

**PROTEİN PRİMER YAPISININ FENOLİK  
BİLEŞİKLERLE MODİFİKASYONU ARACILIĞIYLA  
PROTEİN BAZLI FONKSİYONEL İNGREDİYEN ELDESİ**

**PRODUCTION OF PROTEIN BASED FUNCTIONAL  
INGREDIENT THROUGH THE MODIFICATION OF  
PROTEIN PRIMARY STRUCTURE WITH THE  
PHENOLIC COMPOUNDS**

**ZAHİRE AHSEN YÜKSEL**

**PROF. DR. VURAL GÖKMEN**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
Yüksek Lisans TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.

2020

## ÖZET

# PROTEİN PRİMER YAPISININ FENOLİK BİLEŞİKLERLE MODİFİKASYONU ARACILIĞIYLA PROTEİN BAZLI FONKSİYONEL İNGREDİYEN ELDESİ

**Zahire Ahsen YÜKSEL**

**Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Vural GÖKMEN**

**Eylül 2020, 80 sayfa**

Proteinler, beslenme değeri ve sahip oldukları işlevsel özelliklerinden dolayı çok önemli gıda bileşenleridir. Modifikasyonlar ile protein yapısını değiştirmek, elde edilen yeni hammadde ile gıda güvenliğinin sağlanması, beslenme taleplerinin karşılanması ve lezzetlilik açısından önemlidir. Serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini yakalamanın yanı sıra anti kanserojen ve anti mutajen etkileri olduğu bilinen fenolik bileşiklerin, proteinlerle bağ yapmada yüksek afiniteye sahip oldukları iyi bilinmektedir. Birçok gıdanın yapısında bulunan fenolik bileşikler, kimyasal yapılarına bakıldığında hayli reaktiftirler ve kolaylıkla enzimatik ya da enzimatik olmayan yollarla okside olurlar. Bu tarz reaksiyonların başlangıcında kinonlar oluşur ve oluşan kinonlar sayesinde fenolik bileşik molekülü elektrofilik hale gelmektedir. Dolayısıyla, okside olan fenolik bileşiklerle protein yapısındaki yan zincirlerin nükleofilik eklenmesi protein yapısında modifikasyona sebebiyet vermektedir. Fenollerin oksidasyonu pH, sıcaklık ya da etkileşim süresi gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir ve bu koşulların belirlenmesi protein modifikasyonu açısından önem arz eden bir konudur.

Bugüne kadar, proteinlerle fenolik bileşiklerin bazik koşullarda kovalent bağlanarak kompleks oluşturduğu bilinmektedir.

Bu çalışma ile yeşil çay fenolik bileşikleri ile protein modifikasyonunun sonucunda hem antioksidan potansiyeli artırılmış hem de amino grupların reaktivitesi sınırlandırılarak glikasyon potansiyeli azaltılmış protein ya da protein bazlı gıda elde etmek amaçlanmıştır. Bu amaçla modifiye protein elde etmek için, kazein (KN), ovalbumin (OVA) ve gluten (GLU) proteinleri ilk önce yeşil çay ekstraktı (YÇE) ile alkali (pH 8, 10, 12) koşullar altında muamele edilmiştir. Reaksiyon 25 ve 50 °C’de 30, 60 ve 120 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Bu yolla fenolik bileşiklerin okside olmaları ve kinonları oluşturmaları, dolayısıyla reaktif hale gelmeleri hedeflenmiştir. Kinon oluşumunun ve oluşan kinonların proteinlerin amin kalıntılarına kovalent bağlanmasının doğrulanması için, hem kontrol hem de modifiye edilmiş protein örneklerinin toplam antioksidan kapasitesi (TAK) ve amino asit miktarları ölçülmüştür.

Modifiye olmuş proteinlerin modifikasyonunun doğrulanması için kontrol ve modifiye proteinlerde amino asit analizi yapılmış ve sonrasında lizin içerikleri belirlenmiştir. KN, OVA ve GLU ile yeşil çay ekstrakt çözeltisinin pH 10’da gerçekleştirilen reaksiyonu sonucunda modifiye kazein ve ovalbumin için lizin miktarlarının kontrol örneklerine göre % 94, modifiye gluten için lizin miktarının kontrol örneğine göre %71 oranında modifiye edilebildiği gösterilmiştir. Antioksidan kapasite sonuçlarına göre muamele edilmiş protein örneklerinin toplam antioksidan kapasitesi kontrol örneklerine göre anlamlı derecede yüksektir ( $p<0,05$ ). TAK’da en yüksek artış pH 10’da muamele edilen örneklerde gözlenmiştir. Muamele sıcaklığı ve süresinin bağlanma açısından alkali koşullar kadar etkili olmadığı görülmüştür.

Bunu takiben, modifiye edilmiş proteinlerin glikasyon potansiyeli üzerindeki etkisini araştırmak için en yüksek TAK değerine sahip modifiye edilmiş proteinlerden model reaksiyonlar hazırlanmıştır. Kontrol veya modifiye protein ile farklı konsantrasyonlarda (1-5-10-20-100  $\mu\text{mol}$ ) glukoz çözeltisi ile hazırlanan model sistemler 100°C’de 15 dakika boyunca yağ banyosunda ısıtılmıştır. Ardından erken ve ileri glikasyon belirteçleri olarak furozin ve karboksimetillizin (CML) gibi glikasyon ürünleri analiz edilmiştir. Modifiye protein komplekslerinin kuru sistemde ısıtılması sonucu oluşan

furozin miktarları, kontrol model sisteme göre önemli ölçüde azalmıştır ( $p<0,05$ ). Fakat CML miktarlarında anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p>0,05$ ).

Bazı protein bazlı gıda örneklerinde; (yağsız süt, şekersiz soya sütü, yumurta, buğday unu, çavdar unu ve yulaf unu) belirlenen optimum koşullarda YÇE ile reaksiyon gerçekleştirilerek antioksidan kapasitelerinde değişim izlenmiştir. Modifiye edilmiş protein bazlı gıda örnekleriyle elde edilen sonuçlar kontrol örneklerine göre anlamlı derecede yüksektir ( $p<0,05$ ). Bu sonuçlar modifiye edilmiş protein bazlı gıdaların antioksidan özellikleri arttırılmış fonksiyonel özellikli gıda katkı maddesi olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında KN, OVA ve GLU proteinlerinin yeşil çay fenolikleri ile muamele edilmesinin, antioksidan potansiyeli arttırılmış ve glikasyon potansiyeli sınırlandırılmış fonksiyonel protein elde etmek için büyük bir potansiyele sahip olduğu önerilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Protein modifikasyonu, protein glikasyonu, fenolik bileşikler, gıda proteinleri, protein-fenol kompleksi, kinon, furozin, karboksimetillizin

## **ABSTRACT**

# **PRODUCTION OF PROTEIN BASED FUNCTIONAL INGREDIENT THROUGH THE MODIFICATION OF PROTEIN PRIMARY STRUCTURE WITH THE PHENOLIC COMPOUNDS**

**Zahire Ahsen YÜKSEL**

**Master of Science, Department of Food Engineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Vural GÖKMEN**

**September 2020, 80 pages**

Proteins are vital food ingredients due to their nutritional value and functional properties. Changing the protein structure with modifications is important in terms of providing food safety, corresponding nutritional demands and palatability with the obtained new raw material. Polyphenols, which are well known to have anti carcinogenic and anti mutagenic effects as well as scavenging free radicals and reactive oxygen species, have high affinity for binding with proteins.

The polyphenols found in the most of foods are highly reactive considering their chemical structure and they are easily oxidized by enzymatically or non-enzymatically. At the beginning of these reactions, quinones are formed and accordingly, polyphenol molecule becomes electrophilic. Therefore, nucleophilic addition of the oxidized polyphenols to the side chains in protein structure give rise to modification in the protein structure. Oxidation of polyphenols may vary depending on pH, temperature or interaction time, and investigation of the effects of these factors is an important issue in terms of modification of protein. To date, proteins are known to covalently bind with polyphenols under alkaline condition.

In this study, it is aimed to obtain protein or protein based food with induced antioxidant potential as well as reduced reactivity of amino group resulting in limited glycation potential through modification of proteins with green tea polyphenols. For this purpose, in order to obtain modified proteins, casein (CN), ovalbumin (OVA) and gluten (GLU) proteins were firstly treated with green tea extract (GTE) under alkaline condition (pH 8, 10, 12). Treatment were performed at 25°C and 50°C for 30, 60 and 120 minutes. In this way, polyphenols are aimed to be oxidized and form quinones, thus becoming reactive. Total antioxidant capacity (TAC) and amino acid amount of both control and modified protein samples was measured to confirm the formation of quinone and covalent binding of the formed quinones to amine residues of proteins.

In order to confirm the modification of the modified proteins, amino acid analysis was performed in the control and modified proteins, and then lysine contents were determined. As a result of the reaction of CN, OVA and GLU and green tea extract solution at pH 10, it has been shown that lysine amounts can be modified 94% modified casein and ovalbumin samples, and 71% for modified gluten samples compared to the control. According to the results, TAC of treated proteins samples was significantly higher than control proteins samples ( $p < 0,05$ ). The highest increase in TAC was observed in the samples treated at pH 10. The results indicated that both treatment temperature and time was not as effective as alkaline conditions in terms of binding.

Following this, in order to investigate the effect of modification on glycation potential of modified proteins, model reactions were prepared from modified proteins having highest TAC value. Model systems prepared with either control or treated proteins and glucose in varying concentrations (1-5-10-20-100  $\mu\text{mol}$ ) were heated in an oil bath at 100°C for 15 minutes. Then glycation products such as furosine and N- $\epsilon$ -carboxymethyllysine (CML) were measured as indicators of early and advanced glycation. The amount of furosine formed by heating the modified protein complexes in the dry system was significantly lower than in the heated control model systems ( $p < 0,05$ ). However, there was no significant difference in CML amounts of both heated modified protein and control model systems ( $p > 0,05$ ).

In some protein based food samples; (skim milk, sugarless soy milk, egg, wheat flour, rye flour and oat flour) reaction was performed with GTE under optimum conditions

and the changes in the TAC were observed. The TAC results obtained with modified protein based food samples are significantly higher than the control samples ( $p < 0,05$ ). These results shows that modified protein-based foods can be used as functional food additives with increased antioxidant properties.

Consequently, this study offers that the treatment of CN, OVA and GLU proteins with green tea phenolics has a great potential for obtaining functional protein with increased antioxidant potential and limited glycation potential.

**Keywords:** Protein modification, protein glycation, phenolic compounds, food proteins, protein-phenol complex, quinone, furosine, carboxymethyllysine

## TEŞEKKÜR

Öncelikle, yüksek lisans çalışmam boyunca her zaman anlayışla, değerli görüş ve düşüncelerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her anlamda desteğini gördüğüm hocam sayın Prof. Dr. Vural GÖKMEN'e;

Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı 2018/1 kapsamında yüksek lisans boyunca maddi destek aldığım TÜBİTAK BİDEB'E;

Tez çalışmam süresince her türlü yardımı büyük bir anlayış ve sabırla gösteren ve desteğini esirgmeden benimle paylaşan çok sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi B. Aytül HAMZALIOĞLU'na;

Hem laboratuvar çalışmalarında hem her konuda destekleri için Ezgi DOĞAN CÖMERT ve Işıl GÜRSUL AKTAĞ'a;

Tez çalışmalarım sırasında tanıyıp, sonra da hep devam edeceğini bildiğim tüm destekleri için canım arkadaşım Merve CANLI'ya;

Yanımda her zaman olan ve olacaklarını bildiğim, tez yazım sürecindeki tüm manevi destekleri için canım arkadaşlarım Nur LALELİDAĞ, Zeynep ÇORAK ve Bilge Melis ÇAKICI'ya;

Sadece yüksek lisans çalışmam sırasında değil hayatımın her anında sabır ve inançla hep destek olan annem Zeynep YÜKSEL'e, babam Abdulkadir YÜKSEL'e ve kardeşlerim Sena YÜKSEL ve Elifsu YÜKSEL'e;

Ve son olarak her konuda hep destek olup sabırla dinlemekten hiç vazgeçmeyen Bünyamin MERT'e

sonsuz teşekkür ederim.

Zahire Ahsen YÜKSEL



# İÇİNDEKİLER TABLOSU

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER TABLOSU .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ .....	xii
SEMBOLLER ve KISALTMALAR.....	xiii
GİRİŞ .....	1
1. Genel Bilgiler.....	4
1.1. Proteinler.....	4
1.1.1. Protein Yapısı .....	4
1.1.2. Proteinlerin Fonksiyonel Özellikleri.....	6
1.1.2.1. Proteinlerin Antioksidan Özellikleri .....	7
1.1.3. Proteinlerin Reaksiyonları .....	8
1.1.3.1. Maillard Reaksiyonu ve Protein Glikasyonu .....	8
1.1.3.2. Proteinlerin Fenollerle İnteraksiyonları.....	15
1.2. Fenolik bileşikler .....	16
1.2.1. Fenolik Bileşiklerin Sağlık Üzerine Etkileri .....	17
1.2.2. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Özellikleri.....	18
1.3. Proteinlerin Fenollerle İnteraksiyonu ve Etkileri .....	19
1.3.1. Protein-Fenol İnteraksiyonunun Protein Üzerine Etkileri.....	22
1.3.1.1. Proteinin Antioksidan Özellikleri Üzerine Etkileri.....	24
1.3.1.2. Protein Glikasyonu Üzerine Etkileri .....	24
1.3.2. Protein Fenol İnteraksiyonunun Fenoller Üzerine Etkileri .....	26

2. MATERYAL VE METOTLAR .....	29
2.1. Kimyasallar ve Malzemeler .....	29
2.2. Örneklerin Hazırlanması.....	30
2.2.1. Çeşitli Proteinlerin Yeşil Çay Ekstraktı ile Modifikasyonu.....	30
2.2.2. Çeşitli Protein Bazlı Gıdaların Yeşil Çay ile Modifikasyonu.....	31
2.2.3. Modifiye Protein – Glukoz Model Sistemlerinin Hazırlanması.....	31
2.3. Gerçekleştirilen Analizler .....	32
2.3.1. Antioksidan Kapasite Ölçümü.....	33
2.3.2. Amino Asit Analizi.....	35
2.3.3. Furozin Analizi.....	36
2.3.4 Karboksimetillizin (CML) Analizi .....	36
2.3.5. İstatiksel Analiz .....	37
3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA .....	38
3.1. Yeşil Çay Ekstraktı ile Modifikasyonun Proteinler Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi .....	39
3.1.1. Modifikasyonun Protein Yapısı Üzerine Etkisi.....	39
3.1.2. Modifikasyonun Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi .....	44
3.1.3. Modifikasyonun Glikasyon Üzerine Etkisi.....	51
3.2. Yeşil Çay Ekstraktı ile Modifikasyonun Protein Bazlı Gıda Örnekleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi.....	61
3.2.1. Modifikasyonun Protein Bazlı Gıda Örneklerinde Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi.....	61
4. YORUM .....	64
5. KAYNAKLAR .....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	80

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1</b>	Bir amino asidin -COOH grubu ile diğer bir amino asidin -NH <sub>2</sub> grubunun peptit (amid) bağı ile bağlanması .....	5
<b>Şekil 1.2</b>	Maillard reaksiyonunun mekanizması [14] .....	9
<b>Şekil 1.3</b>	Protein glikasyonunun genel şeması (Glukoz olduğunda R1 hidrojenidir (H). R2, R3, R4 için MG-H1 durumunda metil grubudur. ) [19] .....	10
<b>Şekil 1.4</b>	Amadori ürünlerinin asit hidrolizi boyunca furozin oluşumu [19] .....	12
<b>Şekil 1.5</b>	CML oluşum yolu (Han ve ark.'larından uyarlanmıştır) [60] .....	13
<b>Şekil 1.6</b>	Alkali ortamda enzimatik olmayan o-semi-kinonların oluşumu [15] (Cilliers ve Singleton'dan uyarlanmıştır, 1991) .....	20
<b>Şekil 1.7</b>	Nükleofilik 1,4-Michael katılması ile tiyol ve amin grupları ile kinon reaksiyonu .....	21
<b>Şekil 2.1</b>	Çeşitli proteinlerin yeşil çay ile modifikasyon aşamaları.....	30
<b>Şekil 2.2</b>	Model sistemin hazırlanması .....	32
<b>Şekil 2.3</b>	Tez kapsamında gerçekleştirilen analizler.....	33
<b>Şekil 3.1</b>	(a) Modifiye edilmemiş KN (kontrol) , (b) pH 8'de, (c) pH 10'da, (d) pH 12'de YÇE ile modifiye edilen KN için % lizin miktarları .....	40
<b>Şekil 3.2</b>	(a) Modifiye edilmemiş OVA (kontrol), (b) pH 8'de, (c) pH 10'da, (d) pH 12'de YÇE ile modifiye edilen OVA için % lizin miktarları.....	40
<b>Şekil 3.3</b>	(a) Modifiye edilmemiş GLU (kontrol), (b) pH 8'de, (c) pH 10'da, (d) pH 12'de YÇE ile modifiye edilen GLU için % lizin miktarları.....	41
<b>Şekil 3.4</b>	Yeşil çay fenolik bileşikleri ile proteinlerin lizin kalıntıları arasındaki reaksiyon için önerilen mekanizma [168].....	44
<b>Şekil 3.5</b>	pH 8, pH 10 ve pH 12'de 25 ve 50°C'de modifiye edilen (a) KN, (b) OVA, (c) GLU proteinlerinin antioksidan kapasitelerinin reaksiyon süresince değişimi (sonuçlar ortalama n=37 ±standart sapma olarak verilmektedir).47	
<b>Şekil 3.6</b>	(a) pH 8'de ve (b) pH 10'da 50°C 120 dakika YÇE ile modifiye edilmiş KN proteininin 100°C 'de 15 dakika boyunca farklı konsantrasyonlardaki glukoz ile ısıtılması süresince oluşan FUROZİN ve CML (mmol/g örnek) miktarlarındaki değişim (Sonuçlar ortalama n=32 ±standart sapma olarak verilmektedir) .....	52

- Şekil 3.7** (a) pH 8’de ve (b) pH 10’da 50°C 120 dakika YÇE ile modifiye edilmiş OVA proteininin 100°C ‘de 15 dakika boyunca farklı konsantrasyonlardaki glukoz ile ısıtılması süresince oluşan FUROZİN ve CML (mmol/g örnek) miktarlarındaki değişim (Sonuçlar ortalama n=32 ±standart sapma olarak verilmektedir)..... 54
- Şekil 3.8** (a) pH 8’de ve (b) pH 10’da 50°C 120 dakika YÇE ile modifiye edilmiş GLU proteininin 100°C ‘de 15 dakika boyunca farklı konsantrasyonlardaki glukoz ile ısıtılması süresince oluşan FUROZİN ve CML (mmol/g örnek) miktarlarındaki değişim (Sonuçlar ortalama n=32 ±standart sapma olarak verilmektedir)..... 56
- Şekil 3.9** Farklı kateşin konsantrasyonları eklenerek 100°C ‘de 15 dakika boyunca ısıtılan ovalbuminin FUR (a) ve CML (b) miktarlarındaki değişim (sonuçlar ortalama n=10 ±standart sapma olarak verilmektedir)..... 59
- Şekil 3.10** Protein bazlı gıda örneklerinin pH 10’da 50 °C’de 120 dakika boyunca YÇE ile muamele edilmesi sonucunda TAK değerleri..... 62

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 3.1</b>	Amino asit kompozisyonu (mmol/g protein) .....	38
<b>Tablo 3.2</b>	Kontrol ve modifiye KN örneklerinde histidin, arjinin ve triptofan için yüzde azalış miktarları .....	42
<b>Tablo 3.3</b>	Kontrol ve modifiye OVA örneklerinde histidin, arjinin ve triptofan için yüzde azalış miktarları .....	42
<b>Tablo 3.4</b>	Kontrol ve modifiye GLU örneklerinde histidin, arjinin ve triptofan için yüzde azalış miktarları .....	42

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR

### Semboller

T	Sıcaklık
t	Süre

### Kısaltmalar

ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzothiazolin-6-sülfonik asit)
AGE	Advanced glycation end products (İleri glikasyon son ürünleri)
$a_w$	Su aktivitesi
CML	Karboksimetil lizin
DOLD	3-deoksiglukozon lizin dimeri
FL	Fruktozillizin
FUR	Furozin
GLC	Glukoz
GLU	Gluten
GOLD	Gliksal lizin dimeri
H	Hidrojen
HMF	5-hidroksimetil furfural
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
KN	Kazein
LoQ	Kuantifikasyon limiti
MOLD	Metilgliksal lizin dimeri
MRM	Çoklu reaksiyon izleme (Multiple reaction monitoring)
MS	Kütle spektrometrisi
OVA	Ovalbumin
pI	İzoelektrik nokta
pKa	Asidik ayrışma sabiti
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (sosyal bilimler için istatistik paketi)
TAK	Total antioksidan kapasite

TE	Troloks eşdeğerliği
TEAC	Troloks eşdeğerlik antioksidan kapasite
YÇE	Yeşil çay ekstraktı (Green tea extract)
YÇT	Yeşil çay tozu

## GİRİŞ

Proteinler beslenme açısından ve fonksiyonel özellikleri sebebiyle çok önemli gıda bileşenleridir. Oldukça karmaşık bir yapıya sahip proteinlerin besinsel değerleri ile vücudun elzem amino asitlere olan ihtiyacını karşılamalarının yanı sıra gıdalara kazandırdıkları özellikler arasında emülsifiye edebilme kabiliyetleri, antimikrobiyal aktivite, köpük ve jel oluşturma, lezzet bağlama veya film oluşturma özellikleri yer almaktadır. Bu özelliklerine, gıda sistemlerinde antioksidan olarak kullanımları da eklenebilir [1].

Proteinlerin modifikasyonu henüz gıda işlemede yaygın bir yöntem olmasa da dünyada sürekli artmakta olan beslenme sorunları, yeni hammaddelerin kullanılmasını gerektirmektedir ve bu sorunların giderilmesi açısından protein modifikasyonu her geçen gün önem kazanmaktadır. Proteinlerin gıdadaki yapısal, fonksiyonel ve beslenme özellikleri açısından birçok işlevi yerine getiren bileşenler olması çeşitli modifikasyonlar ile kullanım alanlarını genişletecek ve bunun yanında fiziksel özelliklerin gelişmesine, istenmeyen bileşiklerin, enzimlerin veya alerjenlerin azaltılmasına ve/veya yok edilmesine imkan verecektir. Bu sebeple modifikasyonlar aracılığıyla protein yapısını değiştirmek yeni hammaddelerin ortaya çıkmasını sağlayabileceği gibi gıdalarda gıda güvenliğinin ve fonksiyonel özelliklerin geliştirilmesi anlamında önemlidir. Proteinler, buldukları gıda içerisinde yer alan fenolik bileşikler ile çeşitli etkileşimler sonucu kompleksler oluşturabilirler. Protein-fenol türevlerinin antioksidan aktiviteleri, yapısal farklılıklara ve çevresel koşullara bağlı olarak değişkenlik gösterebilir [2, 3]. Proteine bağlı fenolik bir bileşik, protein yapısı içinde radikal süpürücü etkilere sahip olabilir ve radikallerin azaltılmasında işlev görebilir. Böylece proteini karbonil grupları gibi protein oksidasyon ürünlerinin oluşumuna karşı koruyan potansiyel bir moleküller arası antioksidan olabilir.

Antioksidanlar; reaktif oksijen türlerini nötralize etmek, metal iyonlarının bağlanmasını veya inaktivasyonu sağlamak gibi çeşitli farklı mekanizmalarla serbest radikallere karşı koruyucu olarak yer alabilirler. Oksidatif stresle başa çıkmaya yardımcı antioksidan tüketimi hücreye zarar veren serbest radikallerin etkilerini ortadan kaldırabilir veya azaltabilir. Antioksidanlar olarak fenolik bileşiklerin hücre bileşenlerini oksidatif hasara karşı koruyabileceği ve bu nedenle oksidatif stresle ilişkili çeşitli dejeneratif hastalık



riskini sınırlayabileceğine dair kanıtlar vardır. Antioksidan aktiviteleri sebebiyle fenolik bileşik tüketiminin sağlık üzerinde pek çok yararlı etkisi olduğu bilinmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, kronik insan hastalıkları riski ile fenolik bileşikçe zengin diyet tüketiminin arasında ters bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Fenolik bileşiklerde fenolik gruplar, nispeten kararlı fenoksil radikalleri oluşturmak için bir elektron kabul edebilir ve böylece hücrel bileşenlerde zincir oksidasyon reaksiyonlarını bozabilir. [4] Fenolik bileşiklerce zengin gıdaların düzenli alınmasının insan sağlığını desteklediği ve hastalıklardan korunmaya yardımcı olduğu bilinmektedir ve fenolik bileşikler bakımından zengin diyetler kanser, diyabet, kardiyovasküler problemler ve yaşlanma gibi birçok kronik patolojik durumun gelişmesine ve ilerlemesine karşı önemli bir koruma sağlayabilir. Bu sebeplerden, antioksidan özellikli bileşiklerce zengin gıdaların tüketimi önem arz etmektedir.

Bunların yanında fenolik bileşikler antioksidan aktiviteleri ve karbonil yakalama kabiliyetleri ile de gıda endüstrisi için önemli olan Maillard reaksiyonunun istenmeyen ürünlerinin oluşumu üzerinde azaltıcı bir mekanizmaya sahiptir. Maillard reaksiyonu sonucu protein glikasyonu proteinlerin yapılarının değişmesine ve çeşitli işlevsel bozukluklara neden olabilirler ve in vivo koşullar altında diyabet, Alzheimer, ateroskleroz gibi çeşitli kronik ve dejeneratif hastalıkları teşvik edebilecekleri bildirilmiştir [5, 6]. Hayvan ve insan çalışmalarının sonuçları, diyetteki Maillard reaksiyon ürünü olan AGE düzeylerinin vücutta AGE birikiminin doğrudan ve dolaylı etkilerine ve dejeneratif hastalıklarda daha fazla komplikasyona sahip olduğunu doğrulamaktadır. Bu yüzden Maillard reaksiyonu ile oluşan istenmeyen bileşiklerin besinsel olarak alınmasının azaltılmasına yardımcı olabilmesi adına, gıda prosesi boyunca glikasyon reaksiyonlarının inhibisyonu önemlidir.

Bu tez kapsamında protein – fenol interaksyonu sonucunda çeşitli fonksiyonel özellikleri arttırılmış modifiye protein elde edilmesi amaçlanmaktadır. Bu bağlamda proteinlerin yeşil çay ekstraktı ile farklı alkali pH'larda, farklı etkileşim süresi ve sıcaklıklarda modifikasyonu gerçekleştirilerek, bu koşulların modifikasyon üzerine etkileri belirlenecektir. Proteinlerin yeşil çayla interaksyonu, proteinin antioksidan kapasitesinde artış yaratırken, aynı zamanda protein yan zincirlerindeki reaktif grupların fenolik bileşikler tarafından eliminasyonu da gerçekleşecektir. Bunun doğal bir sonucu olarak da, protein glikasyon davranışını etkilemesi beklenmektedir. Bu çalışma

kapsamında, modifiye edilen proteinlerin antioksidan özelliklerinde ve glikasyon potansiyellerindeki değişim izlenerek, modifikasyonun proteinlerin bu özelliklerini geliştirme açısından başarısı sorgulanacak, sonrasında bu koşullar çeşitli gıda materyallerine uygulanarak fonksiyon özellikleri geliştirilmiş protein elde edilecektir.

# 1. Genel Bilgiler

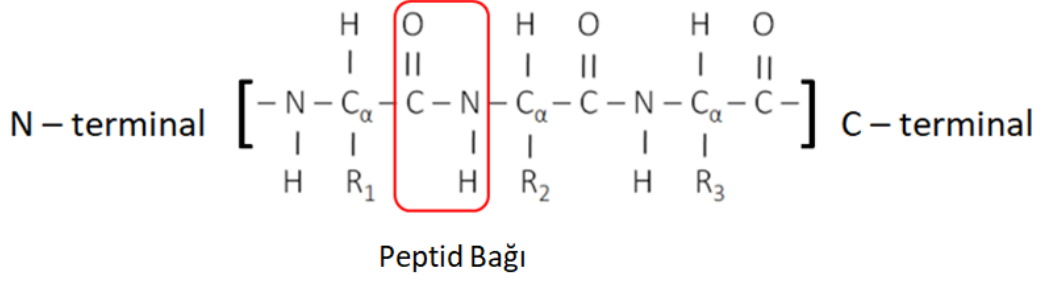
## 1.1. Proteinler

Tüm proteinler 20 amino asitten oluşmuşlardır ve oldukça karmaşık polimerlerdir [7]. Nispi moleküler ağırlıkları 10000 ila birkaç milyon dalton arasında değişmektedir [8]. Binlerce proteinin yapı ve fonksiyolarındaki farklılıklar, amino asitlerin diziliminden kaynaklanmaktadır [7]. Bir protein zincirindeki amino asitleri bağlayan peptit bağlarına ek olarak, diğer bazı kovalent bağlar protein yapısının önemli belirleyicileri olabilir [8]. Kovalent bağların yanı sıra, iyonik, hidrojen ve hidrofobik interaksiyonlar gibi çeşitli elektrostatik interaksiyonlar da protein yapısı için önemlidir.

### 1.1.1. Protein Yapısı

Primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner olmak üzere 4 protein yapısı bulunmaktadır. Proteinlerin primer yapısı; kovalent bağlı amino asit moleküllerinin yapısını, peptit zincirindeki amino asitlerin sayısını ve sırasını, temel peptit bağlarının karakterini ve sayısını, diğer kovalent bağların (disülfid köprüleri ve diğer bağlar) pozisyonu ve karakteri hakkındaki verileri içerir [8].

Bir proteinin primer yapısı, peptit bağları (Şekil 1.1) olarak da bilinen, amino asit bileşenlerinin amid bağları yoluyla kovalent olarak bağlandığı doğrusal dizilimi ifade eder [7]. Bu düz zincirde yer alan amino asit kalıntılarının hepsi L-konfigürasyonunda olup  $n$  sayıda amino asit,  $n-1$  sayıda peptit bağı ile birbirine bağlanmıştır. Zincir uzunluğu ( $n$ ) ve  $n$  kalıntıların bağlandığı sekans, bir proteinin fizikokimyasal, yapısal, biyolojik özelliklerini ve fonksiyonlarını belirler. Amino asit dizilimi sekonder ve tersiyer yapıların oluşumu için bir kod görevi görür ve proteinin biyolojik fonksiyonunu belirler [7].



**Şekil 1.1** Bir amino asidin -COOH grubu ile diğer bir amino asidin -NH<sub>2</sub> grubunun peptit (amid) bağı ile bağlanması

Sekonder yapı, polipeptit zincirinin belirli segmentlerinde amino asit kalıntılarının periyodik olarak uzaysal düzenlenmesini ifade eder [7]. Doğal proteinlerin polipeptit zincirleri, zincirin farklı kısımlarında belirli sekonder yapıya sahiptir [8]. Zincirin belirli bir uzaysal konformasyonu, amino asitlerin fonksiyonel gruplarının kovalent olmayan etkileşimleriyle sabitlenen primer yapısı (amino asit dizisi) ile verilir. Amino asitler hidrofobik yan zincirlere sahip olduğunda hidrofobik etkileşimler mevcuttur, yan zincirde elektrik yükü olan amino asitler (asidik ve bazik hidrofilik amino asitler) elektrostatik etkileşimlere katılır ve diğer hidrofilik ve amfifilik amino asitler fonksiyonel grupları aracılığıyla hidrojen bağları oluşturabilirler. Proteinlerde yaygın olarak; heliks, levha ve dönmeli olmak üzere üç tane sekonder yapı vardır.

Sekonder yapının (polipeptit zincirinin konformasyonu) en önemli unsurları, peptit zincirlerinin sarmal yapısından kaynaklanan spiral yapılardır. Heliks olarak bilinen bu yapılar C<sub>α</sub> atomuna komşu olan peptit zincirlerinin bir araya gelmelerinden oluşur. Proteinin temel sekonder yapısı α-helikstir. α-heliks, moleküller arası hidrojen bağlarının önemli rol oynadığı, polipeptit zincirinin katı bir düzenlemesidir.

β-yapılar; β-kıvrımlı tabakalar veya sadece β-tabakalar olarak da bilinen proteinlerin biraz daha az yaygın olan düzenli sekonder yapılarıdır. Bunlar, kompakt helikslerin aksine uzun uzatılmış polipeptit zincirleri ile karakterize edilir [8].

Bir protein molekülünün tersiyer yapısı, komşu moleküller veya alt birimler ile olan ilişkisine bakılmaksızın, tüm atomlarının uzaydaki (konformasyon) düzenidir. Bütün bir polipeptid zincirinde yer alan bağımsız bazı peptid zinciri bölümlerinin (α-heliks, β-pilili ve düzensiz sargı gibi) birbirlerine göre katlanmasını ifade eder. Bu sekonder yapı

birimleri düzlemsel olmayabilir ancak bükülmüş veya katlanmış olabilir, dolayısıyla birbirlerine farklı şekillerde bağlanmış olabilirler [8]. Amino asitlerin fonksiyonel grupları arasındaki disülfid köprüleri gibi çeşitli kovalent bağlar ile elektrostatik ve hidrofobik interaksiyonlar gibi kovalent olmayan interaksiyonlar, tek tek protein bölümlerinin bağlanmasına ve tersiyer yapının tam olarak sabitlenmesine katkı sağlar [8].

