



## KAFEİN MOLEKÜLÜNÜN MÜSİN PROTEİNİ İLE OLAN ETKİLEŞİMİNİN FLORESAN SPEKTROSKOPİ TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI

**Hilal Yılmaz\* , Arslan Recep Şahin**

Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Bartın, Türkiye

Geliş / Received: 27.11.2022; Kabul / Accepted: 30.12.2022; Online baskı / Published online: 17.01.2023

Yılmaz, H., Şahin, A.R. (2023). Kafein molekülünün müsün proteini ile olan etkileşiminin floresan spektroskopisi ile araştırılması. *GIDA* (2023) 48 (1) 50-60 doi: 10.15237/gida.GD22120

Yılmaz, H., Şahin, A.R. (2023). Investigation of the interaction between caffeine molecule and musin protein by fluorescence spectroscopy technique. *GIDA* (2023) 48 (1) 50-60 doi: 10.15237/gida.GD22120

### ÖZ

Uyanık kalmaya ve yorgunluğun başlamasını önlemeye yardımcı olduğundan, kafein içeren gıdalar dünya çapında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sebeple hem gıda hem de farmasötik amaçlı kafein kullanımına yönelik araştırmalar son yıllarda artmıştır, fakat yaygın olarak oral yolla alınan kafeinin gastrointestinal sistem boyunca ona eşlik eden salyadaki müsün proteini ile olan etkileşimi hakkında bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmamızda kafein ve müsün molekülleri arasındaki etkileşim floresan spektroskopisi tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Deneysel sonuçlar kafein moleküllerinin müsün proteininin floroforları üzerine söndürme etkisi olduğunu göstermiştir. Bu etki hem ağız/bağırsak ortamına yakın pH 7 hem de mide ortamına yakın pH 3 değerlerinde, her kafein molekülü bir protein molekülü ile etkileşime girmesi ve bu etkileşimin statik floresan söndürme mekanizmasının çalışmasına sebep olmasıyla gerçekleşmektedir. Kafein ve müsün etkileşiminin kafein konsantrasyonu arttıkça, özellikle de mide ortamında, hızla arttığını gösteren bu çalışmamız, kafeinin sindirim ve biyoyararlılık çalışmalarına temel oluşturabilecektir.

**Anahtar kelimeler:** kafein, müsün, floresan söndürme, pH, Stern-Volmer

## INVESTIGATION OF THE INTERACTION BETWEEN CAFFEINE MOLECULE AND MUSIN PROTEIN BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY TECHNIQUE

### ABSTRACT

Caffeine-containing foods are frequently used around the world, as it helps to stay awake and prevent the onset of fatigue. Therefore, research on the use of caffeine as a food or pharmaceutical purposes has increased in recent years. However, there is no research for the interaction of caffeine with the mucin protein in saliva that accompanies the orally ingested molecules throughout the gastrointestinal tract. In this study, the interaction between caffeine and mucin was investigated using fluorescence spectroscopy technique. Experimental results showed that caffeine molecules have a quenching effect on the fluorophores of mucin protein. This effect occurs when each caffeine molecule interacts with one protein molecule via the static fluorescence quenching mechanism. Moreover, the interaction of caffeine and mucin was enhanced as the caffeine concentration increases, especially in the stomach environment. After all, this study may provide a good basis for the digestion and bioavailability studies of caffeine.

**Keywords:** caffeine, mucin, fluorescence quenching, pH, Stern-Volmer

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: hiclebioglu@bartin.edu.tr

☎: (+90) 544 849 0058

Hilal YILMAZ; ORCID no: 0000-0002-0399-355X

Arslan Recep ŞAHİN; ORCID no: 0000-0001-5593-6795

## GİRİŞ

Dünyada tüketimi yaygın olan bazı içeceklerin içerisinde kafein bulunmaktadır. Yetişkin nüfusun yaklaşık %80'i her gün kahve veya çay içmektedir. Kahve ve çayda ortalama 2-3 mM kafein bulunmaktadır (Lisko vd., 2017). Doğal uyarıcı bir madde olan kafein az miktarda kakao içinde de bulunmakta ve yoğun karakteristik acımsı tadı sebebiyle kola gibi bazı asitli içeceklere de eklenmektedir.

Bir alkaloid türü olan kafein molekülünün, beyni ve merkezi sinir sistemini uyararak çalıştığı, böylece uyanık kalmaya ve yorgunluğun başlamasını önlemeye yardımcı olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, kafein molekülünün hem gıdalarda hem de ilaç türü ürünlerde katkı maddesi olarak kullanılması gün geçtikçe artmaktadır. Örnek olarak kafein, soğuk algınlığı ilaçları, analjezikler, anorektanlar ve amfetamin benzeri olarak bilinen uyarıcı veya uyarıcı karışımların bileşenlerinde de tüketilir (Grosso vd., 2017).

Kafeinin ayrıca farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri olduğu belirtilmektedir (Alsabri vd., 2018). Kafeinin bağırsak mikrobiotasını değiştirebildiğinden dolayı anti-enflamatuvar etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Hücresel, hayvan ve insan çalışmalarından elde edilen kanıtlara göre kafein bağırsak mikrobiyotasının yapısında ve fonksiyonunda değişiklikler meydana getirir. Bu değişiklikler majör filumlar (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Firmicutes*) arasındaki oran değişiklikleridir (Pan vd., 2016). Bağırsak mikrobiotasındaki bu değişiklikler polifenol biyotransformasyonunda önemli role sahiptir ve obezite karşıtı etki yaptığı belirtilmiştir. Bu sebeple, kafeinin bağırsak ve bağırsak mikrobiotasında olumlu yönde etkileri olduğu söylenmektedir (Moco vd., 2012). Diğer yandan, kafein fazla tüketildiğinde mide kanserine sebep olabileceği yönünde bulgular vardır (Grosso vd., 2017). Bunun da sebeplerinden birisi olarak kafeinin, insan mide müsin salgılayan hücrelerinde müsin salgılanmasını inhibe etmesi olduğu düşünülmektedir. Mukus sekresyonunun azalması, kafein nedeniyle gastrik mukozal hasarın

önemli faktörlerinden biri olabilir (Hamada vd., 1997).

