydana gelmektedir. Ancak bazı proteinlerdeki IgE reaktif olan epitoplar ısıya karşı dayanıklı olduğundan ısıl işlem sonrası da alerjen özelliklerini korumaktadır (Paschke 2009). Yapılan çalışmalar her proteinin bu proseslerden etkilenmesinin farklı olduğunu göstermektedir (Mills ve Mackie 2008, Cucu ve ark. 2011, Pescuma ve ark. 2011, Verhoeckx ve ark. 2015).

Çizelge 4.9. Marker olarak belirlenen peptid dizilimlerine ait özellikler

Örnek	Peptid Dizilimi	Gözlenen m/z değeri	Alıkonma zamanı	Parçalanma İyonları
Fındık (<i>Corylus avellana</i> L.)	INTVNSNTLPVLR	720.9121	11,283	484.3248
				329.1833
	VQVVDDNGNTVFDDELRL	967.9582	12,227	228.1349
				228.1342
				327.2020
Badem (<i>Prunus dulcis</i> L.)	ALPDEVLQNAFR	686.8626	13,524	794.3662
				594.8018
	VQVVNENGDPILNDEVR	955.4829	10,579	441.1958
				157.1337
				228.1346
				72.0806
				327.2020

Isıl işlemin proteinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerine olan etkileri ile ilgili belirsizlikler özellikle alerjen proteinlerin tespiti ile ilgili metotların oluşturulmasını da zorlaştırmaktadır. Farklı gıda alerjenlerinin ısıl işlem sonrası stabilitesinin değerlendirilmesi amacıyla çoğunlukla ELISA yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalar mevcut olmakla birlikte kütle spektrometresinin kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır.

Roux ve ark. (2001) 140°C’de 15 dakika kavurma ve 121°C, 15 psi basınçta 60 dakikaya kadar kavurma işleminin ana badem alerjeni olan prunine olan etkisini Western blot ve ELISA yöntemi kullanarak araştırmışlardır. Kavurma sonrası bademdeki amandin miktarında kavrulmamış örneğe göre %24’lük bir azalma meydana gelmiştir. Kavrulmamış örneklerde prunin miktarı 27 mg/100 mg badem olarak tespit edilirken, altmış dakika otoklavda bekletme sonrası prunin miktarı 9,3 mg/100 mg badem olarak bulunmuştur. Araştırma sonunda prunin alerjeninin farklı ısıl işlemler sonrası da

stabilitesini devam ettirdiğini ve alerjenlerin tespitinde marker olarak kullanılabilceğini ifade etmişlerdir.

Venkatachalam ve ark. (2002) kavurma, haşlama, otoklav ve mikrodalga uygulamaları sonrası Nonpareil badem çeşidindeki alerjen proteinlerin stabilitesini ELISA ve Western blot yöntemleri ile incelemişler ve uygulanan ısı işlemlere rağmen ana badem alerjisi olan pruninin stabilitesini devam ettirdiğini ve işlenmiş gıdalarda badem alerjenlerinin tespit edilmesinde marker olarak kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

Hansen ve ark. (2003) 17 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, çiğ fındık tüketimi sonrası tüm hastaların Cor a 1, Cor a 2 ve Cor a 8'e bağlı olarak alerjik reaksiyon gösterdiği, kavrulmuş fındık tüketiminde ise hastaların yalnızca %29'unun alerjik reaksiyon gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Iwan ve ark. (2011) Maillard reaksiyonlarının Cor a 11 fındık alerjisi üzerine etkisini araştırmışlar ve 37°C'de ısı işleminin spesifik IgE bağlama kapasitesine bir etkisinin olmadığını ancak 145°C 60 dakika uygulamasının IgE bağlama kapasitesinde düşüşe neden olduğunu bildirmişlerdir.

Lopez ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada, fındıkta 138°C'de 15-30 dakika otoklav uygulamasının alerjen-spesifik IgE düzeylerinde azalmaya sebep olduğunu belirtilmiş ve bu azalmanın proteinin çözünürlüğündeki azalmayla ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Parker ve ark. (2015) tahıl barları ve keklerde yumurta, süt ve yer fıstığı alerjenlerinin ELISA ve LC-MS/MS ile analizi ve ısı işleminin etkisinin araştırılması amacıyla yaptıkları çalışmada marker peptidlerin belirlenmesi için pişirme öncesi ve pişirme sonrası analizler gerçekleştirmişlerdir. Pişirme öncesi ve sonrası lizozim, ovalbümin, kazein, laktoglobulin, Ara h 1, Ara h 2 ve Ara h 3 alerjenlerine ait peptidlerin pik alanlarını karşılaştırmışlar ve her biri için pik alanları benzer olarak bulunan birer peptid dizilimini marker olarak belirlemişlerdir. Yumurta ve süt alerjenlerine ait peptidlerin pik alanlarında pişirme sonrası belirgin bir düşüş tespit etmişler ancak yer fıstığı alerjenleri olan Ara h 1, Ara h 2

ve Ara h 3'e ait peptid dizilimlerinin pik alanlarında önemli bir farklılık tespit etmemişlerdir.

Sealey-Voyksner ve ark. (2016) sert kabuklu meyvelerde ısı işlem sonrası alerjen peptid dizilimlerinin stabilitesini araştırmışlar ve çalışma bulgularımıza paralel olarak peptid dizilimlerinin sinyallerinde azalma tespit etmişlerdir. Sinyallerdeki azalmanın glikozilasyona bağlı olarak protein yapısında meydana gelen değişiklikten ötürü olabileceğini belirtmişlerdir. Lipit transfer proteinleri ya da tohum depo proteinlerine ait olan peptidlerin ısı işlemlere karşı daha stabil olduğunu belirtmişlerdir.

Korte ve ark. (2019) LC-MSMS ile gıda alerjenlerinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada ekmek ve bisküvi matrikslerine fındık, badem, ceviz ve yer fıstığı ekleyerek 15 ve 45 dakika pişirme işlemi uygulamışlardır. LC-MS/MS ile analiz sonrası 15 dakika pişirme işlemi uygulanan bisküvilerde marker olarak belirledikleri alerjen peptidlerin yoğunluğunda %40-80 arası bir düşüş görülürken, 45 dakika pişirme işlemi uygulanan örneklerdeki marker peptidlerin yoğunluğunda ise %17-65 arası bir düşüş tespit edilmiştir. Isıl işlem sonrası peptidlerin yoğunluğunun gıda matriksine, alerjen proteinlerin yapısına ve ısı işlem süresine bağlı olarak değişebileceğini ortaya koymuşlardır.

LC-MS/MS ile fındık alerjenlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan diğer bir araştırmada kavurma ve karamelizasyon işlemlerinin alerjen peptid dizilimleri üzerine etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmada Cor a 11 alerjenine ait olan AFSWEVLEAALK peptid dizilimi 180°C 18 dakika kavurma ve karamelizasyon işlemi sonrası stabilitesini kaybederken ALSQHEEGPPR peptid diziliminin stabilitesini koruduğu ifade edilmektedir. Çalışmada gıdalardaki fındık alerjenlerinin belirlenebilmesi amacıyla kavurma ve karamelizasyon işlemleri sonrası varlığını devam ettiren Cor a 8, Cor a 9 ve Cor a 11 alerjenlerine ait sekiz adet peptid dizilimi marker olarak belirlenmiştir (Van Vlierberghe ve ark. 2020).

Lamberti ve ark. (2021) kuru hava ve infrared teknolojilerinin kullanıldığı iki farklı fırında fındıklara 140°C ve 170°C sıcaklıklarda ısıl işlem uygulamışlardır. Her iki ısıl işlem uygulamasında da sıcaklığın artmasıyla birlikte protein çözünürlüğünde azalma tespit etmişlerdir. Ayrıca fındıktaki Cor a 9, Cor a 11 ve Cor a 14 alerjenlerinin IgE reaktivitesinin 140°C sıcaklığa kadar stabilitesini koruduğunu, 170°C sıcaklık uygulamasında ise kuru hava ile ısıtılarak gerçekleştirilen kavurma işlemi sonrası alerjen proteinlerin IgE reaktivitesinin azaldığını, infrared uygulaması yapılan örneklerde ise IgE reaktivitesinin tamamen kaybolduğunu belirtmişlerdir.

4.5. Marker Olarak Belirlenen Peptid Dizilimlerinin Validasyonu

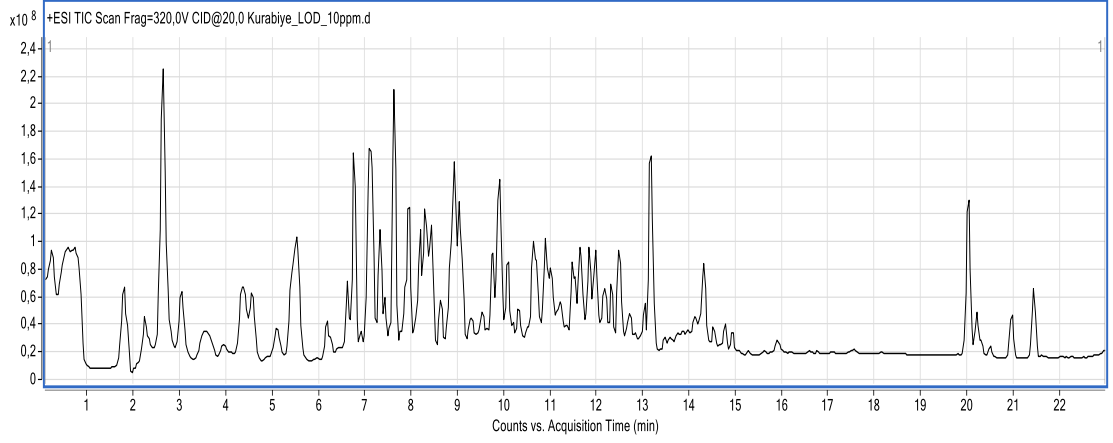
4.5.1. Kalitatif analiz için validasyon çalışması

Gıdalardaki badem ve fındık alerjenlerinin kalitatif analizlerinin validasyon çalışmaları için kek ve dondurma örnekleri hazırlanarak validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş olup elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10'da verilmiştir. Validasyon parametrelerinin değerlendirilmesi Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi'ne göre yapılmıştır (Anonim, 2018).

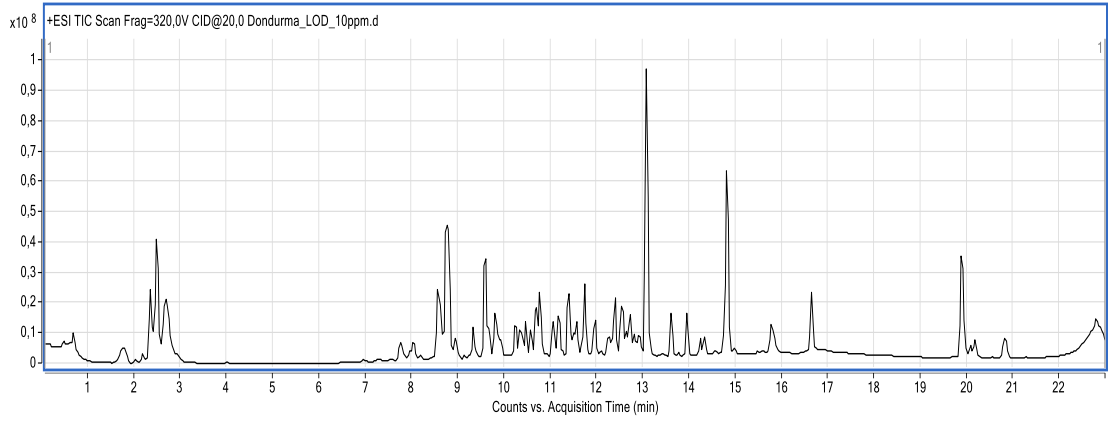
Minimum tespit sınırı (LOD) çalışması için içerisine 10 ppm, 100 ppm, 1000 ppm ve 10000 ppm oranında fındık ve badem ilave edilerek kek ve dondurma numuneleri hazırlanmış ve metodun tespit edebildiği en düşük seviye belirlenmiştir. Kek numunesine ait kromatogram Şekil 4.18'de, dondurma numunesine ait kromatogram ise Şekil 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Kalitatif validasyon çalışması sonuçları

Validasyon		
Parametresi	Hesaplanan Değer	Değerlendirme
-Hassasiyet (SE) -Rölatif Hassasiyet (%SE)	$SE = 20/20=1$ Rölatif SE (%) = $100 \times 1=100$	Rölatif hassasiyet %90'dan daha yüksek olarak bulunduğu kabul edilebilir olarak değerlendirilmiştir.
Doğruluk (RA) Rölatif Doğruluk (%RA)	$RA = (20+20)/40=1$ Rölatif RA(%)= $100 \times (20+ 20)/40 =100 \times 1=100$	Rölatif doğruluk %90'dan daha yüksek olduğundan kabul edilebilir olarak değerlendirilmiştir.
Yanlış Negatif Oranı (FN)	$FN=1-SE=0$	Yanlış negatif oranı %10'u aşmadığından metot kabul edilebilir olarak değerlendirilmiştir.
Özgüllük (SP) Rölatif Özgüllük (%SP)	$SP = 20/20=1$ Rölatif SP = $100 \times 1=100$	Özgüllük %90'dan daha yüksek olduğundan kabul edilebilir olarak değerlendirilmiştir.
Yanlış Pozitif Oranı (FP)	$FP = 1 - 1=0$	Yanlış pozitif oranı %10'u aşmadığından metot kabul edilebilir olarak değerlendirilmiştir.
Gözlenen ve Beklenen Sonuçların Uyumu	$P_0=(N_{11}+N_{22})/N= (20+20)/40=1$ $P_e= [(20*20)+(20*20)]/40^2= (400+400)/1600=0,5$ Kappa (K)= $(1-0,5)/(1-0,5)=$	$K \geq 0.80 \rightarrow$ Çok iyi uyum

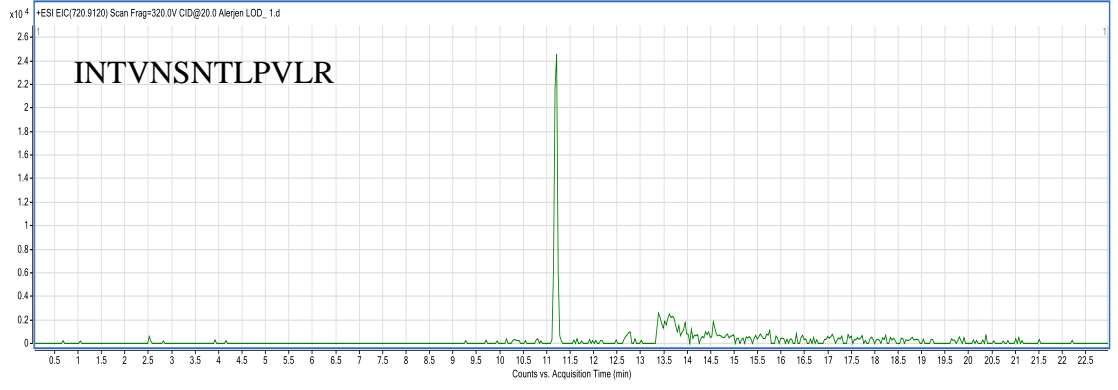


Şekil 4.18. Kek matrisine ait toplam iyon kromatogramı (LOD: 10 ppm)

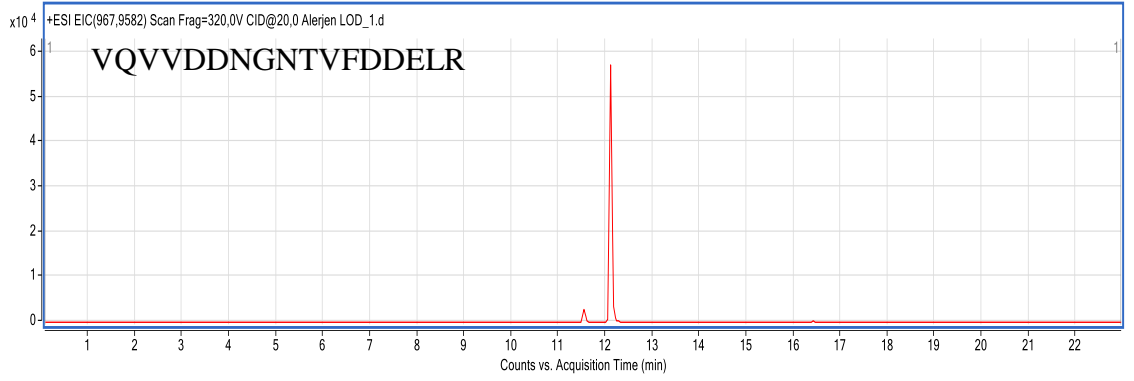


Şekil 4.19. Dondurma matrisine ait toplam iyon kromatogramı (LOD: 10 ppm)

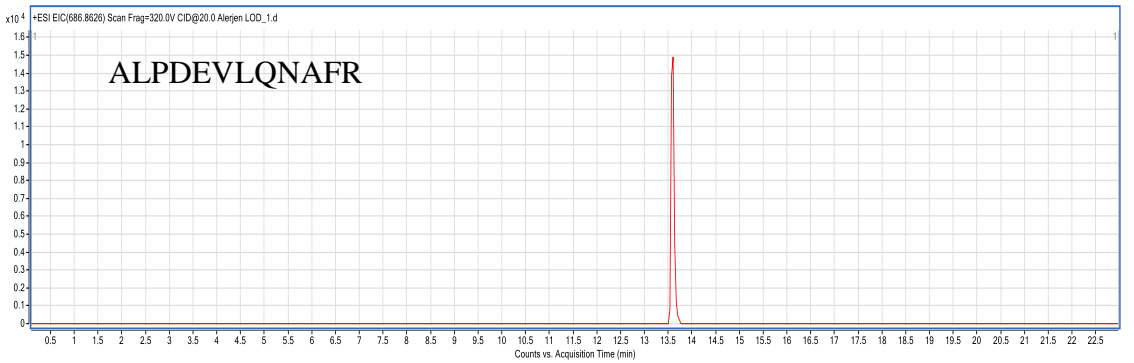
Yapılan çalışmada kek ve dondurma örneklerinde minimum tespit sınırı 10 ppm olarak belirlenmiştir. Şekil 4.20 ile Şekil 4.23 arasında marker olarak belirlenen peptid dizilimlerine ait LOD seviyesindeki iyon kromatogramları gösterilmektedir.



