

## GIDALARIN YAPISINDAKİ FENOLİK BİLEŞİKLERİN VE PROTEİNLERİN İNTERAKSİYON MEKANİZMALARI VE İNTERAKSİYONA ETKİ EDEN FAKTÖRLER

V. Hazal Özyurt\*, Semih Ötles

Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova/İzmir

*Received* / Geliş tarihi: 29.06.2015

*Received in revised form* / Düzeltilecek Geliş tarihi: 17.09.2015

*Accepted* / Kabul tarihi: 11.10.2015

### Özet

Fenolik bileşikler ve gıda proteinlerinin kovalent olmayan ve kovalent ilişkileri, polifenolce zengin gıda ürünlerinin kalitesini etkileyen en temel iki faktördür. Bu derlemeyle, proteinler ve fenolik bileşikler arasındaki ilişkilerin biyokimyasal temelleri ve dolayısıyla polifenolce zengin gıda ve içeceklerin duyu ve besleyici kalitelerinin açıklanması amaçlanmaktadır. Ayrıca, gıda örneklerindeki bu interaksyonlar ile, gıdaların fonksiyonel sonuçlarının daha iyi anlaşılması sağlanmaktadır. Mevcut çalışmalar, interaksyonlar sonucunda proteinlerin ikincil ve üçüncül yapısının değiştiğini, proteinlerin çözünürlüğünün azaldığını, ancak termal stabilitenin geliştiğini göstermektedir. Ayrıca, bazı amino asitlerin miktarı ve protein sindirilebilirliğinin azaldığı ve fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesinin azaldığını göstermektedir. Polifenol yapısı ve tipi, protein tipi ve konsantrasyonu, polifenollerin konsantrasyonu, sıcaklık ve pH, interaksyonları etkileyen parametrelerdir. Bu derlemede, fenolik bileşik ve gıda proteinlerindeki temel etkileşimler incelenmiş ve temel bulgular özetlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Protein, fenolik bileşik, interaksyon, kovalent, kovalent olmayan

## INTERACTION MECHANISMS and EFFECT of PARAMETERS to THESE INTERACTIONS of PHENOLIC COMPOUNDS and PROTEINS in FOOD

### Abstract

Non-covalent and covalent associations of phenolic compounds with food protein are two of the most fundamental factors affecting the quality of phenol-rich food products. This review describes the biochemical bases of associations between phenolic compounds and proteins, therefore it will help to understand organoleptic and nutritional qualities of phenol-rich foods and drinks. It will also allow a better understanding of the functional consequences of these interactions on food samples. Recent studies showed that while secondary and tertiary structures of the proteins were changed, solubility of the protein was decreased, however its thermal stability can be improved. Moreover, the amount of some amino acids and protein digestibility were reduced and proteins significantly decrease the antioxidant capacity in general. The effects of factors such as phenolic compound structure and type, protein type and concentration, concentration of phenolic compounds, temperature, and pH are discussed. In this review, the interactions of phenolic compounds and protein are investigated and basic findings are summarized.

**Keywords:** Protein, phenolic compounds, interaction, covalent, non-covalent

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ hazal.ozyurt@gmail.com,

☎ (+90) 232 311 3010,

☎ (+90) 232 342 7592

## GİRİŞ

Protein-fenolik interaksyonları son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Diyetin bir parçası olan süt, yumurta, et, tahıllar ve yağlı tohumların içerdiği proteinlerin, insan vücudu için önemi tartışılmayacak kadar büyüktür. Proteinler; karboksil grubu, amino grubu, hidrojen atomu ve yan zincirin (R)  $\alpha$ -karbonuna kovalent bağlarla bağlanmasıyla oluşan 20 farklı aminoasitin bir araya gelmesiyle meydana gelen kompleks polimerlerdir. Proteinlerin yapısındaki ve fonksiyonlarındaki farklılık, bu aminoasitler arasında oluşan amid bağlarının yanı sıra, aminoasitlerin sıralanışından meydana gelmektedir (1).

Fenolik bileşikler ise aromatik halkaya bağlı hidroksil grubu içeren kimyasal yapılar olarak adlandırılan enerji metabolizmasında ve büyümede görev almayan ikincil metabolitlerdir (2). Fenolik bileşikler, bitkilerden elde edilen gıdaların ve içeceklerin duyuşsal karakterlerinden sorumludur. Bu bileşiklerin antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerinden dolayı gıdalarda, katkı maddesi olarak kullanıldığı bilinmektedir (3). Ancak, yapılan çalışmalar sonucunda fenolik bileşikler yüksek konsantrasyonda uygulandığında zararlı etkilerinin (sindirim enzimlerinin inhibisyonu, vücut ağırlığında azalma vb.) olduğu belirlenmiştir. Bugün gıdalarda 8000'den fazla fenolik bileşiğe rastlanmaktadır (4). Diyet polifenollerini çok çeşitli yapılar göstermektedir: molekül ağırlığı yaklaşık 100 Da olan basit moleküllerden molekül ağırlığı 1000 Da ulaşan moleküllerdir (4, 5). Yüksek protein ilgisine sahip olan fenolik bileşiklerin protein moleküllerinin iç bölgesine sızabilecek kadar küçük, peptit zinciriyle bir ana noktadan daha fazla bağ yapacak kadar da büyük olduğu bilinmektedir (6). Fenolik bileşenler iki gruba ayrılmaktadırlar: basit fenolik bileşenler ve polifenoller (7). Polifenoller ise karbon yapılarına göre fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve lignanlar olarak sınıflandırılırlar. Fenolik asitler, kafeik asit, ferulik asit ve hidroliz edilebilir taninlerden oluşurken, flavonoidler ise flavonoller, flavonlar, izoflavonlar, flavanonlar, antosiyaninler, flavanollerden oluşur (8). İnsan ve hayvan çalışmalarından alınan verilere göre, fenolik bileşikler osteoporozun önlenmesi, kanserin bazı tiplerinin ve kalp hastalıklarını da içeren bazı hastalıklardan korunmada önemli rol oynarlar. Polifenollerin sağlık üzerine olumlu