Genel olarak baktığımızda kafein ister gıdalarla ister farmakolojik ürünlerle alınsın, bulgular oral yolun kafeinin en yaygın uygulama yolu olduğunu göstermektedir ve kafeinin tam emilimi ince bağırsakta gerçekleşir. Kafein oral yolla alınıp bağırsakta emilene kadar salya ona eşlik etmektedir. Salyanın büyük kısmını müsin isimli proteinler oluşturmaktadır. Müsin, salya ve midesel sıvıların temel proteindir (Bansil ve Turner, 2006). Müsin, yüksek derecede glikozilasyona sahip, yüksek moleküler ağırlıklı (0,5-40 MDa), ampifilik karakterli ve pH 2-3 aralığında seyreden düşük izoelektrik noktasına sahip olan bir proteindir (Svensson ve Arnebrant, 2010). Farklı organlardaki müsin proteinleri, kompozisyon, yapı ve biyofiziksel açılardan önemli farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıkların hem hidrofobik uç bölgelerinden hem de farklı tip, miktar ve pozisyonda negatif yük içeren merkez bölgesinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Bansil ve Turner, 2006; Madsen vd., 2016).

Kafeinin oral proresteki tat salınımı, midede gastrik asit sekresyonunu uarması (Hamada vd., 1997), emilimi ve bağırsak mikrobiyotasını etkilemesi (Moco vd., 2012) gibi durumlar, tüm bu süreçte ona eşlik eden müsin proteini ile olan etkileşimi sonucu olabileceği hipotezini kurmamızı sağlamıştır. Yaptığımız araştırmalarda müsin proteini ile kafein molekülünün etkileşimini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu etkileşimin moleküler düzeyde aydınlatılması kafeinin ağız, mide ve bağırsaktaki etkilerine ışık tutabilir. Protein-ligand etkileşimleri, küçük ilaç moleküllerinin canlı sistemlerde taşınması ve dağılımında önemlidir (Islam vd., 2016).

Bu çalışmamızda, kafein ve müsin arasındaki etkileşimi anlamada floresans spektroskopisi tekniği uygulanmıştır. Floresans spektroskopisi intirinsik floroforların varlığına dayalı bir tekniktir. Proteinlerin içerisindeki triptofan, tirozin ve fenilalanin amino asitleri floresans emisyonu verir ve bu emisyon spektrumlarının hem yoğunluğundaki hem de maksimum tepe

noktasındaki değişimler, bu amino asitlerin ve dolayısıyla proteinin konformasyonel değişimleri veya bulunduğu ortamdaki farklılaşmaları hakkında bilgiler sağlar (Lakowicz, 2006). Bu sebeple müsin proteinindeki kafein varlığında oluşan muhtemel değişimleri ve bu iki molekül arasındaki etkileşimi göstermede floresans spektroskopisi tekniği optimum tekniklerden biridir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Örnek hazırlama

Araştırmada kullanılacak çözeltiler; domuz (porcine) gastrik müsin (PGM) (Tip III) ve kafein yüksek saflıkta (> %98.5) Sigma-Aldrich'den (St. Louis, Missouri, USA) satın alınmıştır ve ekstra bir purifikasyon yapılmadan kullanılmıştır. Protein ve kafein çözeltilerinin gerekli konsantrasyonları 10 mM fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile hazırlanmıştır.

### Floresan spektroskopisi ölçümleri

Tüm intrinsik floresans ölçümlerinde FS5 Spectrofluorometer (Edinburgh Instruments, Livingston, UK) kullanılmıştır (150 W Xenon lambası ve PMT (single photon counting photomultiplier) dedektörü). Ekzitasyon dalga boyu ( $\lambda_{ex}$ ) 280 nm ve emisyon dalga boyu 290-420 nm aralığında ayarlanarak her 2 nm'de ölçüm alınmıştır. Ölçümler oda sıcaklığında 10 mm quartz küvet kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kafein moleküllerinin müsin proteininin floroforları üzerine söndürme etkisini gözlemleyebilmek için kafein çözeltilerinden 0 – 10  $\mu$ M arasında bir seyreltme serisi hazırlanmıştır. Her ölçüm işleminde seçili konsantrasyondan 1 mL kafein çözeltisi ile 1 mL'lik 1 mg/mL konsantrasyonundaki müsin çözeltisine eklenmiştir. Protein çözeltisine (müsin) sabit hacimdeki sönmüleyici (kafein) eklenmesi seyreltme etkisi sonucu oluşan komplikasyonlardan kaçınmamızı sağlamaktadır. Ölçümlerin alınacağı emisyon dalga boyu aralığında kafein molekülleri, protein floresans emisyonu etkileyecek bir enerji absorpsiyonuna sahip değildir fakat kafein moleküllerinin olası ufak absorpsiyon etkilerini de ortadan kaldırmak için her kafein konsantrasyonu için bir blank (kör)

hazırlanmış (yani kafein çözeltilerinin tek başına floresans emisyon şiddetleri ölçülür) ve bu blank (kör) ilgili karışımın emisyon spektrumundan çıkarılarak müsin proteininin floresans şiddetindeki değişim net olarak gözlemlenmiştir (Papadopoulou vd., 2005; Brandão vd., 2017).

Ölçümler sonunda Stern-Volmer grafiği çizilip söndürme katsayısı hesaplanmıştır. Söndürme katsayısı değerine göre söndürmenin dinamik veya statik olduğu saptanabilmektedir. Floresans söndürme analizi aşağıda verilen Stern-Volmer formülüne göre yapılmıştır (Lakowicz, 2006):

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [Q] = 1 + K_q \tau_0 [Q]$$

$F_0$ : müsin olmadığı durumdaki floresans şiddeti

$F$ : müsin varlığında elde edilen floresans şiddeti

$K_{sv}$ : Stern-Volmer söndürme sabiti

$K_q$ : Bimoleküler söndürme sabiti

$[Q]$ : müsin konsantrasyonu

Stern-Volmer grafiği  $F_0/F$  değerine karşılık  $[Q]$  değeri olarak çizildiğinde elde edilen regresyon eğrisinin eğimi  $K_{sv}$  değerini verir.  $K_{sv}$  değeri söndürme verimini ve/veya sönmüleyici molekülün florofora erişilebilirliğini yansıtır. Böylelikle kafein ve müsinler arası etkileşim gücünün bir göstergesi olmaktadır (Mensi vd., 2013).  $K_q$ , bimoleküler söndürme sabitidir ve  $K_{sv}/\tau_0$ 'a eşittir ( $M^{-1} s^{-1}$ ). Bununla birlikte  $\tau_0$  söndürücünün yokluğunda floroforun ömrüdür ( $10^{-8}$  s).

