



Tavuk ve Karides Tropomiyozin Proteini: Ultrases ve Maillard Reaksiyonunun Etkisi^A

Sibel KARAKAYA^{1*}, Sedef Nehir EL¹

Öz: Bu çalışmada benzer homolojiye sahip olmakla birlikte alerjeniteleri farklı olan karides ve tavuk tropomiyozinlerine ultrases uygulaması ve Maillard reaksiyonu oluşturulmasının bu proteinlerin yüzey hidrofobisite, *in vitro* mide sindiriminde hidroliz dereceleri ve sekonder yapıları üzerine etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Her iki kaynaktan izole edilen tropomiyozine Maillard reaksiyonu ve ultrases uygulanmıştır. Örneklerde *in vitro* mide sindirimi, protein profili, protein hidrolizi, yüzey hidrofobisite ve FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Maillard reaksiyonu, karidesten izole edilen tropomiyozinde tavuk tropomiyozine göre daha etkin oluşturulmuştur. Ultrases uygulaması ile karides tropomiyozininde 30.6 kDa molekül ağırlığında protein bandı gözlenmiştir. Ultrases işlemi iki farklı kaynaktan elde edilen tropomiyozini farklı etkilemiştir. Ultrases işlemi tavuk tropomiyozinin yüzey hidrofobisitesinde 3.95 kat, karides tropomiyozinin yüzey hidrofobisitesinde ise 1.27 kat artışa neden olmuştur. Karides tropomiyozinine ultrases+Maillard reaksiyonu uygulaması yüzey hidrofobisitenin 2.39'dan 5.59'a çıkmasına yol açmıştır. Bu sonuçlar uygulanan işlemlerin protein katlanmasında açılmaları neden olduğunun göstergesidir. FTIR analizi sonuçları karides tropomiyozini, ultrases uygulanmış karides tropomiyozini ile ultrases+Maillard reaksiyonu uygulanmış karides tropomiyozininin sekonder yapısının α -heliks olduğunu göstermiştir. Ultrases uygulanmamış tavuk tropomiyozininde β -tabaka yapısı hakimken, ultrases uygulaması ile bu yapı α -heliks olmuştur. Ultrases uygulamasının her iki kaynaktan izole edilen tropomiyozine etkisi farklı olmuştur.

Anahtar Kelimeler: *In vitro* mide sindirimi, protein hidrolizi, protein yüzey hidrofobisitesi, sekonder yapı.

^A Bu araştırma için etik kurula ihtiyaç bulunmamaktadır.

^{*} **Sorumlu yazar/Corresponding Author:** ¹ Sibel Karakaya, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 35100, Bornova, İzmir, sibel.karakaya@ege.edu.tr, [OrcID 0000-0001-5514-9521](https://orcid.org/0000-0001-5514-9521)

¹ Sedef Nehir El, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 35100, Bornova, İzmir, sedef.el@ege.edu.tr, [OrcID 0000-0002-2996-0537](https://orcid.org/0000-0002-2996-0537)

Chicken and Shrimp Tropomyosins: Effects of Ultrasound and Maillard Reaction

Abstract: This study aimed to investigate the effects of ultrasound treatment and the Maillard reaction on shrimp and chicken tropomyosins—proteins that share structural homology but exhibit different allergenic properties. The study focused on changes in surface hydrophobicity, degree of hydrolysis during *in vitro* gastric digestion, and alterations in the secondary structure of tropomyosin. The Maillard reaction and ultrasound were applied to tropomyosins extracted from chicken and shrimp. *In vitro* gastric digestion, protein profiles, protein hydrolysis, surface hydrophobicity and FTIR analyses were carried out. The Maillard reaction was more effective in shrimp tropomyosins than in chicken tropomyosins. A protein band with 30.6 kDa was observed in the SDS-PAGE profile of shrimp tropomyosins treated with ultrasound. Ultrasound treatment affected chicken and shrimp tropomyosins differently. Ultrasound treatment caused a 3.95-fold and 1.27-fold increase in surface hydrophobicity of chicken and shrimp tropomyosins, respectively. Ultrasound+Maillard reaction increased the hydrophobicity of shrimp tropomyosin from 2.39 to 5.59. FTIR analysis revealed that the secondary structure of native and treated shrimp tropomyosins was α -helical. These structures were β -sheet and α -helical for native chicken tropomyosin and ultrasound-treated chicken tropomyosin, respectively. The effect of ultrasound on tropomyosin isolated from both sources differed.

Keywords: *In vitro* gastric digestion, protein hydrolysis, protein surface hydrophobicity, secondary structure.

Giriş

Protein büyüme ve gelişme için en önemli besin öğelerinden biridir. Günlük protein gereksinimi hayvansal ve bitkisel kaynaklardan sağlanmakta ve hayvansal kaynaklar arasında kanatlı eti, kırmızı et ve balık eti ilk sıralarda yer almaktadır (Gürbüz, vd., 2023). Tropomiyozin, omurgalı ve omurgasız hayvanlarda bol miktarda bulunan ancak bitkilerde bulunmayan bir proteindir. Kas kasılmasında ve kas dışı hücrelerin sitoskeletonunda önemli rol oynar. Tropomiyozinin amino asit dizisi hayvanlar aleminde oldukça korunmuştur. Örneğin omurgalı (tavuk) ve omurgasız (kabuklu deniz hayvanları) tropomiyozin dizileri yaklaşık %50 benzerdir. Tropomiyozinin konformasyonu neredeyse tamamen α helikstir (Downs vd., 2016). Omurgalı ve omurgasız hayvanlardaki tropomiyozinin amino asit dizisi ve yapısal benzerliğine rağmen alerjen etkilerinin farklı olduğu bilinmekte ve bunun nedeni araştırılmaktadır (Kamath, 2023). Ayrıca diyetteki proteinlerin alerjen etkilerinin gastrik sindirimleri ile ilişkili olduğunun bilinmesi nedeniyle FAO/WHO rehberi, gıda alerjisine neden olabilecek yüksek riskli gıda proteinlerini tanımlamada benzer alerjenlere karşı reaksiyon gösteren kişilerde serum testlerinin yapılmasını ve pepsin sindirimine karşı direncin ölçülmesini önermektedir (Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, 2003). James vd. (2018) domuz ve karides tropomiyozinlerinin sekans benzerlikleri yüksek olmakla birlikte gastrik sindirimin etkisi farklı olduğunu bildirmiştir.

