

**T.C.  
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALLERJEN PROTEİN OLAN  $\beta$ - KAZEİN'İN Nano-LC SİSTEMİNDE  
BELİRLENMESİ VE BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERLE ETKİLEŞİMLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KERİME ŞENGÜL**

**GIDA GÜVENLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Cemil AYDOĞAN**

**BİNGÖL-2024**

**ALLERJEN PROTEİN OLAN  $\beta$  - KAZEİN VE NANO  
LC SİSTEMİNDE BELİRLENMESİ VE BAZI  
FENOLİK BİLEŞİKLERLE ETKİLEŞİMLERİNİN  
İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Cemil AYDOĞAN danışmanlığında, Kerime ŞENGÜL tarafından hazırlanan bu çalışma 08/02/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Güvenliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. İhsan Güngör ŞAT

*İmza :*

Üye: Prof. Dr. Cemil AYDOĞAN

*İmza:*

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Bayram YURT

*İmza:*

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun ...../ ...../ ..... tarih ve ...../ .....  
nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Zafer ŞİAR**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimi ve tezimin her aşamasında her türlü yardımlarını ve bilgi birikimini esirgemeyen, çalışmalarımın tamamlanabilmesi için gerekli desteği veren saygı değer danışmanım Prof. Dr. Cemil AYDOĞAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansımın ders döneminde bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışması boyunca yaptığımız çalışmalardan veri analize kadar her aşamada yanımda olan ve desteğini esirgemeyen çok kıymetli saygıdeğer hocam Halise AVCİL'e teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her anında desteklerini hissettiğim bugünlere gelmemde büyük emeğe sahip olan sevgili annem Gönül ŞENGÜL, sevgili babam Menduh ŞENGÜL ve tüm aileme en özel teşekkürlerimi sunarım.

**Kerime ŞENGÜL**

**Bingöl 2024**

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Sıvı Kromatografisi (LC).....	3
2.2. Nano-LC.....	5
2.3. Nano-LC Kolon Türleri.....	6
2.3.1. Monolitik Kolonlar.....	8
2.4. Süt Proteinleri.....	10
2.4.1. Beta kazein.....	11
2.4.2. Alerjen etki .....	14
2.5. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması.....	15
2.6. Protein-Fenolik Kompleks Yapıları.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Alet ve Ekipmanlar.....	21
3.2. Kimyasal ve Sarf Malzemeler.....	21
3.3. Deneysel Yöntem.....	22
3.3.1. Monomer Sentezi.....	22
3.3.2. Kolon Silazasyonu.....	22
3.3.3. Monolitik Kolon Sentezi.....	22
3.3.4. Numune Hazırlama.....	25
3.3.5. Sütün Ekstraksiyonu .....	27
3.3.6. Kromatografik Koşullar.....	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	31

4.1. 9-Antrasenmetil Metakrilat (ANM ) Karakterizasyonu.....	31
4.2. Monolitik Kolon Karekterizasyonu.....	31
4.3.Nano-LC Sisteminde $\beta$ -CN Fenolik Bileşiklerin Etkileşiminin incelenmesi.....	35
4.4. Süttten $\beta$ -CN Tayini.....	37
4.5. Nano-LC Sisteminde $\beta$ -CN fenolik bileşiklerin etkileşimlerinin incelenmesi.....	40
4.6. $\beta$ -CN yüzey hidrofobisitesi.....	43
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	54

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ACN	: Asetonitril
AIBN	: 2.2'Azobisisobütürinonitril
ANM	: Antrasenmetil metakrilat
BKM-7	: Betakasomorfin-7
$\beta$ -CN	: Beta kazein
ESI-MS	: Elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi
g	: Gram
HPLC	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
HCl	: Hidroklorik asit
HRMS	: Yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi
i.d.	: İç çap
Kg	: Kilogram
LOQ	: Miktar tayin limiti
LOD	: Tanımlama tayin limiti
L	: Litre
MeOH	: Metanol
ML	: Mililitre
Mm	: Milimolar
Mg	: Miligram
$\mu$ L	: Mikrolitre
ANM	: 9-Antrasenmetil Metakrilat
Nm	: Nanometre
NaCl	: Sodyum klorür
Ppm	: Milyonda
RP	: Ters-Faz

Rs	: Rezolüsyon
RSD	: Bağlı standard sapma
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
OP	: Açık tubüler
OD	: Dış çap
TMSPM	: 3-Trimetoksisilil Propil Metakrilat
UV	: Ultraviole
UPLC	: Ultra Performans Sıvı Kromatografisi
UC	: Utrasantrüfuj
UP	: Ultra safsu
WCOT	: Duvar kaplamalı açık tubüler

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	LC sisteminin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.2.	Tez çalışması kapsamında kullanılan ProFlow-Nano-LC sistemi.....	6
Şekil 2.3.	Nano-LC sisteminin avantajları .....	7
Şekil 2.4.	Analitik nano kolon türleri a) Open tübüler, b) Partükül dolgulu ve c) Monolitik kolonlar.....	9
Şekil 2.5.	Kazein miselleri ve alt miseli modeli .....	11
Şekil 2.6.	$\beta$ -CN'in A1 ve A2 varyantlarının farkı ve beta-kazomorfin-7'nin formülasyonu.....	13
Şekil 2.7.	Fenolik bileşiklerin iskelet yapısı .....	16
Şekil 2.8.	Protein ve Fenolik Etkileşimi .....	18
Şekil 3.1.	Kolon Silanizasyonu işlem basamakları .....	23
Şekil 3.2.	100 $\mu$ m iç çaplı 20 cm ANM monolitik kolon sentez aşamaları .....	24
Şekil 3.3.	Numune Hazırlama işlemine ait resimler .....	26
Şekil 3.4.	Sütten $\beta$ -kazein ekstraksiyon aşamaları .....	28
Şekil 3.5.	Süt ekstraksiyon işlemine ait resimler .....	29
Şekil 4.1.	ANM(9-Antrasenmetil Metakrilat ) elde edilmesi.....	31
Şekil 4.2.	ANM monoliti akıştan önce (a) ve akıştan sonra (b) mikroskop görüntüleri.....	32
Şekil 4.3.	ANM monolitik kolonun geri basıncına karşı akış hızının kalibrasyon grafiği.....	33
Şekil 4.4.	ANM monolitik kolonun A(5000x) ve B(10000x) büyütme SEM görüntüleri.....	34
Şekil 4.5.	Alkilbenzenlerin ANM monolitik kolonda kromatografik ayrımı .....	35
Şekil 4.6.	$\beta$ -CN blank ve 20 ppm kromatogramı .....	36
Şekil 4.7.	M1, M1 (1:2) ve M1 (1:4) süt örnekleri $\beta$ -CN kromatogramı.....	38
Şekil 4.8.	P1, P1 (1:2) ve P1 (1:4) süt örnekleri $\beta$ -CN kromatogramı.....	39
Şekil 4.9.	Fenolik bileşiklerin $\beta$ -CN ile etkileşim kromatogramı .....	41
Şekil 4.10.	Fenolik bileşiklerin proteinlerle etkileşimi.....	42