Floresan söndürme hem statik hem de dinamik söndürmeyi içerir ve maksimum dinamik sabit, sulu bir çözeltide  $2.0 \times 10^{10} M^{-1} S^{-1}$ 'dir (Lakowicz, 2006).  $K_q$ 'nin maksimum dinamik sabitten büyük olduğu durumda, statik söndürme baskındır. Statik söndürme sabitleri aşağıdaki çift-logaritmik denkleme göre hesaplanabilmektedir.

$$\log \left[ \frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K_A + n \log [Q]$$

Bu denklemde  $K_A$ , grafiğin ordinat ile kesişimidir ve bağlanma sabitini verir. Grafiğin eğiminden ise  $n$  değeri hesaplanır ve bağlama noktalarının sayısını verir.

Floresans emisyon şiddetindeki azalma iki molekül arasındaki bağlanma derecesi hakkında bilgi verirken,  $\lambda_{em}$  değerindeki kaymalar ise Trp

çevresindeki değişimleri dolayısıyla protein konformasyonundaki değişimleri göstermektedir.

### İstatistiksel analiz

Tüm deneyler üç kez tekrarlanarak, veriler “ortalama  $\pm$  standart sapma” olarak temsil edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için veriler, varyans analizi (ANOVA) için SPSS yazılımı (Windows için sürüm 16.0, SPSS Inc.) kullanılarak istatistiksel analize tabi tutulmuştur.

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### Floresan söndürme çalışmaları

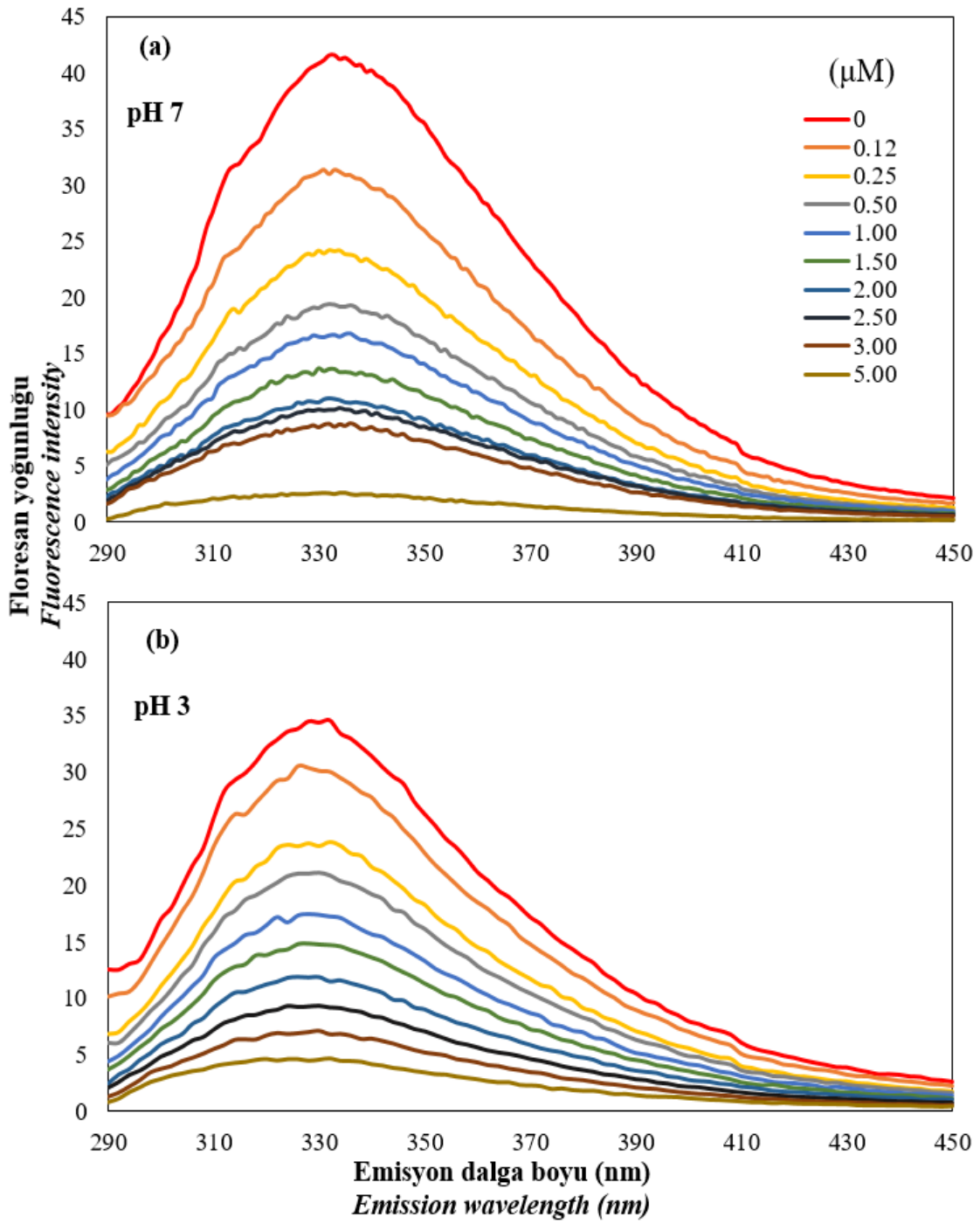
Kafein moleküllerinin müsin protein ile etkileşimini ve kafeinin müsin moleküllerinin floresan şiddeti üzerine söndürme etkisini gözlemek için artan konsantrasyonlarda kafein çözeltisinin müsin protein çözeltisine eklenmesiyle floresan emisyon spektrumları elde edilmiştir. Şekil 1’de gösterildiği üzere hem pH 7 hem de pH 3 ortamında artan kafein konsantrasyonu, müsin proteininin floresan yoğunluğunda kademeli düşüşe neden olmuştur. Diğer bir deyişle, kafein molekülleri müsin molekülleri üzerinde floresan söndürücü olarak etki etmiştir. Floresan söndürme, söndürücü moleküller ile çeşitli moleküler etkileşimler sebebiyle bir floroforun floresan kuantum veriminin azalmasıdır (Papadopoulou vd., 2005). Floresan söndürme için florofor ile söndürücü arasında moleküler temas gereklidir. Moleküler etkileşim veya çözücü bileşimindeki değişiklik nedeniyle, floroforun uyarılma ve emisyon davranışı değiştirilebilir. Örneğin, Tyr solvent polaritesine karşı nispeten duyarlıdır, Trp ise polariteye ve/veya yerel ortama büyük ölçüde bağımlıdır (Lakowicz, 2006). Bunun nedeni, yakın iki izoenerjik geçişe sahip Trp'nin benzersiz şekilde karmaşık floroforudur; bununla birlikte, Tyr emisyonunun tek bir elektronik durumdan meydana geldiği görülmektedir.