etkilerinin olduğu yönünde çok fazla çalışma bulunmaktadır (9-14).

Polifenollerin besleyici etkisi, onların proteinleri çöktürmesi ve bağlaması sonucunda meydana gelebilmektedir (15). Proteinler ve polifenoller (taninler) arasındaki interaksyonları anlamak, etkili kontroller ve doğal içeceklerde çöken kısmın uzaklaşması için önemlidir (16).

Yapılan çalışmalar, gıdalardaki fenolik bileşiklerin, proteinlerle çeşitli etkileşimlerde bulduklarını ve bunun sonucunda gıdanın yapısının, besleyici değerinin ve antioksidan aktivitesinin değiştiğini göstermektedir. Dolayısıyla gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin ve proteinin birbirleriyle interaksyonlarının incelenmesi büyük öneme sahiptir. Bu derlemede fenolik bileşiklerin ve proteinlerin reaksiyonuyla sergilenen interaksyonlar, sonuçları ve tespit için kullanılan analiz yöntemleri incelenmiş ve özetlenmiştir.

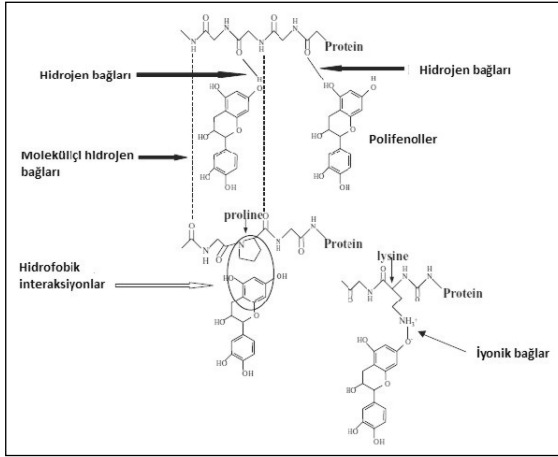
### Fenolik Bileşik-Protein Komplekslerinin Oluşumu

Fenolik bileşikler ve proteinlerin etkileşim mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, bu mekanizmaları açıklayabilmek için, protein ve fenolik yapısındaki değişimlerin ayrı ayrı incelenmesi gerekmektedir.

Teorik olarak, protein ve polifenoller arasındaki interaksyonlar 3 aşamaya ayrılmaktadır: (i) birçok polifenol moleküller, proteinlere eklendikten sonra proteinlerin peptitleri ile bağlanabilmektedir; (ii) polifenol miktarı yetersizse, iki peptit molekülü polifenol kaplı dimerler oluşturabilmekte ve çökme meydana gelebilmektedir (iii) daha polifenoller ile proteinlerin reaksiyonu sonrasında, büyük partiküller daha büyük kompleksler oluşturmaktadır (17, 18).

Fenolik bileşikler ve proteinler arasındaki etkileşimin temelinde farklı mekanizmaların etkili olduğu tespit edilmiştir: hidrojen bağlama, -bağlama, hidrofobik, iyonik ve kovalent bağlanma (Şekil 1) (19). Fenolik bileşiklerin aromatik halkalarındaki hidroksil grupları ve aromatik çekirdekler fenolik bileşikler-protein kompleksi için temel bağlanma bölgesini oluşturur. Protein molekülleri ve fenolik gruplar arasındaki temel çekici kuvvet hidrojen bağları ve hidrofobik interaksyonlardır. Hidrojen bağlama, hidrojen atomu ve ona kovalent olarak bağlanan N, O ya da S gibi elektronegatif atomların