Şekil 4.11. Polifenoller ve proteinler arasındaki başlıca kovalent olmayan etkileşimler.....	43
Şekil 4.12. $\beta$ -CN yüzey hidrofobitesi .....	44

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Sıvı kromotografide kolon iç çaplarına göre isimlendirme.....	4
Tablo 2.2.	Nano-LC’de kullanılan analitik kolon tipleri .....	7
Tablo 3.1.	Kromotogram analizi için flow gradient uygulaması.....	30
Tablo 4.1.	$\beta$ -CN için nano-LC/UV sisteminde validasyon parametreleri.....	37

# ALLERJEN PROTEİN OLAN $\beta$ - KAZEİN'İN Nano-LC SİSTEMİNDE BELİRLENMESİ VE BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERLE ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

## ÖZET

Bu tez çalışmasında, i) ters faz nano-sıvı kromatografi (nano-LC) için hidrofobik karakterli yeni bir 9-Antrasenmetil metakrilat (ANM) monolitik nano-kolon hazırlanması, ii) allerjen protein olan  $\beta$ -kazein ( $\beta$ -CN) için yeni bir tayin metodu geliştirilmesi ve iii) süt numunelerinde uygulaması yapılarak bazı fenolik bileşiklerle etkileşimi sonucunda oluşturduğu kojuje yapılar incelenmiştir. Bu kapsamda  $\beta$ -CN tayini için yeni yaklaşımla antrasenmetakrilat (ANM) bazlı yeni bir hidrofobik monolitik nano-kolon hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. İlk olarak, monolitik kolon ANM, divinilbenzen (DVB) içeren solüsyonlar hazırlanmış, porojenik çözücü olarak siklohegzanol ve dodekanol kullanılmış ve in-situ polimerizasyon yöntemi ile monolitik-nano kolon hazırlanmıştır.

ANM monolitik kolon iç çapı 100  $\mu$ m ve 20 cm uzunluğunda hazırlanmış ve SEM görüntüleri ile yapısal morfolojisi incelenmiştir ayrıca, kolonun kromatografik karakterizasyonu nano-LC sisteminde homolog alkilbenzenler kullanılarak yapılmıştır. Karakterize edilen monolitik kolon kullanılarak nano-LC sisteminde  $\beta$ -CN tayin metodu geliştirilmiş LOD değeri 0,2 mg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen metod süt numunelerine uygulanmış ve miktar tayini yapılmıştır. Ayrıca allerjen protein olan  $\beta$ -CN ve bazı fenoliklerin oluşturduğu kojuje yapılar incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:**  $\beta$ -kazein, proteomik, fenolik bileşikler, nano-LC, monolit, gıda analizi, süt.

# THE DETERMINATION OF AN ALLERGEN PROTEIN , $\beta$ -CASEIN IN Nano-LC SYSTEM AND ITS INTRACTION WITH SOME PHENOLIC COMPOUNDS

## ABSTRACT

In this study, i) preparation of a new 9-Anthracenemethyl methacrylate (ANM) monolithic nanocolumn with hydrophobic character for reversed-phase nano-liquid chromatography (nano-LC), ii) new preparation for the allergenic protein  $\beta$ -casein ( $\beta$ -CN) developing a determination method and iii) applying it to milk samples and examining the conjugate structures formed as a result of its interaction with some phenolic compounds. In this context, a new hydrophobic monolithic nanocolumn based on Anthracenemethacrylate (ANM), a new approach for the determination of  $\beta$ -CN, was prepared and characterized. First, monolithic column solutions containing ANM and divinylbenzene (DVB) were prepared, cyclohexanol and dodecanol were used as porogenic solvents, and a monolithic-nano column was prepared by in-situ polymerization method.

ANM monolithic column was prepared with an inner diameter of 100  $\mu$ m and a length of 20 cm, and its structural morphology was examined with SEM images. In addition, chromatographic characterization of the column was performed using homologous alkylbenzenes in the nano-LC system. The  $\beta$ -CN determination method was developed in the nano-LC system using the characterized monolithic column, and the LOD value was found to be 0.2 mg/mL. The developed method was applied to milk samples and quantification was made. In addition, conjugated structures formed by the allergenic protein  $\beta$ -CN and some phenolics were examined.

**Keywords:**  $\beta$ -casein, proteomics, phenolic compounds, nano-LC, monolith, food analysis, milk.

# 1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde önemli bir yer tutan süt ve süt ürünleri, içerdiği protein, karbonhidrat, yağ, vitamin ve mineraller açısından zengin bir gıdadır (Farkye ve Shah, 2014). Süt proteinleri kazein ve süt serumu olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Süt proteini kazeinin türü olan  $\beta$ -kazein A1 ve A2 olmak üzere iki kısımda incelenmektedir (Haq vd., 2014; Andiç vd., 2021).  $\beta$ -kazein'in A1 ve A2 varyantı arasındaki fark, ekzon 7'deki  $\beta$ -kazein aminoasit peptid zincirinin 67. sıradaki yalnızca bir aminoasidin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Kazeinin türleri arasındaki farklılıklar fiziksel özelliklerini ve enzimatik sindirimini etkilemiştir. Bu durum ise fizyolojik durumlar üzerinden oluşuyorsa besin intoleransı, immünolojik durumların neden olduğu durumlardan üzerinden oluşuyorsa besin alerjisi olarak adlandırılmaktadır (Koca ve Akçam, 2015). Alerjiye neden olan proteinler kazein,  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumindir (Fiocchi vd., 2010). Kazeinde alerjiye neden olan proteinin sadece A1  $\beta$ -kazeinden kaynaklı olduğu, A2  $\beta$ -kazeinin ise böyle bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Swinburn, 2004).