Bazı proteinler tek değil birden fazla özdeş veya farklı polipeptid zincirinden oluşabilir ve ortaya çıkan bu karmaşık yapı, proteinin kuaterner yapısı olarak bilinir. Kuaterner yapı, protein alt birimlerinin uzayda düzenlenmesi ve alt birimlerin iç geometrisine bakılmaksızın, aralarındaki temasların ve etkileşimlerin birleşmesidir. Bir kuaterner yapıdaki alt birimler kovalent olmayan bir birliktelik içinde olmalıdır. Bu nedenle, bir kuaterner yapı sadece karmaşık bir proteinde birden fazla polipeptid zinciri varsa bulunur.

### **1.1.2. Proteinlerin Fonksiyonel Özellikleri**

Proteinlerin fonksiyonel özellikleri genel olarak, nihai ürünün kalite özelliklerine göre, gıda sistemlerinde proteinin işlenmesini ve davranışını etkileyen herhangi bir fizikokimyasal özelliği gösterir [9]. Proteinler, gıdaların duyuşal özellikleri üzerinde büyük etkiye sahiptirler [7]. Diğer gıda bileşenleri ile ortak olarak proteinler, gıda maddelerinin fiziksel özelliklerine; özellikle jelleşme, köpük oluşturma, hamur oluşturma, emülsiyon ve fibriler yapıları oluşturma veya stabilize etme yetenekleri ile önemli ölçüde katkıda bulunur [10]. Örneğin; fırıncılık ürünlerinin duyuşal özellikleri buğday gluteninin viskoelastik ve hamur oluşturuşu özellikleri ile ilişkilidir, et ürünlerinin tekstürel ve sulu olma özellikleri büyük ölçüde kas proteinlerine (aktin, miyozin, aktomyozin ve birçok çözüner et proteini) bağlıdır, süt ürünlerinin tekstürel ve pıhtı oluşturma özellikleri kazein misellerinin kendine özgü kolloidal yapısından kaynaklanmaktadır ve keklerin yapısı ve bazı tatlı ürünlerinin çırpma özellikleri yumurta beyazı proteininin özelliklerine bağlıdır. Fonksiyonel özelliklerinin yanı sıra proteinlerin lipit oksidasyonunu inhibe edebilme yetenekleri antioksidan savunmasında onları önemli bir bileşen haline getirmektedir [11].

### 1.1.2.1. Proteinlerin Antioksidan Özellikleri

Birçok gıda proteininin kendiliğinden antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir. Örneğin; laktoferrin,  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -lg) ve kazein gibi süt proteinlerinin ve soya proteinlerinin gıdalardaki lipit oksidasyon reaksiyonlarını inhibe etme kabiliyetleri olduğu bildirilmiştir [1, 11]. Proteinler antioksidan aktivitelerini yapılarındaki amino asitlerin yan zincirlerine borçludurlar. Tirozin, fenilalanin ve triptofan gibi aromatik amino asitlerin ve sistein ile metiyonin gibi kükürt içeren amino asitlerin antioksidan aktiviteleri, serbest radikallere proton bağışlama yeteneklerinden kaynaklanmaktadır [11]. Bazik bir amino asit olan histidin, imidazol halkası nedeniyle hem radikal sönümleyici hem de metal şelatlayıcı ajan olarak davranabileceği rapor edilmiştir [1].

Protein şelatlayıcı ajanların oksidatif reaksiyonları inhibe edebilmesindeki etki mekanizmaları şu şekildedir [11];

- çözünmeyen metal kompleksler oluşturmak,
- geçiş metallerinin fiziksel yerini değiştirmek (örneğin, metalleri oksidatif olarak kararsız lipitlerden veya lipit hidroperoksitlerden ayırmak)
- geçiş metallerinin kimyasal reaktivitesini azaltmak
- metallerin ve dağılmış lipidlerin etkileşimini sterik olarak engellemek.

Ayrıca proteinlerin katyonik özellikleri antioksidan aktiviteleri açısından önemlidir. Çünkü pozitif yüklü R-grupları, geçiş metallerini lipit damlacıklarından elektrostatik olarak iterek lipit oksidasyon reaksiyonlarını engeller [11].

Gıda proteinlerinin avantajları arasında besinsel değerleri, emülsifiye edebilme kabiliyetleri, mikrobiyel aktiviteleri, köpük ve jel oluşturma, lezzet bağlama veya film oluşturma özellikleri gibi birçok özelliklerinin yanı sıra, gıda sistemlerinde antioksidan olarak kullanımları da bulunabilir [1]. Bununla beraber, proteinlerin lipit oksidasyonunu inhibe etmek için kullanımı, gıda ürünlerinde jelleşme ve vizkozite artışına yol açmaları sebebiyle dokuyu, Maillard reaksiyonu aracılığıyla oluşan esmerleşme sebebiyle rengi ve oluşan bitter bileşikler nedeniyle aromayı etkilediğinden sınırlı kalmaktadır [11].

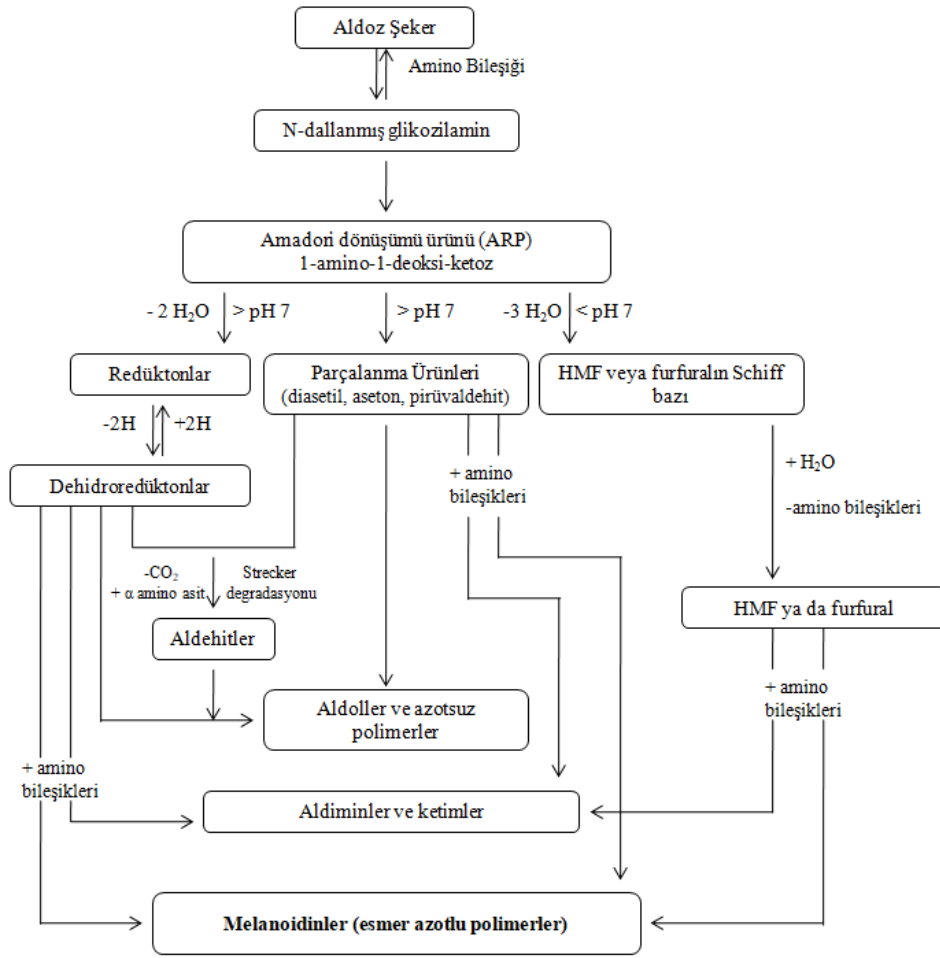
Proteinlerin antioksidan özelliklerinin fenolik antioksidanlarla birlikte olduklarında artış gösterdiği bildirilmiştir. Bu konu ayrıntılı olarak 1.3.1.1.'de tartışılacaktır.

### **1.1.3. Proteinlerin Reaksiyonları**

#### **1.1.3.1.Maillard Reaksiyonu ve Protein Glikasyonu**

Gıdaların yapısında bulunan proteinler, gıdalara uygulanan ısıl işlemler sonucunda bir dizi değişime uğrar. Proteinlerin ısıl işlem sırasında geçirdiği en önemli değişimlerden birisi de 1912 yılında Louise Camille Maillard tarafından ortaya konmuş olan Maillard reaksiyonudur [12]. Maillard reaksiyonu gıda endüstrisinde ısıl işlem sonucu gerçekleşen en önemli reaksiyonlardan biridir. Çünkü aroma, tat, renk ve lezzette değişikliklere neden olurken aynı zamanda bazı kanserojen ve mutajen bileşiklerin oluşumu da reaksiyon sırasında gerçekleşir.

Enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu olarak da bilinen Maillard reaksiyonu, kondensasyon, eliminasyon ve bozunma mekanizmalarını içeren bir dizi karmaşık reaksiyondur [13]. Bu reaksiyon mekanizması (Şekil 1.2) Hodge tarafından 1953 yılında tanımlanmıştır [14]. Daha sonra başka araştırmacılar tarafından reaksiyon yolu ile ilgili daha fazla tanımlama yapılmıştır [15, 16].



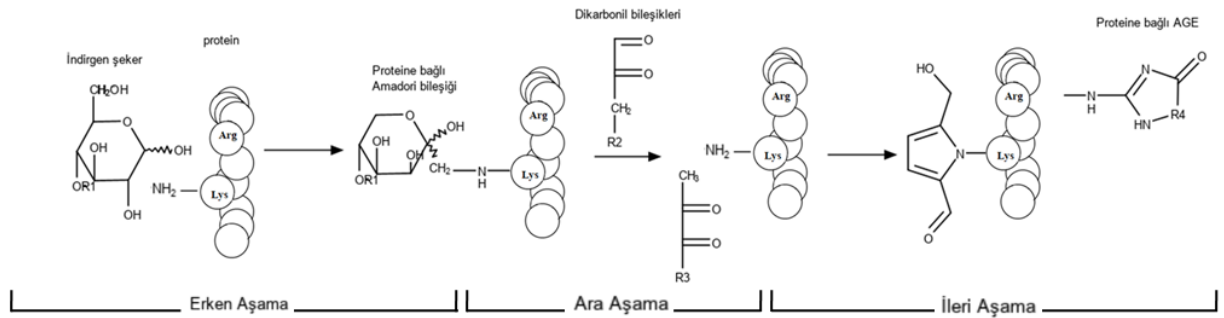
**Şekil 1.2** Maillard reaksiyonunun mekanizması [14]

Mekanizma başlangıç, orta ve son aşama olmak üzere 3 aşamaya ayrılır ve bu aşamaların her biri farklı reaksiyonlar içerir [14]. İlk aşama, amino asit, peptit ya da proteinin serbest amino grubunun glukoz, fruktoz, laktoz ve maltoz gibi indirgen şekerlerin karbonil grubuna nükleofilik eklenmesi ile başlar. Kondensasyon (yoğunlaşma) reaksiyonundan sonra, Schiff bazı, reaksiyonun ilk kararlı ürünü olan Amadori ürünü olarak adlandırılan  $\epsilon$ - veya  $\alpha$ -deoksiketozil amino asit ya da aminoketoz formunu oluşturmak için bir düzenlemeye gider. Eğer indirgen şeker ketoz ise Heyn's ürünü olarak adlandırılan 2-amino-2-deoksi aldoz oluşur. Amadori ürününün bozulması pH'a bağlıdır; pH 7'de veya altında, furfural veya hidrokümetilfurfural (HMF) oluşumu ile esas olarak 1,2-enolizasyona uğrarken, 4-hidroksi-5-metil-2,3-dihidrofuran-3-on gibi indirgeyiciler ve fizyon ürünleri (asetol, pirüvaldehit ve diasetil) esas olarak 2,3 enolizasyon yoluyla pH 7'nin üzerinde oluşturulur. Bu bileşikler çok reaktiftirler ve başka reaksiyonlarda yer alabilirler. Dikarboniller gerçekleşen kompleks reaksiyonlar sırasında amino bileşikleriyle kolaylıkla reaksiyona girerek aldehitleri ve  $\alpha$ -aminoketozları oluştururlar. Bu Strecker degradasyonu olarak bilinir. Reaksiyonun ileri



aşamalarında, melanoidin olarak bilinen kahverengi azotlu polimerlerin oluşumuna yol açan siklizasyonlar, dehidrasyonlar, retro-aldolizasyonlar, yeniden düzenlenmeler, izomerizasyonlar ve daha fazla yoğunlaşma gerçekleşir [14]. Bugün hala Hodge şeması Maillard reaksiyonu mekanizması için temeldir.

Maillard reaksiyonu, bu reaksiyonun sadece gıdalarda ısıtma sırasında değil aynı zamanda canlı içinde de gerçekleştiği anlaşıldıktan sonra çok daha fazla dikkat çekmiştir. Diyabetik hastaların kanında enzimatik olmayan glikozile olmuş bir hemoglobin varyantı olan HbA<sub>1c</sub>'nin tanımlanması ile literatüre “glikasyon” terimi getirilmiştir [17]. Başka bir çalışmada, proteinlerin Maillard reaksiyonunun hücre dışı matris proteinlerinin ve ilgili patolojilerin yaşlanmasında nedensel bir rol oynayabileceğini ve bunun da Maillard reaksiyonunun canlı içinde gerçekleşmesine olan ilginin kaynağı olduğu söylenmiştir [18]. Glikasyon, protein molekülüne şeker parçasının eklenmesidir ve Maillard reaksiyonu boyunca gerçekleşir. Glikasyonun Hodge’ye benzer şekilde yaygın olarak 3 aşamada (Şekil 1.3 Protein glikasyonunun genel şeması) gerçekleştiği kabul edilir. Bunlar; erken, ara ve ileri aşamalarıdır.



**Şekil 1.3** Protein glikasyonunun genel şeması (Glukoz olduğunda R1 hidrojenidir (H). R2, R3, R4 için MG-H1 durumunda metil grubudur.) [19]

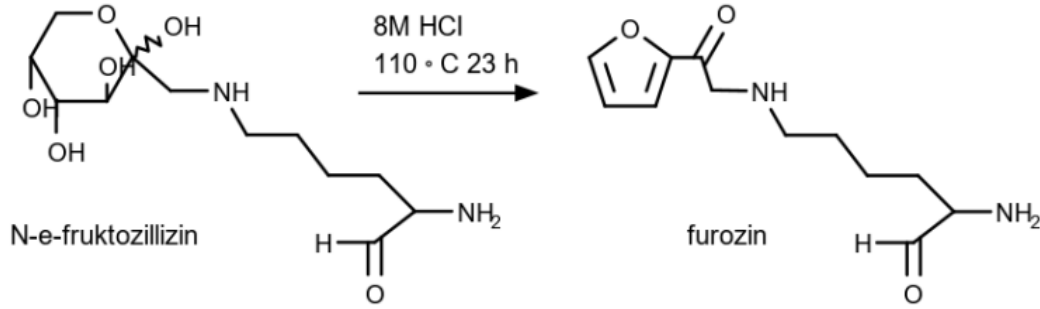
Amadori bileşikleri protein glikasyonunun erken aşamasında oluşurlar ve oluşan bileşikler; N-ε-fruktozillizin, N-ε-maltulozillizin ya da N-ε-laktulozillizin olarak sıralanabilir [19]. Glikasyonun ara aşamasında, 1,2-dikarbonil bileşikleri oluşur. Dikarbonil bileşikleri proteinlerin ve peptidlerin yan zincirleri ile reaksiyona girerek ileri glikasyon son ürünlerini (AGEs) oluştururlar. Peptide bağlı lizin ve arjinin kalıntılarının yan zincirleri, 1,2-dikarbonil bileşikleri ile türevlenmeye duyarlıdır [19]. Şimdiye kadar, N-ε-fruktozillizin (FL), pirlalin, pentozidin, N-ε-karboksimetillizin (CML), N-ε-karboksietillizin, S-karboksimetilsistein, glioksal lizin dimeri (GOLD),

metiloksal lizin dimeri (MOLD), 3-deoksiglukozon lizin dimeri (DOLD) gibi birçok glikasyon ürünü proses gıdalarda tanımlanmıştır [13, 20-22].

Gıda sistemlerinde glikasyon ürünlerinin oluşumu ısı işlemin şiddeti, reaksiyon ortamı (su miktarı, su aktivitesi), reaktant türleri, reaksiyon ortamının pH'sı, oksijen varlığı ve protein konformasyonu gibi faktörlere bağlıdır [23, 24]. Sıcaklık ve ısıtma süresi glikasyon oranını etkileyen temel faktördür. Isıtmadaki sıcaklık artışı glikasyonu hızlandırır. Hafif ısı işlem Amadori ürünlerinin oluşumuyla sonuçlanır. Ancak ısıtma sıcaklığı veya ısıtma süresi uzadığında, Amadori ürünlerinin degradasyonu AGE'lerin ve dikarbonillerin oluşumuna neden olur. Sulu ortamlarda reaktantların dilüsyon etkilerinden dolayı kuru reaksiyon ortamında glikasyon, sulu reaksiyon ortamına oranla daha fazla ilerler. Ayrıca, su varlığında, Amadori yeniden düzenlenme ürünü oluşumu sınırlıdır. Çünkü karbonil ve amin grubu arasındaki kondensasyon reaksiyonu sonucunda su açığa çıkar [23]. Su aktivitesi ( $a_w$ ), reaktantların moleküler hareketliliğini, protein konformasyonunu, yüzey alanını, ortamın çözünmüş oksijenini ve pH'nın yanı sıra amino gruplarının erişilebilirliğini etkiler [24]. Su aktivitesinin reaksiyonun hızı üzerinde bir etkisi vardır ve genellikle 0,5-0,8 arasındaki  $a_w$  değerlerinde esmerleşmenin maksimumda meydana geldiği düşünülür [25]. Proteinler, karbonil gruplarıyla öncelikle lizin kalıntılarının  $\epsilon$ -amino grubu yoluyla reaksiyona girerler. Daha küçük bir oranda, N-terminal amino asitin  $\alpha$ -amino grupları, sisteinin tiyol grubu ve arjininin guanidin grubu gibi diğer amino asitlerin fonksiyonel grupları da Maillard reaksiyonunda yer alır. Bir protein molekülü içindeki bu glikasyon alanlarının mevcudiyeti reaksiyonun derecesini büyük ölçüde etkiler. Bir protein molekülü içindeki glikasyon bölgelerinin erişilebilirliği onun konformasyonuna bağlıdır. Bu nedenle protein konformasyonunu etkileyen herhangi bir çevresel faktörün glikasyon davranışı üzerinde etkisi vardır. Örneğin pH veya sıcaklığa bağlı değişikliklerin (denatürasyon, kümeleşme veya hidroliz) protein yapısı üzerinde, dolayısıyla üretilen gliko bileşikler üzerinde etkisi olacaktır. Reaksiyon ortamının kompozisyonu (lipidlerin, minerallerin, diğer proteinlerin, indirgen ajanların varlığı) ve proteinlere bağlı karbonilin moleküler ağırlığı protein konformasyonunu etkiler [24]. Yapılan bir çalışmada ovalbuminin tersiyer yapısının bozulmasıyla glikasyona açık hale geldiği gözlemlenmiştir [26]. Birçok araştırmacı, lizin kalıntılarının yapısal erişilebilirliğinin, glikasyonu etkileyen en önemli faktör olduğunu öne sürmüştür [27, 28]. Protein glikasyonunu etkileyen faktörlerden biri reaksiyon ortamının pH'sıdır. Bazı çalışmalarda, pH'daki artışın glikasyonu

arttırdığı gösterilmiştir [29, 30]. Proteinlerin glikasyonunu etkilen diğer bir faktör ortamdaki oksijen varlığıdır. Yapılan bir çalışmada, oksijenin glikasyon seviyesinde ve yumurta proteininin glikasyon seçiciliğinde değişikliklere neden olduğu ve oksijen varlığında glikasyonun arttığı gösterilmiştir [31].

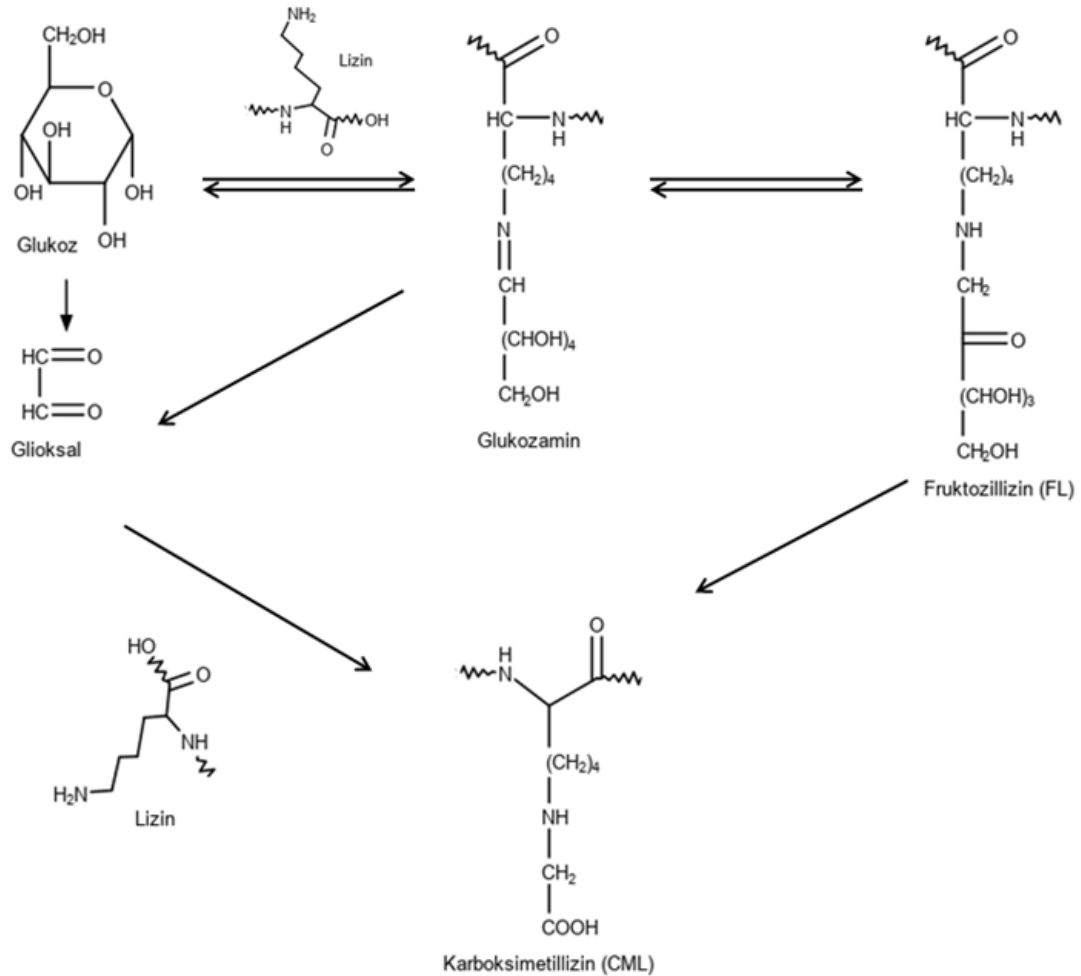
Gıdalarda ilk tanımlanan erken glikasyon ürünlerinden biri furozindir ve Amadori ürününün en yaygın kimyasal göstergesidir [32]. Furozin, 1966'daki tespitinden bu yana gıdalarda termal hasarın indikatörü olarak kullanılmaktadır [32]. Furozin, lizin kalıntısının laktoz, fruktoz, maltoz ve galaktoz ile reaksiyona sokulmasıyla üretilen N-ε-laktozillizin, N-ε-fruktozillizin, N-ε-maltulozillizin ve tagatozillizin gibi Amadori ürünlerinin hidrolizi ile oluşur [33] (Şekil 1.4). Genel olarak furozin hidrolizi için, 110°C'de 23 saat boyunca 6N ya da 8N HCl gibi kuvvetli bir asit kullanılır [34].



**Şekil 1.4** Amadori ürünlerinin asit hidrolizi boyunca furozin oluşumu [19]

N-ε-fruktozillizin oluşumu proteinlerin besinsel kaybına sebep olabilir. Çünkü ortaya çıkan modifikasyondan dolayı lizin biyoyararlanımı azalır. Lizin, bir temel amino asittir. Bu yüzden, furozin oluşumu ısıl işlem görmüş gıdaların besinsel kalitesinin değerlendirilmesi açısından pek çok gıdada araştırılmaktadır. Furozin içeriği süt ürünlerinde, balda, tahıllarda, makarnada ve diğer bazı gıda ürünlerinde kalite göstergesi olarak ölçülmektedir [35-39]. Gıdalarda furozin konsantrasyonu her zaman ısıl işlemin şiddeti ile ilişkili değildir. Daha şiddetli ısıl işlem uygulanan örneklerde glikasyon prosesinin ilerlemesinden dolayı furozin içeriği tekrar azalır. Bu azalış, bazı ara ürünlerin ve AGE'lerin oluşumundan kaynaklanabilmektedir. Daha şiddetli ısıl işlem görmüş gıda ürünlerinde, karboksimetillizin (CML) protein hasarı hakkında ek bilgi verir [33]. CML, gıdalarda ve canlı içinde oluşan temel AGE yapısı içinde

kuantifiye edilmiş ileri glikasyon ürünlerinin ilk ve en yaygın olanıdır. Oksidatif yolda glioksal glukozdan türetilir ve daha sonra CML oluşturmak için lizin kalıntıları ile reaksiyona girer [40]. Namiki tarafından belirlenen yolda ise CML, lizin kalıntıları ve Schiff bazından elde edilen glioksal ile reaksiyon sonucunda oluşur [41]. CML oluşturmak için diğer bir oluşum yolu (Şekil 1.6), Amadori yeniden düzenlenmesi ile oluşan N-ε-fruktozillizin oksitlenmesidir [42].



**Şekil 1.5** CML oluşum yolu (Han ve ark.'larından uyarlanmıştır) [60]

Proteinlerin glikasyonu, proteinlerin farklı katlanmasına ve dolayısıyla işlevsel bozukluklara sebep olur. Örneğin, AGE'ler proteinlerin çapraz bağlanması, matris bileşenlerinin modifikasyonu, trombosit agregasyonu, kusurlu vasküler gevşeme ve anormal lipoprotein metabolizması ile ateroskleroza hızlandırır [5]. Bir çalışmada, diyabet hastalarının vücut proteinlerinin artan kan şekeri seviyesinden dolayı sağlıklı insanlardakine göre 2-3 kat daha fazla glikolize olduğu bulunmuştur [43]. Bu

hastalarda, protein glikasyonunun vücuttaki etkilerine daha fazla rastlanmaktadır. İlerleyen yaş, diyabet ve ileri seviye böbrek yetmezliği olan hastalarda aterosklerotik vasküler hastalıkların daha sıklıkla gözlendiği belirtilmiştir [5, 44]. AGE'ler genel olarak kolajen ve lens proteinleri gibi uzun yaşayan ve devir hızları düşük proteinlerde birikirler. AGE'lerin vücut proteinlerindeki seviyesi yaşlanma boyunca artar ve katarakt hastalığı diyabetli hastalarda görülen protein glikasyonunun en yaygın sonuçlarından biridir [18]. Bir çalışmada, Maillard reaksiyonunun ilk aşamasının in vivo olarak da meydana geldiği, sonraki aşamalarında, Amadori ürününün, protein çözünürlüğünü azaltan sarı-kahverengi floresan ürünleri ve protein çapraz bağları oluşturmak için çoklu dehidrasyon geçirdiği bildirilmiştir. Yaşlanan ve kataraktlı insan merceklerinde de benzer değişikliklerin gözlendiği görülmüştür [18]. Bunların arasında protein agregasyonu, azalmış protein çözünürlüğü, sülfidril gruplarının oksidasyonu, proteinler arasında disülfid kovalent çapraz bağların üretimi, lens çekirdeğinde artan pigmentasyonun yer aldığı belirtilmiştir. Bu çalışmayla proteinlerin Maillard reaksiyonunun yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kalan dokuların, hücre dışı matris proteinlerin ve ilgili patolojilerin yaşlanmasında rol oynayabileceği öne sürülmüştür [18]. Ama başka bir çalışmada AGE'lerin birikiminin yaşlanma açısından nedensel olmaktan ziyade korelasyonlu olduğuna dikkat çekilmiştir [45]. Glikasyonun geri dönüşümlü bir reaksiyon olduğu ve Amadori bileşiğinin; proteinin yaşa bağlı kimyasal modifikasyonun ürünü olmadığı ifade edilmiştir. AGE'lerin, yaşla, uzun ömürlü proteinlerde biriken birçok kimyasal modifikasyon türünden sadece biri olduğu ve özellikle yaşa bağlı kronik hastalıklarda yaşla birlikte doku ve organ fonksiyonlarındaki azalmaya katkıda bulunabileceği belirtilmiş, ancak, proteinlerde birikme oranının maksimum yaşam sürresinin veya türlerin yaşlanma oranının birincil belirleyicisi olmadığına dikkat çekilmiştir [45]. Fakat durum ne olursa olsun, AGE'lerin kronik ve özellikle yaşa bağlı bozukluklar açısından istenmeyen bazı sonuçları olduğu bir gerçektir. Diyabet, böbrek rahatsızlıkları [46], atheroskleroz [47, 48], Alzheimer ve Parkinson gibi kronik ve dejeneratif hastalıklarda yer alabilirler [44, 49].

Gıdalarda gerçekleşen Maillard reaksiyonu gıda kimyası için pek çok nedenden dolayı önemlidir. Ekmek kabuğunun rengi, kavrulmuş kahve ve patates kızartması gibi gıdalarda renk gelişimini, yine kavrulmuş kahve ve fırıncılık ürünlerinde aroma gelişimini sağlar. Buna karşın kurutulmuş gıdaların üretiminde ya da süt tozu eldesinde

olumsuz organoleptik özelliklere sahip aromatik bileşiklerin oluşumuna, UHT süt üretiminde pişmiş tada neden olabilir. Temelde amino asitlerin modifikasyonu ile gerçekleştiğinden (esas olarak şekerlerin ve diğer karbonil bileşiklerinin lizin ile reaksiyonu) gıdalarda besinsel değerin azalmasına sebep olabilir. Esas olarak redüktonlar ve renkli melanoidinlerin antioksidan aktivitelerinden bahsedilebilirken reaksiyon sırasında oluşan 5-hidroksi metil furfural (HMF), akrilamid, furan gibi mutajen ve karserojen bazı ürünler insan sağlığı açısından önemlidir [50].

Birçok hayvan ve insan çalışmalarında besinsel AGE'ler ve vücuttaki AGE'ler arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Laboratuvar farelerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, 3 ay boyunca glikoz-lizin model gıda (AGE içeren) ile beslenen farelerde diyet kaynaklı CML ve dikarbonil bileşiklerinin kalplerde ve tendonlarda CML birikmesinden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür [51]. Ayrıca düzenli besinsel AGE tüketiminin, bireylerin bazı kardiyak doku ve kuyruk sokumu gibi bazı tendonlarında CML birikimine katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır [51]. Bu yüzden AGE'lerin besinsel olarak alınımının azaltılmasına yardımcı olabilmesi adına, gıda prosesi boyunca glikasyon reaksiyonlarının inhibisyonu önemlidir.

### **1.1.3.2. Proteinlerin Fenollerle İnteraksiyonları**

Proteinlerin fenolik bileşiklerle interaksiyonunda aslında kovalent olmayan hidrofobik bağlanmaların esas olarak meydana geldiği önerilmektedir. Kovalent olmayan bağlanma hidrofobik, van der Waals, hidrojen köprü bağları ve iyonik interaksiyonları içerir. Bu tip etkileşim kovalent bağlanmadan daha zayıftır ve çoğunlukla tersinirdir [52]. Fakat bazı çalışmalar, gerçekleşebilecek kovalent reaksiyonlar hakkında da bilgi vermektedir [53, 54]. Bazı çalışmalarda, fenolik bileşikler ve proteinler arasında enzim varlığında gerçekleşen geri dönüşümsüz kovalent etkileşimler önerilmiştir [55]. Buna ek olarak, protein fonksiyonel grupları ile fenolik oksidasyonunun oluşturduğu kinonlar arasında kovalent etkileşimler de gösterilmiştir [56].

Fenolik bileşikler, alkali koşullarda ve oksijen varlığında protein molekülü üzerindeki nükleofilik gruplarla reaksiyona girebilen kinonlara okside olurlar. Kinonlar çok reaktiftirler ve elektrofilik özellikleri nedeniyle proteinin yan zincinleriyle reaksiyona girebilirler [56]. Kinon bileşiklerinin, proteindeki, sisteinin sülfidril grupları ve lizinin  $\epsilon$ -amino gruplarının yanı sıra  $\alpha$ -terminal amino grupları, metiyonin ve triptofan ile de

kolaylıkla reaksiyona girebildiği bildirilmiştir [57]. Bunun yanı sıra,  $\alpha$ - ve  $\beta$ -kazeinlerinin çay fenollerini ile moleküler düzeyde etkileşimlerinin incelendiği bir çalışmada da, fenolik bileşiklerdeki -OH grubu sayısının artmasıyla bağlanmanın da arttığı bildirilmiştir [58]. Sıcaklık, pH, protein türleri, protein konsantrasyonu, fenolik bileşiklerin tipleri ve yapıları, tuz konsantrasyonu ve belirli reaktiflerin eklenmesi gibi protein-fenol etkileşimlerini etkileyen birçok parametre vardır.

Protein-fenol interaksiyonunun çeşitli biyolojik etkileri olabilir. Fenolik bileşiklerin proteinlerin reaktif yan zincirleri ile reaksiyonlarının bir sonucu olarak; proteinlerin çözünürlük, elektroforetik davranış, hidrofobiklik, moleküler ağırlık ve izoelektrik nokta gibi fizikokimyasal özelliklerinde önemli değişikliklere yol açabileceği ifade edilmiştir [59]. Proteinlerin fenollerle etkileşmesi sonucu modifikasyonu ve modifikasyonun etkileri ayrıntılı olarak 1.3.1.'de tartışılacaktır.