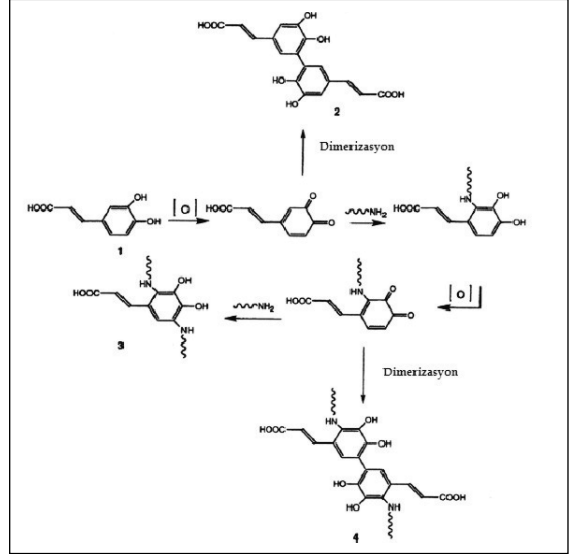
arasında gerçekleşmektedir. Bu bağlar, sudan korundukları sürece stabillerdir (20). Van der Waals interaksyonları, çevrelenen solventler tarafından etkilenen moleküler içi interaksyonlardır. Nötr pH da proteinler pozitif ya da negatif yüklere sahiptir. Proteinlerdeki bu yüklü gruplar protein moleküllerinin yüzeyine dağılır. Elektrostatik interaksyonlar benzer yükler ve zıt yükler arasında meydana gelebilir. Çeşitli polar gruplar arasındaki hidrojen bağlama ve elektrostatik interaksyonlar stabil değildir ve onların stabilitesi apolar çevresel bakıma bağlıdır (21). Polar olmayan gruplar arasında hidrofobik interaksyonlar daha güçlüdür (22).



Şekil 1: Protein ve fenolik bileşikler arasındaki interaksyon mekanizmaları (17)

Fenolik bileşik ve protein interaksyonları ya dönüşümlü ya da dönüşümsüz olarak sınıflandırılmaktadır. Fenolik bileşik ve protein arasında oluşan bağ hidrojen, hidrofobik ve vander Waals gibi kovalent-olmayan kuvvetlerden oluşursa bu geri dönüşümlü reaksiyon olarak adlandırılmaktadır. Geri dönüşümlü fenolik bileşik-protein interaksyonları, çözeltilerde çözilemeyen komplekslerin oluşmasına yol açmaktadır (23, 24). Fenolik bileşikler ve proteinler arasında kovalent bağlanmalar oluştuğunda ise geri dönüşümsüz reaksiyonlar meydana gelmektedir (4). Polifenoller (Şekil 2, 1), moleküler oksijen varlığında veya enzimatik reaksiyonlar sonucunda alkali pHlarda protein çapraz bağlarının oluşumuna yol açan kininleri oluşturmaktadır. Yüksek aktiviteye sahip olan kininler proteinlerin sülfidril ve amino gruplarıyla reaksiyon göstermektedirler ve böylece ya kinonları (Şekil2, 3) oluşturmaktadır ya da yan zincirde bir dimer (Şekil 2, 4) oluşturmaktadır. Kininler, tanin olarak adlandırılan yüksek molekül

ağırlıklı pigmentlerin oluşmasıyla sonuçlanan yoğunlaşma reaksiyonlarına maruz kalmaktadırlar (Şekil 2) (21).



Şekil 2: Fenolik bileşik ve proteinlerin etkileşimi (1).

### Fenolik Bileşikler ve Protein Interaksyonunu Etkileyen Faktörler

Protein ve fenolik bileşikler arasındaki interaksyonları etkileyen çok fazla değişken vardır. Bunların başında sıcaklık, pH, protein tipi ve konsantrasyonu, fenolik bileşiklerin yapısı ve konsantrasyonu, tuz konsantrasyonu ve bazı ajanların eklenmesi gelmektedir (25).

*Sıcaklık*, hidrojen bağlarının oluşumuna neden olarak interaksyonu etkileyen faktörlerin başında gelmektedir. Sastry ve Rao (26) ayçiçeği tohumlarındaki polifenol içermeyen 11S proteinlerinin 5-O-kafeoilkinik asit ile interaksyonu üzerine farklı sıcaklıkların etkisini incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda, sıcaklığın azalmasıyla interaksyonun azaldığı ve sıcaklık 55 °C'nin üzerine çıktığında interaksyonun kaybolduğu belirlenmiştir. Ancak Hoffmann ve ark. (27) nın yaptığı çalışma, prosiyanidin türevleri ile BSA(bovine serum albümin)nin çöktürülmesinin sıcaklıktan bağımsız olduğunu göstermiştir.

*pH'nin* etkisini araştıran çalışmalar incelendiğinde ise, proteinin izoelektrik noktasının altındaki pHlarda meydana gelen fenolik bileşik-protein komplekslerinin düşük çözünürlük gösterdikleri görülmüştür. Sastry ve Rao (26) yaptıkları çalışmada düşük pHlarda, bağlanma bölgesinde daha güçlü bağlanmanın meydana gelmesinin

nedeni proteinin bu pHlarda daha fazla ayrılmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Kroll and Rawel (28) peyniraltı suyu proteinleriyle bitkisel fenollerin pH 9'da reaksiyona girdiğini göstermişlerdir. Ancak, hiçbir gıda bu kadar yüksek pH değerlerinde bulunamayacağı için gıda ile ilgili çalışmaları aydınlatmamıştır. Yuksel ve ark. (29) asidik şartlar ve düşük sıcaklıklarda, hidrofobik interaksiyonların ve hidrojen bağlanmanın baskın olduğunu göstermişlerdir. Polifenol oksidaz varlığında, sıcaklık yükselmesinde ve nötral ya da alkali pH'da hidrokisinamik asit ve klorojenik asitten kinon ya da yarı-kinonların kovalent bağlanma ile oluştuğunu belirlemişlerdir.