Gıdaların hazırlanması ve işlenmesi sırasında uygulanan işlemler gıda proteinlerinin sindirilirliği ve alerjeniteleri üzerine etkilidir. Bu işlemler epitop bölgelerinin tahribatı, modifikasyonu ya da maskelenmesi yoluyla alerjik etkinin artmasına, sabit kalmasına veya azalmasına neden olabilir (Sathe vd., 2005). Bu nedenle, gıda işleme yöntemleri alerjeniteyi azaltmanın bir yolu olarak araştırılmıştır. Gıdanın işlenmesi sırasında meydana gelen Maillard reaksiyonu proteinlerin fonksiyonel özelliklerinde değişimlerin yanı sıra proteinlerin sindirilebilirliği, biyoyararlılığı, immunojenite ve allerjenitesini etkiler. Maillard reaksiyonu gıda alerjenlerinin spesifik IgE bağlanma reaksiyonlarını sekonder yapıda değişim, aglomerat oluşumu ve kümelenme ve yeni epitopların oluşumu gibi mekanizmalarla değiştirebilir. Bu durumda alerjen etki maskelenebileceği gibi yeni epitoplar meydana gelebilir (Apostolovic vd., 2016). Neo-alerjenler olarak adlandırılan bu yeni epitoplar, antijen sunumuyla sonuçlanan antijen sunan hücreleri (antigen presenting cells; APC) hedefleyebilir ve daha sonra T-hücre farklılaşmasının yanı sıra antijene özgü IgE üretimini modüle edebilir. Gıda proteinlerinin alerjik yanıtı neden olması için gastrointestinal sindirim sırasında duyarlılığı oluşturmaya yetecek bir sürede sindirilmemesi gerekir. Bu nedenle proteinlerin enzimatik hidrolizi alerjen etkilerini belirleyen en önemli faktör gibi görünmektedir. Ancak tüm gıda alerjenleri sindirime dirençli değildir. Proteinlerin gastrointestinal sindirime duyarlılığı katlanmış yapının açılması, disülfid bağlarında değişimler, kümelenme, laktosillisin oluşumu ve ileri glikasyon ürünleri oluşumu gibi nedenlerle meydana gelir (Teodorowicz vd., 2017). Peynir altı suyu proteinlerinden β -laktoglobulin ve α -laktalbuminin alerjenitesi üzerine Maillard reaksiyonunun etkisinin incelendiği çalışmalarda alerjen epitopların yok edilemediği ancak afinitelerinde azalma meydana geldiği saptanmıştır (Taheri-Kafrani vd., 2009; Bu vd., 2009). Galaktoz ile glikasyona uğratılan β -laktoglobulinin gastrointestinal sindirime direnç gösterdiği oysa tagatoz ile glikasyon reaksiyonu oluşturulmuş β -laktoglobulinin gastrointestinal sindirime direncinin düşük olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Maillard reaksiyonu nedeniyle oluşan protein kümeleri de sindirime dirence neden olmuştur (Bu vd., 2009; Teodorowicz vd., 2017). Uygulanan geleneksel işlemlerin negatif etkilerini minimuma indirmek için tropomiyozin alerjenitesini azaltmada yüksek basınç, soğuk plazma, ultrases gibi yeni tekniklerin kullanımı araştırılmıştır (Li vd., 2006; Jin vd., 2015; Khan vd., 2019)

Günümüzde hala gıda proteinlerinin alerjik etkisini azaltmak/ortadan kaldırmak üzerine çalışılması önemini korumaktadır. Özellikle benzer (sekans ve homoloji olarak) proteinlerin alerjik etkisinin farklı olması ve bunun nedenlerinin hala anlaşılamamış olması bu araştırmaları gerekli kılmaktadır. Omurgasız hayvanlardaki tropomiyozinin en büyük 8 gıda alerjeninden biri olmasına karşın omurgalı hayvanlardaki tropomiyozinin alerjen etki göstermemesinin nedeni henüz belirlenememiştir. Tropomiyozin içeren bu gıdalar tüketilmeden önce çeşitli gıda işlemlerine maruz kalmaktadır. Bu işlemlerin protein konformasyonu üzerine etkisi üzerine çalışmalar sınırlıdır. Bu kapsamdaki çalışmaların çoğu tropomiyozin alerjenitesini azaltmaya yöneliktir. Ayrıca özellikle ısıl işlem görmüş bu gıdalardaki tropomiyozinin *in vitro* sindirim sırasındaki hidrolizi üzerinde yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada alerjen (karıdesten elde edilmiş) ve alerjen olmayan (tavuktan elde edilmiş) tropomiyozinin konformasyonu ve Maillard reaksiyonu, ultrases ve ultrases+Maillard reaksiyonunun tropomiyozinin *in vitro* mide koşulunda hidrolizi, sekonder yapısı ve yüzey hidrofobisitesi üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Tavuk göğüs eti ve karides (*Parapenaeus longirostris*) yerel bir süpermarketten satın alınmıştır. Çalışmada kullanılan pepsin (P7012), fitaldialdehit (P0657), 8-Anilino-1-naftalensülfonik asit (A1028), sodyum dodesil sulfat (L4390), β -merkaptotanol (M3148) Sigma-Aldrich (USA) firmasından temin edilmiştir. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta kullanılmıştır.

Tropomiyozin Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması

Bütün ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri Liang vd. (2008) ve Zhang vd. (2018) ve tarafından uygulanan yöntemlere birtakım modifikasyonlar uygulanarak 0-4 °C’ de gerçekleştirilmiştir. İşlem görmemiş karides ve tavuk kasları yağ dokudan ayrılmış ve hacim olarak 1.5:5 oranında (a:h) 50 mM KCl içeren 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) tamponu ile 20 saniye homojenize edilmiştir. 10000 g’ de 15 dakika boyunca santrifüjleme sonrası süpernatant kısmı atılmış ve pellet kısmı Tris-HCl tamponunda yeniden süspanse edilmiştir; ardından homojenizasyon ve santrifüj işlemleri sarkoplazmik proteinleri etkili bir şekilde uzaklaştırmak için dört kez tekrarlanmıştır. Elde edilen çökelti kaba filtre kağıdında 50 mL (-20 °C) asetonla 3 kez yıkanmıştır. Yıkanan çökelti oda sıcaklığında 12 saat bekletildikten sonra 50 °C’ de fırında 7 saat kurutulmuştur. Tamamen kurutulan ve toz haline getirilen çökelti, gece boyunca 1 M KCl ve 10 mM 2-merkaptotanol içeren 10 kat (a:h) 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) ile ekstrakte edilmiştir. Karışım daha sonra 15000 xg’de 20 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant kaba filtre kağıdından geçirilmiştir. Süzüntü, 1 N HCl ile pH 4.5’te izoelektrik çöktürmeye tabi tutulmuştur. Çökelti, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) içerisinde çözündürülmüş ve 1 N NaOH ile pH 7.6’ ya getirilmiştir. Ardından %40’ lık (a:h) amonyum sülfat çözeltisi ile 2 saat fraksiyonlamaya tabi tutulmuştur. Sonrasında 10000 g’ de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve elde edilen sıvı kısım 15000 g’de 10 dakika boyunca tekrar santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen çökelti, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) içerisinde çözündürülmüş, 4 °C’ de manyetik karıştırıcıda diyaliz (48 saat, 8 kDa) edilmiştir. Diyaliz tüpündeki örnekler kaynar su banyosunda 5 dakika tutulduktan sonra, 10000 g’ de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım kaba filtre kağıdından geçirildikten sonra liyofilize edilmiştir.

Maillard Reaksiyonu

Maillard reaksiyonu Zhang vd. (2019) tarafından uygulanan metoda göre gerçekleştirilmiştir. Liyofilize edilmiş tavuk ve karides tropomiyozin (TM) örneklerinin konsantrasyonu 2 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde 5 mM glikoz içeren 10 mM fosfat tamponu (pH 6.5) ile karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 90 °C’ de 1.5 dakika ısıtma işlemine tabi tutularak Maillard reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Yoğunluklu Ultrases İşlemi

Yüksek yoğunluklu ultrases işlemi Zhang vd. (2018) tarafından önerilen metotta bazı modifikasyonlar yapılarak TM ve Maillard reaksiyonu gerçekleştirilmiş TM örneklerine uygulanmıştır. Ultrases işlemi, tropomiyozin konsantrasyonları 2 mg mL⁻¹ olan örnekler 6.0 mm çapında titanyum prob kullanılarak ultrases cihazı (Sonopuls, Bandelin, Berlin, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Buzlu su banyosuna daldırılan 50 mL santrifüj tüplerinde TM çözeltilerine 30 dakika boyunca 108 Watt güçte (30 sn açık ve 30 sn kapalı darbe süreleri) ultrases işlemi uygulanmıştır. Maillard reaksiyonu ve ultrases uygulamasına maruz kalmayan örnekler kontrol örnekleri olarak belirlenmiştir.