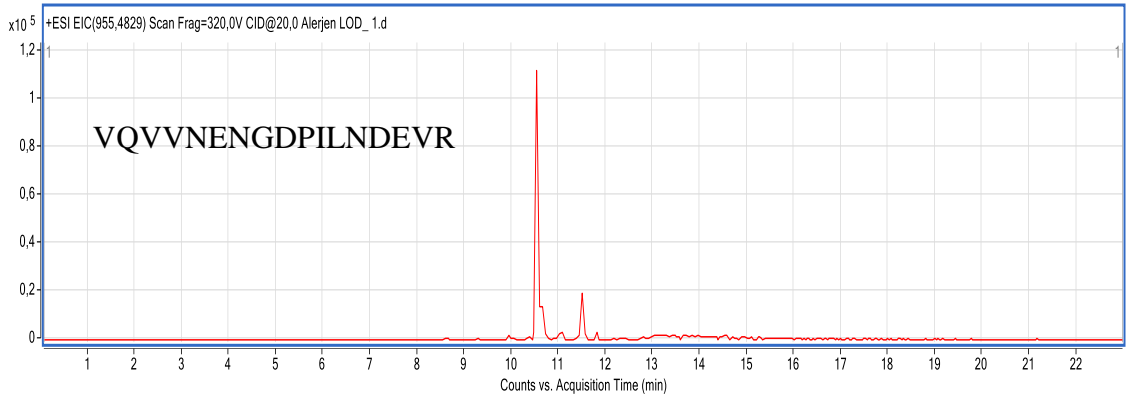
Şekil 4.20. INTVNSNTLPVLR ($m/z= 720.9120$) peptid dizilimine ait iyon kromatogramı (LOD seviyesi)



Şekil. 4.21. VQVDDNGNTVFDDELRL ($m/z= 967.9582$) peptid dizilimine ait iyon kromatogramı (LOD seviyesi)



Şekil 4.22. ALPDEVLQNAFR ($m/z= 686.8626$) peptid dizilimine ait iyon kromatogramı (LOD seviyesi)



Şekil 4.23. VQVVNENGDPI LNDEVR ($m/z= 955.4829$) peptid dizilimine ait iyon kromatogramı (LOD seviyesi)

4.5.2. Kantitatif analiz için validasyon çalışması

Çalışmada ayrıca badem ve fındık için marker olarak belirlenmiş olan peptid dizilimlerinin çeşitler içerisinde miktarsal olarak farklılıklarının belirlenmesi amacıyla kantitatif olarak analizleri yapılmıştır. Çizelge 4.11’de fındık ve badem için marker olarak belirlenmiş olan INTVNSNTLPVLR (Cor a 9.1), VQVVDDNGNTVFDDEL R (Cor a 9.2), ALPDEV LQNAFR (Pru du 6.02.01) ve VQVVNENGDPI LNDEVR (Pru du 6.02) peptid dizilimlerine ait validasyon parametreleri verilmiştir.

Çizelge 4.11. Kantitatif analizlere ait validasyon parametreleri

	INTVNSNTLPVLR Cor a 9.1	VQVVDDNGNTVFDDEL R Cor a 9.2	ALPDEV LQNAFR Pru du 6.02.01	VQVVNENGDPI LNDEVR Pru du 6.02
LOD (ppm)	0,203	0,313	0,428	0,235
LOQ (ppm)	0,359	0,513	0,651	0,318
R ²	0,993	0,995	0,996	0,995
RSD _{pool} (%)	2,72	2,03	6,09	3,01
Geri Kazanım (%)	104,2	102,1	96,7	101,2
Doğruluk (%)	103,6	101,7	97,7	100,2

Alerjen peptidlerin miktarsal analizine yönelik çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bignardi ve ark. (2010) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada badem, fındık, kaju, yer fıstığı ve ceviz alerjenlerinin tahıl gevreği ve bisküvilerde LC-MS/MS ile tespit edilmesi

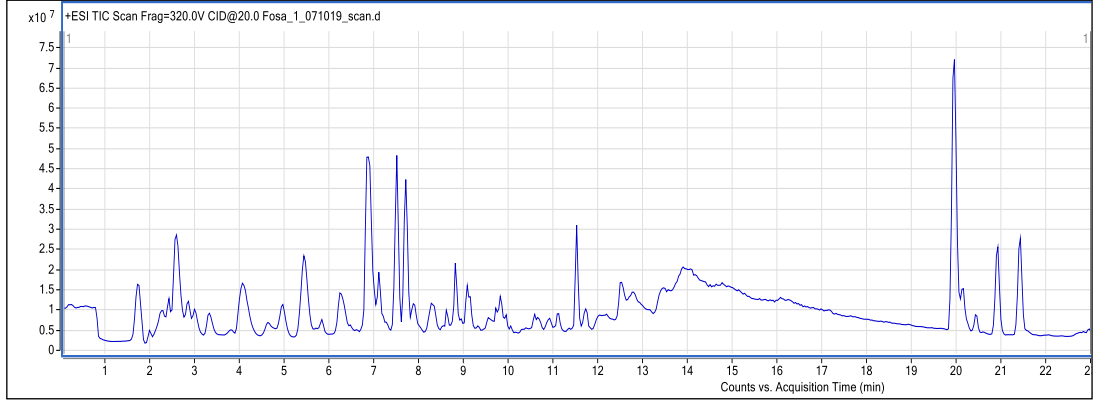
hedeflenmiştir. Yapılan çalışmada sert kabuklu meyve alerjenlerine ait tespit limitlerinin 14-55 mg/kg aralığında değiştiğini belirlemişlerdir.

Heick ve ark. (2011) ekmek örneklerinde süt, yumurta, fındık, ceviz ve badem alerjenlerinin LC-MS/MS ile belirlenmesini amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmada fındık alerjeni olan INTVNSNTLPVLR diziliminin tespit limitini 0,42 mg/kg olarak bulmuşlardır. Bademdeki alerjen peptidlerden GNLDVPPR dizilimi için ise tespit limiti 0,19 mg/kg olarak bildirilmiştir.

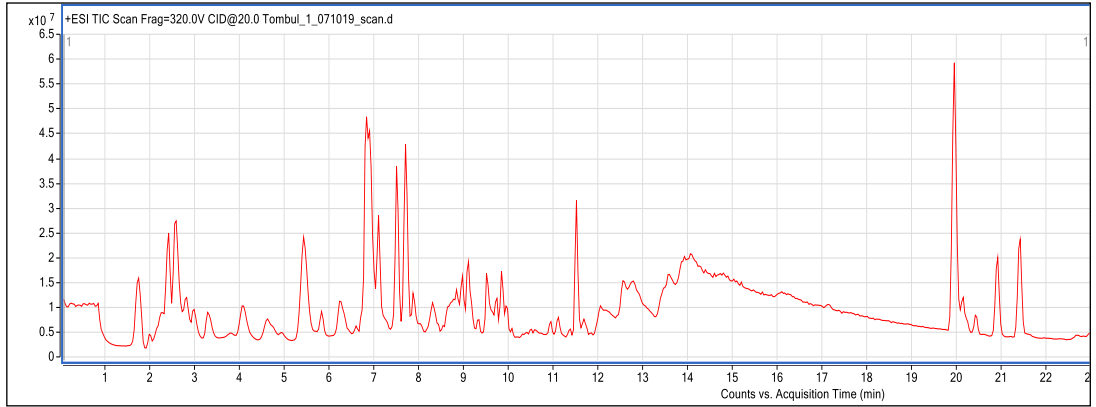
Korte ve ark. (2016) dondurma örnekleri içerisinde sert kabuklu meyve alerjenlerinin LC-HRMS ile tespitine yönelik yaptıkları çalışmada INTVNSNTLPVLR fındık alerjen peptidinin minimum tespit sınırını 0,49 mg/kg, badem alerjeni olan ALPDEVLQNAFR dizilimi için ise 0,34 mg/kg olarak saptamışlardır. INTVNSNTLPVLR diziliminin minimum tespit limiti çalışmada belirlenen 0,203 mg/kg değerine göre daha düşük iken, ALPDEVLQNAFR için tespit ettikleri değer çalışmada tespit edilen 0,428 mg/kg değerine göre daha yüksektir. Minimum tespit sınırındaki farklılıkların çalışmada kullanılan materyal, örnek hazırlama aşaması ve analizlerde kullanılan cihaz farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.6. Farklı Fındık ve Badem Çeşitlerindeki Alerjen Peptid Dizilimlerinin Tespiti

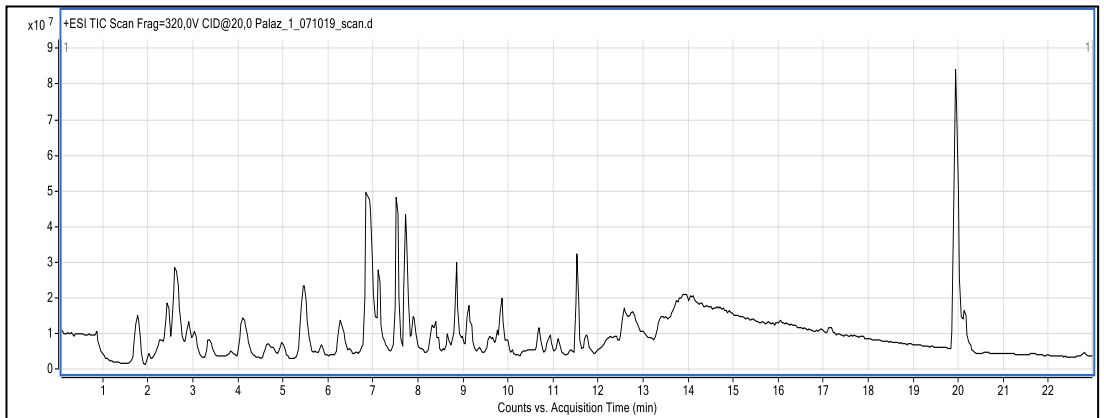
Çalışmada farklı fındık ve badem çeşitlerindeki alerjen peptid dizilimlerinde farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. Fındık ekstraktlarının tripsin ile muamelesi sonrası elde edilen örneklerin LC-QTOF/MS cihazında tarama ve MSMS modunda analizleri gerçekleştirilmiştir. Foşa, Tombul, Palaz, Mincane ve Çakıldak fındık çeşitlerine ait toplam iyon kromatogramları Şekil 4.24 ile Şekil 4.28 arasında verilmiştir. Toplam iyon kromatogramları incelendiğinde farklı fındık çeşitlerine ait kromatogramların benzerlik gösterdiği görülmektedir.



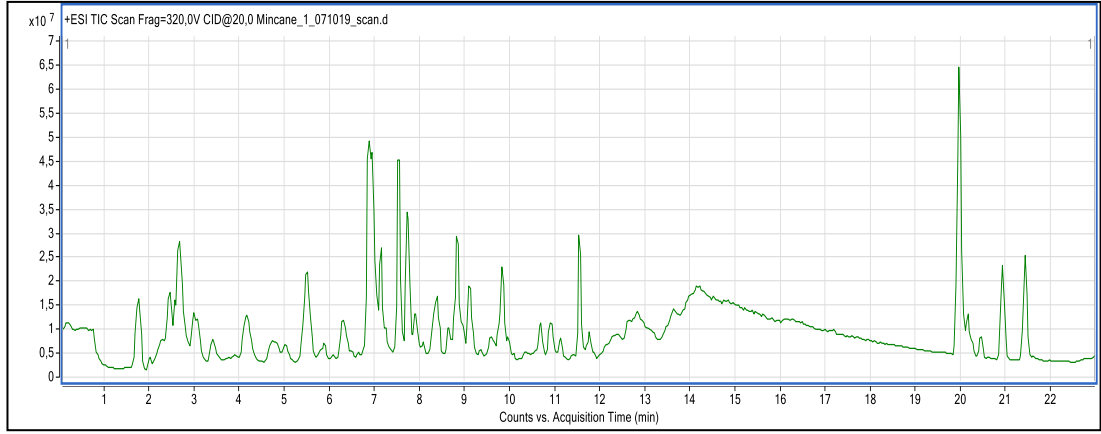
Şekil 4.24. Foşa fıstık çeşidine ait toplam iyon kromatogramı



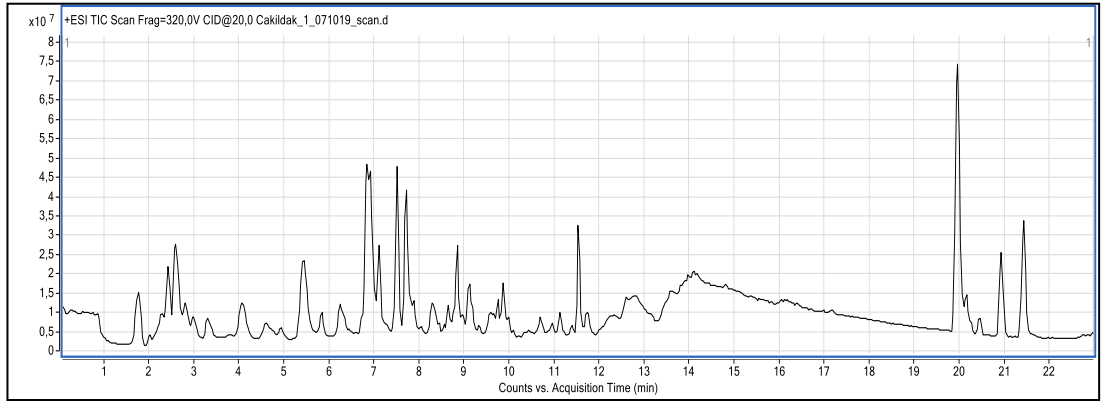
Şekil 4.25. Tombul fıstık çeşidine ait toplam iyon kromatogramı



Şekil 4.26. Palaz fıstık çeşidine ait toplam iyon kromatogramı

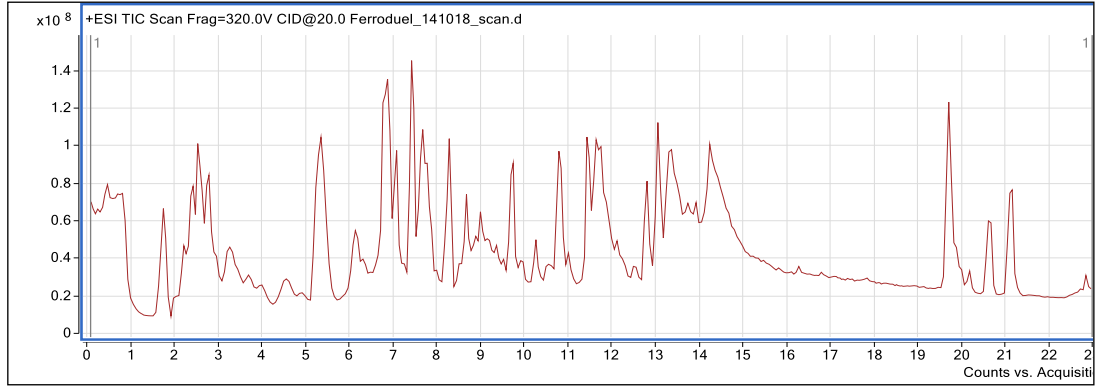


Şekil 4.27. Mincane fındık çeşidine ait toplam iyon kromatogram

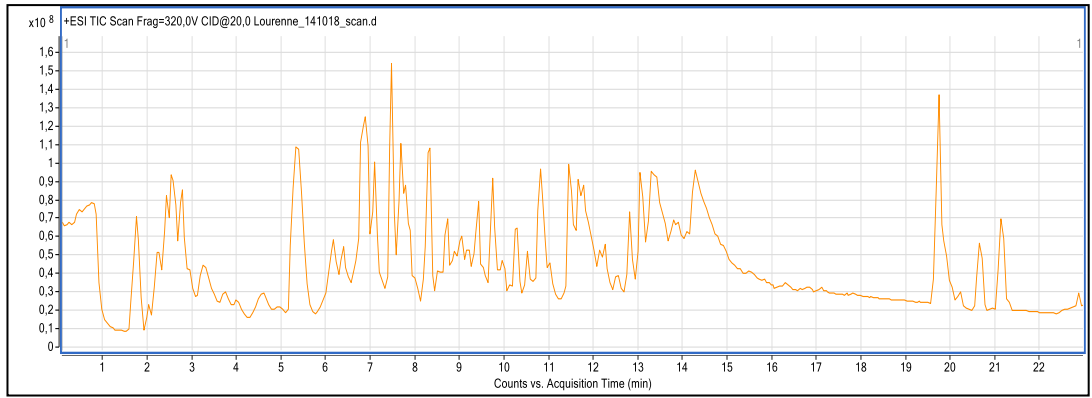


Şekil 4.28. Çakıldak fındık çeşidine ait toplam iyon kromatogram

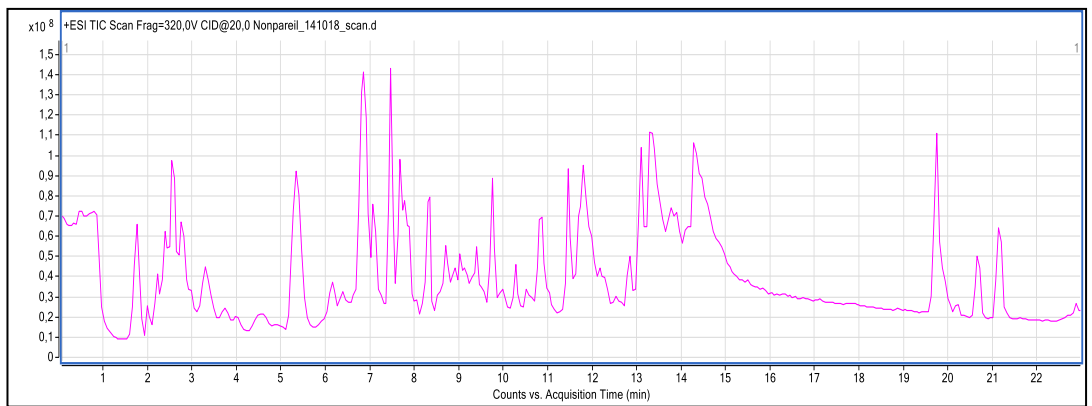
Şekil 4.29 ve Şekil 4.33 arasında ise Ferroduel, Lourenne, Nonpareil, Teksas ve Ferragnes badem çeşidine ait kromatogramlar gösterilmektedir. Fındık çeşitlerine ait kromatogramlarda olduğu gibi badem çeşitlerine ait toplam iyon kromatogramları da kendi içlerinde benzerlik göstermektedir.