Wang ve ark. (30) epigallokateşin gallat (EGCG) ve  $\alpha$ -Laktalbumin arasındaki kovalent bağlanmayı ve  $\alpha$ -Laktalbumin'in emülsifiye edici özellikleri ve antioksidan aktivitesi üzerine EGCG'nin farklı pH, sıcaklık ve ısıtma sürelerindeki etkisini araştırmışlardır.  $\alpha$ -Laktalbumin önemli bir süt proteindir ve bebek gıdaları ve besleyici barlar gibi yüksek protein içeren gıdalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.  $\alpha$ -Laktalbumin küçük (14 200 Da), asidik (pI 4-5) ve globüler bir proteindir (33). Bu çalışma sonucunda, pH 8'de EGCG'nin  $\alpha$ -Laktalbumine kovalent olarak bağlandığı tespit edilmiştir. Ayrıca pH 6'da EGCG ve  $\alpha$ -Laktalbumin arasında, sıcaklığın artmasıyla hidrofobik etkileşimlerden dolayı bir kompleksin oluştuğu ve bulanıklığın arttığı gözlenmiştir. Bu, sıcaklıktaki artışı ile tanin ve prolin arasında oluşan kompleksten kaynaklanmaktadır. Ancak pH'nın artmasıyla  $\alpha$ -Laktalbumin'in yapısı değiştiğinden ve oksitlenen EGCG ve  $\alpha$ -Laktalbumin arasındaki kovalent interaksyondan dolayı bulanıklıkta bir azalma olduğu tespit edilmiştir. pH'nın artmasıyla, alkali şartlarda, kinonun oluşmasına yol açan fenolik hidroksil gruplarının protondan arındırılması sağlanarak kinonların elektrofilik özelliklerine sahip o-kinonlar proteinlerin nükleofilik merkezinde reaksiyona girmektedir ve kovalent bağlanma gerçekleşmiş olur. Çalışma sonucunda,  $\alpha$ -Laktalbumin yapısında bazı değişmelerin meydana gelmesi sonucunda, antioksidatif ve emülsifiye edici aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir.

Almajano ve ark. (31) ise *protein çeşidinin* fenolik bileşikler ile interaksiyon üzerine bir etkisi olup olmadığının incelemek için 5 farklı proteinden (BSA,  $\alpha$ -Laktalbumin,  $\beta$ -Laktalbumin,  $\alpha$ -kazein ve  $\beta$ -kazein) birini içeren çözeltinin antioksidan özellikleri üzerine EGCG'nin etkisini araştırmışlardır.

EGCG'nin bu proteinlerle reaksiyona girdiği, floresans kayıplarıyla ve antioksidan aktivitedeki artış ile doğrulanmıştır. EGCG ve  $\alpha$ -kazeinden oluşan kompleks (30°C) en yüksek antioksidan aktiviteye sahipken bunu sırasıyla  $\beta$ -kazein, BSA,  $\beta$ -Laktalbumin ve  $\alpha$ -Laktalbumin kompleksleri takip etmektedir. Fenolik bileşikler, proteinlerin bağlanma bölgesine bağımlı olarak ya hidrofobik ya da hidrofobik olarak bağlanmaktadır. Fenolik bileşiklerin proteinlere bağlanma ilgisi, proteinlerin hidrofobisite, izoelektrik nokta ve aminoasit bileşimiyle ilgilidir (23).

Soares ve ark. (32) (+)-kateşin, (-)-epikateşin, (-)-epikateşin gallat, malvidin-3-glukosid, tannik asit, prosiyanidin B4, prosiyanidin B2 galat ve prosiyanidin oligomerleri gibi *farklı fenolik bileşikler* ile sığır serum albümini ve  $\alpha$ -amilazın (insandan) interaksiyonunu floresans azalmasıyla belirlemişlerdir. Analiz edilen her iki proteinde globülerdir ve benzer büyüklükte dirler (66kDa ve 56kDa, sırasıyla). Yapısal olarak birbirlerine benzemelerine rağmen bağlanma ilgileri oldukça farklıdır. Her iki proteinde de aminoasit kalıntılarının 3 boyutlu yapıları farklıdır. Bu 3 boyutlu yapı proteinin fonksiyonunun belirlenmesinde önemlidir. Bu çalışma sonucunda, polifenollerin bağlanma ilgisinin, onun molekül ağırlığı ve gallol gruplarının sayısı ile doğrudan ilgili olduğu belirlenmiştir. Aynı proteinler için farklı fenolik bileşikler karşılaştırıldığında, daha küçük polifenol bileşenleri daha az bağlanma grubu içerdiklerinden en zayıf bağlanma ilgisine sahiplerdir. Ancak farklı proteinlerle karşılaştırıldığında, aynı polifenol molekülü proteinin 3 boyutlu yapısıyla ilgili olarak farklı bağlanma etkisi göstermektedir. Bartolome ve ark. (33) ise düşük molekül ağırlıklı fenolikler (p-kumarik asit, p-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, kafeik asit ve +kateşin) ile BSA'nın interaksiyonunu incelemişlerdir. En güçlü BSA'ya bağlanma ilgisi 3,4-dihidroksil benzoik asit ve sinamik asitler (protokateşik asit ve kafeik asit) de gözlenirken, p-hidroksibenzoik asitler BSA ile interaksiyon göstermemiştir. Bu yapılan çalışmalar ışığında fenolik bileşiklerin moleküler ağırlıklarının, metilasyon, hidrolizasyon, glikosilasyon ve hidrojenasyon derecelerinin proteinlerle yaptıkları interaksiyonu etkilediği görülmüştür.