Analizler

Analizler, herhangi bir işlem uygulanmamış, ultrases ve Maillard reaksiyonu + Ultrases işlemi uygulanan tropomiyozin örneklerinde gerçekleştirilmiştir.

***In vitro* Ağız ve Mide Sindirimi**

In vitro sindirim için COST FA1005 INFOGEST aksiyonun katılımcıları tarafından hazırlanan protokol (Brodkorb vd., 2019) kullanılmıştır. Ağız sindiriminde simüle ağız sıvısı (SAS), mide sindiriminde de simüle gastrik sıvısı (SGS) ve pepsin enzimi kullanılmıştır. Mide sindiriminde sırasıyla 37 °C’ de inkübasyonun 2. ve 3. saatlerinde örnek alınmıştır. Pepsin enziminin aktivitesini sonlandırmak için NaOH ile ortamın pH’ ı 7.0’ye ayarlanmış ve santrifüj işlemi (Scientific, IEC C1312 Multispeed Centrifuge, Almanya) uygulanmıştır. Örnekler, SDS-PAGE ve hidroliz derecesi analizleri yapıncaya kadar vialler içerisinde -18 °C’ de muhafaza edilmiştir.

SDS-PAGE Analizi

In vitro sindirime uğramamış örneklerin ve *in vitro* mide sindirimi sonrası elde edilen TM örneklerinin protein profillerinin belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir (Laemmli, 1970). SDS-PAGE uygulamalarında Bio-Rad Mini Protean elektroforez sistemi ve Mini Protean® TGXTM %12’lik ayırma jeli hazır olarak kullanılmıştır. Örnekler örnek tamponuyla karıştırılıp 1 mg mL⁻¹ konsantrasyona sahip olacak şekilde seyreltilmişlerdir. Elektroforez işlemi 50 V sabit voltajda gerçekleştirilmiştir. İşlem sonunda jel boyama çözeltisine konulmuş ve sabit hızda çalkalanmıştır. Sonrasında jeller boya giderme (destaining) çözeltisi ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırılmış ve görüntü alınmıştır. SDS-PAGE analizi sonucu alınan bant görüntülerinin ölçümü ImageJ programı ile gerçekleştirilmiştir (Anon, 2012).

Hidroliz Derecesinin Orto-fitalaldehit (OPA) Analizi ile Belirlenmesi

In vitro mide sindirimi gerçekleşen örneklerin protein hidroliz derecesinin belirlenmesi için OPA yöntemi kullanılmıştır. OPA reaktifi günlük olarak hazırlanmıştır. Spektrofotometrik ölçümler Varioscan Mikroplaka okuyucu (Thermo Scientific, Boston MA) ile gerçekleştirilmiştir. Standart olarak serin amino asidi

kullanılmıştır. Hidroliz derecesinin hesaplanmasında öncelikle örneklerin absorbansından mg serin L⁻¹ karşılıkları standart kalibrasyon grafiği kullanılarak saptanmıştır. Daha sonrasında mg serin L⁻¹ konsantrasyon karşılıkları mmol cinsine çevrilmiştir ve örneklerin meqv serin L⁻¹ değerleri bulunmuştur. Elde edilen bu değerler ile hidrolize olmuş peptit sayısı (h) ve hidroliz derecelerinin (HD) hesaplanmasında Nielsen vd. (2001)'in kullandığı denklemler (Eşitlik 1, 2 ve 3) kullanılmıştır:

$$\text{serin} - \text{NH}_2 = \frac{\frac{\text{meqv serin}}{L} \times \text{örnek hacmi (L)} \times 100}{\text{örnek miktarı (g)} \times \text{örneğin protein yüzdesi}} \quad (1)$$

$$h = \frac{\text{serin NH}_2 - \beta}{\alpha} \quad (2)$$

$$\text{HD (\%)} = \frac{h}{h_{\text{top}}} \times 100 \quad (3)$$

HD, hidroliz derecesini, h hidrolize olmuş peptit bağlarının sayısını, h_{top} ise protein miktarına eşdeğer toplam peptit bağı sayısını ifade etmektedir. H_{top} değerleri tavuktan elde edilmiş tropomiyozin örnekleri için 7.6, karidesten elde edilmiş tropomiyozin örnekleri için ise 8.6 olarak alınmıştır. α ve β sabitleri sırası ile 1 ve 0.4 olarak alınmıştır (Nielsen vd., 2001).

Yüzey Hidrofobisitesinin Belirlenmesi

Örneklerin yüzey hidrofobisitesinin belirlenmesinde Lin vd. (2015) tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır. Liyofilize edilmiş TM örnekleri 0.05-0.5 mg mL⁻¹ konsantrasyon aralığında 0.1 M sodyum fosfat tamponunda (pH 7) hazırlanmıştır. 1.5 mL örnek üzerine 5 mM ANS çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 3 dakika bekletilmiştir. Ardından mikropilaka okuyucu ile (Thermo Scientific Varioskan Flashi Finland) örneklerin 370 nm uyarım ve 490 nm emisyonunda floresans yoğunlukları ölçülmüştür. Örneklerin yüzey hidrofobisitesi, protein konsantrasyonu ve floresans yoğunluğu arasında elde edilen grafiğin ilk lineer kısmının eğimi alınarak belirlenmiştir (Lin vd., 2015).

Sekonder Yapının Belirlenmesi

Tavuk ve karidesten elde edilen tropomiyozinin sekonder yapısındaki değişimler zayıflatılmış toplam yansıma-Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometresi (ATR-FTIR) ile (Perkin Elmer Spectrum Two) saptanmıştır. Cihaz donanımı; dedektör: DTGS; spektrum aralığı: 4000-600 cm⁻¹; lazer: lazer diyot; yazılım: Spectrum 10 şeklindedir. Toz halindeki örnek (0.1 g) oda sıcaklığında elmas kristale yerleştirilmiş ve ölçümler alınmıştır (Neha vd., 2025).

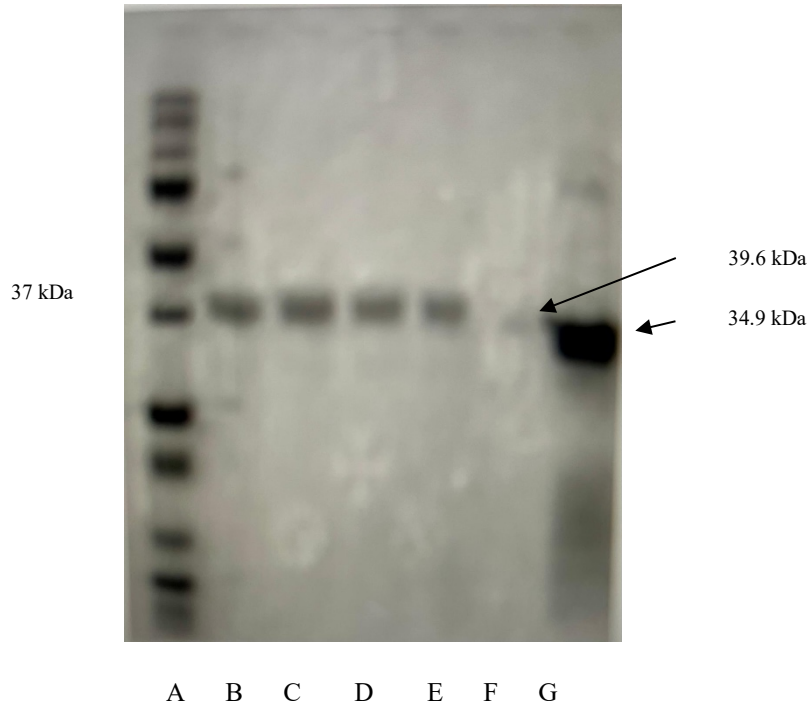
İstatistiksel Analiz

Analizler 3 tekrar 2 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. İstatistik analiz SPSS 22 paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler arasındaki farklılıklar varyans (ANOVA) analizi ile belirlenmiş ve %95 güven aralığında Tukey testi ile değerlendirilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Tropomiyozin Ekstraksiyonu ve *in vitro* Hidroliz

