



T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

İŞLEME ESNASINDA SÜTTE BULUNAN ALERJEN PROTEİNLERİN
YAPISINDAKİ DEĞİŞİKLİKLERİN BELİRLENMESİ YÜKSEK
LİSANS TEZİ

AHMET KAYA

MAYIS 2019
UŞAK

Bu proje Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından (TP044 (2017) nolu proje ile) finansal olarak desteklenmiştir.

T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

İŞLEME ESNASINDA SÜTTE BULUNAN ALERJEN
PROTEİNLERİN YAPISINDAKİ DEĞİŞİKLİKLERİN
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AHMET KAYA

MAYIS 2019

UŞAK

Ahmet KAYA tarafından hazırlanan “İşleme Esnasında Sütte Bulunan Alerjen Proteinlerin Yapısındaki Değişikliklerin Belirlenmesi” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Özgür TARHAN

Tez Danışmanı, Gıda Mühendisliği Ana bilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şebnem HARSA

Gıda Mühendisliği Ana bilim Dalı, İzmir Yüksek Tek. Enstitüsü

Dr. Öğr. Üyesi Özgür TARHAN

Gıda Mühendisliği Ana bilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Doç. Dr. Abdullah DİKİCİ

Gıda Mühendisliği Ana bilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Tarih: 23/05/2019

Bu tez ile U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Murat Kemal KARACAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Ahmet KAYA

İŞLEME ESNASINDA SÜTTE BULUNAN ALERJEN PROTEİNLERİN YAPISINDAKİ DEĞİŞİKLİKLERİN BELİRLENMESİ

(Yüksek lisans tezi)

Ahmet KAYA

**UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Mayıs 2019

ÖZET

İnsan beslenmesinde oldukça önemli bir yer tutan süt ve süt ürünlerinin tüketimi protein alerjisi nedeniyle başta çocuklar olmak üzere bazı insanlar için endişe yaratmaktadır. Ana kaynağı süt olan alerjen proteinlerin sütün ürüne işlenmesi sırasında uygulanan bazı işlemler vasıtasıyla alerjen özellikleri azalabilmektedir. Isıl işlem, enzimle muamele, yüksek basınç maruziyeti ve bir takım kimyasal uygulamaların alerjeniteyi azaltmada etkili olabildiği görülmektedir. Protein alerjenitesinin azalması veya yok olması uygulanan işlemlerin proteinin özellikle ikincil yapısında alerjeniteden sorumlu bölgeler olan epitoplarda konformasyonel değişiklikler meydana getirmesi ile gerçekleşmektedir.

Sunulan bu yüksek lisans tezi ile süt ürünleri olan peynir ve yoğurtta, işleme esnasında uygulanan ısı, enzim ve fermantasyonun sütte bulunan alerjen proteinler üzerine etkisi incelenmiştir. İlk olarak Bradford yöntemi kullanılarak süt ürünlerine ait örneklerdeki protein miktarları tespit edilmiştir. Daha sonra poliakrilamid jel elektroforezi ve kapiler elektroforez yardımıyla örnek numunelerin protein profilleri belirlenmiştir. Isı, enzim ve fermantasyon gibi işlemlerin ardından alerjen protein fraksiyonlarındaki yapısal değişiklikler kızılötesi spektroskopi ile incelenmiştir. Süt ve ürünlerinde uygulanan bu işlemlerle alerjen protein içeriğinde ve yapısında değişimler meydana geldiği tespit edilmiştir.

Bilim Kodu :

Anahtar Kelimeler : Alerji, Süt alerjisi, Protein alerjisi, Elektroforez, FT-IR

Sayfa Adedi : 67

Tez Yöneticisi : Dr. Öğretim Üyesi Özgür TARHAN

**DETERMINATION OF CHANGES IN THE STRUCTURE OF ALLERGEN
PROTEINS IN MILK DURING PROCESSING**

(Master Thesis)

Ahmet KAYA

UŞAK UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

May 2019

ABSTRACT

The consumption of milk and milk products, which have great significance in human nutrition, may cause concerns for some people, especially children, due to protein allergy. Allergen properties of milk-based proteins can be reduced by some processes applied during the processing of milk. Heating process, enzyme treatment, exposure to high pressure and a number of chemical applications can be seen as effective in reducing allergenicity in milk. Reduction or elimination of protein allergen may occur due to the conformational changes in the epitopes responsible for allergenicity in the secondary structure of the protein.

In this thesis work, the effect of heat, enzyme and fermentation on the structure of allergen proteins was investigated. The amounts of protein in various samples collected from different stages of dairy production were determined by Bradford method. Protein profiles of the dairy samples were then determined by polyacrylamide gel electrophoresis and capillary electrophoresis. After heat, enzyme and fermentation processes, structural changes of proteins were determined by infrared spectroscopy. With these processes applied in milk and dairy products, the changes in content and structure of allergen protein were determined.

Science Code :

Keywords : Allergy, Milk allergy, Protein allergy, Electrophoresis, FT-IR

Number Page : 67

Supervisor: Dr. Öğretim Üyesi Özgür TARHAN

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla ben yönlendiren Hocam Dr. Öğretim Üyesi Özgür TARHAN'a, her türlü desteği sağlayan Murat bey Gıda Sanayi ve Ticaret AŞ'ne ve Üretim Müdürlerim Faruk DEMİREL ve Mehmet YILMAZ' a, FT-IR analizlerinde cihaz kullanımına olanak sağlayan Kimya Mühendisliği Bölümü ve Dr. Eyüp YILDIRIR' a, laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Uşak Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Lisans öğrencileri Mustafa GÖZLER ve Rahmi Can YAVUZ'a ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme teşekkür ederim. Bu proje Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından (TP044 (2017) nolu proje ile) finansal olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
SİMGE VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2.İNEK SÜTÜ PROTEİN ALERJİSİ.....	3
2.1. İşleme Yöntemlerinin Protein Alerjisine Etkisi.....	6
3. PROTEİNLERİN TAYİNİ VE TANIMLANMASI	11
3.1. Protein Miktar Tayini	11
3.2. Elektroforez	12
3.2.1. SDS-PAGE Yöntemi.....	12
3.2.2. Kapiler Elektroforez Yöntemi	13
3.3. Infrared Spektroskopi.....	14
3.3.1. FT-IR Yöntemi.....	14
3.4. ÇALIŞMANIN AMACI.....	15
4. MATERYAL ve YÖNTEM	16
4.1. Materyal	16
4.2. Örnek Hazırlama.....	16
4.2.1. Standart Proteinler	16
4.2.2. Süt Örnekleri.....	17

4.2.3. Peynir Örnekleri.....	17
4.2.3.1. Beyaz Peynir Örnekleri	17
4.2.3.2. Kaşar Peynir Örnekleri.....	19
4.2.3.3. Lor Peynir Örnekleri.....	21
4.2.3.4. Yoğurt Örnekleri	22
4.3. Protein Miktarlarının Tayini (Bradford Yöntemi)	23
4.3.1. Bradford Boya Çözeltisinin Hazırlanması	23
4.3.2. Standart Eğri Hazırlanması	23
4.3.3. Örneklerdeki Protein Miktarlarının Belirlenmesi	24
4.4. SDS-PAGE Analizi.....	25
4.4.1. Resolver Jel (%12'lik) Hazırlama	25
4.4.2. Stacking (%4'lük) Jel Hazırlama.....	25
4.4.3. Örnek Hazırlama	25
4.4.3.1. Standart Protein Örnekleri.....	25
4.4.3.2. Peynir ve Yoğurt Örneklerinin hazırlanması.....	26
4.4.4. Jelin Yürütülmesi	26
4.4.5. Jelin Boyanması ve Görüntülenmesi.....	27
4.5. Kapiler Elektroforez	27
4.5.1. Örneklerin Hazırlanması	27
4.5.2. Elektroforez.....	27
4.6. FT-IR Analizleri	29
5. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	30
5.1. Örneklerdeki Protein Miktarlarının Belirlenmesi	30
5.1.1. Bradford Sonuçları:	30
5.2. SDS-PAGE Analizi ile Örneklerdeki Protein Profillerinin Belirlenmesi....	34
5.3. Alerjen Proteinlerin Kapiler Elektroforez'de İncelenmesi	39

5.4. Alerjen Protein Yapısında Konformasyonel Değişikliklerin Belirlenmesi .	50
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ.....	67



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 4.1. Beyaz peynir üretim akış şeması	18
Şekil 4.2. Kaşar peynir üretim akış şeması.....	20
Şekil 4.3. Lor peynir üretim akış şeması	22
Şekil 5.1. Bradford analizinde sığır serum albumin (BSA) standart eğrisi	30
Şekil 5.2. Standart proteinlerin ve örneklerin protein profilleri	35
Şekil 5.3. Beyaz peynir proteinleri ve örneklere ait protein profilleri.....	36
Şekil 5.4. Kaşar peynir proteinleri ve örneklere ait protein profilleri	37
Şekil 5.5. Lor peynir proteinleri ve örneklere ait protein profilleri.....	38
Şekil 5.6. Yoğurt proteinleri ve örneklere ait protein profilleri.....	39
Şekil 5.7. Standart proteinlere ait kapiler elektroforez sonuçları	40
Şekil 5.8. Standart proteinlere ait kapiler elektroforez sonuçları	41
Şekil 5.9. Standart proteinlere ait kapiler elektroforez sonuçları	41
Şekil 5.10. Süt örneklerine ait kapiler elektroforez sonuçları	43
Şekil 5.11.. Beyaz peynir örneklerine ait kapiler elektroforez sonuçları	44
Şekil 5.12. Kaşar peynir örneklerine ait kapiler elektroforez sonuçları	46
Şekil 5.13. Lor peynir örneklerine ait kapiler elektroforez sonuçları.....	47
Şekil 5.14. Yoğurt örneklerine ait kapiler elektroforez sonuçları.....	49
Şekil 5.15. Kazein proteinlerine ait FT-IR sonuçları.....	53
Şekil 5.16. PAS proteinlerine ait FT-IR sonuçları	54

Şekil 5.17. Süt örneklerine ait FT-IR sonuçları.....	55
Şekil 5.18. Beyaz peynir örneklerine ait FT-IR sonuçları.....	56
Şekil 5.19. Kaşar peynir örneklerine ait FT-IR sonuçları.....	57
Şekil 5.20. Lor peynirine ait FT-IR sonuçları	58
Şekil 5.21. Yoğurt örneklerine ait FT-IR sonuçları.....	59



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1. İnek sütü proteinlerinin temel özellikleri	6
Çizelge 4.1. Standart eğri hazırlamada kullanılacak BSA protein dilüsyonları	24
Çizelge 5.1. Beyaz Peynir örneklerinde işleme esnasında tespit edilen protein miktarları.	31
Çizelge 5.2. Kaşar Peyniri örneklerinde işleme esnasında tespit edilen alerjen protein miktarları	32
Çizelge 5.3. Lor Peynir örneklerinde işleme esnasında tespit edilen alerjen protein miktarları	33
Çizelge 5.4. Yoğurt örneklerinde işleme esnasında tespit edilen alerjen protein miktarlar	33
Çizelge 5.5. FTIR bantlarına ait referans literatür çizelgesi.....	50

SİMGE VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

U1	Ulusal marka yoğurt 1
U2	Ulusal marka yoğurt 2
Y1	Yerel marka yoğurt
E1	Ev Tipi Yoğurt
μ l	Mikrolitre
rpm	Round Per Minute
g	Gram
ml	Mililitre
$^{\circ}$ C	Derece Santigrat

Kısaltmalar

Açıklama

β -Lg	beta-laktoglobulin
α -La	alfa-laktalbumin
CN	Kazein
κ -CN	Kappa Kazein

SDS-PAGE	Sodyum Dodesülfat Jel Elektroforez
CE	Kapiler elektroforez
İSA	İnek Sütü Alerjisi
BSA	Sığır Serum Albumin
IgE	İmmunoglobulin E
İSPA	İnek Sütü Protein Alerjisi
ELİSA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
CMD	Karboksimetil dekstran
MPa	Megapaskal
LAB	Laktik Asit Bakterileri
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
TEMED	Tetrametil-etilendiamin
FT-IR	Fourier Transform Infrared
IR	Kızıl ötesi
WPI	Peyniraltısuyu protein izolatu
WPC	Peyniraltısuyu protein konsantratu
UHT	Ultra High Teknoloji
PAS	Peynir Altı Suyu
APS	Amonyum Persülfat
TGS	Tris,glisin,SDS
kDa	Kilo Dalton



1. GİRİŞ

İnek sütü yüksek besleyici değere sahip olmakla beraber en yaygın alerjen gıda ürünlerinden biridir. Özellikle çocuklar üzerinde etkili olan süt alerjisi gastrointestinal sistem, solunum sistemi ve cilt üzerinde çeşitli semptomlarla ortaya çıkar. Büyük çoğunlukla yaşamın ilk yıllarında ortaya çıkmasına rağmen bu alerjiye sahip olan çocukların bir kısmı ilerleyen yaşlarda da süt ürünlerine karşı alerjik olarak kalabilmektedir [1]. İnek sütünün içerdiği ana alerjen proteinler kazein (CN), beta-laktoglobulin (β -Lg) ve alfa-laktalbumin (α -La)'dır [2]. İşlenmiş birçok gıda ürününde süt ve süt proteinleri bulunduğundan süt ürünleri tüketmeyerek süt alerjisinden korunmak çok gerçekçi değildir. Bununla birlikte, süt ürünleri tüketmemek özellikle gelişmekte olan çocuklarda birçok faydalı besin ögesinden mahrum kalabilmek anlamına da gelmektedir. Bu konu üzerine yakın zamanda yapılan bazı çalışmalarda edinilen bulgular, bir takım işleme teknikleriyle sütün alerjen protein içeriğinin azaltılarak süt alerjisini kontrol etmenin mümkün olabileceğini göstermektedir [1]. Bu kapsamda, sunulan çalışmanın amacı sütte ve en çok tüketilen süt ürünleri peynir ve yoğurttaki alerjen protein fraksiyonlarının incelenmesi ve proses esnasında uygulanan ısı, enzim etkisi, fermentasyon gibi bir takım işlemlerin bu protein fraksiyonlarına olan etkisi ve buna bağlı olarak alerjeniteyi azaltmada ki etkinliğinin araştırılmasıdır. Uşak ilinde bulunan ulusal bir süt ürünleri firması olan Muratbey Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş.'den üretim sırasında farklı aşamalarda temin edilen süt ve peynir örneklerindeki, protein profilleri elektroforetik yöntemlerle taranmış, akabinde alerjen proteinlerde yapısal değişiklikler spektroskopik bir yöntemle incelenmiştir. Çalışmada kullanılan kapilar elektroforez yöntemi alerjen protein fraksiyonlarının işleme sırasındaki değişiminin tespiti ile yüksek hassasiyetle, hızlı ve ekonomik olarak sonuca ulaşma noktasında hedeflenen başarıyı yakalanmıştır.

Süt ve süt ürünleri ülkemizde ve dünyada en çok kullanılan besin grupları arasında en üst sıralardadır. Tüketicinin işlenmiş süt ürünlerine ilgisi yüksek olmakla birlikte özellikle çocuklar için kullanımı yukarıda belirtildiği gibi alerji endişesi taşımaktadır. Literatürde süt ürünlerinde alerjinin tanımlanması ve azaltılması ile ilgili olarak sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Süt alerjisi konusunda en çok çalışma insan sağlığı üzerindeki etkileri ve vücudun immunolojik reaksiyonları anlamında tıbbi literatürde bulunmaktadır. Oysaki en çok tercih edilen ve beslenme açısından en önemli kaynaklarımızdan biri olan süt ürünlerinin alerji riskinin ürün içeriği bakımından detaylı bir şekilde tanımlanması oldukça büyük önem taşımaktadır. Bu çalışma bulgularıyla güncel literatürde özellikle insan sağlığı açısından ele alınarak tanımlanan inek sütü alerjisinin işlenmiş süt ürünleri üzerinden tanımlanması, ilgili literatüre de katkı sağlanması ve özellikle bebek ve çocuklara yönelik düşük alerjeniteye sahip yeni ürün geliştirme yönünde bir altyapı oluşturmada önemli katkı sağlaması öngörülmektedir.

2.İNEK SÜTÜ PROTEİN ALERJİSİ

Gıda alerjisi dünyada beslenme konusundaki önemli problemlerden biri olup yetişkin nüfusun %2 sini çocuk nüfusunun %8 ini etkilediği belirtilmektedir [3]. Alerjen etkisi en yüksek gıdalar inek sütü, yumurta, balık, soya, fındık ve fıstık olmakla beraber, bunların içinde inek sütü alerjisinin (İSA) en yaygın görülen protein alerjisi olduğu rapor edilmektedir [4, 5]. İnek sütü yüksek besleyici değerinin yanında, aynı zamanda en yaygın gıda alerjenlerinden biridir. Bebeklik döneminde büyük miktarlarda karşılaşılan ilk antijen kaynağı olan inek sütünün önemli alerjenleri β -laktoglobulin, α -laktalbumin ve kazeinlerdir [6]. Sığır serum albümini (BSA) ve hatta laktoferrin (iz miktarlarda mevcut) gibi diğer proteinler de potansiyel alerjenlerdir [4, 7]. İnek sütü ve insan sütü arasındaki protein kompozisyonundaki farklılıklar, bebeklerin inek sütü alerjisine olan duyarlılıklarını açıklamaktadır [8]. İmmünolojik materyallerin içeriği insan sütünde inek sütünden daha yüksektir, bu da bebeklerin bağışıklık fonksiyonlarını artırabilir ve süt alerjisini önleyebilir [9, 10].

İSA, küçük çocuklarda en sık görülen gıda alerjisidir ve yeni doğan bebeklerin yaklaşık % 2 ila % 7.5'ini etkiler. Çocukların çoğu inek sütü alerjisini 3-4 yaşına kadar aşmaktadır; bununla birlikte, IgE aracılı İnek Sütü Protein Alerjisi (İSPA) 'lı bebeklerin % 15'i, duyarlılığını ikinci on yılda muhafaza etmektedir [3]. İSPA semptomları hemen ortaya çıkabilir veya orta ila büyük miktarlarda inek sütü veya bebek maması alındıktan sonra birkaç saat veya birkaç gün sonra başlayabilir. Gastrointestinal, respiratuar ve kutanöz ve sistemik anafilaktik semptomlar da dâhil olmak üzere İSPA ile geniş spektrumlu klinik belirtiler kaydedilmiştir [4]. Klinik semptomlar ayrı veya birlikte çalışan gecikmiş reaksiyonları içerir. Anında reaksiyonlar çoğunlukla IgE kaynaklıdır. Deri, bağırsak veya solunum yolu semptomlarına yol açar ve bazı durumlarda anafilaktik reaksiyona neden olur [5].

Bugün inek sütü, bir bebeğin diyetine katılan ilk gıdalardan biridir ve bu nedenle erken çocukluk döneminde gıda alerjisinin ilk ve en yaygın nedenlerinden biridir. Aslında, “alerjik Mart” terimi, çocuklarda solunum alerjisinin daha sonraki gelişmesinden önce görülen tipik gıda alerjisi görünümünü açıklamaktadır [6]. İSA prevalansı, çalışılan popülasyonların yaşları arasında tanı veya farklılıklar için kullanılan farklı yöntemlere atfedilebilen çalışmalarda dramatik olarak değişmektedir [7]. Ayrıca, coğrafi faktörler yaygınlık oranlarını etkileyebilir. Genel olarak, inek sütüne kendiliğinden bildirilen advers reaksiyonların sıklığı, sadece çocuklarda değil, yetişkinlerde de tıbbi olarak doğrulanmış tanılardan çok daha yüksektir[8]. Günümüzde okul öncesi çocukların % 0,6–2,5'inin, daha büyük çocuk ve ergenlerin % 0,3'ünün ve yetişkinlerin % 0,5'inin İSA' dan mustarip olduğu bildirilmektedir [8]. İSA prevalansı artmaktadır; bu, emzirmenin azalması ve ineğin süt bazlı formülleri ile beslenmenin artması ile açıklanabilir[9]. Bir çalışmada alerjik bebeklerin, % 45-50'sinin 1 yılda, % 60-75'inin 2 yılda ve % 85-90'ının 3 yaşında alerjinin etkinliğinin azaldığı bildirilmektedir [10]. Her ne kadar başka bir çalışma bu sayıları tam olarak doğrulayamadığı ve tolerans gelişiminin zaman sürecini teyit etmesine rağmen, İSA' nin çocukların % 19' unda 4 yaşına, % 42' sinde 8 yaşına, % 64' ünde 12 yaşında ve % 79' da 16 yaşına kadar devam edebilmektedir [11]. Klinik tolerans gelişiminin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. Toleransın geliştirilmesinde çeşitli faktörler yer alabilir. Kaçınma, Ig' nin düzenli inek sütü tüketimi ve / veya esas olarak konformasyonel epitoplara karşı IgE antikorlarının varlığına bağlı olarak IgG antikorlarının gelişmesi ve ardışık epitoplara karşı değil, IgE antikorlarının bir düşüşünü içerebilir [12, 13].

Sığır ve insan sütünün protein bileşimi arasında bazı benzerlikler bulunurken, insan bağışıklık sistemi tarafından yabancı olarak tanınması için inek sütü proteinleri için yeterli kapsam sağlayan protein türleri ve homolojileri arasında önemli farklılıklar vardır [14, 15]. Çoğu insanda bağışıklık sistemi süt proteinlerini zararsız olarak tanıyabilir ve onları tolere edebilir. Bununla birlikte, alerjik kişilerde bağışıklık sistemi süt proteinlerine duyarlı hale gelir ve zararlı bir iltihap tepkisi oluşturur. Talihsiz bir azınlığın İSA gelişimi nedenleri iyi anlaşılammıştır. Kalıtsal bir yatkınlık var gibi görünmektedir, ancak alerjinin fenotipik ifadesi, genetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşime bağlıdır [16] ve duyarlılığın temel mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır. Buna karşılık, sütte alerjenik belirleyicilerin sayısı

ve doğası hakkında anlayışımız hızla gelişmektedir. Hem alerjinin hem de sütte tetiklediği ve alerjik bireylerde bu tetikleyicilere verilen bağışıklık yanıtlarının çok yönlü olduğu bilinmektedir. Örneğin, ineğin süt proteinleri kazein ve peynir altı suyu proteinleri de dâhil olmak üzere, alerjik yanıtlarda rol oynamaktadır [14]. Bir dizi süt proteininin epitop haritalaması, hem antikor üreten B hücreleri hem de hem antikor hem de hücre aracılı immün tepkilerini yönlendiren T hücreleri için her protein içinde birden fazla alerjenik epitop ortaya çıkarmıştır [15, 16, 17]. Ek olarak, belirli proteinler ve tepki verdikleri epitoplar için alerjik bireyler arasında dikkate değer bir heterojenlik vardır [14]. Süt proteinlerinin daha fazla epitop haritalaması için bir alan olmasına rağmen, sütte antijenik belirleyicilerin karmaşıklığı, seçici olarak ortadan kaldırmaya yönelik zorluğun ölçüsü olduğu gibi hâlihazırda açıkça görülmektedir [18].

Yetiştirme testlerine veya laboratuvar prosedürlerine göre ineğin sütünde tek bir ana alerjen tanımlanmamıştır [19]. Gerçekten, klinik meydan okuma testleri çoğu İSA hastasının inek sütünün birkaç protein fraksiyonuna tepki gösterdiğini ve her bir alerjen proteinin, moleküller boyunca yaygın olarak yayılan birkaç epitopa sahip olabildiğini göstermektedir. Çocuklarda alerjik reaksiyonlarda yaygın olarak rol oynayan inek sütü proteinleri, kazeine ek olarak alfa-laktalbumin ve beta-laktoglobulin fraksiyonları ile peynir altı suyu proteinleridir [20, 21]. Yetişkinlerde, baskın alerjen CN olup, peynir altı suyu proteinlerine karşı duyarlılık ise nadirdir. Alerjenik inek sütü proteinlerinin biyokimyasal özelliği Çizelge 1.1' de bildirilmiştir. Günümüzde süt alerjen analizleri genellikle enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) gibi immüno-test yöntemlerine dayanmaktadır [22]. Ticari test kitleri CN, β -Lg veya total süt proteinlerinin belirlenmesi için kullanılabilir [23]. Bu kitlerin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için laboratuvarlar arası çalışmalar yapılmıştır [24]. Bazı süt proteinleri için antikor çapraz reaktivite bildirilmiştir [25]. ELISA tespit sonuçlarını doğrulamak ve bildirilmemiş süt alerjenlerinin tespit spesifitesini geliştirmek için doğrulayıcı testler gereklidir. Son birkaç on yıldır, kütle spektrometrisi, peptitlerin ve proteinlerin tanımlanması için baskın bir teknoloji haline gelmiştir. Protein tanımlanması için kullanılan birincil akım yaklaşımları yukarıdan aşağıya [26, 27] ve aşağıdan yukarıya [28] dizilimdir. Yukarıdan aşağı sıralama, bozulmamış proteinin gaz fazına sokulmasını içerir. Protein, çeşitli

teknikler kullanılarak protein moleküler ağırlığının ya da parçalanma modelinin ölçülmesiyle tanımlanır [29].

İnek sütünde bulunan proteinler, sütün işlenmesi sırasında birçok mekanik, ısı, kimyasal ve enzimatik işleme maruz kalırlar. Bu işlemlerin proteinde yapısal değişikliğe neden olabileceği dolayısıyla alerjik potansiyelini değiştirebileceği literatürde çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir [12,13,14,15,17]. Bununla ilgili detaylı literatür analizi aşağıda verilmektedir.