Ferrer-Gallego ve ark. (34) BSA ve  $\alpha$ -amilaza üzüm çekirdeği ekstraktının bağlanma yeteneğini triptofan floresansındaki azalma ile ölçmüşlerdir. Bu çalışma sonucunda üzüm çekirdeği ekstraktları

proteinlerle bağlanma yeteneğine ölçülmüştür. Olgunlaşma derecesi ile ilişkili tanin yapısındaki değişimlerle tanin-protein interaksyonları değişmiştir. Hasat aşamasındaki çekirdek ekstraktları hasat sonrası aşamaya göre daha çok bağlanma ilgisi göstermiştir. Olgunlaştıkça, moleküllerin hidrofobitesinde artışla ilgili molekül kütesindeki taninlerin artışı protein ilgisini artırır. Ancak bunu aksine, olgunlaşmayla üzüm çekirdeklerinin acılığında azalma meydana gelir. Bu çalışma sonucunda, tanin-protein interaksyonlarının tek bir açıklamasının olmadığı tespit edilmiştir.

Zhang ve ark. (35) farklı protein tipleri ve farklı fenolik bileşikler çeşitlerinin interaksiyona etkisini incelemek için  $\alpha$ -laktalbumin ve  $\beta$ -laktalbumin ile klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit ve kumarik asidin interaksyonunu araştırmışlardır. Bağlanma modu, bağlanma sabitleri ve peyniraltı suyu proteinlerinin yapısı üzerine kompleks oluşturmanın etkilerini analiz etmek için Floresans, CD ve FTIR spektroskopilerini kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda peynir proteinlerinin yapısının değiştiği ve  $\alpha$ -heliks miktarında önemli azalma meydana gelirken  $\beta$ -diziminde artış meydana gelmiştir.

### **Proteinler ve Fenolik Bileşikler üzerine Fenolik Bileşik ve Proteinlerin İnteraksyonunun Etkisi**

Proteinlerle fenolik bileşiklerin interaksyonu sonucunda, çözünebilirlik, ısıl stabilite ve sindirilebilirlik gibi proteinlerin fizikokimyasal özelliklerinde değişimler meydana gelirken (36), proteinlerin besleyici özellikleri proteaz inhibisyonundan ve zorunlu aminoasitlerin modifikasyonundan dolayı değişmektedir. Protein yapının yanı sıra, gıdanın fenolik yapısı, serbest polifenol içeriği, antioksidan kapasitesi ve gıdadaki fenolik bileşenlerin biyoyararışlılığı da değişebilmektedir (16). Fenolik-protein interaksyonlarını daha iyi anlamak, işleme, taşıma ve depolama süresi boyunca gıda ürünlerindeki proteinlerin ve fenolik bileşiklerin özelliklerinin kontrol edilmesi gerekmektedir (37).

Prigent ve ark. (38) kinon oluşturmak için kahve polifenollerinin pH 8.0 de lizozimle interaksyonu sonucunda lizozim çözünürlüğünü azalttığını belirtmişlerdir.

Gallo ve ark. (39) süt proteinleri ile kakao polifenollerinin moleküler interaksyonlarını araştırmış ve peynir altı suyu ve kazein fraksiyonlarının kakao polifenollerine bağlanmasını

gözlemişlerdir. Kateşin ve epikateşinli  $\beta$ -laktoglobulinin interaksyon yapısı ve bağlı bölgedeki aminoasit kalıntıları tanımlanmıştır.

Nacz ve ark (40) mangostan meyvesindeki fenolik bileşiklerin sığır serum albümini ile oluşturdukları interaksyonu değerlendirmişlerdir. Kabuk kısmından elde edilen fenolik bileşikler güçlü protein çöktürme yeteneğine sahipken, meyvenin yenilebilir kısmından elde edilen fenolik bileşikler, diğer ekstraktlarla karşılaştırıldığında sığır serum albümini için daha büyük ilgi göstermişlerdir.

Budryn ve ark. (41), interaksyonlar sonucunda hem fenolik bileşiklerin hem de proteinlerin fonksiyonel özelliklerinde, özellikle antioksidan aktivitede ve onların emilimindeki azalmadan dolayı fenolik bileşiklerin enkapsüle edilerek gıdalarda kullanılmasının faydalı olacağını düşünmüşlerdir.  $\beta$ -siklodeksitirin ile hidroksisünamik asit ve klorojenik asidi inklüzyon içinde hapsedmişler ve yumurta, soya ve peyniraltı suyu izolatlarında kullanmışlardır. Sonuç olarak, yumurta proteinleri, peynir altı suyu ve soya proteinleri ile yeşil kahveden klorojenik, ferulik ve kafeik asidin güçlü interaksyonu 90 °C de ve oda sıcaklığında, asidik ve nötral pHlarda belirlenmiştir. Bu interaksyonlar hidrofobik interaksyonlar, hidrojen bağları ve kovalent bağlar ile gerçekleşmiştir. Fenolik bileşiklerin inklüzyonu sonucunda, proteinlere fenolik bileşiklerin bağlanması azalmış ve fenolik bileşikler B-siklodekstrinle oluşturulan çözelti içinde kalmıştır.