Tavuk ve karides TM'sinin saf olarak ekstrakte edilip edilmedikleri SDS-PAGE analizi ile belirlenmiştir. SDS-PAGE görüntüleri her iki kaynaktan ekstrakte edilen TM için tek bir bant (tavuk TM için 39.6 kDa ve karides TM için 34.9 kDa) elde edildiğini ve dolayısıyla TM'nin yeterli saflıkta izole edildiğini göstermiştir (Şekil 1, F ve G). Tropomiyozinin molekül ağırlığı 34-39 KDa aralığındadır (Faber vd., 2017). Karides TM'sinin molekül ağırlığının ise 35-38 kDa arasında olduğu bildirilmiştir (Marques vd., 2024). Karides TM'sininin 2 ve 3 saat mide sindirimi sonrasında bant yoğunluğunda azalma saptanmış ancak tamamen sindirilmediği belirlenmiştir. Tavuk TM için de benzer sonuç elde edilmiştir.

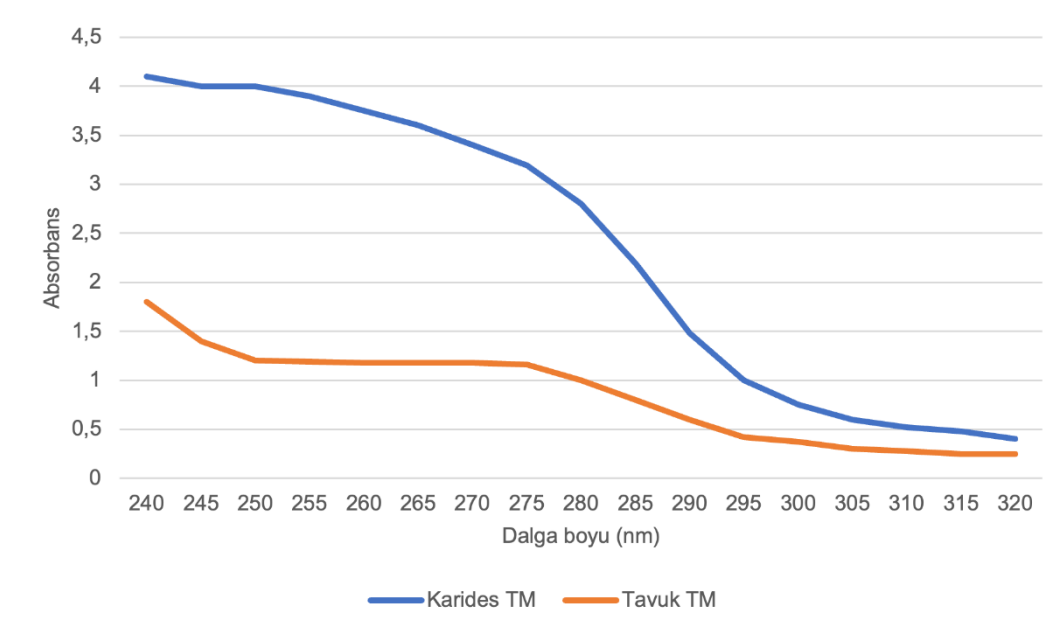


Şekil 1: İşlem görmemiş ve *in vitro* mide sindirimi uygulanmış karides ve tavuk TM SDS Page görüntüleri. A: Marker, B: 3 saat mide sindirimi sonrası tavuk TM C: 3 saat mide sindirimi sonrası karides TM, D: 2 saat mide sindirimi sonrası tavuk TM, E: 2 saat mide sindirimi sonrası karidesTM, F: sindirim uygulanmamış tavuk TM, G: sindirim uygulanmamış karides TM.

Maillard Reaksiyonu

Tavuk ve karidesten elde edilen TM örneklerine uygulanan Maillard reaksiyonu sonucunda 280 nm dalga boyu civarında gözlenen absorbans Amadori ürünlerinin oluştuğunu göstermektedir. Karides TM için 270-280 nm aralığında saptanan absorbans değerleri tavuk TM için saptanan absorbans değerlerinden daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç karides TM'sinin Maillard reaksiyonunda tavuk TM'sine göre daha reaktif olduğunu göstermektedir.

Zhang vd. (2019) karides (*Exopalaemon modestus*) TM'ye deglikozilasyon ve glukoz ile glikasyon reaksiyonları uygulamışlar ve bu işlemlerin allerjenite üzerine etkisini araştırmışlardır. Deglikolizasyonun TM allerjenitesini artırdığı, glukoz ile glikasyonun ise TM allerjenitesini azalttığını saptamışlardır. Karides (*Metapenaeus ensis*) TM'nin transglutaminaz ile katalizlenen glikasyonunun TM'de yapısal değişikliklere neden olduğu ve karidesin allerjik etkisini azaltmada etkili bir uygulama olduğu bildirilmiştir. Ayrıca karides TM ve glikolizasyon reaksiyonu uygulanmış karides TM'nin UV absorpsiyon bölgesinde maksimum absorbans yaptığı dalga boylarında 0.5 nm civarında kayma olduğu tespit edilmiştir (Yuan vd., 2017).