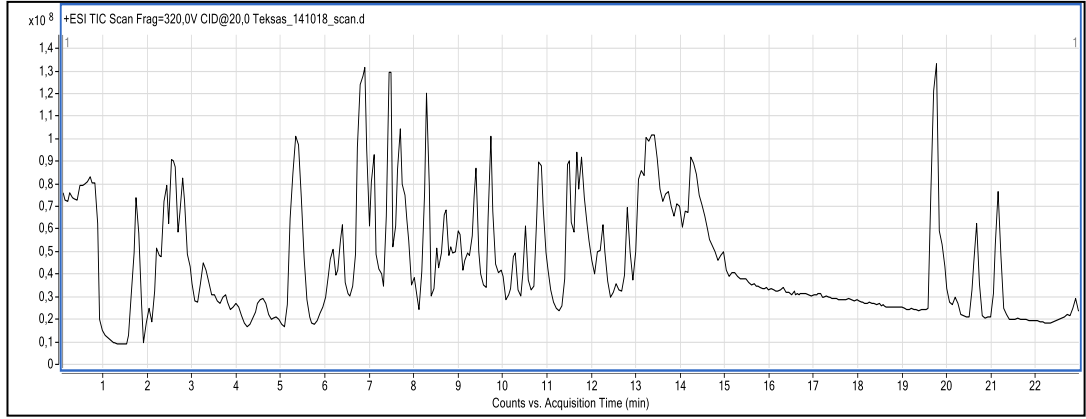
Şekil 4.29. Ferroduel badem çeşidine ait toplam iyon kromatogramı



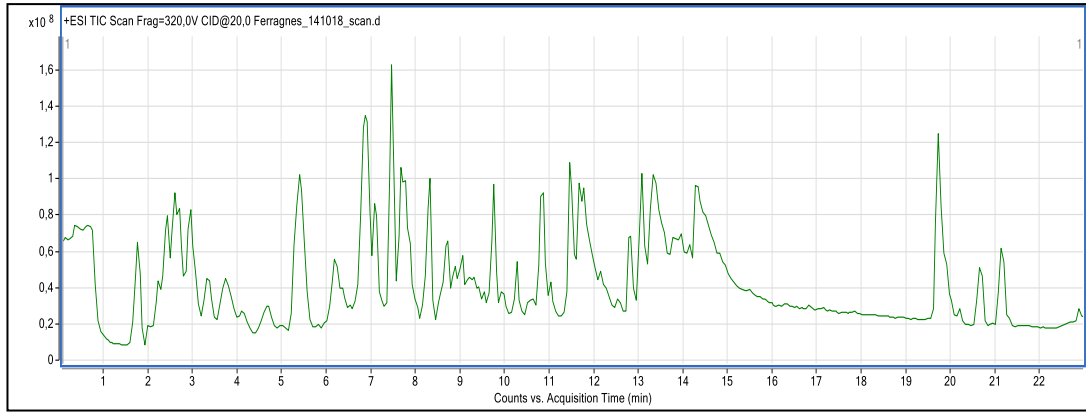
Şekil 4.30. Lourenne badem çeşidine ait toplam iyon kromatogramı



Şekil 4.31. Nonpareil badem çeşidine ait toplam iyon kromatogramı



Şekil 4.32. Teksas badem çeşidine ait toplam iyon kromatogramı



Şekil 4.33. Ferragnes badem çeşidine ait toplam iyon kromatogramı

Farklı fındık ve badem çeşitlerinin MS/MS kütle spektrumlarına ait veriler Matrix Science Mascot yazılımına yüklenmiş ve SwissProt/NCBIprot kütüphaneleri taranarak alerjen peptid dizilimleri araştırılmıştır. Her çeşit için veri tabanından elde edilen sonuçlar incelendiğinde farklı çeşitlerde tespit edilen peptid dizilimleri arasında bir fark olmadığı görülmüştür.

Bu sebeple fındık ve badem için marker olarak belirlenen INTVNSNTLPVLR (Cor a 9.1), VQVDDNGNTVFDDEL (Cor a 9.2), ALPDEVLQNAFR (Pru du 6.02.01) ve VQVVENGDPIINDEVR (Pru du 6.02) peptid dizilimlerinin kantitatif validasyon çalışmaları sonrası farklı süre ve sıcaklıklarda kavurma işlemine tabi tutulan badem ve fındık çeşitlerinde miktarsal olarak farklılıklar araştırılmıştır. Fındık çeşitlerindeki Cor a

9.1 ve Cor a 9.2 alerjenlerinin analiz sonuçlarına ait varyans analiz tablosu Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Fındık çeşidi, kavurma sıcaklığı ve süresinin Cor a 9.1 ve Cor a 9.2 üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	df	Cor a 9.1		Cor a 9.2	
		KO	F değeri	KO	F değeri
Çeşit	4	22,136	62,882**	123,876	181,344**
Kavurma Sıcaklığı	3	408,763	1161,156**	554,215	811,324**
Süre	2	521,313	1480,873**	464,911	680,590**
Çeşit *Sıcaklık	12	6,320	17,954**	16,466	24,105**
Çeşit *Sıcaklık * Süre	38	18,894	53,673**	21,458	31,413**
Hata	60	,352		,683	
Toplam	120				

** : $p < 0.01$

Varyans analizi sonucunda fındık örneklerinde; çeşit, kavurma sıcaklığı ve süresinin Cor a 9.1 ve Cor a 9.2 alerjen miktarı üzerine etkisi ile çeşit*sıcaklık ve çeşit*sıcaklık*süre interaksiyonları $p < 0.01$ seviyesinde önemli bulunmuştur. Farklı fındık çeşitlerindeki Cor a 9.1 alerjen sonuçları Çizelge 4.13’te, Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.14’te verilmiştir. Yapılan Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçlarına göre tüm çeşitlerde Cor a 9.1 miktarında en yüksek değere Çakıldak çeşidinin kontrol örneğinde ulaşılmıştır. Palaz ve Tombul çeşitleri arasında Cor a 9.1 alerjen miktarı açısından istatistiki olarak bir fark bulunmamıştır ($p < 0.05$).

Çizelge 4.13. Fındıklardaki Cor a 9.1 alerjeninin çeşit, süre ve kavurma sıcaklıklarına göre değişimi

Cor a 9.1 miktarı (mg/kg)						
Sıcaklık	Süre	Çakıldak	Foşa	Mincane	Palaz	Tombul
Kontrol		57,86±1,38	55,43±1,44	54,10±1,90	57,43±2,31	55,58±2,13
130	15	53,48±0,95	47,59±1,65	51,45±0,97	49,40±0,50	49,01±0,48
	30	51,61±0,49	45,84±0,40	50,44±1,35	48,20±0,99	47,88±1,27
150	15	49,38±1,62	44,87±1,34	45,60±0,75	46,07±0,73	45,37±0,68
	30	47,76±1,46	44,21±1,26	43,72±1,23	43,50±1,33	43,64±0,55
170	15	45,45±0,87	40,50±1,10	41,59±0,46	40,92±0,87	41,25±0,58
	30	40,57±1,14	39,47±0,39	40,70±0,95	38,59±1,09	39,81±0,92

±: standart sapma (n=3)

Çizelge 4.14. Duncan çoklu karşılaştırma testine göre kavurma sıcaklığı, süresi ve çeşitlerin Cor a 9.1 miktarına etkisi

Çeşit	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
Tombul	47,35 c	Kontrol 57,08 a
Çakıldak	50,32 a	130 50,39 b
Foşa	46,80 d	150 47,03 c
Mincane	48,57 b	170 45,74 d
Palaz	47,65 c	
Standart hata	0,140	0,114

Aynı sütündeki farklı harfler sonuçların Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir (p<0.05).

Fındık çeşitlerindeki Cor a 9.2 alerjen miktarına ait sonuçlar Çizelge 4.15'te, Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.16'da verilmiştir. Yapılan Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçlarına göre tüm çeşitler içerisinde Cor a 9.2 miktarı en yüksek Mincane ve Palaz çeşitlerinin sıcaklık uygulaması yapılmayan kontrol örneklerinde tespit edilmiştir. Mincane ve Palaz çeşitlerinin Cor a 9.2 sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken en düşük değer Foşa çeşidinde bulunmuştur.

Çizelge 4.15. Fındıklardaki Cor a 9.2 alerjeninin çeşit, süre ve kavurma sıcaklıklarına göre değişimi

Fındık çeşitlerindeki Cor a 9.2 miktarı (mg/kg)						
Sıcaklık	Süre	Çakıldak	Foşa	Mincane	Palaz	Tombul
	Kontrol	186,19±2,85	184,81±2,97	187,78±2,44	187,89±3,48	185,45±3,20
130	15	182,16±1,91	186,30±2,61	183,74±2,32	181,35±2,71	181,35±2,71
	30	177,82±2,35	182,06±2,05	183,20±1,23	176,90±3,16	176,90±3,16
150	15	171,84±2,40	178,26±2,19	182,18±1,72	174,76±2,43	174,76±2,43
	30	168,12±2,87	176,38±2,45	178,54±2,27	173,55±2,28	173,55±2,28
170	15	165,77±2,36	175,19±2,29	175,23±2,41	171,31±2,56	171,31±2,56
	30	163,12±1,66	162,63±1,78	169,33±3,12	167,75±3,33	167,75±2,33

±: standart sapma (n=3)

Çizelge 4.16. Duncan çoklu karşılaştırma testine göre kavurma sıcaklığı, süresi ve çeşitlerin Cor a 9.2 miktarına etkisi

Çeşit	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
Tombul	177,42 b	Kontrol 186,62 a
Çakıldak	175,60 c	130 181,21 b
Foşa	174,36 d	150 176,43 c
Mincane	181,90 a	170 171,77 d
Palaz	180,87 a	
Standart hata	0,195	0,159

Aynı sütündeki farklı harfler sonuçların Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir (p<0.05).

Çalışmada kavrulmamış fındık örneklerindeki Cor a 9.1 miktarının 54,10 mg/kg-57,86 mg/kg arasında, Cor a 9.2 miktarının ise 184,81 mg/kg-187,89 mg/kg aralığında değiştiği görülmüştür. Farklı kavurma süre ve sıcaklığına bağlı olarak da Cor a 9.1 ve Cor a 9.2 miktarlarındaki değişimler incelendiğinde her iki alerjen miktarında da sıcaklık ve süreye bağlı olarak azalma meydana gelmiştir.

Ansari ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada fındıkta bulunan farklı peptid dizilimlerinin LC-MS/MS ile analizleri gerçekleştirilmiş ve fındıktaki Cor a 9.1 alerjen

miktarı 397 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Cor a 9.1 miktarı araştırma sonuçlarımızla kıyaslandığında Ansari ve ark. (2012) daha yüksek bir sonuç elde ettiği görülmektedir. Sonuçlardaki miktarsal farklılığın çalışmada kullanılan fındık çeşitleri ya da ekstraksiyon yönteminin farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Validasyon çalışmaları sonrası farklı kavurma prosesleri uygulanmış badem çeşitlerindeki Pru du 6.0201 ve Pru du 6.02 miktarları belirlenmiş ve bu değerlere ait varyans analiz tablosu Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.17. Badem çeşidi, kavurma sıcaklığı ve süresinin Pru du 6.02.01 ve Pru du 6.02 üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	df	Pru du 6.0201		Pru du 6.02	
		KO	F değeri	KO	F değeri
Çeşit	4	237,678	8678,086**	6348,517	6561,831**
Kavurma Sıcaklığı	3	35,944	1312,381**	1407,777	1455,079**
Süre	2	59,282	2164,488**	1425,150	1473,036**
Çeşit *Sıcaklık	12	,495	18,063**	28,524	29,483**
Çeşit *Sıcaklık * Süre	38	1,444	52,718**	47,086	48,668**
Hata	60	,027		,967	
Toplam	12				
	0				

** : p<0.01

Varyans analizi sonucunda badem örneklerinde; çeşit, kavurma sıcaklığı ve süresinin Pru du 6.02.01 ve Pru du 6.02 alerjen miktarı üzerine etkisi ile çeşit*sıcaklık ve çeşit*sıcaklık*süre interaksiyonları p<0.01 seviyesinde önemli bulunmuştur. Farklı badem çeşitlerindeki Pru du 6.02.01 alerjen sonuçları Çizelge 4.18’de, Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.19’da verilmiştir. Yapılan Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçlarına göre tüm çeşitlerde Pru du 6.02.01 miktarı en yüksek Teksas çeşidinin kontrol örneğinde tespit edilmiştir. Ferraduel ve Ferragnes çeşitleri arasında Pru du 6.02.01 alerjen miktarı açısından istatistiki olarak önemli bir fark gözlenmemiştir (p<0.05).

Çizelge 4.18. Bademlerdeki Pru du 6.02.01 alerjeninin çeşit, süre ve kavurma sıcaklıklarına göre değişimi (mg/kg)

Pru du 6.02.01 miktarı (mg/kg)						
Sıcaklık	Süre	Teksas	Nonpareil	Ferraduel	Ferragnes	Laurenne
Kontrol		19,26±0,94	17,40±0,81	13,50±0,98	13,86±0,89	10,01±0,81
130	15	17,34±0,70	15,35±0,77	11,21±0,83	12,00±0,84	7,76±0,73
	30	16,98±0,64	15,08±0,61	11,04±0,84	10,94±0,73	7,26±0,47
150	15	15,68±0,58	14,61±0,58	10,85±0,77	10,42±0,77	6,07±0,68
	30	14,58±0,47	13,98±0,64	10,56±0,65	9,88±0,65	5,71±0,51
170	15	14,22±0,37	12,98±0,50	10,45±0,59	9,45±0,69	5,22±0,59
	30	13,61±0,18	11,91±0,47	9,87±0,51	8,71±0,55	4,76±0,43

±: standart sapma (n=3)

Çizelge 4.19. Duncan çoklu karşılaştırma testine göre kavurma sıcaklığı, süresi ve çeşitlerin Pru du 6.02.01 miktarına etkisi

Çeşit	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
Ferragnes	11,21 c	Kontrol 14,81 a
Ferraduel	11,28 c	130 12,85 b
Nonpareil	14,86 b	150 11,70 c
Teksas	16,36 a	170 10,79 d
Laurenne	7,08 d	
Standart hata	0,011	0,032

Aynı sütündeki farklı harfler sonuçların Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir (p<0.05).

Farklı badem çeşitlerindeki Pru du 6.02 alerjen sonuçları Çizelge 4.20’de, Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları Çizelge 4.21’de verilmiştir. Yapılan Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçlarına göre tüm çeşitler içerisinde Pru du 6.02 miktarında en yüksek değere Laurenne çeşidinin sıcaklık uygulaması yapılmayan örneklerinde ulaşılmıştır. En düşük değer ise Nonpareil çeşidinin 170°C’de 30 dakika kavurma işlemi uygulanan örnekte bulunmuştur.