Rawel ve ark. (42) farklı fenolik bileşiklerle interaksyon sonrasında soya proteinlerinde bulunan lizin, sistein ve triptofanın miktarının azaldığını belirlemişlerdir. Aynı zamanda proteinlerin in vivo ve in vitro sindirilebilirliğinin kondense taninlerin varlığında azaldığını tespit etmişlerdir. Onların interaksyonları sindirilemeyen proteinleri ve inhibitör sindirim enzimleri oluşturmaktadır.

Von Staszewski ve ark. (43) peyniraltı suyu proteinleri farklı yeşil çay çeşitlerine eklenerek antimikrobiyal kapasitelerinin değişimi incelenmiştir. Peyniraltı suyu proteinleri eklendiğinde yeşil çayın antimikrobiyal aktivitesinin maskelendiği ortaya çıkmıştır.

Kırmızı şarapta bulunan fenolik antioksidanlarının, insanlarda bulunan lipoproteinlere bağlandığı ve bu sayede sağlık üzerine olumlu aktiviteler gösterdiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (44).

### **Protein-Fenolik İnteraksiyonlarının Ölçümünde Kullanılan Teknikler**

Protein ve fenolikler arasındaki interaksiyonların ölçülmesi kullanılan bazı yöntemler arasında Matris destekli lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanlı Kütle Spektroskopisi (MALDI-TOF MS), Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, Florasans spektroskopisi, Atomik Kuvvet Mikroskopu (AKM), FT-IR spektroskopisi (Fourier transform kızılotesi), mikrokaloimetri, enzim inhibisyonu, protein çöktürme, kapiler elektroforez, bulanıklılık ve nefelometre sayılabilmektedir. Son yıllarda bu amaçla flüoresans söndürme yaygın olarak kullanılmaktadır (45-50).

MALDI TOF-MS polifenollerin, proteinler ve peptitlerle yaptığı komplekslerin analizlerinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde öncelikle lazer ışınlarıyla moleküller iyonlaştırılmakta ve moleküller arasında olan interaksiyon kütle spektroskopisiyle tespit edilebilmektedir (51, 52).

NMR ile atom çekirdekleri 4-900 MHz frekans aralığında elektromanyetik ışınları absorbe ederek ve dönme enerji seviyelerine uyarılmaktadır. Bu seviyenin ölçülmesiyle katı veya sıvı fazdaki moleküllerin dinamiği ve konformasyonları hakkında detaylı bilgi sahibi olunmaktadır. Bu yöntem protein ve fenolik bileşikler arasındaki etkileşimin hangi bağlarda etkili olduğunun aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Charlton ve ark. (21) prolince zengin proteinler ile polifenollerin interaksiyonları sonucunda yapısal değişimleri tanımlamak için pH 3.8-6.0 aralığında NMR kullanmışlardır.

Flüoresans spektroskopisinde ise interaksiyonun tespitinde florasans özelliğine sahip aminoasitlerden yararlanılmakta veya daha spesifik olarak moleküller florasans boyalarla işaretlenmektedirler (53). Flüoresans şiddetine bağlı olarak aralarındaki enerji transferi ölçülebilmekte ve birbirleriyle olan etkileşimleri ve konformasyonları hakkında bilgiler edinilebilmektedir (54). Flüoresans ölçümler, kromofor moleküllerin dolaylarındaki moleküller çevre hakkında bilgi sağlamaktadır. Proteinin flüoresans özelliğinin azalması söndürme olarak adlandırılmaktadır (47).

FT-IR spektroskopisi, kızılotesi bölgede moleküllerin uyarılmasıyla moleküller arası etkileşim sonucu oluşan bağlar tayin edilebilmektedir. Wang ve ark. (30) EGCG ile kompleks oluşturan  $\alpha$ -laktalbuminin yapısal değişimlerini analiz etmek için 4000-400  $\text{cm}^{-1}$

aralığında FT-IR spektrumunu kullanmışlardır. Proteinlerin ikincil yapısının 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bölgede karakteristik amid I bağlarını oluşturan hidrojen bağlarıyla ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. pH 8'de  $\alpha$ -laktalbumin 3298  $\text{cm}^{-1}$ , 1635  $\text{cm}^{-1}$  ve 1542  $\text{cm}^{-1}$  de ana bantlar sergilerken, EGCG ile interaksiyon sonucunda bu değerlerde azalma gözlenmiştir.

### **SONUÇLAR**

Gıdaların yapısında bulunan fenolik bileşikler ve proteinler molekül düzeyinde etkileşim içindedir ve son ürünlerin fonksiyonel özelliklerinde değişime neden olmaktadır. Daha da önemlisi, bu gıdaların besleyici değerlerinde de olumlu ve olumsuz değişimler olmaktadır. Bu nedenle, interaksiyonların ve interaksiyon mekanizmalarının incelenmesi gıda açısından büyük önem arz etmektedir.