İnsan vücudunda birçok biyolojik aktiviteye sahip olan fenolik bileşiklerden yüksek düzeyde faydalanabilmek için diğer moleküllerle etkileşimleri önem taşımaktadır. Fenolik bileşikler sahip oldukları aromatik halkalar ve hidroksil gruplarından dolayı hidrofobik ve hidrofilik etkileşimlerle, hidrojen ve kovalent bağlarla hücre duvarına ve ortamdaki protein, karbonhidrat, lipit gibi yapılara bağlanabilme yeteneğine sahiptirler. Fenolik bileşikler yüksek protein ilgisine sahip olduğundan dolayı protein moleküllerinin iç bölgesine sızabilecek kadar küçük, peptid zinciriyle daha fazla bağ yapacak kadar da büyük olduğu bilinmektedir. Protein-fenolik kompleksinde etkileşim proteinlerin hidrofobik bölgeler sayesinde fenolik bileşiklerle kompleks oluşturmakta ve bu etkileşiminin temelinde fenoliklerin aromatik halkası (-OH grupları) ile proteinlerin hidrofobik bölgeleri (-CH<sub>2</sub> grupları) arasındaki kovalent olmayan etkileşimlere dayanır (Diniz vd., 2008; Le Bourvellec ve Renard,2012).

Fenolik bileşiklerin sağlık üzerine etkileri miktarlarına bağlıdır ve biyoyararlanıma etki eden faktörlerden biridir (Rodríguez ve ark., 2009; Öztürk ve ark., 2016). Biyoaktif

bileşiklerin insan sağlığına etkilerinin anlaşılabilmesi için alınan polifenollerin orjinlerini, tüketim miktarlarını, biyoyararlılıklarını ve biyoyararlılıklarına etki eden faktörlerinin bilinmesi önemlidir. Protein yapısının yanında gıdanın fenolik yapısı, serbest polifenol içeriği, antioksidan kapasitesi ve gıdadaki fenolik bileşenlerin biyoyararlılığı da değişebildiği gözlemlenmiştir (Thongkaew ve ark., 2014).

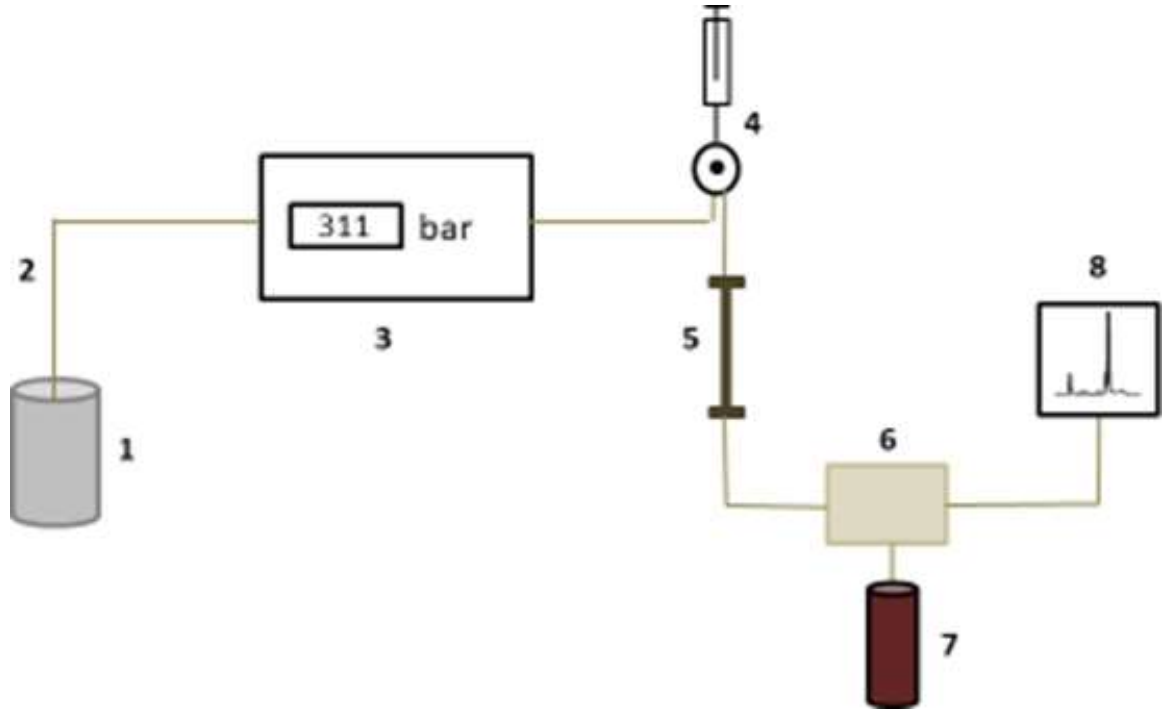
Modern gıda bilimi ve foodomik tüketicinin refahını ve sağlığını iyileştirmek amacıyla omics teknolojilerinin uygulanması ve entegrasyonu yoluyla gıda ve beslenme alanları arasındaki bir disiplinler alan olup moleküler omik düzeyinde gıda bileşenlerinin ve besin maddelerinin mekanizmaları hakkında önemli moleküler bilgiler sunmaktadır. Biyokimyasal mekanizmada meydana gelen değişiklikleri belirlemek için çok hassas bir analitik yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. Analitik yöntemin daha duyarlı, tekrarlanabilir ve uygun maliyetli olması büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda yapılan analizlerde minyatürleştirilmiş sıvı kromatografi ön plana çıkmaktadır. Protein ve fenolikler arasındaki etkileşiminin incelenmesinde kullanılan yöntemler arasında Matris destekli lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektroskopisi (MALDI-TOF MS), Nano-LC/MS gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. Kromatografik kolon seçiminde uzunluk, iç çap ve sabit faz tipi göz önünde bulundurularak daha küçük iç çapa (i.d.) sahip kolon seçimi herhangi bir analitik ayırmanın performansı için önem arz etmektedir. Kolonun iç çapının azalmasına bağlı olarak analizde ayrıştırılan bileşiklerin kolondaki konsantrasyonu yükselir ve MS gibi düşük konsantrasyona duyarlı dedektörlerle beraber kullanıldığında yüksek hassasiyet elde edilir. Nano-LC'nin omics, gıda güvenliği ve kalitesi vb. araştırma alanları ile ilgili birçok çalışmanın mevcut olduğunu, bu durum yeni analitik kolonların geliştirilmesine odaklanan çalışmaları teşvik etmekte olup kolon teknolojisine ilgi zamanla artmıştır (Wilson ve ark., 2019).