Çizelge 2.1. İnek sütü proteinlerinin temel özellikleri [20]

İnek sütü proteinleri %100	Protein	Alerjenite	Toplam protein %	MA (kDa)	pI	Amino Asit Kalıntısı
Kazein (%80)	α 1-Kazein	Major	32	26,60	4,9 - 5,0	199
	α 2-Kazein	Major	10	25,2	5,2 - 5,4	207
	β -Kazein	Major	28	24	5,1 - 5,4	-
	κ -Kazein	Major	10	19	5,4 - 5,6	169
Peynir altı suyu proteinleri %20	α -Laktoalbumin	Major	5	14,2	4,8	123
	β -Laktoglobulin	Major	10	18,3	5,3	162
	İmmunoglobulin	-	3	150	-	-
	BSA	-	1	66,3	4,9 - 5,1	582
	Laktoferrin	-	belirti	80	8,7	703

2.1. İşleme Yöntemlerinin Protein Alerjisine Etkisi

Süt alerjisini ortadan kaldırmak için bu alerjenleri yok etme veya azaltma stratejileri konusunda hali hazırda çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Isıl işlem, glikoz reaksiyonu, yüksek basınç, enzimatik hidroliz ve laktik asit fermantasyonu gibi bir takım yöntemlerin, temel işleme teknolojilerinin, işleme koşullarının optimize edilmesinin inek sütü protein alerjenlerinin azaltılmasına nasıl yardımcı olabileceği araştırılmaktadır. Isıtma, çoğu süt ürününün imalatında

önemli bir süreçtir. Isıtma işlemleri sırasında, denatürasyon, agregasyon ve diğer moleküllerle olan Maillard reaksiyonu gibi proteinlerde önemli yapısal ve kimyasal değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler, süt protein alerjenlerinin antijenikliği üzerinde önemli etkilere sahip olabilir. İnek sütü proteinleri arasında ısıya dayanıklılık, kazein, immüoglobulinler (Ig), sığır serum albümini (BSA), β -Lg, α -La sırasına göre azalmaktadır [17]. Bir çalışmada, 120 °C' de 15 dakika uygulanan ısıl işlemin sığır kazeinin antijenikliğini etkilemediği ancak BSA 70°C ile 80 °C' de veya 100 °C'de antijenikliklerini kayb ettikleri rapor edilmiştir [12, 13]. Yaklaşık 15 dakika boyunca 80 ve 100 °C'de ısıl işlemin β -Lg ve BSA ile IgE fiksasyon kapasitesinde bir düşüş yarattığını fakat α -La ve kazeinler için herhangi bir değişiklik oluşmadığını tespit etmiştir [14]. Bununla birlikte β -Lg çözeltisini veya sütü 72 °C'de ısıttıktan sonra β -Lg'nin IgE bağlanma kabiliyetinde yalnızca hafif bir düşüş tespit etmiş, buna karşılık ELISA inhibisyon çalışmaları ile 90 °C'de belirgin bir düşüş tespit edilmiştir [15]. Bir diğer çalışmada, α -La ve β -Lg' nin antijenikliğinin 50 °C'den 90 °C'ye yükselen sıcaklık arttıkça arttığını fakat her iki proteinin antijenikliği 90 °C'nin üzerinde belirgin bir şekilde düştüğünü gözlemlemişlerdir [16]. Farklı bir çalışmada, 120 °C' de 20 dakika işleme tabi tutulduğunda, α -La' nin antijenikliği, muamele edilmemiş numunenin başlangıç değerine kıyasla % 25 azalmıştır. Peynir altı suyunun protein antijenliğinin 50 ila 90 ° C arasında artmasını, ısı denatürasyonu sırasında konformasyonel yapının ortaya çıkması nedeniyle doğal molekül içine gömülmüş alerjenik epitoplardan maruziyetinden kaynaklanmasıyla açıklamışlardır [17]. Ayrıca ısıyla denatüre edilmiş β -Lg' nin, doğal halde bulunmayan bazı yeni epitoplara sergilediği de gösterilmiştir [18]. Farklı bir çalışmada 90 °C' nin üzerindeki antijenite azalması, sülfhidril/disülfid değişimi ve ardından toplama yoluyla molekül yüzeyine maruz bırakılan konformasyonel epitoplardan imhası veya maskeleyişinden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir [17]. Isıtmanın süt proteinlerinin alerjenitesi üzerindeki etkisi, çeşitli in vivo çalışmalarla da araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada ısıyla denatüre olmuş β -Lg' nin (90 °C, 30 dk.) sıçanların gastrointestinal mukozasında doğal β -Lg' den daha yoğun lokal immünolojik reaksiyona neden olduğunu göstermiştir [19]. Yüksek ısı (pişirme), muhtemelen ısıya dirençli proteinlerin konformasyonunu değiştirecek ve böylece alerjenik epitoplardan yok ederek çeşitli gıda proteinlerinin alerjenitesini azaltacaktır [20].

Maillard reaksiyonu yoluyla indirgen şekerlerle konjugasyon, proteinlerin fonksiyonel özelliklerini geliştirmek için etkili bir araç olmakla beraber gıda protein alerjenitesini

maskelemek için de umut verici bir yöntem gibi gözükmetedir [21, 22, 23]. β -Lg' nin karboksimetil dekstran (CMD) ile konjugasyonunun, bu proteinin emülsiyon yapma özelliklerini, geliştirilmiş termal kararlılığı ve düşük immünojenikliği geliştirdiği rapor edilmiştir [24, 25]. Maillard reaksiyonu ile süt protein alerjenitesinin azaltılması, proteinlere konjuge edilen sakkaritlerin miktarına ve sakkaritlerin molekül ağırlığına bağlı olduğunu belirtilmiş, yüksek sakkarit içeriğine sahip β -Lg-CMD konjüгатlarının, farelerden antiserum kullanarak yapılan ELISA' nın değerlendirmesi yoluyla belirgin düşük immünojenisite gösterdiğini bulmuştur [26]. Süt proteinlerinin antijen özelliklerinin modifikasyonu, reaksiyon koşulları ve Maillard reaksiyonunun derecesi ile de ilişkili olduğu da literatürde belirtilmiştir [27, 28].

Yüksek basınç, gıda üretiminde yeni işleme tekniklerinden biridir. Yüksek basınçlı işlem süt proteinlerinde denaturasyon ve agregasyon oluşumu gibi yapısal değişikliklere neden olabileceği gibi buna bağlı olarak süt proteinlerinin alerjenik potansiyelini de etkileyebilir [29]. Farklı sıcaklıklarda (30-68 °C) yapılan yüksek basınç işleminin (200-600 MPa), peynir altı suyu çözeltisi ve yağsız sütte β -Lg' nin antijenitesini artırabildiğini rapor edilmiştir [17]. Bir başka çalışmada, β -Lg 'nin 200 ve 400 MPa' da yüksek basınç uygulanması, β -Lg-spesifik IgG' sine olan bağlanmayı arttırmış ve alerjik hastalardan IgE' ye bağlanmayı etkilemediği görülmüştür [30]. Bununla birlikte yüksek basınç ile indüklenen proteinlerin konformasyonundaki değişiklikler enzimatik sindirimi daha kolay hale getirebileceği ifade edilmektedir. β -Lg, yüksek basınç altında çeşitli enzimler tarafından etkili bir şekilde hidrolize edilebilir [31, 32]. Yüksek basınç altında β -Lg' nin enzimatik işlem sonucu elde edilen hidrolizatları azalan antijenite ve IgE bağlanmasını göstermiştir [4, 33, 34]. Peynir altı suyu proteinlerinin hidrolizi üzerinde tripsin, kimotripsin ve pepsin ile yapılan yüksek basınçlı işlemin (100 ila 300 MPa) etkisinin incelendiği bir araştırmada enzimlerin seçimine bağlı olarak, yüksek basınçlı peynir altı suyu protein hidrolizini güçlendirdiğini ve hidrolizatların antijenikliğini azalttığını gösterdi [34]. Bir başka çalışmada, sırasıyla enzimatik hidroliz öncesi veya sırasında yüksek basınç işlemi (300 MPa) ile kombine edildiğinde, Corolase ve Nötraz ile elde edilen sığır peynir altı suyu protein hidrolizatlarının antijenikliğini önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir [35]. Bu anlamda, süt proteinlerinin hidrolizi sırasında yüksek basınç kullanılması, hipoalerjenik peynir altı suyu hidrolizatlarının üretilmesi için etkili bir strateji olarak değerlendirilebilir.

Alerjeniteyi azaltmak için, proteinler enzim hidroliziyle küçük peptit molekülleri ve amino asitler haline dönüştürülebilir. Proteolitik enzimler hayvan, bitki ve mikrobik organizmalarda yaygın olarak bulunur. Hidroliz işlemi esnasında, enzim tipleri, hidroliz modeli ve hidroliz derecesi farklılıkları, hidrolizatın peptit bileşimi ile enzimatik işlemin antijeniteye etkisi tanımlanabilir. Peynir altı suyu proteininin antijenitesinin tripsin ile hidroliz yoluyla düşürülebileceği belirtilmiştir [36]. Papain ve nötrase veya alkalaz, proteaz S' nin hidrolizde proleathe kombinasyonunun, tek enzimle karşılaştırıldığında peynir altı suyu proteininin alerjenikliğini azaltmada daha etkili olduğunu gösterdi [37]. Başka bir çalışmada, "iki adımlı" alkalaz-papain hidroliz işleminin, alerjik epitoplara hala mevcut olmasına rağmen, inek sütü peynir altı suyu proteininin immünreaktivitesini azaltmada oldukça etkili olduğunu gösterilmiştir. Alkalaz ile hazırlanan peynir altı suyu protein konsantresi hidrolizatlarına papain ilavesinin, elde edilen ürünün duyu özelliklerini değiştirdiği rapor edilmiştir [38]. Bununla beraber, alkalaz ile elde edilen peynir altı suyu protein konsantresi hidrolizatlarının antijenitesinin, hidroliz koşullarının (pH, sıcaklık ve enzim-substrat oranı) optimizasyonu ile etkili bir şekilde azaltılabildiği de belirtilmiştir [39]. Proteinin enzimatik sindirimi yeni antijenik maddeler üretebilir [40]. Yapılan bir çalışmada triptik hidrolizin β -Lg' nin alerjenitesini koruduğu ve hatta arttırdığını göstermişlerdir [41]. Çok sayıda epitopun β -Lg molekülü boyunca dağıldığını belirterek bunların, molekülün hidrofobik kısımlarında yer alabileceğini ve proteinin doğal konformasyonunda IgE antikorları için erişilmez olabileceğini, ancak sindirim süreçlerinden sonra biyolojik olarak kullanılabilir hale gelebileceğini belirtmişlerdir [41]. Kısmen hidrolize edilmiş formüller, risk altındaki bebeklerde inek sütü alerjisinin önlenmesinde yararlı olabilir [42]. Hidrolizden sonra elde edilen peptitlerin moleküler ağırlığı, alerjenitenin araştırılması için sıklıkla analiz edilmektedir. Bunun için ultrafiltrasyon ve kromatografik yöntemler kullanılmaktadır [43, 44, 45, 46].

Proteolitik enzimler fermantasyon sırasında laktik asit bakterileri (LAB) ile üretilebilir. Süt proteinlerinin Lactobacillus fermantasyonu ile hidrolizi süt sindirimi ve biyoaktif peptidlerin üretimi üzerinde önemli etkilere sahip olabilir. Proteoliz, bazı epitoplara parçalanmasına ve süt alerjenitesinin azalmasına neden olabilir [47, 48]. Probiyotikler, bağışıklık sistemini uyarmada ve bağışıklık aracılı hastalıklar üzerinde faydalı etkilere sahiptir [48, 49]. Klinik raporlar, yoğurt gibi fermente gıdaların diyetle tüketilmesinin muhtemelen

bağışıklık düzenleme mekanizması yoluyla alerjilerin gelişimini azaltabileceğini önermektedir [48]. Geleneksel bulgar yoğurtlarından elde edilen 21 *Lactobacillus* suşunun elektroforez ve RP-HPLC analizleriyle α -La ve β -Lg' ye karşı farklı proteolitik etkinlik gösterdiği bildirilmiştir [50]. Çeşitli çalışmalar, farklı LAB suşlarının süt proteinlerinin antijenik özelliklerini azaltabileceğini ortaya koymuştur. *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* CRL 656, saf β -Lg ve bunun epitoplarını bozarak, alerjik çocukların IgE' leri tarafından tanınmasını azaltabilmektedir [51]. Benzer şekilde, α S1-kazein ve β -kazein' in IgE bağlanması, *Lactobacillus fermentum* IFO3956 ve *Lactobacillus helveticus* A75' in proteolitik aktivitesi ile önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir [52, 53].

Sunulan çalışmada, süt ürünlerinde işleme sırasında alerjen proteinlerin etkilenip etkilenmediğinin tespit edilmesi amacıyla hammadde, ara ürünler ve son ürünlerde protein profilleri incelenmiştir. Bu amaçla kullanılan protein tanımlama tekniklerine yönelik temel bilgilere aşağıda kısaca değinilmiştir.

3. PROTEİNLERİN TAYİNİ VE TANIMLANMASI

Gıdalarda protein tayini ve tanımlaması çeşitli yöntemlerle yapılabilir. Özellikle işlenmiş gıda ürünlerindeki protein miktarlarının tespiti uygulanan işlem koşullarının besin değeri yönünden yüksek faydalı protein içeriğine zarar verip vermediğinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bunları belirlerken gravimetrik&volumetrik, kromatografik, elektroforetik ve spektroskopik yöntemler kullanılabilir. Bu tez çalışmasında protein miktarının belirlenmesinin ardından elektroforez ve infrared spektroskopisi yöntemleri kullanılmıştır.

3.1. Protein Miktar Tayini

Gıda ürünlerinde bulunan proteinlerin miktarlarının tayini için Kjeldahl, Bradford, Lowry, Biüriet yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlardan Kjelhdahl yöntemin ilkesi sütün bileşimindeki azotun katalizör ve sülfirik asit varlığında yaş yakma yöntemi ile amonyağa dönüştürülüp, amonyağın amonyumsülfat olarak tutulmasına dayanır.

Lowry yönteminde alkali ortamda +2 yüklü bakır iyonu proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturur ve +1' e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tyr, Trp ve Cys aminoasitleri Folin-Fenol reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Biüriet Yönteminde alkali ortamda Cu^{+2} iyonlarının protein ve peptitlerdeki peptid bağı azotuyla verdiği reaksiyon sonucu oluşan mavi-mor rengin 540-560 nm deki absorbansından yararlanılır.

Bu tez çalışmasında analizlerde kullanılacak süt, peynir ve yoğurt örneklerinin içerdiği protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla Bradford yöntemi kullanılmıştır. Spektrofotometrik bir yöntem olan Bradford yönteminde bir organik boyar madde olan Commassie brilliant blue G-250, negatif yüke sahip bir boya olup proteindeki pozitif yüklü gruplara bağlanabilme

özelliğine sahiptir. Kuvvetli bir asitte çözüldüğünde elde edilen kahverengi kırmızı renkte bulunan bu boya proteine bağlandığında mavi renk oluşturmaktadır. Bu mavi renkli boya-protein kompleksi maksimum dalgaboyu 595 nm'de absorpsiyon piki verir ve bu sayede örnekteki protein miktarı tespit edilir. Bu reaksiyon yüksek duyarlılıkta olup (0.01 – 0.05 mg protein/ml) tekrarlanabilir ve hızlı sonuç vermektedir [54].

3.2. Elektroforez

Elektroforez iletken bir çözelti içindeki yüklü/yüksüz parçacıkların veya moleküllerin bir elektriksel alan içerisinde göç etmesidir. Proteinler yüklü parçacıklar olup ortam pH'ına göre pozitif ya da negatif yüklü olabilme özelliğine sahiptirler. Buna göre karışım içerisindeki farklı protein fraksiyonları bir destek ortamı üzerinde elektriksel alana maruz kaldıklarında ağırlık ve yüklerine göre ilerleyebilmekte ve birbirlerinden ayrılabilirler. Elektroforez proteinleri moleküler ağırlıkları ve yüklerine göre birbirinden ayırır ve tanımlama amaçlı kullanılan bir yöntemdir. Farklı destek ortamlarının kullanıldığı çeşitli elektroforez yöntemleri bulunmakla beraber bu çalışmada SDS-PAGE ve Kapılar Elektroforez yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlere ilişkin detaylı bilgiler aşağıda verilmektedir.

3.2.1. SDS-PAGE Yöntemi

Proteinler yapılarındaki amino asit ve fonksiyonel gruplara bağlı olarak pozitif veya negatif yük taşımaktadırlar. Protein molekülünün içerdiği bir çözeltiye uygun bir destek ortamı üzerinde bir elektriksel alan uygulandığında protein net yüküne ve büyüklüğüne bağlı olarak belirli bir hızla hareket eder. Bu yöntemde proteinlerin hareket etmesini sağlayacak destek ortamı poliakrilamid jeldir. Kullanılan bu jel sentetik bir yapıya sahip olan akrilamid ile akrilamid türevi N-N'-metilen bisakrilamidin polimerleşmesiyle oluşturulur ve yürütülecek örnekler bu jel üzerinde hareket eder. Polimerleşme reaksiyonunda bulunan akrilamid molekülleri düz zincirler oluştururlar. Bisakrilamid molekülleri ise iki akrilamid zinciri ile çapraz bağlanmalar oluşturur. Bu sayede ağimsı bir yapı meydana gelir. Polimerleşmenin etkinliği pH, sıcaklık, amonyum persülfat (APS) ve N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) miktarına göre

farklılık gösterir. Polimerleşmenin serbest radikal oluşturabilmesi için APS reaksiyon başlatıcı, TEMED ise katalizör olarak görev alır.

Proteinler, güçlü negatif yük taşıyan bir deterjan olan sodyum dodesilsülfat (SDS) içeren bir çözelti ile muamele edilir ve SDS proteinlerin hidrofobik kısımlarına bağlanarak protein yapısının açılmasına, bağlı proteinlerin birbirinden ayrılmasına ve çözelti içinde serbestçe hareket etmesine neden olur. Ayrıca, proteinlerdeki S-S bağlarını kırmak için betamerkaptoetanol gibi bir indirgeyici ajan kullanıldığında çok alt birimli molekülleri oluşturan polipeptitlerin analizi mümkün olmaktadır. Proteinler uygun voltaj uygulanarak oluşturulan elektriksel alanda belli süre ilerleyip her protein molekülü çok sayıda eksi yüklü deterjan molekülü bağlar. Bunlar deterjanın gerçek yükünü örtterek voltaj uygulandığında artı elektroda doğru ilerlemesine neden olur. Yükü daha fazla olan büyük proteinler daha büyük elektriksel kuvvet etkisinde kaldıklarından daha hızlı ilerlemeleri gerekir. Sonuçta karmaşık bir protein karışımı moleküler ağırlıklarına göre bir dizi belirli protein bantlarına ayrılır. Bu karışımdaki önemli proteinler Coomasie mavisi gibi bir boya ile saptanabilir. Gümüş ya da altın içeren boyalar kullanılarak daha az (10 ng kadar) protein içeren bantlar da belirlenebilir [55].

3.2.2. Kapiler Elektrophorez Yöntemi

Kapiler elektrophorez (CE), kromatografi ile elektrophorezin bileşimi olan bir tekniktir. Elektrophorez, sıvı veya yarı katı bir ortamda, elektriksel yük ile çözelti içindeki yüklü taneciklerin belirli bir pH' da hareket etmesi ve büyüklüklerine göre ayrılmaları prensibine dayanır. Akım uygulandığında çözeltideki maddeler kolon boyunca hareket eder ve aynı zamanda dedektörün yerleştirilmiş olduğu katottan ayrılırlar. Kapiller genelinde uygulanan potansiyel fark elektroosmotik akış olarak adlandırılır [60]. Elektrophoretik harekete, sürtünme kuvveti ile elektrostatik kuvvet etki etmektedir. Elektrostatik kuvvet, parçacıkların sahip oldukları yüke ve uygulanan elektrik alanla orantılıdır ve bu kuvvet parçacıkların sahip oldukları yüke ters yönlü olan elektroda doğru hareket etmesini sağlar. Negatif yüklü iyonlar anoda, pozitif yüklü iyonlar ise katoda doğru sürüklenir. Sürtünme kuvveti ise bu hareketin tam tersin yönelik bir kuvvet uygulamaktadır. Bu iki kuvvet dengelendiğinde iyonik tanecikler hareket etmeye başlar [61]. Çapı küçük ve yükü fazla olan moleküllerin mobiliteleri daha

yüksektir. Büyük çaplı ve az yüklü moleküller ise mobiliteleri daha düşüktür. Tamponun pH'ındaki değişim ile analitlerin yükü de değişir, bu nedenle analitlerin elektroforetik mobiliteleri de değişime uğrar [62, 63].

3.3. Infrared Spektroskopi

Infrared Spektroskopi (IR) gıda örneklerinin içeriğini oluşturan kimyasal bileşenlerin yapısındaki değişiklikleri belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır. Isıl işlem ve kimyasal muamele ile oluşabilecek değişikliklerin ve tağşiş gibi istenmeyen müdahalelerin tespitinde de kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada Fourier dönüşümlü (FT) IR spektroskopisi kullanılarak işleme esnasında süt ürünlerinde bulunan alerjen proteinlerin yapısal değişiklikleri incelenmiştir. FT-IR yöntemine ilişkin detaylı bilgi izleyen bölümde verilmiştir.

3.3.1. FT-IR Yöntemi

FTIR yöntemi, matematiksel Fourier dönüşümü yöntemi ile ışığın kızılötesi (IR) yoğunluğunda dalga sayısının ölçülmesini sağlayan spektroskopik bir yöntemdir. Bu yöntem, kızıl ötesi diye adlandırılan radyasyonun absorpsiyonu ile kimyasal bağların titreşimlerinin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Kızıl ötesi ışınlar kimyasal bağların gerilme, büzülme ve bükülme gibi değişik titreşim hareketleri ile absorbe edilir. Kızıl ötesi bölgelerde bulunan kimyasal bağların titreşimlerindeki değişiklik ve absorpsiyon özellikleri spektral piklerin oluşmasını sağlar. Fonksiyonel her grup kendine özgü titreşim frekansına sahiptir [56].

Elektromanyetik ışık dizilerinin kızıl ötesi bölgesi 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasında değişmektedir ve yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; $4000\sim 14000 \text{ cm}^{-1}$), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; $400\sim 4000 \text{ cm}^{-1}$) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; $4\sim 400 \text{ cm}^{-1}$) olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır. MIR bölgesindeki bantlar ile hücre duvarı bileşenleri, proteinler ve nükleik asitler gibi bakteri hücrelerinin toplam bileşenleri belirlenebilir [57].

MIR spektroskopisi organik bileşenlerin tanımlanmasını. Bir organik maddenin ışık dizisinde $3600\sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ aralığına, 'fonksiyonel gruplar bölgesi' olarak adlandırılır. İkinci

bölge 1200-700 cm^{-1} olan parmak izi bölgesidir. Bu bölge, özellikle moleküldeki küçük yapısal değişiklikleri incelemekte kullanılır. Molekülün yapısında oluşan küçük değişiklikler, bu bölgedeki absorpsiyon piklerinin büyük ölçüde yer değiştirmesine neden olur. Bu yüzden, iki ışık dizisinin bu bölgede çakışması, bu iki ışık dizisinin aynı madde olduğunu gösteren bir işarettir. Tek bağların çok büyük bir kısmı bu bölge aralıklarında absorpsiyon bantları oluşturur. Bölgenin çok dar olmasından dolayı bu bölgedeki titreşimlerin frekansları, enerjilerinin birbirine çok yakın olması sebebiyle birbirlerini fazlasıyla etkiler [57, 58, 59].

3.4. ÇALIŞMANIN AMACI

Yukarıda çeşitli örnekler verilen literatür taramasında sütte protein alerjisinin etkilerinin araştırılması ve alerjenitenin azaltılması yönünde uygulanabilecek bir takım işleme yöntemlerine dair önemli çalışmalar ve bulgular görülmektedir. Süt ürünleri olan peynir ve yoğurttaki alerjen proteinlerin tanımlanması anlamında, özellikle bu ürünlerden yola çıkılarak detaylı bir tanımlama çalışmasına rastlanmamıştır. Rapor edilen çalışmalar çoğunlukla süt alerjisinin insan üzerindeki etkilerine yoğunlaşmakta olup, işlenmiş gıda ürünlerindeki alerjenitenin tanımlanmasına dair sınırlı sayıda çalışma tespit edilmiştir. Bu çalışmada özellikle Elektroforez ve IR spektroskopisi kullanılarak süt ürünlerindeki protein alerjenitesinin incelenmesi hem literatüre hem de işleme tekniklerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. Materyal

Kullanılacak süt ve peynir rnekleri Muratbey Gıda ve Süt rnleri Paz. San. Tic. Ltd. Őti. (UŞak) tarafından temin edilmiştir. rnek numuneler üretim hattındaki peynir proseslerinin her bir aŐamasından steril Őartlarda alınmıŐtır ve +4°C’de saklanmıştır. Deneysel çalışmalarda standart olarak kullanılacak yüksek saflıktaki proteinler Sigma’dan, kimyasallar Sigma, Biorad, İsolab, Across ve Tekkim firmalarından satın alınmıŐtır.

4.2. rnek Hazırlama

Sunulan çalışmada süt ve peyniraltı suyu (PAS) proteinlerine ait standartlar, ticari protein izolatları, süt, peynir ve yoğurt örnekleri kullanılmıştır.

4.2.1. Standart Proteinler

Deneysel çalışmalarda kontrol amaçlı kullanılan standart proteinler aşağıda verilmiştir.

- Peyniraltısu yu protein izolatı, WPI (BIPRO, ABD)
- Peyniraltısu yu protein konsantratı, WPC (BIPRO, ABD)
- Alfa-Laktalbumin, ALA (BIPRO, ABD)
- Kazein, CAS (Sigma C3400)
- Alfa-kazein, α -Ca (Sigma C6780)
- Beta-kazein, β -Ca (Sigma C6905)
- Kapa-kazein, κ -Ca (Sigma C0406)
- Alfa-laktalbumin, α -La (Sigma 1013909)
- Beta-laktoglobulin, β -Lg (Sigma L2506)

- Sığır serum albümin, BSA (Sigma 05470)

Toz halinde bulunan standart proteinler ultra saf su içerisinde çözdürülerek derişimleri 10 mg/ml olacak şekilde stok protein çözeltileri hazırlandı. Bu standart protein çözeltileri 10 kat seyreltilerek deneysel çalışmalarda (SDS-PAGE, FT-IR ve CE) kullanılmak üzere +4 °C’de saklandı.