### **KAYNAKLAR**

- 1.Ozdal T, Capanoglu, E, Altay F. 2013. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Res Int*, 51: 954-970.
- 2.Harnly JM., Bhagwat S., Lin LZ. 2007. Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Anal Bioanal Chem*, 389: 47-61.
- 3.Swieca M. Seczyk L. Gawlik-Dziki U. Dziki D. 2014. Bread enriched with quinoa leaves – The influence of protein-phenolics interactions on the nutritional and antioxidant quality. *Food Chem*, 162:54-62.
- 4.Guo W, Kong E, Meydani M. 2009. Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutr Cancer*, 61: 807-810.
- 5.Haslam E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J Nat Prod*, 59:205-215.
- 6.Mulauzi RB, Ndhala AR, Kulkarni MG, Staden JV. 2012. Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever. *J Ethnopharmacol*, 143: 185-193.
- 7.Vermerris W, Nicholson R. 2006. Families of phenolic compounds and means of classification. In: *Phenolic Compound Biochemistry* Vermerris W. Nicholson R. (Eds.), London: Springer, pp. 3-25.
- 8.Acar J, Gökmen V, 2005. Fenolik Bileşikler. Gıda Kimyası. Saldamlı, İ (Baş editör). Hacettepe yayınları, Ankara, Türkiye.

9. Chen D, Wan SB, Yang H, Yuan J, Chan TH, Dou QP. 2011. EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment. *Adv Clin Chem*, 53:155-177.
10. Zakaria ZA, Hisam EEA, Rofiee MS, Norhafizah M, Somchit MN, Teh LK., Salleh MZ. 2011. In vivo antiulcer activity of the aqueous extract of Bauhinia purpurea leaf. *J Ethnopharmacol*, 137:1047-1054.
11. Han N, Gu Y, Ye C, Cao Y, Liu Z, Yin J. 2012. Antithrombotic activity of fractions and components obtained from raspberry leaves (*Rubus chingii*). *Food Chem*, 132: 181-185.
12. Tao WW, Duan JA., Yang NY., Tang YP, Liu MZ., Qian YF. 2012. Antithrombotic phenolic compounds from *Glycyrrhiza uralensis*. *Fitoterapia*, 83: 422-425.
13. Beara IN, Lesjak MM, Orcic DZ, Simin ND, Cetoyevic-Simin DD, Bozin B, Mimica-Dukic NM, 2012. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. *LWT -Food Science and Technology* 47: 64-70.
14. Zimmer AR, Leonardi B, Miron D, Schapoval E, Oliveira JR, Gosmann G. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: from traditional use to scientific approach. *J Ethnopharmacol*, 139: 228-233.
15. Jansman AJM. 1993. Tannins in feedstuffs for simple stomached animals. *Nutr Res Rev* 6:209-236.
16. Thongkaew C, Gibis M, Hinrichs J, Weiss J. 2014. Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate-pectin coacervates. *Food Hydrocoll*, 41: 103-112.
17. Bourvellec CL, Renard, CMGC. 2012. Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 52:213-248.
18. Diniz A, Escuder-Gilabert L, Lopes NP, Villanueva-Camañas RM, Sagrado S, Medina-Hernández MJ. 2008. Characterization of interactions between polyphenolic compounds and human serum proteins by capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem*, 391(2):625-632.
19. Hasni I, Bourassa P, Hamdani S, Samson G, Carpentier R, Tajmir-Riahi H. 2011. Interaction of milk a- and b-caseins with tea polyphenols. *Food Chem*, 126 (2): 630-639.
20. Loomis WD, Battaile J. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* 5:423-438.
21. Damodaran S. 1996. Amino acids, peptides, and proteins. In *Food chemistry*, Fennema O.R. (Ed.), Marcel Dekker, Inc. pp. 321-429.
22. Hagerman AE, Butler LG. 1978. Protein precipitation method for the quantification of tannins. *J Agric Food Chem*. 26:809-812.
23. Prigent SV, Voragen AG, Visser AJ, van Koningsveld GA, Gruppen H. 2007. Covalent interactions between proteins and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid). *J Sci Food Agric*, 87(13): 2502-2510.
24. Charlton AJ, Baxter NJ, Khan ML, Moir AJG, Haslam E, Davies AP, Williamson MP. 2002. Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J Agric Food Chem*, 50:1593-1601.
25. Oliveira A, Alexandre EMC, Coelho M, Lopes C, Almeida DPF, Pintado M. 2015. Incorporation of strawberries preparation in yoghurt: Impact on phytochemicals and milk proteins. *Food Chem*, 171: 370-378.
26. Sastry MCS, Rao MSN. 1990. Binding of CGA by the isolated polyphenol-free 11S protein of sunflower (*Helianthus annuus*) seed. *J Agric Food Chem*, 38, 2103-2110.
27. Hoffmann T, Glabasnia A, Schwarz B, Wisman KN, Gangwer KA, Hagerman AE. 2006. Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. *J Agric Food Chem*, 54, 9503-9509.
28. Kroll J, Rawel HM. 2001. Reactions of plant phenols with myoglobin: Influence of chemical structure of the phenolic compounds. *J Food Sci*, 66:48-58.
29. Yuksel Z, Avci E, Erdem YK. 2010. Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins. *Food Chem*, 121: 450-456.
30. Wang X, Zhang J, Lei F, Liang C, Yuan F, Gao Y. 2014. Covalent complexation and functional evaluation of (-)-epigallocatechin gallate and a-lactalbumin. *Food Chem*, 150:341-347.
31. Almajano MP, Delgado ME, Gordon MH, 2007. Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate. *Food Chem*, 101:126-130.
32. Soares S, Mateus N, Freitas V, 2007. Interaction of Different Polyphenols with Bovine Serum Albumin (BSA) and Human Salivary  $\alpha$ -Amylase (HSA) by Fluorescence Quenching. *J Agric Food Chem*, 55:6726-6735.