## **1.2. Fenolik bileşikler**

Fenolik bileşikler bitkilerdeki fenilpropanoid, shikimate ve pentozfosfat metabolik yollarının ikincil metabolitleridir [60]. Aynı zamanda fenolik bileşikler, düşük molekül ağırlıklı basit moleküllerden oluşan, yüksek molekül ağırlıklı kompleks moleküllere kadar çok çeşitli bileşikler grubudur [61]. Tüm fenolik bileşiklerin yapısal olarak genel özelliği aromatik halkaya ve en az bir hidroksil grubuna sahip olmasıdır [53]. Karbon atomlarının sayısına ve düzenine göre sınıflandırılabilirler ve daha çok şeker ile organik asitlere konjuge olarak bulunurlar [62]. Bitkilerdeki en önemli fenolik bileşikler; flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler ve lignanlardır [62]. 8000'den fazla fenolik yapının olduğu bildirilmiştir ve bunların birçoğu gıdalarda görülmektedir. Pek çok gıda bileşeni içinde yer alan fenolik bileşiklerce zengin diyetlerin kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser ve inme gibi hastalıkların insidansını azaltabileceğine dair çalışmalar vardır [62].

Bu tez kapsamında incelenecek olan fenol kaynağı olarak yeşil çay, dünyada en çok tüketilen içeceklerden biridir [63]. Yeşil çay yaprakları biyoaktif bileşikler açısından özellikle de antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşikler bakımından zengindir [64]. Genel olarak bu aktiviteye flavonoidlerin neden olduğu ifade edilmektedir. Kateşinler flavonoidlerin %80-90'ını oluştururlar ve yeşil çayın suda çözünür katı kısmının da yaklaşık %40'ını oluştururlar [65]. Zengin bir kateşin kaynağı olan yeşil çayda bulunan

dört ana kateşin; (-) - epikateşin (EC), (-) - epigallokateşin (EGC), (-) - epikateşin-3-gallat (ECG) ve (-) - epigallokateşin-3-gallattır (EGCG) [65].

Bilimsel çalışmalar, yeşil çay tüketiminin genel sağlığı iyileştirdiğini ve bazı hastalıkların oluşum riskini azalttığını göstermişlerdir [64]. Hem antioksidan kaynağı olmaları hem de antikanserojenik, antiarteriosklerotik ve antimikrobiyal ajan olarak sağlığa yararlı etkileri nedeniyle ilgi görmektedirler [66]. Sağlığa faydalı etkilerinin yanı sıra yeşil çayın, gıda sistemlerinde lipid oksidasyonuna karşı antioksidan mekanizmalarla reaktif türlere etki ederek oksidatif hasarı engelleyebileceği de belirtilmiştir [64].

### **1.2.1. Fenolik Bileşiklerin Sağlık Üzerine Etkileri**

Fenolik bileşik tüketiminin sağlık üzerine birçok yararlı etkisi olduğu bildirilmektedir. Bunların arasında en önemlisi, fenolik bileşiklerin sahip olduğu yüksek antioksidan aktiviteden kaynaklanmaktadır. Fenolik bileşikler, antioksidan olarak, serbest radikal yakalama, pek çok enzimin aktivitesini inhibe etme gibi çeşitli şekillerde hareket edebilirler [55]. Aynı zamanda sinerjistik davranış ile diğer antioksidanların etkisini arttırabilirler.

Fenolik bileşiklerin, antioksidan olarak, hücre bileşenlerini oksidatif hasara karşı koruyabileceği ve bu nedenle oksidatif stresle ilişkili dejeneratif hastalık riskini sınırlayabilecekleri belirtilmiştir. [67] Organizma içinde direkt antioksidan aktiviteleri ve kardiyovasküler hastalıklardan korunmada antioksidan aktivitelerinin biyolojik ilişkisi değerlendirilmiş [68] ve anti-karserojen gibi pozitif biyoaktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir [69]. Antioksidan özelliklerine ek olarak, fenolik bileşikler, hayvan modellerinde ve in vitro sistemlerde, serbest radikalleri yakalama ve temizleme, nitrik oksidi regüle etme, lökosit immobilizasyonunu azaltma, apoptozisi indüklemeye, hücre yayılımı ve anjiyogenesi engelleme ve fitoöstrojenik aktivite gösterme gibi çeşitli etkiler göstermişlerdir [70-73]. Bu etkiler, kanser ve kardiyovasküler hastalıklarda potansiyel koruyucu olarak katkıda bulunabilirler. Kardiyovasküler hastalıklara ilişkin verilerde, yüksek fenolik bileşik alımlarının ve muhtemelen kateşinlerin koruyucu etkileri olduğu belirtilmiştir [74].

Fenolik bileşikler diyetle en çok bulunan antioksidanlardır [67] ve hemen hemen tüm bitki kökenli gıdalarda bulunsalar da meyveler, sebzeler ve içecekler bu bileşiklerin



insan diyetindeki ana kaynaklarıdır [75]. Çay fenolik bileşiklerinin antioksidan özellikleri iyi bilinmektedir ve temelde bu durum flavonoidlerin kimyasal yapısında aromatik halka ve hidroksil grupların kombinasyonuna dayandırılmaktadır [76]. Çayın yararlı etkisi çay kateşinleri olarak bilinen çay fenolik bileşiklerinin güçlü antioksidan aktivitesine bağlanmıştır [77]. Çay fenolik bileşiklerinin in vitro olarak güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir, ancak bu aktivite sadece birkaç vakada tümör oluşumunun inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir [78, 79]. Bu potansiyel mekanizmanın in vivo önemi olmadığı ve aksine bazı çalışmaların, bu bileşiklerin hücre öldürme aktivitesinin, en azından in vitro olarak, pro-oksidan aktiviteleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [80]. Bir çalışmada, resveratrol antikanserojenik özellik gösterirken, farelerde kardiyovasküler hastalık riskini arttırdığı gösterilmiştir [81]. Benzer şekilde, kuersetinin farklı hastalıkları önlemek için etkili olabileceği, ancak diyetle uzun süreli olarak eklendiğinde farelerin ömrünü de kısaltabileceği ifade edilmiştir [82].

### **1.2.2. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Özellikleri**

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi, çekirdek yapı ile ilgili fonksiyonel grupların düzenlenmesine bağlıdır. Birçok antioksidan özellikli fenolik bileşik yapısı göstermiştir ki, antioksidan aktivite hem konfigürasyon hem de toplam hidroksil grubu sayısından önemli ölçüde etkilenmektedir. Bir antioksidan olarak işlev görebilmesi için, fenolik bileşiğin, bir dizi reaksiyon yoluyla diğer mevcut radikallerle (örneğin; lipit peroksil radikali) reaksiyona girerek sonuç olarak deaktive edebilen stabilize fenoksi radikali oluşturabilmesi gerekir. Flavanollerdeki B-halkası 3', 4'-dihidroksil konfigürasyonu, reaktif oksijen türlerinin atılmasının ve lipit peroksidasyonunun önlenmesinin en önemli belirleyicisidir [83]. Bu düzenleme, peroksil ve süperoksit radikallerinin en güçlü sönmüleyicilerinin belirgin bir özelliğidir. B halkası üzerindeki hidroksil grupları; hidroksil, peroksil, lipit hidroperoksil radikallerine hidrojenler bağışlamak için düşük aktivasyon enerjisine sahiptir, böylece bunları stabilize eder ve nispeten stabil bir fenolik bileşik radikale yol açar. Böylece zincir kırıcı antioksidanlar olarak hareket ederler. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi ayrıca elektronları serbest radikallere bağışlama yeteneklerinden kaynaklanır, böylece lipit peroksidasyon reaksiyonlarının ilerlemesini önler.

Fenolik bileşiklerin bir alt grubu olan flavonlar ve flavanonların, peroksil ve hidroksil temizleme aktivitelerinin toplam OH grup sayısına göre doğrusal olarak arttığı bildirilmiştir [84]. Örneğin, luteolin'in (B halkasında 3', 4' pozisyonunda iki hidroksil ikame edicisine sahip olan) peroksil radikal süpürme kabiliyeti, kaempferolden (3' pozisyonunda sadece bir hidroksil ikame edicisine sahiptir) önemli ölçüde fazladır [83]. Flavonoidlerin oksidasyonu, kateşol halkası mevcut olduğunda B halkası üzerinden meydana gelir ve elektron delokalizasyonunu kolaylaştırarak oldukça kararlı bir *o*-yarı kinon radikalini verir. Flavonoidler tarafından serbest radikal süpürme işlemi aslında B-halkası üzerinde 3-pozisyonunda bir serbest OH grubunun varlığına da bağlıdır. Flavonoid heterosiklik yapı, serbest bir 3-OH varlığında ve aromatik halkalar arasında konjügasyona izin vererek antioksidan aktiviteye katkıda bulunur.

Fenolik bileşiklerin serbest radikallere karşı antioksidan görevi gördükleri ancak bir geçiş metali bulunduğunda pro-oksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir [83]. Kateşinler, serbest radikal türleri söndürme ve geçiş metal şelasyonu gibi etki göstermelerinin yanı sıra, bu bileşiklerin bazı etkilerinin oksidatif stresi indükleyebileceği belirtilmiştir [85]. Bu tür pro-oksidan etkilerin tümör hücrelerinde apoptozun indüklenmesinden sorumlu olabileceği ya da kanserojen saldırıya karşı koruma sağlayan normal dokularda endojen antioksidan sistemleri indükleyebileceği ifade edilmiştir [85]. Daha yüksek dozlarda epigallokateşin gallat kullanan *in vivo* çalışmalarda, pro-oksidan etkilerin epigallokateşin gallatın potansiyel toksik etkilerinde rol oynayabileceği rapor edilmiştir. Galati ve ark.'larının gerçekleştirdiği bir çalışmada, izole edilmiş fare hepatositlerinin 200 µM epigallokateşin gallat ile muamelesinin süreye ve doza bağlı sitotoksosite ile sonuçlandığı bildirilmiştir [86].

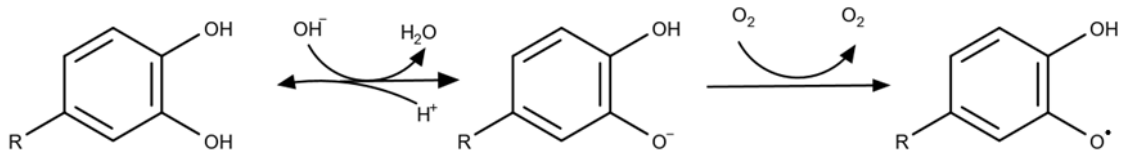
### **1.3. Proteinlerin Fenollerle İnteraksiyonu ve Etkileri**

Literatür kaynaklarının çoğu, fenolik bileşikler ve proteinler arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerle ilgilidir. Prensipte olarak, beş muhtemel fenolik ve protein etkileşim türü önerilebilir. Bunlar; hidrojen bağı,  $\pi$ -bağlanma, hidrofobik, iyonik ve kovalent bağlantılardır [87, 88]. Proteinler ve fenolik bileşikler arasında geri dönüşümsüz etkileşimler, kovalent bağların oluşumu ile karakterize edilir [54].

Kovalent bağlanma, fenolik bileşiklerle (ferulik-, kafeik-, klorojenik- ve gallik asit, *m*-, *o*- ve *p*-dihidrobenzenler, flavon, kuersetin, rutin, *p*-benzokinon, seçilmiş doğal ve

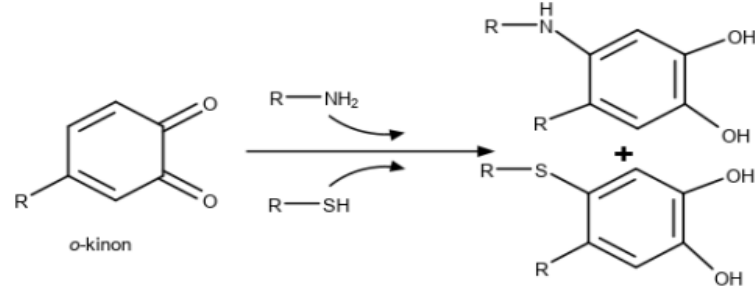
sentetik izoflavonlar) kombinasyon halinde farklı gıda proteinleri (bovin serum albumin, peynir altı suyu proteinleri, soya proteinleri,  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktalbumin, miyoglobin) ve enzimleri ( $\alpha$ -amilaz, tripsin, lizozim) kullanan model sistemlerde ve gıda matrislerinde (yeşil kahve çekirdek proteini, süt proteinleri) gerçekleştirilebilir. Ana reaktif kalıntıları, sisteinin serbest tiyol grupları, lizinin serbest amino grupları, metiyonin kalıntıları, triptofan kalıntılarının indol halkaları gibi nükleofilik yan zincirlerdir [59].

Fenolik asitlerin başlıca kimyasal özelliklerinden biri, oksitlenme kolaylığıdır. Oksijen varlığında, klorojenik asit, kafeik asit ve diğer ilgili *o*-difenoller, polifenol oksidazın etkisi veya alkalın çözeltisi içinde ilgili kinona kolaylıkla oksitlenebilirler [89]. Kovalent bağların oluşumu fenolik bileşiklerin oksidasyonunu ve *o*-kinonların veya *o*-yarı-kinonların (semi) oluşumunu içerir [90-92]. Reaktif bir elektrofilik ara madde olan kinon, bir protein zincirindeki lizin, metiyonin, sistein ve triptofan gibi nükleofilik kısımlar tarafından kolayca saldırıya uğrayabilir [57, 89, 92-97]. Bu eklenmenin üzerine daha fazla oksidasyonla, çapraz bağlı protein polimerlerinin oluşumuna yol açan ikinci bir eklenme meydana gelebilir [96, 97]. Nötrül veya alkali pH için fenolik bileşiklerin dengesi, aktif oksijen türleri ile hızla okside olabilir fenolat formuna taşınır [98] (Şekil 1.6).



**Şekil 1.6** Alkali ortamda enzimatik olmayan *o*-semi-kinonların oluşumu [15] (Cilliers ve Singleton'dan uyarlanmıştır, 1991)

Elektrofilik özellikleriyle kovalent bağların oluşumuna yol açan *o*-kinonlar, proteinler gibi nükleofilik merkezlerle kolayca reaksiyona girebilir [54, 94, 96, 99] (Şekil 1.7).



**Şekil 1.7** Nükleofilik 1,4-Michael katılması ile tiyol ve amin grupları ile kinon reaksiyonu

Nükleofilik eklenme reaksiyonu, amino asitler veya peptitlerin amino gruplarıyla da ortaya çıkar [53, 91, 94, 100-102]. *O*-kinonlar hem birincil aminlere [100, 101] hem de ikincil aminlere eklenebilir [53, 94].

Bir çalışmada, kafeik asit türevleri, alkali çözelti içinde yarı kinon tipi serbest radikallere oksitlenmişlerdir. Radikal oluşumdan sonra dimerizasyon, iki kafeik asit ester molekülünün yan zincirlerinin izoprenil grubunun bağlanması ile meydana gelir ve bunu bir siklizasyon aşaması takip eder. Çözelti içinde dimer ile bir amino bileşiğinin mevcudiyeti, Michael tipi ilave ve nükleofilik siklizasyon yoluyla bir benzasridin halka yapısının oluştuğu görülmüştür [101].

Amin ve *o*-kinon arasındaki doğrudan reaksiyon, bir Schiff bazı oluşturmaktan ziyade Michael tipi eklenme (1,4 eklenme) reaksiyonu ile gerçekleşir [91]. Kinonlara nükleofilik amino asit eklenmesini yöneten faktörlerden biri,  $\alpha$ -amino grubunun iyonlaşma durumudur: protonlanması, nükleofilik durumunu azaltır [91].

Kinonlar kondensasyon reaksiyonları geçirebilirler ve bunun sonucunda taninler olarak adlandırılan kahverengi yüksek moleküler ağırlıklı pigmentleri oluşturular. Taninler oldukça reaktiftirler ve hızla proteinin amino grubu ve SH grubu ile birleşirler [103].

Protein ve fenolik bileşikler arasında kompleks oluşumunu etkileyen pek çok faktör vardır [104]. Bunlar; çevresel koşullar, sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu ve belirli reaktiflerin eklenmesi şeklindedir [53, 105]. Farklı çevresel pH değerlerinde fenolik bileşiklerin doğasında meydana gelen değişimler, onların stabilite ve çözünürlüğünü etkileyebilir ve proteinlerle kompleks oluşumuna neden olabilirler [106-108]. Bununla beraber, literatür verilerine dayanarak, protein-fenolik bileşik interaksiyonunun

oluşumunu etkileyen ana iki faktör; protein tipi ve fenolik bileşiğin yapısıdır [104]. Prigent ve ark.'larının yaptığı bir çalışma, hidrofobisite, izoelektrik nokta değeri ve proteinin amino asit dizilimindeki farklılıkların fenolik bileşiklerle etkileşimlerini kuvvetli şekilde etkilediğini göstermiştir [109]. Bazı durumlarda amino asit dizilimi, etkileşimin bağlanma kuvvetinin tahmin edilmesini sağlar [52]. Fenolik bileşikler; moleküler ağırlıklarında, metilasyon, hidroksilasyon ve glikozilasyon derecelerinde farklılıklar gösterebilir [104]. Fenolik bileşiklerin proteine bağlanma afiniteleri molekül ağırlıklarındaki artış ile birlikte artar [110]. Metilasyon fenolik bileşiklerin proteine bağlanma afinitelerini azaltırken, A ve B halkasının hidroksilasyonu fenolik bileşiğin bağlanma etkinliğini artırır [111].

Fenolik bileşikler ve proteinler arasındaki etkileşimler iki açıdan algılanabilir: ilk olarak fenolik bileşiklerle etkileşim, proteinin fizikokimyasal özelliklerinde değişikliklere sebep olabilir. Bu tür komplekslerin oluşması, çözünürlük, termal stabilite ve sindirilebilirliği değiştirerek, proteinlerin besinsel değerini, teknolojik değerini enzimatik aktivitelerini ve diğer biyolojik etkilerinin azalmasına sebep olabilir [53, 105, 112].

### **1.3.1. Protein-Fenol İnteraksiyonunun Protein Üzerine Etkileri**

Proteinlerin modifikasyonu hala gıda işlemede yaygın bir yöntem olmaktan uzak olsa da iki ana nedenden dolayı giderek daha önemli hale gelmektedir. İlk olarak, proteinler gıdadaki birçok işlevi yerine getirir ve bunlardan bazıları modifiye edilerek doğal proteinlerden çok daha fazla kullanım alanı bulabilirler. İkincisi, dünyada artan beslenme sorunları, yeni hammaddelerin kullanılmasını gerektirmektedir. Modifikasyonlar ile protein yapısını değiştirmek, bu tür yeni hammaddelerin (örneğin; bitki veya mikrobiyal kökenli proteinler) gıda güvenliği, lezzetlilik ve biyolojik değer kriterlerini karşılamaını sağlayabilir.

Gıda işleme açısından, protein modifikasyonunun amacı şunlardır;

- Gıdada istenmeyen bileşiklerin oluşumuna neden olan reaksiyonların engellenmesi (Maillard reaksiyonu ile oluşabilecek istenmeyen bileşikler)
- Proteinlerin bazı fiziksel özelliklerinin iyileştirilmesi (doku, köpük stabilitesi, çözünürlük)

- Besin değerinin iyileştirilmesi (sindirilebilirlik derecesinin arttırılması, toksik veya diğer istenmeyen bileşenlerin etkisizleştirilmesi, bazı amino asitler gibi temel bileşenler dahil edilmesi)

Modifikasyon, kimyasal veya enzimatik reaksiyonları veya her ikisinin birlikte kombinasyonunu içerir. Proteinlerin özelliklerinin modifikasyonu, amino asit kompozisyonu ya da molekül boyutunu değiştirerek veya hetero bileşenleri çıkararak veya ekleyerek mümkündür [10]. Böyle değişiklikler kimyasal ve/veya enzimatik reaksiyonlar ile gerçekleştirilebilir.

Gıda proteinlerinin modifikasyonu, organizasyonun tüm seviyelerinde, yani birincil, ikincil ve üçüncül yapılarda, yapı veya konformasyonda değişiklikler içerebilir. Fiziksel (termal ve basınç), kimyasal veya enzimatik prosedürler kullanılarak kovalent bağların ve ikincil kuvvetlerin bozulmasını ve yeniden düzenlenmesini içerebilir [9]. Sonuç olarak, fenolik bileşiklerin proteinlerin reaktif yan zincirleri ile reaksiyonları, çözünürlük, elektroforetik davranış, hidrofobiklik, moleküler ağırlık ve izoelektrik nokta gibi fizikokimyasal özelliklerde önemli değişikliklere yol açar [59].

Proteinlerin biyolojik aktivitesi ve işlevselliği, farklı fenolik bileşiklerle olan etkileşimlerinden fazlasıyla etkilenir ve sonuç olarak enzimatik aktivitede ve proteinlerin çözünürlük ya da termal stabilite gibi fizikokimyasal özelliklerinde değişimlere yol açar [105, 113, 114]. Yapılan bir çalışmada, ısıtma boyunca süt proteinleri ve kafeik asitin arasında oluşan kompleksler analiz edilmiş ve fenolik asitle süt proteinlerinin interaksiyonunun mevcut lizin ve tiyol gruplarında azalmaya neden olduğu görülmüştür [115]. Ayrıca, kafeik asit varlığı kazein misellerinin boyutunda ve çapraz bağlanmalarında artışa sebep olmuştur. Çalışmada, ısıtma boyunca kafeik asitin kinonlara okside olduğu mekanizma önerilmiştir [53]. Farklı fenolik bileşiklerle soya proteini arasındaki interaksiyonun analiz edildiği bir çalışmada, proteinlerde lizin, sistein ve triptofan içeriğinde azalma olduğu görülmüştür [116]. Bunun yanında, proteinin ikincil ve üçüncül yapılarında değişimler ile interaksiyon boyunca yüzey hidrofobitesinde artış gözlemlenmiştir. Aynı zamanda kompleksler başlangıç proteininden daha yüksek moleküler ağırlık ve farklı bir izoelektrik nokta ile karakterize edilmiştir.

### **1.3.1.1. Proteinin Antioksidan Özellikleri Üzerine Etkileri**

Nükleofiller ve kinon arasındaki kovalent interaksiyon, sadece aktif yan zincir gruplarını bloke etmekle kalmaz aynı zamanda dihidroksibenzenin fenolik kısmını da yeniden oluşturur ve böylece genel antioksidatif kapasiteyi artırabilir. Yeniden düzenlenmiş fenolün protein üzerinde lokal olarak antioksidan etki göstermesi muhtemeldir. Proteine bağlı fenolik bir bileşik, protein yapısı içinde radikal süpürücü etkilere sahip olabilir ve radikallerin azaltılmasında işlev görebilir. Böylece proteini karbonil grupları gibi protein oksidasyon ürünlerinin oluşumuna karşı koruyan potansiyel bir moleküller arası antioksidan olabilir.

Bir çalışmada, sığır serum albümini gibi proteinlerin, fenolik antioksidanlarla birlikte mevcut olduğunda lipit oksidasyonuna karşı sinerjistik bir antioksidatif etki gösterdiği bildirilmiştir [117]. Başka bir çalışmada bunun emülsiyonların depolanması sırasında protein-fenol kovalent ilişkilerinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür [118]. Benzer bir çalışmada, miyofibriller proteinlerin modifikasyonunun, protein tiyoller ve kinonlar arasında eklenme oluşturarak lipitlerin oksidatif stabilitesi üzerinde önemli bir etki gösterdiği bildirilmiştir [119].

### **1.3.1.2. Protein Glikasyonu Üzerine Etkileri**

Fenolik bileşikler gibi doğal antioksidanlar, Maillard reaksiyonunun gidişatını değiştirdiği için glikasyon inhibitörü olarak iyi bir potansiyele sahiptir [120]. Pek çok çalışmada; kateşinlerin A halkasında bulunan oldukça aktif iki elektron veren grupların varlığından dolayı elektrofilik aromatik ikame reaksiyonları ile reaktif dikarbonil bileşiklerini yakaladıkları ortaya konulmuştur [121-123]. Son dönemlerde, kateşinlerin aynı zamanda Maillard reaksiyonuna bağlı reaktif imin ara maddeleri için tutucu ajan oldukları rapor edilmiştir [124]. Yeşil çay, epigallokateşin, epikateşin gallat ve epigallokateşin gallat gibi kateşinler için zengin bir kaynaktır ve diyabetik farelerde anti-glikasyon etkisine sahip olduğu gösterilmiştir [125]. Bu etki çoğunlukla fenollerin karbonil yakalama kabiliyetlerine atfedilir [121, 126].

Anti-glikasyon konseptinin biyokimyasal mekanizması, glikasyon reaksiyonunu geciktiren veya önleyen herhangi bir mekanizmayı içerebilir. Oksidatif stresi

hafifletmek ve reaktif karbonil bileşiklerinin oluşumunu azaltmak için temizleyici hidroksil radikalleri ve süperoksit radikallerini içeren anti-glikasyon stratejileri şu şekildedir;

- proteinlere karbonil veya dikarbonil bağlantısının bloke edilmesi,
- metal iyon şelasyonu ile AGE oluşumunun engellenmesi,
- AGE'lerde çapraz bağ yapısının kırılmasıdır [127].

Fenolik bileşiklerin anti-glikasyon aktivitesi çoğunlukla onların antioksidan davranışlarına ve karbonil yakalama fonksiyonlarına atfedilir. Antioksidanlar, muhtemelen metal iyonu şelasyonu ve serbest radikal türlerinin tutulması yoluyla, oksidatif stresin zayıflatılmasını ve ayrıca glikasyonun orta aşamalarında oluşan karbonil bileşiklerinin yakalanmasını sağlayarak AGE inhibitörleri olarak işlev görür [128, 129]. Bununla birlikte, glikasyonun inhibisyonunda fenolik bileşiklerin yer alabileceği başka mekanizmalar da yer alabilir.

Sığır serum albümini, glukoz/fruktoz ve meyve özütlerinin 37°C'de 7 gün boyunca inkübe edilerek hazırlandığı bir model sistemde, AGE oluşumundaki azalmanın toplam fenolik konsantrasyonuna ve radikal yakalama kapasitesine bağlı olduğu gösterilmiştir [130]. Zhang ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada; naringenin, epikateşin, klorojenik asit, rosmarinik asit ve floretin eklenerek hazırlanan glukoz-kazein model sistemi hazırlanarak, 120°C'de 2 saat boyunca ısıtılmıştır. Bu fenollerin, floresan AGE ve CML oluşumu üzerinde inhibisyon gösterdiği görülmüştür [131]. Aynı araştırmacılar tarafından aynı fenoller kullanılarak hazırlanan kurabiye model sistemi incelenmiş ve tüm fenolik bileşiklerin glioksal miktarındaki azalmada etkili oldukları ancak metilglioksal konsantrasyonunun etkilenmediği belirtilmiştir. Fakat pişirme sırasında meydana gelen termal bozulma ve dönüşüm nedeniyle fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesinde ciddi şekilde düşüş ve antioksidan aktivitede beklenildiği kadar artış olmadığı gösterilmiştir [132]. Başka bir çalışmada, genistein artan konsantrasyonlarının, laktoz ve  $\beta$ -laktoglobulinin çapraz bağlantılarını etkili bir şekilde inhibe edebildiği ve reaktif dikarbonil bileşiklerini yakalayarak AGE'lerin doza bağlı şekilde baskılanmasında belirleyici rol oynadığı belirtilmiştir [133]. Ferulik asitin glikasyon üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, soya glisinini veya sığır serum albümini, ferulik asit ile pH 12'de 60°C'de 60 dakika süreyle inkübe edilmiş ve daha



sonra fruktoz, model sistemlerine ilave edilerek 60 dakika daha inkübe edilmiştir [134, 135]. Ferulik asidin floresan AGE'leri ve CML oluşumunu sırasıyla yaklaşık % 90 ve % 85 oranında azalttığı bulunmuştur. Ferulik asidin anti-glikasyon aktivitesi, bileşiğin antioksidan aktivitesine bağlanmıştır [135, 136] ve ayrıca ferulik asidin, proteinin oksidasyonuna karşı koruyucu etkiler sağlayan proteinlerle kompleksler oluşturabileceği belirtilmiştir. Aynı şekilde başka bir çalışmada soya izoflavonlarının anti-glikasyon etkisi incelenmiştir. Soya glisinin, genistin, genistein veya soya izoflavon bakımından zengin özütü (daidzein, glisit ve genistein içeren) 60°C'de pH 12'de 1 veya 16 saat karıştırılmış, daha sonra fruktoz ilave edilmiş ve aynı sıcaklıkta 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. Genistince zengin özüt ve genistein saf bileşiklerinin Maillard reaksiyonunun ilerlemesi üzerinde etki göstermediği, ancak, soya izoflavon bakımından zengin özütün (soya izoflavonlarının bir karışımından oluşur) erken Maillard reaksiyonu ürünlerinin oluşumunu ve ayrıca reaksiyonun ileri aşamaya ilerlemesini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Hem floresan AGE'ler hem de CML oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür. Soya izoflavonları ve soya glisinin arasındaki mekanizma tam olarak açıklanmamasına rağmen, erken Maillard reaksiyon ürünlerinin oluşumunun izoflavonların aktif glikasyon bölgelerine konjügasyonu ile inhibe edilebileceği, AGE oluşumunun dikarbonil ara maddelerinin ve oksijen radikal türlerinin yakalanmasıyla azaltılabileceği öne sürülmüştür [137]. Yapılan iki çalışmada da proteinler ve fenolik bileşikler alkali koşullarda etkileştirilmiştir [134, 137]. Fenolik bileşiklerin protein glikasyonunun her aşaması üzerindeki önleyici etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, glikasyonun erken aşaması için; bovin serum albumin-glukoz, ara aşaması için bovin serum albumin-metilglioksal ve son aşaması için peptit-riboz model sistemleri hazırlanmıştır. Kaempferol, luteolin, naringenin, kuersetin, rutin, epikateşin gallat ve epigallokateşin gallat eklenmesinin HbA<sub>1c</sub> seviyesini, glikasyon reaksiyonunun floresan yoğunluğunu ve elektro spin rezonans spektrumlarının radikal sinyallerini azalttığı gösterilmiştir [138]. Bu çalışmada, fenolik bileşiklerin proteinlere eklenmesinin protein glikasyonu ve oksidasyonunu önemli bir şekilde inhibe edebileceği ve bu durumun fenolik bileşiklerin, özellikle luteolin ve rutinin antioksidan aktiviteleri ve radikal temizleme kabiliyetleri ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır [138].

### **1.3.2. Protein Fenol İnteraksiyonunun Fenoller Üzerine Etkileri**

Fenolik bileşiklerin insan vücudunda pek çok potansiyel biyoaktivitesi olduğu bilinmektedir [59, 112]. Proteinlerle interaksiyonları, fenolik bileşiklerin antioksidan

aktivitesini etkileyebilir. Protein-fenol türevlerinin antioksidan aktivitesi, fenolik bileşiklerin konsantrasyonuna, türevlenme derecesine, fenolik bileşiklerdeki hidroksil gruplarının fiziksel konuma, diğer gıda bileşenlerine ve pH gibi çevresel koşullara bağlı olarak değişebilir ve eşit miktarda serbest fenolik bileşiğe kıyasla antioksidan aktivite azalabilir veya artabilir [2, 3]. Protein-fenol interaksiyonu sonucunda, proteinlerin fenolik bileşiklere güçlü bağlanma afiniteleri nedeniyle fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin azalabileceği belirtilmiştir [105]. Bunların dışında, fenolik bileşiklerin proteinlere bağlanma afinitesi onların moleküler büyüklüğüne bağlı olarak değişebilir [139] ve fenolik bileşiklerin moleküler büyüklükleri arttıkça proteine bağlanma afiniteleri de artar. Fenolik bileşiklerin sağlığı destekleyici potansiyel özelliklerinden dolayı bu komplekslerin önemine ilişkin farklı görüşler mevcuttur. Bu alandaki temel araştırmalar çay, kahve ve kakaoda bulunan fenolik bileşiklerin süt proteinleri ile etkileşimleri hakkında bilgi sağlamıştır [105].