4.2.2. Süt Örnekleri

Çalışmada süt örneği olarak çiğ süt ve UHT süt örnekleri kullanıldı. Çiğ süt örnekleri Muratbey Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Uşak)’den sağlanmışır. UHT süt örneği olarak ulusal bir firmanın tetrapak ambalajlanmış ürünü kullanılmışır. Çiğ süt ve UHT süttten deney tüplerine 5 ml alınıp yağını ayırmak üzere 4000 rpm’de 20 dakika santrifüj işlemleri yapıldı. Yağ tabakasının altından 1 ml örnekler alınıp başka tüplere konuldu. Ultra saf su ile 10 kat seyreltilen süt örnekleri deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere + 4 °C’de saklandı.

4.2.3. Peynir Örnekleri

Çalışmada klasik beyaz, kaşar ve lor peyniri üretim hattından alınan örnekler kullanılmışır. Üretim hattından örnekleme yapılışı ve örneklerin analizlere hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

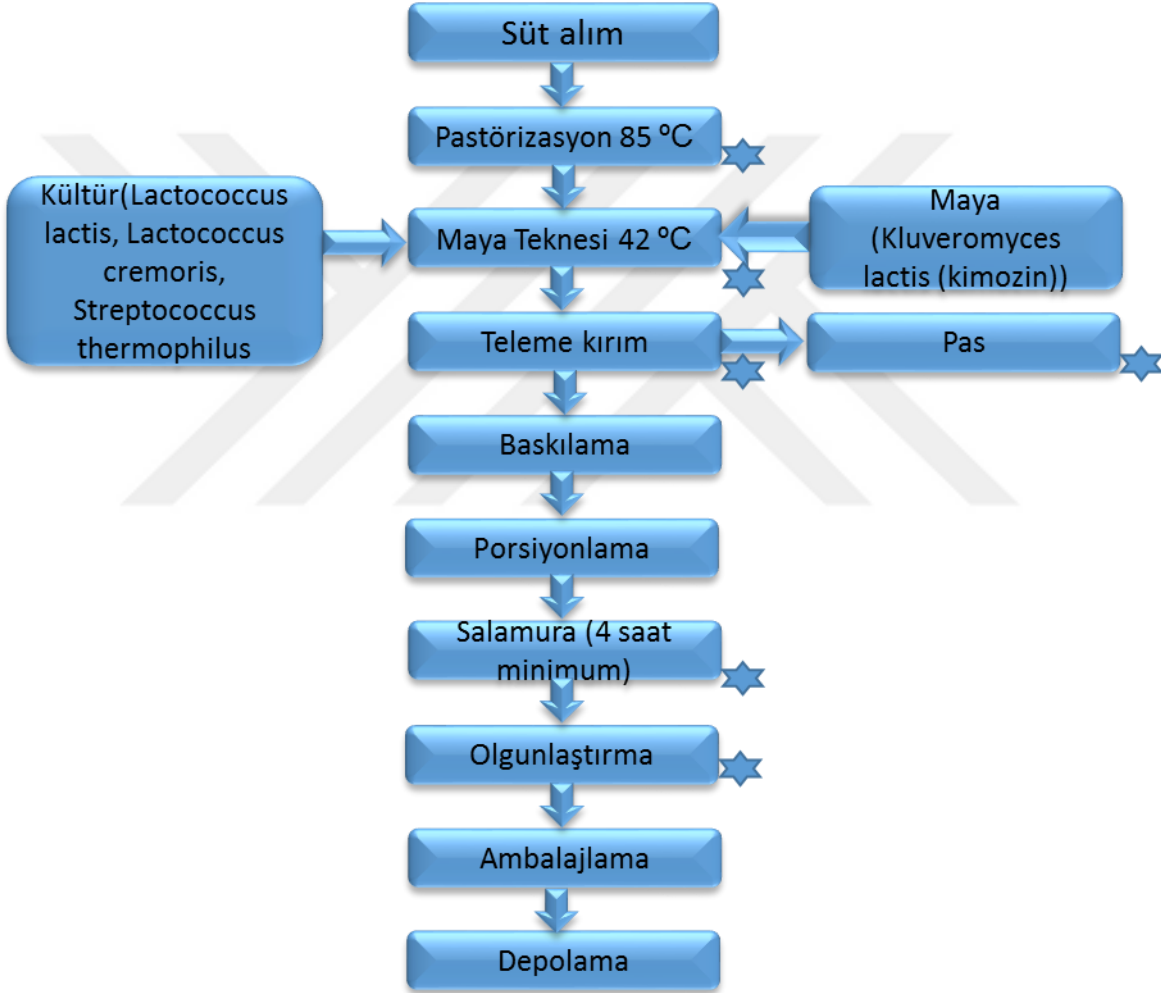
4.2.3.1. Beyaz Peynir Örnekleri

Beyaz peynir üretimi akım şeması Şekil 4.1’de verilmiştir. Bu üretim hattından çeşitli aşamalarda steril kaplara numuneler alınmış ve deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C’de saklanmışır. Üretim hattından alınan örnekler aşağıda sıralanmışır;

Örnekler

1. Pastörizasyon sonrası süt (85 °C)
2. Mayalama sonrası süt

3. Teleme
4. PAS
5. Salamura sonrası beyaz peynir
6. Olgunlaştırma sonrası beyaz peynir



Şekil 4.1. Beyaz peynir üretim akış şeması

(* Örnekleme yapılan aşamalar)

Üretim hattından alınan pastörize (85 °C) süt, mayalama sonrası süt ve peynir altı suyu örneklerinden 5 ml alınarak 4000 rpm' de 20 dakika santrifüj edildi. Yağı ayrılan örneklerden 1'er ml alınarak ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere 2-10 oranlarında seyreltildi ve +4 °C 'de

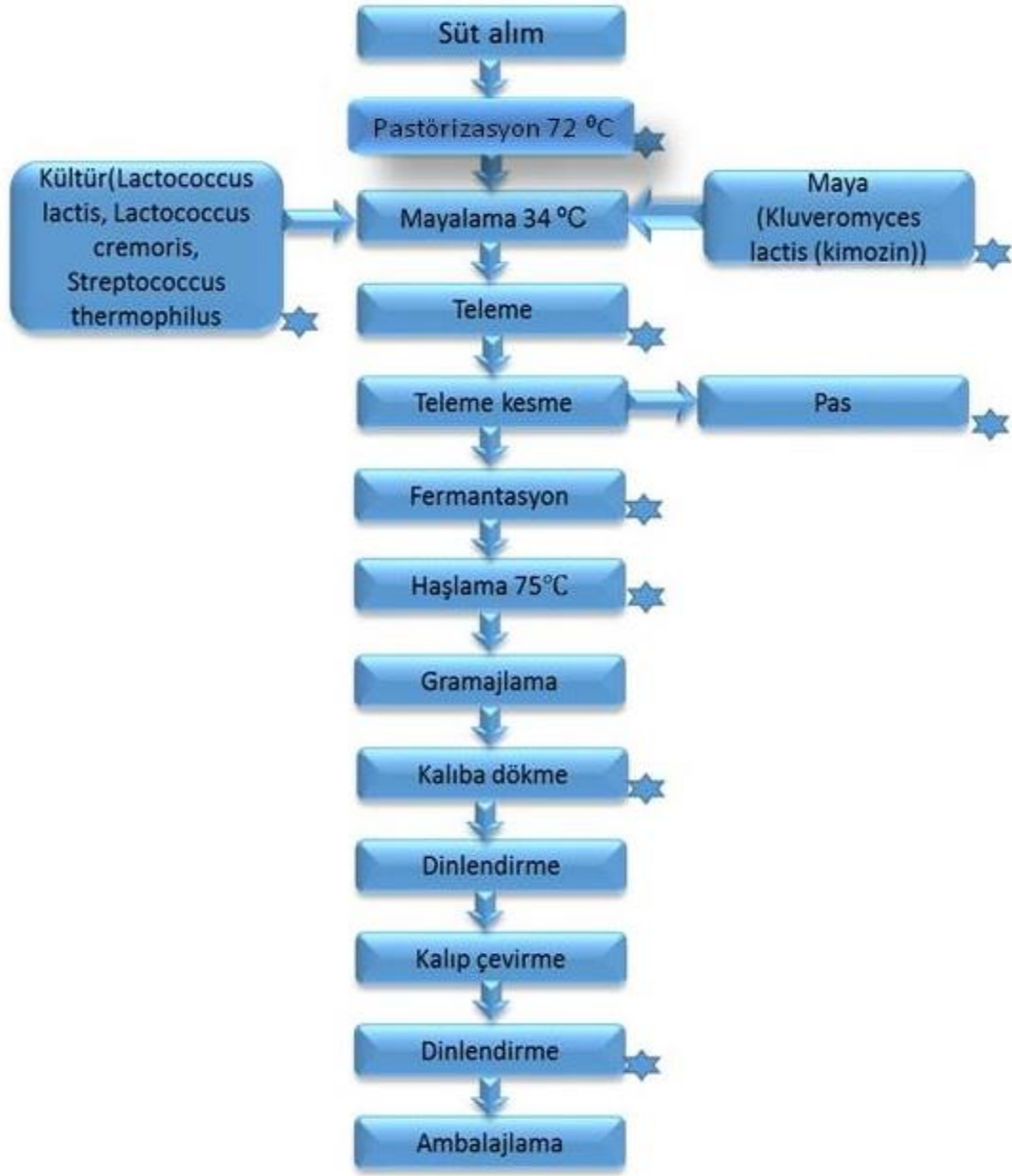
saklandı. Üretim hattından alınan teleme, salamura sonrası ve olgunlaştırma sonrası peynir örnekleri 1'er gram tartılarak 5 ml ultra saf suda çözüldü. Çözelti 4000 rpm' de 20 dakika santrifüj edildi. Yağı ayrılan örneklerden 1'er ml alınarak ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere 2-10 oranlarında seyreltildi ve +4 °C 'de saklandı.

4.2.3.2. Kaşar Peynir Örnekleri

Kaşar peyniri üretimi akım şeması Şekil 4.2'de verilmiştir. Kaşar peynir üretim hattından çeşitli aşamalarda steril kaplara numuneler alınmış ve deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır. Üretim hattından alınan örnekler aşağıda sıralanmıştır;

Örnekler

1. Pastörizasyon sonrası süt (72 °C)
2. Kültürlü süt
3. Mayalama sonrası süt
4. Teleme
5. PAS
6. Bekleme sonrası teleme
7. Haşlama sonrası kaşar hamuru (75 °C)
8. Olgunlaştırma sonrası kaşar
9. Taze kaşar



Şekil 4.2. Kaşar peynir üretim akış şeması

(* Örnekleme yapılan aşamalar)

Üretim hattından alınan pastörizasyon (72 °C) sonrası süt, kültür ilaveli süt, mayalanmış (kimozin ile) sütün sıvı olan yüzeyi ile peynir altı suyu aşamalarından 5 ml alınıp tüplere

konuldu. 4000 rpm 20 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Yüzeydeki yağ tabakasının alt kısımlardan 1 ml alınarak ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere 2-10 oranlarında seyreltildi ve +4 °C 'de saklandı. Mayalama sonrası katı kısım, taze teleme, asitliği ilerlemiş teleme, haşlama sonrası kaşar hamuru, taze kaşar, olgunlaştırılmış kaşar aşamalarından 1 g alınıp 5 ml saf su ile homojenize edildi. Daha sonra 4000 rpm' de 20 dakika santrifüjlenerek yağ fazın ayrılması sağlandı. Santrifüjden sonra elimizdeki örneklerin sıvı kısımlarından eppendorf tüplere 1 ml alındı, katı kısımlarından ise eppendorf tüplere bir spatul ucu kadar alınıp 1ml ultra saf suda çözüldürüldü. Belirtilen şekilde hazırlanan örnekler ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere 2-10 oranlarında seyreltildi ve +4 °C 'de saklandı.

4.2.3.3. Lor Peynir Örnekleri

Lor peyniri üretimi akım şeması Şekil 4.3' te verilmiştir. Lor peyniri üretim basamaklarından çeşitli aşamalarda numuneler alındı ve deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı. Üretim hattından alınan örnekler aşağıda sıralanmıştır;

Örnekler

1. PAS (Isıl işlem öncesi)
2. PAS (Isıl işlem sonrası)
3. Süzme sonrası lor
4. Süzme sonrası PAS
5. Paketleme öncesi lor



Şekil 4.3. Lor peynir üretim akış şeması

(* Örnekleme yapılan aşamalar)

Kaşar peyniri üretim hattından alınan çiğ pas, kaynatma sonrası pas ve lordan sonraki süzölmüş pas aşamalarından 5 ml alınıp 4000 rpm 20 dakika yağ fazın ayrılması sağlandı. Yağdan arındırılan kısımlardan 1 ml alınıp ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere 2-10 oranlarında seyreltildi ve +4 °C 'de saklandı. Süzme sonrası lor ve paketleme öncesi lor peynirlerinden 1 g alınıp 5 ml saf su ile homojenize edildi. Örnekler 4000 rpm 20 dakika santrifüj edildi. Yağ fazı altındaki serum kısmından 1ml alınarak ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere 2-10 kat seyreltildi. Katı kısımlarından ise eppendorf tüplere bir spatul ucu kadar alınıp 1ml ultra saf suda çözüldürüldü, 2-10 oranlarında seyreltildi ve +4 °C 'de saklandı.

4.2.3.4. Yoğurt Örnekleri

Çalışmada ulusal iki marka tarafından üretilen yoğurtlar, yerel firma tarafından üretilen yoğurt ve ev yapımı yoğurt örnekleri kullanıldı. Ev tipi yoğurt için Murat Bey Gıda Sanayi ve

Ticaret A.Ş. (Uşak)' dan temin edilen çiğ süt ev ortamında kaynatıldı ve soğuması için oda koşullarında bekletildi. Mayalama için yaklaşık 37 °C olması beklendi ve daha önceden yapılmış bir yoğurttan bir miktar alınıp mayalama sıcaklığına getirilen süt ile mayalama işlemi gerçekleştirildi. Yaklaşık olarak 4 saat sonra pıhtı tutan yoğurt bir gece buzdolabında bekletildi. Kullanılan yoğurt örnekleri aşağıda sıralanmıştır;

1. (U1)
2. (U2)
3. (Y1)
4. (E1)

Yoğurt örnekleri hazırlanırken, 5 g alınıp 4000 rpm 20 dakika santrifüj yapıldı ve yağ fazın ayrılması sağlandı. Yağ tabakasının altındaki serumdan 1 ml alınıp tüplere konuldu, katı kısmından 1 spatul ucu alınıp 1 ml ultra saf su içinde çözdürüldü. Alınan bu örnekler 2-10 oranlarında seyreltildi ve +4 °C 'de saklandı.

4.3. Protein Miktarlarının Tayini (Bradford Yöntemi)

Bu çalışmada tüm örneklerdeki protein miktarı tayinleri Bradford Yöntemine göre yapıldı [64]. Ölçüm için örnekler ve ilgili kimyasal malzemeler aşağıdaki gibi hazırlandı.

4.3.1. Bradford Boya Çözeltisinin Hazırlanması

Konsantre Bradford boya çözeltisi (Bradford Dye Reagent, Biorad) verilen reçeteye göre 1/5 oranında seyreltildi. Bunun için 20 mL boya çözeltisine 80 mL distile su eklendi ve elde edilen seyreltik çözelti filtre kâğıdı ile süzülerek kullanıldı.

4.3.2. Standart Eğri Hazırlanması

BSA Standart eğrisinin çizimi için kullanılacak bir seri protein dilüsyonu Çizelge 4.1' e göre hazırlanmıştır. Stok BSA çözeltisinden (10 mg/ml) çizelgede belirtilen miktarlarda alınarak belirtilen son derişimlere ulaşmak üzere ultra saf su ile hacim tamamlandı.

Çizelge 4.1. Standart eğri hazırlamada kullanılacak BSA protein dilüsyonları

Ultra saf su (µL)	Stok BSA çözeltisi (10 mg/ml) (µL)	Son derişim (ppm)
900	100	1000
925	75	750
950	50	500
975	25	250
990	10	100

Hazırlanan her bir dilüsyondan 100 µl alınarak 5 mL seyreltilmiş boya çözeltisi (protein assay dye reagent, BİO-RAD) ile karıştırıldı. Boya ve örnek karışımı 5 dakika süresince karanlık bir ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örneklerin 595 nm'deki absorbans değerleri UV-Görünür Bölge Spektrofotometre (Biochrom Libra s70, ABD) ile okundu. Her örnek için 3 okuma yapıldı ve deney iki kez tekrarlandı. Elde edilen veriler kullanılarak standart eğri ve regresyon denklemi elde edildi.

4.3.3. Örneklerdeki Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Üretim hattından alınan örnekler Bölüm 3.2'de belirtildiği üzere hazırlandı ve her birinin içerisindeki protein miktarları Bradford yöntemi ile tespit edildi. Buna göre her bir örnekten 100 µl alınarak 5 mL boya çözeltisi ile karıştırıldı. Karıştırılan örnekler karanlık bir odada 5 dakika bekletilmelerinin ardından 595 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometrede okundu ve kayıt altına alındı. Her bir örnek iki ve/veya üçer defa okuma gerçekleştirildi ve deneyler ikişer defa tekrarlandı.

4.4. SDS-PAGE Analizi

SDS-PAGE analizi jel hazırlama, örnek yükleme, elektroforez, boyama, yıkama ve görüntüleme adımlarından oluşmaktadır. Her bir süreç aşağıda detaylı şekilde açıklanmıştır.

4.4.1. Resolver Jel (%12'lik) Hazırlama

Jelin hazırlanması BİO-RAD'ın kataloğunda belirtilen metotlara göre yapılmıştır. Cam plaka ekipmanları önce distile su, ardından %70 etanol ile temizlendi ve kurutuldu. Plakalar dik bir şekilde plaka tutucuya takıldı ve dikkatlice tutucu üzerine sabitlendi.

Resolver A (BİO-RAD) 'dan her bir jel için 3mL, Resolver B (BİO-RAD)' den her bir jel için 3 mL, %10 APS (amonyum persülfat) 'den her bir jel için 30 µL, TEMED (tetrametil-etilendiamin)' ten her bir jel için 3 µL alınıp 50 mL'lik erlende karıştırıldı ve SDS-PAGE kasetlerinin içerisine yukarıdan yaklaşık 2 cm boşluk bırakacak şekilde otomatik pipetlerle 5 mL karışım jeli boşaltıldı. Jel üzerine yapının düzgün olması için etanol döküldü. Yaklaşık yarım saat sonra jel üzerindeki etanol dökülerek jel yüzeyi saf su ile etanolden arındırıldı.

4.4.2. Stacking (%4'lük) Jel Hazırlama

Stacking A (BİO-RAD) 'dan her bir jel için 1 mL, Stacking B (BİO-RAD)' den her bir jel için 1 mL, %10 APS (amonyum persülfat) 'den her bir jel için 10 µL, TEMED (BİO-RAD) (tetrametil-etilendiamin)' ten her bir jel için 2 µL alınıp 50 mL'lik erlende karıştırıldı. Hazırlanan bu karışım Resolver jelin üzerine döküldü ve kuyucuk oluşumu için üzerine tarak yerleştirildi ve bir saat beklenip jel donduktan sonra tarak dikkatlice yerinden çıkartıldı.

4.4.3. Örnek Hazırlama

4.4.3.1. Standart Protein Örnekleri

Çalışmada kullanılan protein standartları WPI, WPC, ALA ve kazein, α -La, β -Lg, BSA, α -CN, β -CN, κ -CN'inden eppendorf tüplere 10 mg/ml alınıp 1000 ppm'e seyreltildi.

Standart proteinler seyreltme işleminden sonra her birinden 5 µl alınıp 95 µl ultra saf su ile ependorf tüplerine aktarıldı. İçerisinde beta merkaptotanol bulunan 4x'lik laemi sample buffer (BİO-RAD) 1x' e seyreltildi. Daha sonra hazırlanan örneklerin (100 µl) her birinin üzerine sample buffer' dan 33 µl ilave edildi ve 95 °C 'de 5 dakika ısıtılarak proteinler denature edildi. Örnekler elektroforez jeline yüklemeye hazır hale getirildi.

4.4.3.2. Peynir ve Yoğurt Örneklerinin hazırlanması

Örnek hazırlamada kullanılan çiğ süt, pastörize süt ve peynir numuneleri Muratbey Gıda firmasından temin edildi. UHT süt örneğinde ulusal bir marka market ürünü kullanılmıştır. Yoğurt örneklerinde ise yerel ve ulusal marka market yoğurtları ile ev yapımı yoğurt kullanıldı.

SDS-PAGE analizi yapılacak tüm örneklerin hazırlanması ile ilgili detaylar önceki bölümde (Bölüm 4.2) verilmiştir. Tüm örnekler (Beyaz peynir, kaşar peynir, Lor peynir, Yoğurt) içerdikleri yağın ayrılması için santrifüj işlemine tabi tutuldu. Bu işlem sonrası sıvı kısımlardan 100 ml farklı bir tüpe alındı ve 1:1 oranında ultra saf su ile seyreltildi. Santrifüj sonrası katı kısımda 5 mg alınarak 95 µL ultra saf su içerisinde çözündürüldü [65]. İçerisinde beta merkaptotanol bulunan 4x'lik laemi sample buffer 1x'e seyreltildi. Daha sonra hazırlanan örneklerin (100 µl) her birinin üzerine sample buffer' dan 33 µl ilave edildi ve 95 °C 'de 5 dakika ısıtılarak proteinler denature edildi. Örnekler elektroforez jeline yüklemeye hazır hale getirildi.

4.4.4. Jelin Yürütülmesi

Cam tabakalar içerisinde donmuş jel tank (BİO-RAD) içerisine yerleştirildi. Jeli bulunduran tank yaklaşık yüksekliği 3 cm olana kadar yürütme tamponu 1xTGS (Tris, glisin, SDS, pH) Buffer (BİO-RAD) ile dolduruldu. Hazırlanan örneklerden pipet yardımıyla 20 µl kuyulara dikkatlice yüklendi. Protein bantlarının moleküler ağırlıklarını tespit etmek amacıyla

jellerde bir kuyuya protein standartı (Precision plus protein dual xtra standards, BİO-RAD) yüklendi. Yürütme işlemi sırasıyla 60 V ve 15 dk, akabinde 90 V 90 dk olarak gerçekleştirildi.

4.4.5. Jelin Boyanması ve Görüntülenmesi

Yürütme işlemi bittikten sonra cam tabakalar sistem üzerinden çıkartıldı ve jele zarar vermeden cam tabakaların ayrılması sağlandı. Jel üzerindeki boyanın sabitlenmesi için fiksasyon solüsyonuna (%40 metanol, %10 asetik asit) (BİO-RAD) bırakıldı ve yarım saat fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Fiksasyon işleminin ardından jel hafif distile su ile yıkanarak boyama işlemi yapıldı. Bu işlem için Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (BİO-RAD) kullanılarak 1 saat boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama işleminin ardından jel Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution (BİO-RAD) 'da 4 saat tutularak protein olmayan bölgelerdeki boyanın uzaklaştırılması sağlandı.

Bu işlemlerin ardından jeller UV-Transilluminatör (BİO-RAD) üzerine alınarak protein bantları incelendi.

4.5. Kapiler Elektroferez

4.5.1. Örneklerin Hazırlanması

Standart örnekler ve diğer peynir ve yoğurt örnekleri bölüm 3.2.'de anlatıldı. Bu örneklerden sıvı olanları 100 µl alınarak fosfat tamponu ile 1000 µl' ye tamamlandı. Katı örnekler ise pelletlerden bir spatül ucu (yaklaşık 10 mg) alınan numune 1000 ultra saf suda çözüldü. Buradan 10 µl alınarak fosfat tamponu ile 1000 µl' ye tamamlandı. Hazırlanan örnekler 0.45 µm çapındaki filtrelerden geçirildi ve kolona beslendi.

4.5.2. Elektroferez

Süt ve peynir örneklerine ait elektroferogramlar Agilent Kapiler Elektroferezi (7100, ABD) kullanılarak elde edildi. Metodun çalışma süresi, kolon ön koşullandırma hariç her bir

örnek için yaklaşık 30 dakika olarak belirlendi. Sitrat ve fosfat tamponları ile geniş bir pH aralığında (2.5 – 8) farklı tampon ortamları denendi. En iyi tamponun pH 7 'de 100 mM fosfat çözeltisi olduğu tespit edildi. Çalışmada aktif uzunluğu 40 cm, çapı 50 mikron olan kaplanmamış kılcal kolonlar (Agilent, ABD) kullanıldı. Kapiler elektroforez 20 °C kaset sıcaklığı, 20 kV elektrokinetik enjeksiyon ile 50 mbar basınçla 5 saniye boyunca örneğin kolona enjeksiyonu ile yapıldı. Proteinlerin 210 nm'deki absorpsiyon pikleri elektroferogram olarak elde edildi [75].