Çizelge 4.20. Bademlerdeki Pru du 6.02 alerjeninin çeşit, süre ve kavurma sıcaklıklarına göre değişimi

Pru du 6.02 (mg/kg)						
Sıcaklık (°C)	Süre	Teksas	Nonpareil	Ferraduel	Ferragnes	Laurenne
Kontrol		89,24±1,80	72,67±1,65	107,97±3,46	82,38±2,75	113,64±3,48
130	15	80,53±1,44	65,86±1,94	96,46±3,68	75,91±2,61	107,14±3,60
	30	82,56±1,65	59,21±2,03	92,55±2,15	77,20±2,47	104,52±2,94
150	15	69,78±1,37	61,77±1,53	90,46±2,57	69,03±2,11	106,92±2,67
	30	66,15±1,09	54,77±1,85	88,47±2,02	65,95±2,06	98,37±3,08
170	15	59,74±1,59	50,45±1,66	91,13±1,89	61,25±1,76	95,53±2,89
	30	55,42±1,42	46,15±1,45	83,13±1,75	59,15±1,41	91,14±0,48

±: standart sapma (n=3)

Çizelge 4.21. Duncan çoklu karşılaştırma testine göre kavurma sıcaklığı, süresi ve çeşitlerin Pru du 6.02 miktarına etkisi

Çeşit	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
Ferragnes	70,83 d	Kontrol 93,06 a
Ferraduel	95,37 b	130 79,45 b
Nonpareil	57,20 e	150 75,19 c
Teksas	73,28 c	170 70,34 d
Laurenne	103,05a	
Standart hata	0,232	0,189

Aynı sütündeki farklı harfler sonuçların Duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir (p<0.05).

Kavrulmamış badem çeşitlerinde ise Pru du 6.02.01 miktarı 13,50 mg/kg-19,26 mg/kg aralığında, Pru du 6.02 miktarı ise 72,67 mg/kg-113,64 mg/kg aralığında tespit edilmiştir. Artan sıcaklık ve süreye bağlı olarak da Pru du 6.0201 ve Pru du 6.02 miktarlarında azalma olduğu belirlenmiştir.

Literatürde farklı çeşitlerde bulunan alerjenlerin karşılaştırıldığı çalışmalar az sayıdadır. Çalışmaların büyük bir kısmını ELISA veya PCR testi ile yapılan çalışmalar oluşturmakta olup kütle spektrometresi ile farklı çeşitlerdeki alerjen proteinlerin araştırıldığı çalışmalar oldukça kısıtlıdır.

Runde Römer, Levantiner, Neapler, Contorta fındık çeşitlerinde; çeşit, depolama ve ısı işlemin IgE bağlayan epitoplara etkisini incelenmiştir. İmmüno blot testlerde çeşitler arasında alerjenik aktivitedeki fark önemsiz bulunurken, alerjen proteinlerin çoğu 170°C üzeri sıcaklıklarda stabilitesini kaybetmiş, yalnızca 14 kDA dan küçük olan bir proteinin alerjenitesini devam ettirdiğini belirlemişlerdir. On dokuz hafta depolama süresi sonunda da fındık çeşitlerindeki proteinlerin alerjenitesinde bir değişiklik olmadığı ifade edilmiştir (Wigotzki ve ark. 2000).

Koppelman ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada 3 farklı yer fıstığı çeşidinde elde ettikleri SDS-PAGE ve densitometrik analiz sonuçlarına göre, çeşitlere ait Ara h1 ve Ara h2 miktarlarının toplam proteine oranlarının %12-16 ve %5,9-9,3 aralığında değiştiğini belirtmişlerdir. Analitik yöntemin belirsizliği göz önüne alındığında çeşitler arasında Ara h 1 ve Ara h 2 miktarı açısından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadığını saptamışlardır. Ayrıca ELISA testi ile IgE bağlama kapasitelerini ve farklı çeşitlerin IgE bağlama kapasitelerinin de büyük ölçüde benzerlik gösterdiği sonucuna varmışlardır.

Prandi ve ark. (2013) İtalya'nın farklı bölgelerinde yetiştirilen üç farklı *Triticum durum* buğdayındaki Tri a 30 alerjeninin SDS-PAGE ve enzimatik parçalanma sonrası LC-MS/MS ile analizini gerçekleştirmişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre Durum buğdaylarındaki Tri a 30 miktarının 0,22-1,11 mg/g arasında değiştiğini ve yetiştirilen bölge ve çeşitler açısından Tri a 30 miktarında istatistiksel olarak $p < 0,01$ seviyesinde farklılık olduğunu ifade etmişlerdir.

Wu ve ark. (2016) Çin'de yetiştirilen 53 farklı yer fıstığı çeşidi üzerine yaptıkları çalışmada SDS-PAGE ile ayrıştırılan alerjen proteinlerin IgE bağlama kapasitelerini ELISA testi ile karşılaştırmışlardır. Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 ve Ara h 6 alerjenlerinin

ELISA testi ile elde edilen miktarsal sonuçları arasında çeşitler arasında farklılık olduğunu ve farklılığın çeşidin toplam protein miktarıyla orantılı olarak değiştiğini ifade etmişlerdir.

Ribeiro ve ark. (2020) alerjenitesi düşük ve tüketici sağlığı için uygun olan fındık çeşitlerini belirlemeyi amaçladıkları araştırmada Portekiz’de yetiştirilen 18 farklı fındık çeşidi üzerinde çalışmışlardır. Fındık çeşitlerindeki Cor a 8, Cor a 9 ve Cor a 14 alerjenleri için PCR ile elde ettikleri amplifikasyon eğrilerinde benzer profiller tespit etmişlerdir. Ayrıca alerjik kişilerde yaptıkları testlerde çeşitlerin IgE reaktivitesinde de farklılık olmadığını ifade etmişlerdir.

5. SONUÇ

Son yıllarda diğer tüm alerjik hastalıklarda olduğu gibi gıda alerjisinin görülme sıklığında da hızlı bir artış görülmektedir. Değişen yaşam tarzıyla ilişkili olarak gittikçe gelişen ve sanayileşen ülkelerde geleneksel beslenme alışkanlıklarından uzaklaşıldığı ve beslenmedeki bu değişimin alerjilerde ve alerjik hastalıklardaki artışla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Gıdalardaki alerjenlerin etiketlenmesine dair yasal düzenlemeler bulunmasına rağmen birçok ürün yanlış etiketlenme sonucu piyasadan toplatılmakta ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ayrıca çapraz bulaşma nedeniyle gıdalarda alerjenlerin varlığı gıda güvenliği ve tüketici sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadır. Bu sebeple gıdalardaki alerjenlerin tespiti ve etikette yasal düzenlemelere uygun bir şekilde beyan edilmesi oldukça önemlidir.

Sert kabuklu meyveler önemli bir alerjen grubunu oluşturmaktadır. Badem ve fındık ülkemizde yetiştirilen ve sıklıkla tüketilen sert kabuklu meyvelerin başında gelmektedir. Bu meyveler ham veya kavrulmuş olarak tüketilebilmekte veya birçok gıdanın üretiminde bileşen olarak kullanılmaktadır. Sağlık ve beslenme açısından yararlı besinler olmasına karşın fındık ve badem bazı kişilerde alerjik reaksiyonlara sebep olabilmektedir. Bu nedenle gıdalardaki fındık ve badem alerjenlerin belirlenmesi gıda güvenliğinin sağlanması ve tüketici sağlığının korunması için gereklidir. Ayrıca fındık ve badem çeşitlerinde bulunan alerjenlerdeki farklılıkların belirlenmesi hem tüketiciler hem de üreticiler için önem arz etmektedir.

Çalışmada gıdalardaki badem ve fındık alerjenlerinin proteomiks tekniği ile belirlenebilmesi amacıyla LC-QTOF/MS cihazı kullanılarak metod geliştirilmiş ve validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Öncelikle fındık ve badem örneklerinde protein ekstraksiyonu amacıyla TRIS/HCl, amonyum karbonat, dibazik sodyum fosfat ve 0,01 M HCl tamponları kullanılarak ekstraksiyon denemeleri yapılmış ve tüm örneklerde 200mM TRIS/HCl çözeltisi ile en yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmiştir.

Kavrulmamış fındık ve badem örneklerinde alerjen peptid dizilimlerinin belirlenebilmesi için ekstraksiyon ve enzimatik parçalanma sonrası örnekler LC-QTOF/MS cihazı ile

analiz edilerek kütle spektrumları elde edilmiştir. Kütle spektrumunda yer alan parçalanma ürünlerinin kütlelerine ait bilgilerden peptidin sekansının belirlenebilmesi amacıyla veriler Matrix Science Mascot yazılımına yüklenmiş ve SwissProt/NCBIprot kütüphaneleri taranarak fındık ve bademe özgü olan alerjen peptid dizilimleri belirlenmiştir. UNIPROT veritabanı yardımıyla peptid dizilimlerinin doğrulaması yapılmıştır.

Kavrulmamış örneklerdeki alerjen peptid dizilimleri belirlendikten sonra, örneklere farklı sıcaklık ve sürelerde kavurma işlemi uygulanarak ham örneklerde belirlenmiş olan peptid dizilimlerinin ısı işlem sonrası stabiliteelerini devam ettirip ettirmediği araştırılmıştır. Peptid yoğunluğuna örneklerdeki protein miktarının potansiyel etkisini belirlemek amacıyla, çeşitli süre ve sıcaklıklarda kavurma işlemi uygulanmış örneklerin protein miktarı belirlenmiş ve kavurma sonrası protein değerlerinde kontrol örneğine göre istatistiksel olarak önemli bir düşüş tespit edilmiştir.

Farklı süre ve sıcaklıklarda kavurma işlemi sonrası örneklere ait kütle spektrumları veri tabanında incelenmiş ve bazı peptid dizilimlerinin varlığını devam ettirirken bazılarının ise stabiliteelerini kaybettiği görülmüştür. Isıl işlem sonrası stabilitesini koruyan INTVNSNTLPVLR (Cor a 9.1), VQVDDNGNTVFDDELRL (Cor a 9.2) dizilimleri fındık alerjenlerinin tespiti, ALPDEVLQNAFR (Pru du 6.02.01) ve VQVVNENGDPILNDEVR (Pru du 6.02) peptid dizilimleri ise badem alerjenlerinin tespiti amacıyla marker olarak belirlenmiştir. Yapılan validasyon çalışmaları sonrası kek ve dondurma matriksleri içerisinde bulunan marker peptid dizilimleri için minimum tespit seviyesi 10 ppm olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada ayrıca ülkemizde yetiştirilen önemli fındık ve badem çeşitlerinde alerjen proteinlerde farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. Fındıkta Çakıldak, Foşa, Mincane, Palaz ve Tombul çeşitleri; bademde ise Ferragnes, Ferraduel, Nonpareil, Teksas ve Laurene çeşitleri incelenmiştir. Veri tabanındaki araştırmalar sonucunda alerjen kompozisyonu açısından çeşitler arasında bir fark olmadığı ancak marker olarak belirlenen peptid dizilimlerinin konsantrasyonlarında çeşitler arasında istatistiksel olarak ($p < 0.01$) önemli bir fark olduğu belirlenmiştir. Fındık çeşitleri içerisinde en yüksek Cor

a 9.1 ve Cor a 9.2 konsantrasyonları sırasıyla akıldak ve Mincane eşidinde tespit edilmiştir. Bademde ise Teksas ve Laurene eşitleri Pru du 6.0201 ve Pru du 6.02 alerjenlerinin konsantrasyonlarının en yüksek tespit edildiği çeşitlerdir.

Bu alışma ile fındık ve bademdeki alerjen peptid dizilimleri yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip olan LC-QTOF/MS cihazı kullanılarak proteomiks yöntemiyle belirlenmiştir. Böylece tek bir analiz ile farklı gıda matrikslerinde bulunan alerjen peptid dizilimlerinin çoklu tespiti mümkün olmaktadır. Çalışma yanlış etiketlenme veya çapraz bulaşma sonucu alerjen tespit edilen gıda ürünlerinin geri ağrılmasından kaynaklanan ekonomik kayıpların engellenmesine ve gıda güvenliğinin sağlanmasına katkıda bulunulacaktır. Ayrıca Türk Gıda Kodeksi Etiketleme ve Tüketicileri Bilgilendirme Yönetmeliği'nde gıdaların etiketinde belirtilmesi zorunlu olan alerjen gruplarından bazılarının tespit edilmesine olanak sağlanacaktır.

Yapılan çalışmanın alerjenlerin proteomiks yöntemiyle çoklu belirlenmesine bir temel oluşturduğu ve diğer alerjen gıda gruplarındaki alerjenlerin tespit edilmesi çalışmalarına da fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca gıda alerjenleri üzerine yapılacak olan yeni araştırma ve projeler için yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

Abdallah, C., Dumas-Gaudot, E., Renaut, J., Sergeant, K. 2012. Gel-Based and Gel-Free Quantitative Proteomics Approaches at a Glance. *International Journal of Plant Genomics*, 494572.

Ahsan, N., Rao, R., Gruppuso, P.A., Ramratnam, B., Salomon, A.R. 2016. Targeted proteomics: Current status and future perspectives for quantification of food allergens. *J. proteomics*, 143: 15–23.

Akata, İ., Bakırcı, S., Dereli, D., Küçükğüven, E., Yılmaz, İ., Kaya, E. 2014. İmmünokromatografik Kart Testlerin Çalışma Prensipli Ve Üretim Teknikleri. *Düzce Medical Journal*, 16(3): 45-53.

Akkerdaas, J.H., Wensing, M., Knulst, A.C., Krebitz, M., Breiteneder, H., de Vries, S., Penninks, A.H., Aalberse, R.C., Hefle, S.L., van Ree, R. 2003. How accurate and safe is the diagnosis of hazelnut allergy by means of commercial skin prick test reagents?. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 132(2): 132–140.

Akkerdaas, J.H., Schocker, F., Vieths, S., Versteeg, S., Zuidmeer, L., Hefle, S.L., Aalberse, R.C., Richter, K., Ferreira, F., van Ree, R. 2006. Cloning of oleosin, a putative new hazelnut allergen, using a hazelnut cDNA library. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50(1): 18–23.

Albillos, S.M., Menhart, N., Fu, T.J. 2009. Structural stability of Amandin, a major allergen from almond (*Prunus dulcis*), and its acidic and basic polypeptides. *J. Agric. Food. Chem.*, 57(11): 4698–4705.

Allen, K.J., Turner, P.J., Pawankar, R., Taylor, S., Sicherer, S., Lack, G., Rosario, N., Ebisawa, M., Wong, G., Mills, E., Beyer, K., Fiocchi, A., Sampson, H.A. 2014. Precautionary labelling of foods for allergen content: are we ready for a global framework?. *World Allergy Organ. J.*, 7(1): 10.

Anonim, 2004. Amerika Birleşik Devletleri Gıda Alerjen Etiketlemesi ve Tüketicinin Korunması Yasası. <https://www.fda.gov/food/food-allergens-gluten-free-guidance-documents-regulatory-information/food-allergen-labeling-and-consumer-protection-act-2004-falcpa-->(Erişim tarihi: 15.01.2020).

Anonim, 2017. Türk Gıda Kodeksi Etiketleme ve Tüketicileri Bilgilendirme Yönetmeliği. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/01/20170126M1-6.htm>(Erişim tarihi: 15.03.2020).

Anonim, 2018. Kimyasal Ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Kimyasal_Fiziksel_Val_Ver_Rehberi.pdf(Erişim tarihi: 02.10.2020).

Anonim, 2019. 2018 Yılı Fındık Sektörü Raporu. Toprak Mahsülleri Ofisi Genel Müdürlüğü. <https://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/findiksektorraporu2018.pdf>-(Erişim tarihi: 11.03.2020).

Anonim, 2020. 2019 Yılı Fındık Sektörü Raporu. Toprak Mahsülleri Ofisi Genel Müdürlüğü. <https://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/sektorraporlari/findik2019.pdf>-(Erişim tarihi: 15.09.2020).

Anonim, 2021. Allergen Nomenclature, Allergen Nomenclature IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. <http://www.allergen.org/>-(Erişim tarihi: 03.01.2021).

Ansari, P., Stoppacher, N., Baumgartner, S. 2012. Marker peptide selection for the determination of hazelnut by LC-MS/MS and occurrence in other nuts. *Anal. Bioanal. Chem.*, 402(8): 2607–2615.

Arıcan, Ö., Hacımustafaoğlu, O.Y. 2002. Besin alerjisi. *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 13(2): 142-146.

Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., de Vries, S.C., Gautier, M.F., Ciurana, C L., Verbeek, E., Mohammadi, T., Knul-Brettlova, V., Akkerdaas, J.H., Bulder, I., Aalberse, R.C., van Ree, R. 2001. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 124(1-3): 67–69.

Asero, R., Arena, A., Cecchi, L., Conte, M.E., Crivellaro, M., Emiliani, F., Lodi Rizzini, F., Longo, R., Minale, P., Murzilli, F., Musarra, A., Nebiolo, F., Quercia, O., Ridolo, E., Savi, E., Senna, G. E., Villalta, D. 2011. Are IgE Levels to Foods other than Rosaceae Predictive of Allergy in Lipid Transfer Protein-Hypersensitive Patients? *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 155(2): 149–154.

Ayuso, R., Grishina, G., Bardina, L., Carrillo, T., Blanco, C., Ibáñez, M.D., Sampson, H.A., Beyer, K. 2008. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 122(4), 795–802.

Balık, H., Kayalak Balık, S., Okay, A. 2015. Yeni Fındık Çeşitleri (Okay 28 ve Giresun Melezi). *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 19(2): 104-109.

Ballabio, C., Chessa, S., Rignanese, D., Gigliotti, C., Pagnacco, G., Terracciano, L., Fiocchi, A., Restani, P., Caroli, A.M. 2011. Goat milk allergenicity as a function of α S1-casein genetic polymorphism. *J. Dairy Sci.*, 94(2): 998–1004.

Bartra, J., García-Moral, A., Enrique, E. 2016. Geographical differences in food allergy. Geographische Unterschiede bei Nahrungsmittelallergien. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 59(6): 755–763.