Şekil 1’de müsin proteininin kendisinin (kafein varlığından bağımsız olarak) bir adet geniş floresan emisyon piki verdiği görülmektedir. Bu tip pikler, proteinin floresan emisyon yoğunluğuna Trp’a ek olarak Tyr rezidülerinin de katkıda bulunduğunu göstermektedir. Proteinlerin floresan emisyonuna, en uzun dalga

boyunda absorblayan Trp hakimdir. Trp varlığında proteinde fenilalanin (Phen) ve Tyr amino asitleri bulunmasına rağmen absorbladıkları enerji esas olarak Trp'a aktarılır. Protein floresansı genellikle 280 nm'de uyarılır, ancak Phen, maksimum 282 nm'ye yakın yapılandırılmış bir emisyon sergiler. Bu nedenle çok küçük bir kuantum verimine sahip olan Phen, bu çalışmada olduğu gibi uyarılmamıştır. Tyr ve Trp'ın sudaki maksimum emisyonları sırasıyla 303 nm ve 350 nm'de gerçekleşir (Lakowicz, 2006). Böylece, Şekil 1’de gözlemlenen emisyon tepe noktaları, 280 nm'de hem Tyr hem de Trp'ın absorpsiyonundan kaynaklanmaktadır. Öte yandan, Tyr'den Trp'a rezonans enerji transferleri art arda gerçekleşir, bu nedenle Tyr'in çoğu proteinin emisyonuna yalnızca küçük bir katkısı gözlemlenebilir, geri kalan enerji bu çalışmada da olduğu gibi Trp rezidülerinin geniş bir pik vermesine sebep olur.

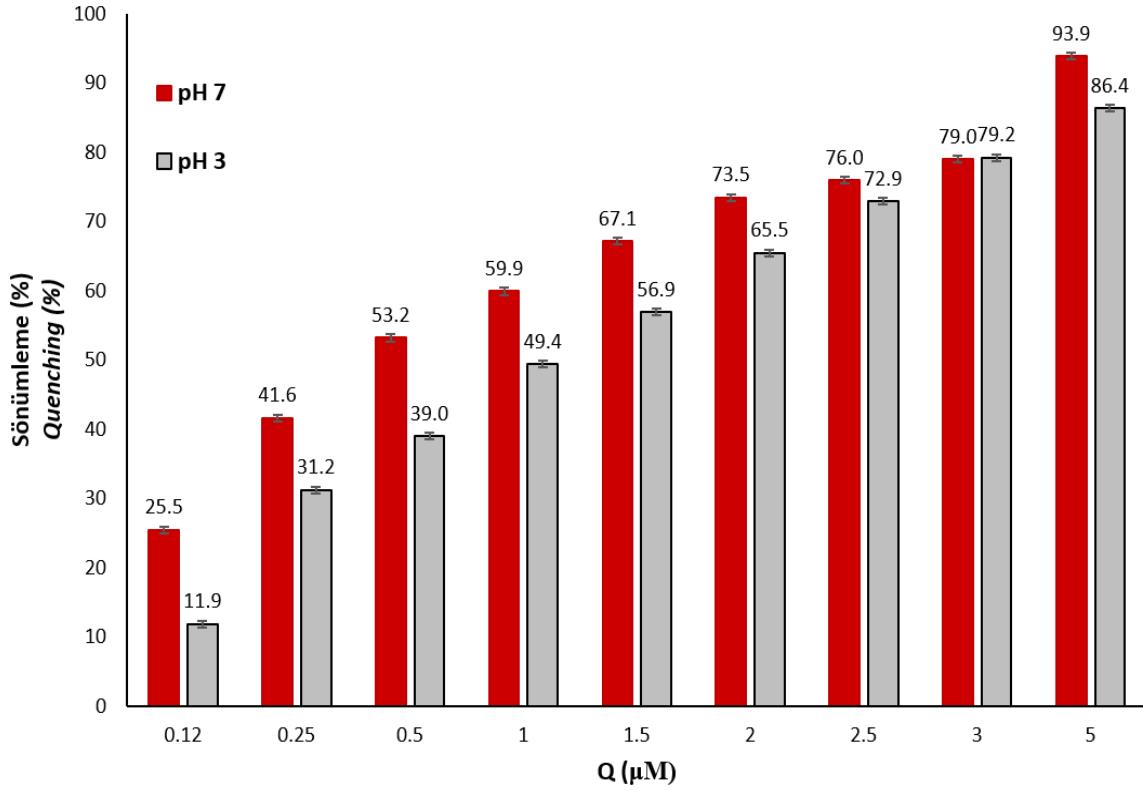
Kafein konsantrasyonunun müsin proteinlerinin floresan yoğunluğu üzerine etkisini daha net görebilmek için her bir konsantrasyonun söndürme yüzdesi hesaplanarak Şekil 2’de gösterilmiştir. Ortam pH'ı 7 olduğunda 0.12  $\mu$ M kafein konsantrasyonunda % 25.5 $\pm$ 0.5 oranında bir söndürme olurken, kafein miktarı 5  $\mu$ M olduğunda söndürme oranı % 93.9 $\pm$ 0.3'e çıkmaktadır. Söndürme yüzdeleri pH 3 ortamında genel olarak pH 7'ye göre daha düşük olmakla beraber, benzer şekilde 0.12  $\mu$ M'dan 0.12  $\mu$ M'a artan kafein konsantrasyonu daha fazla söndürmeye sebep olmuştur (sırasıyla % 11.9 $\pm$ 0.5 ve % 86.4 $\pm$ 0.4).