Bir çalışmada, fenolik bileşiklerin sütlü kahve ile birlikte tüketilmesinin kan dolaşımına giren fenolik bileşik miktarını azalttığı gözlemlenmiş [140] ve süt ile veya süt olmadan tüketilen kahvedeki absorblanan klorojenik asit miktarı analiz edildiğinde 24 saat sonunda kahvenin sütle birlikte tüketildiğinde absorbe olan klorojenik asit miktarının daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır [140]. Sütün çay örneklerinin antioksidan kapasitesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, antioksidan kapasitenin ölçümü için farklı metotlar kullanılmıştır ve ABTS ve voltametri yöntemlerine göre sütün, çayın antioksidan kapasitesi üzerinde azaltıcı etki gösterdiği, lipid peroksidasyon yöntemi ile sütün, çayların antioksidan kapasitesini geliştirdiği belirtilmiştir. Araştırmacılar bu durumun, sütün çayın antioksidan kapasitesi üzerinde çift etkili olabileceğini, ilk olarak sütün çözelti içinde veya katı-sıvı ara yüzeyinde meydana gelen reaksiyonlar için önleyici bir etki gösterirken, su içinde yağ emülsiyonlarında antioksidan kapasiteyi arttırıcı etki gösterebileceğini ifade etmişlerdir [110]. Arts ve ark'larının [141] yaptığı bir çalışmada fenolik bileşiklerin proteinlerle yaptığı interaksiyonların antioksidan özellikler üzerindeki etkileri protein ve fenolik yapısı açısından değerlendirilmiş ve antioksidan kapasitede azalış gözlemlenmiştir. ABTS•+ metodu ile yapılan analizler;  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -kazein ve albumin varlığında fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesinin değiştiğini göstermiştir. Kateşinlerin antioksidan kapasitelerindeki maskelenmenin en fazla albumin ve  $\beta$ -kazeinde olduğu görülmüştür.  $\alpha$ - ve  $\kappa$ - kazeine kıyasla  $\beta$ - kazeinde gözlenen yüksek antioksidan maskelenmesinin,

yapısındaki prolin gruplarının varlığı ile ilişkili olduğu ve prolin gruplarının, kateşinin hidroksil grupları için yüksek bir afiniteye sahip olduğu [142] ifade edilmiştir. Antioksidan aktivitenin maskelenmesinin sadece protein yapısına bağlı olmadığı hatta fenolik bileşik yapısının büyük ölçüde etkili olduğu belirtilmiş ve 3' pozisyonunda flavonoide bağlanmış bir gallat grubunun maskeleyen derecesini arttırdığı bununla birlikte, B halkasını galattakine benzer bir pirogallol grubuna dönüştüren bir 5' pozisyonunda –OH grubunun maskeleyen derecesini azaltabileceği belirtilmiştir [141]. Proteinlerle etkileşimin başka bir sonucu, fenolik bileşiklerin biyoyararlanımının azalması olabilir. Protein-fenol etkileşimleri fenolik bileşiklerin biyoyararlanımı açısından değerlendirildiğinde, siyah çaya süt ilavesi, kompleks oluşumu ve toplam kateşin geri kazanımında bir azalma ile sonuçlanmıştır. Ancak, protein-fenol komplekslerinin sindirim sırasında bozunduğu ve sütlü veya sütsüz çay tüketiminin kateşin plazma konsantrasyonunda bir fark yaratmasının pek olası olmadığı ifade edilmiştir. [143] Serafini ve ark.'ları siyah çaya süt eklenmesinin, çayın süt olmadan tüketildiğinde gözlenen antioksidan potansiyelindeki artışı ortadan kaldırdığını belirtmişler [144], fakat diğer çalışmalar protein varlığının çay fenollerinin biyoyararlanımı veya antioksidan kapasitesi üzerinde hiçbir etkisi olmadığını belirtmişlerdir [145, 146]. Diğer yandan, oluşan komplekslerin gastrointestinal sistemdeki akıbeti bilinmemektedir. Farklı miktarlardaki kuersetinin sığır serum albuminine (BSA) kovalent olarak eklendiği bir çalışmada, kuersetinin BSA'ya kovalent bağlanmasının toplam antioksidan aktivitesini eşdeğer miktarda serbest kuersetine kıyasla azalttığını göstermektedir. Fakat BSA-kuersetin kompleksinin antioksidatif etkisi için belirleyici olanın bağlı kuersetin miktarı olduğu ifade edilmiştir [2]. Farklı çalışmalarda, fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin, protein-fenol etkileşimlerinden kaynaklı maskelenebileceği ifade edilmiş, fakat protein-fenol komplekslerinin spesifik bir karakterizasyonu gerçekleştirilmemiştir. Yapılan başka bir çalışmada süt ilavesi siyah çayın sağlığı geliştirici etkisini ortaya çıkarmış, bununla birlikte süt proteinlerinin varlığı, araştırmaya katılan insanların kan serumunda fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesinde değişikliklere neden olmamıştır [147].

Fenolik bileşiklerin, hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonu, sonradan eklenen aromatik halka yapısı antioksidan aktivitelerini belirleyici yapılardır [110]. Çözeltide, kateşinler gibi polifenoller, en bol süt proteini olan  $\beta$ -kazein gibi prolin açısından zengin proteinlerle etkileşime girerek çözünmeyen kompleksler [148] oluşturabilir.

## 2. MATERYAL VE METOTLAR

### 2.1. Kimyasallar ve Malzemeler

Potasyum peroksidisülfat, 2,2'-azinobis (3-etil benzo thiazolin-6 sülfonik asit) (ABTS), 6-hidroksi-2,5,7,8 tetra metil kroman-2 karboksilik asit (Troloks), asetonitril, sodyum hidroksit, selüloz (toz formda), metanol, formik asit, hidroklorik asit, amonyum format, sodyum borohidrit (Fluka), sodyum bikarbonat, kazein, albumin, gluten Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Almanya)'dan temin edilmiştir. Aseton ISOLAB Chemicals (Wertheim, Almanya)'dan temin edilmiştir. Sitrik asit (Fluka), sodyum fosfat, borik asit Merck (Darmstadt, Almanya)'dan temin edilmiştir. Potasyum dihidrojen fosfat, di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat, di-sodyum hidrojen fosfat anhidrus, sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ve sodyum karbonat anhidrus Merck (Darmstadt, Almanya)'dan temin edilmiştir.

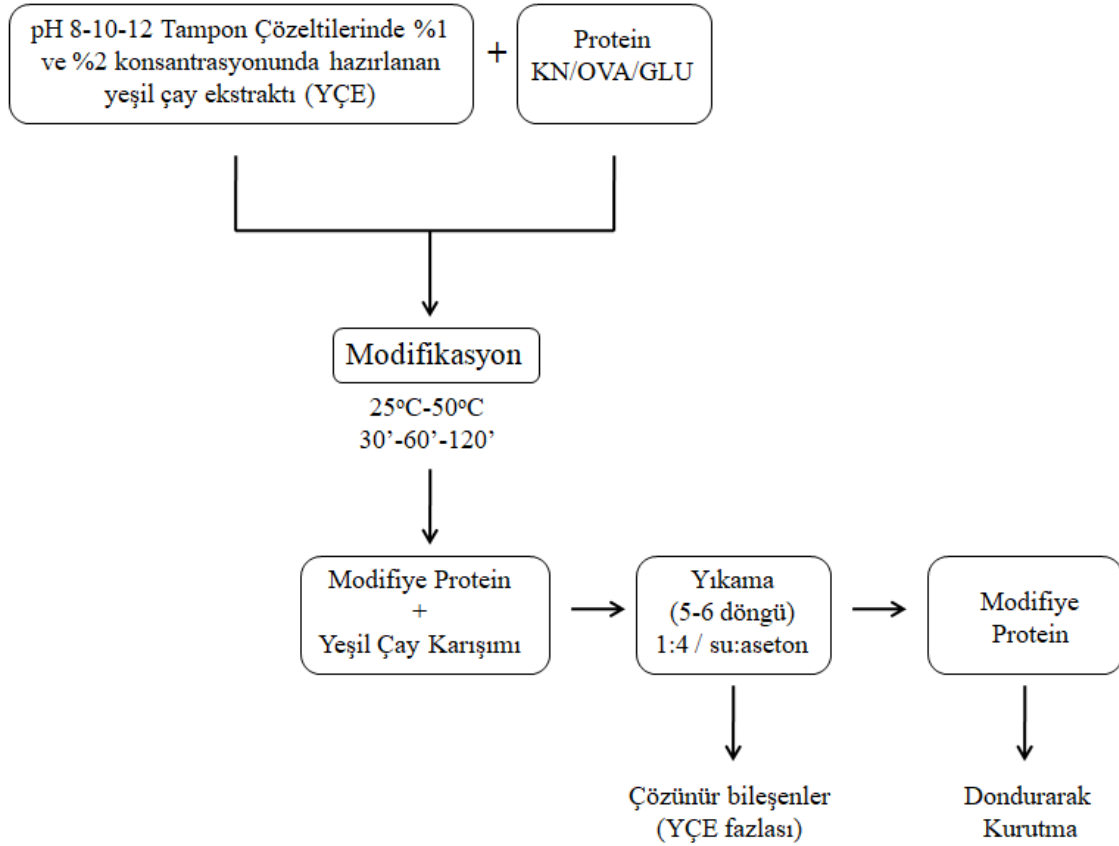
Analizlerde ultra saf su (MiliQ sistemi, Milipore, Bedford, MA, ABD) kullanılmıştır. Enjektör filtre (naylon, 0,45 µm), Oasis HLB (1 mL, 30 mg) katı faz ekstraksiyon kartuşları, Atlantis HILIC kolon (250 x 4,6 mm, 5 µm) Waters (Miliford, MA, ABD) firmasından temin edilmiştir. Synchronis HILIC kolon (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) ThermoScientific (ABD)'den temin edilmiştir. ZIC-HILIC (150 x 4.6 mm, 3.5 µm) kolon MerckSeQuant (Darmstadt, Almanya)'dan temin edilmiştir.

Domuz gastrik mukozasından pepsin ( $\geq 250$  U/mg katı), domuz pankreasından pankreatin (4 x USP), *Streptomycesgriseus*'dan proteaz ( $\geq 3,5$  U/mg katı) Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Almanya)'dan temin edilmiştir.

Protein-fenol etkileşiminde kullanılan yeşil çay ekstraktı yerel marketten temin edilmiştir. Gıda örneklerinde antioksidan analizleri için kullanılan buğday unu, çavdar unu, yulaf unu, yağsız inek sütü, şekersiz soya sütü ve yumurta yerel marketlerden temin edilmiştir.

## 2.2. Örneklerin Hazırlanması

### 2.2.1. Çeşitli Proteinlerin Yeşil Çay Ekstraktı ile Modifikasyonu



**Şekil 2.1** Çeşitli proteinlerin yeşil çay ile modifikasyon aşamaları

Bu çalışmada, fenolik bileşik kaynağı olarak yerel marketten temin edilen yeşil çay ekstraktı kullanılmıştır. İlk olarak, proteinlerle muamele edilecek yeşil çay çözeltisinin; çalışmada kullanılan ovalbumin, kazein ve gluten proteinlerinin lizin miktarına göre % 1 (w/v) ve % 2 (w/v) konsantrasyonunda yeşil çay ekstraktı olarak belirlenmiştir. Çözelti pH'ları farklı pH tamponları kullanılarak ayarlanmıştır. Yapılan çalışmalar, protein fenolik bileşik interaksiyonunda kovalent bağlanmanın alkali pH'larda daha hızlı gerçekleştiğini göstermiştir [149]. Bu sebeple proteinlerin yeşil çay ekstraktı ile muamelesinde 8, 10, 12 pH tamponları kullanılarak bağlanmanın en fazla olduğu pH'nın belirlenmesi amaçlanmıştır. pH etkisinin yanı sıra protein-yeşil çay etkileşiminde sıcaklık ve sürenin etkisinin incelenmesi için reaksiyon 25°C ve 50°C'lerde 30, 60, 120 dakikalık süreyle gerçekleştirilmiştir. 250 mg protein üzerine 25 mL yeşil çay ekstraktlı çözelti eklenmiş, 350 rpm'de manyetik karıştırıcıda reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda elde edilen karışıma, reaksiyon sonucunda

bağlanmayan yeşil çayın uzaklaştırılması amacıyla yıkama prosedürü uygulanmıştır. Bunun için reaksiyon karışımı 1:4 oranında su:soğuk aseton karışımı ile karıştırıldıktan sonra 7000 rpm'de 3 dakika santrifüj uygulanmış, supernatant atılarak pelet elde edilmiştir. Bu yıkama işlemi 5-6 kez tekrar edilmiş, reaksiyona girmeyen yeşil çayın tamamı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen retentat liyofilize edilerek modifiye edilmiş protein izole edilmiştir.

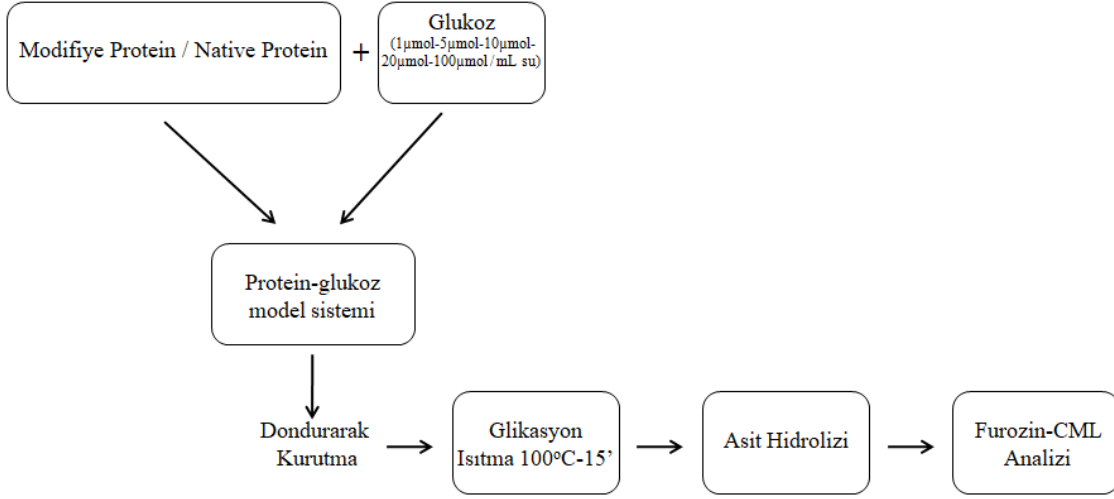
### **2.2.2. Çeşitli Protein Bazlı Gıdaların Yeşil Çay ile Modifikasyonu**

Tez kapsamında, çeşitli protein bazlı gıdaların da yeşil çay ile modifikasyonu amaçlanmıştır. Protein bazlı gıda olarak yerel marketten temin edilen buğday unu (%10-12), çavdar unu (%11), yulaf unu (%15), yağsız inek sütü (%3,5-4), şekersiz soya sütü (%3,3) ve yumurta (%13) örnekleri kullanılmıştır. Öncelikle, gıda örnekleri toz forma getirilmek üzere liyofilize edilmiştir. Ardından her protein pH 10'da hazırlanan yeşil çay ekstraktı çözelti ile 50°C'de 120 dakika boyunca reaksiyona sokulmuştur. Bu reaksiyon koşullarına, örneklere benzer proteinler için optimum olduğu kabul edilen koşullara bakılarak karar verilmiştir. Yeşil çay ile modifiye edilmiş kazein, ovalbumin ve gluten örneklerine yapılan antioksidan kapasite ölçümü sonuçlarına göre, optimum koşullar pH 10'da 50°C ve 120 dakika olarak belirlenmiştir. Reaksiyon yapılan protein bazlı gıda örneklerinden serbest yeşil çayın uzaklaştırılması için, bölüm 2.2.1.'de belirtildiği gibi yıkama prosedürü uygulanmıştır. Liyofilize edilen örnekler, antioksidan kapasite ölçümleri için +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### **2.2.3. Modifiye Protein – Glukoz Model Sistemlerinin Hazırlanması**

Yeşil çay ekstraktı ile muamele işleminin kazein, ovalbumin ve gluten proteinlerinin glikasyon potansiyelini nasıl etkilediğinin anlaşılabilmesi için model sistemler hazırlanmıştır. Bunun için modifiye edilmiş proteinlerle bu proteinlerin kontrol örnekleri farklı konsantrasyonlarda glukoz çözeltileriyle hazırlanmıştır. Bunun için, kazein, ovalbumin ve gluten proteinlerinin amino asit analizi ile lizin miktarları belirlenmiş, daha sonra bu proteinlerin lizin içeriklerine göre iz, eş molar ve aşırı olacak şekilde glukoz ilave edilmesine karar verilmiştir. Model sistemlerin hazırlanmasında, modifikasyonun en yüksek ve en düşük olduğu protein örnekleri kullanılmıştır.

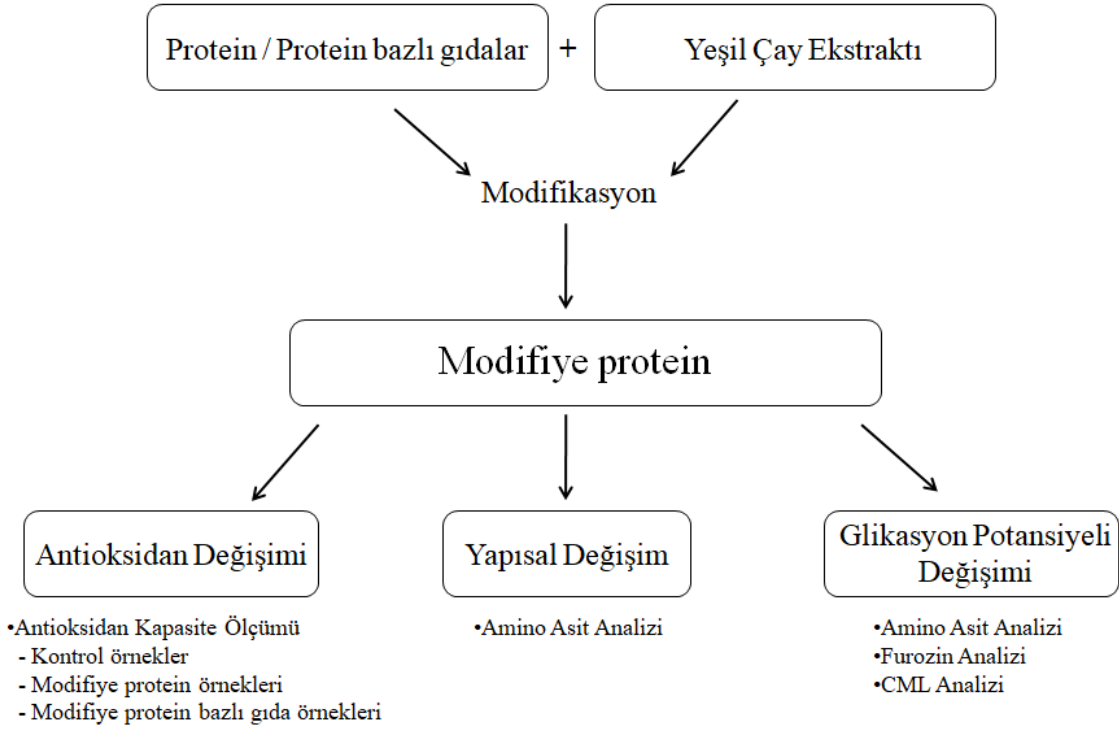
Tüplere 25 mg kontrol ve modifiye protein alınmış ve tüplere 1 mL su içerisinde 1-5-10-20-100  $\mu\text{mol}$  glukoz. $\text{mL}^{-1}$  deiyonize su ilave edilmiştir. Daha sonra tüplerin içeriği liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen örnekler, 100°C’de 15 dakika yağ banyosunda ısıtılarak glikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiş (Şekil 2.2) ve bu örneklerde furozin ve karboksimetillizin (CML) analizleri yapılmıştır.



Şekil 2.2 Model sistemin hazırlanması

### 2.3. Gerçekleştirilen Analizler

Tez kapsamında elde edilen modifiye protein ve modifiye protein bazlı gıda örneklerinde, modifikasyonun etkilerinin anlaşılabilmesi ve dolayısıyla doğrulanabilmesi için çeşitli analizler gerçekleştirilmiştir. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen analizler Şekil 2.3’de gösterilmiştir.



**Şekil 2.3** Tez kapsamında gerçekleştirilen analizler

### 2.3.1. Antioksidan Kapasite Ölçümü

Protein fenolik bileşik interaksyonu ile elde edilen modifiye proteinler ve onların kontrol örneklerinde antioksidan kapasite ölçümü yapılmıştır. Bu analizle, uygulanan modifikasyon koşullarının proteinlerin antioksidan kapasitelerinde yarattığı değişimin izlenmesi ve dolayısıyla optimum modifikasyon koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Antioksidan kapasite ölçümü QUENCHER metodu kullanılarak yapılmıştır [150, 151].

Antioksidan kapasite ölçümü için ABTS•+ stok çözeltisinden ABTS•+ çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 38,42 mg ABTS 5 mL deiyonize suda çözdürülmüştür. Potasyum peroksidisülfat çözeltisi, 6,615 mg potasyum peroksidisülfat 5 mL deiyonize su ile hazırlanmıştır. Konsantrasyonu 7 mmol.L<sup>-1</sup> olan ABTS ve 2,45 mmol.L<sup>-1</sup> olan potasyum peroksidisülfat çözeltilerinin 5'er mL'si reaksiyona sokularak toplamda 10 mL'lik stok ABTS•+ çözeltisi hazırlanmış, 12-16 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir [152]. ABTS•+'nin çalışma çözeltisi 10 mL'lik stok ABTS•+ çözeltisinden yaklaşık 800 mL tampon çözelti ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Tampon çözeltileri; kullanılan proteinlerin izoelektrik noktalarında hazırlanmıştır. Proteinlerin



izoelektrik noktalarında yüzey özelliklerinin erişilebilir olduğu bildirilmektedir [153]. Bu sebeple ölçümler kullanılan proteinlerin spesifik izoelektrik noktalarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, YÇE ile reaksiyonlar alkali pH'larda gerçekleştirilmiştir ve bu pH'lar proteinlerin izoelektrik noktalarının üzerindedir. Proteinler izoelektrik noktalarının üzerinde negatif yüklüdürler. ABTS•+'nin radikal katyonu olması nedeniyle, yük dengesini ve ölçülen madde ile iyonik olarak etkileşmediğini garanti etmek amacıyla da tampon çözeltiler proteinlerin izoelektrik noktalarında hazırlanmıştır. Proteinlerin izoelektrik noktaları sitrat-fosfat tamponu kullanılarak sırasıyla; kazein için 4,6, ovalbumin için 4,54 ve gluten için 6,2 pH'larında hazırlanmıştır. Çalışma çözeltisi 734 nm'de 0,75-0,80 absorbansa ayarlanarak örnek ölçümleri için hazırlanmıştır.

Sonuçlar mmolTroloxedeğeri.kg<sup>-1</sup> (mmol TE.kg<sup>-1</sup>) olarak ifade edilmiştir [151]. 10'ar mg tartılarak tüplere alınan örnekler üzerine 10 mL ABTS•+ çalışma çözeltisi eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Tüpler 27 dakika boyunca belirli bir yörüngede, karanlıkta 350 rpm de kuvvetlice çalkalandıktan sonra, 6080g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. 30 dakikalık reaksiyon sonucunda, berrak supernatant (3 mL) küvete alınarak; Shimadzu model 2100 değişken dalga boylu UV-görünür spektrofotometrede (ShimadzuCorp., Kyoto, Japan) 734 nm'de ölçüm gerçekleştirilmiştir. Yüksek antioksidan aktivite nedeniyle radikal maddedeki renk açılması/değişimi ile ölçülen absorbans değeri lineer cevap aralığının altındaysa ölçümden önce ön seyreltme işlemi uygulanması gereklidir. Seyreltme işlemi, toz halindeki örnekler radikal çözeltilere göre inert bir madde olan selüloz ile karıştırılarak yapılmıştır. Seyreltme faktörleri, toplam antioksidan kapasite değerlerine bağlı olarak farklı oranlarda (1:1, 1:10, 1:100 (w/w)) olmuştur. Her örneğin Trolox eşdeğer antioksidan kapasitesini (TEAC) yüzde inhibisyon dönüşümü üzerinden hesaplamak için standart referans olarak Trolox kullanılmıştır. 0 ile 600 µg.mL<sup>-1</sup>metanol aralığında konsantrasyonlarda Trolox kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden yararlanılmış ve antioksidan kapasite değerleri kilogram başına milimolTrolox olarak ifade edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi oluşturabilmek için farklı konsantrasyonlardaki trolox çözeltilerinden 100 µL alınarak test tüpüne aktarılmıştır ve üzerlerine 10 mL ABTS•+ çalışma çözeltisi eklenmiştir. Karışımlar oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra elde edilen radikal çözeltilerden 2 mL küvetlere aktarılmış, ve kalibrasyon eğrisini oluşturmak için 734 nm'de absorbans ölçülmüştür.

### 2.3.2. Amino Asit Analizi

Gerçekleştirilen modifikasyonun protein yapısında yarattığı değişimin izlenebilmesi için kontrol ve modifiye proteinlerde amino asit analizi gerçekleştirilmiştir. Modifiye proteinin ne kadar modifiye olduğunun anlaşılabilmesi için yapılan prosedür sonucunda elde edilen proteinlerde enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz ile protein-fenol interaksyonu ile oluşan kovalent bağın kırılması önlenmiştir.

Enzimatik hidroliz, Henle ve ark'larının [154] yayınladığı prosedür modifiye edilerek uygulanmıştır. Bunun için pepsin, pankreatin ve proteaz enzimleri kullanılmıştır. Hidroliz için modifiye olmuş proteinler ve kontrol proteinlerinden 10 mg alınarak 1 mL 0,05 M HCl çözeltisinde çözündürülmüştür. Ardından protein örneğinin üzerine 50 µL pepsin (13,2 mg pepsin.2 mL<sup>-1</sup> 0,01 M HCl) eklenmiştir ve 37°C'de çalkalamalı su banyosunda 24 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra kısmen hidroliz edilmiş örneğin üzerine 410 µL 1,43 M sodyum bikarbonat tamponu eklenerek ortam pH'sı yaklaşık 8'e getirilmiş ve pepsin sindirimi durdurulmuştur. Ardından 0,05 g pankreatin, 1 mL pankreatin tamponu (4920 µL x 10 mM HCl + 410 µL 1,43 M sodyum bikarbonat tampon) içinde hazırlanmış ve bu çözeltiden 10 µL alınarak örneğin üzerine eklenmiştir. Örnekler pankreatin enzimi varlığında çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 48 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra kısmen hidroliz edilen örneklerin üzerine 50 µL proteaz (13,2 mg.2 mL<sup>-1</sup> deiyonize su) eklenerek 37°C'de çalkalamalı su banyosunda 24 saat bekletilmiş ve hidroliz tamamlanmıştır.

Enzimatik hidroliz sonrasında hidrolizatlar su ve asetonitril ile seyreltildikten sonra internal standart olarak 0,5 mg.L<sup>-1</sup> konsantrasyonunda theanin eklenmiştir. Örnekler vorteks ile karıştırıldıktan sonra 0,45 µ naylon filtreden geçirilip kromatografi vialine alınmıştır. Kromatografik ayırım Synchronis-HILIC (100 x 2.1 mm, 1.7 µm) kolonu kullanılarak 40°C'de gradyan karışım ile gerçekleştirilmiştir. Gradyan karışımında mobil fazlar; (A) su içerisinde %0,5 formik asit ve 5 mM amonyum format ve (B) %90 asetonitril içerisinde %0,5 formik asit ve 5 mM amonyum format olarak hazırlanmıştır ve akış hızı 0,7 mL/dk'dır. İlk 3 dakika boyunca kolon %100 B mobil fazında tutulmuştur. Ardından %B oranı 4 dakika içerisinde lineer olarak %70'e düşürülmüştür. Daha sonraki 10 saniyede lineer olarak %20'ye düşürülmüş ve 10.dakikanın sonuna kadar %20'de tutulmuştur. Sonrasında 1 dakika içinde lineer olarak başlangıç kompozisyonuna (%100B) yükseltilmiş ve bu şartlar altında 4 dakika tutulmuştur. Bu şekilde kromatografik ayırım 15 dakikada tamamlanmıştır. Internal standart olarak %0,5

mg.L<sup>-1</sup> konsantrasyonda theanin kullanılmıştır. Veriler m/z oranı theanin için 175.0, parçalanma iyonları için 46.0 ve 158.0 izlenerek kaydedilmiştir. Kuantifikasyonda external standart eğrisi oluşturmak için 0,1 ile 5 mg.L<sup>-1</sup> aralığında amino asit karışımları kullanılmıştır. Analiz pozitif iyonlaştırma kullanılarak Waters TQD LC-MS/MS'de (ABD) gerçekleştirilmiştir. İyonlaştırma kaynağı parametreleri; kaynak sıcaklığı 120°C, desolvation sıcaklığı 350°C, çarpışma enerjisi 12 V, desolvation gaz akış hızı 900 L/h, kapiler voltaj 3,5 kV, kon voltajı 20 V ve ekstraktör voltajı 3 V'dur.

### **2.3.3. Furozin Analizi**

Furozin analizi Gökmen ve ark.'larına göre [155] bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. 25 mg kuru modifiye protein ve kontrol örnekleri cam tüplere konulmuştur. Üzerlerine 2,5 mL 8N HCl eklenmiştir. Tüpler hızlıca azot gazından geçirilip sıkıca kapatılmış ve hidroliz için 110°C'de 23 saat boyunca tutulmuştur. Hidrolizatlar filtre kağıdı ile süzölmüş ve süzölen hidrolizatlardan 100 µL cam tüplere alınmıştır. Hidrolizatlar azot gazı altında kuruyana kadar buharlaştırılmış ve konsantre olmuş örnek 1 mL deiyonize suda çözülmüş ve OASİS HLB kartuştan geçirilerek cam viallere alınmıştır. Kromatografik ayırım Agilent Technologies 1200 Series Quat Pump'da (ABD) Atlantis HILIC kolunu ile (4.6 x 250 mm, 5 µm) 40°C'de 1 mL/dk akış hızındaki %1 formik asit çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon 280 nm dalgaboyunda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, 1-10 mg/L aralığında furozin standartları kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır.

### **2.3.4 Karboksimetillizin (CML) Analizi**

CML analizi Palermo ve ark.'larına [156] göre bazı modifikasyonlar ile gerçekleştirilmiştir. 20 mg kuru modifiye protein ve kontrol örnekleri cam tüpler içerisine tartılıp üzerine 100 µL deiyonize su ilave edilmiştir. Sonrasında üzerlerine 450 µL sodyum borat tamponu (0,2 M, pH 9,2) ile 500 µL sodyum borohidrit (1M çözelti 0,1 M NaOH içerisinde hazırlanmıştır) eklenmiştir. Fruktozillizin hekzitollizine indirgenmesi için örnekler 4 saat boyunca oda sıcaklığında tutulmuştur. Daha sonra örnekler 2 mL 8N HCl eklenip azot gazından geçirilip, kapakları sıkıca kapatılmıştır. 23 saat boyunca 110°C'de tutulan örnekler, hidroliz sonrasında filtre kağıdından geçirilerek süzölmüştür. Cam tüplere alınan 20 µL hidrolizat azot ile buharlaştırılmış ve buharlaştırılan örnek 1 mL deiyonize suda çözdürülerek önceden koşullandırılmış

OASIS HLB kartuştan geçirilerek cam viallere alınmıştır. Kartuş koşullandırılması sırasıyla 1 mL metanol, 1 mL deiyonize su ve 1 mL hava geçirilerek gerçekleştirilmiştir. Kartuştan geçirilirken ilk 8 damla atılarak seyrelmeden kaynaklanabilecek hatalar giderilmeye çalışılmıştır. Analiz pozitif iyonlaştırma kaynağı kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve rnekler MerckSeQuant ZIC-HILIC (150 x 4.6 mm, 3.5 µm) kolonu ile Agilent Technologies 1260 Infinity II UltivoTripleQuad LC-MS/MS'te (ABD) analiz edilmiştir. Kromatografik ayırım 1 mL/dk akış hızında, 60°C'de gradyan karışım ile gerçekleştirilmiştir. Gradyan karışım olarak mobil fazlar (A) su içerisinde %0,1 formik asit ve (B) asetonitril içerisinde %0,1 formik asit olarak hazırlanmıştır ve akış hızı 1 mL/dk'dır. Eluent kompozisyonu ilk 12 dakika boyunca %30 A ve %70 B olacak şekilde tutulmuştur. Daha sonraki 1 dakikada % A oranı lineer olarak %80'e çıkmış ve %B oranı %20'ye dūřürölmüřtür. Sonraki 3 dakika boyunca aynı şartlar altında tutulup 17. dakikada A %30 'a dūřürölüp B %70'e çıkarılmıştır. Takip eden 5 dakika boyunca kolon bu şartlarda tutulmuştur. Bu şekilde kromatografik ayırım 22 dakikada tamamlanmıştır. İyon kaynağı parametreleri; gaz sıcaklığı 300°C, gaz akış hızı 6 L/dk, nebulizer basıncı 60 psi, kapiler voltajı 2 kV, sheath gaz sıcaklığı 300°C, sheath gaz akışı 11 L/dk, nozzle voltajı 0,5 kV'dır.

Tarama türü çoklu reaksiyon izleme (multiple reaction monitoring, MRM)'dir. Verilerin alınması m/z oranı CML için 205.10, parçalanma iyonları için 84.10 ve 130.10 izlenerek gerçekleştirilmiştir. Kuantifikasyon için matrix-match kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır. Blank matris olarak; ısıtılmamış kontrol protein örnekleri seçilmiş ve hidroliz edilmiştir. Hidroliz edilen ısıtılmamış kontrol protein örneklerinden 20 µL alınarak azotla uçurulmuş ve konsantre olmuş örneklerin üzerine 100 µL 0, 1, 2, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında CML ilave edilmiştir. Daha sonra rnekler 900 µL deiyonize suda çözölerek yukarıda belirtildiği şekilde CML analizine hazırlanmıştır. Modifiye protein ve kontrol örneklerinde olduğu gibi yukarıda bahsedildiği şekilde analiz edilmiştir.

### **2.3.5.İstatiksel Analiz**

Verilerin istatiksel analizi için IBM SPSS-23.0 kullanılmıştır. Örnekler arasında istatiksel açıdan anlamlı bir farkın olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile incelenmiştir. Bunun için Tukey ve Duncan HSD Post-Hoc testleri p<0,05 düzeyindeki anlamlı farklılıkları belirlemek için uygulanmıştır.

### 3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bu tez kapsamında, çeşitli proteinler YÇE ile modifiye edilmiş ve modifiye edilen proteinlerin antioksidan özelliklerinde ve glikasyon potansiyellerindeki değişim izlenmiştir. Bu çalışmada protein-fenol interaksiyonu için kazein, ovalbumin ve glutenin amino asit kompozisyonları incelenerek; aktif yan zincirlere sahip amino asit miktarları dikkate alınmıştır. (Tablo 3.1’de kazein, ovalbumin ve gluten için bazı amino asit miktarları mmol/g protein olarak verilmiştir [8, 157, 158]).