Basera, W., Botha, M., Gray, C.L., Lunjani, N., Watkins, A.S., Venter, C., Allen, K.J., Hlela, C., Zar, H.J., Levin, M.E. 2015. The South African Food Sensitisation and Food Allergy population-based study of IgE-mediated food allergy: validity, safety, and acceptability. *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 115(2): 113–119.

Baş, D., Deniz, E. 2015. Gıda Güvenliği Ve Kalite Kontrolünde Biyosensörler. *Gıda*, 40 (4): 225-232.

Battaglia F. 2008. Analysis of Allergenic Proteins by Mass Spectrometry. (Doktora Tezi), Università degli Studi di Padova, Italy.

Bernhisel-Broadbent, J., Dintzis, H.M., Dintzis, R.Z., Sampson, H.A. 1994. Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d III) compared with ovalbumin (Gal d I) in children with egg allergy and in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 93(6), 1047–1059.

Beyer, K., Grishina, G., Bardina, L., Grishin, A., Sampson, H.A. 2002. Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 110(3): 517–523.

Beyerlein, L., Pohl, D., Delco, F., Stutz, B., Fried, M., Tutuian, R. 2008. Correlation between symptoms developed after the oral ingestion of 50 g lactose and results of hydrogen breath testing for lactose intolerance. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(8): 659–665.

Bhardwaj, H., Rajesh, Sumana, G. 2021. Recent advances in nanomaterials integrated immunosensors for food toxin detection. *J. Food Sci. Technol.*, 1.

Bignardi, C., Elviri, L., Penna, A., Careri, M., Mangia, A. 2010. Particle-packed column versus silica-based monolithic column for liquid chromatography–electrospray-linear ion trap-tandem mass spectrometry multiallergen trace analysis in foods. *J. Chromatogr. A*, 1217: 7579–7585.

Biscola, V., de Olmos, A.R., Choiset, Y., Rabesona, H., Garro, M.S., Mozzi, F., Chobert, J.M., Drouet, M., Haertlé, T., Franco, B. 2017. Soymilk fermentation by *Enterococcus faecalis* VB43 leads to reduction in the immunoreactivity of allergenic proteins β -conglycinin (7S) and glycinin (11S). *Beneficial microbes*, 8(4), 635–643.

Bolling, B.W., Chen, C.Y., McKay, D.L., Blumberg, J.B. 2011. Tree nut phytochemicals: composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, Brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutr. Res. Rev.*, 24(2): 244–275.

Boo, C.C., Parker, C.H., Jackson, L.S. 2018. A Targeted LC-MS/MS Method for the Simultaneous Detection and Quantitation of Egg, Milk, and Peanut Allergens in Sugar Cookies. *Journal of AOAC International*, 101(1): 108–117.

Breiteneder, H. 2004. Thaumatin-like proteins -- a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy*, 59(5): 479–481.

Breiteneder, H., Radauer, C. 2004. A classification of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 113(5): 821–831.

Breiteneder, H., Mills, C. 2005. Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 5(3): 275–279.

Bruijnzeel-Koomen, C., Ortolani, C., Aas, K., Bindslev-Jensen, C., Björkstén, B., Moneret-Vautrin, D., Wüthrich, B. 1995. Adverse reactions to food. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Subcommittee. *Allergy*, 50(8): 623–635.

Bu, G., Luo, Y., Zhang, Y., Chen, F. 2010. Effects of fermentation by lactic acid bacteria on the antigenicity of bovine whey proteins. *J. Sci. Food Agric.*, 90(12): 2015–2020.

Bugajska-Schretter, A., Grote, M., Vangelista, L., Valent, P., Sperr, W.R., Rumpold, H., Pastore, A., Reichelt, R., Valenta, R., Spitzauer, S. 2000. Purification, biochemical, and immunological characterisation of a major food allergen: different immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound forms of carp parvalbumin. *Gut*, 46(5): 661–669.

Burney, P., Summers, C., Chinn, S., Hooper, R., van Ree, R., Lidholm, J. 2010. Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: a EuroPrevall analysis. *Allergy*, 65(9): 1182–1188.

Cabanillas, B., Pedrosa, M.M., Rodríguez, J., González, A., Muzquiz, M., Cuadrado, C., Crespo, J.F., Burbano, C. 2010. Effects of enzymatic hydrolysis on lentil allergenicity. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54(9): 1266–1272.

Cabanillas, B., Maleki, S.J., Rodríguez, J., Cheng, H., Teuber, S.S., Wallowitz, M.L., Muzquiz, M., Pedrosa, M.M., Linacero, R., Burbano, C., Novak, N., Cuadrado, C., Crespo, J.F. 2014. Allergenic properties and differential response of walnut subjected to processing treatments. *Food Chem.*, 157: 141–147.

Calinoiu, L.F., Vodnar D.C., Socaciu, C. 2013. The Reactivity and Allergenic Potential of Hazelnut Peptides. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca: Food Science and Technology*, 70(1): 25–32.

Carlson, G., Coop, C. 2019. Pollen food allergy syndrome (PFAS): A review of current available literature. *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 123(4): 359–365.

Careri, M., Costa, A., Elviri, L., Lagos, J.B., Mangia, A., Terenghi, M., Cereti, A., Garoffo, L.P. 2007. Use of specific peptide biomarkers for quantitative confirmation of hidden allergenic peanut proteins Ara h 2 and Ara h 3/4 for food control by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389(6): 1901–1907.

Carrera, M., Cañas, B., Gallardo, J. M. 2018. Advanced proteomics and systems biology applied to study food allergy. *Curr. Opin. Food Sci.*, 22: 9–16.

Chassaigne, H., Nørgaard, J.V., Hengel, A.J. 2007. Proteomics-based approach to detect and identify major allergens in processed peanuts by capillary LC-Q-TOF (MS/MS). *J. Agric. Food Chem.*, 55(11): 4461–4473.

Chassaigne, H., Trégoat, V., Nørgaard, J.V., Maleki, S. J., van Hengel, A.J. 2009. Resolution and identification of major peanut allergens using a combination of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis, Western blotting and Q-TOF mass spectrometry. *J. Proteomics*, 72(3): 511–526.

Chen, L., Zhang, S., Illa, E., Song, L., Wu, S., Howad, W., Arús, P., van de Weg, E., Chen, K., Gao, Z. 2008a. Genomic characterization of putative allergen genes in peach/almond and their synteny with apple. *BMC genomics*, 9: 543.

Chen C.H. 2008b. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Anal. Chim. Acta*, 624(1): 16–36.

Chen, J., Hu, Y., Allen, K. J., Ho, M. H., Li, H. 2011. The prevalence of food allergy in infants in Chongqing, China. *Pediatric allergy and immunology: official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 22(4): 356–360.

Chung, S.Y., Champagne, E. 2001. Association of end-product adducts with increased IgE binding of roasted peanuts. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 3911-3916.

Clare, D.A., Gharst, G., Sanders, T.H. 2007. Transglutaminase polymerization of peanut proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 55(2): 432–438.

Cong, Y., Li, Y., Li, L. 2020. Immunoglobulin E and immunoglobulin G cross-reactive allergens and epitopes between cow milk α_{S1} -casein and soybean proteins. *Int. J. Dairy Sci.*, 103(11): 9815–9824.

Cosette, A., Eliane, D., Jenny R., Kjell S. 2012. Gel-Based and Gel-Free Quantitative Proteomics Approaches at a Glance. *International Journal of Plant Genomics*, 494572.

Costa, J., Mafra, I., Carrapatoso, I., Oliveira, M.B. 2012a. Almond allergens: molecular characterization, detection, and clinical relevance. *J. Agric. Food Chem.*, 60(6), 1337–1349.

Costa, J., Mafra, I., Oliveira, M.B.P.P. 2012b. High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods. *Food Chemistry*, 133(3): 1062–1069.

Costa, J., Amaral, J.S., Grazina, L., Oliveira, M., Mafra, I. 2017. Matrix-normalised real-time PCR approach to quantify soybean as a potential food allergen as affected by thermal processing. *Food Chem.*, 221: 1843–1850.

Courtois, J., Bertholet, C., Tollenaere, S., Van der Brempt, X., Cavalier, E., El Guendi, S., Gillard, N., Gadisseur, R., Quinting, B. 2020. Detection of wheat allergens using 2D Western blot and mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 178: 112907.

Cucu, T., Platteau, C., Taverniers, I., Devreese, B., De, L.M., De, M.B. 2011. ELISA detection of hazelnut proteins: effect of protein glycation in the presence or absence of wheat proteins. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 28: 1–10.

Cucu, T., De Meulenaer, B., Bridts, C., Devreese, B., Ebo, D. 2012a. Impact of thermal processing and the Maillard reaction on the basophil activation of hazelnut allergic patients. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(5): 1722–1728.

Cucu, T., Devreese, B., Trashin, S., Kerkaert, B., Rogge, M., De Meulenaer, B. 2012b. Detection of hazelnut in foods using ELISA: challenges related to the detectability in processed foodstuffs. *Journal of AOAC International*, 95(1): 149–156.

Çimen, M. 2015. Fen ve Sağlık Bilimleri Alanlarında SPSS Uygulamalı Veri Analizi, Palme Yayıncılık, Türkiye.

Daly, M., Ansari, P., Häubl, G., Rogers, A., Brunner, K. 2018. Assessing Almond and Peanut Allergens Using Commercially Available Immunoanalytical Kits and LC-MS/MS: A Case Study. *Journal of AOAC International*, 101(1): 96–101.

De Angelis, E., Bavaro, S.L., Monaci, L., Pilolli, R. 2018a. Effects of the Varietal Diversity and the Thermal Treatment on the Protein Profile of Peanuts and Hazelnuts. *J. Food Qual.*, 1–10.

De Angelis, E., Bavaro, S.L., Forte, G., Pilolli, R., Monaci, L. 2018b. Heat and pressure treatments on almond protein stability and change in immunoreactivity after simulated human digestion. *Nutrients*, 10(11).

Dhondalay, G.K., Rael, E., Acharya, S., Zhang, W., Sampath, V., Galli, S. J., Tibshirani, R., Boyd, S.D., Maecker, H., Nadeau, K.C., Andorf, S. 2018. Food allergy and omics. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 141(1): 20–29.

Diaz-Amigo, C. 2010. Towards a Comprehensive Validation of ELISA Kits for Food Allergens: Case 1—Egg. *Food Anal. Methods*, 3(4): 344–350.

Díaz-Perales, A., Blanco, C., Sánchez-Monge, R., Varela, J., Carrillo, T., Salcedo, G. 2003. Analysis of avocado allergen (Prs a 1) IgE-binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 112(5): 1002–1007.

Dona, D.W., Suphioglu, C. 2020. Egg Allergy: Diagnosis and Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(14): 5010.

- Dooper, M. B. W., Plassen, C., Holden, L., Moen, L., Namork, E., Egaas, E. 2008.** Antibody binding to hazelnut (*Corylus avellana*) proteins: the effects of extraction procedure and hazelnut source. *Food & Agricultural Immunology*, 19(3): 229–240.
- Downs, M. L., Johnson, P. 2018.** Target Selection Strategies for LC-MS/MS Food Allergen Methods. *Journal of AOAC International*, 101(1), 146.
- Dunwell, J.M., Purvis, A., Khuri, S. 2004.** Cupins: the most functionally diverse protein superfamily?. *Phytochemistry*, 65(1): 7–17.
- Eggesbø, M., Botten, G., Halvorsen, R., Magnus, P. 2001.** The prevalence of allergy to egg: a population-based study in young children. *Allergy*, 56: 403-411.
- El-Agamy, E.I. 2007.** The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, 68(1): 64–72.
- Eldoğan, Ü., Şahan, A., Çoban, N. 2014.** Current Situation of Almond Cultivation in Turkey and World. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, (2): 1379-1386.
- Eldoğan, Ü. 2020.** Dünya’da Ve Türkiye’de Badem, *Antep Fıstığı Araştırma Dergisi*, 8:44-45.
- Eller, E., Kjaer, H.F., Høst, A., Andersen, K.E., Bindslev-Jensen, C. 2009.** Food allergy and food sensitization in early childhood: results from the DARC cohort. *Allergy*, 64(7): 1023–1029.
- Elizur, A., Appel, M.Y., Nachshon, L., Levy, M.B., Epstein-Rigbi, N., Golobov, K., Goldberg, M.R. 2018.** NUT Co Reactivity - ACquiring Knowledge for Elimination Recommendations (NUT CRACKER) study. *Allergy*, 73(3): 593–601.
- Elsayed, S., Aas, K. 1971.** Characterization of a major allergen (cod). Observations on effect of denaturation on the allergenic activity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 47(5): 283–291.
- Faber, M.A., Pascal, M., El Kharbouchi, O., Sabato, V., Hagendorens, M.M., Decuyper, I.I., Bridts, C.H., Ebo, D.G. 2017.** Shellfish allergens: tropomyosin and beyond. *Allergy*, 72(6): 842–848.
- Fernandez, A., Butz, P., Tauscher, B. 2009.** IgE binding capacity of apple allergens preserved after high pressure treatment. *High Pres. Res*, 29: 705-712.
- Fernández-Cuesta, A., Kodad, O., Socias, R., Velasco, L. 2012.** Phytosterol Variability in Almond Germplasm. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 137(5): 343–348.
- Fiocchi, A., Brozek, J., Schünemann, H., Bahna, S. L., von Berg, A., Beyer, K., Bozzola, M., Bradsher, J., Compalati, E., Ebisawa, M., Guzmán, M. A., Li, H., Heine, R. G., Keith, P., Lack, G., Landi, M., Martelli, A., Rancé, F., Sampson, H., Stein, A., ... World Allergy Organization (WAO) Special Committee on Food**

Allergy. 2010. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatric allergy and immunology: official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 21: 1–125.

Fremout, W., Dhaenens, M., Saverwyns, S., Sanyova, J., Vandenaabeele, P., Deforce, D., Moens, L. 2010. Tryptic peptide analysis of protein binders in works of art by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 658(2): 156–162.

Fu, T.J., Maks, N. 2013. Impact of thermal processing on ELISA detection of peanut allergens. *J. Agric. Food Chem.*, 61(24):5649-5658.

Fu, X., Sheng, L., Yu, Y., Ma, M., Cai, Z., Huang, X. 2018. Rapid and universal detection of ovalbumin based on N,O,P-co-doped carbon dots-fluorescence resonance energy transfer technology. *Sens. Actuators B. Chem.*, 269: 278–287.

Gallien, S., Duriez, E., Domon, B. 2011. Selected reaction monitoring applied to proteomics. *J. Mass Spectrom.*, 46(3): 98–312.

Garino, C., Zuidmeer, L., Marsh, J., Lovegrove, A., Morati, M., Versteeg, S., Schilte, P., Shewry, P., Arlorio, M., van Ree, R. 2010. Isolation, cloning, and characterization of the 2S albumin: a new allergen from hazelnut. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54(9): 1257–1265.

Gaur, V., Sethi, D.K., Salunke, D.M. 2008. Purification, identification and preliminary crystallographic studies of Pru du amandin, an allergenic protein from *Prunus dulcis*. *Acta Crystallographica: Section F*, 64(1):32–35.

Gavrović-Jankulović, M., Ćirković, T., Vucković, O., Atanasković-Marković, M., Petersen, A., Gojgić, G., Burazer, L., Jankov, R.M. 2002. Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 110(5): 805–810.

Geiselhart, S., Hoffmann-Sommergruber, K., Bublin, M. 2018. Tree nut allergens. *Mol. Immunol*, 100: 71–81.

Gendel S.M. 2012. Comparison of international food allergen labeling regulations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 63(2): 279–285.

Germini, A., Paschke, A., Marchelli, R. 2007. Preliminary studies on the effect of processing on the IgE reactivity of tomato products. *J. Sci. Food Agric.*, 87(4): 660–667.

Gomaa, A., Boye, J. 2015. Impact of irradiation and thermal processing on the immunochemical detection of milk and egg allergens in foods. *Food Res. Int.*, 74: 275–283.

Gruber, P., Becker, W.M., Hofmann, T. 2005. Influence of the Maillard reaction on the allergenicity of Ara h2, a recombinant major allergen from peanut (*Arachis hypogaea*), its major epitopes, and peanut agglutinin. *J. Agric. Food. Chem.*, 53: 2289-2296.

Gupta, R S., Warren, C.M., Smith, B.M., Jiang, J., Blumenstock, J.A., Davis, M.M., Schleimer, R.P., Nadeau, K.C. 2019. Prevalence and Severity of Food Allergies Among US Adults. *JAMA network open*, 2(1): e185630.

Hamada, Y., Nagashima, Y., Shiomi, K. 2001. Identification of collagen as a new fish allergen. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(2): 285–291.

Han, X., Jin, M., Breuker, K., McLafferty, F.W. 2006. Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons. *Science*, 314(5796): 109–112.

Hanash S. 2003. Disease proteomics. *Nature*, 422(6928): 226–232.

Hansen, K.S., Ballmer-Weber, B.K., Lüttkopf, D., Skov, P.S., Wüthrich, B., Bindslev-Jensen, C., Vieths, S., Poulsen, L.K. 2003. Roasted hazelnuts--allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Allergy*, 58(2): 132–138.

Hassan, A.K., Venkatesh, Y.P. 2015. An overview of fruit allergy and the causative allergens. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.*, 47(6), 180–187.

Hauser, M., Egger, M., Wallner, M., Wopfner, N., Schmidt, G., Ferreira, F. 2008. Molecular Properties of Plant Food Allergens: A Current Classification into Protein Families. *The Open Immunology Journal*, 1: 1-12.