Müsin proteininin kafein içermediği durumdaki floresan yoğunlukları karşılaştırıldıklarında pH 7’de pH 3’e göre daha yüksek değere sahip olduğu görülmektedir. Bununla birlikte pH 7’de kafeinin daha fazla söndürme etkisi olmuştur. Bu durum şaşırtıcı değildir, çünkü müsinin izoelektrik noktasının 2 ile 3 arasında yer aldığı bilinmektedir (Bansil ve Turner, 2006) ve dolayısıyla pH 3’de net yükü neredeyse sıfırdır. Bu veriler, müsin protein yapısında pH'ın önemine ve sonuç olarak, müsinin kafein ile etkileşime girme yeteneğine floresan rezidülerinin yan zincirlerindeki yük miktarlarının katkısına işaret etmektedir.



Şekil 1. Artan kafein konsantrasyonu ve farklı pH ortamlarında mûsin proteininin floresan emisyon spektrumları ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 280 nm)

Figure 1. Fluorescence emission spectra of mucin protein at different caffeine concentration and Ph



Şekil 2. Artan kafein konsantrasyonu ve farklı pH ortamlarında müsin proteininin floresan yoğunluğundaki sönümlenme yüzdeleri

Figure 2. Fluorescence quenching percentage of mucin protein at different caffeine concentration and pH

Floresan yoğunluğunun yanı sıra maksimum emisyon dalga boyu ( $\lambda_{max}$ ) değerindeki değişimler de çözücü ortamının ve moleküler etkileşimin etkileri hakkında önemli ipuçları verebilmektedir. Farklı pH değerlerindeki tampon çözeltilerinde müsin için gözlenen tüm  $\lambda_{max}$  değerleri, tek başına Trp indol grubu için  $\lambda_{max}$  değerinden biraz daha kısadır ( $\lambda_{em} = 340$  nm) (Lakowicz, 2006). Bu durum müsinin ana floresan rezidülerinin proteinin çözücü ile temas halindeki yüzey bölgesinde değil de, sulu çözücünden daha etkili bir şekilde korunduğu hidrofobik bölgelerde bulunduğunu gösterir. Fakat müsin proteininin maksimum floresan yoğunluğu verdiği dalga boyu pH 7'de 332 nm iken pH 3'te 328 nm olmuştur (Şekil 1 ve Çizelge 1). Yani ortam pH 7'den pH 3'e değiştirildiğinde 4 nm'lik daha düşük dalga boyuna kayma (maviye kayma) gözlemlenmiştir. Emisyonun daha uzun dalga boyuna kayması (kırmızıya kayma – red shift), genellikle proteinler

açıldığında meydana gelir ve bu, proteinlerin kompakt yapısında önemli bir kayıp olduğunu düşündürür. Diğer yandan floroforlar doğal proteinin içine gömülü haldeyse daha kısa dalga boyunda emisyon verir (maviye kayma- blue shift) (Lakowicz, 2006). Gastrik müsinin, pH  $\geq 4$ 'te rastgele halka konformasyonundan, müsin moleküllerinin pH  $< 4$ 'te bir araya toplandığı anizotropik ve daha kompakt bir konformasyona doğru bir konformasyonel değişime uğradığı bilinmektedir (Çelebioğlu vd., 2015). pH 3'te müsin molekülleri protonlanır ve negatif yük değeri düşer (Çelebioğlu vd., 2020). Bu, daha önce yaptığımız zeta potansiyel çalışmaları sonucunda gösterilmiştir (Yılmaz vd., 2021). Bu çalışma sonuçları da daha düşük  $\lambda_{max}$  vererek pH 3 değerinde müsin molekülünde katlanmalar meydana geldiğini kanıtlamıştır.

Çizelge 1. Kafein müsin etkileşiminin pH 7 ve pH 3 ortamlarında Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ), bimoleküler söndürme ( $K_q$ ) ve bağlanma sabitleri ( $K_A$  ve  $n$ ) ile maksimum floresan dalga boyu ( $\lambda_{max}$ ) ve ulaşılabilir florofor değerleri ( $f_a$ )

Table 1. Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ), bimolecular quenching ( $K_q$ ), and binding constants ( $K_A$  ve  $n$ ) of the caffeine-mucin interaction in addition to the maximum fluorescence wavelength ( $\lambda_{max}$ ) and accessible fluorophore ( $f_a$ )

| pH | Stern-Volmer sabitleri<br>Stern-Volmer constants |                                      |                | Çift-logaritmik regresyon değerleri<br>Double-logarithmic regression values |      |                | $f_a$ | $\lambda_{max}$<br>(nm) |
|----|--|--------------------------------------|----------------|---|------|----------------|-------|-------------------------|
|    | $K_{sv}$ ( $10^{14}$ L mol <sup>-1</sup> )       | $K_q$ ( $10^6$ L mol <sup>-1</sup> ) | R <sup>2</sup> | $K_A$ ( $10^5$ L mol <sup>-1</sup> )  | $n$  | R <sup>2</sup> |       |                         |
| 7  | 1.18   | 1.18                                 | 0.985          | 1.67  | 0.70 | 0.988          | 0.84  | 332                     |
| 3  | 1.13   | 1.13                                 | 0.960          | 1.10  | 0.94 | 0.980          | 1.03  | 328                     |

### Stern-Volmer ve bağlanma katsayıları

Kafein konsantrasyonunu artırarak müsin floresan söndürmeyi açıklamak için Şekil 3'te sunulan Stern-Volmer grafikleri, deneysel olarak ölçülen F ve  $F_0$  değerleri kullanılarak elde edilmiştir. Her iki pH değerinde de lineer Stern-Volmer eğrileri bulunmuştur. Bu genellikle, proteinin tüm ana floresan rezidülerinin çözücü tarafından eşit olarak erişilebilir olduğu anlamına gelir. İki florofor popülasyonu mevcutsa ve bir sınıf söndürücü tarafından erişilebilir değilse, Stern-Volmer çizimleri doğrusallıktan x eksenine doğru sapar (Giraddi vd., 1996). Müsin proteininin floresan rezidülerinin eşit olarak erişilebilir olup olmadığından emin olmak için ulaşılabilir floresan kesri ( $f_a$ ) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_A [Q]} + \frac{1}{f_a}$$

$1/[Q]$  değerine karşılık  $F_0/\Delta F$  grafiği lineer olarak bulunmuş ve bu lineer eğrinin eğimi  $1/(f_a K_A)$  değerini ve ordinat ile kesişimi ise  $1/f_a$  değerini vermiştir. Hesaplanan ve Çizelge 1'de verilen  $f_a$  değerleri her iki pH ortamında da yaklaşık 1'dir. Bu da tüm floresanın söndürülebilir Trp'den kaynaklandığı anlamına gelmektedir. Dolayısıyla bu veriler, Stern-Volmer eğrilerinden elde edilen, tüm ana floresan rezidülerinin söndürülebilir olduğu ve protein içinde gömülü veya söndürücü tarafından kullanılmayan kısımların olmadığı verilerini desteklemektedir.