Bu çalışmada Nano-LC sisteminde sütte bulunan alerjen proteini  $\beta$ -CN belirlenmesi ve  $\beta$ -CN nin fenolik bileşiklerle etkileşimi sonucunda oluşturduğu yapıyı ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu kapsamda  $\beta$ -CN tayini için yeni yaklaşımla hidrofobik monolit hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Karakterize edilen monolitik nano-kolon kullanılarak Nano-LC/UV sisteminde  $\beta$ -CN tayin metodu geliştirilmiş ve süt numunelerine uygulanmıştır. Sonrasında  $\beta$ -CN ve bazı fenoliklerin etkileşimleri incelenmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Sıvı Kromatografisi (LC)

Sıvı kromatografisi (LC), katı faz ve sıvı faz arasında fiziksel bir ayırma tekniğidir. Bir numune, hareketli faz ve sabit faz arasında dağıtılarak bölme, adsorpsiyon veya diğer etkileşimler yoluyla içerdiği analitlerine ayrılır (Dong, 2019).



Şekil 2.1. LC sisteminin şematik gösterimi 1)Solvent rezervuarı 2) transfer 3)manometre pompası 4) örnek injeksiyonu 5) kolon 6)detektör 7)atık 8)veri sistemi

LC sistemi (Şekil 2.1) pompa, enjektör, kolon, dedektör, veri kaydedici ve atıktan meydana gelmektedir. HPLC sisteminde sabit faz ile mobil faz arasında analiz edilen bileşenlerin göç etme hızlarının birbirinden farklı olması esasına dayanmaktadır. Kolondan ayrılan akışkanın toplamına “effluent”, mobil faz kısmına “eluent” ve ayrılmış bileşen kısmına da “eluat” denilmektedir. Sıvı kromatografisi 1900'lerin başında, "klasik kolon kromatografisi" olarak meydana çıkmıştır (Snyder ve Kirkland, 1979). 1941'de Martin ve Syngge tarafından zamanla sıvı kromatografisi (LC) metodu geliştirilmiş ve yapılan çalışmalarda sıvı-sıvı kromatografisine ve kromatografinin teorik modeline ek olarak,

LC'nin "hareketli faz içinde çok küçük bileşenlerin kolon boyunca yüksek basınç farkı" oluşturması öngörülmüştür (Ettre, 1971). LC sisteminde yüksek basınçlı pompalar gerektiren küçük partiküllü kolonların tercih edilmesiyle 'yüksek performans dönüşümü' sağlanmıştır. Zamanla tüm LC üniteleri dahil kolonların, pompaların ve dedektörlerin ticarileştirilmesi, kullanımı kolaylaştırıp kullanıcılar tarafından uygulamada kolaylık sağlamıştır (Neal, 1995). Gaz kromatografisi (GC)'de, uçucu olmayan ve farklı özellikteki bileşenlerin analiz edilememesi sıvı kromatografisine olan ilgiyi arttırmıştır (Neal, 1995).

HPLC genellikle uçucu olmayan organik bileşiklerin analizinde kullanılmaktadır. Aminoasit, protein, nükleik asit, hidrokarbon fenol bileşikler, pestisit gibi bileşenler HPLC de hassasiyetle analiz edilmiştir (Sestak ve ark., 2015). LC için terminoloji kolon iç çapına (i.d.) veya analiz boyunca uygulanan akış hızına dayanmaktadır (Vasconcelos Soares Maciel ve ark., 2020). İç çapına göre çeşitli kolon tiplerinin isimleri ve bunlarla ilişkili karakteristikler Tablo 2.1'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Sıvı kromatografisi sistemlerine göre kolon tipi ve akış hızları (Vasconcelos Soares Maciel ve ark., 2020)

Kolon İç Çapı (i.d.) (mm)	Akış Hızı (mL min <sup>-1</sup> )	İsimlendirme
4,6-3,2	2,0-0,5	HPLC
3,2-1,5	0,5-0,1	Microbore LC
1,5-0,5	0,1-0,01	Micro LC
0,5-0,15	0,01-0,001	Kapiler-LC
0,15-0,01	0,001-0,0001	Nano-LC
0,05-0,005	<0,0001	Open-Tubular LC

Tablo 2.1'de kromatografik teknikte kullanılan kolonların iç çapı ve akış hızları arasındaki farklar gösterilmiştir. Nano-LC'de kolon iç çapı 10-150 µm ve akış hızı ise 1000-50 nL/dk olup bu değer aralığında çalışma koşulları oluşturulmaktadır. Kolon iç çapı ve akış hızının düşük olması yüksek basınçlı sistemlerin kullanılmasını zorunlu kılmıştır.