33. Bartolome B, Estrella I, Hernandez MT, 2000. Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA). *J Food Sci*, 65(4): 617-621.
34. Ferrer-Gallego R, Gonçalves R, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bail n MT, Freitas V, 2012. Interaction of phenolic compounds with bovine serum albumin (BSA) and  $\alpha$ -amylase and their relationship to astringency perception. *Food Chem*, 135:651-658.
35. Zhang H, Yu D, Sun J, Guo H, Ding Q, Liu R., Ren F. 2014. Interaction of milk whey protein with common phenolic acids. *Journal of Molecular Structure*, 1058: 228-233.
36. Labuckas DO, Maestri DM, Perell M, Mart nez ML, Lamarque AL. 2008. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chem*, 107: 607-612.
37. Jakobek L. 2015. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem*, 175:556-567.
38. Prigent SVE, Gruppen H, Visser AJWG, Van Koningsveld GAHD, Alfons GJV. 2003. Effects of non-covalent interactions with 5-o-caffeoylquinic acid (CGA) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *J Agric Food Chem*, 51:5088-5095.
39. Gallo M, Vinci G, Graziani G, Simone CD, Ferranti P. 2013. The interaction of cocoa polyphenols with milk proteins studied by proteomic techniques. *Food Res Int*, 54:406-415.
40. Naczka M, Townsend M, Zadernowski R, Shahidi F. 2011. Protein-binding and antioxidant potential of phenolics of mangosteen fruit (*Garcinia mangostana*). *Food Chem*, 128:292-298.
41. Budryn G, Palecz B, Rachwal-Rosiak D, Oracz J, Zaczynska D, Belica S, Navarro-Gonzalez I, Meseguer JMV, Perez-Sanchez H. 2015. Effect of inclusion of hydroxycinnamic and chlorogenic acids from green coffee bean in  $\beta$ -cyclodextrin on their interactions with whey, egg white and soy protein isolates. *Food Chem*, 168: 276-287.
42. Rawel HM, Czajka D, Rohn S, Kroll J. 2002. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *Int J Biol Macromol*, 30: 137-150.
43. Von Staszewski, M. V., Pilosof, A. M. R., & Jagus, R. J. (2011). Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chem*, 125, 186-192.
44. Ivanov V, Carr AC, Frei B. 2001. Red wine antioxidants bind to human lipoproteins and protect them from metal ion-dependent and -independent oxidation. *J Agric Food Chem*, 49(9): 4442-4449.
45. de Freitas V, Carvalho E, Mateus N. 2003. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chem*, 81:503-509.
46. Frazier RA, Papadopoulou A, Mueller-Harvey I, Kisson D, Green RJ. 2003. Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry. *J Agric Food Chem*, 51:5189-5195.
47. Carvalho E, Povoas MJ, Mateus N, de Freitas V. 2006. Application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein-tannin interactions. *Journal of Science and Food Agriculture*, 86:891-896.
48. Papadopoulou A, Frazier RA. 2004. Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends Food Science and Technology*, 15:186-190.
49. Horne J, Hayes J, Lawless HT. 2002. Turbidity as a measure of salivary protein reactions with astringent substances. *Chemical Senses*, 27:653-659.
50. Fickel J, Pitra Ch, Joest BA, Hofmann RR. 1999. A novel method to evaluate the relative tannin-binding capacities of salivary proteins. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol*, 122: 225-229.
51. Flaudrops C, Armstrong N, Raoult D, Chabrière E. 2015. Determination of the animal origin of meat and gelatin by MALDI-TOF-MS. *J Food Compos Anal*, 41: 104-112.
52. Rohn S. 2014. Possibilities and limitations in the analysis of covalent interactions between phenolic compounds and proteins. *Food Res Int*, 65:13-19.
53. Park YS, Polovka M, Martinez-Ayala AL, González-Aguilar GA, Ham KS, Kang SG, Park YK, Heo BG, Namiesnik J, Gorinstein S, 2015. Fluorescence studies by quenching and protein unfolding on the interaction of bioactive compounds in water extracts of kiwi fruit cultivars with human serum albumin. *Journal of Luminescence*, 160: 71-77.
54. Wang X, Liu F, Liu L, Wei Z, Yuan F, Gao Y. 2015. Physicochemical characterisation of  $\beta$ -carotene emulsion stabilised by covalent complexes of  $\alpha$ -lactalbumin with (-)-epigallocatechin gallate or chlorogenic acid. *Food Chem*, 173:564-568.