Stern-Volmer grafiklerinin doğrusallığı aynı zamanda sadece bir tip söndürme mekanizması olduğunu ve bunun dinamik veya statik olabileceğini işaret etmektedir. Müsin-kafein

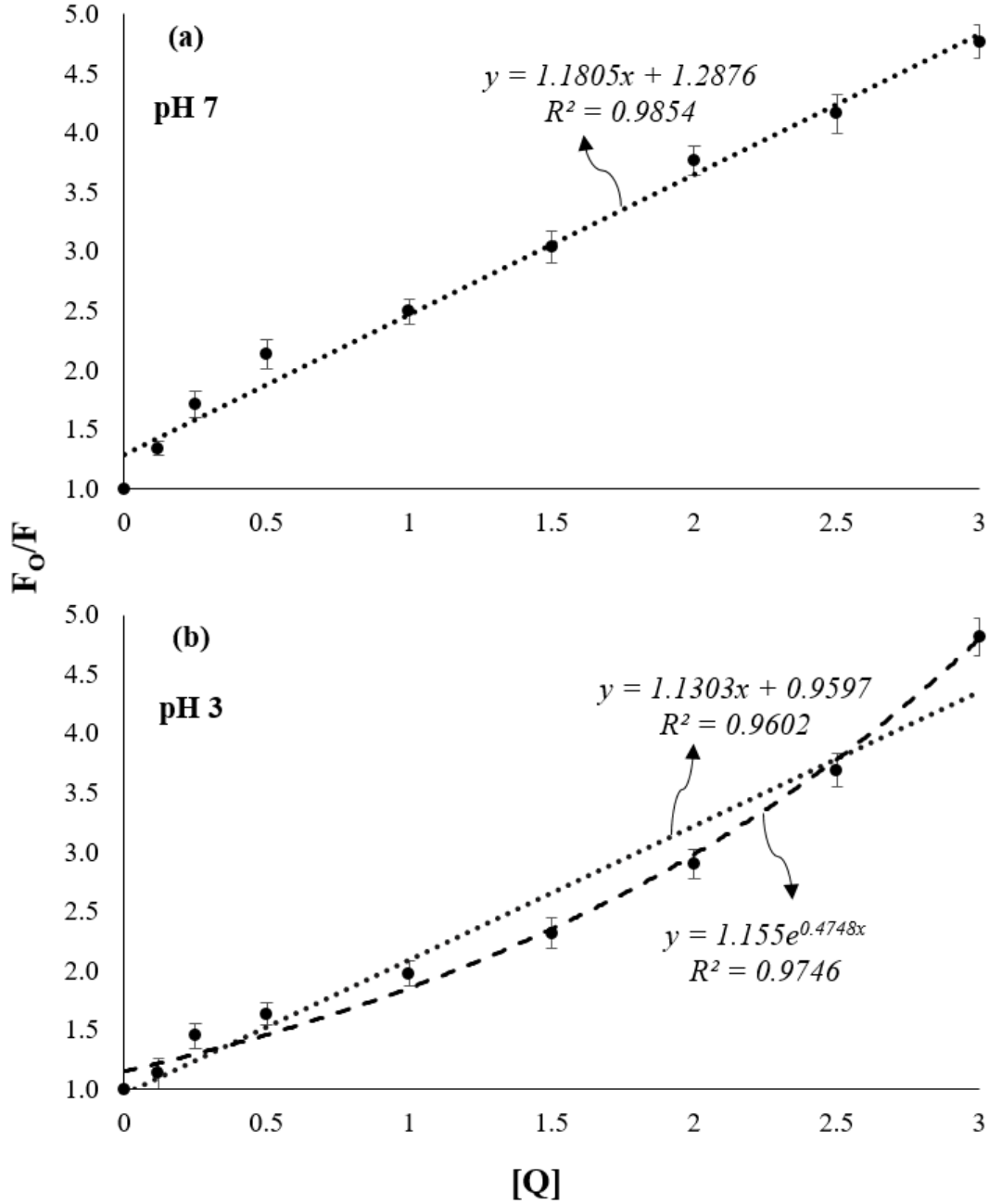
sistemi için Stern-Volmer söndürme sabiti olan  $K_{SV}$  değerleri  $[Q]$ 'ya karşılık  $F_0/F$  grafiğinin eğiminden hesaplanmaktadır (Şekil 3) ve söndürme verimliliğini ve söndürücü kafeinin müsin floroforuna erişilebilirliğini yansıtır (Papadopoulou vd., 2005). Bimoleküler söndürme sabiti  $k_q$  ise  $K_{sv}/\tau_0$  oranından hesaplanmaktadır. Hesaplanan  $K_{SV}$  ve  $k_q$  değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. Her iki pH için de  $k_q$  sabitleri maksimum dinamik söndürme sabiti olan  $2.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  değerinden büyük olduğu için müsin-kafein sisteminde statik söndürme baskındır.

Şekil 3b'de gösterilen diğer bir durum ise pH 3 ortamında artan kafein konsantrasyonunda Stern-Volmer eğrisi doğrusallıktan kayabilmekte ve y eksenine doğru yukarı doğru eğrilik gösterebilmektedir. Stern-Volmer denkleminin (yukarı doğru eğimli grafikler) pozitif sapmalar genellikle söndürme miktarı büyük olduğunda tespit edilir (Brandão vd., 2017). Stern-Volmer grafiğinden bu tür bir sapma, statik söndürme işlemine atfedilir ve genellikle "eylem alanı" modeliyle açıklanır (Giraddi vd., 1996; Lakowicz, 1999). Bu modele göre yine statik söndürme gerçekleşir ve florofor tam uyarılma anında söndürücü molekül ile bitişik halde bulunur. Müsin-kafein sisteminde de, kafein molekülleri tam uyarılma anında müsin molekülleriyle etkileşim sonucu floresan-olmayan-kompleks oluşturarak statik söndürmeye sebep olduğu düşünülmektedir. Bu durum pH 3'de ve artan kafein konsantrasyonlarında daha etkilidir.