**Tablo 3.1** Amino asit kompozisyonu (mmol/g protein)

AA	KN	OVA	GLU
Lizin	0,56	0,35	0,08
Arjinin	0,24	0,22	0,14
Sistein	0,012	0,15	0,087
Triptofan	0,07	0,034	0,048
Histidin	0,19	0,15	0,14

Besinsel ve fonksiyonel özelliklerinden dolayı, kazein temel olarak gıdalarda besin takviyesini sağlamak veya gıda ürününün fiziksel özelliklerini değiştirmek için kullanılan en yaygın ingrediendir [159]. Çünkü kazein temel amino asit olan lizince zengindir ve reaktif lizin kalıntıları kolaylıkla okside fenol bileşikleriyle elektrofilik-nükleofilik eklenmeler verebilir. Yüksek lizin miktarı ve yaygın kullanım potansiyeli ile kazein, model sistem için seçilen proteinlerden biri olmuştur. Yumurta proteinleri, renk ve lezzet sağlamanın yanı sıra özellikle yumurta beyazı; mükemmel köpürme, jelleşme ve emülsifiye etme gibi fonksiyonel özellikleri nedeniyle fırıncılık ürünleri, beze ve et ürünleri gibi birçok gıda için arzu edilen bir bileşendir [160]. Pek çok alanda geniş bir kullanım alanı olan ovalbumin, yumurta beyazı proteinlerinin yaklaşık % 54’ünü oluşturur [158]. Ovalbuminin serbest tiyol grupları ve reaktif yan zincirlerinin (Arjinin, Histidin gibi) varlığı; ingrediye olarak katıldığı pek çok gıda ürününde, diğer gıda bileşenleri ile reaksiyon potansiyelini arttırmaktadır. Dolayısıyla, gıda ürünlerindeki geniş dağılımı ve üstün çözünürlük özellikleri nedeniyle bu çalışmada ovalbumin

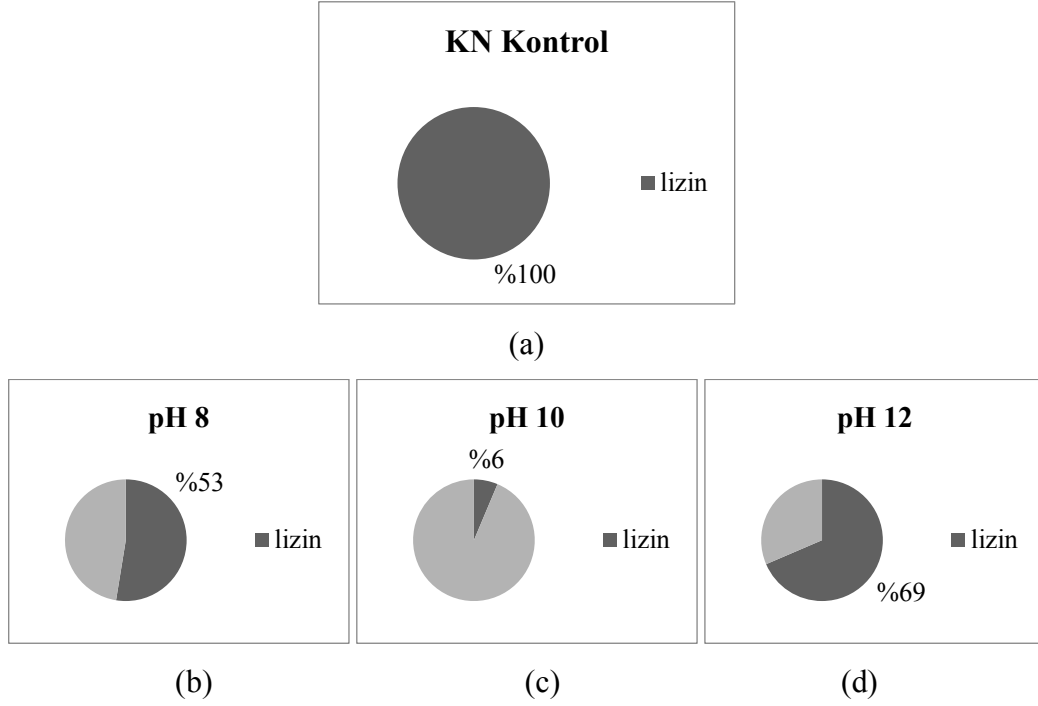
seçilmiştir. Gluten proteini lizin, triptofan ve metiyonin miktarı açısından düşük olma eğilimi gösterse de asparajin, glutamin, prolin ve arjinin bakımından zengindir [161]. Çeşitli hububatlar ve baklagillerle yapılan bir çalışmada, buğday gluteninin, test edilen diğer proteinlere kıyasla daha yüksek konsantrasyonda disülfid bağlarına ve toplam sisteine ve en yüksek antioksidatif kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir [162]. Gluten, yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir ve sadece fırıncılık sektöründe değil aynı zamanda ana bileşen olarak soya sosu, hidrolize buğday proteinleri, buğday kepeği hidrolizati, buğday protein izolati, buğday nişastası, glikoz şurupları, buğday maltodekstrin, sorbitol, laktitol, maltitol, karamel,  $\beta$ -glukan, alkol/etanol, sirke, buğday tohumu yağı, ilaçlar vb. pek çok alanda da [163] kullanım potansiyeli vardır. Bu sebeplerden glutenin fenolik bileşikler ile modifikasyonunun olası sonuçlarının gıda endüstrisi için değerlendirilebilir olacağı düşünülerek tez kapsamında gluten proteininin kullanımına karar verilmiştir.

Yeşil çay ile yapılmış farklı çalışmalarda yeşil çay ekstraktındaki kateşin miktarının 0,17 – 0,29 mmol toplam kateşin/g ekstrakt aralığında değiştiği görülmüştür [164, 165]. Bu sebeple proteinlerin reaktif yan zincirlere sahip amino asit miktarları değerlendirilerek; kazein ve ovalbumin proteinleri için %2 yeşil çay ekstraktlı çözelti ile gluten ise %1 yeşil çay ekstraktlı çözelti ile muamele edilmiştir.

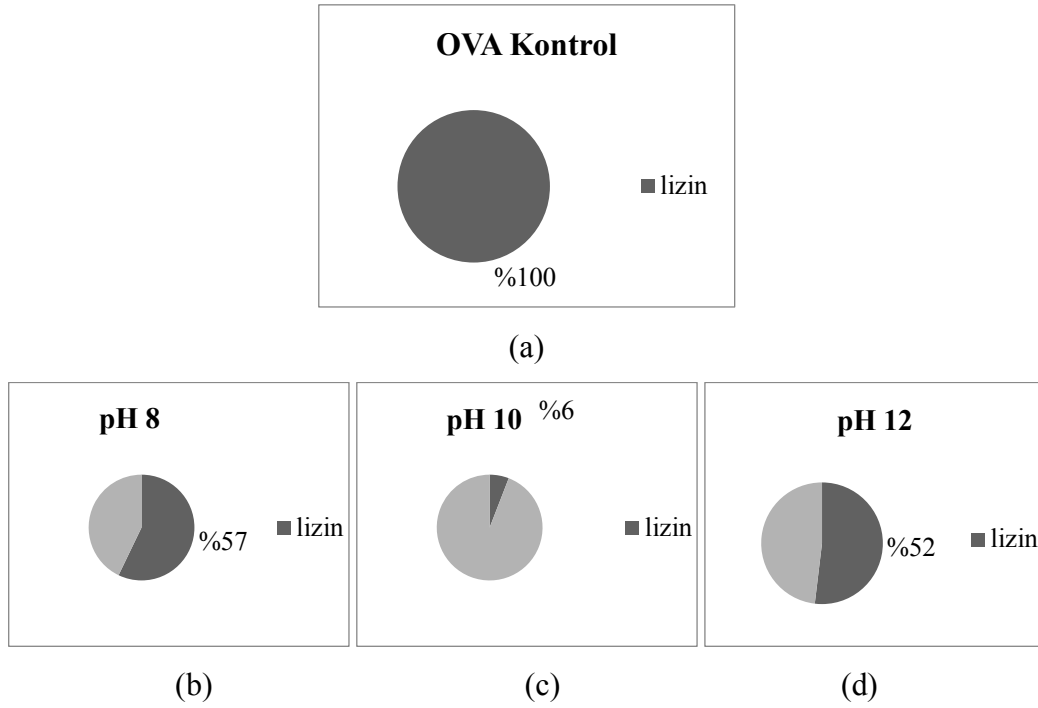
### **3.1. Yeşil Çay Ekstraktı ile Modifikasyonun Proteinler Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi**

#### **3.1.1. Modifikasyonun Protein Yapısı Üzerine Etkisi**

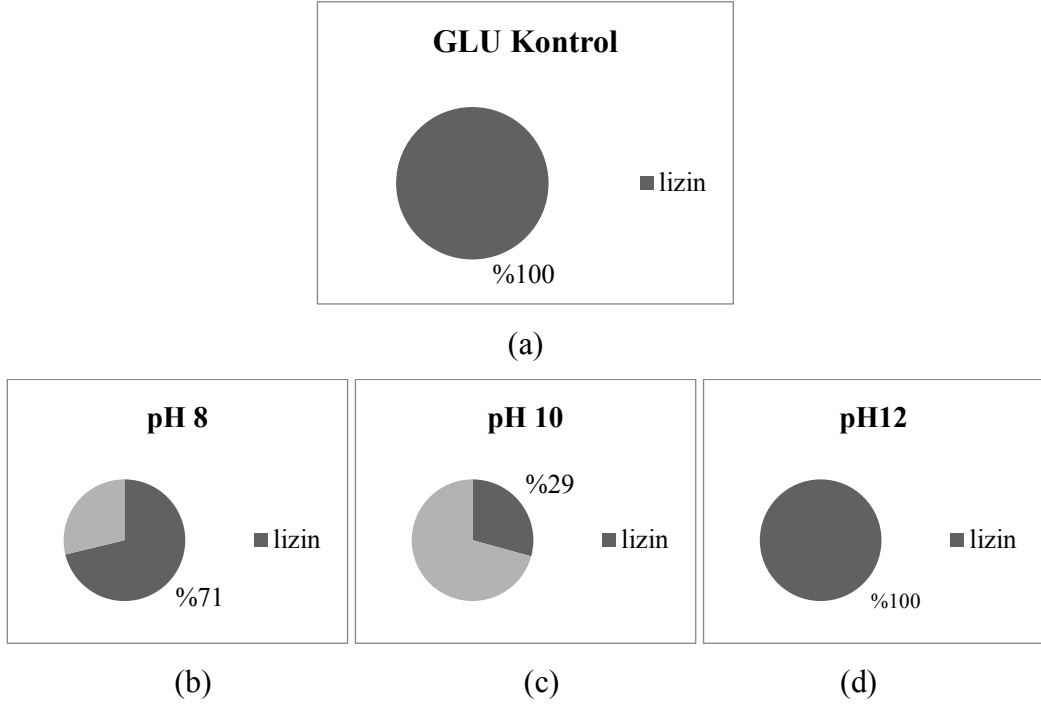
Kazein, ovalbumin ve gluten proteinleri pH 8, 10 ve 12’de 30, 60, 120 dakika boyunca 25 ve 50°C’de YÇE ile etkileştirilerek modifiye edilmiştir. Protein modifikasyonunun doğrulanması amacıyla örneklerde enzimatik hidroliz sonrasında amino asit analizi yapılmıştır. Protein-fenol interaksiyonu ile oluşan kovalent bağın kırılması istenmediği için enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.1’de modifiye kazein, Şekil 3.2’de modifiye ovalbumin ve Şekil 3.3’de modifiye gluten proteinindeki lizin miktarlarının kontrol örneklerine göre yüzde azalış oranları verilmiştir.



**Şekil 3.1** (a) Modifiye edilmemiş KN (kontrol) , (b) pH 8’de, (c) pH 10’da, (d) pH 12’de YÇE ile modifiye edilen KN için % lizin miktarları



**Şekil 3.2** (a) Modifiye edilmemiş OVA (kontrol), (b) pH 8’de, (c) pH 10’da, (d) pH 12’de YÇE ile modifiye edilen OVA için % lizin miktarları



**Şekil 3.3** (a) Modifiye edilmemiş GLU (kontrol), (b) pH 8’de, (c) pH 10’da, (d) pH 12’de YÇE ile modifiye edilen GLU için % lizin miktarları

Modifiye olmamış KN lizin içeriği %100 kabul edildiğinde, modifikasyon sonrasında modifiye KN lizin miktarlarının; pH 8’de %47, pH 10’da %94 ve pH 12’de %31 oranında azaldığı görülmektedir. Benzer şekilde, modifiye olmamış OVA lizin içeriği %100 kabul edildiğinde, modifikasyon sonrasında modifiye OVA lizin içerikleri; pH 8’de %43, pH 10’da %94 ve pH 12’de %48 oranında azalmıştır. Bunlara ek olarak, modifiye olmamış GLU lizin içeriği %100 kabul edildiğinde, modifikasyon sonrasında modifiye GLU lizin miktarları; pH 8’de %29, pH 10’da %71 ve pH 12’de %0 oranında azalmıştır.

Lizinin yanı sıra, modifikasyon sonrasında reaktif yan zincire sahip amino asitler histidin, arjinin, triptofan miktarları da incelenmiştir. Tablo 3.2, Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’de bu amino asitlerin yüzde azalış değerleri verilmiştir.



**Tablo 3.2** Kontrol ve modifiye KN örneklerinde histidin, arjinin ve triptofan için yüzde azalış miktarları

<b>Reaktif amino asit miktarındaki azalış (%)</b>			
	pH 8	pH 10	pH 12
<b>Histidin</b>	%61	%35	%0
<b>Arjinin</b>	%86	%29	%81
<b>Triptofan</b>	%61	%10	%12

**Tablo 3.3** Kontrol ve modifiye OVA örneklerinde histidin, arjinin ve triptofan için yüzde azalış miktarları

<b>Reaktif amino asit miktarındaki azalış (%)</b>			
	pH 8	pH 10	pH 12
<b>Histidin</b>	%33	%0	%48
<b>Arjinin</b>	%61	%0	%80
<b>Triptofan</b>	%51	%10	%21

**Tablo 3.4** Kontrol ve modifiye GLU örneklerinde histidin, arjinin ve triptofan için yüzde azalış miktarları

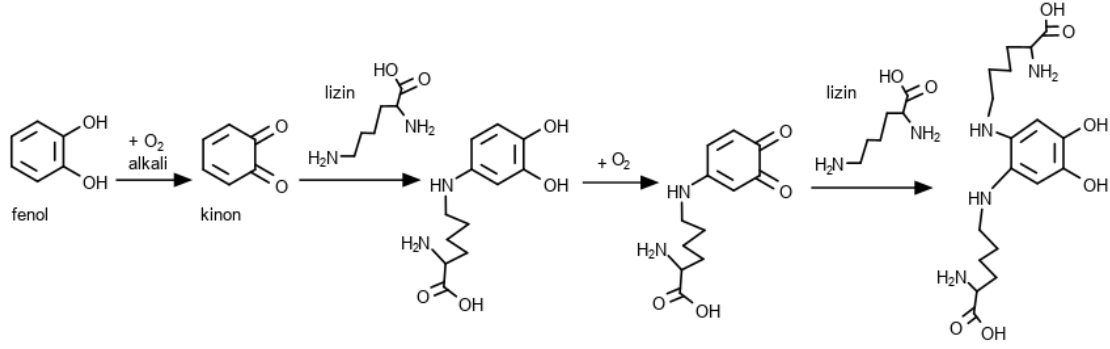
<b>Reaktif amino asit miktarındaki azalış (%)</b>			
	pH 8	pH 10	pH 12
<b>Histidin</b>	%64	%0	%8
<b>Arjinin</b>	%0	%0	%25
<b>Triptofan</b>	%75	%0	%4

Histidin, Arjinin ve Triptofan için azalış değerleri pH 10'a kıyasla pH 8 ve pH 12'de oldukça fazladır. OVA için pH 12'de reaktif yan zincire sahip amino asitlerin azalışının pH 8'e kıyasla genel anlamda daha fazla olduğu, KN ve GLU içinse pH 8'deki reaktif yan zincire sahip amino asitlerdeki azalışın pH 12'ye kıyasla daha fazla olduğu görülmektedir.

Proteinlerin reaksiyonlarını etkileyen faktörler arasında yer alan pH, reaktif ve reaktif olmayan iyonlaşma durumları arasındaki reaktif yan zincirlerin dağılımını kontrol ettiği için oldukça önemlidir [166]. Proteinlerdeki tüm iyonlaşabilir grupların pKa değerleri serbest amino asitlerden farklıdır. Proteinlerin pKa değerleri ile serbest amino asitlerin pKa değerlerinin farklı olması, proteinlerdeki bu grupların değiştirilmiş elektronik ve

dielektrik ortamlarıyla ilgilidir. [8] pKa<sub>1</sub> değeri COO<sup>-</sup> ve COOH konsantrasyonlarının eşit olduğu pH olarak bilinir ve ortam pH'sı pKa<sub>1</sub> değerinin altındaysa amino asidin karboksil grubu pozitif yüklenir. Benzer şekilde, [NH<sub>3</sub><sup>+</sup>] = [NH<sub>2</sub>] olduğu durumda pH değeri pKa<sub>2</sub> değerine eşit olur [7]. pKa<sub>3</sub> değeri ise protein yan zincirindeki grupların iyonlaşabildiği değeri ifade eder ve pH'nın pKa<sub>3</sub> değerinin üzerinde olduğu durumda yan zincirler negatif yüklenirler. Lizin için pKa<sub>3</sub> değeri 10,53 ve izoelektrik noktası (pI) 9,74'tür. Arjinin pKa<sub>3</sub> değeri 12,48 ve pI 10,76'dır. Histidinin pKa<sub>3</sub> değeri 6,0 ve pI değeri 7,59 ve triptofanın pI değeri 5,89'dur. Ayrıca amino asitlerin izoelektrik noktalarının üzerindeki pH değerlerinde negatif yüklendiği bilinmektedir. Tez kapsamında incelenen amino asitlerin pKa<sub>3</sub> değerleri genel olarak 9-10 arasındadır ve modifikasyon için uygulanan muamele koşulları pI değerlerinin üzerindedir. Alkali ortam koşulları ile negatif yüklenen amino asidin pozitif yüklü elektrofilik kinon molekülü ile daha fazla bağ yapması beklenmektedir. Buradan hareketle ortam pH'sı, reaktif amino asitlerin pKa<sub>3</sub> değerleri ve bağlanma yüzdeleri arasında net bir korelasyon görülememiştir. Buna sebep olarak, kullanılan proteinlerin ve yeşil çayın çok kompleks ve büyük moleküller olmasının reaktif amino asitlerin farklı alkali koşullardaki davranışını değerlendirmeyi zorlaştırdığı söylenebilir. Ancak elde edilen sonuçlar net olarak göstermektedir ki, lizin pH 10'da diğer amino asitlere kıyasla okside fenolik bileşik ile daha yüksek verimle reaksiyona girmektedir.

Fenolik bileşiklerin alkali koşullarda fenolat iyonlarına dönüştüğü ve ardından kinon oluşumunun gerçekleştiği bir gerçektir [89]. Bir çalışmada, fenolik bileşikler önce buğday kepeği matrisinin yüzeyinde bulunan serbest amino gruplarına bağlanarak alkali koşullar altında kinon formlarına oksitlenmişlerdir ve daha sonra çözünür fenolik bileşiklerin buğday kepeği yüzeyinde polimerleşmeye devam ettiği görülmüştür [167]. Benzer şekilde, bizim çalışmamızda, oksitlenmiş fenolik bileşiklerin, lizin, metiyonin, sistein, triptofan ve arjinin gibi nükleofiller tarafından kolaylıkla saldırıya uğrayabileceği yapılan amino asit analizi ile doğrulanmıştır. Proteinlerin alkali koşullarda YÇE ile muamelesi esnasında gerçekleşen reaksiyon için önerilen mekanizma Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.4** Yeşil çay fenolik bileşikleri ile proteinlerin lizin kalıntıları arasındaki reaksiyon için önerilen mekanizma [168]

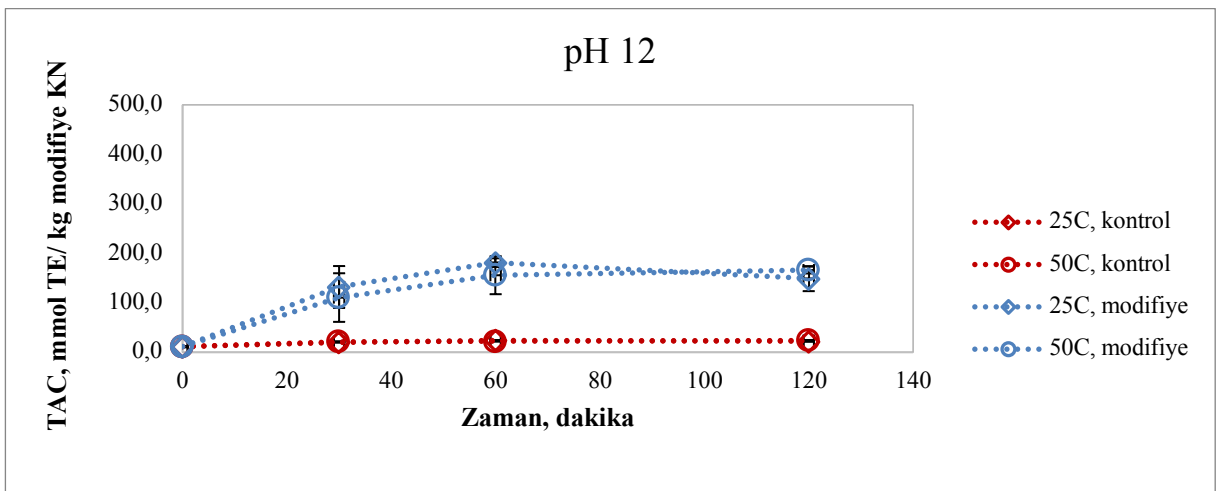
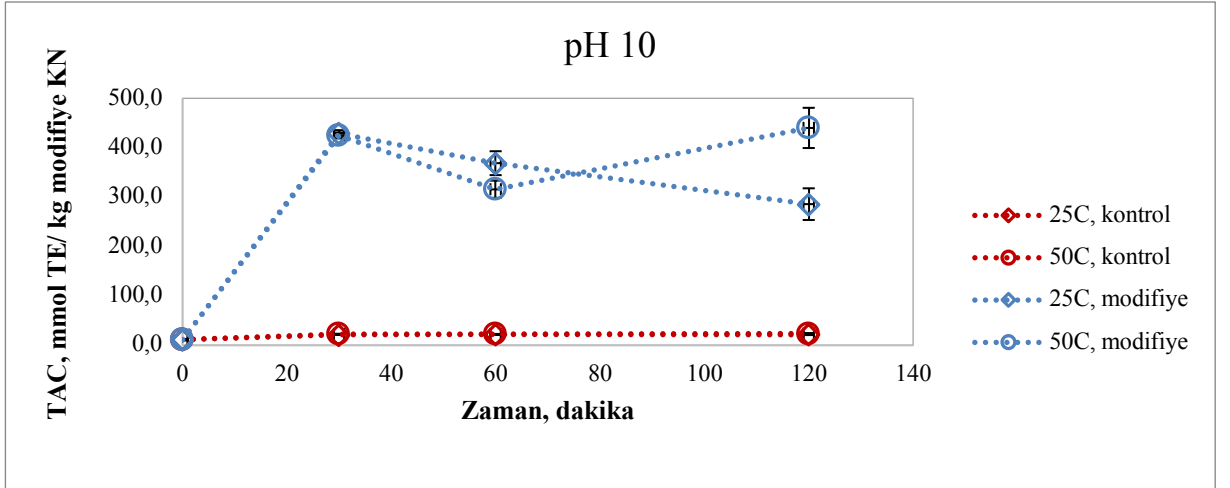
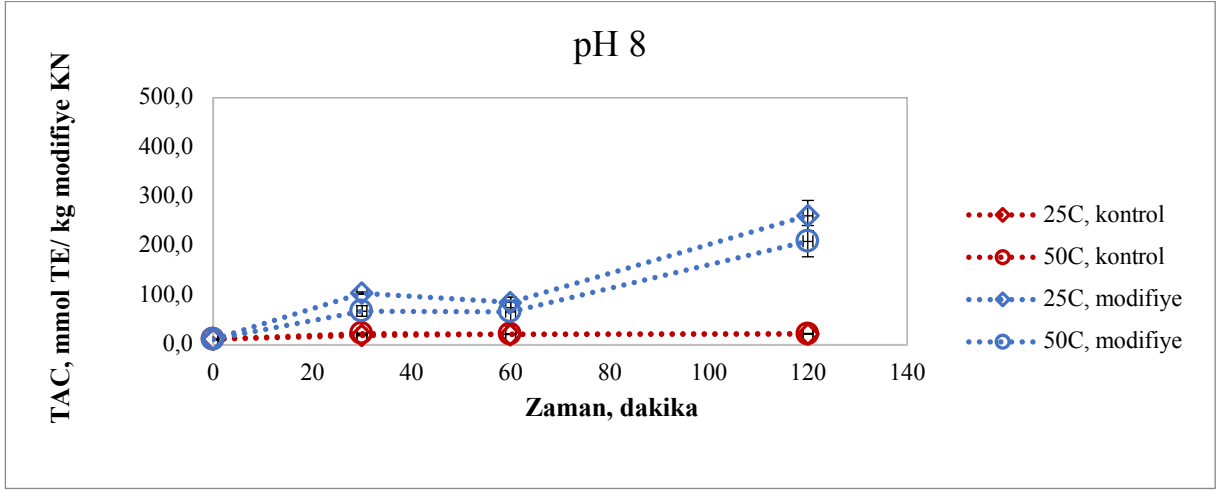
Alkali koşullar altında okside olan fenolik bileşiklerin proteinlerin reaktif yan zincirlerine kovalent olarak eklenmesi yüklü grupların kaybına neden olmuştur. Reaktif lizin kalıntılarındaki azalmanın muhtemel sonuçlarından biri olan glikasyon potansiyelindeki değişim de tez kapsamında incelenecektir.

### 3.1.2. Modifikasyonun Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi

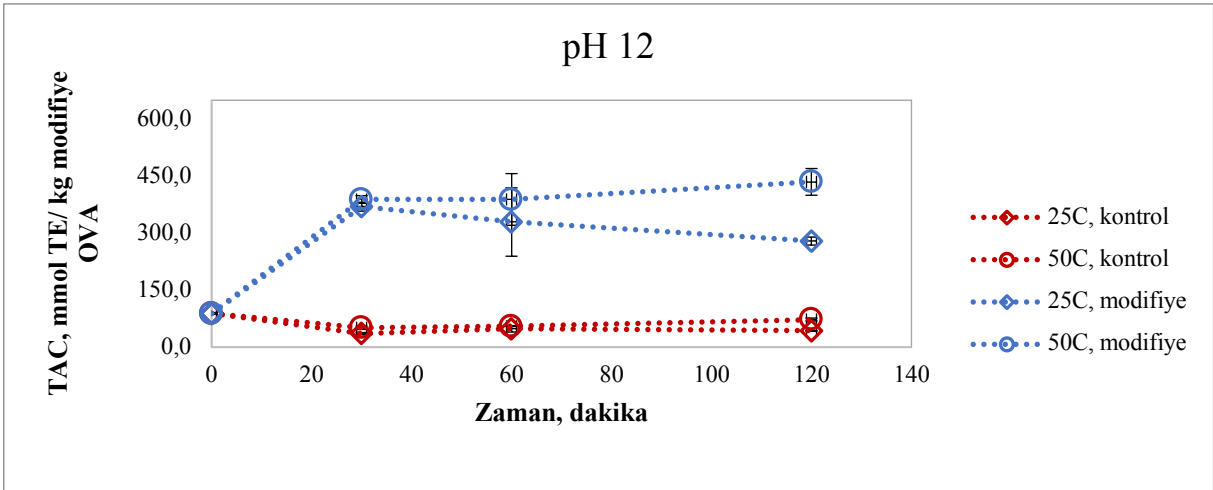
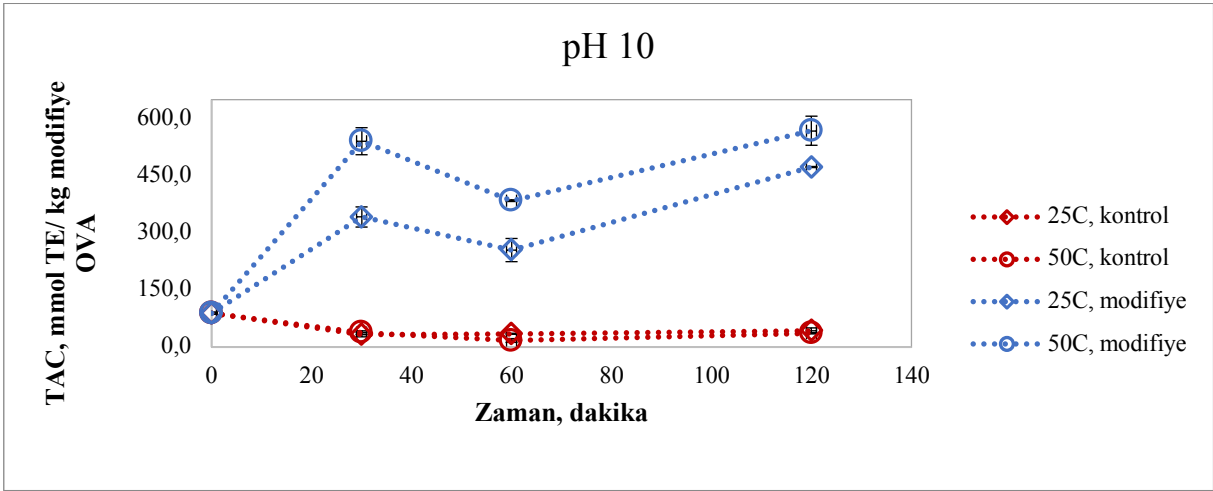
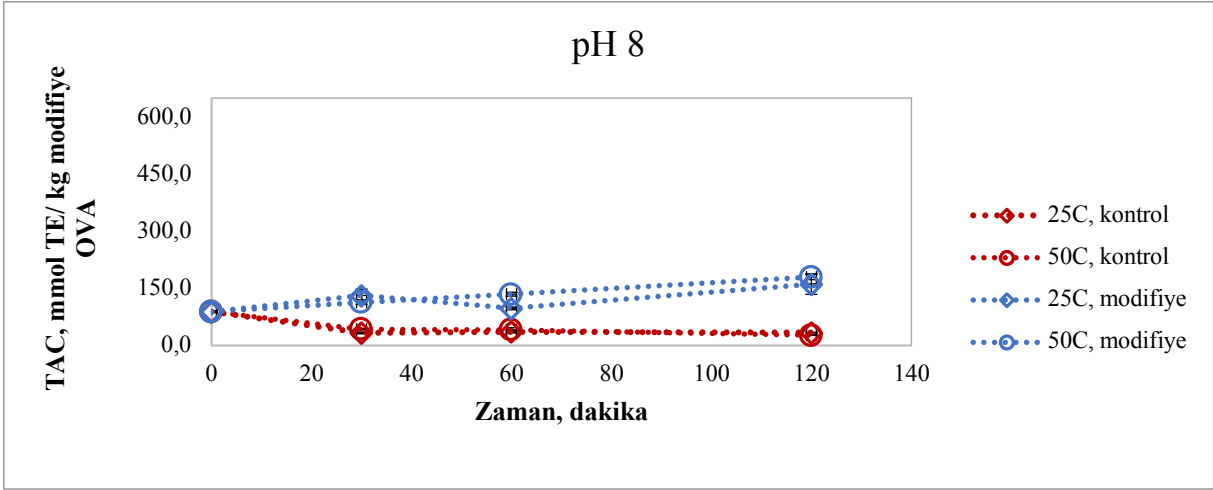
Protein modifikasyonu enzimatik hidroliz gerçekleştirildikten sonra yapılan amino asit analizi ile doğrulanmıştır. Modifikasyonun antioksidan aktivite üzerindeki etkisinin incelenmesi için modifiye proteinlerde antioksidan kapasite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. KN, OVA ve GLU proteinlerinin farklı pH'larda antioksidan kapasitelerindeki değişim, Şekil 3.5'de gösterilmiştir. Genel olarak TAK sonuçları göstermiştir ki, modifiye protein örneklerinin TAK değerleri, kontrol örneklerinden anlamlı derecede yüksektir ( $p < 0,05$ ).