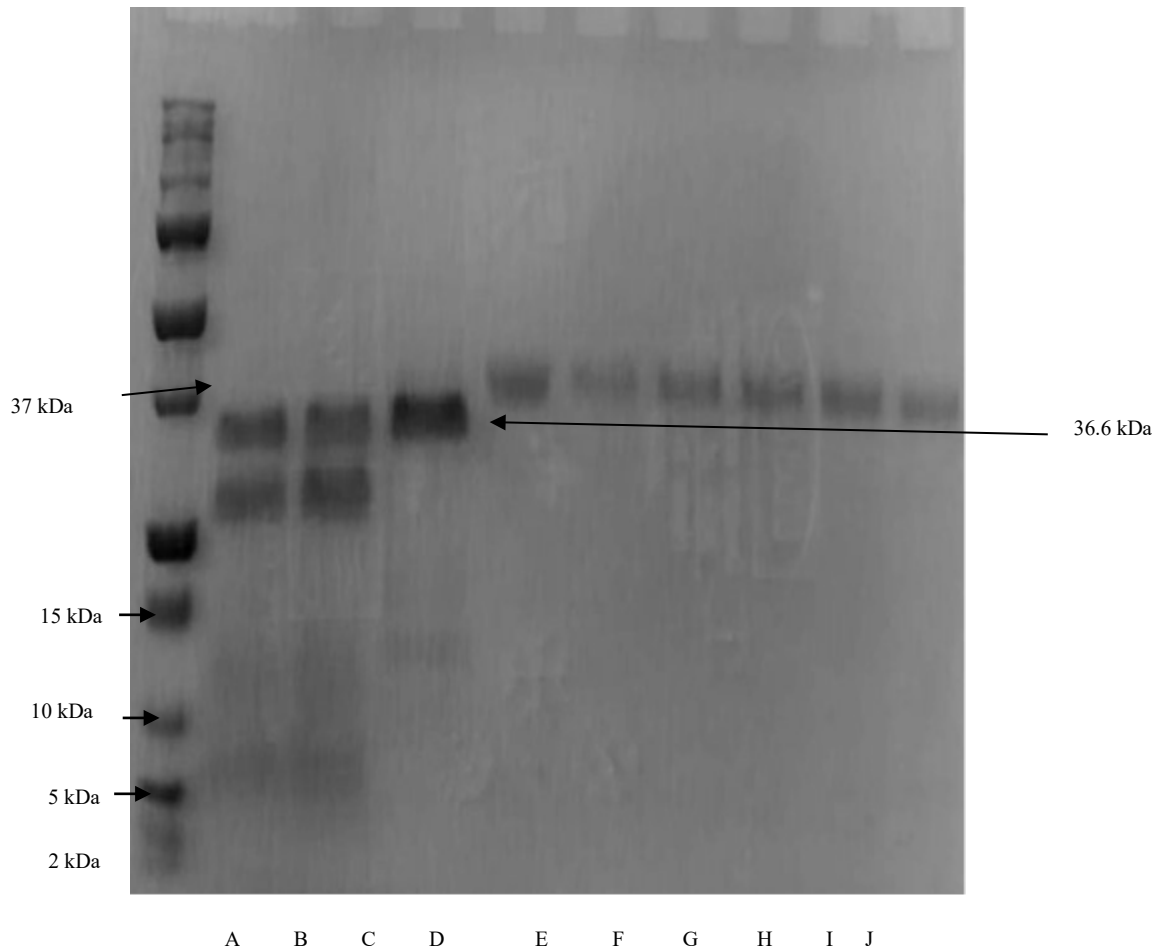


Şekil 2: Tavuk ve karidesten izole edilen TM'ye uygulanan ısıtma işlemi (90 °C'de 1.5 dak.) sonucu 240 nm- 320 nm dalga boyu aralığındaki absorbans değerleri.

Ultrases ve Maillard Reaksiyonu Uygulamalarının Tropomiyozin ve Tropomiyozin *in vitro* Hidrolizi Üzerine Etkisi

Ultrases son yıllarda gıda işlemede kullanımı artan ısıtma olmayan bir gıda işleme yöntemidir. Ultrases insanlar için duyulabilir limitin (20 kHz) üzerinde bir titreşim frekansına sahip dalgalar tarafından üretilen bir enerji şeklidir. Bu sistemde elektrik enerjisi kavitasyona neden olacak titreşimli enerjiye dönüştürülür. Kaviteasyon enerjisi daha sonra kimyasal, fiziksel veya biyolojik etkilere neden olur (Çimen vd., 2024). SDS-PAGE profilinde karides

TM'nin molekül ağırlığı 34.9 kDa olarak görüntülenmiştir. SDS-PAGE profili ultrases uygulamasının karides TM'nin degradasyonuna ve 2 farklı molekül ağırlığında proteinlerin (36.6 kDa ve 30.6 kDa) oluşumuna neden olduğunu göstermiştir. Bu profilde saptanan 36.6 kDa molekül ağırlığına sahip bandın karides TM olduğu ve 30.6 kDa molekül ağırlığındaki bandın ultrases uygulamasına bağlı olarak TM'nin degradasyonu ile oluşmuş daha düşük molekül ağırlığına sahip protein bandı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca 20 kDa altında molekül ağırlığına sahip proteinler tespit edilmiştir. Maillard reaksiyonu uygulanmış karides TM'ye ultrases uygulaması sonucunda 36.6 kDa ve 30.6 kDa molekül ağırlığında bantlar ve 20 kDa altındaki yoğunlaşmış nispeten daha silik görüntünün elde edilmiş olması bu degradasyona ultrases uygulamasının neden olduğunu göstergesidir (Şekil 3).



Şekil 3: İşlem uygulanmış TM'ye ait SDS-PAGE görüntüleri. A: marker, B: ultrases uygulanmış karides TM, C: ultrases+maillard reaksiyonu uygulanmış karides TM, D: ultrases uygulanmış tavuk TM, E: ultrases uygulanmış karides TM (2 sa mide sindirimi sonrası), F: ultrases+Maillard reaksiyonu uygulanmış karides TM (2 sa mide sindirimi sonrası), G: ultrases uygulanmış tavuk TM (2 sa mide sindirimi sonrası), H: ultrases uygulanmış karides TM (3 sa mide sindirimi sonrası), I: ultrases+Maillard reaksiyonu uygulanmış karides TM (3 sa mide sindirimi sonrası), J: ultrases uygulanmış tavuk TM (3 sa mide sindirimi sonrası)

Tavuktan elde edilen ultrases uygulanmış TM’de ise 36.6 kDa molekül ağırlığında ve karides TM’ye göre (Şekil 3 B) daha yoğun bir bandın varlığı, ultrases işleminin bu iki farklı kaynaktan elde edilen TM’ye farklı etkisi olduğunu göstermektedir. Tavuktan elde edilen ultrases uygulanmış TM’nin SDS-PAGE profilinde 15 kDa molekül ağırlığının üzerinde silik protein bantları görülmüştür. Ultrases+Maillard reaksiyonu uygulanmış tavuk TM’nin SDS-PAGE profili ultrases uygulanmış tavuk TM ile aynı olmuştur. Bu nedenle sonraki analizlere ultrases uygulanmış TM ile devam edilmiştir. Her iki kaynaktan elde edilmiş ve işlem uygulanmış TM’nin 2 ve 3 saatlik *in vitro* mide sindirimi sonrasında 36.6 ve 30.6 kDa molekül ağırlığına sahip proteinlere ait görüntülerin saptanmaması bu proteinlerin hidrolize olduğunu göstermiştir. Bu sonuç ultrases uygulamasının karides TM’nin alerjenitesini azaltmada etkili olabileceğinin göstergesidir. Ancak bunun kabul görmüş alerjen testleriyle desteklenmesi gerekir.

Dong vd. (2020) oda sıcaklığında 0, 5, 10, 15 ve 20 dakika boyunca yüksek yoğunluklu ultrases uygulamasının (20 kHz, 400 W) karides proteinlerinin sindirilirliği üzerine etkili olduğunu ve 20 dak ultrases uygulamasının *in vitro* protein sindirilirliğinin (mide ve ince bağırsak sindirimi) %76.42’den %83.95’e yükselmesine neden olduğunu bildirmiştir. Ayrıca ultrases uygulamasının karides alerjisini azaltmada etkili olduğu belirtilmiştir. Zhong vd. (2025) ultrason destekli soğuk plazma (UCP) uygulamasının karides tropomiyozininin *in vitro* sindirime direnci ve sindirim sonrası açığa çıkan ürünlerin alerjen etkisindeki değişiklikleri incelemiştir. İşlem uygulanmış tropomiyozinin *in vitro* sindirime karşı stabilitesinin azaldığı, özellikle ince bağırsakta sindirim direncinin düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca işlem görmüş tropomiyozinin *in vitro* sindirimi ile açığa çıkan ürünlerin IgE bağlanma kapasitesinin azaldığı bulunmuştur. İşlem uygulanmamış tropomiyozinin IgE bağlanma kapasitesi %68.13 iken, 10 dakika işlem uygulanmış tropomiyozinde bu değer %39.12’ye düşmüştür.