Müsin ve kafein moleküllerinin etkileşiminde rol alan bağlanma bölgelerinin sayısı ( $n$ ) çift-logaritmik regresyon eğrisinden hesaplanmıştır

(Şekil 4). Her iki pH noktasında da  $n$  değerleri 1'e yakındır. Bu da demek oluyor ki bir kafein molekülü, bir müsin molekülü ile moleküller arası çapraz bağlanma yoluyla bağımsız olarak

etkileşime girebilmektedir. Yine çift-logaritmik regresyon eğrisinden hesaplanan bağlanma sabitleri ( $K_A$ ) ise pH 3'te 1.10 iken pH 7'de 1.67'dir.

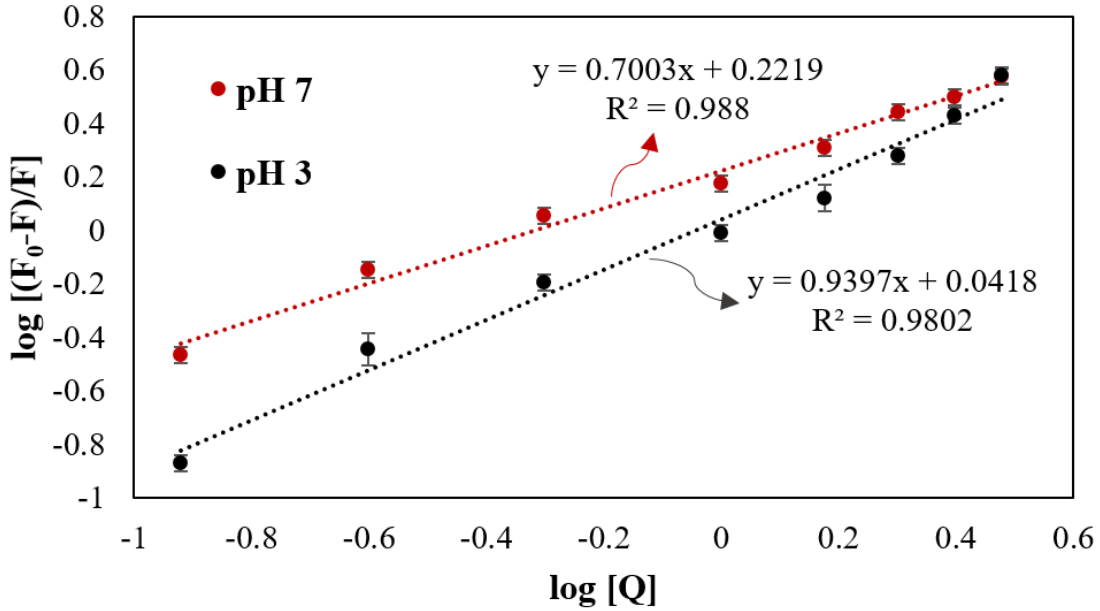


Şekil 3. Kafein ve müsin etkileşiminin pH 7 (a) ve pH 3 (b) ortamlarındaki Stern-Volmer eğrileri  
Figure 3. Stern-Volmer plots for the caffeine-mucin interaction at pH 7 (a) and pH 3 (b)



Bağlanma sabitinin pH 7 noktasında biraz daha büyük olması aynı kafein konsantrasyonlarında olmasına rağmen pH 7 ortamında kafein moleküllerinin müsin proteini ile etkileşime girme

eğiliminin daha yüksek ve güçlü olduğunu ima etmektedir. Kafein varlığında müsin floresan yoğunluğundaki düşüşün pH 7'de daha fazla oluşu da bu sonuçları desteklemektedir (Şekil 2).



Şekil 4. Kafein ve müsin etkileşiminin pH 7 ve pH 3 ortamlarındaki Çift Logaritmik Regresyon eğrileri  
Figure 4. Double-logarithmic regression plots for the caffeine-mucin interaction at pH 7 and pH 3

Kafein moleküllerinin proteinlerle bağ yapabildiği ve bunun sonucu proteinlerin floresanlarını statik söndürme mekanizması ile söndürdüğü literatürde bulunan bazı çalışmalarda da gösterilmiştir. Kafein moleküllerinin bovin serum albümin proteini ile sadece tek bir bağlanma bölgesinden ( $n=1$ ), bovin hemoglobun ile ise 5 bölgeden ( $n=5$ ), etkileşime girerek statik floresan söndürmeye sebep olduğu gözlemlenmiştir (Bian vd., 2006; Wang vd., 2009). Bovin serum albümin tek zincirli bir proteinken, bovin hemoglobun ise tetramerdir. Bu durum protein yapısının kafein molekülleri ile bağlanma derecesini etkilediğini göstermektedir. Müsin proteini ve kafein arasındaki etkileşimi inceleyen bu çalışmada da pH'a bağlı protein yapısındaki değişimlerin benzer şekilde kafein molekülleri ile olan etkileşimini etkilediği gözlemlendi.

Sonuç olarak hem pH 7 hem pH 3 ortamında her kafein molekülü bir protein molekülü ile

etkileşime girmektedir ve bu etkileşim statik floresan söndürme mekanizmasının çalışmasına sebep olmaktadır. Özellikle düşük kafein konsantrasyonlarında kafeinin müsin ile etkileşimi pH 7'de daha fazla ve etkileşim sonucu oluşan bağlar nispeten daha güçlüdür. Fakat pH 3 ortamında kafein konsantrasyonu 2  $\mu$ M üzerine çıktığında kafein molekülleri, zaten katlanmış yapıda bulunan müsin proteinlerinin etrafında bulunarak tam uyarılma anında söndürülmesine sebep olmaktadır. Biyolojik ortamlarda moleküler etkileşimleri etkileyecek birden fazla parametre olmasına karşın bu çalışmanın sonuçları, kafein moleküllerinin gastrointestinal sistemde en yoğun bulunan müsin proteini ile hem ağız/bağırsak ortamı olan pH 7 hem de mide ortamına yakın değer olan pH 3'te etkileşime girebildiğini ve bu etkileşimin kafein konsantrasyonu arttıkça, özellikle de mide ortamında, hızla arttığını göstererek kafeinin sindirim ve biyoyararlılık çalışmalarına temel oluşturabilecektir.