Kolon ön koşullandırma:

<u>tanımlama</u>	<u>program</u>
1) 1 M NaOH	100mbar, 1200 saniye inlet:1; outlet 7
2) dH ₂ O	100mbar, 120 saniye inlet:2; outlet 7
3) Boş vial	100mbar, 300 saniye inlet:4; outlet 7
4) Metanol	100mbar, 60 saniye inlet:5; outlet 7
5) 1 M HCl	100mbar, 1200 saniye inlet:6; outlet 7
6) Fosfat tamponu	
7) dH ₂ O	

<u>tanımlama</u>	<u>program</u>
1) 0,1 M NaOH; 2) dH ₂ O; 3) Boş vial; 4) Fosfat tamponu, 5) Fosfat tamponu; 6) Fosfat tamponu; 7) dH ₂ O;	<u>Günlük şartlama:</u> 100mbar, 600 saniye inlet:1; outlet 7 100mbar, 600 saniye inlet:2; outlet 7 100mbar, 800 saniye inlet:6; outlet 7 <u>Ara yıkama</u> 100mbar, 300 saniye inlet:1; outlet 7 100mbar, 300 saniye inlet:2; outlet 7 100mbar, 300 saniye inlet:4; outlet 7

4.6. FT-IR Analizleri

FT-IR analizleri için tüm örnekler ve standart proteinler önceki bölümlerde açıklandığı şekilde hazırlandı. Örnekler IR bant titreşimleri sonucu oluşan spektrumları Perkinelmer/Spectrum 400 (ABD) ile elde edildi.

Her örnek için 400 – 4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında, 4 cm⁻¹ tarama hızıyla 64 tarama yapıldı ve elde edilen spektrumlar kaydedildi.

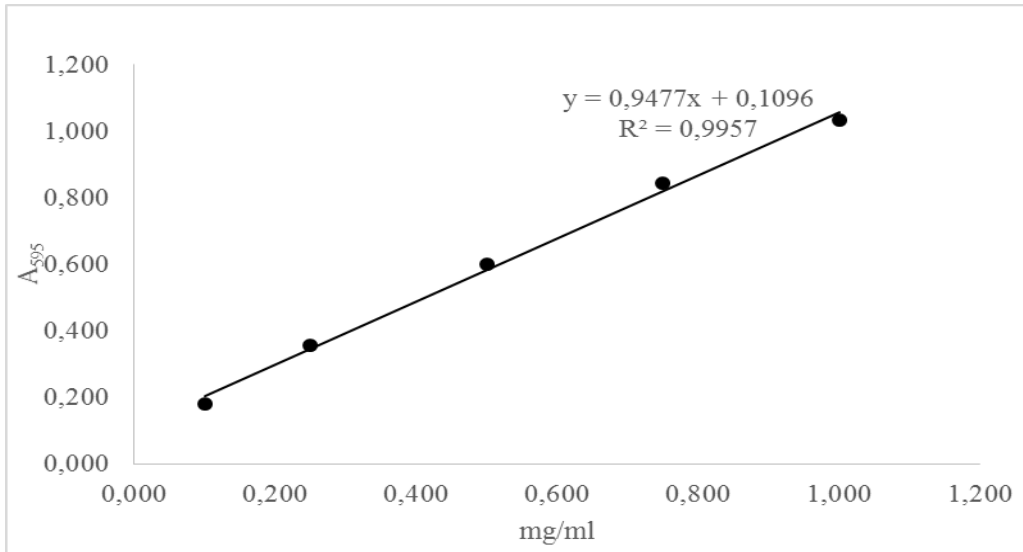
5. BULGULAR ve TARTIŞMA

İnek sütü, peynir ve yoğurt örneklerindeki alerjen protein profilleri ve işleme esnasında gerçekleşen değişimler çeşitli yöntemlerle incelenmiş ve bulguları sunulmuştur.

5.1. Örneklerdeki Protein Miktarlarının Belirlenmesi

5.1.1. Bradford Sonuçları:

Süt, peynir ve yoğurt örneklerinde protein miktarlarını belirlemek amacıyla Bradford yöntemi kullanılmıştır. BSA proteinine ait standart eğri bu proteinin bir seri dilüsyonunun hazırlanarak UV spektrofotometrede absorbans değerlerinin elde edilmesi ve absorbansa karşılık konsantrasyonun grafiğe alınmasıyla elde edilmiştir (Şekil 5.1). Elde edilen bu standart eğri yardımıyla bu çalışmada kullanılacak süt örneklerinin protein miktarları belirlenmiştir.



Şekil 5.1. Bradford analizinde sığır serum albumin (BSA) standart eğrisi

Standart eğri kullanılarak beyaz peynir, kaşar peynir, lor peynir ve yoğurt üretim aşamalarının her birisinden alınan örnek numunelerin protein miktarları belirlenerek sırasıyla Çizelge 5.1., Çizelge 5.2., Çizelge 5.3. ve Çizelge 5.4. 'te verilmiştir. Standart eğri sayesinde her numunenin protein miktarları grafikteki denklemden yararlanılarak tespit edilmiştir. Çizelge 5.1. beyaz peynir üretim hattından değişik aşamalarda alınan örneklerdeki alerjen protein miktarları gösterilmektedir.

Çizelge 5.1. Beyaz Peynir örneklerinde işleme esnasında tespit edilen protein miktarları

	Örnek adı	Protein miktarı (mg/ml)
Beyaz Peynir Örnekleri	Teleme sup.	1,03±0,068
	PAS beyaz	2,725±0,002
	Teneke sup.	4,743±0,631
	Teleme pellet	0,629±0,09
	Salamura pellet	3,415±0,09
	Salamura sup.	0,319±0,098

Kaşar peyniri üretim hattından değişik aşamalarda alınan örneklerdeki alerjen protein miktarları Çizelge 5. 2' de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Kaşar Peyniri örneklerinde işleme esnasında tespit edilen alerjen protein miktarları

	Örnek adı	Protein miktarı (mg/ml)
Kaşar Peynir Örnekleri	Kültür sonrası süt	20,297±0,423
	Maya sonrası serum	3,729±0,062
	Maya sonrası pellet	2,723±0,044
	Kaşar PAS	3,209±0,128
	Teleme sup.	0,544±0,025
	Bekleme sonrası sup	0,637±0,075
	Haşlama sup.	2,06±0,01
	Taze kaşar sup	2,064±0,086
	Taze kaşar pellet	4,962±0,169
	Olgunlaştırma sup.	1,474±0,029
	Teleme pellet	1,827±0,014
	Bekleme sonrası pellet	4,211±0,831
	Haşlama sonrası pellet	11,029±0,868
	Olgunlaştırma pellet	6,812±0,557
Mayalama sonrası katı sup	1,682±0,025	

Lor peyniri üretim hattından değişik aşamalarda alınan örneklerdeki alerjen protein miktarları Çizelge 5. 3'te verilmiştir.

Çizelge 5.3. Lor Peynir örneklerinde işleme esnasında tespit edilen alerjen protein miktarları

	Örnek adı	Protein miktarı (mg/ml)
Lor Peynir Örnekleri	Alkali sonrası PAS	1,382±0,048
	Isıtma, 95 °C	3,526±0,188
	Süzme sonrası PAS	0,388±0,054
	Süzme son. Lor sup	0,335±0,036
	Çapalama Lor sup.	0,011±0,006

Yoğurt üretim hattından değişik aşamalarda alınan örneklerdeki alerjen protein miktarları Çizelge 5. 4'te verilmiştir.

Çizelge 5.4. Yoğurt örneklerinde işleme esnasında tespit edilen alerjen protein miktarları

	Örnek adı	Protein miktarı (mg/ml)
Yoğurt örnekleri	U1 sup	2,16±0,062
	U2 sup	2,178±0,068
	Y1 sup	2,819±0,082
	E1 sup	0,955±0,02

Elde edilen bulgulara bakıldığında literatürdeki bulgulara benzer sonuçlar bulunmuştur. Tunçtürk Y. (2010) peynir proteinleri üzerine yaptığı çalışmada 14.6 g peynir/100 g süt sonucunu bulmuştur [78]. Benzer sonuçlar Lucey ve Kelly [79], Kosikowski ve Mistry [80] ve Bulut ve Akın [81] tarafından da bildirilmiştir. Protein miktarlarındaki değişmelerin proseslerdeki aşamaların farklılıkları, ısıl işlem normlarının değişikliği, mayalama ve teleme kırma gibi işlemlerdeki süreç ve yapılan işlem süresindeki değişmeler göz önüne alındığında

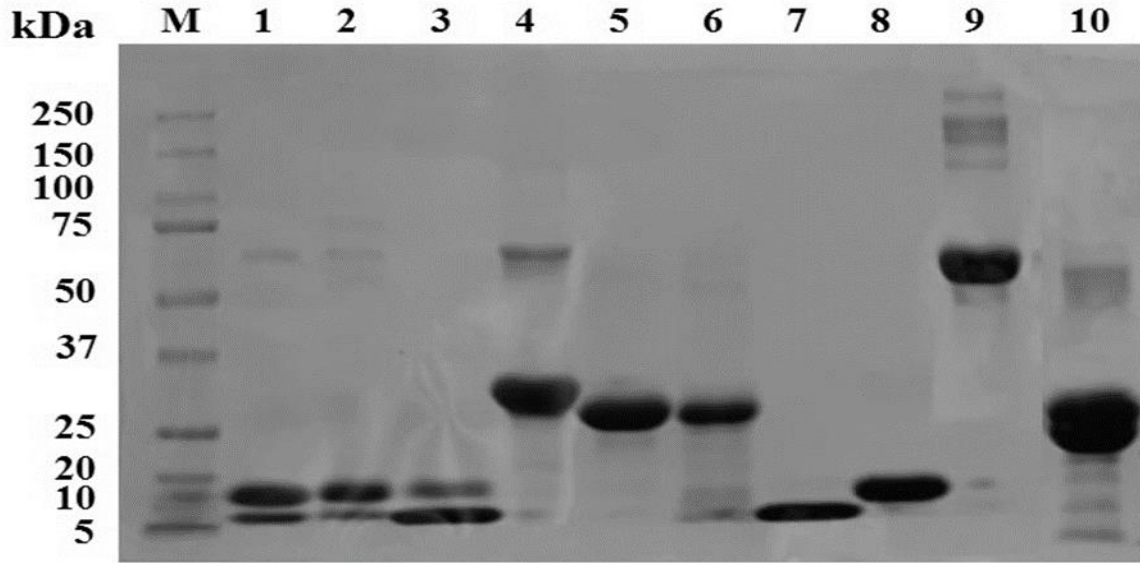
alerjen protein miktarlarında farklılıklar gözlenmiştir. Protein miktarlarına genel olarak bakıldığında Çetindar Ş. (2017) Süt teknolojisi I isimli yayınında kazein ve serum proteinleri sırasıyla % 2,6 ve % 0,6 olarak tespit etmiştir [76].

Peynir örneklerinde süttten telemeye geçişte kazeinin çökmesiyle meydana gelen değişiklik ve serum proteinlerinin ayrılması nedeni ile üretim basamaklarına sırasıyla bakıldığında alerjen protein miktarlarında düşüş görülmektedir. Lor peynirinde ise serum miktarı çiğ pas' ta düşük olmasında rağmen ısıtmanın etkinliği temel alındığında 96 °C ısıya maruz kalan PAS'ın protein miktarında çiğ PAS'a göre farklı sonuç gözlendi.

Literatüre bakıldığında yoğurdun protein miktarı ortalama % 3-4 olması gerektiği görülmektedir [77]. Protein miktarlarındaki farklılıkların sebebinin seyreltme işlemlerinde proteinlerin tam olarak çözündürülemediği olarak değerlendirilmiştir.

5.2. SDS-PAGE Analizi ile Örneklerdeki Protein Profillerinin Belirlenmesi

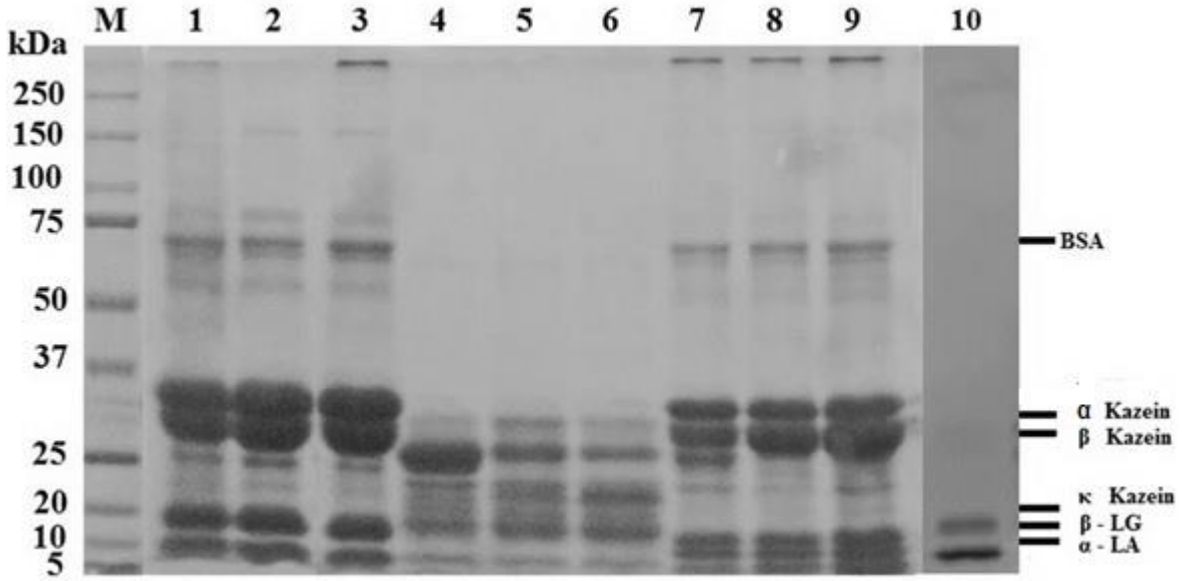
Süt, peynir ve yoğurt örneklerinde işleme esnasında alerjen protein içeriklerinde gerçekleşen değişimler SDS-PAGE analizleri ile izlenmiştir. Çalışmada kullanılan standart proteinlere ait profiller Şekil 5.2. 'de verilmiştir.



Şekil 5.2. Standart proteinlerin ve örneklerin protein profilleri

(M: marker, 1: WPI, 2: WPC, 3: α -La, 4: α -kazein, 5: β -kazein, 6: κ -kazein, 7: α -La, 8: β -Lg, 9: BSA, 10: Kazein)

Standart proteinlerde kalitatif farklılıklar yüksek, orta ve düşük molekül ağırlıklı bölgelerde cinsler arasında gözlenmiştir. Moleküler ağırlık bölgesinde, moleküler ağırlıkta az bir değişiklik gösteren test edilen örneklerde yaklaşık molekül ağırlığı ~ 220 kDa ve ~ 190 kDa olan proteinler tespit edildi. Orta moleküler ağırlık bölgesinde, bir adet belirgin peptid tespit edildi. Bu alandaki örnekte yavaş hareket kabiliyeti ve hafif yoğunlukta BSA (66.2kDa) saptandı. Benzer şekilde α -kazein bandında, BSA'nın ağır zinciri olabilecek 64 kDa'lık bir protein bandı tespit edildi. Düşük molekül ağırlık ve yüksek hareketlilik bölgesinde standart protein örneklerinde net olarak önemli bir bant (~ 19 kDa ile ~ 25 kDa arasında) saptandı. Bu bant grubunda α -kazein 25 kDa, β -kazein 24 kDa, κ -kazein ise 19 kDa bandında tespit edildi. Standartların en alt bölgesindeki bantlara bakıldığında ise 12 kDa ile 18 kDa arasında sırasıyla α -La (~ 14 kDa) ile β -Lg (~ 18 kDa) tespit edildi.

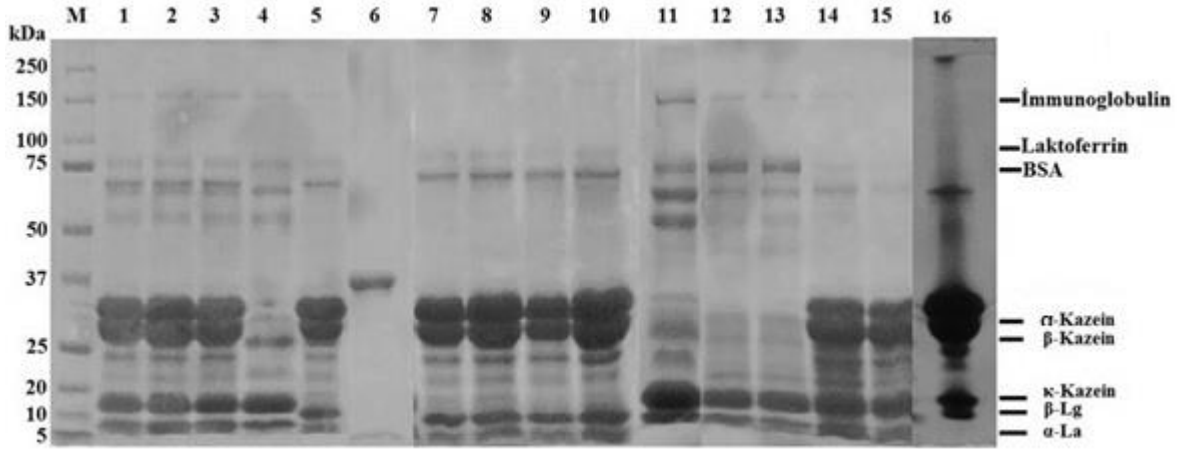


Şekil 5.3. Beyaz peynir proteinleri ve örneklere ait protein profilleri

(M: marker, 1: UHT Süt, 2: Çiğ süt, 3: Pastörizasyon sonrası süt 85 °C, 4: Teleme sulu kısım, 5: Salamura sonrası beyaz sulu kısım, 6: Tenekelere aktarıldıktan sonraki beyaz peynir sulu kısım, 7: Teleme katı kısım, 8: Salamura sonrası beyaz peynir katı kısım, 9: Tenekelere aktarıldıktan sonraki beyaz peynir katı kısım, 10: Peynir altı suyu)

Süt örneklerine bakıldığında (1. 2. ve 3. hat) her bir süt örneğinin bütün alerjen protein profillerini net bir şekilde barındırdığını görmekteyiz. 1, 2 ve 3 numaralı bantlarda α -kazein ~33kDa ve β -kazein ~26kDa olarak saptandı. Isıl işleme uğrayan sütlere bakıldığında protein profili açısından net bir farklılık gözlenememiştir. Aynı bantlarda hafif yoğunlukta κ -Kazein ~22kDa olarak tespit edildi. Belirgin bir şekilde aynı düzlemde bulunan β - Lg ile α - La ise sırasıyla ~18kDa, ~14kDa olarak saptanmıştır. Bu üç bant grubunda hafif yoğunlukta BSA ise ~66kDa olarak görülmektedir. 4,5 ve 6 numaralı hatlara bakıldığında α s1-kazein varlığından söz edemiyoruz. Fakat 4. Bant yoğun olarak κ -Kazein barındırmaktadır. Diğer 8 ve 9 numaralı hatlara bakıldığında aynı protein profillerini barındırırken 7 numaralı bantta 8 ve 9 numaralı bantlardan farklı olarak κ -Kazein (~26kDa) varlığından söz edebiliriz. Son bandımızda baskın olan iki ana protein varlığı sırasıyla β -Lg ~18kDa ve α -La ~12kDa olarak tespit edildi. Benzer şekilde Kausar ve ark. (2017) BSA, α - kazein, β -kazein, κ -kazein, α -La ve β -Lg proteinlerin

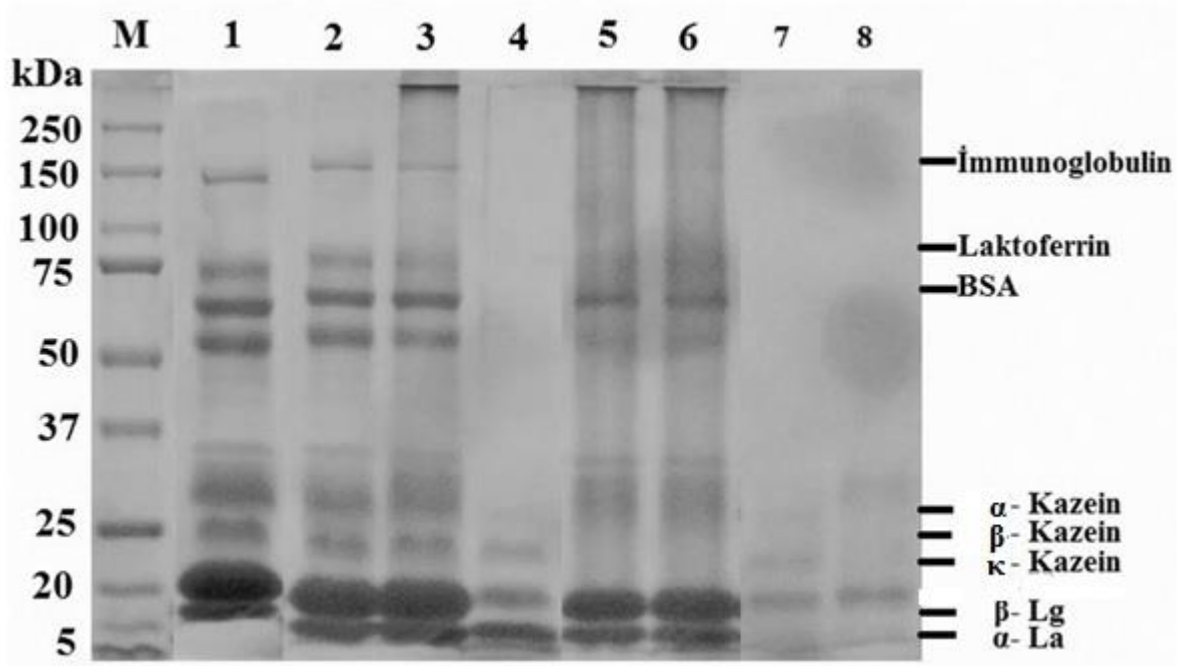
moleküler ağırlıklarını sırasıyla 78,6kDa, 28kDa, 24kDa, 22kDa, 14kDa, 18kDa olarak ifade etmişlerdir [65].



Şekil 5.4. Kaşar peynir proteinleri ve örneklere ait protein profilleri

(M: Marker, 1: Çiğ süt, 2: Pastörizasyon sonrası süt 72 °C, 3: Kültürlü süt, 4: Maya eklendikten sonraki sıvı kısım, 5: Maya sonrası katı kısım, 6: Kimozin, 7: Teleme katı kısım, 8: Fermantasyon sonrası katı kısım, 9: Haşlama sonrası katı kısım, 10: Olgunlaştırma sonrası katı kısım, 11: Peynir altı suyu, 12: Teleme sıvı kısım, 13: Fermantasyon sonrası sıvı kısım, 14: Haşlama sonrası sıvı kısım, 15: Olgunlaştırma sonrası sıvı kısım, 16: Taze kaşar katı kısım)

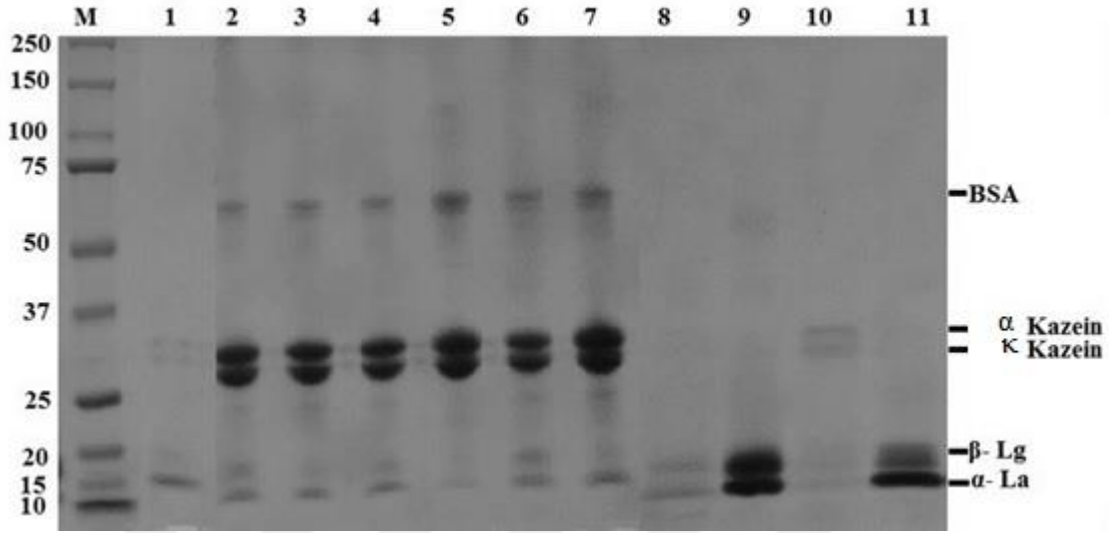
Kaşar peyniri örneklerinde 7 numaralı numunedeki teleme örneğine bakıldığında bantlarda α -kazein ~33kDa , β -kazein ~28kDa ve κ -kazein ~26kDa olarak saptandı. Teleme örneğinde belirgin bir şekilde aynı düzlemde bulunan β - Lg ile α - La ise sırasıyla ~18kDa ,~12kDa olarak saptanmıştır. Teleme örneğinde serum kaçağı olduğundan söz edebiliriz. Pas örneğinin bulunduğu 11 numaralı hatta bakıldığında iz miktarda kazein grubu protein kalıntısı görülmektedir. Asıl baskın olan β - Lg ~18kDa, α - La ise ~12kDa olarak tespit edildi. 16 numaralı hatta bakıldığında taze kaşar örneği içerisindeki protein miktarı görülmektedir. Bu band grubunda immunoglobulin ve α - La haricindeki diğer proteinlerin baskın bir şekilde görüldüğü BSA 66.2kDa, α -kazein ~33kDa , β -kazein ~28kDa, κ -Kazein ~22kDa ve β - LG ~19kDa olarak tespit edildi.