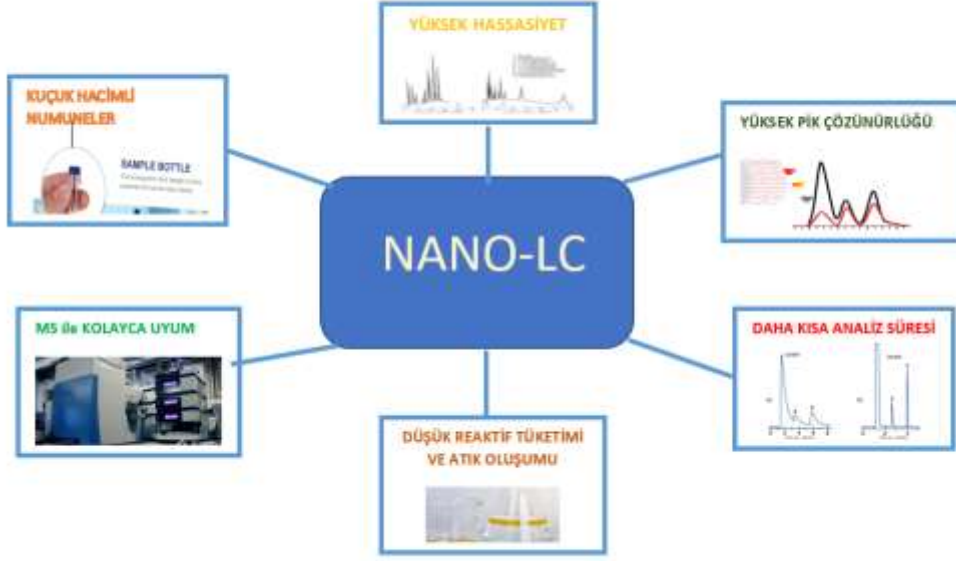
## 2.2. Nano-LC

Minyatürleştirilmiş LC teknolojisine dayalı analitik metodların tarihi 20. yüzyılın ikinci yarısına kadar uzanmakta olup bu metodlar 21.yüzyılda da yapılan çalışmalarla yaygınlaşmıştır (Foley, 1996). Nano-LC genel anlamda yüksek hassasiyet gerektiren, bir karışımda çok düşük miktarda bulunan bileşenlerin analizinde kullanılan modern kromatografi sistemi olarak tanımlanır (Sestak ve ark., 2015). Nano-LC kromatografi tekniği kolon iç çap (i.d.) ve/veya hareketli faz akış hızına göre adlandırılmaktadır. Nano terimi uygulanan nano hacimden kaynaklanmakta olup bu durum günümüzde ise daha çok ayırma için kullanılan kolonun iç çapının 10-200 µm aralığında olması ile açıklanmaktadır (Aydoğan ve ark., 2020).



Şekil 2.2. Tez çalışması kapsamında kullanılan Nano-LC sistemi

Gıda, ilaç, çevre analizlerinde olmak üzere pek çok alanda uygulanmaktadır (Aydoğan, 2019; Roberg-Larsen ve ark., 2021). Nano LC, klasik HPLC sisteminin geliştirilmiş hali olarak karşımıza çıkmaktadır ve klasik HPLC sistemine göre düşük numune gereksinimi, kısa analiz süresi, az miktarda reaktif kullanımı, MS ile uyumlu olup yüksek hassasiyet sunması, partikül çapının ve kolon uzunluğunun azaltılması, hızlı analizlere olanak sağlaması gibi bazı avantajlar sunmaktadır (Aydoğan, 2019a) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Nano-LC sisteminin avantajları

Bu sistemde birçok karmaşık yapıda bileşen etkin olarak analiz edilmesi ve moleküler omik çalışmalarında kullanılmaktadır (Asensio-Ramos ve ark., 2017).

### 2.3. Nano-LC Kolon Türleri

Kromatografik analizlerde kolonun uzunluğu, iç çapı ve sabit faz türü analizin performansını etkilemektedir. Küçük iç çapa sahip kolon seçimi herhangi bir analitik ayırmanın performansı için önemlidir. Nano-LC sisteminde ayırım 10 ila 150  $\mu\text{m}$  arasında iç çaplı nano kolonda yapılır. Kolonlarda genel anlamda sabit faz olarak silika kullanılmakta olup diğer kullanılan sabit fazlar ise organik polimer, zirkonya, titanyum oksit, alüminyum oksit ve gözenekli grafitleştirilmiş karbondur. Diğer kromatografi türlerinde olduğu gibi, kolonlarındaki fonksiyonel grup genel anlamda C18, C8 ve C4 gibi ters faz olup amino ve amid gibi HILIC fonksiyonel gruplarına sahip kolonlar da ticari olarak satılmaktadır. Enantiyomerik ayırmalarda ise kiral bileşiklerin ayırımı için polisakkarit ve onun türevi bazlı CSP (kiral sabit faz), polimer bazlı CSP ve silika bazlı CSP kolonlar kullanılmaktadır (Hernández-Borges ve ark., 2007; Unger ve ark., 2008; Nazario ve ark., 2015; Sestak ve ark., 2015b; Wilson ve ark., 2019).

Kolonun iç çapının azalmasına bağlı olarak analizinde ayrıştırılan bileşiklerin kolondaki konsantrasyonu yükselir ve elektrosprey iyonizasyon (ESI-MS) kütle spektrometresi gibi düşük konsantrasyona duyarlı dedektörlerle beraber kullanıldığında yüksek hassasiyet elde edilir (Wilson ve ark., 2019). Literatürde Nano-LC sisteminde omik, gıda güvenliği ve kalitesi gibi farklı araştırma alanları ile ilgili birçok çalışma mevcuttur (Aydoğan ve ark., 2021; Şeker ve ark., 2022). Yapılan çalışmalar nano-LC kolonların geliştirilmesine odaklanan çalışmaları teşvik etmekte olup kolon teknolojisine ilgiyi zamanla artırmıştır (Wilson ve ark. 2019; Aydoğan ve ark., 2020).