Ortamda yeşil çay olmadığı koşullarda muamele edilmiş KN (KN kontrol) proteinlerinde gerçekleştirilen TAK analizi sonuçlarına ( $11,5 \pm 1,0$  mmol TE.kg<sup>1</sup>) göre, kontrol örnekleri modifikasyon koşullarından etkilenmezken yeşil çayla muamele sonrasında pH 8'de TAK  $209,8 \pm 31,6$  mmol TE.kg<sup>1</sup>, pH 10'da  $440,1 \pm 40,7$  mmol TE.kg<sup>1</sup> ve pH 12'de  $181,2 \pm 8,8$  mmol TE.kg<sup>1</sup>'a yükselmiştir. Modifiye KN örnekleri incelendiğinde, YÇE ile pH 8, 10 ve 12'de gerçekleştirilen muamele sonucunda TAK değerlerinde anlamlı bir artış görülmüştür ( $p < 0,05$ ). pH 8'de sıcaklığı arttırmanın TAK üzerine etkisi olmazken ( $p > 0,05$ ), süreyi uzatmak TAK'da anlamlı bir fark yaratmıştır ( $p < 0,05$ ). Sıcaklık ve süreyi arttırmanın pH 10 ve pH 12'de gerçekleştirilen muamele sonucundaki TAK değerlerinde anlamlı bir etkisi görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). En yüksek

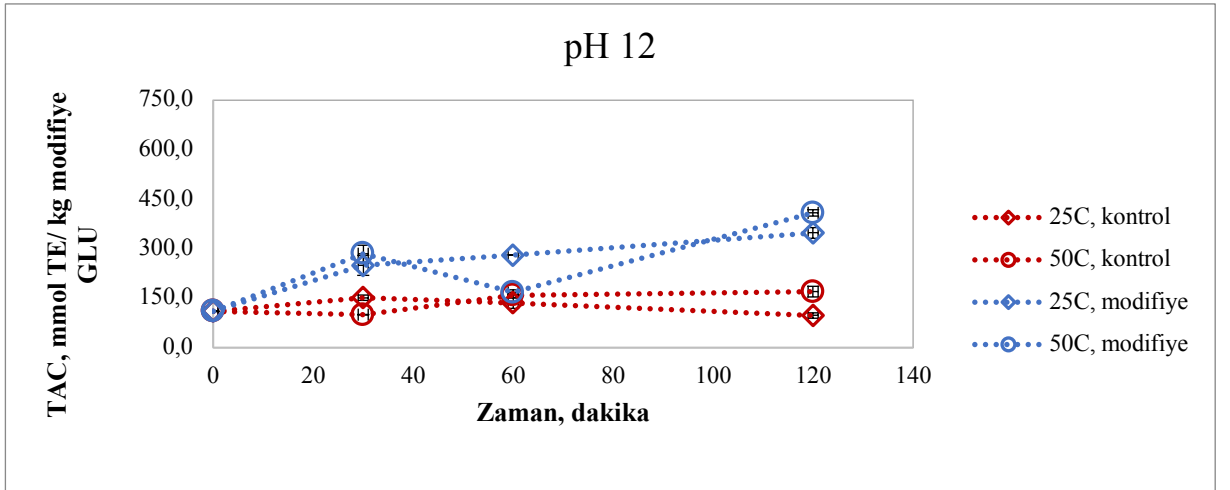
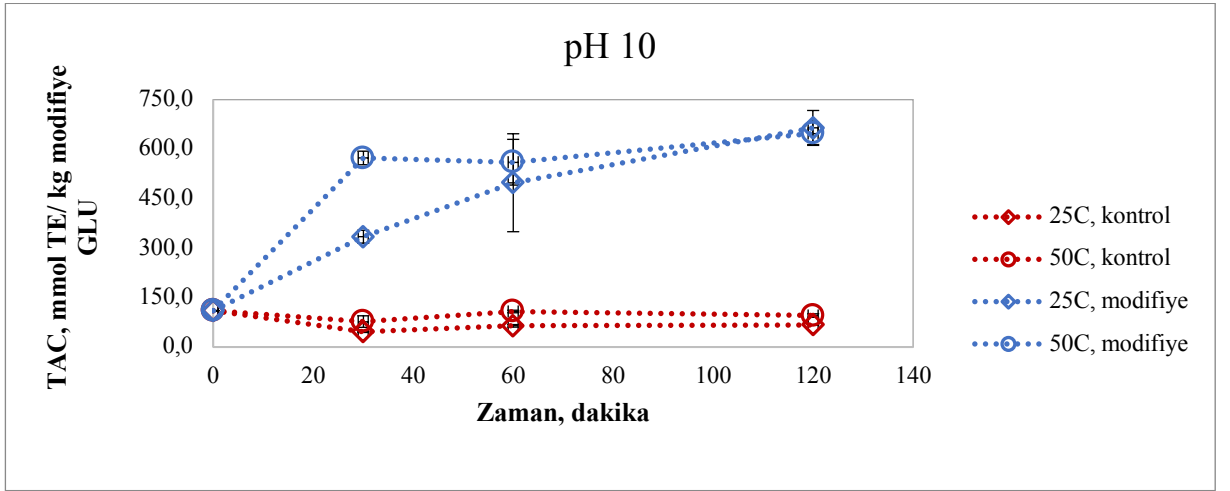
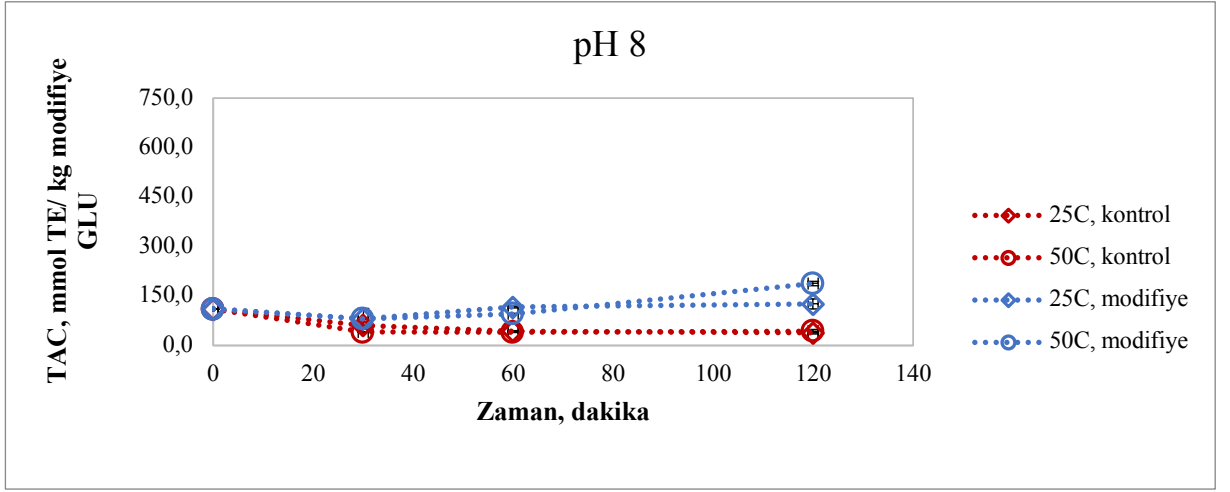
TAK değeri pH 10'da gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda elde edilen modifiye proteinlerde görülmüştür.



(a)



(b)



(c)

**Şekil 3.5** pH 8, pH 10 ve pH 12’de 25 ve 50°C’de modifiye edilen (a) KN, (b) OVA, (c) GLU proteinlerinin antioksidan kapasitelerinin reaksiyon süresince değişimi (sonuçlar ortalama  $n=37 \pm$  standart sapma olarak verilmektedir)

Benzer sonuçlar OVA ve GLU örnekleri için de gözlenmiştir. OVA örnekleri ortamda yeşil çay olmadığı koşullarda muamele edilmiş (OVA kontrol) ve TAK analizleri gerçekleştirilmiştir. Ancak, OVA başlangıç örneği TAK değeri  $88,9 \pm 2,2$  mmol TE.kg<sup>1</sup> olarak gözlenmişken farklı pH, sıcaklık ve sürelerde muamele edildikten sonra TAK değerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Yeşil çayla muamele sonrasında TAK sonuçları pH 8’de  $179,9 \pm 6,9$  mmol TE.kg<sup>1</sup>, pH 10’da  $568,4 \pm 38,3$  mmol TE.kg<sup>1</sup> ve pH 12’de  $435,2 \pm 35,1$  mmol TE.kg<sup>1</sup> olmuştur.

Genel olarak proteinler, oksidatif modifikasyona duyarlı birçok reaktif bölgeye sahiptir. Proteinlerin antioksidan özelliği ilk önce amino asit bileşimleri ve ikinci olarak konumlandırmaları ile ilişkilidir. Bu nedenle antioksidan etkiye sahip amino asitlerin lokalizasyonu ve fiziksel erişilebilirliği önemlidir [162]. Amino asitler, esas olarak sülfhidril gruplarının (sistein ve metiyonin) indirgen etkisi veya aromatik kalıntıların elektron eksikliği olan radikallere (triptofan, tirozin ve fenilalanin) proton bağıışı ile antioksidanlar olarak işlev görebilir. Tiyol grupları, aromatik yan zincirler (triptofan, tirozin ve fenil alanin) ve histidindeki imidazol halkasının varlığı antioksidan özellikler için önemli yapısal özellikler olarak kabul edilir [169]. Ovalbumin, tek bir disülfid bağı olan 6 sistein kalıntısı içeren ve serbest -SH (tiyol) gruplarına sahip tek yumurta akı proteinidir [170]. Tiyol gruplarının varlığı, redoks düzenlenmesinde ve bağlayıcı metal iyonlarında rol oynama yeteneği sağlar ve bu nedenle antioksidan özellik gösterir [171-173]. Farklı alkali koşullar altında gerçekleşen reaksiyonlar sırasında ovalbumindeki tiyol grupları oksidasyona uğramıştır. Yeşil çay olmadan farklı koşullarda muamele edilen OVA antioksidan kapasitesinde başlangıca göre gözlenen azalış tiyol gruplarının oksidasyona uğraması sebebiyle görülmektedir.

Benzer şekilde GLU örnekleri de ortamda yeşil çay olmadan modifikasyon koşullarında muamele edilmiş (GLU kontrol) ve TAK analizleri gerçekleştirilmiştir. GLU kontrol örneklerinin TAK sonuçlarına göre muamele edilmeden önce TAK değeri  $110,3 \pm 0,33$  mmol TE.kg<sup>1</sup> iken, pH 8 ve pH 10’da farklı sıcaklık ve sürelerde reaksiyon ile antioksidan kapasitelerinde düşüş gerçekleşmiştir. Yeşil çayla muamele sonrasında ise TAK sonuçları pH 8’de  $187,8 \pm 6,7$  mmol TE.kg<sup>1</sup>, pH 10’da  $664,3 \pm 52,9$  mmol TE.kg<sup>1</sup> ve pH 12’de  $408,5 \pm 9,6$  mmol TE.kg<sup>1</sup> olmuştur.

Protein yapısı, moleküler ağırlığı ve amino asit sekansları antioksidan kapasitesini güçlü bir şekilde etkileyebilir. Bir çalışmada, yapısal molekül bütünlüğünün proteinlerin antioksidan etkisi için en önemli konu olduğu belirtilmiştir. Amino asit kalıntılarının erişilebilirliğini değiştiren herhangi bir değişiklik antioksidan aktiviteyi artırabilir [174]. Karmaşık bir protein olan buğday gluteninin, test edilen diğer hububat proteinlere kıyasla en yüksek disülfid bağları ve toplam sistein konsantrasyonuna ve aynı zamanda en yüksek ABTS radikal temizleme etkinliğine sahip olduğu gösterilmiştir [162]. Sistein kalıntıları, çeşitli reaktif oksijen türleri tarafından oksidasyon için kolay hedeflerdir. Sistein kalıntılarının proteinlerde geri dönüşümlü redoks anahtarları olarak işlev görebilmesi, bu amino asidin benzersiz redoks kimyasına dayanır [175]. Gluten proteininde sistein amino asiti minör (%2) [176] olmasına rağmen, sistein protein içinde zincirler arası disülfid bağları veya proteinler arasında zincirler arası disülfid bağları oluşturur [163]. Disülfid bağlarının proteinlerde öncelikle yapısal bir rolü olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, redoks merkezleri olarak hizmet etme kapasiteleri de mevcuttur [177]. Farklı proteinlerle yapılan bir çalışmada, proteinin kısa bir süre ısıtılmasının; proteinin kısmi denatürasyonuna, protein zincirlerinin açılmasına ve reaktif kalıntıların serbest kalmasına neden olurken bunun yanı sıra bir proteinin yapısından hidrojen ve disülfid bağları ve onların serbest radikallerle reaksiyonlarını ve transferini teşvik eden çok etkili bir faktör olduğu gösterilmiştir [162]. Test edilen proteinlerin antioksidan kapasiteleri; disülfid (S-S) bağları ve toplam sistein konsantrasyonları ile pozitif, serbest tiyol (-SH) gruplarının konsantrasyonu ile negatif korelasyon gösterdiği görülmüştür [162]. Bu açıdan, S-S bağlarının konsantrasyonunun antioksidan kapasite ile ilişkili olduğu söylenebilir. En yüksek disülfid bağları konsantrasyonuna sahip olduğu bilinen glutenin alkali ortamda denatüre olarak bağ konsantrasyonunda meydana gelecek azalma GLU kontrol örneklerindeki antioksidan kapasitedeki azalmayı açıklayabilir.

Modifiye OVA örnekleri incelendiğinde, YÇE ile pH 8, 10 ve 12'de gerçekleştirilen muamele sonucunda TAK değerlerinde anlamlı bir artış görülmüştür ( $p < 0,05$ ) ve en yüksek TAK değeri pH 10'da gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda elde edilen modifiye proteinlerde görülmüştür. OVA'nin YÇE ile muamelesinde pH 8, 10 ve 12'de sıcaklık ve süreyi uzatmak TAK değerleri için istatistiksel bir fark yaratmamıştır.



Modifiye GLU örneklerinde de benzer şekilde YÇE ile gerçekleştirilen muamele sonucunda TAK değerlerinde anlamlı bir artış görülmüştür ( $p < 0,05$ ). pH 8’de sıcaklık ve süreyi uzatmak TAK değerlerinde anlamlı bir fark yaratmamıştır. pH 10’da sıcaklığı arttırmak ilk 30 dakika içinde TAK değerinde anlamlı bir artışa sebep olurken ( $p < 0,05$ ), 30. dakikadan sonra sıcaklık ve süreyi arttırmanın bir etkisi olmamıştır ( $p > 0,05$ ). pH 12’de ise süreyi uzatmak TAK değerlerinde anlamlı bir artışa sebep olmuştur.

Alkali koşullar altında kinon formuna okside olan fenolik bileşikler ile kompleks oluşturarak elde edilen modifiye proteinlerin antioksidan kapasitesindeki en yüksek artış, üç protein için de pH 10’da muamele edilen örneklerde gözlenmiştir. pH 8’de TAK değerlerinin en az oluşu; kinon oluşumunun daha yavaş gerçekleşmesi ve/veya lizin, sistein, arjinin, histidin, triptofan gibi kalıntıların kinon halkasına daha yavaş bağlanmasından kaynaklanmış olabilir. Benzer bir şekilde tirozinazla pH 7’de ve pH 10’da gerçekleştirilen bir çalışmada reaksiyon sonucunda pH artışıyla reaktif lizin kalıntılarının kaybının arttığı görülmüştür [57, 89]. Kateşinlerin oto-oksidasyonlarının incelendiği bir çalışmada, kullanılan tüm kateşinlerin oto-oksidasyonunun pH ile arttığı görülmüştür. pH ile oto-oksidasyonun artması proteinlerin reaktif kalıntılara bağlanma oranını arttıracak ve bağlanma miktarındaki artışa paralel olarak antioksidan aktivite değerlerinde artış görülmesi beklenmektedir. Zayıf bazik koşullar altında B halkası üzerinden okside olan kateşinlerin, güçlü bazik çözeltilerde reaksiyon hızlarının büyük ölçüde arttığı ve C halkası üzerindeki gallat ikame edicilerinin de oksitlendiği ifade edilmiştir [178]. pH 12’deki antioksidan kapasite artışı pH 10’na göre nisbeten daha azdır. Reaktif amino asitlerin  $pK_{a3}$  değerleri genel olarak 9-10 arasında değişmekte ve bu değerlerin üzerinde bağlanmanın daha fazla olması ve buna bağlı olarak antioksidan kapasitede daha fazla artış görülmesi beklenmektedir. Fakat pH 12’deki antioksidan kapasite artışı pH 10’na göre nispeten daha azdır. Bu durum fenolik bileşiklerin yüksek alkali koşullarda bağlanma afinitelerinin değişmesi ile ilişkilendirilebilir. Bir çalışmada, yüksek asidik ve bazik koşulların (pH 2 ve pH 12) fenollerin bağlanma afinitesini etkileyebileceği ve hidroliz sonucu bağlı fenolik asitlerin kaybından dolayı böyle yüksek pH koşullarının bağlanma üzerinde daha az etkili olacağı ifade edilmiştir [167].

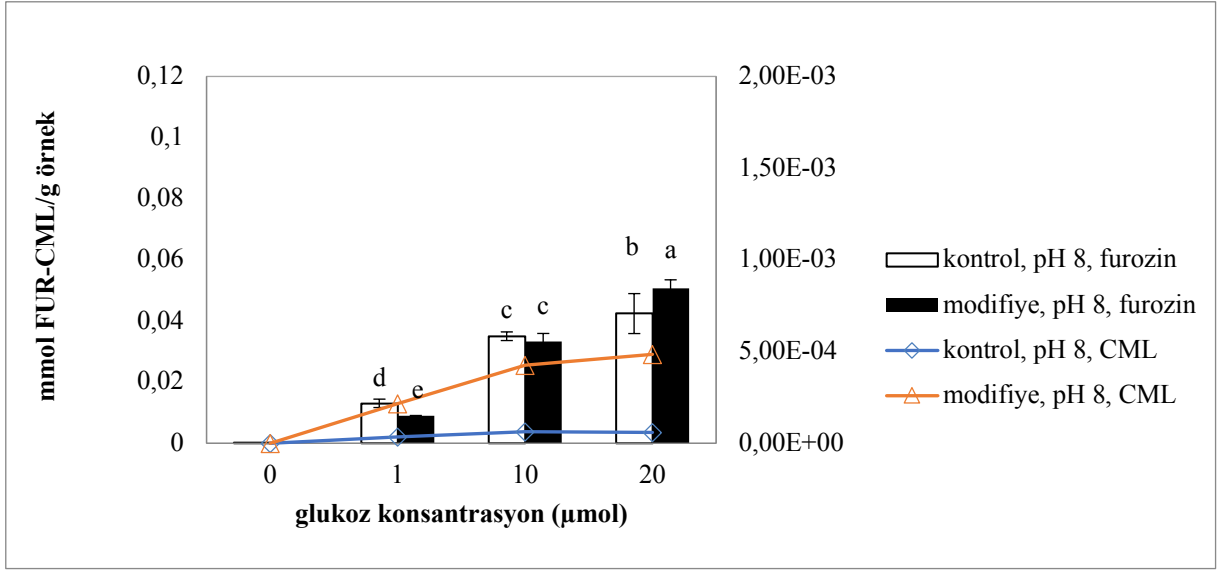
Sıcaklık, oksidasyon reaksiyonlarını etkileyen temel faktörlerden biridir ve sıcaklık artışı ile birlikte fenoksi radikallerin oluşumunun artması beklenmektedir.

Ancak sıcaklık ve süreyi uzatmak proteine okside fenolik bileşiğin bağlanması noktasında alkali pH ile muamele kadar etkili görülmemiştir. Yapılan bir çalışmada, pH 10'da sıcaklık artışının lizin kaybını oda sıcaklığında %27, 40°C'de %40 ve 60°C'de %55'e varan şekilde büyük ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir [57, 89]. Başka bir çalışmada, buğday kepeği ve yeşil çay infüzyonu ile yapılan reaksiyonlarda farklı sıcaklık ve sürelerin etkisi incelenmiş [167] ve sıcaklığın 25°C'den 50°C'ye çıkarılması antioksidan kapasitede 1,96 kat, sürenin 30 dakikadan 60 dakikaya uzatılması da 1,49 kat artışa sebep olmuştur. Reaksiyon sıcaklığı ile beraber reaksiyon süresinin lizin kaybı üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada ise, lizin kaybının büyük kısmının reaksiyon süresindeki ilk 30 dakika içerisinde gerçekleştiği, 30 dakikadan sonra 180 dakika boyunca devam eden reaksiyon süresinin lizin miktarında anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür [57, 89].

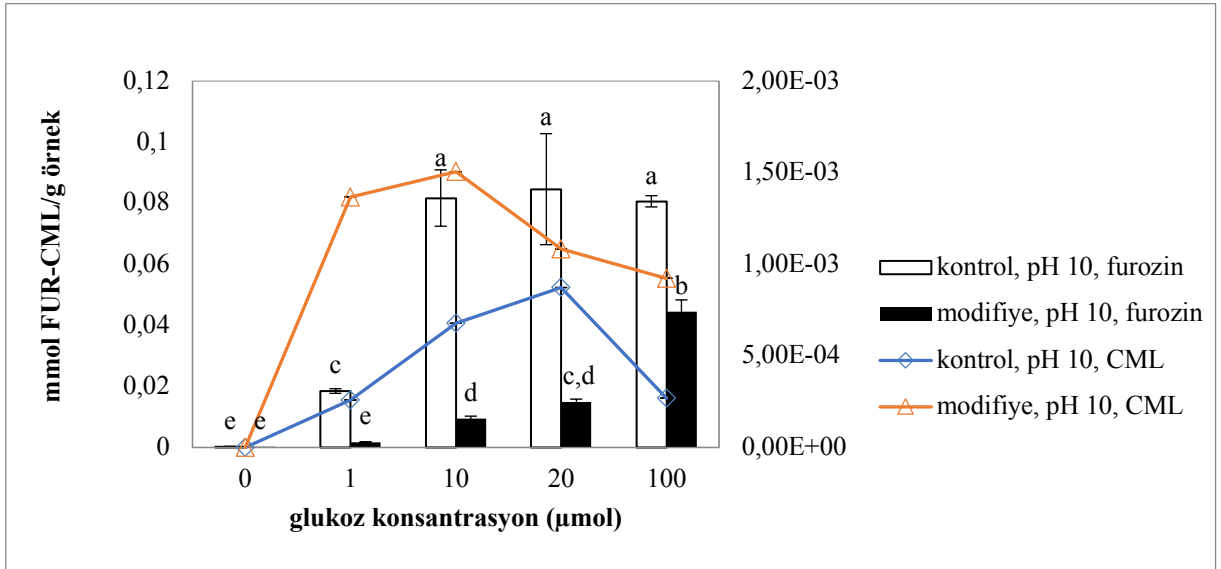
### **3.1.3. Modifikasyonun Glikasyon Üzerine Etkisi**

Protein modifikasyonu sonrasında lizin ve reaktif amino asitlerde azalma, antioksidan kapasite sonuçlarında ise anlamlı bir artış görülmüştür. Modifikasyonun, glikasyon potansiyeli üzerine etkilerinin incelenmesi için furozin ve karboksimetillizin (CML) analizleri gerçekleştirilmiştir. Oksitlenmiş fenollerin proteinlere bağlanması, mevcut glikasyon bölgelerinin bozulmasına yol açabilir, bu da glukoz ile ısıtma sırasında furozin ve CML oluşumunda azalmaya neden olabilir.

Bu çalışmada, fenolce zengin bir kaynak olan YÇE ile proteinin primer yapısının modifikasyonunun gerçekleştirilmesinin proteinlerin glikasyon potansiyeli üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla antioksidan kapasite sonuçları ve amino asit analizi dikkate alınarak bağlanmanın en fazla olduğu pH 10 ve bağlanmanın en az olduğu pH 8'de 50°C 120 dakika boyunca modifiye edilen proteinler alınmıştır. KN ve OVA model sistemleri, 1 ile 100  $\mu\text{mol glukoz.mL}^{-1}$  arasında değişen konsantrasyonlarda glukoz ile KN ve OVA'dan oluşmaktadır. Bunun yanında GLU ve 1 ile 100  $\mu\text{mol glukoz.mL}^{-1}$  arasında değişen konsantrasyonlarda glukoz ile hazırlanan model sistemler de 100°C'de 15 dakika boyunca yağ banyosunda ısıtılmışlardır. Farklı protein-glukoz model sistemlerinde furozin ve CML oluşumu izlenmiştir.



(a)



(b)

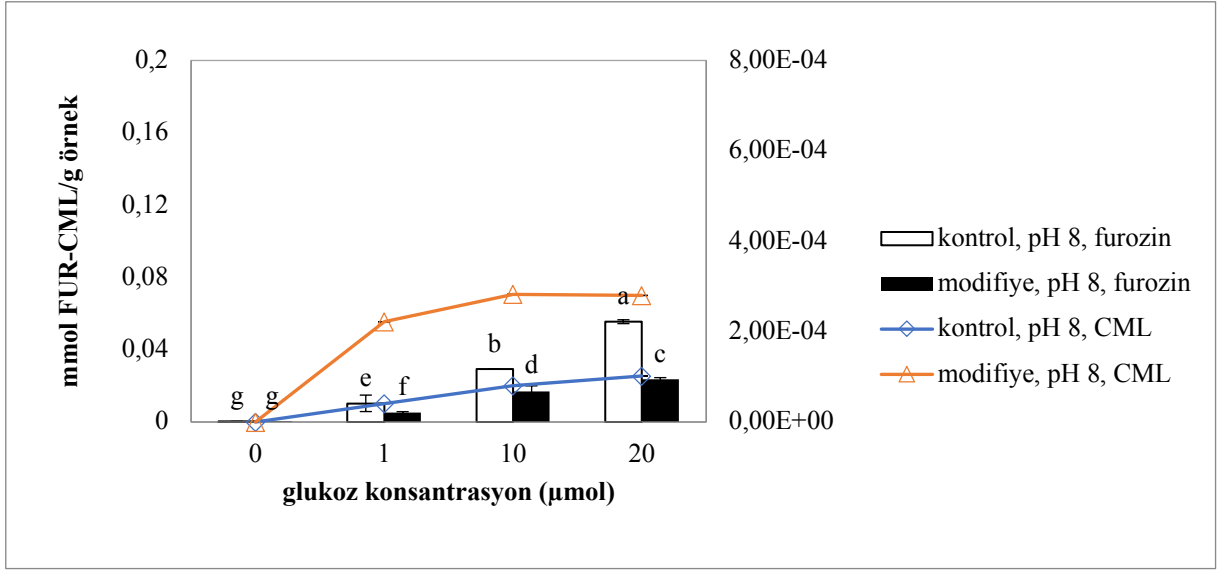
**Şekil 3.6** (a) pH 8'de ve (b) pH 10'da 50°C 120 dakika YÇE ile modifiye edilmiş KN proteininin 100°C 'de 15 dakika boyunca farklı konsantrasyonlardaki glukoz ile ısıtılması süresince oluşan FUROZİN ve CML (mmol/g örnek) miktarlarındaki değişim (Sonuçlar ortalama n=32 ±standart sapma olarak verilmektedir)

Şekil 3.6 pH 8 ve 10'da muamele edilmiş kontrol ve modifiye KN proteinlerinden oluşturulmuş model sistemlerde oluşan furozin ve CML miktarlarının (mmol FUR-CML.g<sup>-1</sup>örnek) glukoz konsantrasyonuna göre değişimi verilmiştir. pH 8'deki sonuçlar incelendiğinde, kontrol örneklerine (kontrol, pH 8) kıyasla kazenin YÇE ile modifiye edilmiş örneklerinde (modifiye, pH 8) ısıtma sonucunda oluşan furozin miktarının fazla olduğu görülmektedir. Diğer yandan, pH 10'da muamele edilen KN, farklı

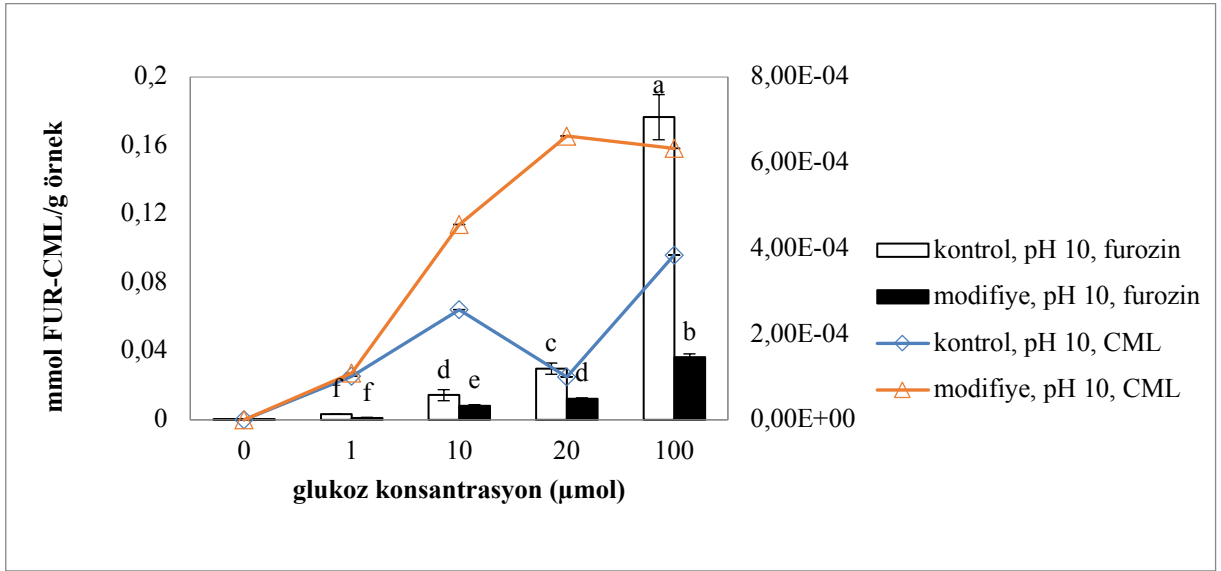
konsantrasyonlarda glukoz ile ısıtıldığında furozin oluşumu önemli miktarda teşvik edilmiştir. Bu durum kazein misel yapısıyla ilişkilendirilebilir. Kazein misellerinin yapısının serbest olduğu ve yüksek pH'da ayrıştığı ifade edilmiştir [179]. Kazein misel boyutunun  $pH > 8$  ve  $pH < 5$  olduğu durumlarda dissosiyeye olduğu, pH 8'e kadar nötr pH'ya kıyasla misel boyutunun arttığı belirtilmiştir [180]. Benzer bir çalışmada da, kazein misellerinin büyüklüğü pH 7,0 ve 7,5'da arttığı, daha sonra pH 8,5'in üzerinde düşmeye başladığı, 8,5'in altındaki pH değerlerinde kazein misellerinin şiştiği, yüksek pH'nın ayrışmalarına neden olduğu düşünülmektedir [181]. Yani bu durum pH 10'da gerçekleştirilen modifikasyon sırasında KN misellerinin dissosiyeye olmasına ve yüzeye bakan lizin sayılarının artmasına neden olmuş olabilir.

Diğer yandan, yeşil çay ile modifiye edilmiş KN (modifiye, pH 10, furozin) kontrol örneklere (kontrol, pH 10, furozin) kıyasla anlamlı derecede az furozin oluşturmuştur. Isıtma sonucunda, pH 10'da muamele edilen kontrol KN ve  $20 \mu\text{mol glukoz.mL}^{-1}$  ile hazırlanan model sistemde oluşan furozin miktarı  $0,085 \text{ mmol FUR.g}^{-1}$  örnek iken modifiye KN ile hazırlanan model sistemde oluşan furozin miktarı  $0,015 \text{ mmol FUR.g}^{-1}$  örnek'tir. Bu sonuç fenolik bileşikler ile pH 10'da gerçekleştirilen modifikasyon sonucunda furozin oluşumunun %82,4 oranında azaldığını göstermektedir.  $100 \mu\text{mol glukoz.mL}^{-1}$  ile kontrol KN örneklerinden hazırlanan model sistemlerde furozin oluşum miktarı  $0,080 \text{ mmol FUR.g}^{-1}$  örnek iken modifiye KN ile hazırlanan sistemde  $0,045 \text{ mmol FUR.g}^{-1}$  örnek'tir. Bu da pH 10'da gerçekleştirilen modifikasyonun  $100 \mu\text{mol glukoz.mL}^{-1}$  ile reaksiyonda furozin oluşumunda %44 oranında bir azalma yarattığını göstermektedir. Sonuç olarak, pH 10'da gerçekleştirilen modifikasyon sonucu elde edilen modifiye KN glikasyon sonuçları, YÇE ile muamelenin furozin miktarında anlamlı seviyede azalışa sebep olduğu söylenebilir ( $p < 0,05$ ).

Benzer şekilde pH 8'de muamele edilen KN kontrol örneği ve  $1 \mu\text{mol glukoz.mL}^{-1}$  ile hazırlanan model sistem, ısıtma sonucunda modifiye KN ile hazırlanmış model sisteme kıyasla daha az furozin oluşturmuştur. pH 8'de modifiye olmuş KN'in lizin içeriğinin kontrol örneğine göre azaldığı yapılan amino asit analizi ile görülmüştür. Aynı şekilde modifiye KN TAK değerlerinde kontrol KN'e göre artış görülmüştür. Bu sonuçlar ile birlikte furozin oluşumunun azalması beklenen bir durumdur. Ancak, aynı modifiye proteinlere daha fazla glukoz ilave edilerek ısıtıldığında, modifiye proteinlerde furozin oluşumunda kontrole kıyasla anlamlı bir fark görülmemiştir.