Şekil 5.5. Lor peynir proteinleri ve örneklere ait protein profilleri

(M: Marker, 1: Peynir altı suyu, 2: Alkali muamele sonrası PAS, 3: Isıtma sonrası PAS, 4: Süzme sonrası PAS, 5: Süzme sonrası lor katı kısım, 6: Presleme sonrası lor katı kısım, 7: Süzme sonrası lor sıvı kısım, 8: Presleme sonrası lor sıvı kısım)

Lor örneklerindeki pas bantlarında (1-4) baskın olan alerjen proteinlerin serum grubu (α -La, β -Lg, BSA) olduğu görülmektedir. PAS örneklerinde ince bantlar halinde görülen kazein bantları, sütteki tüm kazeinin çöktürülemediğini ve PAS içerisine bir miktar karıştığını göstermektedir. Bu durum verimin istenen seviyede olmadığını ve endüstriyel açıdan olumsuz değerlendirilerek, Pas da kazein kaçağı olarak adlandırılır. Lor örneklerindeki 5 ve 6 numaralı bantlarda serum grubu proteinlerin baskınlığı görüldü. Burada β - LG ~19kDa, α - La ise ~12kDa olarak tespit edildi.



Şekil 5.6. Yoğurt proteinleri ve örneklere ait protein profilleri

(M: Marker, 1: U1 pellet, 2: U2 pellet, 3: Y1 pellet, 4: E1 pellet, 5: E2 pellet, 6: E3 pellet, 7: U1 sup., 8: U2 sup., 9: E1 sup., 10: E2 sup., 11: E3 sup.(ev tipi yoğurttan üç defa örnekleme yapıldı))

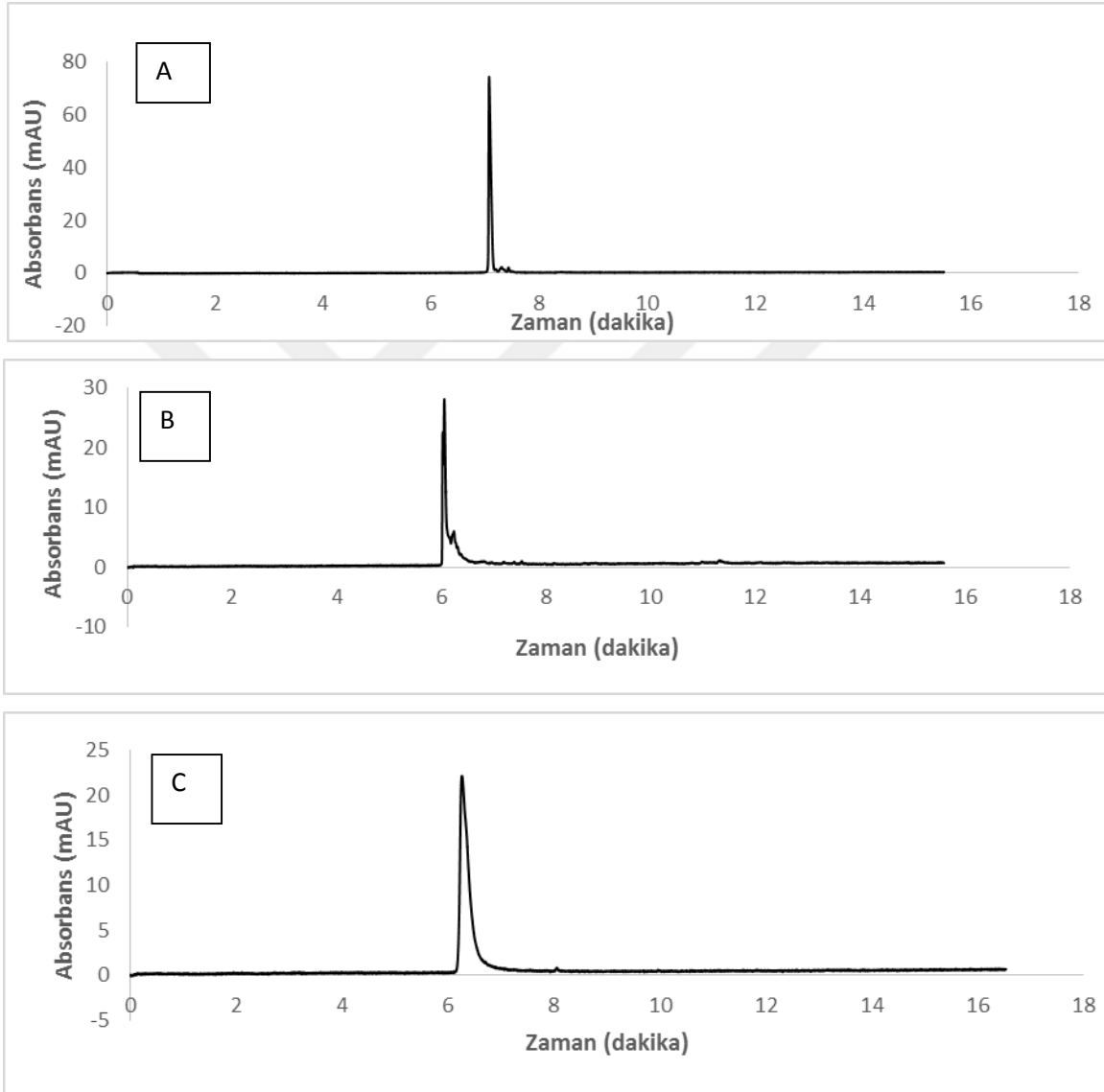
Yoğurt örneklerinde 1-7 arasındaki hatlarda baskın olarak kazein grubu alerjen proteinler saptandı. Burada α -kazein ~33kDa , κ -kazein ~28kDa olarak tespit edildi. Diğer bandlara bakıldığında 9 ve 11 numaralı bandlarda sıvı kısımlarından örnekler alındığı için serum proteinlerinden β - Lg ~19kDa, α - La ise ~12kDa olarak saptandı.

5.3. Alerjen Proteinlerin Kapiler Elektroforez’de İncelenmesi

Alerjen süt proteinlerinin çözünürlüğü, süt numunesinin ön ısıtılması, laktoz ve protein içeriği ve saklama koşulları dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır. Standart örneklerde minimum çözünürlük gözlemlendi. Bu örneklerden alınan veriler doğrultusunda süt, peynir ve yoğurt örneklerinde alınan sonuçların kıyaslaması yapıldı.

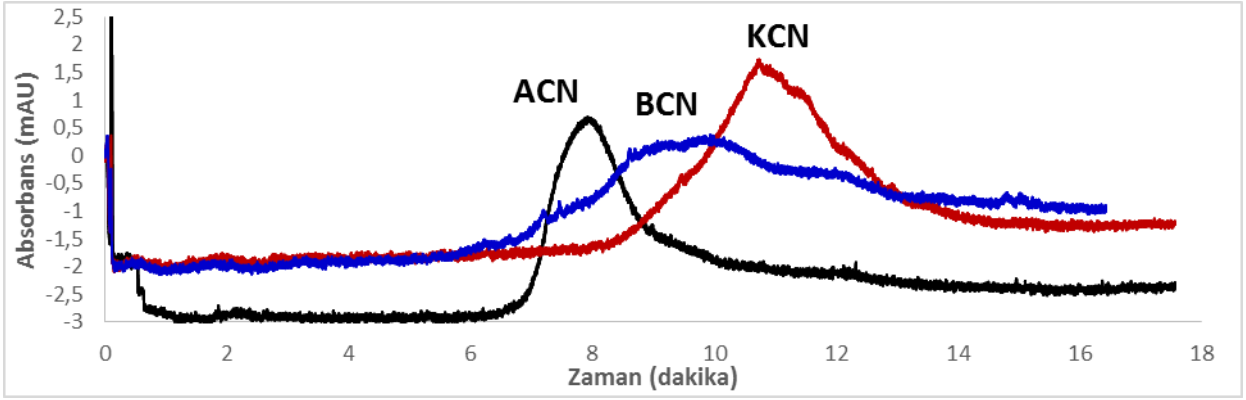
Şekil 5.7’de pH 7 fosfat tamponu kullanılarak standart proteinlerdeki alerjen süt proteinlerinin hangi zaman aralığında pik verdiği tespit edildi. Kantitatif değil de kalitatif bir tayin yapıldığı için pik alanları verilmemiş sadece elektroferogramlar verilmiştir.

Sütte bulunan alerjen protein içeriği kazein, β -Lg, α -La ve BSA fraksiyonlarından oluşmaktadır. Bu proteinlere ait standartların elektroferogramları Şekil 5.7, 5.8 ve 5.9 da verilmektedir.



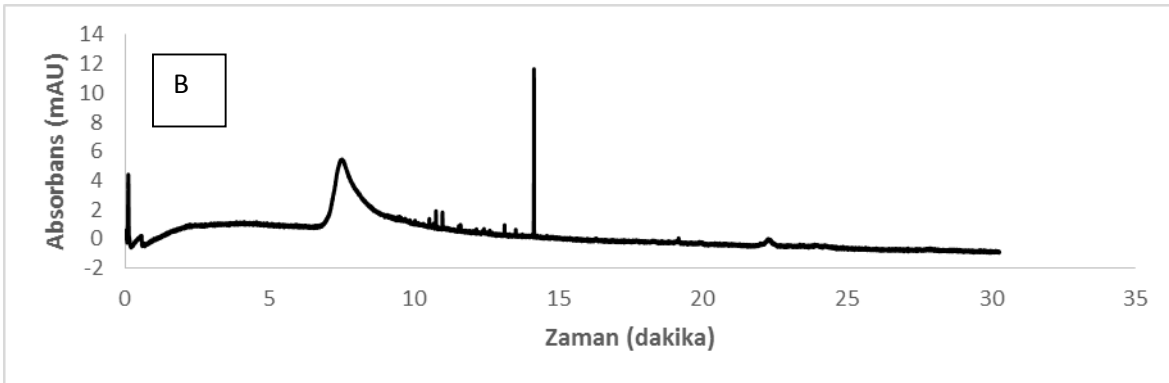
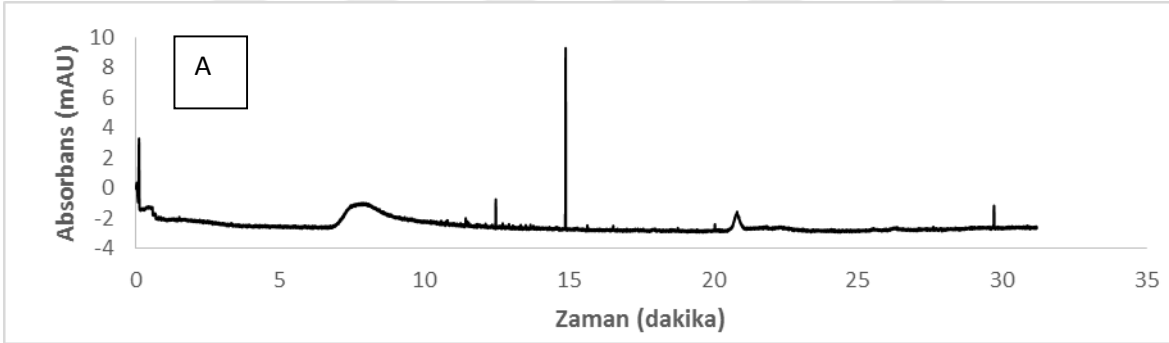
Şekil 5.7. Standart proteinlere ait kapiler elektroforez sonuçları (A: α -La, B: β -Lg, C: BSA)

Şekil 5.7'ye bakıldığında her bir protein örneğinin hangi dakikada pik verdiği görülmektedir. Kullanılan fosfat tamponu sayesinde (pH 7) alfa laktalbumin için 7,1 dakikada pik verdiği gözlemlendi. β -Lg 6. dakika ve BSA için 6,3 dakikada pik verdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 5.8. Standart proteinlere ait kapiler elektroforez sonuçları (ACN: α -kazein, BCN: β -kazein, KCN: κ -kazein)

Kazein örneklerine bakıldığında 6. dakikalar ile 14. dakikalar arasında yoğun bir şekilde pik dağılımının olduğu gözlemlendi. Kazeinin üç alt grubunun da birbirlerine yakın zamanlarda pik verdiği tespiti yapılmıştır.

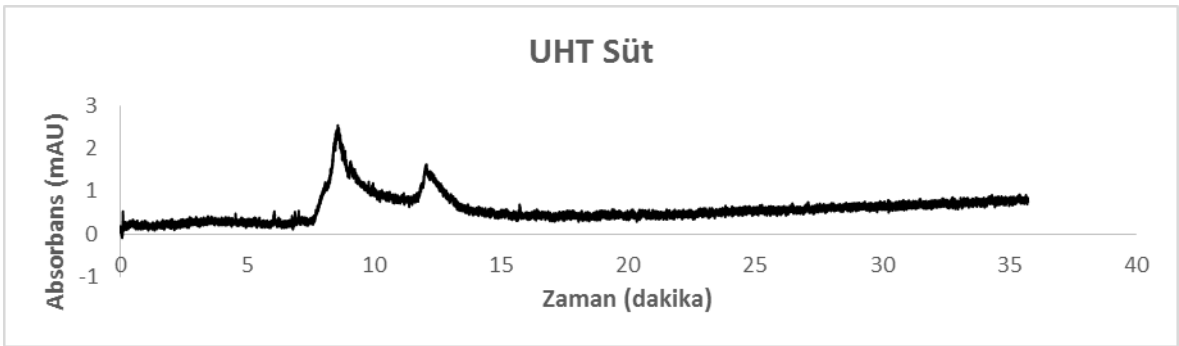
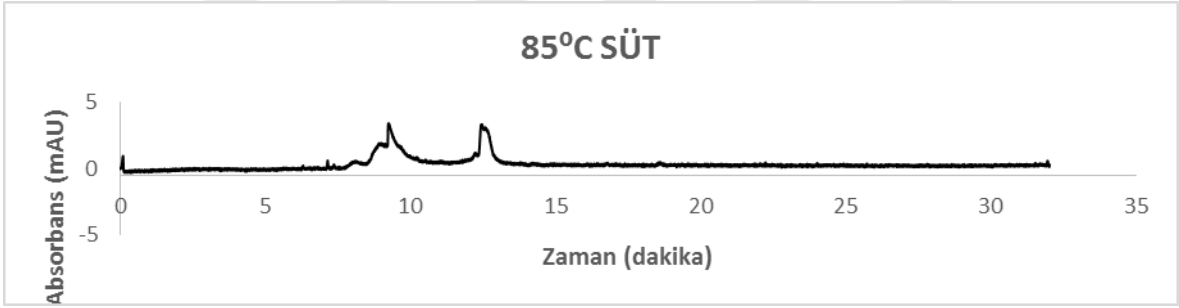
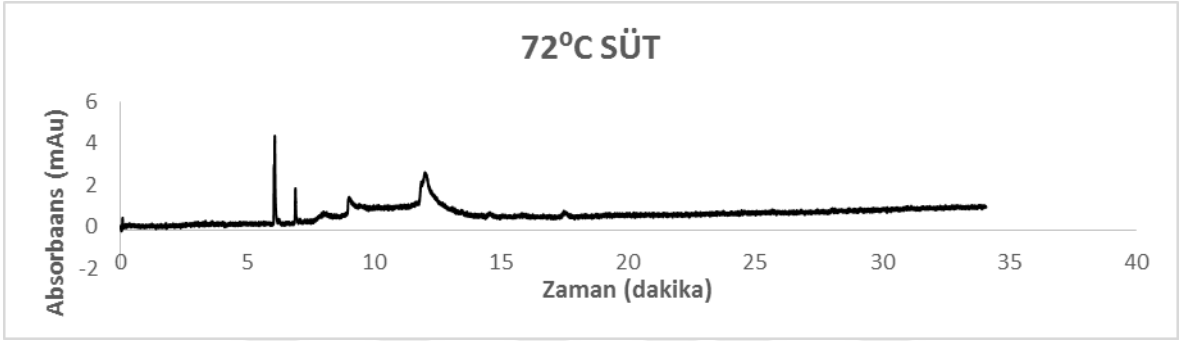
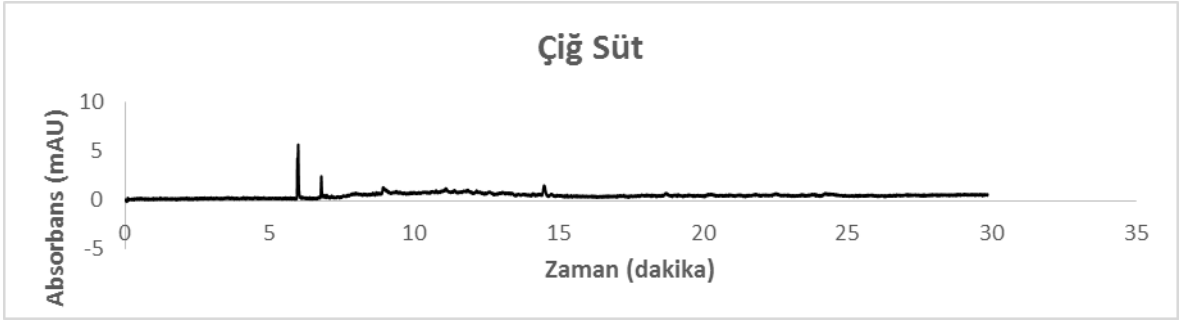


Şekil 5.9. Standart proteinlere ait kapiler elektroforez sonuçları (A: WPI, B: WPC)

WPI ile WPC örneklerindeki pik zamanları hemen hemen birbiri ile aynı zamanlarla özleştirildi. Her iki grup içinde 6. dakika ile 9. dakikalar arasında pik verdiği kanısına varıldı. Alınan bulgular neticesinde Omar ve ark. (2016) yaptığı çalışmada kapiler elektroforez elektroperogramlarından elde edilen kazein ve serum grubu proteinlerin pik alanları ve zamanları doğrusal bir korelasyona varılmıştır [76].

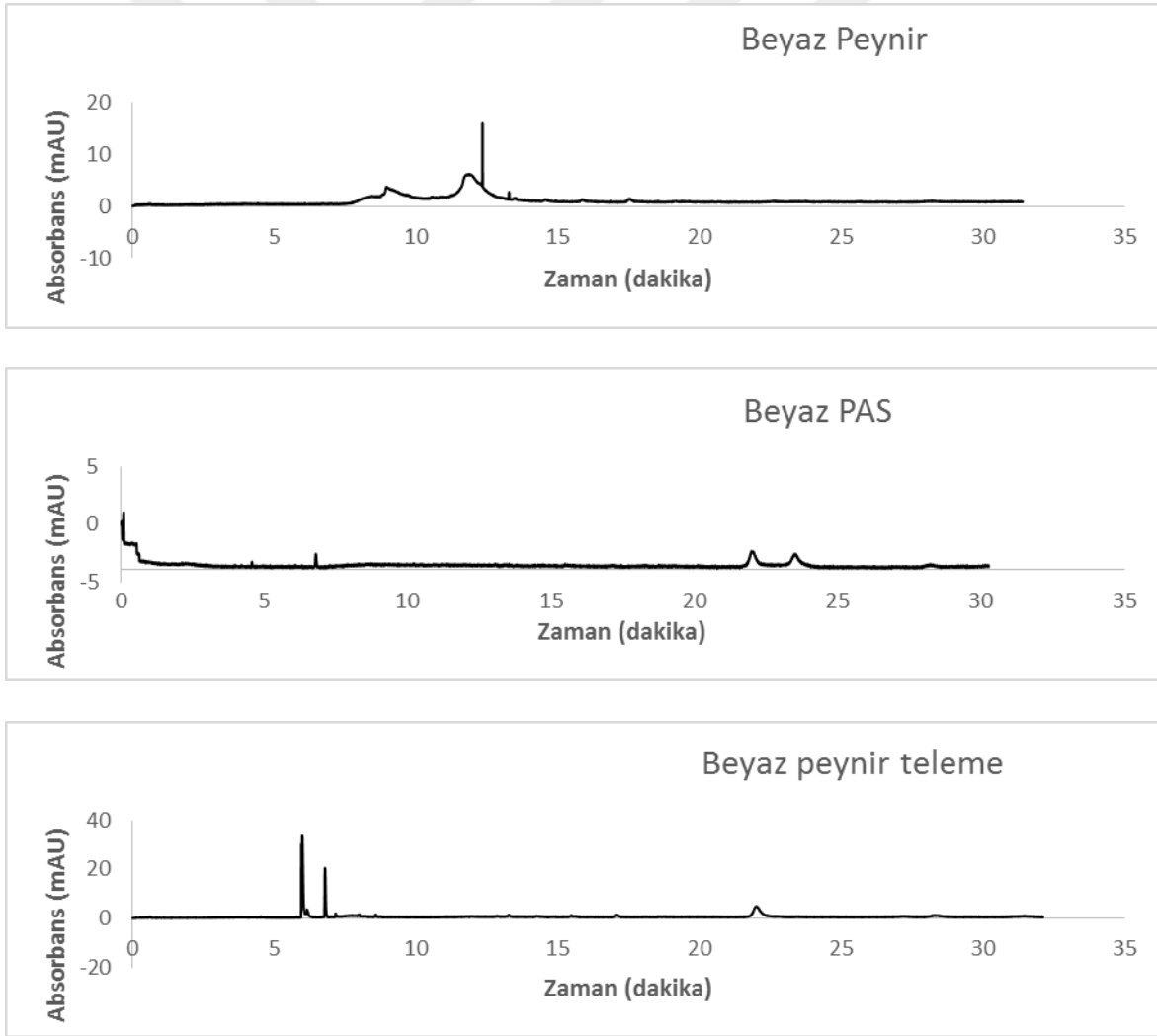
Şekil 5.10 işlem görmemiş çiğ süt, tetrapak kutuda satın alınan UHT süt, beyaz peynir ve kaşar peyniri üretim aşamalarının ilk adımları olan 85 °C ve 72 °C'de yapılan pastörizasyon aşamalarından alınmış örneklere ait elektroferogramları göstermektedir. Standart proteinlerden anlaşıldığı üzere serum proteinleri 6. ve 8. dakikalar arasında, kazein grubu proteinleri ise 7. ve 14. dakikalar arasında pik vermektedir. Her dört örnekte de bu aralıkta geniş (yayvan) pikler gözlenmiştir. Hem serum hem kazein grubu protein fraksiyonları bu yayvan pikin altında kalmış ve tam olarak ayrılamamıştır.

Çiğ süt ve 72 °C'de pastörize edilmiş süt örneğinde alerjen protein gruplarından serum protein gruplarının yaklaşık 6. dakika civarlarında pik verdiği gözlemlendi. Diğer alerjen protein gruplarının ise tam olarak ayrılamadığı tespiti yapılmıştır. Isıl işlem sıcaklarının artmasıyla serum protein gruplarındaki kararsızlık artmakta kazein grubu proteinlerin ise daha kolay ayrıştığı gözlemlendi.