Hazebrouck, S., Guillon, B., Drumare, M.F., Paty, E., Wal, J.M., Bernard, H. 2012. Trypsin resistance of the major peanut allergen Ara h 6 and allergenicity of the digestion products are abolished after selective disruption of disulfide bonds. *Mol. Nutr. Food Res.*, 56(4): 548–557.

Heick, J., Fischer, M., Pöpping, B. 2011. First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1218(7): 938–943.

Heroldova, M., Houska, M., Vavrova, H., Kucera, P., Setinova, I., Honzova, S., Kminkova, M., Strohalm, J., Novotna, P., Proskova, A. 2009. Influence of high-pressure treatment on allergenicity of rDau c1 and carrot juice demonstrated by in vitro and in vivo tests. *High Pressure Research*, 29(4): 695–704.

Ho, M.H., Wong, W.H., Chang, C. 2014. Clinical spectrum of food allergies: a comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 46(3): 225–240.

Hoffmann-Sommergruber, K., Mills, E.N. 2009. Food allergen protein families and their structural characteristics and application in component-resolved diagnosis: new data from the EuroPrevall project. *Anal. Bioanal. Chem.*, 395(1): 25–35.

Hoffmann-Sommergruber, K. 2016. Proteomics and its impact on food allergy diagnosis. *EuPA open proteomics*, 12: 10–12.

Hoffmann, B., Münch, S., Schwägele, F., Neusüß, C., Jira, W. 2017. A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of lupine, pea, and soy proteins in meat products. *Food Control*, 71: 200-209.

Hu, Y., Chen, J., Li, H. 2010. Comparison of food allergy prevalence among Chinese infants in Chongqing, 2009 versus 1999. *Pediatrics international: Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 52(5): 820–824.

Huecas, S., Villalba, M., Rodríguez, R. 2001. Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3- β -glucanase: Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. *J. Biol. Chem.*, 276(30): 27959–27966.

Husband, F.A., Aldick, T., Van der Plancken, I., Grauwet, T., Hendrickx, M., Skypala, I., Mackie, A.R. 2011. High-pressure treatment reduces the immunoreactivity of the major allergens in apple and celeriac. *Mol. Nutr. Food Res.*, 55(7): 1087–1095.

Immer, U., Lacorn, M. 2015. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for detecting allergens in food, Editor(s): Simon Flanagan, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Handbook of Food Allergen Detection and Control, Woodhead Publishing, pp: 199-217.

Iwan, M., Vissers, Y.M., Fiedorowicz, E., Kostyra, H., Kostyra, E., Savelkoul, H.F., Wichers, H.J. 2011. Impact of Maillard reaction on immunoreactivity and allergenicity of the hazelnut allergen Cor a 11. *J. Agric. Food. Chem.*, 59(13): 7163–7171.

Jankiewicz, A., Baltés, W., Bögl, K.W., Dehne, L.I., Jamin, A., Hoffmann, A., Hausteiner, D., Vieths, S. 1997. Influence of food processing on the immunochemical stability of celery allergens. *J. Sci. Food. Agric.*, 75: 359-370.

Jarolim, E., Rumpold, H., Endler, A.T., Ebner, H., Breitenbach, M., Scheiner, O., Kraft, D. 1989. IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*. *Allergy*, 44(6): 385–395.

Jiménez-Saiz, R., Benedé, S., Molina, E., López-Expósito, I. 2015. Effect of processing technologies on the allergenicity of food products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 55(13): 1902–1917.

Jin, T., Albillos, S.M., Guo, F., Howard, A., Fu, T.J., Kothary, M.H., Zhang, Y.Z. 2009. Crystal structure of prunin-1, a major component of the almond (*Prunus dulcis*) allergen amandin. *J. Agric. Food. Chem.*, 57(18): 8643–8651.

Johansson, S.G., Hourihane, J.O., Bousquet, J., Bruijnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M.L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberge, P., van Hage-Hamsten, M., Wüthrich, B., EAACI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force. 2001. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*, 56(9): 813–824.

Johnson, P.E., Van der Plancken, I., Balasa, A., Husband, F.A., Grauwet, T., Hendrickx, M., Knorr, D., Mills, E.N., Mackie, A.R. 2010. High pressure, thermal and pulsed electric-field-induced structural changes in selected food allergens. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54(12): 1701–1710.

Johnson, P.E., Baumgartner, S., Aldick, T., Bessant, C., Giosafatto, V., Heick, J., Mamone, G., O'Connor, G., Poms, R., Popping, B., Reuter, A., Ulberth, F., Watson, A., Monaci, L., Mills, E. N. 2011. Current perspectives and recommendations for the development of mass spectrometry methods for the determination of allergens in foods. *Journal of AOAC International*, 94(4): 1026–1033.

Kader J.C. 1996. Lipid-Transfer Proteins In Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 627–654.

Kasera, R., Singh, A.B., Kumar, R., Lavasa, S., Prasad, K.N., Arora, N. 2012. Effect of thermal processing and γ -irradiation on allergenicity of legume proteins. *Food Chem. Toxicol.*, 50(10): 3456–3461.

Kaya, A., Erkoçoğlu, M., Civelek, E., Çakır, B., Kocabaş, C. N. 2013. Prevalence of confirmed IgE-mediated food allergy among adolescents in Turkey. *Pediatric allergy and immunology: official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 24(5): 456–462.

Kırsaçhoğlu, C.T., Özden, A. 2006. Besin allerjileri. *Güncel Gastroenteroloji*, 10(2): 148-159.

Kodad, O., Estopañán, G., Juan, T., Mamouni, A., Socias i Company, R. 2011. Tocopherol concentration in almond oil: genetic variation and environmental effects under warm conditions. *J. Agric. Food. Chem.*, 59(11): 6137–6141.

Koeberl M., Clarke D., Lopata A., 2014. Next Generation of Food Allergen Quantification Using Mass Spectrometric systems. *J. Proteome Res.*, 13: 3499-3509.

Koppelman, S.J., Vlooswijk, R.A., Knippels, L.M., Helsing, M., Knol, E.F., van Reijsen, F.C., Bruijnzeel-Koomen, C.A. 2001. Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world. *Allergy*, 56(2): 132–137.

Korte, R., Brockmeyer, J. 2016. MRM3-based LC-MS multi-method for the detection and quantification of nut allergens. *Anal. Bioanal. Chem.*, 408(27): 7845–7855.

Korte, R., Lepski, S., Brockmeyer, J. 2016. Comprehensive peptide marker identification for the detection of multiple nut allergens using a non-targeted LC–HRMS multi-method. *Anal. Bioanal. Chem.*, 408(12): 3059.

Korte R, Oberleitner D, Brockmeyer J. 2019. Determination of food allergens by LC-MS: Impacts of sample preparation, food matrix, and thermal processing on peptide detectability and quantification. *J. Proteomics*, 196: 131-140.

Köksel, H., Köroğlu, D., Popping B. 2011. Gıda Alerjenleri ve AB Yönetmelikleri. 7. Gıda Mühendisliği Kongresi, 24-26 Kasım 2011, Başkent Öğretmenevi, Ankara.

Krebitz, M., Wagner, B., Ferreira, F., Peterbauer, C., Campillo, N., Witty, M., Kolarich, D., Steinkellner, H., Scheiner, O., Breiteneder, H. 2003. Plant-based Heterologous Expression of Mal d 2, a Thaumatin-like Protein and Allergen of Apple (*Malus domestica*), and its Characterization as an Antifungal Protein. *Journal of Molecular Biology*, 329(4): 721.

Kruger, N.J. 2009. The Bradford method for protein quantitation: The Protein Protocols Handbook. Editor: Walker, J. M., Springer, pp:17–24.

Kulis, M., Macqueen, I., Li, Y., Guo, R., Zhong, X.P., Burks, A.W. 2012. Pepsinized cashew proteins are hypoallergenic and immunogenic and provide effective immunotherapy in mice with cashew allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 130(3): 716–723.

Küden, B.A., Küden, A., Bayazit, S., Çömlekçioğlu, S., İmrak, B., Rehber Dikkaya, Y. 2014. Badem Yetiştiriciliği. TAGEP Proje No:5.2.3.1. Şeftali, Nektarin, Badem ve Elma Çeşit Adaptasyonu Projesi (KKTC– Güzelyurt ve Türkmenköy Ekolojik Koşullarında Bazı Şeftali, Nektarin, Badem ve Elma Çeşitlerinin Meyve Verim ve Kalitesinin Saptanması). Okman Matbaası. Adana. 17s.

Kvenshagen, B., Halvorsen, R., Jacobsen, M. 2009. Is there an increased frequency of food allergy in children delivered by caesarean section compared to those delivered vaginally?. *Acta paediatrica*, 98(2): 324–327.

Lamberti, C., Nebbia, S., Antoniazzi, S., Cirrincione, S., Marengo, E., Manfredi, M., Smorgon, D., Monti, G., Faccio, A., Giuffrida, M.G., Balestrini, R., Cavallarin, L. 2021. Effect of hot air and infrared roasting on hazelnut allergenicity. *Food Chem.*, 342: 128174.

Lao-araya, M., Trakultivakorn, M. 2012. Prevalence of food allergy among preschool children in northern Thailand. *Pediatrics international: official journal of the Japan Pediatric Society*, 54(2): 238–243.

Lattanzio, V.M.T. 2020. Introduction to the Toxins Special Issue on Improved Analytical Technologies for the Detection of Natural Toxins and Their Metabolites in Food. *Toxins*, 12(8): 467.

- Lauer, I., Foetisch, K., Kolarich, D., Ballmer-Weber, B.K., Conti, A., Altmann, F., Vieths, S., Scheurer, S. 2004.** Hazelnut (*Corylus avellana*) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity. *Biochem. J.*, 383(Pt 2): 327–334.
- Lauer, I., Alessandri, S., Pokoj, S., Reuter, A., Conti, A., Vieths, S., Scheurer S. 2008.** Expression and characterization of three important panallergens from hazelnut. *Mol. Nutr. Food Res.*, 52: 262-271.
- Lee, J.Y., Kim, C J. 2010.** Determination of allergenic egg proteins in food by protein-, mass spectrometry-, and DNA-based methods. *Journal of AOAC International*, 93(2), 462–477.
- L'Hocine, L., Boye, J.I., Munyana, C. 2007.** Detection and quantification of soy allergens in food: study of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Food Sci.*, 72(3): C145–C153.
- Li, H., Yu, J., Ahmedna, M., Goktepe, I. 2013.** Reduction of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2, in roasted peanuts by ultrasound assisted enzymatic treatment. *Food Chem.*, 141(2): 762–768.
- Loh, W., Tang, M.L.K. 2018.** The epidemiology of food allergy in the global context. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 15:1-9.
- López, E., Cuadrado, C., Burbano, C., Jiménez, M.A., Rodríguez, J., Crespo, J.F. 2012.** Effects of autoclaving and high pressure on allergenicity of hazelnut proteins. *Journal of Clinical Bioinformatics*, 2(1), 12.
- López-Pedrouso, M., Lorenzo, J.M., Gagaoua, M., Franco, D. 2020.** Current Trends in Proteomic Advances for Food Allergen Analysis. *Biology*, 9(9): 247.
- Løvik, M. 2010.** Considerations on Developing Criteria to Determine Whether a Food Allergen is of Public Health Importance. *Food Anal. Methods*, 3(4): 339.
- Lu, X., DeFelippis, M.R., Huang, L. 2009.** Linear epitope mapping by native mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 395: 100–107.
- Luo, C., Hu, C., Gao, J., Li, X., Wu, Z., Yang, A., Chen, H. 2013.** A potential practical approach to reduce Ara h 6 allergenicity by gamma irradiation. *Food Chem.*, 136(3-4), 1141–1147.
- Ma, X., Ge, Y., Zhang, J., Huang, W., Han, J., Chen, Y., Li, H., Sun, J. 2020.** Comprehensive quantification of sesame allergens in processed food using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Control*, 107, 106744.
- Maleki, S.J., Hurlburt, B.K. 2004.** Structural and functional alterations in major peanut allergens caused by thermal processing. *Journal of AOAC International*, 87(6): 1475–1479.

Mandalari, G., Mackie, A.R. 2018. Almond Allergy: An Overview on Prevalence, Thresholds, Regulations and Allergen Detection. *Nutrients*, 10(11): 1706.

Mann, M., Hendrickson, R.C., Pandey, A. 2001. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual review of biochemistry*, 70: 437–473.

Marzano, V., Tilocca, B., Fiocchi, A.G., Vernocchi, P., Levi Mortera, S., Urbani, A., Roncada, P., Putignani, L. 2020. Perusal of food allergens analysis by mass spectrometry-based proteomics. *J. Proteomics*, 215, 103636.

Masiri, J., Benoit, L., Meshgi, M., Day, J., Nadala, C., Samadpour, M. 2016. A Novel Immunoassay Test System for Detection of Modified Allergen Residues Present in Almond-, Cashew-, Coconut-, Hazelnut-, and Soy-Based Nondairy Beverages. *J. Food Prot.*, 79(9): 1572–1582.

Masthoff, L.J., Hoff, R., Verhoeckx, K.C., van Os-Medendorp, H., Michelsen-Huisman, A., Baumert, J.L., Pasmans, S.G., Meijer, Y., Knulst, A.C. 2013. A systematic review of the effect of thermal processing on the allergenicity of tree nuts. *Allergy*, 68(8): 983–993.

McWilliam, V., Koplin, J., Lodge, C., Tang, M., Dharmage, S., Allen, K. 2015. The Prevalence of Tree Nut Allergy: A Systematic Review. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 15(9): 54.

Meinlschmidt, P., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P. 2016a. Soy protein hydrolysates fermentation: Effect of debittering and degradation of major soy allergens. *LWT - Food Sci. Technol.*, 71: 202–212.

Meinlschmidt, P., Ueberham, E., Lehmann, J., Reineke, K., Schlüter, O., Schweiggert-Weisz, U. ve Eisner, P. 2016b. The effects of pulsed ultraviolet light, cold atmospheric pressure plasma, and gamma-irradiation on the immunoreactivity of soy protein isolate. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 38(Part B): 374–383.

Messina, M., Venter, C. 2020. Recent Surveys on Food Allergy Prevalence. *Nutrition Today*, 55(1): 22–29.

Meyer-Pittroff, R., Behrendt, H., Ring, J. 2007. Specific immuno-modulation and therapy by means of high pressure treated allergens. *High Pressure Research*, 27(1): 63–67.

Mills, E. N., Jenkins, J., Marigheto, N., Belton, P.S., Gunning, A.P., Morris, V.J. 2002. Allergens of the cupin superfamily. *Biochem. Soc. Trans.*, 30(Pt 6): 925–929.

Mills, C.E., Sancho, A.I., Moreno, J., Kostyra, H. 2007. The effects of food processing on allergens: Managing Allergens in Food, Editorler: Mills, C., Wichers, H., Hoffmann-Sommergruber, K., Boca Raton, Florida, s.117–133.

Mills, E.N., Mackie, A.R. 2008. The impact of processing on allergenicity of food. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 8(3): 249–253.

Monaci, L., Nørgaard, J.V., Van Hengel, A.J. 2010. Feasibility of a capillary LC/ESI-Q-TOF MS method for the detection of milk allergens in an incurred model food matrix. *Analytical Methods*, 2(7): 967–972.

Monaci, L., Brohée, M., Tregoat, V., van Hengel, A. 2011. Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA. *Food Chem.*, 127(2): 669–675.

Moreno, F.J., Clemente, A. 2008. 2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens?. *The Open Biochemistry Journal*, 2: 16–28.

Nakamura, A., Watanabe, K., Ojima, T., Ahn, D.H., Saeki, H. 2005. Effect of maillard reaction on allergenicity of scallop tropomyosin. *J. Agric. Food. Chem.*, 53(19): 7559–7564.

Nakamura, R., Teshima, R. 2013. Proteomics-based allergen analysis in plants. *J. Proteomics*, 93: 40–49.

Nitride, C., Nørgaard, J., Omar, J., Emons, H., Estes, M.M., O'Connor, G. 2019. An assessment of the impact of extraction and digestion protocols on multiplexed targeted protein quantification by mass spectrometry for egg and milk allergens. *Anal. Bioanal. Chem.*, 411(16): 3463–3475.

Noorbakhsh, R., Mortazavi, S.A., Sankian, M., Shahidi, F., Maleki, S.J., Nasiraii, L.R., Falak, R., Sima, H.R., Varasteh, A. 2010. Influence of processing on the allergenic properties of pistachio nut assessed in vitro. *J. Agric. Food. Chem.*, 58(18), 10231–10235.

Nwaru, B.I., Hickstein, L., Panesar, S.S., Roberts, G., Muraro, A., Sheikh, A., EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. 2014. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 69(8): 992–1007.

Obeng, B.B., Amoah, A.S., Larbi, I.A., Yazdanbakhsh, M., van Ree, R., Boakye, D.A., Hartgers, F.C. 2011. Food allergy in Ghanaian schoolchildren: data on sensitization and reported food allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 155(1): 63–73.

Onwude, D.I., Hashim, N., Janius, R., Abdan, K., Chen, G., Oladejo, A.O. 2017. Nonthermal hybrid drying of fruits and vegetables: A review of current technologies. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 43: 223–238.

Orem, A., Yucesan, F.B., Orem, C., Akcan, B., Kural, B.V., Alasalvar, C., Shahidi, F. 2013. Hazelnut-enriched diet improves cardiovascular risk biomarkers beyond a lipid-lowering effect in hypercholesterolemic subjects. *J. Clin. Lipidol.*, 7(2): 123–131.