Tablo 2 2. Nano-sıvı kromatografisinde kullanılan analitik kolon tipleri (Vasconcelos Soares Maciel ve ark., 2020)

Kolon Türleri	Sabit Fazlar	Uygulamalar	Avantajlar
Partikül Dolgulu Kolonlar	Alkil bağlı (C8, C18), Fenil-heksil, Siyano Amino diol	Gıda, çevre, ve ilaç analizi	Birden fazla sabit fazın farklı seçiciliği mevcuttur.
Monolitik Kolonlar	Organik polimer monolitler Silika bazlı monolitler Hibrit monolitler	Biyoanaliz için kiral ayırmalar, afinite kromatografisi ve biyomoleküller	Yüksek geçirgenlik, hızlı kütle transferi, düşük ayırma süresi, ayarlanabilir özellikler ve kolay üretim
Açık Tubüler Kolonlar	WCOT: fiziksel olarak adsorbe edilmiş polimerik fazlar ve nanopartiküller; PLOT: kimyasal olarak bağlı polimerik fazlar.	Yetersiz numuneler için: adli tıp, tıp, biyotıp	LC-EI-MS için daha uygun olan yüksek kromatografik verimlilik, optimum geçirgenlik ve düşük karşı basınç oranları

Tablo 2.2’de özetlendiği gibi Nano-LC kolonları monolitik kolonlar (polimer monolit, silika monolit, hibrit monolit ), açık tubüler (duvar kaplamalı kolon, PLOT kolon) ve dolgulu kolon olarak 3 gruba ayrılmaktadır (Aydoğan, 2019b).



Şekil 2.4. Analitik nano kolon türleri soldan sağa a) Açık tubular, b) Partikül dolgulu ve c) Monolitik kolonlar

Monolitik ve partikül dolgulu kolonların içerisine dolgu yapılır ancak açık tubüler kolonlar da ise kolon iç duvarı kaplanıp orta kısımda açıklık kalacak şekilde yapılır. Monolitik kolonların görünümü dallanmış ağsı bir yapı şeklindedir (Şekil 2.4).

### 2.3.1. Monolitik Kolonlar

Monolitler, sadece bir yapıdan oluşan ve homojen yapıya sahip tek parçadan oluşan network yapılarıdır (Arrua ve ark., 2012). Svec ve Frechet tarafından 1900'lerin başlarında partikül dolgulu kolonlara alternatif olarak polimer monolitik sabit faz önermişlerdir (Svec ve Frechet, 1992). Bu kolonların partikül dolgulu kolonlardan daha yüksek geçirgenliğe sahip olduğu ve analiz yapıldığı süreçte daha düşük analitin kütle transfer direncine sahiptir (Ladisich ve Zhang, 2016). Son yapılan çalışmalarda monolitik kolonlar kolay hazırlama, yüksek akış hızında hızlı ayırma, yüksek geçirgenlik, küçük moleküllerin ve makro moleküllerin ayrılması gibi birçok avantaj sağlamaktadır (Liu ve ark., 2013).

Monolitik kolonlar, yapısındaki bileşimlerine göre üç ana gruba ayrılmakta olup bunlar; organik polimer bazlı, inorganik silika bazlı ve organik-silika hibrit monolitlerdir (Aydoğan ve ark., 2020). Hidrofobik, hidrofilik, iyonize olabilen zwitteriyonik monomerlerin kullanımıyla monolitik kolonların hazırlama tekniğini çeşitlilik göstermektedir (Svec, 2004a). Monolitik kolonlar farklı numuneler için ön kolon (trap kolon) ayrıca moleküllerin ayrılması için analitik kolon olarak kullanılabilir.

Monolitler monomerlerin porojenik karışım ve polimerizasyon reaksiyonunu başlatan bir radikal başlatıcı içeren homojen bir polimerizasyon karışımının termal polimerizasyon sureti

ile hazırlanır (Arrua ve ark., 2012). Yapısındaki fonksiyonel monomerlerin çeşitliliği nedeniyle polimer bazlı monolit kolon; ters fazlı sıvı kromatografisi (RPLC), hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC), hidrofilik etkileşim kromatografisi (HILIC) ve iyon değişim kromatografisi (IEC) gibi birçok kromatografik tekniklerde yapılan çalışmalarda kullanılmıştır (Talebi ve ark., 2013). Polimer monolit nano kolonlar omiks uygulamalarında, gıda güvenliği ve kalitesi biyoanalitik kimya gibi alanlarda yapılan çalışmalar mevcut olup protein analizinde (Aydoğan, 2016; Aydoğan ve ark., 2021), iyon analizinde (Aydoğan ve ark., 2015), proteomik çalışmalarında (Yi ve ark., 2017) mikro-nano ölçekli kromatografi çalışmalarında (Vasconcelos ve ark., 2020) analitik kolon olarak tercih edilmiştir. Polimerbazlı monolitler metakrilatbazlı strienbazlı akrilamidbazlı olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Monolitik kolon üretiminde farklı işlemler kimyasal maddeler ve deneysel yöntemler denenmiştir. Yöntemde bir başlatıcı reaktif ve bir çapraz bağlayıcının ilavesiyle sıvı bir çözelti hazırlanıp kolona enjekte edilir polimerizasyon reaksiyonuyla aktifleştirilme işlemi gerçekleştirilir (Lima ve ark., 2023). Polimer monolit ile nano kolonun duvarı arasında kovalent bağ olması için silanizasyon işlemi yapılmaktadır. Yüksek basınca dirençli, mekanik olarak stabil polimer monolit kolonlar hazırlamak amacıyla polimerin iç yüzeye kovalent olarak bağlanması gerekmektedir. Bu işlem polimerizasyon aşamasından önce bir ön hazırlama işlemidir. Polimer monolit kolon elde edebilmek için gözenek oluşturucu çözücüler ve termal radikal başlatıcı içeren organik polimer içeren karışım kolona enjekte edilir. Monolit yapımında polimerizasyon reaksiyonunun süresi ve sıcaklığı parojen solvent seçimi ve karışımdaki monomer/parojen solvent oranı monolit yapının elde edilmesinde önemli rol oynar (Ghanem ve ark., 2022).