**ÇIKAR ÇATIŞMASI**

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir. Finansörlerin çalışmanın tasarımında, verilerin toplanmasında, analiz edilmesinde, yazımında veya sonuçların yayınlanması kararında hiçbir rolü olmamıştır.

**YAZARLARIN KATKISI**

Tasarım, Hilal Yılmaz; metodoloji, Hilal Yılmaz deneyler, Hilal Yılmaz ve Arslan Recep Şahin; sonuçlar rapor hazırlama, Hilal Yılmaz ve Arslan Recep Şahin; yazma, Hilal Yılmaz; gözetim, Hilal Yılmaz; fon edinimi, Hilal Yılmaz ve Arslan Recep Şahin. Tüm yazarlar makaleyi okumuştur ve yayınlanan versiyonunu kabul etmiştir.

**TEŞEKKÜR**

Bu araştırmayı finanse ettiklerinden dolayı TÜBİTAK 2209/A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destek Programı'na teşekkür ederiz.

**KAYNAKLAR**

Alsabri, S. G., Mari, W. O., Younes, S., Elsadawi, M. A., Oroszi, T. L. (2018). Kinetic and dynamic description of caffeine. *Journal of Caffeine and Adenosine Research*, 8(1), 3-9.

Bansil, R., Turner, B. S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current opinion in colloid & interface science*, 11(2-3), 164-170.

Bian, W., Wei, Y. L., Wang, Y. P., Dong, C. (2006). Study on interaction of caffeine and theophylline with bovine serum albumins. *Guang pu xue yu Guang pu fen xi= Guang pu*, 26(3), 505-508.

Brandão, E., Silva, M. S., García-Estévez, I., Mateus, N., de Freitas, V., Soares, S. (2017). Molecular study of mucin-procyanidin interaction by fluorescence quenching and Saturation Transfer Difference (STD)-NMR. *Food chemistry*, 228, 427-434.

Çelebioğlu, H. Y., Gudjónsdóttir, M., Meier, S., Duus, J. Ø., Lee, S., Chronakis, I. S. (2015). Spectroscopic studies of the interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and bovine submaxillary mucin. *Food Hydrocolloids*, 50, 203-210.

Çelebioğlu, H. Y., Lee, S., Chronakis, I. S. (2020). Interactions of salivary mucins and saliva with food proteins: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(1), 64-83.

Giraddi, T. P., Kadadevarmath, J. S., Malimath, G. H., Chikkur, G. C. (1996). Effect of solvent on the fluorescence quenching of organic liquid scintillators by aniline and carbon tetrachloride. *Applied radiation and isotopes*, 47(4), 461-466.

Grosso, G., Godos, J., Galvano, F., Giovannucci, E. L. (2017). Coffee, caffeine, and health outcomes: An umbrella. *Annual Review of Nutrition*, 37, 131-156.

Hamada, E., Nakajima, T., Hata, Y., Hazama, H., Iwasawa, K., Takahashi, M., ... Omata, M. (1997). Effect of caffeine on mucus secretion and agonist-dependent Ca<sup>2+</sup> mobilization in human gastric mucus secreting cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1356(2), 198-206.

Islam, M. M., Sonu, V. K., Gashnga, P. M., Moyon, N. S., Mitra, S. (2016). Caffeine and sulfadiazine interact differently with human serum albumin: A combined fluorescence and molecular docking study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 152, 23-33.

Lakowicz, J. R. (1999). Instrumentation for fluorescence spectroscopy. In *Principles of fluorescence spectroscopy* (pp. 25-61). Springer, Boston, MA.

Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd ed.; Springer: Baltimore, Maryland; ISBN 978-0-387-46312-4.

Lisko, J. G., Lee, G. E., Kimbrell, J. B., Rybak, M. E., Valentin-Blasini, L., Watson, C. H. (2017). Caffeine concentrations in coffee, tea, chocolate, and energy drink flavored e-liquids. *Nicotine & Tobacco Research*, 19(4), 484-492.

Madsen, J. B., Sotres, J., Pakkanen, K. I., Efler, P., Svensson, B., Abou Hachem, M., ... Lee, S. (2016). Structural and mechanical properties of thin films of bovine submaxillary mucin versus porcine

- gastric mucin on a hydrophobic surface in aqueous solutions. *Langmuir*, 32(38), 9687-9696.
- Mensi, A., Choiset, Y., Rabesona, H., Haertlé, T., Borel, P., Chobert, J. M. (2013). Interactions of  $\beta$ -lactoglobulin variants A and B with vitamin A. Competitive binding of retinoids and carotenoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(17), 4114-4119.
- Moco, S., Martin, F. P. J., Rezzi, S. (2012). Metabolomics view on gut microbiome modulation by polyphenol-rich foods. *Journal of proteome research*, 11(10), 4781-4790.
- Pan, M. H., Tung, Y. C., Yang, G., Li, S., Ho, C. T. (2016). Molecular mechanisms of the anti-obesity effect of bioactive compounds in tea and coffee. *Food & function*, 7(11), 4481-4491.
- Papadopoulou, A., Green, R. J., Frazier, R. A. (2005). Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(1), 158-163.
- Svensson, O., Arnebrant, T. (2010). Mucin layers and multilayers—Physicochemical properties and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(6), 395-405.
- Wang, Y. Q., Zhang, H. M., Zhou, Q. H. (2009). Studies on the interaction of caffeine with bovine hemoglobin. *European journal of medicinal chemistry*, 44(5), 2100-2105.
- Yılmaz, H., Lee, S., Chronakis, I. S. (2021). Interactions of  $\beta$ -Lactoglobulin with Bovine Submaxillary Mucin vs. Porcine Gastric Mucin: The Role of Hydrophobic and Hydrophilic Residues as Studied by Fluorescence Spectroscopy. *Molecules*, 26(22), 6799.