İki ve 3 saat *in vitro* mide sindirim sonrasında elde edilen hidroliz dereceleri (Çizelge 1) SDS-PAGE sonuçları ile uyum göstermektedir. İşlem uygulanmamış tavuk TM ve karides TM’nin hidroliz dereceleri arasında bir farklılık saptanmamış ($p>0.05$), ancak ultrases uygulanan tavuk TM’nin 2 saat *in vitro* mide sindirimi sonrasında hidroliz derecesinin %31.42 ile kontrole göre yaklaşık 1.6 kat arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Ultrases uygulaması karides TM’nin hidroliz derecesinin hem 2 saat hem de 3 saat mide sindirimi sonrasında artmasına neden olmuştur ($p<0.05$). İki saat *in vitro* mide sindirimi sonrasında ultrases ve Maillard reaksiyonunu birlikte uygulamanın karides TM’nin sadece ultrases uygulamasına göre hidrolize edilebilirliğini artırdığı saptanmıştır ($p<0.05$). Oysa üç saat *in vitro* mide sindirimi sonrasında her iki işlem arasında hidroliz derecesi bakımından bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çizelge 1. Tropomiyozinin *in vitro* mide sindirimi sonrasında saptanan hidroliz derecesi

Örnekler	Hidroliz Derecesi (%)*	Hidroliz Derecesi (%)*
	2 saat mide sindirimi sonrası	3 saat mide sindirimi sonrası
Karides TM	18.06 ± 0.42 ^{a, A}	27.68 ± 0.04 ^{a, B}
Ultrases uygulanmış karides TM	23.63 ± 1.84 ^{b, A}	29.81 ± 0.84 ^{b, B}
Ultrases ve Maillard reaksiyonu uygulanmış karides TM	28.85 ± 1.33 ^{c, A}	29.86 ± 0.36 ^{b, A}
Tavuk TM	19.26 ± 0.57 ^{a, A}	20.63 ± 1.04 ^{c, A}
Ultrases uygulanmış tavuk TM	31.42 ± 2.04 ^{d, A}	34.43 ± 1.68 ^{d, A}

* Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir.

^{a-d} Aynı sütundaki farklı harfler p<0.05 düzeyinde anlamlı farklılığı göstermektedir.

^{A-B} Aynı satırdaki farklı harfler p<0.05 düzeyinde anlamlı farklılığı göstermektedir.

Tropomiyozinin Yüzey Hidrofobisitesi ve Sekonder Yapı

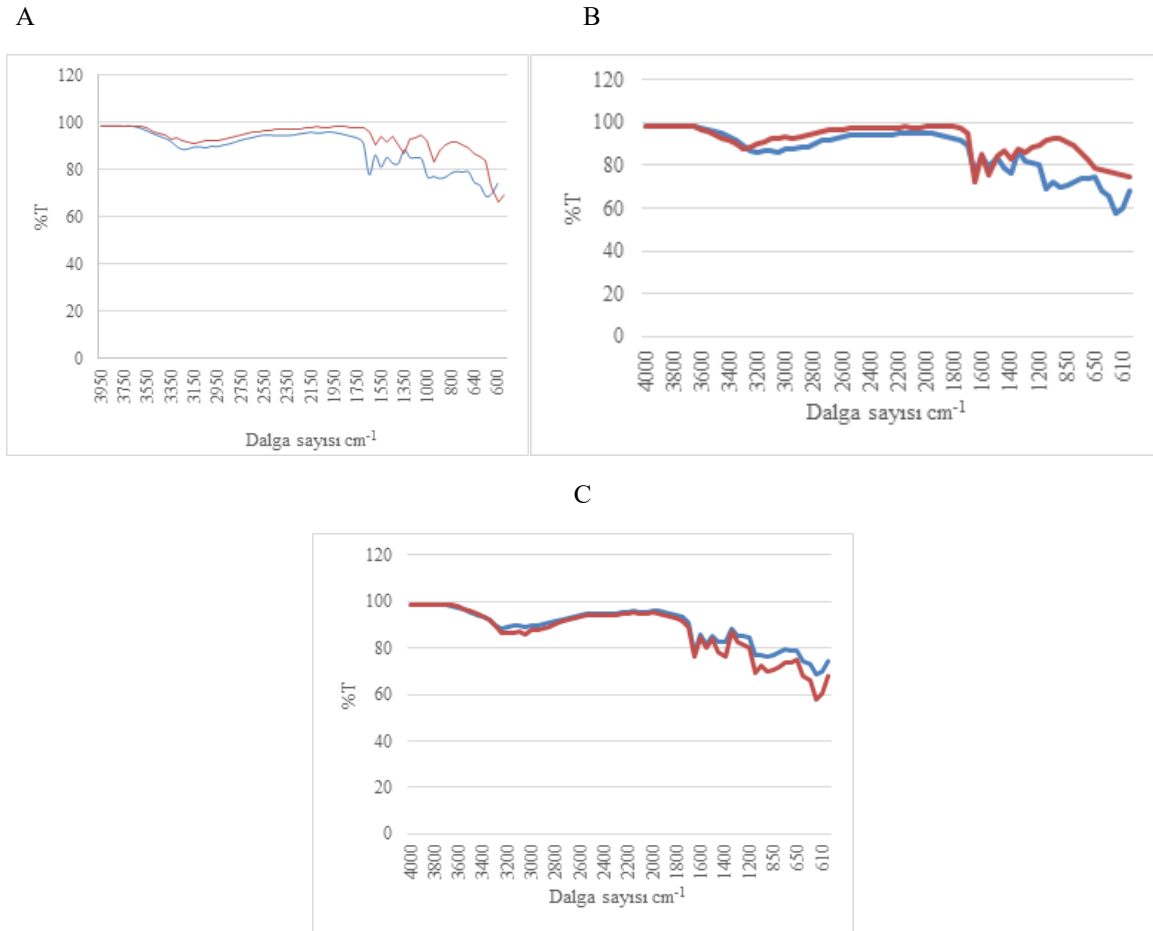
Proteinlerin hidrofobisitesi; proteinin katlanması, lizize duyarlılığı, polimerizasyonu/kümelenmesi, lipitlere bağlanması veya misel yapılara girmesi ve protein-protein interaksyonu için önemli bir faktördür. Hidrofobisite analizi protein katlanması ve stabilitesini, özellikle proteinlerin sekonder yapısını, iç ve dış bölgeleri, antijenik bölgeleri, amino asit dağılımındaki periyodik tekrarları, membran ile ilişkili bölgeleri anlamaya yardımcı olur. Proteinlerin tersiyer yapısı hidrofobik gruplar arasındaki interaksyonla oluşur. Proteinin yüzey hidrofobisitesinin α -heliks içeriği ile negatif ilişkisi olduğu bildirilmiştir (Jiang vd., 2015).

Çizelge 2. Tropomiyozin örneklerinin yüzey hidrofobisite değerleri

Örnekler	Yüzey hidrofobisitesi
Karides TM	2.39
Ultrases uygulanmış karides TM	3.04
Ultrases+ Maillard reaksiyonu uygulanmış karides TM	5.59
Tavuk TM	2.53
Ultrases uygulanmış tavuk TM	9.97

En yüksek yüzey hidrofobisite değeri ultrases uygulanmış tavuk TM’de elde edilmiştir. Ultrases işlemi tavuk TM’nin yüzey hidrofobisite değerinde 3.95 kat, karides TM’nin yüzey hidrofobisitesinde ise 1.27 kat artışa neden olmuştur. Karides TM’ye ultrases+Maillard reaksiyonu uygulaması yüzey hidrofobisite değerinin 2.39’dan 5.59’a çıkmasına (2.33 kat artış) yol açmıştır. Bu sonuçlar uygulanan işlemlerin protein katlanmasında açılmalara neden olduğunu göstermektedir. Ancak çalışmamızda karides TM için saptadığımız yüzey hidrofobisite değerleri Yuan vd. (2017) tarafından karides TM ve glikasyona uğratılmış karides TM için saptanan değerlerden oldukça düşüktür. Bu her iki çalışmada kullanılan farklı karides örneklerinden, TM ekstraksiyonu ve saflaştırmasındaki farklılıklardan ve glikasyonda kullanılan farklı şekerlerden kaynaklanabilir. Liv vd. (2025) TM’de konformasyonel epitopların bozulmasının yapısal değişikliklere neden olabileceğini belirtmiştir. Özellikle hidrofobik bölgelerin açığa çıkmasının protein yüzeyindeki alerjik epitopların protein yapısı içine gömülmesi ile sonuçlanabileceği vurgulanmıştır. Bu nedenle çalışmamızda saptadığımız hidrofobisite artışı alerjen epitopların protein içine gömülmesi için uygun bir yapı oluşturmuş olabilir.