(a)



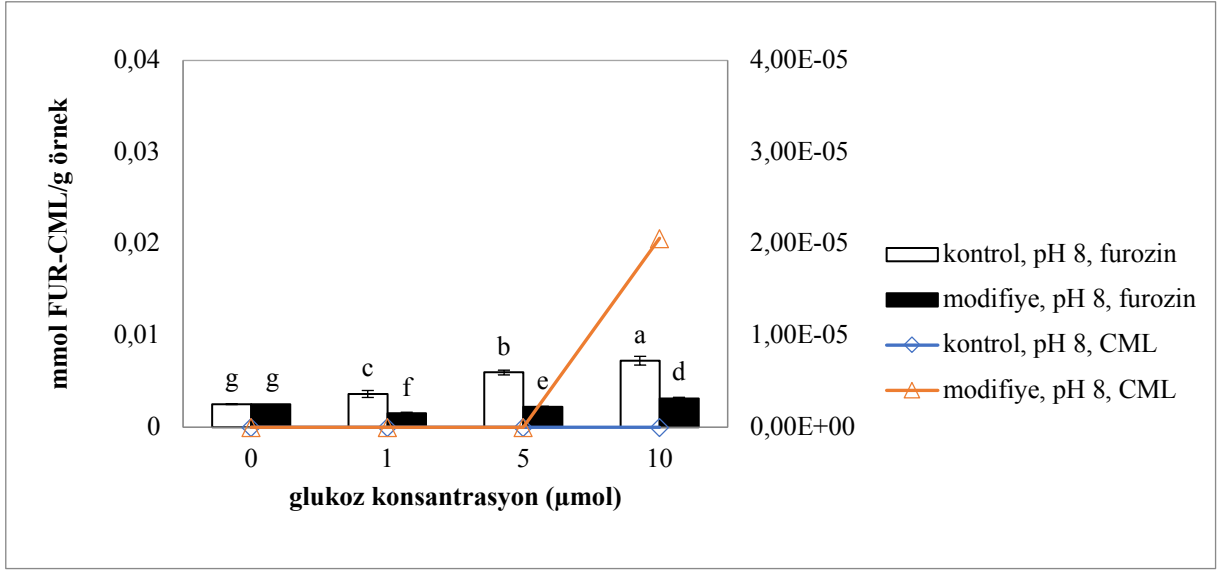
(b)

**Şekil 3.7** (a) pH 8'de ve (b) pH 10'da 50°C 120 dakika YÇE ile modifiye edilmiş OVA proteininin 100°C 'de 15 dakika boyunca farklı konsantrasyonlardaki glukoz ile ısıtılması süresince oluşan FUROZİN ve CML (mmol/g örnek) miktarlarındaki değişim (Sonuçlar ortalama n=32 ±standart sapma olarak verilmektedir)

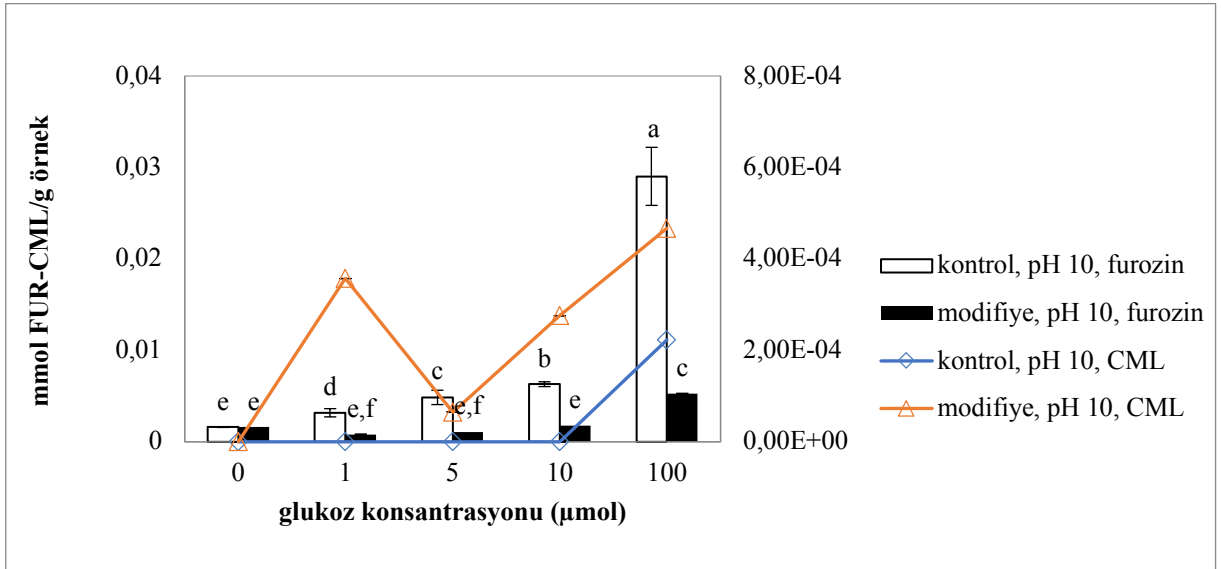
Şekil 3.7'de pH 8 ve pH 10'da YÇE olmadan gerçekleştirilen modifikasyon koşullarında muamele edilmiş OVA (kontrol, pH 8 ve kontrol, pH 10) ile YÇE ile muamele edilen OVA (modifiye, pH 8 ve modifiye, pH 10) ile hazırlanmış model sistemlerde oluşan furozin ve CML miktarlarının (mmol FUR-CML.g<sup>-1</sup> örnek) glukoz konsantrasyonuna göre değişimi verilmiştir. pH 8 için kontrol OVA ile 20 µmol glukoz.mL<sup>-1</sup> ile yapılan ısıtma sonucunda oluşan furozin miktarı 0,055 mmol FUR.g<sup>-1</sup>

örnek iken aynı koşullarda YÇE ile modifiye edilen OVA örneğinde oluşan furozin miktarı 0,023 mmol FUR.g<sup>-1</sup> örnek olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar pH 8’de gerçekleştirilen modifikasyon sonucunda furozin miktarında %58’lik bir azalışa karşılık gelmektedir.

Benzer şekilde, bağlanmanın en yüksek olduğu koşullar olan pH 10 için kontrol OVA ve 20 µmol glukoz.mL<sup>-1</sup> ile hazırlanan model sistemde ısıtma sonucunda oluşan furozin miktarı 0,029 mmol FUR.g<sup>-1</sup> örnek iken aynı koşullarda YÇE ile modifiye edilen OVA sisteminde oluşan furozin miktarı 0,012 mmol FUR.g<sup>-1</sup> örnek olarak tespit edilmiştir. Bu da pH 10’da gerçekleştirilen modifikasyon ile oluşan furozin miktarında %58,6’lık bir azalmaya karşılık gelmektedir. Benzer sonuçlar, pH 10’da muamele edilen OVA ve 100 µmol glukoz.mL<sup>-1</sup> ile hazırlanan örneklerde de gözlenmiştir. pH 10 koşullarında modifikasyon, ısıtma sonucunda oluşan furozin miktarında %78,9’luk bir azalma sağlamıştır.



(a)



(b)

**Şekil 3.8** (a) pH 8’de ve (b) pH 10’da 50°C 120 dakika YÇE ile modifiye edilmiş GLU proteininin 100°C ‘de 15 dakika boyunca farklı konsantrasyonlardaki glukoz ile ısıtılması süresince oluşan FUROZİN ve CML (mmol/g örnek) miktarlarındaki değişim (Sonuçlar ortalama n=32 ±standart sapma olarak verilmektedir)

Şekil 3.8’de pH 8 ve pH 10’da YÇE varlığında muamele edilmiş GLU (modifiye, pH 8 ve modifiye pH 10) ve YÇE olmadan muamele edilen GLU (kontrol, pH 8 ve kontrol, pH 10) ile hazırlanan model sistemlerde oluşan furozin ve CML miktarlarının (mmol FUR-CML.g<sup>-1</sup> örnek) glukoz konsantrasyonuna göre değişimleri verilmiştir. pH 8’de 5 µmol glukoz.mL<sup>-1</sup> ile yapılan ısıtma sonucunda kontrol örnekte oluşan furozin miktarı 0,0059 mmol FUR.g<sup>-1</sup> örnek iken modifiye GLU örneğinde bu miktar 0,0022 mmol

FUR.g<sup>-1</sup> örnek olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, pH 8'de gerçekleştirilen modifikasyon sonucunda furozin miktarında %62,7'lik bir azalış meydana gelmiştir.

pH 10'da da benzer sonuçlar elde edilmiştir. 5 µmol glukoz.mL<sup>-1</sup> ile hazırlanan model sistemlerinde ısıtma sonucunda oluşan furozin miktarı, modifiye örnekte kontrol örneğe kıyasla %77,5 oranında azalmıştır. Benzer şekilde pH 10'da YÇE ile modifiye edilen örnek ve 100 µmol glukoz.mL<sup>-1</sup> ile hazırlanan model sistemlerde yapılan ısıtma sonucunda oluşan furozin miktarında, kontrole oranla %81,7 oranında azalma gözlenmiştir.

Sonuç olarak, hem pH 8'de hem pH 10'da modifiye olmuş proteinlerle gerçekleştirilen glikasyon reaksiyonlarında, modifiye olmamış örneklere kıyasla YÇE ile muamele edilmiş modifiye proteinlerde oluşan furozin miktarının anlamlı düzeyde azaldığı söylenebilir (p<0,05). YÇE ile proteinlerin modifikasyonunun, ısıl işlem uygulanan gıdalarda erken glikasyon ürünlerinin oluşumunu sınırlama açısından potansiyele sahip olduğu görülmüştür.

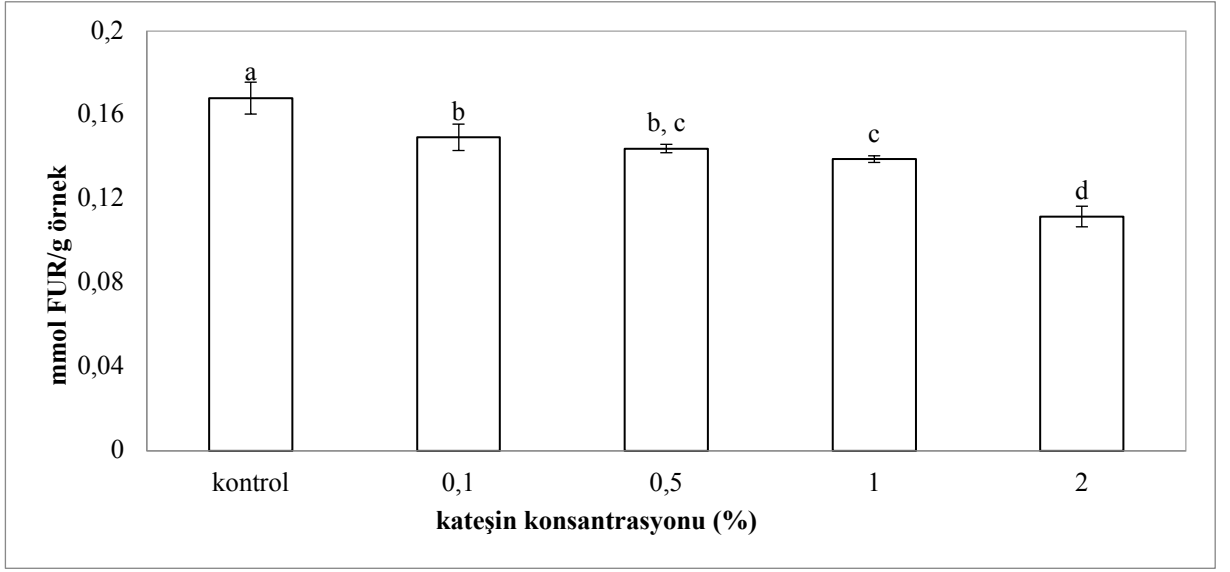
Fenolik bileşiklerin anti-glikasyon etkilerini gösteren çeşitli çalışmalar vardır [121, 126, 182-184]. Bu etki çoğunlukla fenollerin karbonil yakalama aktivitelerine atfedilmiştir [121, 126]. Fenollerin oto-oksidasyonu, protein molekülünün amin kalıntıları ile daha fazla reaksiyon ile kinon oluşumuna ve dolayısıyla daha az glikasyona açık hale gelmesine yol açar. Bir çalışmada, yüksek epikateşin konsantrasyonunun, Maillard reaksiyonu sırasında glukoz ile lizinin ısıtılması sırasında gerçekleşen ara radikallerin oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir [183]. Epikateşin kinon formlarının Maillard reaksiyonu sırasında lizin ile reaksiyona girdiği açıklanmıştır. Başka bir çalışmada ise glisin ve okside olmuş kateşin reaksiyonunun glisinin atılması yoluyla gıdalardaki Maillard reaksiyonuna müdahale ettiği ve çeşitli Maillard reaksiyonu ürünlerinin oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir [182]. Fenolik bileşiklerin bu reaksiyonu, alkali koşullarda ve oksitleyici ortamda elverişlidir. Yapılan bir çalışmada, fenolik bileşiklerin ilgili kinonlara kolayca oksitlenebileceği, uygun pH koşullarında fenolik bileşiklerin lizozime kovalent eklenmesi ile modifiye edildiği gösterilmiştir [185]. Oksitlenmiş fenolik bileşik formu, reaktif protein kalıntıları ile reaksiyona girerek furozin oluşumunda azalmaya neden olabilir. Yapılan başka çalışmalarda sadece erken glikasyon ürünlerinin değil aynı zamanda ileri glikasyon ürünlerinin inhibe edilebileceği de gözlenmiştir. Proteinlerle fenollerin pH 12'de 60°C'de 1 veya 16 saat boyunca muamele edildiği benzer bir model sistem hazırlanmıştır. Soya izoflavon bakımından



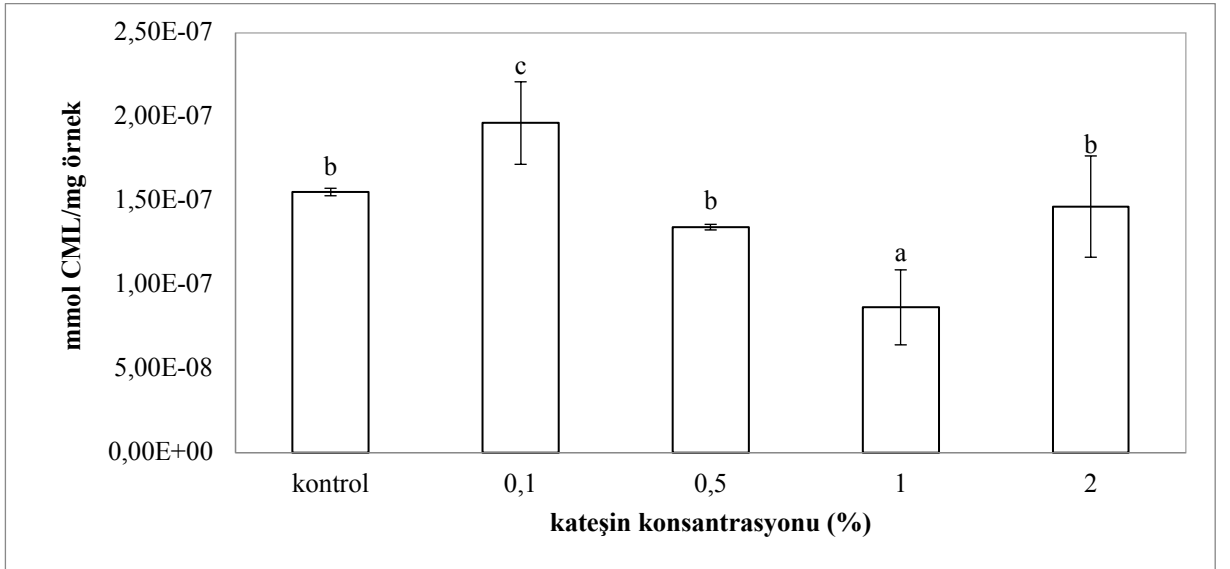
zengin ekstrakt kullanılarak yapılan çalışmada erken Maillard reaksiyon ürünlerinin oluşumunu ve ayrıca reaksiyonun ileri aşamaya gitmesini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [137]. Erken Maillard reaksiyon ürünlerinin oluşumunun izoflavonların aktif glikasyon bölgesine konjugasyonu ile inhibe edilebileceği, AGE oluşumunun dikarbonil ara maddelerinin ve oksijen radikal türlerinin yakalanmasıyla modüle edilebileceği öne sürülmüştür [137]. Bir çalışmada, izomerleştirilmiş ve oksitlenmiş klorojenik asit formlarının, fizyolojik koşullara benzer şartlar altında sığır serum albümin (BSA) proteinine bağlanabileceğini ve bu bağlamanın BSA'nın antioksidan kapasitesinde artışa ve AGE'lerin oluşumunu inhibe edebileceğini bildirmişlerdir [186].

Bu tez kapsamında yapılan modifikasyon sonucunda proteinlerde furozin ile beraber ileri glikasyon ürün belirteci olan CML'de analiz edilmiştir. KN, OVA ve GLU için hazırlanan model sistemlerin ısıtılması sonucunda, YÇE ile muamele edilen modifiye proteinlerde YÇE olmadan muamele edilen kontrol örneklerine kıyasla ölçülen CML miktarlarında artış gözlemlenmiştir. Şekil 3.6, Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de de görüldüğü gibi bu model sistemlerde, CML oluşumunun furozin ile karşılaştırıldığında, çok düşük miktarlarda olduğu gözlenmiştir. Gerçekleştirilen istatistiksel analizler, YÇE ile modifiye edilmiş proteinler ve kontrol proteinlerle hazırlanan model sistemlerde oluşan CML miktarları arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir ( $p>0,05$ ).

Modifikasyon sonrasında CML oluşumunda beklenen azalmanın olmaması, oluşan fruktozillizinin fenol varlığında CML'e oksidasyonunun tetiklenebileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle YÇE'nin CML oluşumu üzerine olası pro-oksidan davranışının izlenmesi de amaçlanmıştır. Bunun için kateşin ve OVA'dan oluşan model sistemler hazırlanmıştır. %0,1 ile 2 arasında değişen konsantrasyonlarda kateşin, OVA ve 20  $\mu\text{mol glukoz.mL}^{-1}$  ile hazırlanan model sistemler 100°C 'de 15 dakika boyunca ısıtılmıştır. Isıtma sonrasında furozin ve CML analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.9'da farklı kateşin konsantrasyonlarında ısıtılan OVA-glukoz model sistemlerinde oluşan furozin ve CML miktarlarındaki değişim verilmiştir. Şekil 3.9 (a)'da, kateşin konsantrasyonundaki artış ile furozin oluşumunda azalma olduğu görülmektedir. Şekil 3.9 (b)'de ise CML oluşumu ile kateşin konsantrasyonu arasında bir ilişki olmadığı görülmektedir.



(a)



(b)

**Şekil 3.9** Farklı kateşin konsantrasyonları eklenerek 100°C 'de 15 dakika boyunca ısıtılan ovalbuminin FUR (a) ve CML (b) miktarlarındaki değişim (sonuçlar ortalama n=10 ±standart sapma olarak verilmektedir)

CML gelişmiş bir glikasyon son ürünüdür ve daha önce açıklandığı gibi iki yoldan oluşabilir. Erken glikasyon ürünü N-ε-fruktozillizin, CML oluşturmak için oksidasyona gidebilir veya ara glukoz (glikoksal) ürünleri doğrudan lizine bağlanarak CML oluşturabilir. Bu model sistemlerde oluşan CML miktarları dikkate alındığında, deney koşullarımızda baskın CML oluşum yolunun, YÇE'da yer alan kateşinlerin oksidasyon reaksiyonlarını önleyerek glioksalın lizine doğrudan bağlanması üzerinden değil, furozinin oksidasyonu yoluyla olduğu düşünülmektedir. Ancak kateşin-OVA glukoz ile

hazırlanan model sistemlerde gerçekleşen protein-fenol kompleksi oluşumunun, CML oluşumu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ).

Fenolik bileşiklerin glikasyon üzerindeki etkileri hakkında çelişkili sonuçlar vardır; bazı araştırmacılar fenolik bileşiklerin glikasyonu arttığını bildirmişlerdir. Bir araştırmada, fenolik bileşiklerin varlığında ve yokluğunda CML seviyesi ölçülmüştür ve sonuç olarak birçok bileşik CML oluşumunu önemli ölçüde inhibe ederken, epikateşin, gallik asit gibi bileşiklerin CML oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir. Epikateşinin glikasyonu hem inhibe edebileceği hem de arttırabileceği belirtilirken, aynı karakteristik yapıya, yani bir kateşol grubuna sahip olan bileşiklerin arttırıcı etki yarattığı bildirilmiştir [187]. Benzer bir çalışmada, fenolik bileşiklerin içerdiği kateşol grubunun, kateşol yapısının oto-oksidasyonu sırasında hidrojen peroksit ürettiği, daha sonra hidrojen peroksinin hidroksil radikallerini üretebileceği ve son olarak hidroksi radikallerinin ve Amadori ürünlerinin reaksiyonları ile CML üretilebileceği açıklanmıştır [188]. Her ne kadar epikateşin, gallik asit ve 4-metilkateşol arttırıcı etkilerini yüksek konsantrasyonda (1 mM) gösterse de, bu bileşiklerin 0.01 mM konsantrasyonunun CML oluşumunu engellediği belirtilmiştir [188]. Bu durum, kateşol gruplarının CML oluşumu üzerindeki etkilerinin konsantrasyonlarına bağlı olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, düşük konsantrasyonlarda kateşol bileşikleri, yüksek antioksidatif aktiviteleri nedeniyle CML oluşumunu engellemelerine rağmen, yüksek konsantrasyonlarda kateşol bileşikleri, hidrojen peroksit üreterek CML oluşumunu arttırmıştır. Bu çalışmada, kateşol bileşiklerinin aşırı miktarda bulunmasının CML oluşumunu arttırabileceği ve bunun in vivo olarak da olumsuz etkileri indükleyebileceği ifade edilmiştir [188]. Başka bir çalışmada, kateşinler gibi fenolik bileşiklerin, otoksidasyon sırasında kinon veren kateşinlerin hidrojen peroksit ürettiği gösterilmiş ve kateşinlerin CML oluşumu üzerindeki arttırıcı etkilerinin hidrojen peroksit üretilmesiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir [189].

Yapılan analizler sonucu oluşan CML miktarlarının ppb seviyelerinde olduğu görülmektedir. Çalışmamızda ölçülen limit of quantitation (LoQ) değeri 5 ppb olarak bulunmuştur. LoQ değeri analitin sadece güvenilir bir şekilde tespit edilemediği aynı zamanda önyargı ve tutarsızlık için tanımlanmış bazı hedeflerin karşılandığı en düşük konsantrasyondur [190]. Çalışmamızda örneklerde oluşan CML miktarlarının LoQ değerlerine yakın olduğu görülmektedir. Bu nedenle bu seviyelerde belirsizliğin yüksek

olması, CML oluşumunu etkileyen parametrelerin etki seviyesini izlemeyi zorlaştırmaktadır. Bu raporlar ve çalışmamız, kateşol kalıntıları içeren doğal bileşiklerin CML oluşumunu arttırabileceğini ve antioksidanların olumsuz yönlerini önlemek için fenolik bileşik takviyesinin dikkatle uygulanması gerektiğini göstermektedir.

### **3.2. Yeşil Çay Ekstraktı ile Modifikasyonun Protein Bazlı Gıda Örnekleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi**

Tez kapsamında yapılan işlemler sonucunda elde edilen modifiye proteinin, antioksidan kapasitesi arttırılmış ve glikasyon potansiyeli sınırlandırılmış olup, fonksiyonel bir ingrediyan olarak kullanım potansiyeli olduğu görülmektedir.

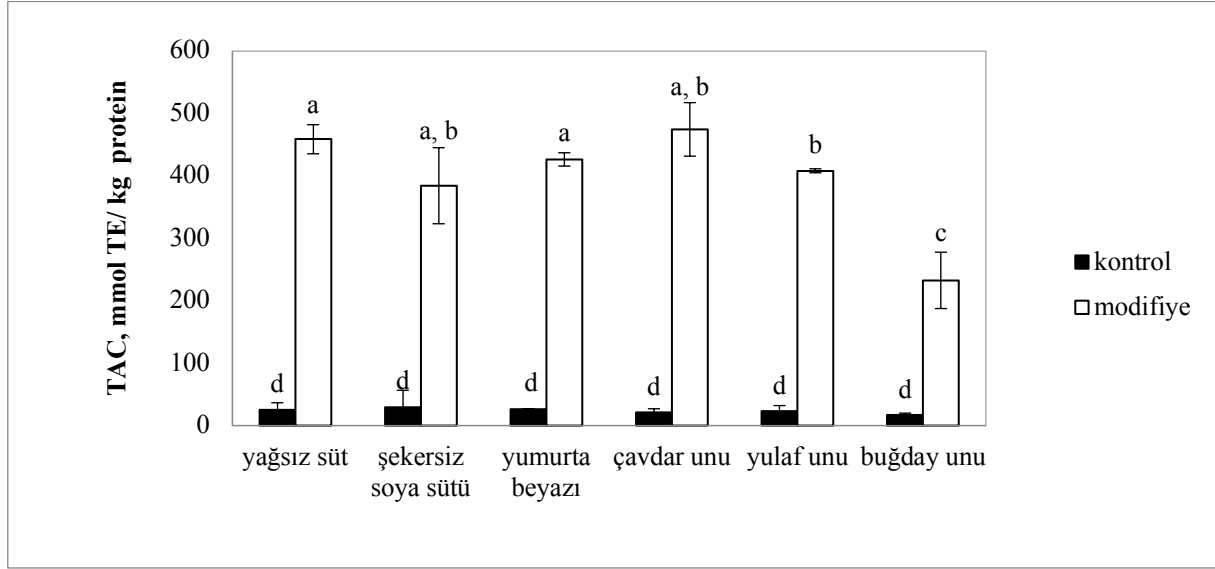
Değişen beslenme biçimi ve taleplerin değişmesi, vegan gıdalara yönelimi arttırmış ve hayvansal protein yerine bitkisel proteinlerin kullanım potansiyelini arttırmıştır. Bitki bazlı proteinlerin gıda formüllerinde kullanılması, daha fazla sürdürülebilirlik ve düşük üretim maliyetleri nedeniyle ilgi çekmektedir [191]. Bitki bazlı protein içeren gıdaların lizin içerikleri hayvan bazlı protein içeren gıdalara kıyasla daha düşük olsa da [191] hayvansal gıdadan uzaklaşma bu gıdalara olan talebi arttırmaktadır. Örneğin soya proteinlerinin lizin içeriğinin buğday gluteni gibi tahıl proteinlerinin içeriği ile kazein gibi hayvansal proteinlerin içeriği arasında olduğu gösterilmiştir [192]. Bu durum bitkisel bazlı proteinlerin de hayvansal bazlı proteinler kadar kullanım alanını arttırmaktadır.

Bunların yanında, YÇE ile zenginleştirilmiş ürünlerin hazırlanması, fenolik bileşik tüketimini arttırmak, antioksidan alımını iyileştirmek için önemli bir seçenek olabilir. Bu yüzden tez kapsamında, gıda sektöründe geniş kullanım alanı olan ve yüksek besin değerine sahip süt ve yumurta ile beraber soya sütü, buğday, çavdar ve yulaf unu örneklerinin modifiye edilmesine karar verilmiştir. Bu örnekler belirlenen optimum koşullar altında pH 10'da 50°C'de 120 dakika boyunca YÇE ile muamele edilmiştir.

#### **3.2.1. Modifikasyonun Protein Bazlı Gıda Örneklerinde Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi**

Modifiye edilmiş protein bazlı gıda örneklerinde TAK ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, modifiye edilmiş protein bazlı gıda örneklerinin TAK değerlerinin kontrol örneklerine göre anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermiştir ( $p < 0,05$ ). Antioksidan kapasitelerinde kontrole göre yağsız sütte 18 kat, şekerli soya sütünde 13 kat, yumurta

beyazında 16 kat, çavdar ununda 23 kat, yulaf ununda 18 kat ve buğday ununda 14 katlık bir antioksidan kapasite artışı görülmüştür (Şekil 3.10).



**Şekil 3.10** Protein bazlı gıda örneklerinin pH 10'da 50 °C'de 120 dakika boyunca YÇE ile muamele edilmesi sonucunda TAK değerleri

Bazı çalışmalarda yeşil çay fenolik bileşikleri ile zenginleştirilmiş çeşitli protein bazlı gıdaların antioksidan kapasiteleri ölçülmüş ve duyuşal açıdan değerlendirilmiştir. Tam buğday unu ile yapılan tava ekmeğine yeşil çay tozu (YÇT) ilavesinin, hamur ve ekmek kalitesi ve antioksidan aktivite üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, farklı konsantrasyonlar denenmiştir. 1,00 g YÇT/100 g un ilavesinin tava ekmeği üzerinde anlamlı bir antioksidan kapasite artışına neden olduğu ve oda sıcaklığında 8 günlük depolama sırasında peroksit birikimi oranında önemli derecede azaltıcı etki gösterdiği görülmüştür. Bununla birlikte 3,00 g YÇT/100 g un ve daha yüksek seviyelerde YÇT ilavesinin ekmek kalitesi, hacim ve dokusunun YÇT'dan olumsuz etkilenmiş ve 2,00 g YÇT/100 g un seviyesinin üzerindeki ilavelerde ekmeğin antioksidan kapasitesinde anlamlı bir fark görülmediği ifade edilmiştir [193].

Çavdar ekmeğinin YÇE ile zenginleştirilerek antioksidan özellik ve duyuşal profilinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, 100 g çavdar unu başına %1,1 YÇE içeren çavdar ekmeğinin iyi bir kateşin kaynağı olduğu ve antioksidan özellik açısından iyi olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte çalışmada sadece en yüksek (%1,1) YÇE seviyesinde istenmeyen lezzet algılanmıştır. Duyusal özelliklerde meydana gelen değişiklikler

nedeniyle, avdar ekmeğine eklenen YE seviyesinin % 0,8 ile sınırlandırılması gerektiği ifade edilmiştir [194]. Süt rnleri ile gerçekleştirilen bir çalışmada, YE'nin süt ürünleri matrislerine eklenmesi, simüle edilmiş bir gastrointestinal ortamda fenolik bileşik stabilitesini ve antioksidan aktiviteyi arttıran protein-fenol kompleksi oluşumunu teşvik ettiği belirtilmiştir [195].

## 4. YORUM

Tez kapsamında, protein molekülünün primer yapısının fenolik bileşiklerle modifikasyonu aracılığıyla elde edilen modifiye proteinlerin antioksidan kapasiteleri ve glikasyon potansiyelleri değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen denemeler sonucunda proteinlerin başarılı bir şekilde modifiye edildiği çeşitli yollardan doğrulanmıştır. Sonuçlar, alkali koşullar altında oluşan yeşil çay fenollerinin kinon formlarının, proteinlerin yapısındaki serbest amino grupları ile reaksiyona girebileceğini göstermiştir. Protein yapısında yer alan reaktif grupların yüksek antioksidan özellikteki yeşil çay fenollerini tarafından bloke edilmesi, elde edilen modifiye proteinlerin antioksidan kapasitelerinin desteklenmesini, bunun yanı sıra Maillard reaksiyonu açısından daha az hedef haline gelmesini sağlamıştır. Diğer bir deyişle, protein-fenol interaksyonu proteinin glikasyonu ile oluşabilecek potansiyel olarak zararlı bileşiklerin oluşumunu azaltmada etkili olmuş ve insan sağlığı için yararlı olabilecek antioksidan yapıların oluşumunu teşvik etmiştir. Bu sebeplerden yeşil çay ile modifiye edilmiş proteinlerin fonksiyonel özellik kazandırılmış bir katkı maddesi olarak değerlendirilebilir olduğu söylenebilir.

Modifiye proteinler ile gerçekleştirilen model sistem sonuçlarına göre modifikasyon seviyesinde erken glikasyon ürünlerinde azalma gözlenirken ileri glikasyon ürünlerinde bir miktar artış görülmektedir. Bu durum, ileri glikasyon ürünlerinin oldukça düşük seviyelerde oluşması nedeniyle ölçümsel belirsizlikten kaynaklanabileceği gibi, aşırı fenol varlığında glikasyon reaksiyonunun ileri yönde ilerlediğinin de göstergesi olabilir. Farklı çalışmalarda da fenolik bileşiklerin glikasyonu inhibe etme üzerine etkileri ile ilgili çelişkili sonuçlar olduğu görülmektedir. Bu duruma fenolik bileşik konsantrasyonunun etkili olabileceği gibi oto-oksidasyon sırasında oluşabilecek çeşitli bileşiklerin de sebep olabileceği bildirilmiştir. Bu yüzden, oksitlenmiş fenolik bileşiklerin ve proteinin interaksyonu sırasında oluşan eklentilerin ve oluşan farklı maddelerin tanımlanması için daha fazla araştırma yapılmalıdır. Ayrıca tez sonuçları ve benzer çalışmalar, antioksidan özellikli bileşiklerin gıdalarda CML oluşumunu arttırabileceğini ve bu olumsuz etkiyi önlemek için gıdalardaki kullanım miktarlarına dikkatle karar verilmesi gerektiğini göstermektedir. Diğer taraftan lizinin esansiyel bir amino asit olması nedeniyle, proteinde modifiye edilmiş lizin kalıntılarının

biyoyararlanımı ile ilgili sağlık endişeleri olabilir. Bir taraftan Maillard reaksiyonu ile oluşabilecek toksik bileşiklerin inhibisyonu gerçekleşirken diğer taraftan lizin modifikasyonu daha düşük biyoyararlanıma sebep olabilir. Bu nedenle, bir başka önemli araştırma konusu olan lizin kalıntılarının oksitlenmiş fenolik bileşiklerle modifikasyonunun vücuttaki yararlanımı ile ilgili konuların aydınlatılmasına ihtiyaç vardır.

Bu tez kapsamında amaçlandığı gibi fonksiyonel modifiye proteinin elde edilmesi için bir alt yapı sağlanmıştır. Son zamanlarda takviye gıda tüketimi, zenginleştirilmiş fırıncılık ürünleri, sporcu beslenmesi, besinsel içeriği yüksek ve hızlı tüketim kolaylığı sunan atıştırmalık gıda talebinin artması ve yenabilir ambalaj üretimine olan ilginin artışı tez kapsamında elde edilen modifiye proteinler için geniş bir kullanım alanı yaratabilmektedir. Proteinlerin yeşil çay ile modifikasyonu, son yıllarda ortaya çıkan tüketici beslenme eğilimlerini karşılayabilecek yenilikçi çözümler ortaya koyabilir. Elde edilen modifiye proteinin gıda endüstrisi tarafından fonksiyonel ingrediyen olarak global düzeyde kullanım potansiyeli olabilir.