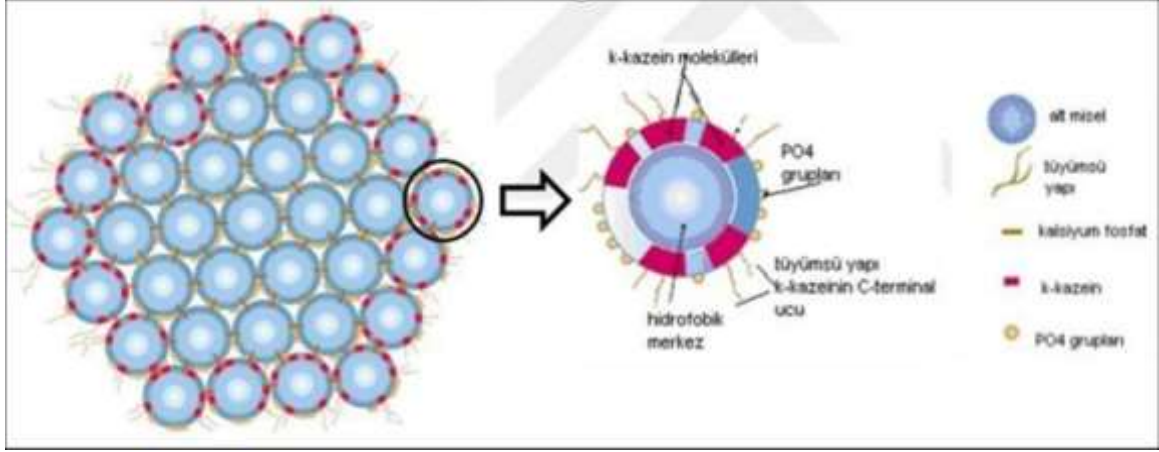
Organik polimer monolitik kolonlarda mezo ve makro gözenekler olmak üzere iki farklı gözenek türü vardır. Mezo gözenekler (2 - 50 nm), hareketli mobil faz ile dolu olup analitin aktif adsorpsiyon bölgelerine erişmesini sağlar. Makro gözenekler, geri basıncı önemli düzeyde artırmadan daha fazla mobil faz akışını sağlar. Mezo gözenekler yüzey alanına, makro gözenekler ise esas olarak gözenekliliğe yarar sağlamıştır (Svec, 2004b). İyi bir monolitik kolon, geniş bir yüzey alanı sergileyen alıkonma için yüksek bir akış ve düşük bir geri basınç sağlayan kolondur.

## 2.4. Süt Proteinleri

İnsan beslenmesinde önemli bir yer tutan süt ve süt ürünleri, içerdiği protein, karbonhidrat, yağ, vitamin (B12, B2 ve B5 vitaminleri) ve mineraller (Ca, Mg, P, Se) açısından zengindir. Sütün bileşimini; su, azotlu bileşikler, karbonhidratlar, yağlar, vitaminler, tuz ve mineraller, süt gazları ve enzimler oluşturur (Farkye ve Shah, 2014). Sütün bileşiminin büyük bir kısmını su oluşturup geriye kalan kısmını ise kuru madde olarak adlandırılan bileşenler oluşturur. Süt proteinleri kazein ve süt serumu olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Süt proteinleri, 20°C de pH 4.6 da çözünebilirliklerine göre ikiye ayrılmakta olup kazeinler pıhtılaşırken peyniraltı suyu proteinleri pH 4.6 da çözünebilir olarak kalırlar.

İnek sütünde proteinin yaklaşık %80 kazein ve %20 peynir altı suyu proteinlerinden oluşur. Ancak bazı araştırmacılar peynir altı suyu proteinlerinin sütte yaklaşık %14 oranında bulunduğunu raporlamışlardır (McLachlan, 2001; Roginski ve ark., 2003; Şahin ve Boztepe, 2021). Süt proteini olan kazein ve süt serumu birden fazla proteinden oluşmakta olup süt serumunu oluşturan proteinler ise albümin, globülin ve proteaz- peptonlardır. Kazeini daha ayrıntılı incelersek olursak inek sütü proteinlerinin %80'ini oluşturan kazein;  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - ve  $\kappa$ -kazein olmak üzere 4 farklı fraksiyondan meydana gelmiştir (Cheung ve Mehta, 2015; Andiç ve ark., 2021). Kazein misellerindeki fraksiyon oranları sırasıyla %40, 12,5, 35 ve 12,5 şeklinde sıralanmaktadır. Diğer bir fraksiyon olan  $\gamma$ -kazein ise sütte çok düşük miktarlarda bulunur ve  $\beta$ -kazeinin sütün doğal enzimi olan plazmin tarafından proteolizi sonucu yan ürün olarak oluşur (Andiç ve ark., 2021).

Kazein, laktasyon esnasında misel adı verilen kalsiyum içeren kümeler halinde salgılanan süt proteindir (Kang ve ark., 1986; Lin ve ark., 1993). Kazeinin yapısında hem asit (COOH) hem bazik (NH<sub>2</sub>) gruplar bulundurduğundan dolayı amfoter özellik göstermektedir. Kazein miselleri 10-15 nm çapındaki alt misellerden oluşmakta olup bu alt miseller kazein misellerinin yapıtaşlarını oluşturur. Miseller arasındaki iyonik bağlar kalsiyum köprüleri tarafından oluşturulmaktadır (Şenel, 2018). Kazein misellerinin görünümü Şekil 2.5 de verilmiştir.



Şekil 2.4. Kazein miselleri ve alt miseli modeli (Şenel, 2011)

Kazeinler kolloid formunda olup, dispersiyondaki partiküllerin büyüklükleri 20-600 nm arasında değişkenlik göstermektedir. Kazein misellerinin yaklaşık %93'ü (kuru maddenin) kazein ve geriye kalan kısmı ise inorganik maddeden oluşmakta olup bu maddeler arasında kalsiyum, fosfat, magnezyum, sodyum ve sitrat bulunmaktadır. Bileşiminin de miktar açısından en çok bulunan kalsiyum ve fosfat olup koloidal kalsiyum fosfat formundadır.