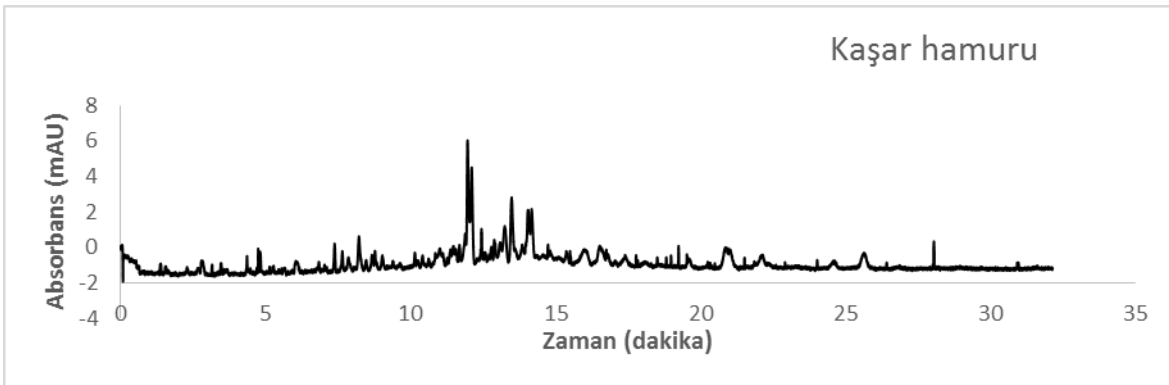
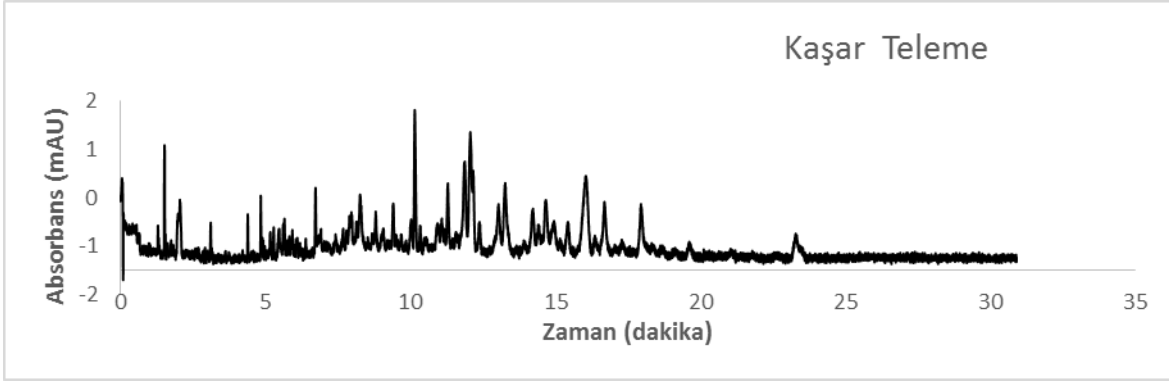
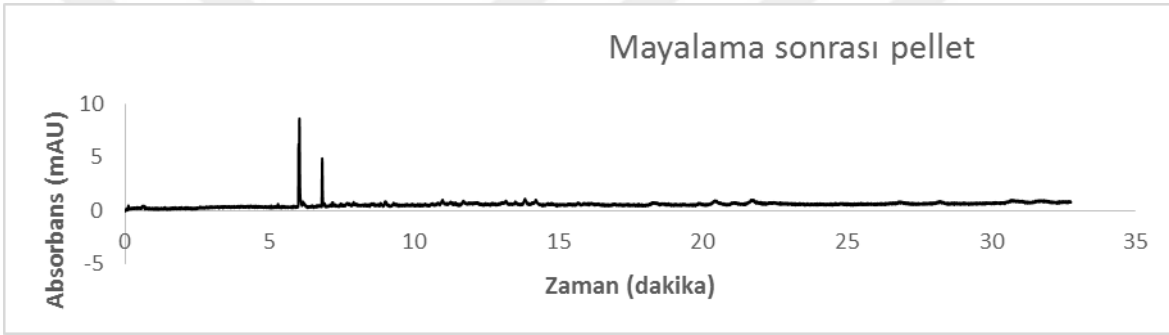
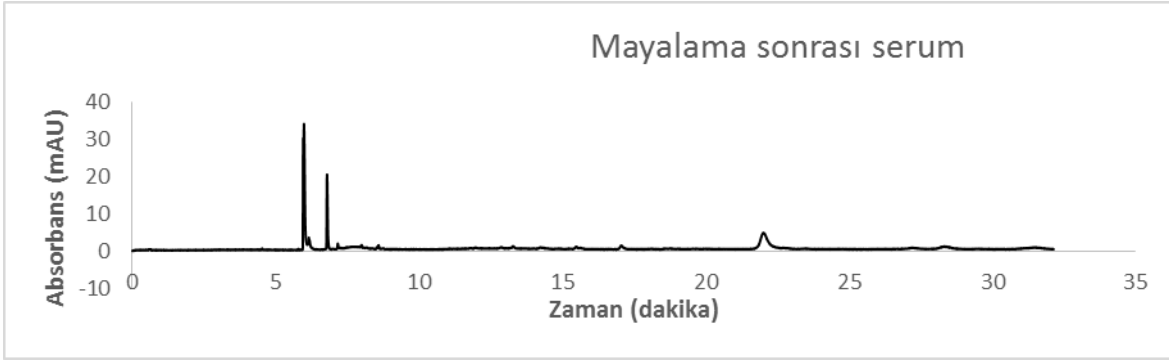
Şekil 5.10. Süt örneklerine ait elektroferogramlar

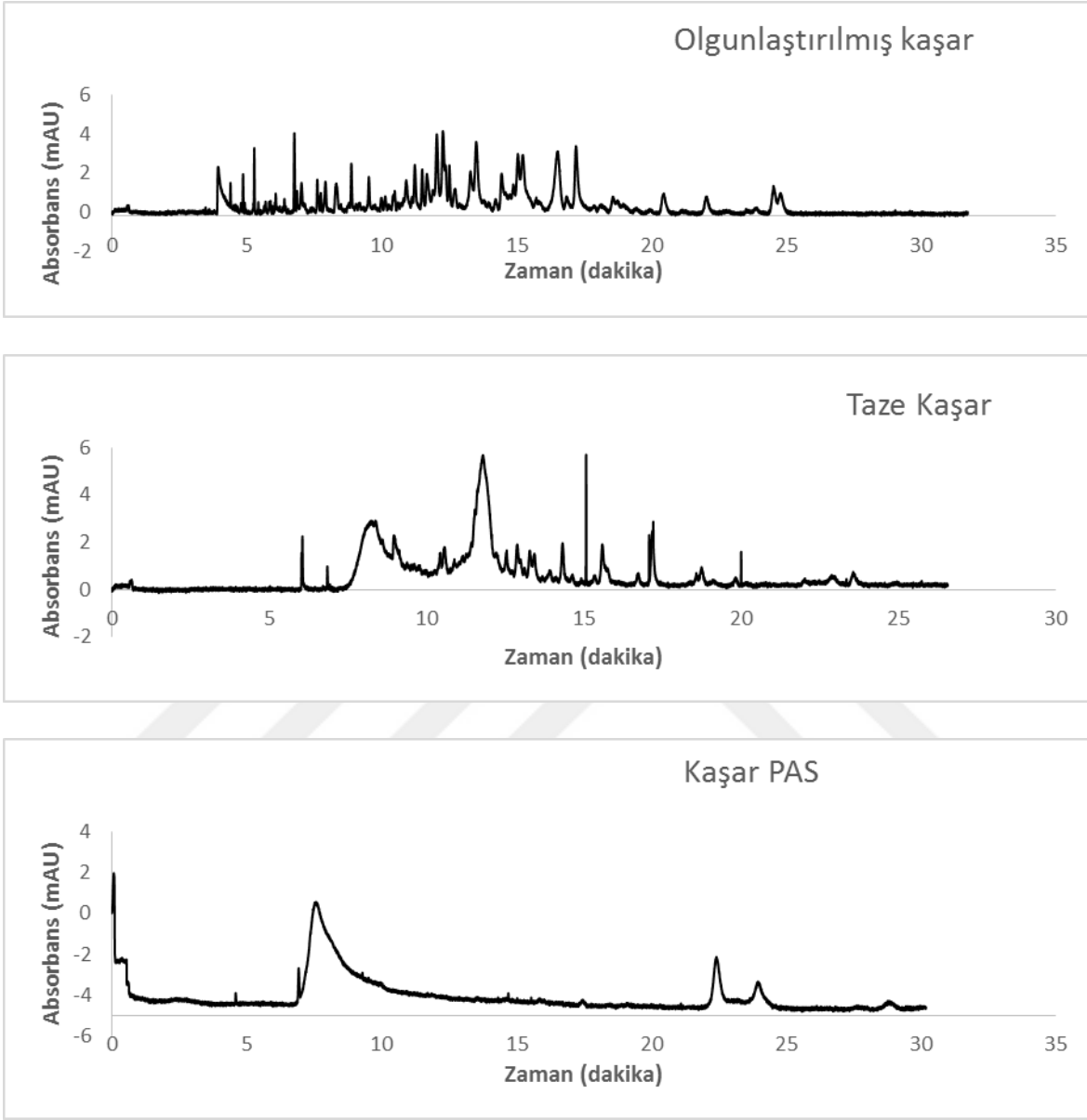
Beyaz peynir üretim hattından çeşitli aşamalarda alınan örnekler SDS-PAGE ile analiz edilmiş ve protein profillerine bakılarak farklılık gösteren aşamalardan alınanlar kapiler elektroforez de analiz edilmiştir. Buna göre beyaz peynir örneklerine ait kapiler elektroforez sonuçları şekil 5.11’de verilmiştir. Beyaz peynir örneklerinde telemenin peynir altı suyundan ayrılmasından dolayı sadece kazein grubu proteinlerin varlığı görüldü. Yaklaşık 6. dakika civarlarında pik oluştuğu tespiti yapıldı. Beyaz peynirin PAS’ında ise çok az bir miktarda serum gurubu varlığı az da olsa 7. dakika pik oluşumuna neden olmuştur. Peynir örneğinde ise üretim 8. dakika ile 13. dakikalar arasında birbirlerinden tam olarak ayrılamamış yoğun bir kazein grubu protein varlığından kaynaklı pik gözlemlendi.



Şekil 5.11. Beyaz peynir örneklerine ait elektroferogramlar

Kaşar peyniri örneklerine ait elektroferogramlar Şekil 5.12’de verilmiştir.



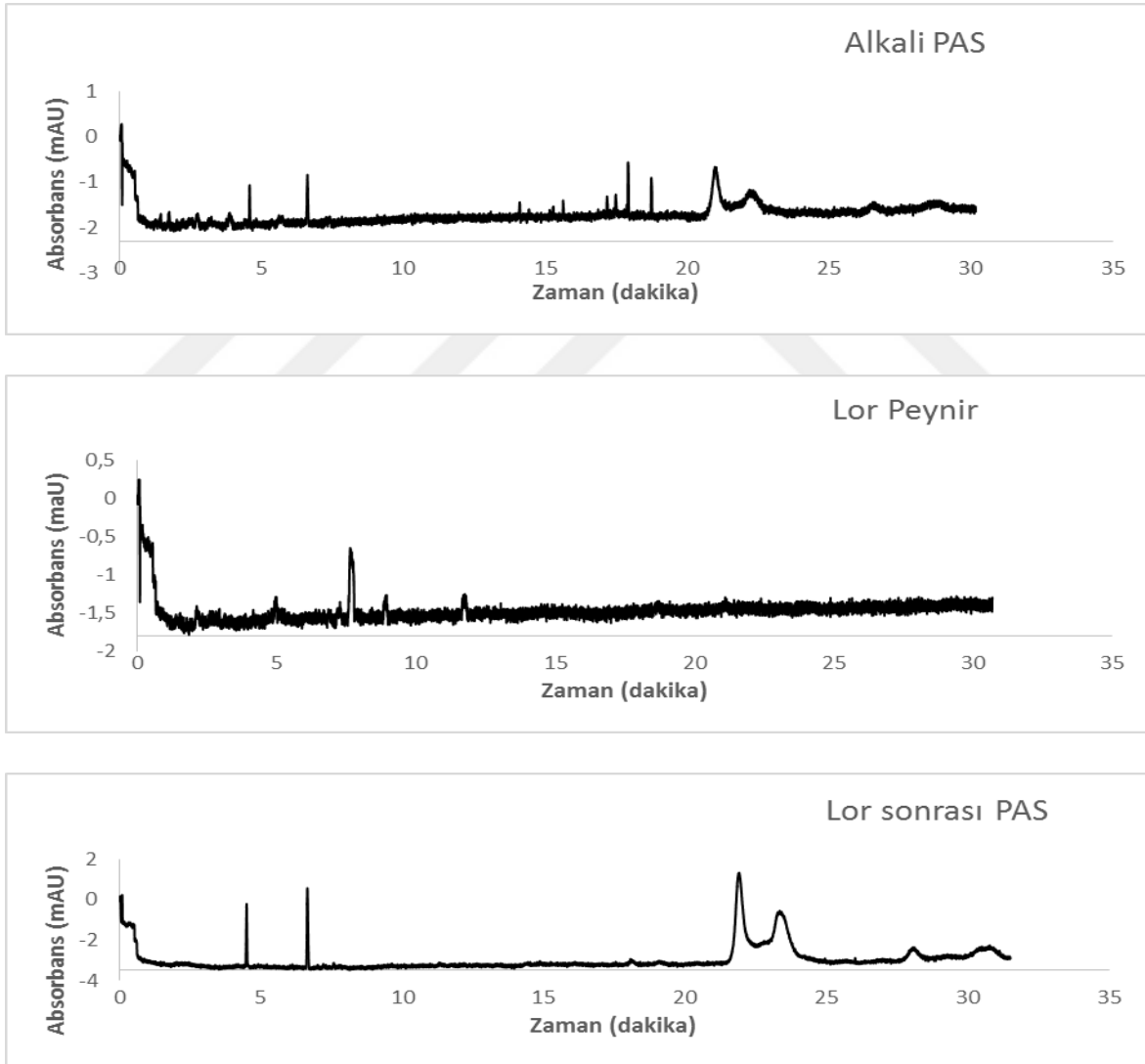


Şekil 5.12. Kaşar peynir örneklerine ait elektroferogramlar

Kaşar peyniri örneklerinde de SDS-PAGE sonuçları dikkate alınarak bazı örnekler seçilmiş ve kapiler elektrofrezde analiz edilmiştir. Elektroferogramlara göre mayalama aşamasındaki örneklerin yalnızca serum örneklerinden oluşan pikler verdiği ve 6. dakikada bu piklerin geldiği tespit edildi. En yoğun pik veren örneğin teleme ve taze kaşar örneklerinde olduğu, bu örneklerde telemeden ayrılamamış serum proteinlerinin varlığı dikkati çekmiştir.

Çok sayıda pik varlığı, proteinlerin uygulanan işlemlerin etkisi altında peptit zincirlerine parçalandıklarını göstermektedir. Taze kaşar örneğine özellikle 7. dakikaların ortalarında kazein grubu proteinler pik vermeye başlamış ve 13. dakikaya kadar bu proteinlere ait geniş bir absorpsiyon piki gözlemlenmiştir. Kazein grubu kullanılan tampon içerisinde sınırlı çözüldüğünden, bu grup proteinlerde tam bir ayrılma gözlenememiştir. Kaşar pas örneğinde ise tam ayrılamamış serum grubu proteinlerin 7 ile 9. dakikalarda pik verdiği tespit edilmiştir.

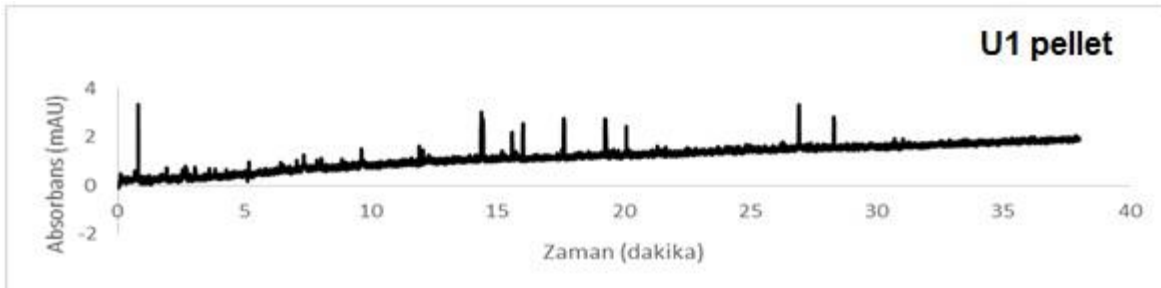
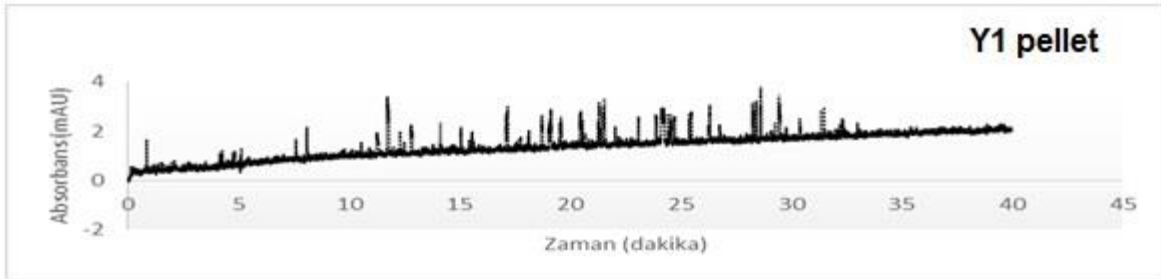
Lor peyniri örneklerine ait elektroferogramlar şekil 5.13'de verilmektedir.

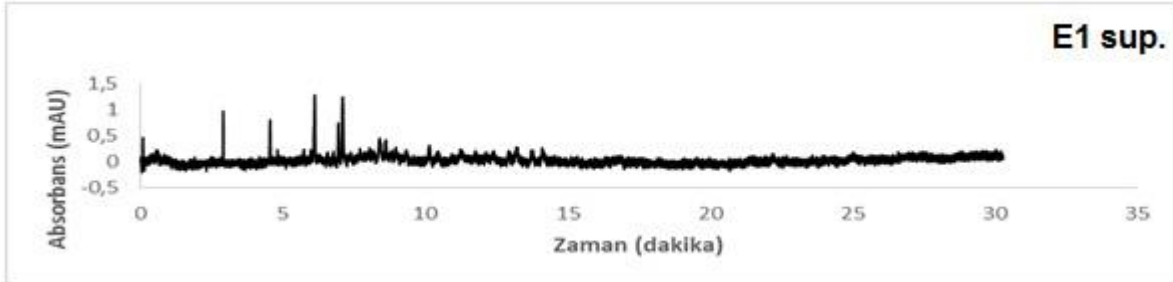
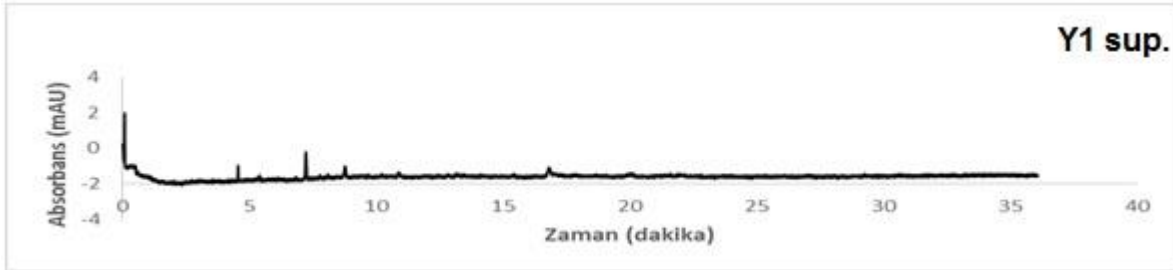
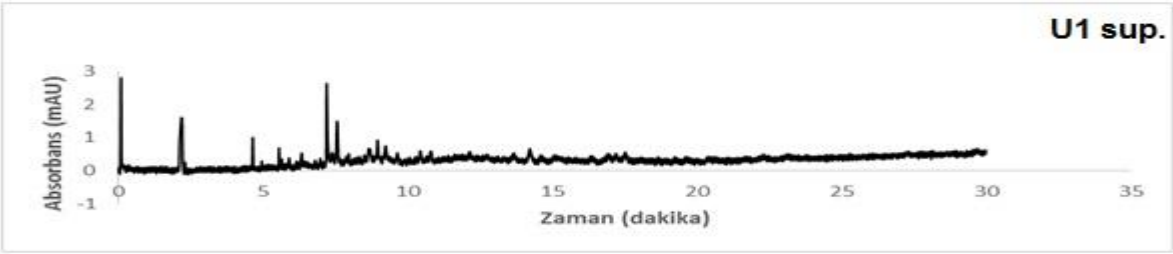
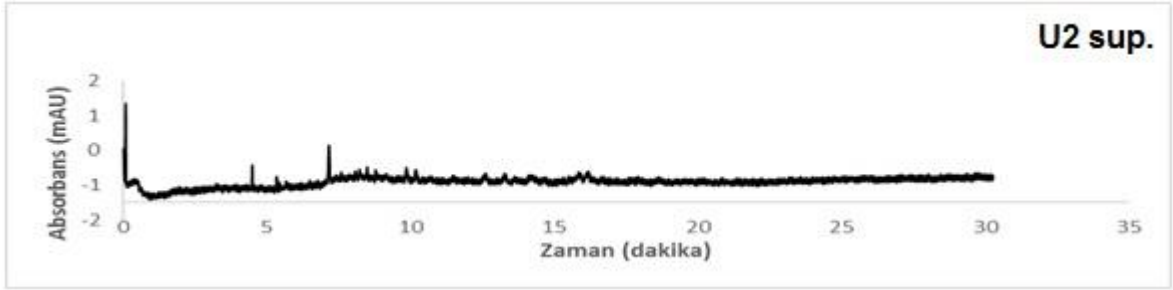
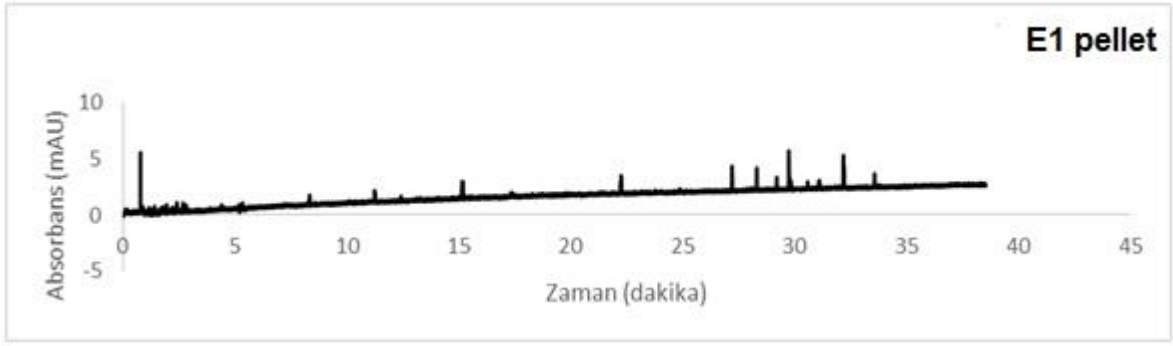


Şekil 5.13. Lor peynir örneklerine ait elektroferogramlar

Lor peynir üretim basamağının ilk aşamasındaki PAS'ın pH'ının alkali konuma getirilmesinden kaynaklı serum grubu proteinlerin tam ayrılamadığı gözlemlendi. Lor peyniri 7. ve 9. Dakikalarda sırasıyla β -Lg ve α -La pikleri vermiştir. Lor peynirinden sonraki son PAS örneğinde ise 4. dakikaların ortalarında ve 6. dakikaların ortalarında iz miktarda serum grubu protein varlığı gözlemlendi.

Fermente süt ürünü yoğurt için ulusal, yerel ve ev yapımı yoğurt örneklerinin serum ve pıhtı kısımları da kapiler elektroforez de incelendi. Bu örneklere ait elektroferogramlar şekil 5.14'de verildi. Yoğurt örneklerinin hemen hepsinde 4 ile 6. dakikalar arasında serum grubu proteinler sırasıyla β -Lg ve α -La pikleri tespit edildi. U2 sup. ve Y1 sup. yoğurt örneklerinde kazein grubu proteinler gözlemlenmesi çok az pikler vermiştir. Bu nedenle tespiti tam olarak yapılamamıştır. U1 sup. ile E1 sup. yoğurt örneklerinde kazein grubu proteinler daha güçlü pikler vermiştir. Her iki örnekte de 7. dakikada α -CN diğer kazeinlere oranla daha fazla ayrılmıştır. β -CN ile κ -CN fraksiyonları ise tam ayrılamamış olarak 8. ve 9. dakikalarda pikler vermiştir. Y1, U1 ve E1 örneklerinin pelletlerine bakıldığında ise genelde parçalanma ürünleri tespit edildi.





Şekil 5.14. Yoğurt örneklerine ait elektroferogramlar

5.4. Alerjen Protein Yapısında Konformasyonel Değişikliklerin Belirlenmesi

PAS proteinlerinin ve kazeinin α -La, β -Lg, BSA, α kazein, β kazein ve κ kazein gibi çeşitli alt birim proteinlerinden oluştuğunu ve bu proteinlerin ortam koşullarına göre farklı davranışlar sergileyebildikleri bilinmektedir. Literatüre belirli infrared bölgelerinde tespit edilen titreşim bantlarına göre protein yapısına ait özellikler çizelge 5. 5’de verilmiştir.

Çizelge 5.5. FTIR titreşim bölgelerine ait referans literatür çizelgesi

örnek adı	dalga sayısı, cm^{-1}	amid modu	yapısal elemanlar	referanslar
α -La	1688-1698	Amid I (1610-1700 cm^{-1})	β - yaprak	Kong ve Yu, 2007
	1667-1687		β - kıvrım	Kong ve Yu, 2007
	1660-1670		3_{10} sarmal	Jackson ve Mantasch, 1995
	1646-1658		α -sarmal/rasgele	Jackson ve Mantasch, 1995; Kong ve Yu, 2007
	1620-1642		β - yaprak	Jackson ve Mantasch, 1995; Kong ve Yu, 2007
	1610-1628		Birleşim bölgesi	Jackson ve Mantasch, 1995
	1545-1551	Amid II (1520-1560 cm^{-1})	α -sarmal	Ambrose and Elliott, 1951; Jackson ve Mantasch, 1995
	1521-1525		β - yaprak	Ambrose ve Elliott, 1951; Jackson ve Mantasch, 1995
	1260-1315	Amid III (1220-1330 cm^{-1})	α -sarmal	Anderle ve Mendelsohn, 1987
	1245-1270		Farklı halka	Anderle ve Mendelsohn, 1987
1220-1250	β - yaprak		Anderle ve Mendelsohn, 1987	
β -Lg	1630	Amid I	β -yaprak	Lee ve ark. 2007
	1643		β - yaprak	Lee ve ark. 2007
	1694		β - yaprak	Lee ve ark. 2007
	1656		α - sarmal	Lee ve ark. 2007

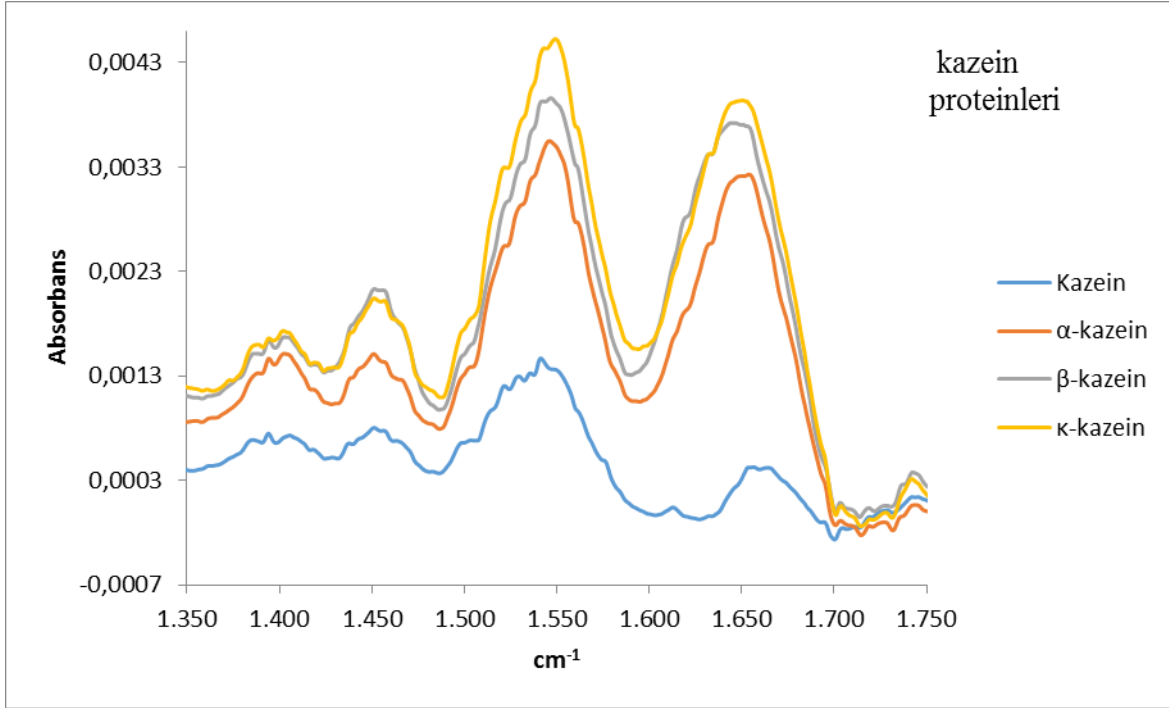
	1663		α - sarmal	Lee ve ark. 2007
	1673		α -sarmal	Lee ve ark. 2007
	1681		α -sarmal	Lee ve ark. 2007
α - casein	1656	Amid I	α -casein	Beauchemin ve ark., 2007; Krimm & Bandekar, 1986
	1544			Beauchemin ve ark., 2007; Krimm & Bandekar, 1986
	1658	Amid I	α -sarmal	Curley, Kumosinski, Unruh, & Farrell, 1998;Malin ve ark., 2001
	1618-1632		β - yaprak	Curley, Kumosinski, Unruh, & Farrell, 1998;Malin ve ark., 2001
	1675		Dönüm noktası	Curley, Kumosinski, Unruh, & Farrell, 1998;Malin ve ark., 2001
	1688		β -antiparalel	Curley, Kumosinski, Unruh, & Farrell, 1998;Malin ve ark., 2001
	1644		Farklı halka	Curley, Kumosinski, Unruh, & Farrell, 1998;Malin ve ark., 2001
β - casein	1652	Amid II	β -casein	Beauchemin et al., 2007; Krimm & Bandekar, 1986
	1540			Beauchemin ve ark., 2007; Krimm & Bandekar, 1986
	1658	Amid I	α -sarmal	Curley, Kumosinski, Unruh, & Farrell, 1998;Malin ve ark., 2001

	1618-1632		β - yaprak	Curley, Kumosinski, Unruh, & Farrell, 1998;Malin ve ark., 2001
	1674		Dönüm noktası	Curley, Kumosinski, Unruh, & Farrell, 1998;Malin ve ark., 2001
	1686		β -antiparalel	Curley, Kumosinski, Unruh, & Farrell, 1998;Malin ve ark., 2001
	1644		Farklı halka	Curley, Kumosinski, Unruh, & Farrell, 1998;Malin ve ark., 2001
Serum albumin	1658	Amid I (1600-1700)	α -sarmal	Baello, Pancoska, & Keiderling, 2000; Bramanti & Benedetti, 1996; Kato, Matsui, & Tanaka, 1987; Peters, 1985; Reed, Feldhoff, Clute, & Peters, 1975); Gorinstein ve ark. (2002)
	1638-1688		β - yaprak	
	1675		Dönüm noktası	
	1644		Farklı yapı	

Literatür referanslarını içeren yukarıdaki çizelgeye göre PAS ve kazein proteinlerinin Amid I, II ve III bölgelerinde farklı dalga sayılarında güçlü titreşim bantları mevcuttur. Sütün peynir ve yoğurda işlenmesi sırasında ısı işlem, enzim, fermentasyon gibi uygulamalara maruziyeti sonucu protein yapısında denaturasyon, degradasyon ve bir çok konformasyonel değişiklik gerçekleşmiş olması beklenmektedir. Aynı değişiklikler protein yapısındaki alerjen bölgeleri de kapsayacağından, üretimden çeşitli aşamalardan alınan örneklerin kızılötesi spektroskopisi ile incelemesi sonucu elde edilen bulgular bu bölümde irdelenmiştir.