- Ortolani, C., Ballmer-Weber, B.K., Hansen, K.S., Ispano, M., Wüthrich, B., Bindslev-Jensen, C., Ansaloni, R., Vannucci, L., Pravettoni, V., Scibilia, J., Poulsen, L.K., Pastorello, E.A. 2000.** Hazelnut allergy: a double-blind, placebo-controlled food challenge multicenter study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 105(3): 577–581.
- Palomares, O., Villalba, M., Quiralte, J., Polo, F., Rodríguez, R. 2005.** 1,3- β -glucanases as candidates in latex–pollen–vegetable food cross-reactivity. *Clin. Exp. Allergy*, 35: 345-351.
- Palosuo, K., Varjonen, E., Kekki, O.M., Klemola, T., Kalkkinen, N., Alenius, H., Reunala, T. 2001.** Wheat omega-5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108(4): 634–638.
- Parker, C.H., Khuda, S.E., Pereira, M., Ross, M.M., Fu, T.J., Fan, X., Wu, Y., Williams, K.M., DeVries, J., Pulvermacher, B., Bedford, B., Zhang, X., Jackson, L.S. 2015.** Multi-allergen Quantitation and the Impact of Thermal Treatment in Industry-Processed Baked Goods by ELISA and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.*, 63(49): 10669–10680.
- Paschke, A. 2009.** Aspects of food processing and its effect on allergen structure. *Molecular nutrition & food research*, 53(8): 959–962.
- Pastorello, E.A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ispano, M., Conti, A., Ansaloni, R., Rotondo, F., Incorvaia, C., Bengtsson, A., Rivolta, F., Trambaioli, C., Previdi, M., Ortolani, C. 1998.** Sensitization to the major allergen of Brazil nut is correlated with the clinical expression of allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 102(6 Pt 1): 1021–1027.
- Pastorello, E A., Pravettoni, V., Farioli, L., Ispano, M., Fortunato, D., Monza, M., Giuffrida, M.G., Rivolta, F., Scibola, E., Ansaloni, R., Incorvaia, C., Conti, A., Ortolani, C. 1999.** Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen. *The J. Allergy Clin. Immunol.*, 104(5): 1099–1106.
- Pastorello, E.A., D'Ambrosio, F.P., Pravettoni, V., Farioli, L., Giuffrida, G., Monza, M., Ansaloni, R., Fortunato, D., Scibola, E., Rivolta, F., Incorvaia, C., Bengtsson, A., Conti, A., Ortolani, C. 2000.** Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot. *The J. Allergy Clin. Immunol.*, 105(2 Pt 1): 371–377.
- Pastorello, E.A., Varin, E., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Trambaioli, C., Fortunato, D., Giuffrida, M.G., Rivolta, F., Robino, A., Calamari, A.M., Lacava, L., Conti, A. 2001.** The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 756(1-2): 85–93.
- Pedreschi, R., Nørgaard, J., Maquet, A. 2012.** Current challenges in detecting food allergens by shotgun and targeted proteomic approaches: a case study on traces of peanut allergens in baked cookies. *Nutrients*, 4(2), 132–150.

Peng, J., Meng, X., Deng, X., Zhu, J., Kuang, H., Xu, C. 2014. Development of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of ovalbumin in foods. *Food Agr. Immunol.*, 25(1): 1–8.

Pereira-Barros, M.A., Barroso, M.F., Martín-Pedraza, L., Vargas, E., Benedé, S., Villalba, M., Rocha, J.M., Campuzano, S., Pingarrón, J.M. 2019. Direct PCR-free electrochemical biosensing of plant-food derived nucleic acids in genomic DNA extracts. Application to the determination of the key allergen Sola l 7 in tomato seeds. *Biosens. Bioelectron.*, 137: 171–177.

Pescuma, M., Hébert, E.M., Rabesona, H., Drouet, M., Choiset, Y., Haertlé, T., Mozzi, F., de Valdez, G.F., Chobert, J.M. 2011. Proteolytic action of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 656 reduces antigenic response to bovine β -lactoglobulin. *Food Chem.*, 127(2): 487–492.

Peters, R. L., Koplin, J. J., Gurrin, L. C., Dharmage, S. C., Wake, M., Ponsonby, A. L., Tang, M., Lowe, A. J., Matheson, M., Dwyer, T., Allen, K. J. 2017. The prevalence of food allergy and other allergic diseases in early childhood in a population-based study: HealthNuts age 4-year follow-up. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 140(1): 145–153.

Peterson, A.C., Russell, J.D., Bailey, D.J., Westphall, M.S., Coon, J.J. 2012. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, 11: 1475–1488.

Petrulakova, M., Valik, L. 2015. Food allergy and intolerance. *Acta Chimica Slovaca*, 8(1): 44-51.

Peyron, S., Mouécoucou, J., Frémont, S., Sanchez, C., Gontard, N. 2006. Effects of heat treatment and pectin addition on beta-lactoglobulin allergenicity. *J. Agric. Food. Chem.*, 54(15): 5643–5650.

Pfeifer, S., Bublin, M., Dubiela, P., Hummel, K., Wortmann, J., Hofer, G., Keller, W., Radauer, C., Hoffmann-Sommergruber, K. 2015. Cor a 14, the allergenic 2S albumin from hazelnut, is highly thermostable and resistant to gastrointestinal digestion. *Mol. Nutr. Food Res.*, 59(10): 2077–2086.

Phizicky, E., Bastiaens, P.I., Zhu, H., Snyder, M., Fields, S. 2003. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature*, 422(6928): 208–215.

Pilolli, R., Van Poucke, C., De Angelis, E., Nitride, C., de Loose, M., Gillard, N., Huet, A.C., Tranquet, O., Larré, C., Adel-Patient, K., Bernard, H., Mills, E.N.C., Monaci, L. 2021. Discovery based high resolution MS/MS analysis for selection of allergen markers in chocolate and broth powder matrices. *Food Chemistry*, 343.

Planque, M., Arnould, T., Dieu, M., Delahaut, P., Renard, P., Gillard, N. 2016. Advances in ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass

spectrometry for sensitive detection of several food allergens in complex and processed foodstuffs. *J. Chromatogr. A.*, 1464: 115–123.

Poms, R.E., Capelletti, C., Anklam, E. 2004. Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency. *Mol. Nutr. Food Res.*, 48(6): 459–464.

Prandi, B., Faccini, A., Tedeschi, T., Galaverna, G., Sforza, S. 2013. LC/MS analysis of proteolytic peptides in wheat extracts for determining the content of the allergen amylase/trypsin inhibitor CM3: Influence of growing area and variety. *Food Chem.*, 140(1–2): 141–146.

Prester L. 2016. Seafood Allergy, Toxicity, and Intolerance: A Review. *J. Am. Coll. Nutr.*, 35(3): 271–283.

Pushpa, B.P., Bhat, G.S., Jayaprakasha, H.M. 2018. Effect of heat treatment and enzymatic hydrolysis on reduction in allergenicity of milk proteins. *Indian J. Nutr. Diet.*, 55(2): 156–165.

Ramachandran, S., Christensen, H.E., Ishimaru, Y., Dong, C.H., Chao-Ming, W., Cleary, A.L., Chua, N.H. 2000. Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 124(4): 1637–1647.

Ramirez, A., Bahna, S.L. 2009. Food hypersensitivity by inhalation. *Clin. Mol. Allergy*, 7: 4.

Ribeiro, M., Costa, J., Mafra, I., Cabo, S., Silva, A.P., Gonçalves, B., Hillion, M., Hébraud, M., Igrejas, G. 2020. Natural Variation of Hazelnut Allergenicity: Is There Any Potential for Selecting Hypoallergenic Varieties?. *Nutrients*, 12(7), 2100.

Rigby, N.M., Marsh, J., Sancho, A.I., Wellner, K., Akkerdaas, J., van Ree, R., Knulst, A., Fernández-Rivas, M., Brettlova, V., Schilte, P.P., Summer, C., Pumphrey, R., Shewry, P.R., Mills, E.N. 2008. The purification and characterisation of allergenic hazelnut seed proteins. *Mol. Nutr. Food Res.*, 52 Suppl 2: S251–S261.

Ring, J. (2005). Allergy in Practice. Springer Berlin Heidelberg, <https://0210022ht-y-https-link-springer-com.proxy.uludag.deep-knowledge.net/book/10.1007%2Fb137849-> (Erişim tarihi: 10.09.2020).

Rizzello, C.G., Nionelli, L., Coda, R., Gobetti, M. 2012. Synthesis of the cancer preventive peptide lunasin by lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Nutrition and Cancer*, 64(1), 111–120.

Roehr, C. C., Edenharter, G., Reimann, S., Ehlers, I., Worm, M., Zuberbier, T., Niggemann, B. 2004. Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 34(10): 1534–1541.

Rona, R.J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S.T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., McBride, D., Madsen, C. 2007. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 120(3): 638–646.

Roux, K.H., Teuber, S.S., Sathe, S.K. 2003. Tree nut allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 131(4): 234–244.

Sagu, S.T., Zimmermann, L., Landgräber, E., Homann, T., Huschek, G., Özpınar, H., Schweigert, F.J. 2020. Comprehensive Characterization and Relative Quantification of α -Amylase/Trypsin Inhibitors from Wheat Cultivars by Targeted HPLC-MS/MS. *Foods*, 9(10), 1448.

Samady, W., Warren, C., Wang, J., Das, R., Gupta, R.S. 2020. Egg Allergy in US Children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 8(9): 3066–3073.e6.

Sapan, N., Demir, E., Tamay, Z., Akçakaya, N., Güler, N., Yazıcıoğlu, M., Karaman, Ö., Akçay, A., Öneş Ü. 2013. “Çocuk alerji ve astım akademisi”, besin alerjisi tanı ve tedavi protokolü. *Türk Pediatri Arşivi Dergisi*, 270-274.

Sathe, S.K., Wolf, W.J., Roux, K.H., Teuber, S.S., Venkatachalam, M., Sze-Tao, K.W.C. 2002. Biochemical characterization of amandin, the major storage protein in almond (*Prunus Dulcis* L.). *J. Agric. Food. Chem.*, 50: 4333–4341.

Sathe, S.K., Sharma, G.M. 2009. Effects of food processing on food allergens. *Mol. Nutr. Food Res.*, 53(8): 970–978.

Schalk, K., Lexhaller, B., Koehler, P., Scherf, K.A. 2017. Isolation and characterization of gluten protein types from wheat, rye, barley and oats for use as reference materials. *PloS one*, 12(2): e0172819.

Schocker, F., Lüttkopf, D., Müller, U., Thomas, P., Vieths, S., Becker, W.M. 2000. IgE binding to unique hazelnut allergens: identification of non pollen-related and heat-stable hazelnut allergens eliciting severe allergic reactions. *Eur. J. Nutr.*, 39(4): 172–180.

Schubert-Ullrich, P., Rudolf, J., Ansari, P., Galler, B., Führer, M., Molinelli, A., Baumgartner, S. 2009. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Anal. Bioanal. Chem.*, 395(1): 69–81.

Sealey-Voyksner, J., Zweigenbaum, J., Voyksner, R. (2016). Discovery of highly conserved unique peanut and tree nut peptides by LC-MS/MS for multi-allergen detection. *Food Chem.*, 194, 201–211.

Sena-Torralba, A., Pallás-Tamarit, Y., Morais, S., Maquieira, Á. 2020. Recent advances and challenges in food-borne allergen detection. *Trends Analyt. Chem.*, 132.

Shefcheck, K.J., Musser, S.M. 2004. Confirmation of the allergenic peanut protein, Ara h 1, in a model food matrix using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J. Agric. Food. Chem.*, 52(10): 2785–2790.

Shewry, P.R., Napier, J.A., Tatham, A.S. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7): 945–956.

Shriver, S.K. 2011. Effect of selected nonthermal processing methods on the allergen reactivity of Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*). *Master Thesis*, Graduate School Of The University Of Florida, USA.

Sicherer, S.H., Muñoz-Furlong, A., Sampson, H.A. 2003. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 112(6): 1203–1207.

Sicherer, S.H., Muñoz-Furlong, A., Sampson, H.A. 2004. Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 114(1): 159–165.

Sicherer, S.H., Sampson, H.A. 2010. Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 125(2 Suppl 2): S116–S125.

Silva, L.A., Silva, A.F., Ribeiro, Â.C., Silva, A.O., Vieira, F.A., Segundo, G. R. 2016. Adult Food Allergy Prevalence: Reducing Questionnaire Bias. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 171(3-4): 261–264.

Skripak J.M., Matsui E.C., Mudd K., Wood R.A. 2007. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120: 1172–1177.

Sloane, D., Sheffer, A. 2001. Oral allergy syndrome. *Allergy Asthma Proc.*, 22(5): 321–325.

Stiefel, G., Anagnostou, K., Boyle, R.J., Brathwaite, N., Ewan, P., Fox, A.T., Huber, P., Luyt, D., Till, S.J., Venter, C., Clark, A.T. 2017. BSACI guideline for the diagnosis and management of peanut and tree nut allergy. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 47(6): 719–739.

Sudha, M. L., Soumya, C., Prabhasankar, P. 2016. Use of dry-moist heat effects to improve the functionality, immunogenicity of whole wheat flour and its application in bread making. *J. Cereal Sci.*, 69: 313–320.

Suh, S.M., Park, S.B., Kim, M.J., Kim, H.Y. 2019. Simultaneous detection of fruit allergen-coding genes in tomato, apple, peach and kiwi through multiplex PCR. *Food Sci. Biotechnol.*, 28(5): 1593–1598.

Sze-Tao, K.W.C., Sathe, S.K. 2000. Walnuts (*Juglans regia* L): proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein *in vitro* digestibility. *J. Sci. Food. Agric.*, 80: 1393-1401.

- Taheri-Kafrani, A., Gaudin, J.C., Rabesona, H., Nioi, C., Agarwal, D., Drouet, M., Chobert, J. M., Bordbar, A.K., Haertle, T. 2009.** Effects of heating and glycation of beta-lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cow milk allergy patients. *J. Agric. Food. Chem.*, 57(11): 4974–4982.
- Tamang, J.P., Watanabe, K., Holzapfel, W.H. 2016.** Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7, 377.
- Tammineedi, C.V.R.K., Choudhary, R., Perez-Alvarado, G.C., Watson, D.G. 2013.** Determining the effect of UV-C, high intensity ultrasound and nonthermal atmospheric plasma treatments on reducing the allergenicity of α -casein and whey proteins. *LWT - Food Sci. Technol.*, 54(1): 35–41.
- Tawde, P., Venkatesh, Y.P., Wang, F., Teuber, S.S., Sathe, S.K., Roux, K. H. 2006.** Cloning and characterization of profilin (Pru du 4), a cross-reactive almond (*Prunus dulcis*) allergen. *The J. Allergy Clin. Immunol.*, 118(4): 915–922.
- Teuber, S.S., Dandekar, A.M., Peterson, W.R., Sellers, C.L. 1998.** Cloning and sequencing of a gene encoding a 2S albumin seed storage protein precursor from English walnut (*Juglans regia*), a major food allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 101(6 Pt 1): 807–814.
- Thakur, M.S., Ragavan, K.V. 2013.** Biosensors in food processing. *J. Food Sci. Technol.*, 50(4): 625–641.
- Thomas, S.N. 2011.** Mass spectrometry: Contemporary practice in clinical chemistry. Editörler: Clarke, W., Marzinke, M., Elsevier, pp: 171-184.
- Tobajas, A.P., Agulló-García, A., Cubero, J.L., Colás, C., Segura-Gil, I., Sánchez, L., Calvo, M., Pérez, M.D. 2020.** Effect of high pressure and pulsed electric field on denaturation and allergenicity of Pru p 3 protein from peach. *Food Chem.*, 321: 126745.
- Török, K., Hajas, L., Horváth, V., Schall, E., Bugyi, Z., Kemény, S., Tömösközi, S. 2015.** Identification of the factors affecting the analytical results of food allergen ELISA methods. *Eur. Food Res. Technol.*, 241(1): 127–136.
- Turnbull, J.L., Adams, H.N., Gorard, D.A. 2015.** Review article: the diagnosis and management of food allergy and food intolerances. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 41(1): 3–25.
- Untersmayr, E., Vestergaard, H., Malling, H.J., Jensen, L.B., Platzer, M.H., Boltz-Nitulescu, G., Scheiner, O., Skov, P.S., Jensen-Jarolim, E., Poulsen, L.K. 2007.** Incomplete digestion of codfish represents a risk factor for anaphylaxis in patients with allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 119(3): 711–717.
- Urade, R., Sato, N., Sugiyama, M. 2018.** Gliadins from wheat grain: an overview, from primary structure to nanostructures of aggregates. *Biophysical reviews*, 10(2): 435–443.