Son yıllarda ekmeğin içeriğlerinin zenginleştirilmesi ile fonksiyonel ürün tüketimi, birçok ülkede ekmeğin temel gıda maddesi olması sebebiyle sağlığı iyileştirmek, beslenme eksikliklerini önlemek ve vitamin, mineral gibi maddelerin diyetle alımını desteklemek için önemli bir araç olarak görülmektedir. Gluten modifikasyonu ile glikasyon potansiyeli azaltılmış ve antioksidan kapasitesi artırılmış modifiye gluten kullanımı, ekmeğ ve fırıncılık ürünlerini zenginleştirirken olası toksik bileşik oluşumunun önlenmesi sağlayabilir. Bunun yanında antioksidan kapasite açısından güçlendirilmiş gıda tüketimini de destekleyebilir. Ayrıca son zamanlarda protein içeriği artırılmış proteinli süt ve yoğurt gibi süt ürünleri tüketimine yönelim artmıştır. Bu tarz ürünlerle birlikte protein alımı artarken ürün üretimi sırasında uygulanan ısıl işlemler istenmeyen bileşik oluşumlarını teşvik edebilir. Yapılan bir çalışmada, çeşitli proteince zenginleştirilmiş UHT sütlerdeki Maillard reaksiyon ürünlerinin seviyeleri araştırılmış ve protein takviyesinin bir sonucu olarak bu ürünlerdeki Maillard reaksiyonu ürünlerinin UHT sütlere kıyasla daha yüksek bulunduğu tespit edilmiştir. [196] Tez kapsamında elde ettiğimiz glikasyon özellikleri sınırlandırılmış modifiye KN ilavesi, proteince zenginleştirilmiş süt ürünlerinde oluşan Maillard reaksiyonu ürünlerinin sınırlandırılmasını sağlayabilir. Modifiye KN ilavesi bu ürünlerde sadece glikasyon



potansiyelini sınırlandırmayacak, aynı zamanda gıda ile antioksidan alımını da destekleyecektir. Benzer şekilde atıştırmalık tüketime uygun protein barlar için modifiye protein kullanımı, yüksek antioksidan kapasitesi sayesinde pek çok açıdan sağlığa yararlı olduğu bilinen antioksidanların alımını da arttıracaktır.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Arcan, I. and A. Yemenicioğlu, Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food Chemistry*, 103 (2007) 2, 301-312.
- [2] Rohn, S., H.M. Rawel, and J. Kroll, Antioxidant Activity of Protein-Bound Quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004) 15, 4725-4729.
- [3] Arts, M.J.T.J., et al., Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food and Chemical Toxicology*, 39 (2001) 8, 787-791.
- [4] Pandey, K.B. and S.I. Rizvi, Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2 (2009) 5, 270-8.
- [5] Raj, D.S.C., et al., Advanced glycation end products: A nephrologist's perspective. *American Journal of Kidney Diseases*, 35 (2000) 3, 365-380.
- [6] Vitek, M.P., et al., Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (1994) 11, 4766.
- [7] Damodaran, S., K.L. Parkin, and O.R. Fennema, *Fennema's Food Chemistry*, Fourth Edition. Taylor & Francis, 2007.464
- [8] velisek, J., *Amino Acids, Peptides and Proteins in The Chemistry of Food*, J. velisek, Editor. John Wiley & Sons, Ltd. UK. 4-86, 2014.
- [9] Kinsella, J.E. and N. Melachouris, Functional properties of proteins in foods: A survey. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7 (1976) 3, 219-280.
- [10] Weder, J.K.P. and H.D. Belitz, PROTEIN | Functional Properties, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, B. Caballero, Editor. Academic Press Oxford. 4835-4841, 2003.
- [11] Elias, R.J., S.S. Kellerby, and E.A. Decker, Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 48 (2008) 5, 430-41.
- [12] Maillard, L.C., Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way. *Compte-Rendu de l'Academie des Science*, 154 (1912), 66-68.
- [13] Henle, T., Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. *Amino Acids*, 29 (2005) 4, 313-22.
- [14] Hodge, J.E., Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1 (1953) 15, 928-943.
- [15] Yaylayan, V.A., Classification of the Maillard reaction: A conceptual approach. *Trends in Food Science & Technology*, 8 (1997) 1, 13-18.
- [16] Thornalley, P.J., et al., Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *The Biochemical journal*, 375 (2003) Pt 3, 581-592.

- [17] Rahbar, S., O. Blumenfeld, and H.M. Ranney, Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 36 (1969) 5, 838-843.
- [18] Monnier, V. and A. Cerami, Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science*, 211 (1981) 4481, 491-493.
- [19] Henle, T., Maillard Reaction of Proteins and Advanced Glycation End Products (AGEs) in Food, in *Process-Induced Food Toxicants*, R.H. Stadler and D.R. Lineback, Editors. 215-242, 2008.
- [20] Poulsen, M.W., et al., Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food Chem Toxicol*, 60 (2013), 10-37.
- [21] Zeng, J. and M.J. Davies, Evidence for the Formation of Adducts and S-(Carboxymethyl)cysteine on Reaction of  $\alpha$ -Dicarbonyl Compounds with Thiol Groups on Amino Acids, Peptides, and Proteins. *Chemical Research in Toxicology*, 18 (2005) 8, 1232-1241.
- [22] He, J., et al., Simultaneous determination of N  $\epsilon$ -(carboxymethyl) lysine and N  $\epsilon$ -(carboxyethyl) lysine in cereal foods by LC-MS/MS. *European Food Research and Technology*, 238 (2014).
- [23] van Boekel, M.A.J.S., Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review. *Food / Nahrung*, 45 (2001) 3, 150-159.
- [24] Oliver, C.M., Insight into the glycation of milk proteins: an ESI- and MALDI-MS perspective (review). *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51 (2011) 5, 410-31.
- [25] Labuza, T. and W. Baisier, The Kinetics of Nonenzymatic Browning. *Physical Chemistry of Foods*, ed. H. Schwartzberg and R. Hartel. New York M. Dekker, 1992.327
- [26] Huang, X., et al., Increase of ovalbumin glycation by the maillard reaction after disruption of the disulfide bridge evaluated by liquid chromatography and high resolution mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 61 (2013) 9, 2253-62.
- [27] Walton, D.J. and B.H. Shilton, Site specificity of protein glycation. *Amino Acids*, 1 (1991) 2, 199-203.
- [28] Brown, E., et al., Accessibility and mobility of lysine residues in beta-lactoglobulin. 5601-5610, 1988.
- [29] Thomsen, M.K., et al., Effect of water activity, temperature and pH on solid state lactosylation of  $\beta$ -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 23 (2012) 1, 1-8.
- [30] Broersen, K., et al., Glycoforms of beta-lactoglobulin with improved thermostability and preserved structural packing. *Biotechnol Bioeng*, 86 (2004) 1, 78-87.
- [31] Yeboah, F.K., et al., Monitoring Glycation of Lysozyme by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2000) 7, 2766-2774.
- [32] Erbersdobler, H.F. and V. Somoza, Forty years of furosine - forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Mol Nutr Food Res*, 51 (2007) 4, 423-30.

- [33] Mehta, B.M. and H.C. Deeth, Blocked Lysine in Dairy Products: Formation, Occurrence, Analysis, and Nutritional Implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15 (2016) 1, 206-218.
- [34] Elliott, A.J., et al., Heat-induced and other chemical changes in commercial UHT milks. *J Dairy Res*, 72 (2005) 4, 442-6.
- [35] Erbersdobler, H.F., et al., Determination of furosine in heated milk as a measure of heat intensity during processing. *Journal of Dairy Research*, 54 (1987) 1, 147-151.
- [36] Rufián-Henares, J.A., et al., Assessing nutritional quality of milk-based sport supplements as determined by furosine. *Food chemistry*, 2007 v.101 no.2 (2007) no. 2, pp. 573-578.
- [37] Delgado-Andrade, C., J. Rufián Henares, and F. Morales, Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals. *Food Chemistry*, 100 (2005), 725-731.
- [38] del Castillo, M.D., N. Corzo, and A. Olano, Early Stages of Maillard Reaction in Dehydrated Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1999) 10, 4388-4390.
- [39] Sanz, M.L., et al., 2-Furoylmethyl Amino Acids and Hydroxymethylfurfural As Indicators of Honey Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 15, 4278-4283.
- [40] Wolff, S.P. and R.T. Dean, Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *The Biochemical journal*, 245 (1987) 1, 243-250.
- [41] Glomb, M. and V. Monnier, Mechanism of Protein Modification by Glyoxal and Glycolaldehyde, Reactive Intermediates of the Maillard Reaction. *Journal of Biological Chemistry* 270 (1995), 10017-10026.
- [42] Ahmed, M., S. Thorpe, and J. Baynes, Identification of W-Carboxymethyllysine as a Degradation Product of Fructoselysine in Glycated Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 261 (1986), 4889-4894.
- [43] Ahmed, N., et al., Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia*, 48 (2005) 8, 1590-603.
- [44] Münch, G., et al., Alzheimer's disease – synergistic effects of glucose deficit, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *Journal of Neural Transmission*, 105 (1998) 4, 439-461.
- [45] Baynes, J.W., The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Experimental Gerontology*, 36 (2001) 9, 1527-1537.
- [46] Šebeková, K. and V. Somoza, Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects – PRO. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51 (2007) 9, 1079-1084.
- [47] Wang, Z., et al., Advanced glycation end-product Nepsilon-carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes. *Atherosclerosis*, 221 (2012) 2, 387-96.

- [48] Sakata, N., et al., Increased advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis*, 142 (1999) 1, 67-77.
- [49] Li, J., et al., Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: mechanisms and perspective. *J Neurol Sci*, 317 (2012) 1-2, 1-5.
- [50] Velisek, J., Saccharides, in *The Chemistry of Food*, J. velisek, Editor. John Wiley & Sons, Ltd. UK. 198-334, 2014.
- [51] Roncero-Ramos, I., et al., An advanced glycation end product (AGE)-rich diet promotes Nepsilon-carboxymethyl-lysine accumulation in the cardiac tissue and tendons of rats. *J Agric Food Chem*, 62 (2014) 25, 6001-6.
- [52] Nagy, K., et al., Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence. *Food chemistry*, 132 (2012) 3, 1333-1339.
- [53] Kroll, J., et al., Reactions of Plant Phenolics with Food Proteins and Enzymes under Special Consideration of Covalent Bonds. *Food Science and Technology Research*, 9 (2003) 3, 205-218.
- [54] Jervis, L. and W.S. Pierpoint, Purification technologies for plant proteins. *Journal of Biotechnology*, 11 (1989) 2, 161-198.
- [55] Rohn, S., H.M. Rawel, and J. Kroll, Inhibitory Effects of Plant Phenols on the Activity of Selected Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 12, 3566-3571.
- [56] Beart, J.E., T.H. Lilley, and E. Haslam, Polyphenol interactions. Part 2. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid-catalysed decomposition; observations on some polymeric proanthocyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (1985) 9, 1439-1443.
- [57] Hurrell, R.F., P.A. Finot, and J.L. Cuq, Protein-polyphenol reactions. 1. Nutritional and metabolic consequences of the reaction between oxidized caffeic acid and the lysine residues of casein. *Br J Nutr*, 47 (1982) 2, 191-211.
- [58] Hasni, I., et al., Interaction of milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 126 (2011) 2, 630-639.
- [59] Le Bourvellec, C. and C.M. Renard, Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 52 (2012) 3, 213-48.
- [60] Parada, J. and J.M. Aguilera, Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J Food Sci*, 72 (2007) 2, R21-32.
- [61] Bravo, L., Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56 (1998) 11, 317-333.
- [62] Crozier, A., I.B. Jaganath, and M.N. Clifford, Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*, 26 (2009) 8, 1001-43.
- [63] Maeta, K., et al., Green tea polyphenols function as prooxidants to activate oxidative-stress-responsive transcription factors in yeasts. *Appl Environ Microbiol*, 73 (2007) 2, 572-80.
- [64] Lorenzo, J.M. and P.E.S. Munekata, Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6 (2016) 8, 709-719.

- [65] Reygaert, W.C., Green Tea Catechins: Their Use in Treating and Preventing Infectious Diseases. *Biomed Res Int*, 2018 **(2018)**, 9105261.
- [66] Wang, R. and W. Zhou, Stability of Tea Catechins in the Breadmaking Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 **(2004)** 26, 8224-8229.
- [67] Scalbert, A., et al., Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 45 **(2005)** 4, 287-306.
- [68] Hollman, P.C., et al., The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr*, 141 **(2011)** 5, 989S-1009S.
- [69] Bellion, P., et al., Polyphenolic Apple Extracts: Effects of Raw Material and Production Method on Antioxidant Effectiveness and Reduction of DNA Damage in Caco-2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 **(2010)** 11, 6636-6642.
- [70] Higdon, J.V. and B. Frei, Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43 **(2003)** 1, 89-143.
- [71] Yang, C.S., et al., Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr*, 21 **(2001)**, 381-406.
- [72] Nijveldt, R., et al., Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAMFlavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74: 418-425. *The American journal of clinical nutrition*, 74 **(2001)**, 418-25.
- [73] Adlercreutz, H. and W. Mazur, Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med*, 29 **(1997)** 2, 95-120.
- [74] Arts, I.C. and P.C. Hollman, Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*, 81 **(2005)** 1 Suppl, 317s-325s.
- [75] Balasundram, N., K. Sundram, and S. Samman, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99 **(2006)** 1, 191-203.
- [76] Namal Senanayake, S.P.J., Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review. *Journal of Functional Foods*, 5 **(2013)** 4, 1529-1541.
- [77] Jaziri, I., et al., Effect of green and black teas (*Camellia sinensis* L.) on the characteristic microflora of yogurt during fermentation and refrigerated storage. *Food Chemistry*, 112 **(2009)** 3, 614-620.
- [78] Xu, Y., et al., Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res*, 52 **(1992)** 14, 3875-9.
- [79] Frei, B. and J.V. Higdon, Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies. *The Journal of Nutrition*, 133 **(2003)** 10, 3275S-3284S.
- [80] Lambert, J.D., et al., Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr*, 81 **(2005)** 1 Suppl, 284s-291s.

- [81] Wilson, T., et al., Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sciences*, 59 (1996) 1, PL15-PL21.
- [82] Jones, E. and R.E. Hughes, Quercetin, flavonoids and the life-span of mice. *Experimental Gerontology*, 17 (1982) 3, 213-217.
- [83] Cao, G., E. Sofic, and R.L. Prior, Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22 (1997) 5, 749-760.
- [84] Hu, M., D.J. McClements, and E.A. Decker, Antioxidant Activity of a Proanthocyanidin-Rich Extract from Grape Seed in Whey Protein Isolate Stabilized Algae Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004) 16, 5272-5276.
- [85] Lambert, J.D. and R.J. Elias, The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys*, 501 (2010) 1, 65-72.
- [86] Galati, G., et al., Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic Biol Med*, 40 (2006) 4, 570-80.
- [87] Hagerman, A.E., Tannin—Protein Interactions In “Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health. I-Analysis, Occurrence and Chemistry.”, in *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I*, P. Ho, C.Y. Lee, and M.T. Huang, Editors. American Chemical Society. 236-247, 1992.
- [88] Bianco, A., et al., Biomimetic Supramolecular Biophenol–Carbohydrate and Biophenol–Protein Models by NMR Experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (1997) 11, 4281-4285.
- [89] Hurrell, R.F. and P.-A. Finot, Nutritional Consequences of the Reactions Between Proteins and Oxidized Polyphenolic Acids, in *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety*, M. Friedman, Editor. Springer US Boston, MA. 423-435, 1984.
- [90] Kalyanaraman, B., C.C. Felix, and R.C. Sealy, Semiquinone anion radicals of catechol(amine)s, catechol estrogens, and their metal ion complexes. *Environmental health perspectives*, 64 (1985), 185-198.
- [91] Kalyanaraman, B., P.I. Premovic, and R.C. Sealy, Semiquinone Anion Radicals from Addition of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Quinones Derived from Oxidation of Catechols and Catecholamines. *J Biol Chem*, 23 (1987), 11080-11087.
- [92] Nicolas, J.J., et al., Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34 (1994) 2, 109-157.
- [93] Pierpoint, W.S., o-Quinones formed in plant extracts. Their reaction with bovine serum albumin. *The Biochemical journal*, 112 (1969) 5, 619-629.
- [94] Pierpoint, W.S., o-Quinones formed in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides. *The Biochemical journal*, 112 (1969) 5, 609-616.
- [95] Machholz, R. and H.J. Lewerenz, *Lebensmitteltoxikologie*. Spring-Verlag, (1989), 226-231.

- [96] Matheis, G. and J.R. Whitaker, MODIFICATION OF PROTEINS BY POLYPHENOL OXIDASE AND PEROXIDASE AND THEIR PRODUCTS. *Journal of Food Biochemistry*, 8 (1984) 3, 137-162.
- [97] Matheis, G. and J.R. Whitaker, Peroxidase-catalyzed cross linking of proteins. *Journal of Protein Chemistry*, 3 (1984) 1, 35-48.
- [98] Cilliers, J.J.L. and V.L. Singleton, Characterization of the products of nonenzymic autoxidative phenolic reactions in a caffeic acid model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (1991) 7, 1298-1303.
- [99] Peter, M.G., Chemical Modifications of Biopolymers by Quinones and Quinone Methides. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 28 (1989) 5, 555-570.
- [100] Yabuta, G., et al., Structure of green pigment formed by the reaction of caffeic acid esters (or chlorogenic acid) with a primary amino compound. *Biosci Biotechnol Biochem*, 65 (2001) 10, 2121-30.
- [101] Namiki, M., et al., Development of free radical products during the greening reaction of caffeic acid esters (or chlorogenic acid) and a primary amino compound. *Biosci Biotechnol Biochem*, 65 (2001) 10, 2131-6.
- [102] Schilling, S., et al., Characterization of covalent addition products of chlorogenic acid quinone with amino acid derivatives in model systems and apple juice by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 22 (2008) 4, 441-8.
- [103] Damodaran, S., O.R. Fennema, and K.L. Parkin, *Food Chemistry*. CRC Press, 2008.252
- [104] Czubinski, J. and K. Dwiecki, A review of methods used for investigation of protein-phenolic compound interactions. *International Journal of Food Science & Technology*, 52 (2017) 3, 573-585.
- [105] Ozdal, T., E. Capanoglu, and F. Altay, A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51 (2013) 2, 954-970.
- [106] Friedman, M. and H.S. Jürgens, Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2000) 6, 2101-2110.
- [107] Tungjai, M., et al., Spectrophotometric Characterization of Behavior and the Predominant Species of Flavonoids in Physiological Buffer: Determination of Solubility, Lipophilicity and Anticancer Efficacy. *The Open Drug Delivery Journal*, 2 (2008), 10-19.
- [108] Stojadinovic, M., et al., Binding affinity between dietary polyphenols and beta-lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed. *Food Chem*, 136 (2013) 3-4, 1263-71.
- [109] Prigent, S.V.E., et al., Effects of Non-covalent Interactions with 5-O-Caffeoylquinic Acid (Chlorogenic Acid) on the Heat Denaturation and Solubility of Globular Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 17, 5088-5095.



- [110] Dubeau, S. and G. Samson, Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas. *Food Chemistry*, 122 (2010), 539-545.
- [111] Xiao, J., et al., Interaction of dietary polyphenols with bovine milk proteins: molecular structure-affinity relationship and influencing bioactivity aspects. *Mol Nutr Food Res*, 55 (2011) 11, 1637-45.
- [112] Tomas-Barberan, F.A. and C. Andres-Lacueva, Polyphenols and health: current state and progress. *J Agric Food Chem*, 60 (2012) 36, 8773-5.
- [113] Jakobek, L., Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem*, 175 (2015), 556-67.
- [114] Rohn, S., et al., Reactions with phenolic substances can induce changes in some physico-chemical properties and activities of bromelain – the consequences for supplementary food products. *International Journal of Food Science & Technology*, 40 (2005) 7, 771-782.
- [115] O'Connell, J.E. and P.F. Fox, Proposed mechanism for the effect of polyphenols on the heat stability of milk. *International Dairy Journal*, 9 (1999) 8, 523-536.
- [116] Rawel, H.M., et al., Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30 (2002) 3, 137-150.
- [117] Bonoli-Carbognin, M., et al., Bovine serum albumin produces a synergistic increase in the antioxidant activity of virgin olive oil phenolic compounds in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem*, 56 (2008) 16, 7076-81.
- [118] Almajano, M.P., M.E. Delgado, and M.H. Gordon, Albumin causes a synergistic increase in the antioxidant activity of green tea catechins in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 102 (2007) 4, 1375-1382.
- [119] Jongberg, S., et al., 4-methylcatechol inhibits protein oxidation in meat but not disulfide formation. *J Agric Food Chem*, 59 (2011) 18, 10329-35.
- [120] Delgado-Andrade, C., Carboxymethyl-lysine: thirty years of investigation in the field of AGE formation. *Food Funct*, 7 (2016) 1, 46-57.
- [121] Totlani, V.M. and D.G. Peterson, Influence of Epicatechin Reactions on the Mechanisms of Maillard Product Formation in Low Moisture Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 2, 414-420.
- [122] Noda, Y. and D.G. Peterson, Structure–Reactivity Relationships of Flavan-3-ols on Product Generation in Aqueous Glucose/Glycine Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 9, 3686-3691.
- [123] Totlani, V.M. and D.G. Peterson, Reactivity of Epicatechin in Aqueous Glycine and Glucose Maillard Reaction Models: Quenching of C2, C3, and C4 Sugar Fragments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 10, 4130-4135.
- [124] Bin, Q., D.G. Peterson, and R.J. Elias, Influence of phenolic compounds on the mechanisms of pyrazinium radical generation in the Maillard reaction. *J Agric Food Chem*, 60 (2012) 21, 5482-90.

- [125] Babu, P.V., K.E. Sabitha, and C.S. Shyamaladevi, Effect of green tea extract on advanced glycation and cross-linking of tail tendon collagen in streptozotocin induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*, 46 (2008) 1, 280-5.
- [126] Sang, S., et al., Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin-3-Gallate: A New Trapping Agent of Reactive Dicarbonyl Species. *Chemical Research in Toxicology*, 20 (2007) 12, 1862-1870.
- [127] Wu, C.H., et al., Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. *Food Funct*, 2 (2011) 5, 224-34.
- [128] Reddy, V.P. and A. Beyaz, Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discov Today*, 11 (2006) 13-14, 646-54.
- [129] Peng, X., et al., Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. *Food Funct*, 2 (2011) 6, 289-301.
- [130] Harris, C.S., et al., Investigating wild berries as a dietary approach to reducing the formation of advanced glycation endproducts: chemical correlates of in vitro antiglycation activity. *Plant Foods Hum Nutr*, 69 (2014) 1, 71-7.
- [131] Zhang, X., et al., Treatment of proteins with dietary polyphenols lowers the formation of AGEs and AGE-induced toxicity. *Food Funct*, 5 (2014) 10, 2656-61.
- [132] Zhang, X., F. Chen, and M. Wang, Antioxidant and antiglycation activity of selected dietary polyphenols in a cookie model. *J Agric Food Chem*, 62 (2014) 7, 1643-8.
- [133] Kong, Y., et al., Glycation of beta-lactoglobulin and antiglycation by genistein in different reactive carbonyl model systems. *Food Chem*, 183 (2015), 36-42.
- [134] Silvan, J.M., et al., Control of the Maillard reaction by ferulic acid. *Food Chem*, 128 (2011) 1, 208-13.
- [135] Wang, J., et al., Protein glycation inhibitory activity of wheat bran feruloyl oligosaccharides. *Food Chemistry*, 112 (2009) 2, 350-353.
- [136] Srey, C., et al., Effect of inhibitor compounds on Nepsilon-(carboxymethyl)lysine (CML) and Nepsilon-(carboxyethyl)lysine (CEL) formation in model foods. *J Agric Food Chem*, 58 (2010) 22, 12036-41.
- [137] Silvan, J.M., et al., Glycation is regulated by isoflavones. *Food Funct*, 5 (2014) 9, 2036-42.
- [138] Wu, C.-H. and G.-C. Yen, Inhibitory Effect of Naturally Occurring Flavonoids on the Formation of Advanced Glycation Endproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 8, 3167-3173.
- [139] de Freitas, V. and N. Mateus, Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 2, 940-945.
- [140] Duarte, G.S. and A. Farah, Effect of simultaneous consumption of milk and coffee on chlorogenic acids' bioavailability in humans. *J Agric Food Chem*, 59 (2011) 14, 7925-31.

- [141] Arts, M.J.T.J., et al., Interactions between Flavonoids and Proteins: Effect on the Total Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 5, 1184-1187.
- [142] Luck, G., et al., Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, 37 (1994) 2, 357-371.
- [143] van der Burg-Koorevaar, M.C., S. Miret, and G.S. Duchateau, Effect of milk and brewing method on black tea catechin bioaccessibility. *J Agric Food Chem*, 59 (2011) 14, 7752-8.
- [144] Serafini, M., A. Ghiselli, and A. Ferro-Luzzi, In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur J Clin Nutr*, 50 (1996) 1, 28-32.
- [145] van het Hof, K.H., et al., Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. *Eur J Clin Nutr*, 52 (1998) 5, 356-9.
- [146] Hollman, P.C., et al., Addition of milk does not affect the absorption of flavonols from tea in man. *Free Radic Res*, 34 (2001) 3, 297-300.
- [147] Reddy, V.C., et al., Addition of milk does not alter the antioxidant activity of black tea. *Ann Nutr Metab*, 49 (2005) 3, 189-95.
- [148] Liang, Y. and Y. Xu, Effect of extraction temperature on cream and extractability of black tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *International Journal of Food Science & Technology*, 38 (2003) 1, 37-45.
- [149] Kroll, J., H.M. Rawel, and N. Seidelmann, Physicochemical Properties and Susceptibility to Proteolytic Digestion of Myoglobin-Phenol Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2000) 5, 1580-1587.
- [150] Celik, E.E., V. Gokmen, and V. Fogliano, Soluble antioxidant compounds regenerate the antioxidants bound to insoluble parts of foods. *J Agric Food Chem*, 61 (2013) 43, 10329-34.
- [151] Serpen, A., V. Gökmen, and V. Fogliano, Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science*, 90 (2012) 1, 60-65.
- [152] Re, R., et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (1999) 9, 1231-1237.
- [153] Dee, K.C., D. Puleo, and R. Bizios, An Introduction To Tissue-Biomaterial Interactions. *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*, by Kay C. Dee, David A. Puleo, Rena Bizios, pp. 248. ISBN 0-471-25394-4. Wiley-VCH, August 2002., 29 (2002).
- [154] Henle, T., H. Walter, and H. Klostermeyer, Evaluation of the extent of the early Maillard-reaction in milk products by direct measurement of the Amadori-product lactuloselysine. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 193 (1991) 2, 119-122.
- [155] Gökmen, V., A. Serpen, and F. Morales, Determination of Furosine in Thermally Processed Foods by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International*, 92 (2009), 1460-3.
- [156] Palermo, M., A. Fiore, and V. Fogliano, Okara promoted acrylamide and carboxymethyl-lysine formation in bakery products. *J Agric Food Chem*, 60 (2012) 40, 10141-6.

- [157] Woychik, J.H., J.A. Boundy, and R.J. Dimier, Amino acid composition of proteins in wheat gluten. *Agric. food Chem.*, 9 (1961), 307-309.
- [158] Belitz, H.D., W. Grosch, and P. Schieberle, *Food Chemistry*. 2009.197
- [159] Jindal, S. and A. Naeem, Consequential secondary structure alterations and aggregation during prolonged casein glycation. *Journal of Fluorescence*, 23 (2013) 3, 367-374.
- [160] Lechevalier, V., et al., Egg white drying: Influence of industrial processing steps on protein structure and functionalities. *Journal of Food Engineering*, 83 (2007) 3, 404-413.
- [161] Shewry, P.R., Improving the protein content and composition of cereal grain. *Journal of Cereal Science*, 46 (2007) 3, 239-250.
- [162] Žilić, S., et al., Effects of isolation, enzymatic hydrolysis, heating, hydration and Maillard reaction on the antioxidant capacity of cereal and legume proteins. *Food Research International*, 49 (2012) 1, 1-6.
- [163] Žilić, S., Wheat Gluten: Composition and Health Effects. 71-86, 2013.
- [164] Aytaç, E., G. Serdar, and M. Sökmen, Comparison of Some Extraction Methods for Isolation of Catechins and Caffeine from Turkish Green Tea. *International Journal of Secondary Metabolite*, 2 (2015), 16-25.
- [165] Tadesse, A., et al., Quantification of total polyphenols, catechin, caffeine, L-theanine, determination of antioxidant activity and effect on antileishmanial drugs of ethiopian tea leaves extracts. *Pharmacognosy Res*, 7 (2015) Suppl 1, S7-S14.
- [166] Feeney, R.E., R.B. Yamasaki, and K.F. Geoghegan, Chemical Modification of Proteins: An Overview, in *Modification of Proteins*. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. 3-55, 1982.
- [167] Doğan, E. and V. Gökmen, Mechanism of the interaction between insoluble wheat bran and polyphenols leading to increased antioxidant capacity. *Food Research International*, 69 (2015), 189-193.
- [168] Cömert, E.D., H.G. Akıllıoğlu, and V. Gökmen, Mitigation of ovalbumin glycation in vitro by its treatment with green tea polyphenols. *European Food Research and Technology*, 243 (2016) 1, 11-19.
- [169] Nimalaratne, C. and J. Wu, Hen Egg as an Antioxidant Food Commodity: A Review. *Nutrients*, 7 (2015) 10, 8274-93.
- [170] Li-Chan, E.C.Y. and H. Kim, Structure and Chemical Compositions of Eggs, in *Egg Bioscience and Biotechnology*, Y. Mine, Editor. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA. 1-95, 2008.
- [171] Deneke, S.M., Thiol-based antioxidants, in *Current Topics in Cellular Regulation*, E.R. Stadtman and P.B. Chock, Editors. Academic Press. 151-180, 2001.
- [172] Thomas, J.A., B. Poland, and R. Honzatko, Protein Sulfhydryls and Their Role in the Antioxidant Function of Protein S-Thiolation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 319 (1995) 1, 1-9.
- [173] Roos, G. and J. Messens, Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation. *Free Radic Biol Med*, 51 (2011) 2, 314-26.

- [174] Medina-Navarro, R., et al., Protein antioxidant response to the stress and the relationship between molecular structure and antioxidant function. *PLoS One*, 5 (2010) 1, e8971.
- [175] Reddie, K.G. and K.S. Carroll, Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Curr Opin Chem Biol*, 12 (2008) 6, 746-54.
- [176] Wieser, H., Bread making: improving quality. Cambridge Woodhead Publishing Ltd. xvii + 589 pp., 2003.497
- [177] Farver, O. and I. Pecht, Electron transfer in proteins: in search of preferential pathways. *The FASEB Journal*, 5 (1991) 11, 2554-2559.
- [178] Mochizuki, M., et al., Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1569 (2002) 1, 35-44.
- [179] Liu, Y. and R. Guo, pH-dependent structures and properties of casein micelles. *Biophys Chem*, 136 (2008) 2-3, 67-73.
- [180] Ye, R. and F. Harte, Casein maps: effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl<sub>2</sub> on the particle size of reconstituted casein micelles. *J Dairy Sci*, 96 (2013) 2, 799-805.
- [181] Sinaga, H., N. Bansal, and B. Bhandari, Effects of milk pH alteration on casein micelle size and gelation properties of milk. *International Journal of Food Properties*, 20 (2016) 1, 179-197.
- [182] Guerra, P.V. and V.A. Yaylayan, Interaction of flavanols with amino acids: postoxidative reactivity of the B-ring of catechin with glycine. *J Agric Food Chem*, 62 (2014) 17, 3831-6.
- [183] Yin, J., et al., Epicatechin and epigallocatechin gallate inhibit formation of intermediary radicals during heating of lysine and glucose. *Food Chem*, 146 (2014), 48-55.
- [184] Colahan-Sederstrom, P.M. and D.G. Peterson, Inhibition of Key Aroma Compound Generated during Ultrahigh-Temperature Processing of Bovine Milk via Epicatechin Addition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 2, 398-402.
- [185] Rawel, H.M., J. Kroll, and S. Rohn, Reactions of phenolic substances with lysozyme — physicochemical characterisation and proteolytic digestion of the derivatives. *Food Chemistry*, 72 (2001) 1, 59-71.
- [186] Fernandez-Gomez, B., et al., New knowledge on the antiglycoxidative mechanism of chlorogenic acid. *Food Funct*, 6 (2015) 6, 2081-90.
- [187] Nagai, R., et al., Inhibition of AGEs formation by natural products. *Amino Acids*, 46 (2014) 2, 261-6.
- [188] Fujiwara, Y., et al., Natural compounds containing a catechol group enhance the formation of Nε-pyrrolysine-(carboxymethyl)lysine of the Maillard reaction. *Free Radic Biol Med*, 50 (2011) 7, 883-91.
- [189] Akagawa, M., T. Shigemitsu, and K. Suyama, Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67 (2003) 12, 2632-40.

- [190] Armbruster, D.A. and T. Pry, Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist. Reviews*, 29 Suppl 1 (2008) Suppl 1, S49-S52.
- [191] Gorissen, S.H.M., et al., Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino Acids*, 50 (2018) 12, 1685-1695.
- [192] Friedman, M. and D.L. Brandon, Nutritional and health benefits of soy proteins. *J Agric Food Chem*, 49 (2001) 3, 1069-86.
- [193] Ning, J., et al., Effect of green tea powder on the quality attributes and antioxidant activity of whole-wheat flour pan bread. *LWT - Food Science and Technology*, 79 (2017), 342-348.
- [194] Bajerska, J., et al., Catechin stability, antioxidant properties and sensory profiles of rye breads fortified with green tea extracts. *Journal of food and nutrition research*, 49 (2010), 104-111.
- [195] Lamothe, S., et al., Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food Funct*, 5 (2014) 10, 2621-31.
- [196] Aktağ, I.G., A. Hamzalıoğlu, and V. Gökmen, Lactose hydrolysis and protein fortification pose an increased risk for the formation of Maillard reaction products in UHT treated milk products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 84 (2019).