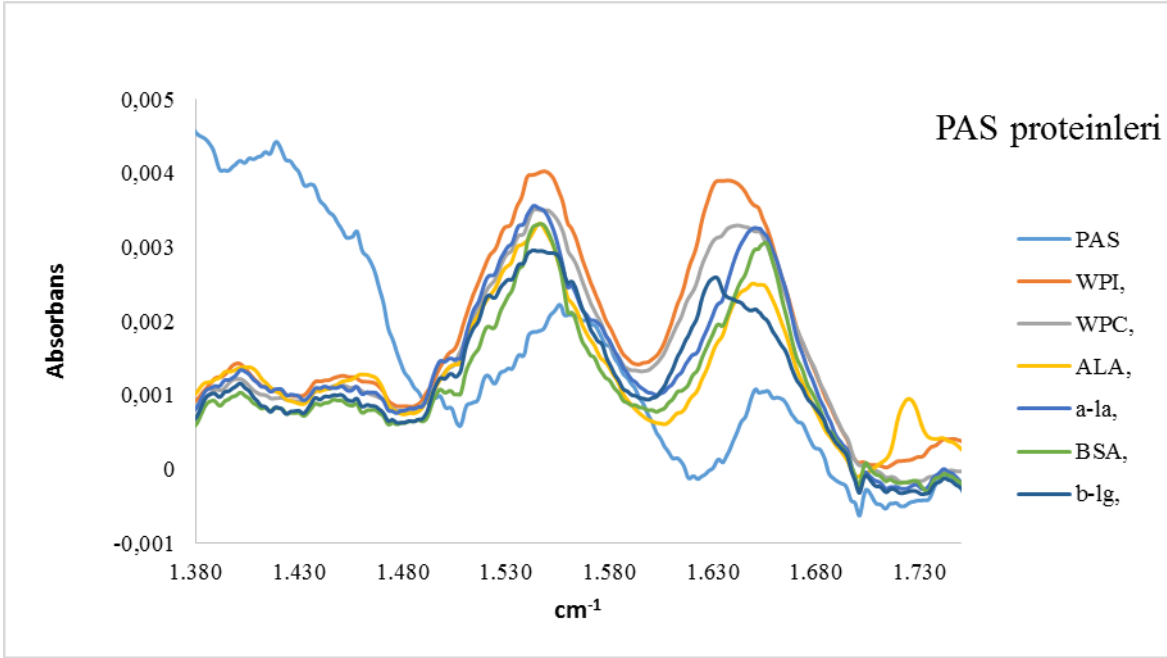
Kazein grubu standart proteinlerin FT-IR sonuçlarına Şekil 5.15' a bakıldığında amid I (1600-1700 cm^{-1}) bölgesine bakıldığında κ -kazeinin 1656 cm^{-1} , β -kazeinin 1652 cm^{-1} , α -kazeinin 1649 cm^{-1} ve serbest kazeinin 1669 cm^{-1} de α -helix dediğimiz sarmal yapıların pik

verdiğini net bir şekilde görmekteyiz. Amid II bölgesindeki α -kazeinin 1543 cm^{-1} , β -kazeinin 1551 cm^{-1} , κ -kazeinin 1552 cm^{-1} ve serbest kazeinin ise 1544 cm^{-1} de sarmal yapıda güçlü pikler verdiği gözlemlendi. β - sheet katmanlarına bakıldığında κ -kazeinin $1541\text{-}1553\text{ cm}^{-1}$, $1641\text{-}1657\text{ cm}^{-1}$, β -kazeinin $1551\text{-}1559\text{ cm}^{-1}$, $1638\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$, α -kazeinin 1551 cm^{-1} , $1643\text{-}1663\text{ cm}^{-1}$, serbest kazeinin $1658\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$ de pik verdiği gözlemlendi. Serbest kazeinin diğerlerine oranla β - sheet katmanındaki piklerin zayıf olduğunu söyleyebiliriz.



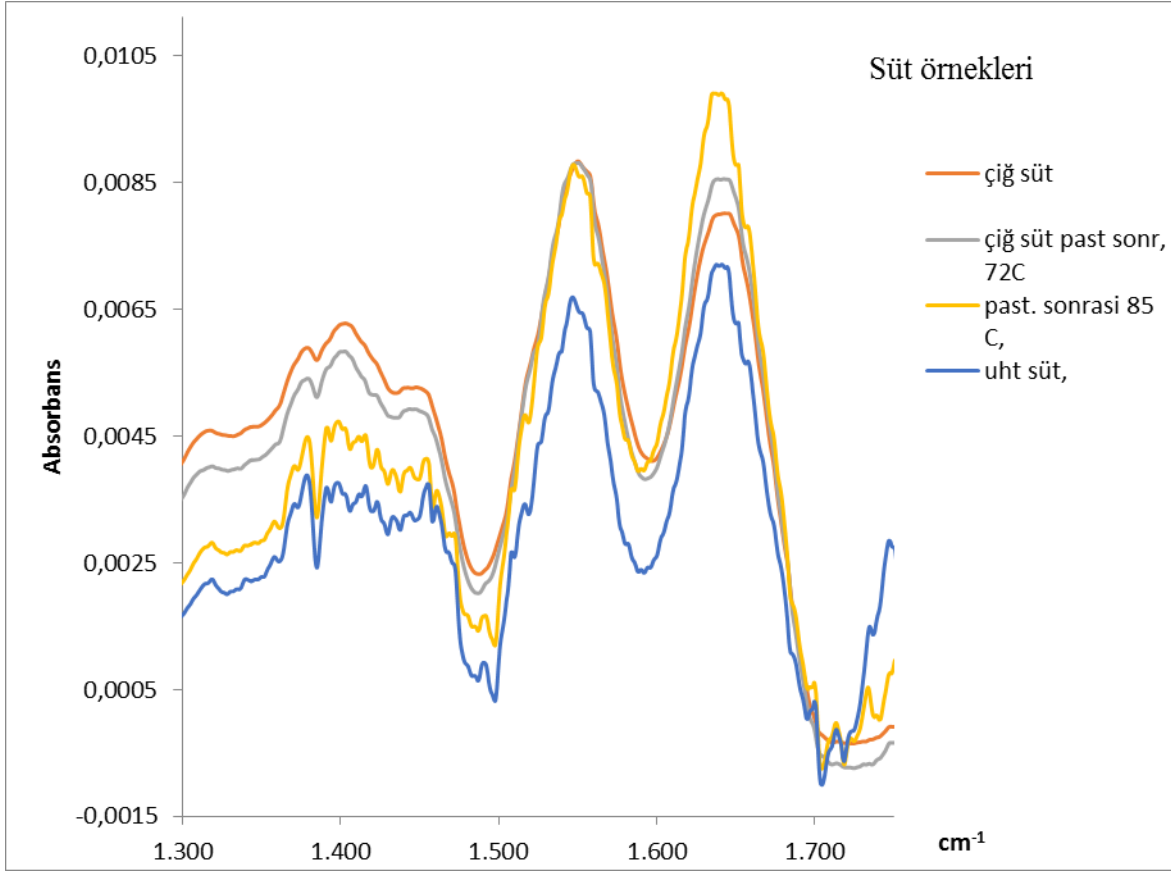
Şekil 5.15. Kazein proteinlerine ait IR spektrumları

PAS proteinlerine bakıldığında amid I ve amid II de WPI 1635 cm^{-1} ve 1544 cm^{-1} , WPC 1636 cm^{-1} ve 1553 cm^{-1} , α -La 1654 cm^{-1} ve 1544 cm^{-1} , BSA 1653 cm^{-1} ve 1548 cm^{-1} , A-LA 1652 cm^{-1} ve 1546 cm^{-1} , β -Lg 1632 cm^{-1} ve 1543 cm^{-1} , serbest pas 1652 cm^{-1} ve 1554 cm^{-1} de güçlü pikler vermiştir (Şekil 5.18). β - sheet katmanlarında WPI $1539\text{-}1553\text{ cm}^{-1}$, $1635\text{-}1653\text{ cm}^{-1}$, WPC $1547\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$, $1637\text{-}1654\text{ cm}^{-1}$, α -La 1554 cm^{-1} , $1644\text{-}1653\text{ cm}^{-1}$, BSA $1543\text{-}1549\text{ cm}^{-1}$, 1656 cm^{-1} , α -La 1548 cm^{-1} , $1651\text{-}1656\text{ cm}^{-1}$, β -Lg $1542\text{-}1555\text{ cm}^{-1}$, 1633 cm^{-1} , serbest pas 1555 cm^{-1} , 16552 cm^{-1} aralığındaki katmanlarda güçlü pikler verdiği tespit edildi. Serbest PAS'ın verdiği piklerin diğerlerine oranla daha zayıf pikler olduğu tespit edildi.



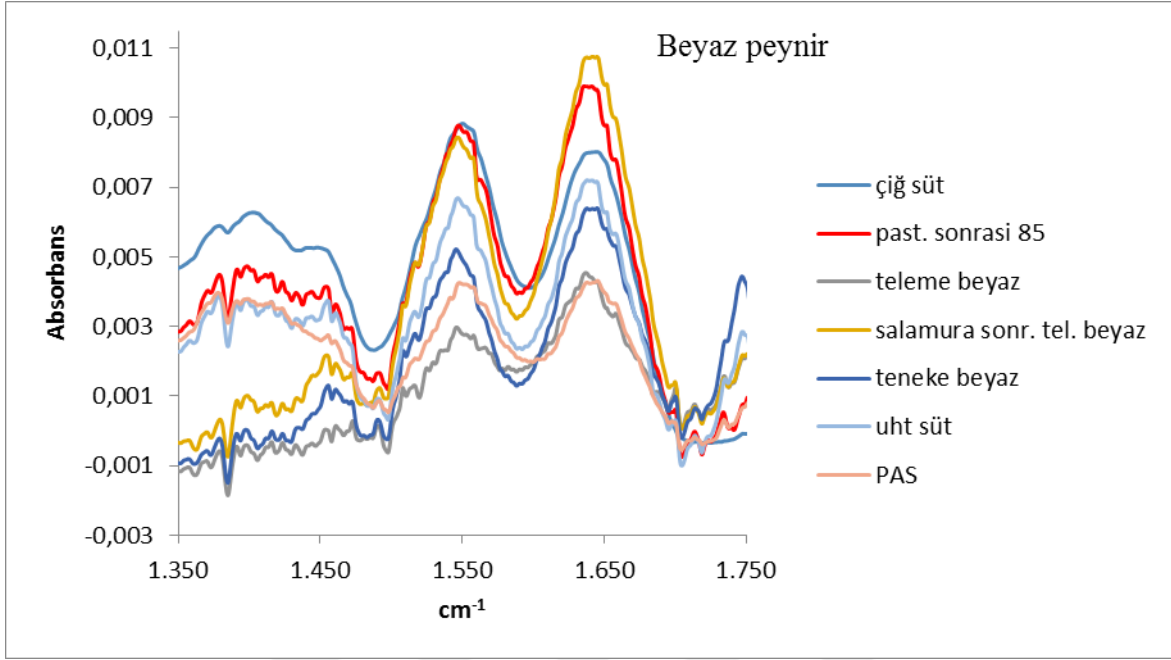
Şekil 5.16. PAS proteinlerine ait IR spektrumları

Süt örneklerindeki FT-IR sonuçları Şekil 5.17’de gösterilmiştir. Amid I ve amid II bölgesinde çiğ süt örneğinin 1549 cm^{-1} ve 1644 cm^{-1} , pastörize süt ($72\text{ }^{\circ}\text{C}$) 1645 cm^{-1} ve 1548 cm^{-1} , pastörize süt ($85\text{ }^{\circ}\text{C}$) 1643 cm^{-1} ve 1544 cm^{-1} , UHT süt 1643 cm^{-1} ve 1548 cm^{-1} α - helix noktaları tespit edildi. β - sheet katmanlarındaki çiğ süt örneği, pastörize süt ($72\text{ }^{\circ}\text{C}$) ve pastörize süt ($85\text{ }^{\circ}\text{C}$) numunelerinin 1553 cm^{-1} de güçlü pik verdiği UHT sütün ise 1550 cm^{-1} de diğerlerine oranla daha düşük pik verdiği tespit edildi. Özellikle ısıl işlemin artmasıyla 1520 , 1550 - 1560 ve 1650 - 1660 bölgelerindeki şiddetli kıvrımlı bölgeler α -La, α -CN, β -CN proteinlerinin alerjenik epitoplardaki tahribatı gösterdiği tahmin edilmektedir. Bu bölgelerde yoğunlukla sekonder yapılarındaki α sarmal ve β yaprakların varlığı dikkat çekmektedir. Piklere bakıldığında 90 dereceye kadar sıcaklığın alerjeniteyi artırdığı, sonrasında azalttığı, bizde piklere bakınca bunu görüyoruz [16]. Çiğ süt ile pastörize sütlerin Şekil 5.17’deki IR spektrumlarına bakıldığında ısıl işlemin artmasıyla piklerdeki absorpsiyonun yükseldiğini fakat UHT sütün ise diğer sıcaklık normlarından daha düşük absorpsiyon piki verdiği tespit edildi



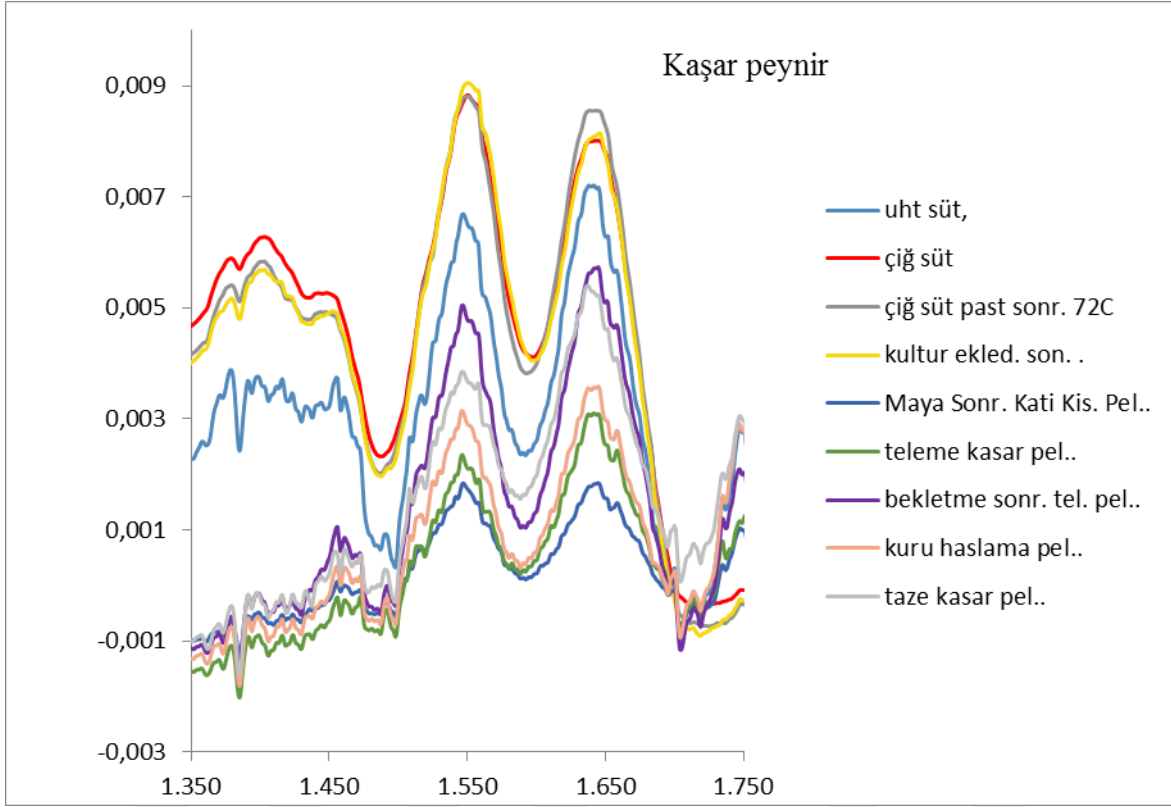
Şekil 5.17. Süt örneklerine ait IR spektrumları

Beyaz peynir örneklerinde amid I ve amid II bandlarına bakıldığında teleme örneği 1657 cm⁻¹ ve 1555 cm⁻¹, salamura sonrası beyaz peynir 1650 cm⁻¹ ve 1552 cm⁻¹, teneke beyaz peynir 1669 cm⁻¹ ve 1555 cm⁻¹, pas 1656 cm⁻¹ ve 1559 cm⁻¹ α sarmal noktalarında pik verdiği tespit edildi. PAS ve teneke sonrası beyaz örneklerdeki piklerin zayıf olduğu tespit edildi. β -yaprak katmanlarında teleme örneği 1543-1555 cm⁻¹ 1643-1657 cm⁻¹, salamura sonrası beyaz peynir 1541-1553 cm⁻¹, 1638-1653 cm⁻¹ de güçlü pikler verdiği saptandı. Kimozin ile mayalandıktan sonraki basamaklarda absorpsiyon piklerinde azalma meydana geldiği tespit edildi. Kullanılan enzim seçimine bağlı olarak alerjenik proteinlerin yapısındaki değişikliği görmekteyiz [34].



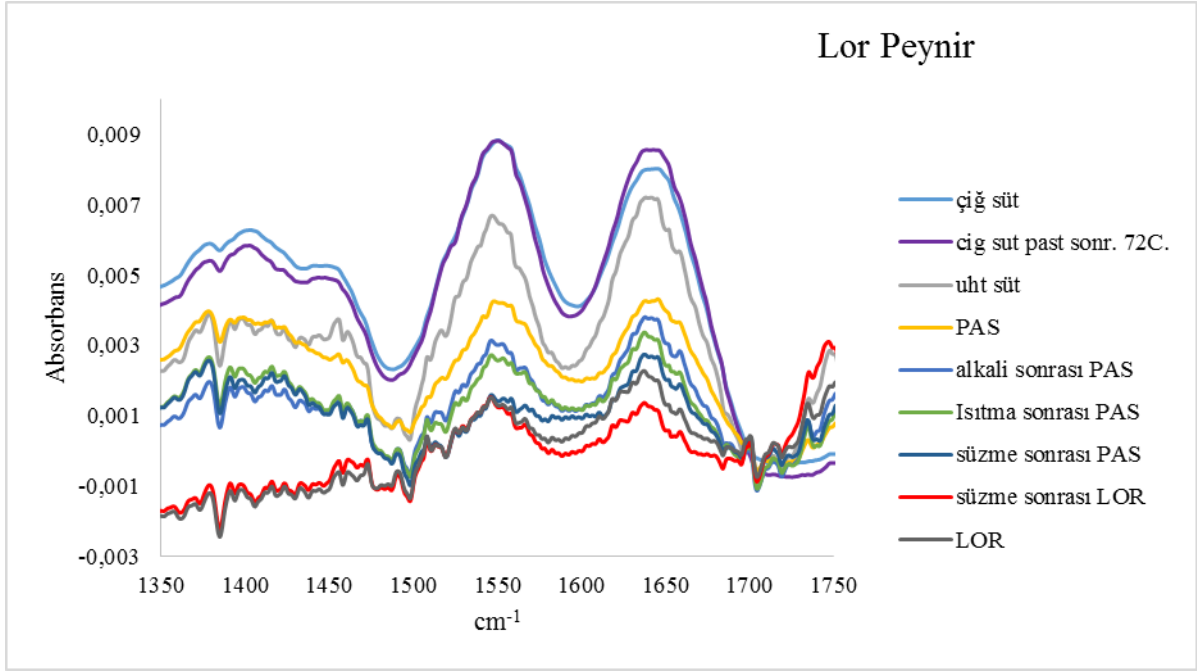
Şekil 5.18. Beyaz peynir örneklerine ait FT-IR sonuçları

Kaşar peynir örneklerinde amid I ve amid II bandlarına bakıldığında süt örneklerin ayrı pik verdiği, teleme ve kaşar örneklerinin ise ayrı bir pik verdiği gözlemlendi (Şekil 5.19). Teleme örneklerindeki piklerin yaklaşık olarak amid I 1645 cm^{-1} , amid II bölgesinde 1549 cm^{-1} olarak tespit edildi. Teleme örneklerinde yoğun titreşimlerin olduğu gözlemlendi. Bu bölgelerden 1540 cm^{-1} bandında β -CN, α -CN ve α -La proteinlerine ait kuvvetli α sarmal ve β yaprak bölgeler tespit edildi.