- Valenta, R., Duchene, M. 1991.** Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*, 253: 557.
- van Boxtel, E.L., Gruppen, H., Koppelman, S.J., van den Broek, L.A.M. 2008.** Heat denaturation of Brazil nut allergen Ber e 1 in relation to food processing. *Food Chem.*, 110(4), 904–908.
- van Hengel A.J. 2007.** Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389(1): 111–118.
- van Ree R. 2002.** Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochemical Society transactions*, 30(Pt 6): 910–913.
- Van Vlierberghe, K., Gavage, M., Dieu, M., Renard, P., Arnould, T., Gillard, N., Coudijzer, K., De Loose, M., Gevaert, K., Van Poucke, C. 2020.** Selection of universal peptide biomarkers for the detection of the allergen hazelnut in food through a comprehensive, high resolution mass spectrometric (HRMS) based approach. *Food Chem.*, 309: 125679.
- Venkatachalam, M., Teuber, S.S., Roux, K.H., Sathe, S.K. 2002.** Effects of roasting, blanching, autoclaving, and microwave heating on antigenicity of almond (*Prunus dulcis* L.) proteins. *J. Agric. Food. Chem.*, 50(12): 3544–3548.
- Venkataratnam, H., Cahill, O., Sarangapani, C., Cullen, P.J. ve Barry-Ryan, C. 2020.** Impact of cold plasma processing on major peanut allergens. *Scientific Reports*, 10(1).
- Venter, C., Pereira, B., Grundy, J., Clayton, C.B., Roberts, G., Higgins, B., Dean, T. 2006.** Incidence of parentally reported and clinically diagnosed food hypersensitivity in the first year of life. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 117(5): 1118–1124.
- Verhoeckx, K., Vissers, Y.M., Baumert, J.L., Faludi, R., Feys, M., Flanagan, S., Herouet-Guicheney, C., Holzhauser, T., Shimojo, R., van der Bolt, N., Wichers, H., Kimber, I. 2015.** Food processing and allergenicity. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 80: 223–240.
- Verweij, M.M., Hagendorens, M.M., Trashin, S., Cucu, T., De Meulenaer, B., Devreese, B., Bridts, C.H., De Clerck, L.S., Ebo, D.G. 2012.** Age-dependent sensitization to the 7S-vicilin-like protein Cor a 11 from hazelnut (*Corylus avellana*) in a birch-endemic region. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 22(4): 245–251.
- Viñas, M., Carnés, J., López-Matas, M.A., Hernández, N., Castillo, M.J., Ibero, M. 2014.** Allergy to goat and sheep cheese with tolerance to cow's milk and its derivatives. *Allergologia et immunopathologia*, 42(3): 186–190.

Wal J.M. 2002. Cow's milk proteins/allergens. *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 89(6 Suppl 1): 3–10.

Wal, J. 2003. Thermal processing and allergenicity of foods. *Allergy*, 58: 727-729.

Warner, J.O., Kaliner, M.A., Crisci, C.D., Del Giacco, S., Frew, A. J., Liu, G.H., Maspero, J., Moon, H.B., Nakagawa, T., Potter, P.C., Rosenwasser, L., Singh, A.B., Valovirta, E., Van Cauwenberge, P. 2006. Allergy Practice Worldwide: A Report by the World Allergy Organization Specialty and Training Council. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 139(2): 166–174.

Wigotzki, M., Steinhart, H., Paschke, A. 2000. Influence of Varieties, Storage and Heat Treatment on IgE-Binding Proteins in Hazelnuts (*Corylus avellana*). *Food Agric. Immunol.*, 12(3), 217.

Wu, Z., Zhou, N., Xiong, F., Li, X., Yang, A., Tong, P., Tang, R., Chen, H. 2016. Allergen composition analysis and allergenicity assessment of Chinese peanut cultivars. *Food Chem.*, 196, 459–465.

Xiong, L.J., Xie, X.L., Li, Y., Deng, X.Z. 2021. Current status of fecal calprotectin as a diagnostic or monitoring biomarker for cow's milk protein allergy in children: a scoping review. *World Journal of Pediatrics*, 17(1): 63.

Yada, S., Lapsley, K., Huang, G. 2011. A review of composition studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients. *J. Food Compos. Anal.*, 24(4/5): 469–480.

Yamamoto, S., Mikami, N., Matsuno, M., Hara, T., Odani, S., Suzuki, A., Nishiumi, T. 2010. Effects of a high-pressure treatment on bovine gamma globulin and its reduction in allergenicity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74(3), 525–530.

Yang, H., Gao, J., Yang, A., Chen, H. 2015. The ultrasound-treated soybean seeds improve edibility and nutritional quality of soybean sprouts. *Food Res. Int.*, 77(4): 704–710.

Yang, A., Zuo, L., Cheng, Y., Wu, Z., Li, X., Tong, P., Chen, H. 2018. Degradation of major allergens and allergenicity reduction of soybean meal through solid-state fermentation with microorganisms. *Food and Function*, 9(3): 1899–1909.

Yao, M., Xu, Q., Luo, Y., Shi, J., Li, Z. 2015. Study on reducing antigenic response and IgE-binding inhibitions of four milk proteins of *Lactobacillus casei* 1134. *J. Sci. Food. Agric.*, 95(6), 1303–1312.

Yu, C.J., Lin, Y.F., Chiang, B.L., Chow, L.P. 2003. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(1): 445–453.

Yuan, D., Kong, J., Li, X., Fang, X., Chen, Q. 2018. Colorimetric LAMP microfluidic chip for detecting three allergens: peanut, sesame and soybean. *Scientific Reports*, 8(1): 8682.

Zaffran, D. 2016. Effects of Thermal Processing on Structure and Immunoreactivity of Amandin, Almond (*Prunus dulcis* L.) Major Protein. *Master Tezi*, Florida State University, College Of Human Sciences.

Zhang, Y., Zhang, J., Sheng, W., Wang, S., Fu, T. 2016. Effects of heat and high-pressure treatments on the solubility and immunoreactivity of almond proteins, *Food Chem.*, 199: 856-861.

Zhang, Y., Jin, T. 2020. Almond allergens: update and perspective on identification and characterization. *J. Sci. Food. Agric.*, 100(13): 4657–4663.

Zheng, C., Wang, X., Lu, Y., Liu, Y. 2012. Rapid detection of fish major allergen parvalbumin using superparamagnetic nanoparticle-based lateral flow immunoassay. *Food Control*, 26(2): 446–452.

Zhenxing, L., Caolimin, L., Jamil, K. 2006. Reduction of allergenic properties of shrimp (*Penaeus Vannamei*) allergens by high intensity ultrasound. *Eur. Food Res. Technol.*, 223(5): 639.

Zhu, H., Bilgin, M., Snyder, M. 2003. Proteomics. *Annual Review of Biochemistry*, 72: 783–812.

Zuidmeer, L., Goldhahn, K., Rona, R.J., Gislason, D., Madsen, C., Summers, C., Sodergren, E., Dahlstrom, J., Lindner, T., Sigurdardottir, S.T., McBride, D., Keil, T. 2008. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 121(5): 1210–1218.e4.

Zuidmeer-Jongejan, L., Fernández-Rivas, M., Winter, M.G., Akkerdaas, J.H., Summers, C., Lebens, A., Knulst, A.C., Schilte, P., Briza, P., Gadermaier, G., van Ree, R. 2014. Oil body-associated hazelnut allergens including oleosins are underrepresented in diagnostic extracts but associated with severe symptoms. *Clinical and translational allergy*, 4(1): 4.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nurcan AYŞAR GÜZELSOY
Doğum Yeri ve Tarihi : Mustafakemalpaşa, 09.09.1979
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu
Lise : MKP Anadolu Öğretmen Lisesi
Lisans : Ege Üniversitesi/Gıda Mühendisliği
Yüksek Lisans :Uludağ Üniversitesi/Kimya Anabilim Dalı

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü

İletişim (e-posta) : nurcan.aysarguzelsoy@tarimorman.gov.tr

Yayımlar

Ayşar Güzelsoy, N., Çavuş, F., Akgün, B., Şahan, Y. 2021. Effect of Thermal Processing on Food Allergens. X Food Technology International Symposium, 17-21 May 2021, Murcia, Spain.

Çavuş, F., Ayşar Güzelsoy, N., Akgün, B. 2021. Aroma Characterization Of Virgin Olive Oil From Five Turkish Olive Varieties By SPME/GC/QTOF MS. X Food Technology International Symposium, 17-21 May 2021, Murcia, Spain.

Ayşar Güzelsoy N., Çavuş F., Kaçar O. 2020. Discrimination of *Thymus*, *Origanum*, *Satureja* and *Thymbra* species from the family Labiatae by untargeted metabolomic analysis. *Czech J. Food Sci.*, 38: 151-157.

Akgün, B., Ayşar Güzelsoy, N., Yavuz, A., İstanbullu, Y., Budaklıer, A. 2019. Alternative Techniques For Fruit and Vegetable Waste Valorization in Turkey. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 22: 45-53.

Hunter, D., Borelli, T., Beltrame, D., Oliveira, C., Coradin, L., Wasike, V. W., Wasilwa, L., Mwai, J., Manjella, A., Samarasinghe, G., Madhujith, T., Nadeeshani, H., Tan, A., Ay, S. T., Güzelsoy, N., Lauridsen, N., Gee, E., Tartanac, F. 2019. The potential of neglected and underutilized species for improving diets and nutrition. *Planta*, 250(3), 709–729.

Elik, A., Yanik, D. K., İstanbullu, Y., Guzelsoy, N. A., Yavuz, A., Göğüş, F. 2019. Strategies to Reduce Post-Harvest Losses for Fruits and Vegetables. *International Journal of Scientific and Technological Research*, 5(3), 29-39.

Ayşar Güzelsoy, N., Borelli, T., Güner, B., Hunter, D., Beltrame, D.M.O., Wasike, V., Samarasinghe, G., Salantur, A. 2019. Neglected no more: the importance of food

composition data for the conservation and sustainable use of agricultural biodiversity. 13th International Food Data Conference, 14-18 Ekim 2019, Lizbon, Portekiz.

Ayşar Güzelsoy, N., Çavuş, F., Tan, A. 2019. Bioactive compounds content of *Scolymus hispanicus* L. grown in Aegean Region of Turkey. 13th International Food Data Conference, 14-18 Ekim 2019, Lizbon, Portekiz.

Ayşar Güzelsoy, N., Çavuş, F., Şahan, Y. 2019. Determination of Allergen Peptides in Turkish Hazelnut Cultivars with Proteomics Approach. 13th International Food Data Conference, 14-18 Ekim 2019, Lizbon, Portekiz.

Çavuş, F., Us, M., Güzelsoy, N. A. 2018. Antep Fıstığı İçerisine Tağşiş Amacı İle Katılan Bezelyenin Sıvı Kromatografi- Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi İle Kemometrik Olarak Belirlenmesi. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi*, 34-41.

Çavuş, F., Güzelsoy, N. A. 2017. Gıdalarda Coğrafi Orjinin Belirlenmesine Yönelik Analiz Yöntemleri. 10. Gıda Mühendisliği Kongresi, 9-11 Kasım 2017, Antalya.

Çavuş, F., Us, M., Güzelsoy, N. A. 2017. Jelatin Orijininin LC Q-TOF Kullanılarak Kemometrik Olarak Belirlenmesi. 10. Gıda Mühendisliği Kongresi, 9-11 Kasım 2017, Antalya.

Güzelsoy, N. A., Ucurum, Ö., Tokat, E., Tan, A., Tuğrul Ay, S. K. Özbek. 2017. Nutritional Properties of Some Wild Edible Species in Turkey. *ANADOLU, J. of AARI*, 27(2): 39-45.

Özbek, K., Tan, A., Karabak, S., Güzelsoy A.N. , Sarı, N., Duran, R., Taşcı, R., Güner, B., Yücearslan, H., Deniz, D., Aksoy, A. 2017. Biodiversity for Food and Nutrition Project: Black Sea Region Studies. *ANADOLU, J. of AARI*, 27 (2): 17 – 25.

Tan, A., Adanacioğlu, N., Karabak, S., Güzelsoy, N., Tan, A. Ş., Aykas, L. 2017. Sea Beets [*Beta vulgaris subsp. maritima* (L.) Arcang. Wild Edible Beets and Home Garden Beets of Turkey. *ANADOLU, J. of AARI*, 27 (2): 54-61.

Çınar, A., Tuğrul Ay, S., Ayas, F., Karabak, S., Güzelsoy, N., Uçurum, Ö. 2017. Foxtail lilly (*Eremurus spectabilis* M.Bieb) as priority species of biodiversity for “Food and Nutrition Project” of Turkey. *ANADOLU, J. of AARI*, 27(2): 69-73.

Güzelsoy, N. A., Tan, A., Güner, B., Tuğrul Ay, S., Özbek, K., Karabak, S., Arslan, Y. 2017. Linking biodiversity to food and nutrition: Enhancing the contribution of wild edible plants to nutrition in Turkey . International Symposium: Biodiversity for Food and Nutrition, 27-28th November, 2017, Brasilia/Brasil.

Özbek, K., Turgay, O. C., Taşkın, T. Guzelsoy Aysar, N. Deniz, D. 2017. İzmir-Manisa Demiryolu Kenarında Yetiştirilen Bakla (*Vicia FabaL*) Örneklerinde Ni, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn Miktarlarının Araştırılması. 5 International Participation Soil and Water Resources Congress, Kırklareli.

Özbek, K., Turgay, O. C., Taşkın, T. Güzelsoy Aysar, N. Deniz, D. 2017. İzmir-Menemen Karayolu Kenarında Yetiştirilen Bakla (*Vicia Faba L.*)Örneklerinde Ni, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn Miktarlarının Araştırılması. 5 International Participation Soil and Water Resources Congress, Kırklareli.

Güzelsoy, N. A., Tan, A., Güner, B. 2017. Nutrition Indicators for Biodiversity: Food composition & Food consumption. Poster presentation, International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species (BEWS2017), 3-5 April 2017, Antalya, Turkey

Beltrame, D.M.O., Borelli, T., Tan, A., Samarasinghe, G., Wasike, V.,Coradin, L., Oliveira, C.S., Ay, S.T., Ozbek, K., Aysar, N. Hunter, D. 2017. Eat it or lose it! –The nutritional value of plants in promoting sustainable diets and Conservation. State of the World’s Plants Symposium. Royal Botanic Gardens, Kew 25–26 May 2017.

Tan, A, Tuğrul Ay S., Adanacioğlu, N., Güzelsoy Aysar, N., Karabak S., Çınar, A., 2016. Biodiversity for Food and Nutrition: Edible Wild Species, Wild Mushrooms and Underutilized Species of Turkey. The 4th International One Health Congress & 6th Biennial Congress of the International Association for Ecology and Health, 3 - 7 December, Melbourne, Australia.

Güzelsoy, N. A., Ucurum, Ö., Eren, O., Tan, A., Özkan, İ., Güner, B. 2016. Proximate and Mineral Composition of Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Landraces in Turkey. 15th International Cereal and Bread Congress, 18-21 April, 2016, İstanbul.

Adanacioglu, N., Tan, A, Güzelsoy, Aysar, N., Aykas, L., Taş, N., Taylan, T., 2016. Traditional Uses of Wild Edible Plants for Health and Nutrition: A Case Study of Aegean Region of Turkey. The 4th International One Health Congress & 6th Biennial Congress of the International Association for Ecology and Health. 3 - 7 December, Melbourne, Australia.

Tuğrul Ay, S., Çınar, A. Ayas, F., Uçurum, Ö., Tokat, E., Güzelsoy, N. 2015.*Gypsophyla arrostii* and *Ferulago trachycarpa* Species from Medicinal Foods in Mediterranean Region of “Mainstreaming biodiversity conservation and sustainable use for improved human nutrition and wellbeing” Project. Poster presentation. 19th International Conference of FFC - 7th International Symposium of ASFFBC. 17-18 November 2015, Kobe University, Kobe, Japan.

Güzelsoy, N. A., Ucurum, Ö., Tokat, E., Tan, A., Ozbek, K., Özkan, İ. 2015.Nutrient content of selected biodiverse foods in Turkey. Oral presentation, 11th Food Data Conference, 3-5 November 2015, Hyderabad, India.

Güzelsoy, N. A., Özkan, İ., Guner, B., Tan, A., Ozbek, K. 2015. The importance of food composition data in decision making for agriculture, nutrition and health. Oral presentation, Bioersivity for Improved Nutrition and Health Workshop, 2 November 2015, Hyderabad, India, p.3.

Güzelsoy, N. A., İzgi, B. 2015. Balık Yağı Gıda Takviyelerinde Metal Bulaşanlarının (As, Hg, Cd, Pb) Belirlenmesinde Analitik Parametrelerin Optimizasyonu, *Gıda ve Yem Bilimi- Teknoloji Dergisi*, 15:19-26.

Özkan, İ., Güner, B., Özbek, K., Tan, A., Ay. S., Karabak, S., Güzelsoy, N. 2014. Mainstreaming Biodiversity Conservation and Sustainable Use For Improved Human Nutrition And Wellbeing. Balkan Agricultural Congress, 8-11 September 2014, Edirne.

Altun, N., Güzelsoy, N., İzgi, B. 2014. Determination Of Organochlorine Pesticides And Some Element Residues In Drinking Water By Analytical Techniques. 9th Aegean Analytical Chemistry Days, Chios, Greece.

Güzelsoy, N., İzgi, B. 2013. Optimisation Of Microwave Digestion Procedure For The Determination Of Trace Elements In Fish Oil Supplements By ICP-MS. Eurofoodchem XVII, May 07-10, Istanbul, Turkey.

Güzelsoy, N., İzgi, B. 2012. Determination of Trace Elements In Fish Oil Supplements. 3rd Pak-Turk Conference On Chemical Science, Bursa.

Ersoy, M., Güzelsoy N., İzgi, B. 2010. Trace Element Analysis of Blueberries (*Vaccinium myrtillus*). 1st Trace Element Analysis Congress, 22-25 Nisan 2010, Denizli, p.88.

Ersoy, M., Güzelsoy N., İzgi, B., 2011. Multi-Element Analysis and Antioxidant Activity of blueberries. XII. National Spectroscopy Congress, 18-22 May 2011, Antalya, Poster Award.

Güzelsoy, N., İzgi, B. 2009. Determination of Pb, Fe and Zn Content of Tomato Paste By Line Source and High Resolution Continuum Source AAS. 5th Black Sea Conference On Analytical Chemistry, Ordu, Turkey.