Sekonder yapı konusunda fikir veren bir başka analiz ise FTIR spektroskopisidir. Amid I bölgesindeki FTIR spektrumu incelendiğinde karides TM'nin sekonder yapısı için elde edilen frekans (cm^{-1}) 1640murgasız.44, ultrases uygulanmış karides TM için 1648.68, ultrases ve Maillard reaksiyonu uygulanmış karides TM için 1651.42, tavuktan TM için 1624.03 ve ultrases uygulanmış tavuk TM için 1648.65 olarak saptanmıştır (Şekil 4 ve Çizelge 3). Dong vd. (2020) “1618-1640 cm^{-1} ve 1670-1690 cm^{-1} ”, 1645 cm^{-1} , 1650-1660 cm^{-1} ve “1660-1670 cm^{-1} ve 1690-1700 cm^{-1} ” frekanslarının sırasıyla β -tabaka, rastgele sarmal, α -heliks ve β -dönüş yapılarını işaret eden frekanslar olduğunu bildirmiştir. Bu değerlendirmeye göre karides TM ve ultrases uygulanmış karides TM'de saptanan frekans değerleri sekonder yapının α -heliks olduğunu göstermektedir. Bu sonuç Fu vd. (2019) tarafından uzak-UV CD ile karides TM'nin sekonder yapısı için saptamış oldukları %80 civarında α -heliks yapı ile uyumludur. Araştırmacılar karides TM ile riboz, galaktooligosakkarit ve kitosanoligosakkarit arasında Maillard reaksiyonu oluşturmuşlar ve reaksiyon sonunda başlangıçtaki α -heliks yapıda yaklaşık %10 düzeyinde bir azalma ve β -tabaka yapıda göreceli bir artış belirlemişlerdir. Ultrases ve Maillard reaksiyonu uygulanmış karides TM'nin sekonder yapısının α -heliks olduğu görülmektedir. Ultrases uygulanmamış tavuk TM'de β -tabaka yapısı hakimken, ultrases uygulaması ile bu yapı karides TM (α -heliks) ile benzer hale dönüşmüştür.



A: kontrol (kırmızı) ve ultrases uygulanmış karides TM (mavi); B: kontrol (kırmızı) ve ultrases uygulanmış tavukTM (mavi); C: Ultrases uygulanmış tavuk TM (mavi) ve ultrases uygulanmış karides TM (kırmızı)

Şekil 4: Örneklerin FTIR spektrumları

Çizelge 3. Örneklerin Amid I ve Amid II bandındaki dalga sayısı (cm⁻¹)

Örnekler	Amid I bölgesi (1700-1600 cm ⁻¹) Dalga sayısı (cm ⁻¹) (Sekonder yapı)	Amid II bölgesi (1600-1500 cm ⁻¹) Dalga sayısı (cm ⁻¹)
Karides TM	1648.44 (α -heliks)	1540.49
Ultrases uygulanmış karides TM	1648.68 (α -heliks)	1540.28
Ultrases+ Maillard reaksiyonu uygulanmış karides TM	1651.42 (α -heliks)	1544.84
Tavuk TM	1624.03 (β -tabaka)	1546.13
Ultrases uygulanmış tavuk TM	1648.65 (α -heliks)	1540.50

Amid II bandı proteindeki N-H bükülme ve C-N gerilme titreşimlerinden kaynaklanır. Amid II bandı, proteinlerin ikincil yapılarının belirlenmesinde kullanılmakla birlikte Amid I bandına kıyasla daha az hassas bir göstergedir. Karides TM'ye ultrases uygulaması bu bantta hafif bir kaymaya neden olmuştur. Benzer kayma Amid I bandında da gözlenmiştir. Çalışmamızda, ultrason uygulaması, α -heliks oranını artırarak daha düzenli ve helikal bir yapı kazandırmışken, Maillard reaksiyonu, α -heliks oranını bir miktar azaltmış ama yapıyı tamamen bozmak yerine β -tabaka yönünde yeniden düzenlemiştir. Bu noktada Maillard reaksiyonunun etkisi kısmen karmaşıktır. Sekonder yapı açısından kısmen olumsuz (α -heliks azalıyor), ancak yapı tamamen rastgele hale gelmediği için, bu değişim fonksiyonel özellikler açısından nötr ya da olumlu olarak değerlendirilebilir. Maillard reaksiyonu, sekonder yapıda α -heliks oranını azaltarak bazı yönlerden (örneğin stabilite) daha sınırlı düzeyde olumsuzluğa neden olabilir, çünkü bu değişim aynı zamanda sindirilirliği arttırabilir, tekno-fonksiyonel özellikler üzerine genelde olumlu etkilere neden olabilir Shi vd. (2012). Tavuk TM'ye uygulanan ultrases benzer etkiye neden olmuş ve azalma yönünde olmak üzere bir kaymaya yol açmıştır. Lv vd. (2025) çeşitli deniz canlılarında konformasyonel ve linear epitopları temel alarak TM alerjenitesini araştırmışlar ve karides, yengeç, ıstiridye ve deniz tarağı TM'lerinde ortak özelliğin tipik α -heliks yapıyla karakterize olduğunu bildirmiştir. Alerjen etki gösteren bu 5 deniz ürünündeki TM'nin yapısal özelliklerinin benzer olduğunu vurgulamışlardır. Yine aynı çalışmada kabuklulardaki TM ile yumuşakçalardaki ve balıktaki TM'nin düşük homoloji gösterdiği ifade edilmiştir. Ayrıca biyoinformatik araçlarla ve TM'nin sekonder yapısı ile tahminlenen alerjik etkinin Western blot ve hayvan deneyleri ile doğrulandığı belirtilmiştir.

Sonuç

Bu çalışmada amino asit dizilimleri ve homoloji olarak birbirine benzeyen ancak alerjeniteleri farklı olan tavuk ve karides tropomiyozininin *in vitro* ağız, mide sindirimi sırasındaki hidroliz dereceleri, yüzey hidrofobisiteleri ve sekonder yapıları karşılaştırılmıştır. Ayrıca ultrases uygulaması ve Maillard reaksiyonunun iki farklı kaynaktan elde edilen tropomiyozin üzerinde farklı etkilerinin olup olmadığı *in vitro* ağız, mide sindirimi sırasındaki hidroliz dereceleri, yüzey hidrofobisiteleri ve sekonder yapıları ile değerlendirilmiştir. Ultrases uygulamasının her iki kaynaktan izole edilen TM'ye etkisi farklı olmuştur. Bu farklılık *in vitro* sindirim sonrasındaki TM'nin hidroliz derecesi, FTIR spektroskopisi ve yüzey hidrofobisite sonuçları ile ortaya

konmuştur. Karides kası proteinlerinde Maillard reaksiyonunun sekonder yapıyı nasıl etkilediğine dair doğrudan FTIR analizlerine dayalı çalışma bulunmamaktadır. Ancak, genel olarak deniz ürünleri ve et ürünleri üzerinde yapılan araştırmalar, bu tür işlemlerin protein yapısını değiştirebileceğini göstermektedir. Örneğin, deniz ürünlerinde yapılan bazı çalışmalar, yüksek basınçlı işleme (HPP) veya ultrasonik işleme gibi yöntemlerin proteinlerin sekonder yapısını değiştirdiğini ve bu değişikliklerin alerjeniteyi etkileyebileceğini belirtmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından finansal olarak desteklenmiştir (BAP, Proje No; 17-MÜH-019). Yazarlar finansal destek için teşekkür eder. Bu araştırma için etik kurula ihtiyaç bulunmamaktadır. Veriler makul talep üzerine sağlanabilmektedir. Yazarlar çalışmaya eşit katkıda bulunmuştur. Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynakça

- Anonim, 2012. "ImageJ" Programı <https://imagej.net/ij/> (Erişim Tarihi: 22.10.2023).
- Apostolovic, D., Stanic-Vucinic, D., de Jongh, H.H., de Jong, G.A., Mihailovic, J., Radosavljevic, J., Radibratovic, M., Nordlee, J. A., Baumert, J. L., Milcic, M., Taylor, S. L., Clua, N. G., Velickovic, T. C., and Koppelman, S. J. 2016. Conformational stability of digestion-resistant peptides of peanut conglutins reveals the molecular basis of their allergenicity. *Scientific Reports*, 6: 29249.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W. and Recio, I. 2019. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14:991-1014.
- Bu, G., Luo, Y., Zheng, Z., and Zheng, H. 2009. Effect of heat treatment on the antigenicity of bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein isolate. *Food Agricultural Immunology*, 20: 195–206.
- Çimen, N., Unal, K., ve Alp, H. 2024. Effects of ultrasound-assisted marination on spent hen meats: Microstructure textural and technological properties. *Food Bioscience*, 61: 104563.
- Dong, X., Wang, J., and Raghavan, V. 2020. Effects of high-intensity ultrasound processing on the physicochemical and allergenic properties of shrimp. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 65: 102441.

- Downs, M., Johnson, P. and Zeece, M. 2016. Insects and their connection to food allergy: Insects as Sustainable Food Ingredients. 1st ed. Eds: Dossey, A.T., Morales-Ramos, J.A., and Rojas, M.G., Academic Press. 255-272.
- Faber, M.A., Pascal, M., El Kharbouchi, O., Sabato, V., Hagendorens, M.M., Decuyper, I.I., Bridts, C.H., and Ebo, D.G. 2017. Shellfish allergens: tropomyosin and beyond. *Allergy*, 72: 842-848.
- Fu, L.C., Wang, J., Wang, C., Ni, S., and Wang, Y. 2019. Maillard reaction with ribose, galacto-oligosaccharide or chitosan oligosaccharide reduced the allergenicity of shrimp tropomyosin by inducing conformational changes. *Food Chemistry*, 274:789-795.
- Gürbüz, İ.B., Gemeç, E., ve Kadağan, Ö. 2023. Tüketicilerin beyaz et tercihlerini etkileyen faktörler ve gıda harcamaları içerisinde beyaz etin payı: Bursa ili örneği. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 37: 343-363.
- Lv., L., Wei, F., Liu, L., Song, F., Hou, X., and Yang, Q. 2025. Study on the allergenicity of tropomyosin from different aquatic products based on conformational and linear epitopes analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73: 4936-4946.
- James, J.K., Pike, D.H., Khan, J., and Nanda, V. 2018. Structural and dynamic properties of allergen and non-allergen forms of tropomyosin. *Structure*, 7: 997-1006.e5.
- Jiang, L., Wang, Z., Li, Y., Meng, X., Sui, X., Qi, B., and Zhou, L. 2015. Relationship between surface hydrophobicity and structure of soy protein isolate subjected to different ionic strength. *International Journal of Food Properties*, 18: 1059-1074.
- Jin, Y., Deng, Y., Qian, B., Zhang, Y., Liu, Z., and Zhao, Y. 2015. Allergenic response to squid (*Todarodes pacificus*) tropomyosin Tod p 1 structure modifications induced by high hydrostatic pressure. *Food and Chemical Toxicology* 76: 86-93.
- Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, and World Health Organization. 2003. Codex Alimentarius: Food Hygiene, Basic Texts (Food & Agriculture Org).
- Kamath, S. D., 2023. Tropomyosin: A cross-reactive invertebrate allergen. *Encyclopedia of Food Allergy*, 310-319. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96018-2.00147-4>
- Khan, M. U., Ahmed, I., Lin, I.H., Li, Z., Costa, J., Mafra, I., Chen, Y., and Wu, Y-N. 2019. Potential efficacy of processing technologies for mitigating crustacean allergenicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59: 2807-2830.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Li, Z.X., Lin, H., Cao, L.M., and Jameel, K. 2006. Effect of high intensity ultrasound on the allergenicity of shrimp. *Journal of Zhejiang University Science B*, 7: 251-256.

- Liang, L-L., Cao, M-J., Su, W-J., Zhang, L-J., Huang, Y-Y., and Liu, G-M. 2008. Identification and characterisation of the major allergen of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Food Chemistry*, 111: 998–1003.
- Lin, H., Li, Z., Lin, H., Song, Y., Lv, L., and Hao, Z. 2015. Effect of pH shifts on IgE-binding capacity and conformational structure of tropomyosin from short-neck clam (*Ruditapes philippinarum*). *Food Chemistry*, 188: 248-255.
- Marques, L.P., Bernardo, Y. A. A., and Conte-Junior, C. A. 2024. Applications of high-intensity ultrasound on shrimp: Potential, constraints, and prospects in the extraction and retrieval of bioactive compounds, safety, and quality. *Concise Reviews and Hypotheses in Food Science*, 89:3148-3166.
- Neha, O., Rangasamy, A., Sankar, T. V., Surasani, V. K. R., Gnanasekaran, L., Vinayagam, S., Sundaram, T., Mutum, R. D., Faraj, T.Kh., Alrefaei, A. F., Dara, P. K., Lackner, M. 2025. Tropomyosin allergen from freshwater and marine water crabs: Identification, structural-physicochemical rheological and allergenic characterization. *Applied Food Research*, 5:1 100894.
- Nielsen, P. M., Petersen, D., and Dambmann, C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Food Chemistry and Toxicology*, 66: 642-646.
- Sathe, K.S., Teuber, S.S. and Rouxc, H.K. 2005. Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnology Advances*, 23: 423–429.
- Shi Y, Liu F, Ge H, Chen ZW, Zheng WW. 2012. Study on secondary structural changes of protein in the formation of microcapsule by FTIR spectroscopy. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, 32(7):1815-9. Chinese. PMID: 23016331.
- Taheri-Kafrani, A., Gaudin, J.C., Rabesona, H., Nioi, C., and Agarwal, D. 2009. Effects of heating and glycation of β -lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cow milk allergy patients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 4974–4982.
- Teodorowicz, M., van Neerven, J., and Savelkoul, H. 2017. Food processing: The influence of the Maillard reaction on the immunogenicity and allergenicity of food proteins. *Nutrients*, 9: 835. doi:10.3390/nu9080835.
- Yuan, F.Z., Lv, L.T., Li, Z.X., Mi, N.S., Chen, H. R. and Lin, H. 2017. Effect of transglutaminase-catalyzed glycosylation on the allergenicity and conformational structure of shrimp (*Metapenaeus ensis*) tropomyosin. *Food Chemistry*, 219: 215–222.
- Zhang, Z., Zhang, X., Chen, W., and Zhou, P. 2018. Conformation stability, *in vitro* digestibility and allergenicity of tropomyosin from shrimp (*Exopalaemon modestus*) as affected by high intensity ultrasound. *Food Chemistry*, 245: 997-1009.

- Zhang, Z., Xiao, H., Zhang, X., and Zhou, P. 2019. Conformation allergenicity and human cell allergy sensitization of tropomyosin from *Exopalaemon modestus*: Effects of deglycosylation and Maillard reaction. *Food Chemistry*, 276: 520-527.
- Zhong, H., Tang, C., Li, J. and Cheng, J-H. 2025. Ultrasound-assisted cold plasma treatment reduces resistance to *in vitro* digestion of tropomyosin and allergenicity of tropomyosin digestion products. *Food Chemistry*, 473:143049.