Şekil 5.19. Kaşar peynir örneklerine ait IR spektrumları

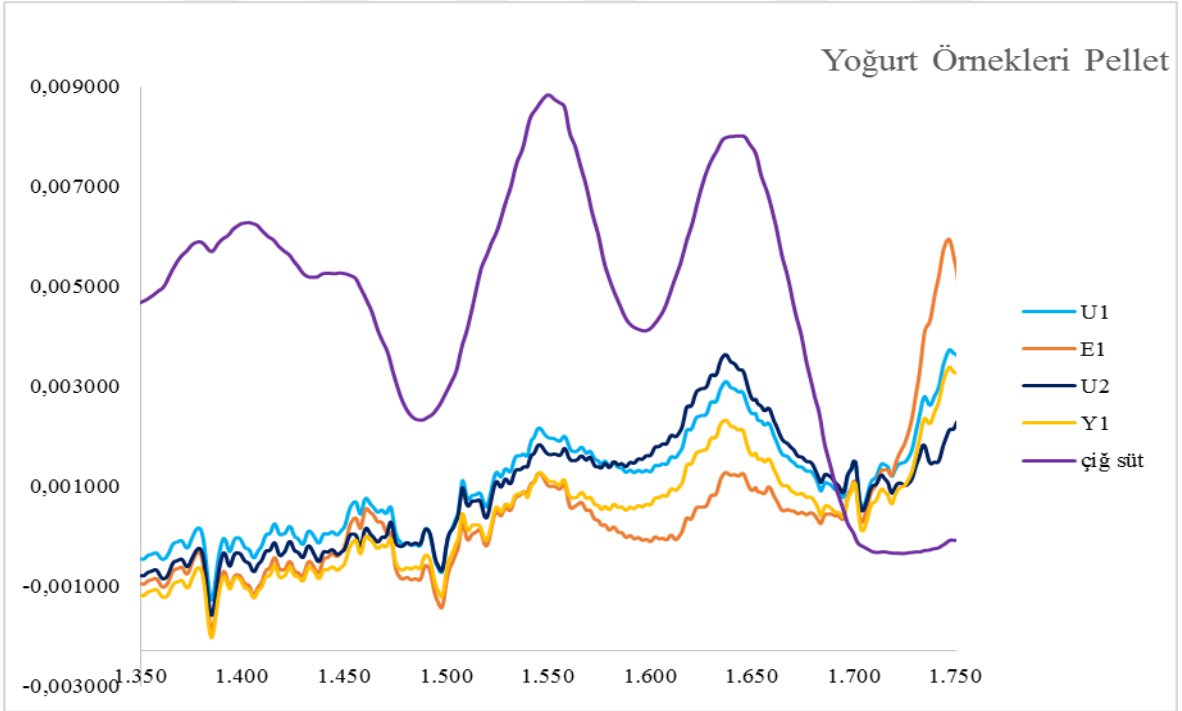
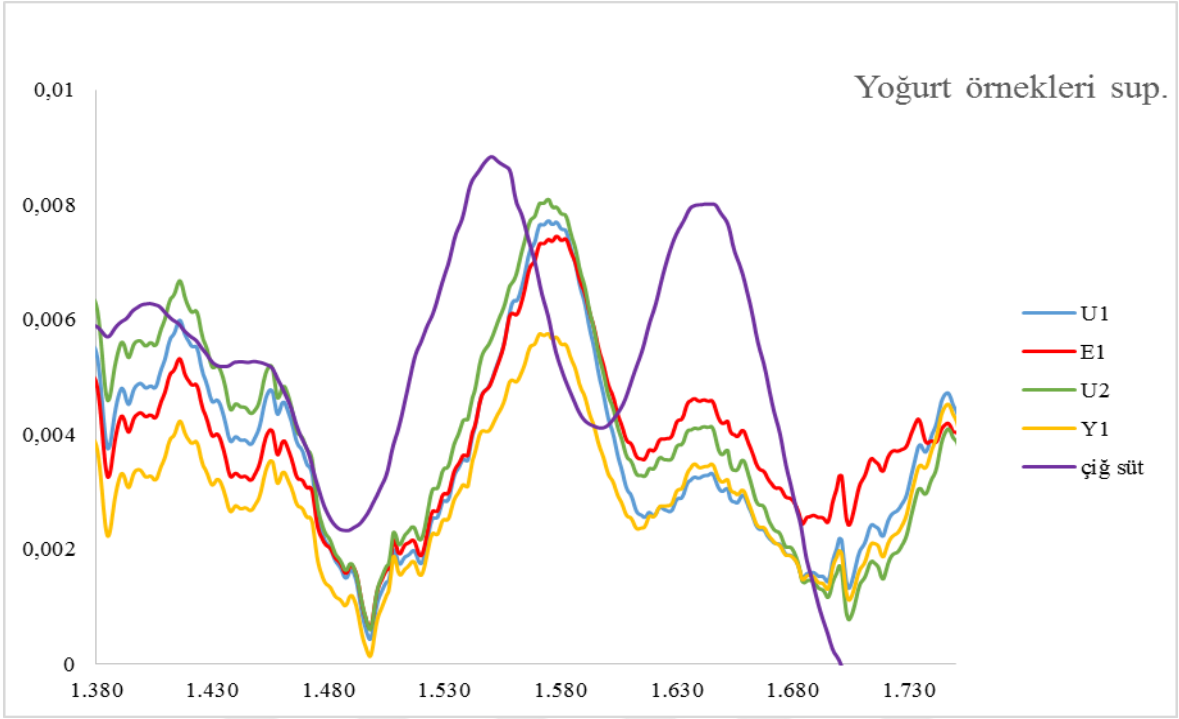
Lor örneklerindeki amid I ve amid II bölgesine bakıldığında peynir altı suyundan lora kadar olan süreçteki piklerin yaklaşık aynı düzlemde sırasıyla 1643 cm^{-1} ve 1555 cm^{-1} olarak tespit edildi (Şekil 5.20). PAS' tan itibaren gerçekleşen işlem basamaklarının çeşitliliği örneklerde belirli titreşimlere neden olduğu gözlemlendi. Titreşimde özellikle $1650\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$ bandında alerjen proteinlerin sekonder yapılarına ait β -sarmal, β -yaprak ve α -sarmal bölgelerin varlığı tespit edildi. Amid II bölgesinde ise en çok belli olan 1550 cm^{-1} bandında α -La 'ya ait α - sarmal bölgelerdir.



Şekil 5.20. Lor peynirine ait IR spektrumları

Yoğurt örneklerinin katı kısımlarında amid I bölgesinde hafif dereceli pikler verdiği görülmekte. Her bir örneğin 1641 cm⁻¹ de pik verdiği tespit edildi (Şekil 5. 21). Amid II bölgesindeki piklere bakıldığında 1547 cm⁻¹ de zayıf pikler tespit edildi. Sıvı kısımdan alınan örneklere baktığımızda amid II bölgesinde yoğunlaşan güçlü pikler tespit edildi. Bu bölgede 1575 cm⁻¹ de α –helix denilen sarmal yapı tespit edildi. Amid I bölgesindeki zayıf piklere bakıldığında 1648 cm⁻¹ de küçük çaplı β yaprak piklerinden bahsedilebilir.

Bütün bulgular incelendiğinde alerjen proteinlerin denaturasyonunu noktasında alınan verilerin olumlu sonuçlandığını söyleyebiliriz. Gomaa (2015), alerjen proteinlerin ikincil yapısına bakıldığında antijenikliğin belirli bir miktar azaldığını öne sürmüştür [76]. Bulgular birbirine benzer niteliktedir.



Şekil 5. 21 Yoğurt örneklerine ait IR Spektrumları

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

İşleme esnasında sütte bulunan alerjen proteinlerin yapısındaki değişikliklerin incelendiği bu araştırmada beyaz peynir, kaşar peynir, lor peynir ve yoğurt örneklerindeki çeşitli işlem basamaklarından alınan örneklerde alerjen proteinler incelenmiştir.

Sırasıyla çiğ süttten başlayarak pastörize ve UHT süt örneklerinde alerjen protein kıyaslamasına bakıldığında çiğ süt örneğindeki alerjenitenin pastörize süte oranla daha az olduğu tespitinde bulunabiliriz. Süt örneklerine bakıldığında α -La ve β -Lg 'nin 85 °C ye kadar olan ısı işlemlerde alerjenitesinde artma olduğu gözlemlendi. Bu değişimin alerjenik epitoplara denatürasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir [16]. Özellikle lor peyniri üretiminde kullanılan yöntemlerde 96 °C' ye varan sıcaklık değişimlerinde ürünün yapısında meydana gelen değişiklikler FT-IR sonuçlarında daha kararsız ve titreşimli bir yapının oluşmasına neden olmuş ve alerjenik epitoplara antijenik bölgelerinde denatürasyonlar olmuştur.

Fermantasyon işlemi esnasında laktik asit bakterilerinin üründe meydana getirdiği yapısal değişiklik alerjen bölgelerdeki epitoplarda hatırı sayılır değişikliklere neden olmuştur. Bu bölgelerdeki alerjenitenin FT-IR sonuçlarında daha kararsız ve salınımlı pikler verdiği gözlemlendi.

FT-IR sonuçlarına bakıldığında süt örneklerindeki alerjenite oranları çiğ sütteki alerjenite oranının 72 °C ve 85 °C pastörize süte oranla daha düşük düzeyde kaldığı, verilen piklerin amid I bölgesinde kısmi artıştan dolayı ısı işlemin alerjeniteyi arttırdığı kanaatine varıldı.

Beyaz peynir örneklerindeki alerjenitenin fermantasyon ile beraber kimozen enzimi ile interaksyonu çiğ süte oranla alerjenitede gözle görünür bir azalmaya neden olmuştur.

Kaşar peynir üretim basamaklarındaki fermantasyonun beyaz peynir örneğinde olduğu gibi kimozen enzimi ile birlikte kullanımı çiğ süte kıyasla proteinlerdeki alerjenite oranlarında

belirgin azalmaya neden olduğu gözlemlendi.

Lor peyniri örneklerine bakıldığında PAS'ın fermentasyon nedeni ile asitlik düzeyinin yüksek olması alerjen olan serum proteinlerindeki alerjenitenin azalmasına neden olmuştur. PAS'a uygulanan kaynatma işlemi ile yüksek sıcaklıklara ulaşan serum proteinleri alerjen bölgelerinde gözle görünür bir azalma tespit edildi.

Yoğurt örneklerinde fermentasyonun alerjenik olan kazein ve serum proteinleri üzerindeki yapısal değişikliğe bakıldığında hem kazein proteinlerinde hem de serum proteinlerinde alerjenik olan bölgelerdeki epitoplara tahrip olduğu düşünülmektedir.

Her bir peynir örneğinde ısı işlemi, fermentasyon ve enzim uygulamalarına bakıldığında bu işlemlerin alerjenik olan proteinler üzerine etkisinin olumlu sonuçlara neden olduğunu söyleyebiliriz.

Üretim ve uygulanabilirlik açısından bakıldığında alerjeniteyi azaltmak için işletmelerin bir takım iyileştirmeler yaparak bu soruna çözümler üretilebilir. Fermentasyon aşamalarında kullanılan kültürlerin özellikle laktik asit bakterileri seçiminde epitoplara üzerinde etkili olan suşlarıyla birlikte çalışan türler kullanılıp denaturasyona ya da modifikasyona neden olabilir. Literatürde modifikasyona neden olduğu ispatlanan *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum IFO3956*, *Lactobacillus helveticus A75* gibi türlerin diğer peynir üretiminde kullanılan türler ile beraber kullanımı alerjeniteyi azaltırken aroma açısından da kayıpları engelleyeceği düşünülmektedir.

Alerjeniteyi azaltmak için, proteinler enzim hidroliziyle küçük peptit molekülleri ve amino asitler haline dönüştürülebilir. Peynirin mayalama aşamasında mayalarda epitoplara antijenlerle birleşmesini engellemek amacıyla kimozen ile beraber papain, alkalaz, pepsin gibi antijenik bölgelere duyarlı enzimler ile beraber kullanılması ısı işlemi ile beraber enzimatik reaksiyonun epitoplara üzerinde denaturasyona neden olup alerjenitede azalmaya neden olacağı düşünülmektedir [39].

Yapılan bu çalışma ile işlenmiş süt ürünlerindeki (peynir ve yoğurt) alerjen içerikleri ile üretim basamaklarında meydana gelen süreçlerdeki alerjenik değişimler incelendi. Literatürde bu konu ile ilgili boşluğun ışık tutulduğu düşünülmektedir. İlerleyen zamanlarda ise immünolojik çalışmalarla araştırmaların zenginleştirilmesi hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ajala, AR., Cruz AG., Faria AF., Walter HM., Granato, D., Sant'Ana S. (2010) 'Food allergens: Knowledge and practices of food handlers in restaurants', *Food Control*, 21, 1318–1321
2. Çokuğraş Haluk, Akçakaya Necla. *Besin Allerjileri, "Temel Allerji"*. V. Ulusal Allerji Kongresi. Ankara, 203-213, 1991.
3. Eggesbo 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.
4. Fritsche R. Role for technology in dairy allergy. *Aust J Dairy Technol.* 2003;58:89–91.
5. Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H, Bahna SL, von Berg A, Beyer K, Bozzola M, Bradsher J, Compalati E, Ebisawa M, Guzman MA, Li H, Heine RG, Keith P, Lack G, Landi M, Martelli A, Rancé F, Sampson H, Stein A, Terracciano L, Vieths S. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) guidelines. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21:1–125.
6. Isolauri E, Turjanmaa K. Combined skin prick and patch testing enhances identification of food allergy in infants with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97:9-15.
7. Sharma S, Kumar P, Betzel C, Singh TP (2001). Structure and function of proteins involved in milk allergies. *J Chromatogr B* 756:183–187.
8. Fox PF, McSweeney PLH (1998). *Dairy chemistry and biochemistry*. Blackie Academic & Professional, London
9. El-Agamy EI. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Res.* 2007;68:64–72.
10. Guo BH. *Dairy chemistry*. Beijing: China Light Industry Press; 2001.
11. Kleber N, Hinrichs J. Antigenic response of β -lactoglobulin in thermally treated bovine skim milk and sweet whey. *Milchwissenschaft.* 2007;62:121–124.
12. Fiocchi A, Restani P, Riva E, Mirri GP, Santini I, Bernardo L, Galli CL. Heat treatment modifies the allergenicity of beef and bovine serum albumin. *Food Technol.* 1998;53:798–802.
13. Hanson LA, Mansson I. Immune electrophoretic studies of bovine milk and milk products. *Acta Paediatrica.* 1961;50:484–490.
14. Baldo BA. Milk allergies. *Aust J Dairy Technol.* 1984;39:120–128.
15. Ehn BM, Ekstrand B, Bengtsson U, Ahlstedt S. Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen beta-lactoglobulin. *J Agric Food Chem.* 2004;52:1398–1403.
16. Bu GH, Luo YK, Zheng Z, Zheng H (2009b). Effect of heat treatment on the antigenicity of bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein isolate. *Food Agric Immunol* 20:195–206.
17. Kleber N, Maier S, Hinrichs J. Antigenic response of bovine β -lactoglobulin influenced by ultra-high pressure treatment and temperature. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2007;8:39–45.
18. Davis PJ, Williams SC. Protein modification by thermal processing. *Allergy.* 1998;53:102–105.

19. Rytönen J, Karttunen TJ, Karttunen R, Valkonen KH, Jenmalm MC, Alatossava T, Björkstén B, Kokkonen J. Effect of heat denaturation on beta-lactoglobulin-induced gastrointestinal sensitization in rats: denatured β -LG induces a more intensive local immunologic response than native β -LG. *Pediatr Allergy Immunol*. 2002;13:269–277.
20. Thomas K, Herouet-Guicheney C, Ladics G, Bannon G, Cockburn A, Crevel R, Fitzpatrick J, Mills C, Privalle L, Vieths S. Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: international workshop report. *Food Chem Toxicol*. 2007;45:1116–1122.
21. Babiker E, Hiroyuki A, Matsudomi N, Iwata H, Ogawa T, Bando N, Kato A. Effect of polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on the allergenicity and functional properties of soy protein. *J Agric Food Chem*. 1998;46:866–871
22. Nakamura S, Suzuki Y, Ishikawa E, Yakushi T, Jing H, Miyamoto T, Hashizume K. Reduction of in vitro allergenicity of buckwheat Fag e 1 through the Maillard-type glycosylation with polysaccharides. *Food Chem*. 2008;109:538–545.
23. Van de Lagemaat J, Silvan JM, Moreno FJ, Olano A, del Castillo MD. In vitro glycation and antigenicity of soy proteins. *Food Res Int*. 2007;40:153–160.
24. Hattori M, Nagasawa K, Ametani A, Kaminogawa S, Takahashi K. Functional changes in β -lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran. *J Agric Food Chem*. 1994;42:2120–2125.
25. Nagasawa K, Takahashi K, Hattori M. Improved emulsifying properties of β -lactoglobulin by conjugating with carboxymethyl dextran. *Food Hydrocoll*. 1996;10:63–67.
26. Hattori M, Nagasawa K, Ohgata K, Sone N, Fukuda A, Matsuda H, Takahashi K. Reduced immunogenicity of β -lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran. *Bioconjugate Chem*. 2000;11:84–93.
27. Bu GH, Lu J, Zheng Z, Luo YK (2009). Influence of Maillard reaction conditions on the antigenicity of bovine α -lactalbumin using response surface methodology. *J Sci Food Agric* 89:2428–2434.
28. Bu GH, Luo YK, Lu J, Zhang Y (2010). Reduced antigenicity of β -lactoglobulin by conjugation with glucose through controlled Maillard reaction conditions. *Food Agric Immunol* 21:143–156.
29. Lametti S, Transidico P, Bonomi F, Vecchio G, Pittia P, Rovere P, Dall’Aglia G. Molecular modifications of β -lactoglobulin upon exposure to high pressure. *J Agric Food Chem*. 1997;45:23–29.
30. Chicón R, Belloque J, Alonso E, López-Fandiño R. Immunoreactivity and digestibility of high-pressure-treated whey proteins. *Int Dairy J*. 2008;18:367–376.
31. Chicon R, Belloque J, Recio I, López-Fandiño R (2006a). Influence of high hydrostatic pressure on the proteolysis pattern of beta-lactoglobulin A treated with trypsin. *J Dairy Res* 73:121–128.
32. Chicon R, López-Fandiño R, Quirós A, Belloque J (2006b). Changes of chymotrypsin hydrolysis of β -lactoglobulin.
33. Bonomi F, Flocchi A, Frøkiaer H, Gaiaschi A, Lametti S, Poiesi C, Rasmussen P, Restani P, Rovere P. Reduction of immunoreactivity of bovine beta-lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. *J Dairy Res*. 2003;70:51–59.

34. Peñas E, Préstamo G, Baeza ML, Martínez-Molero MI, Gomez R. Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. *Int Dairy J.* 2006a;16:831–839.
35. Peñas E, Restani P, Ballabio C, Préstamo G, Fiocchi A, Gomez R. Evaluation of the residual antigenicity of dairy whey hydrolysates obtained by combination of enzymatic hydrolysis and high-pressure treatment. *J Food Prot.* 2006b;69:1707–1712.
36. Pahud JJ, Monti JC, Jost R. Allergenicity of whey protein: its modification by tryptic in vitro hydrolysis of the protein. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1985;4:408–413.
37. Nakamura T, Sado H, Syukunobe Y, Hirota T. Antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by combination of two proteases. *Milchwissenschaft.* 1993;48:667–670.
38. Wróblewska B, Karamać M, Amarowicz R, Szymkiewicz A, Troszyńska A, Kubicka E. Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis. *Int J Food Sci Technol.* 2004;39:839–850.
39. Zheng H, Shen XQ, Bu GH, Luo YK. Effects of pH, temperature and enzyme-to-substrate ratio on the antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by alcalase. *Int Dairy J.* 2008;18:1028–1033.
40. Haddad ZH, Kalra V, Verma S. IgE antibodies to peptic and peptic-tryptic digest of β -lactoglobulin: significance in food hypersensitivity. *Ann Allergy.* 1979;42:368–371.
41. Selo I, Clement G, Bernard H, Chatel JM, Creminon C, Peltre G, Wal JM. Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clin Exp Allergy.* 1999;29:1055–1063.
42. Chan YH, Shek LPC, Aw M, Quak SH, Lee BW. Use of hypoallergenic formula in the prevention of atopic disease among Asian children. *J Paediatr Child Health.* 2002;38:84–88.
43. Van Beresteijn ECH, Peeters RA, Kaper J, Meijer RJGM, Robben AJPM, Schmidt DG. Molecular mass distribution, immunological properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. *J Food Prot.* 1994;57:619–625.
44. Van Hoeyveld EM, Escalona-Monge M, de Swert LFA, Stevens EAM. Allergenic and antigenic activity of peptide fragments in a whey hydrolysate formula. *Clin Exp Allergy.* 1998;28:1131–1137.
45. Calvo MM, Gómez R. Peptidic profile, molecular mass distribution and immunological properties of commercial hypoallergenic infant formulas. *Milchwissenschaft.* 2002;57:187–190.
46. Puerta A, Diez-Masa JC, de Frutos M. Immunochromatographic determination of β -lactoglobulin and its antigenic peptides in hypoallergenic formulas. *Int Dairy J.* 2006;16:406–414.
47. Bertrand-Harb C, Ivanova IV, Dalgalarondo M, Haertlé T. Evolution of β -lactoglobulin and α -lactalbumin content during yoghurt fermentation. *Int Dairy J.* 2003;13:39–45.
48. Cross ML, Stevenson LM, Gill HS. Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int Immunopharmacol.* 2001;1:891–901.
49. Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2003;361:1869–1871.

50. Tzvetkova I, Dalgalarondo M, Danova S, Iliev I, Ivanova I, Chobert J-M, Haertle T. Hydrolysis of major dairy proteins by lactic acid bacteria from Bulgarian yogurts. *J Food Biochem.* 2007;31:680–702.
51. Pescuma M, Hébert EM, Rabesona H, Drouet M, Choiset Y, Haertlé T, Mozzi F, de Valdez GF, Chobert J-M. Proteolytic action of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 656 reduces antigenic response to bovine β -lactoglobulin. *Food Chem.* 2011;127:487–492.
52. El-Ghaish S, Rabesona H, Choiset Y, Sitohy M, Haertlé T, Chobert J-M. Proteolysis by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 isolated from Egyptian milk products decreases immuno-reactivity of α _{S1}-casein. *J Dairy Res.* 2011;78:203–210.
53. Ahmadova A., El-Ghaish S., Choiset Y, Rabesona H., Drouet M., Chobert J.M., Kuliev A.A., Haertlé T. Modification of IgE binding to β - and α S1-caseins by proteolytic activity of *Lactobacillus helveticus* A75. (2013). *J. Food Biochem.* 37,491–500.
54. Robyt, J.F. and White, B.J. 1987. Biological Preparations. In *Biochemical Techniques: Theory and Practice*, pp, 253-290. Waveland Press. Prospect Heights, IL.
55. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition, Garland Science, 2002.
56. Başıyigit, G., Karahan, A.G., Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve Laktik Asit Bakterilerinin Tanısında Kullanılması, *Gıda* (2010). 35 (6): 445-452.
57. De Voort FR. 1992. Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Res Int*, 25, 397–403.
58. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. 1998. *Principles of Instrumental Analysis*. 5th Edition. Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H (çeviri ed) Bilim Yayıncılık, Ankara, s. 850.
59. Erkahveci A, Karaali A. 1996. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisinin gıda analizlerine uygulanması, *GIDA*, 21 (5):337-345.
60. Özden S., Ertan, R., Akı-Şener, E., Yalçın İ. (2004). Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Pratikleri 1-2.
61. Kok, W. (2000). *Capillary Electrophoresis: Instrumentation and Operation*, Wiesbaden : Vieweg, Germany.
62. Cansever M.Ş. (2010). *Metabolik Hastalıkların Teşhisinde Kapiler Elektroferez*, (doktora tezi), İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
63. Heiger D. (2000). *High Performance Capillary Electrophoresis An Introduction*, Agilent Technologies, Germany.
64. M.M. Bradford, 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
65. Kausar R, Hameed A, Qureshi ZI and Muhammd G, 2017. Comparative protein profiling of milk of Nili-Ravi buffaloes, Sahiwal and cross bred cows by SDS-PAGE. *Pak Vet J*, 37(1): 73-77.
66. Kong, J, and Yu. S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8): 549–559.

67. Jackson, M., and Mantsch, H.H. (1995). The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30(2):95-120.
68. Ambrose, E. J., and Elliott, A. (1951). *Proc. Roy. Soc., A*, 205, 48.
69. Anderle, G and Mendelsohn, R. (1987). Thermal denaturation of globular proteins. Fourier transform-infrared studies of the amide III spectral region., *Biophys J.*52(1): 69–74.
70. Lee, S.H., Lefevre, T., Subirade, M., Paquin, Q. (2007). Changes and Roles of Secondary Structures of Whey Protein for the Formation of Protein Membrane at Soy Oil/Water Interface under High-Pressure Homogenization., *J. Agric. Food Chem.*, , 55 (26), pp 10924–10931.
71. Beauchemin, R., N' soukpoe-Kossi, C. N., Thomas, T. J., Thomas, T., Carpentier, R., & Tajmir-Riahi, H. A. (2007). Polyamine analogues bind human serum albumin. *Biomacromolecules*, 8, 3177–3183.
72. Krimm, S., & Bandekar, J. (1986). Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 38, 181-364.
73. Curley, D. M., Kumosinski, T. F., Unruh, J. J., & Farrell, H. M. Jr., (1998). Changes in the secondary structure of bovine casein by Fourier transform infrared spectroscopy: Effects of calcium and temperature. *Journal of Dairy Science*, 81, 3154–3162.
74. Malin, E. L., Alaimo, M. H., Brown, E. M., Aramini, J. M., Germann, M. W., Farrell, H. M. Jr., et al. (2001). Solution structures of casein peptides: NMR, FTIR, CD and molecular modeling studies of as1- casein, 1–23. *Journal of Protein Chemistry*, 20, 391–404.
75. Omar, A., Harbourne, N., Oruna-Concha, M. J., (2016). Quantification of major camel milk proteins by capillary electrophoresis. *International Dairy Journal* 58, 31-35.
76. A. Gomaa, J. Boye , Impact of irradiation and thermal processing on the immunochemical detection of milk and egg allergens in foods *Food Research International* 74 (2015) 275–283.
77. Biberöglü, Ö., Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi,” Geleneksel Olarak Üretilen Yoğurtların Bazı Kimyasal Özellikleri”, 2013; 8(1): 43-51.
78. Tunçtürk, Y., Andiç, S., Ocak, E., (2010). Homojenizasyon ve Pastörizasyonun Beyaz Peynir ve Peyniraltı Suyu Bileşimine Etkisi 35 (5): 339-345.
79. Lucey J, Kelly J. 1994. Cheese yield. *J Soc Dairy Technol*, 47(1): 1-14.
80. Kosikowski FV, Mistry VV. 1997. The yield of cheese. In: *Cheese and fermented milk foods*, Kosikowski FV and Mistry VV (chief ed), Vol. 1. Origins and principles third ed. Westport CT, USA, pp. 622-632.
81. Bulut B, Akın N. 2008. Çiğ ve pastörize süttten işlenen Mihaliç peynirlerinin kimyasal bileşimi ve olgunlaşma sırasında mikrobiyel florasındaki değişimin belirlenmesi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 21-23 Mayıs Erzurum. s 721-724.
82. Çetindar, Ş., (2017), *Süt Teknolojisi I*, 96-98.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı : Ahmet
Soyadı : KAYA
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri : Uşak
e-mail : akaya6464@gmail.com

Eğitim Bilgileri

<u>Derece</u>	<u>Eğitim Birimi</u>	<u>Mezuniyet Tarihi</u>
Yüksek Lisans	Uşak Üniversitesi	2019
Lisans	Pamukkale Üniversitesi	2015
Ön Lisans	Mersin Üniversitesi	2011
Lise	Uşak Ticaret Meslek Lisesi	2007

İş Deneyimi

<u>Yıl</u>	<u>Yer</u>	<u>Görev</u>
2015-	Muratbey Gıda	Üretim Vardiya Sorumlusu
2011-2012	Arbella Makarna	Gıda Kalite Kontrol