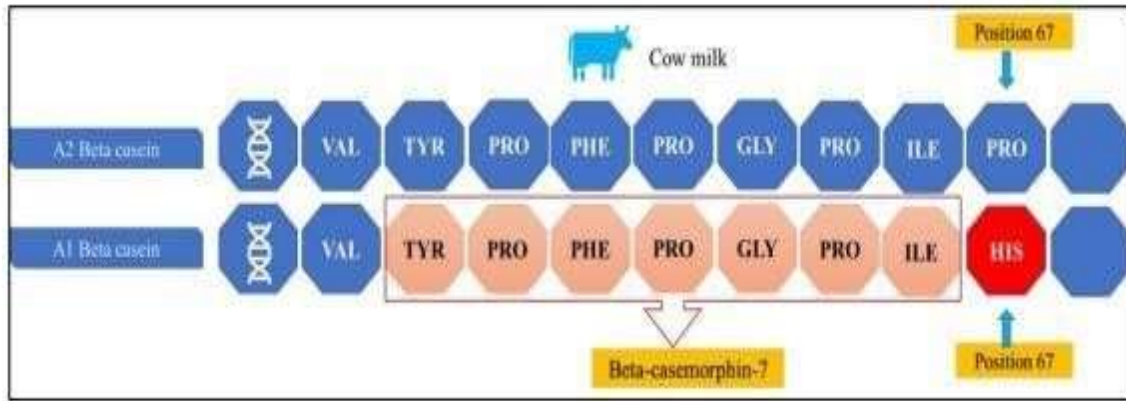
Kazein bu inorganik maddelerle kalsiyum kazeinat-fosfat veya kalsiyum- fosfokazeinat formunda kompleks oluşturmaktadır (Metin, 2005). Kazeinler, sütteki toplam proteinin %80'ini içeren fosfoproteinlerdir (Şeker ve ark., 2022).

#### 2.4.1. Beta Kazein

$\beta$ -CN hidrofobik kazein fraksiyonu olup yapısında disülfid bağı içermemektedir. Düzenli sekonder yapıların oluşumunu engelleyen ve protein zincirinin sert bükülmesine neden olan prolin aminoasidini yüksek oranda içermektedir (Monaci ve ark., 2006; Villa ve ark., 2018). Hayvanların genetik olarak çeşitlilik gösterdiğinden ötürü bu durum süt proteinlerindeki bileşimlerinin türler arasında değişimine neden olmaktadır (Raynes ve ark., 2015). Sütler yapısındaki protein içeriğine göre sınıflandırılmaktadır. Kazeinli sütlerde (inek, koyun, keçi ve manda sütü) 2/3 oranında kazein bulunmakta, diğer süt türü olan albüminli sütlerde (insan, kısrak, eşek sütü) ise süt serum proteinlerini bulunmaktadır (Dinç, 2009; Boro ve ark., 2016; Gün ve Soyuçok, 2018; Andiç ve ark., 2021).

$\beta$ -CN geni 6.kromozomda yer almakta ve 209 aminoasit dizilişinden meydana gelmektedir (Dinç, 2009; Bozkaya, 2009; Gün ve Soyuçok, 2018).  $\beta$ -CN'in 12 genetik varyantı olup,bunlar; A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I, ve G diye sıralanmaktadır (Kamiński ve ark., 2007). Sütte kazein proteininin A1 ve A2 olmak üzere iki varyantı bulunmaktadır (Haq ve ark., 2014; Andiç ve ark., 2021).  $\beta$  kazeinin A1 ve A2 varyantı arasındaki fark, ekzon 7'deki  $\beta$ -CN aminoasit peptid zincirinin 67.sıradaki yalnızca bir aminoasidin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. A1  $\beta$ -CN sütü,  $\beta$ -CN geninin 6. kromozomunun 7. eksonunda yer alan 67. sıradaki aminoasit histidinin içermektedir. A1  $\beta$ -CN sütün de ise histidin yerine prolin amino grup asit içermektedir (Dinç, 2009; Bozkaya, 2009; Gün ve Soyuçok, 2018). Kazeinin türleri arasındaki farklılıklar fiziksel özelliklerini ve enzimatik sindirimi etkilemiştir.

$\beta$ -CN'in A1 ve A2 varyantlarının farkı ve beta-kazomorfin-7'nin formülasyonu Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.5.  $\beta$ -CN'in A1 ve A2 varyantlarının farkı ve beta-kazomorfin-7'nin formülasyonu (Demirel ve Çak, 2018)

A1  $\beta$ -CN gastro-intestinal enzim türü olan pankreatik elastazdan salgılanan izolösin peptidaz enzimi ile 67. sıradaki histidin peptid bağı parçalanarak BKM-7'in karboksil ucu serbest kalır. Bundan dolayı BKM-7 olan, 7. aminoasitten bir biyoaktif peptid salgılanır (Chatterjee ve Patel, 2015). BKM-7 opioid etkisini sindirim sisteminin, mide ve bağırsak mukusunun yavaş salınımına etki ederek kazeinlerin yavaş emilmesi ve gıdanın sindirim sisteminden geçişinin daha uzun olmasına neden olmaktadır (Chatterjee ve Patel, 2015). BKM-7 morfin benzeri özellikler sahip olduğundan dolayı opioid etki gösterip dispepsi (hazımsızlık) neden olur (He ve ark., 2017). A2-kazeinin 67. pozisyonundaki prolin,



peptitler ve aminoasitlere parçalamadığından dolayı insan vücudunda BCM-7 oluşumunu engeller (He ve ark., 2017). A2  $\beta$ -CN; vücutta DPP4 (dipeptidil peptidaz 4) enzimlerinin düzenlenmesine neden olarak opioid olmayan bir etki gösterir (Chatterjee ve Patel, 2015). BKM-7; bağırsağın florasını değiştirmekte, lenfosit sayısının artmasıyla (T ve B lenfositleri) ile goblet hücrelerine benzer hücrelerin oluşumunda artan mRNA'ya bağlı olarak MUC5AC (mukus oluşturan gliko protein, mün 5AC) konsantrasyonu reseptör aktivasyonunu etkilediği rapor edilmiştir (Bell ve ark., 2006; Ho ve ark., 2014). Bu durumdan dolayı enterik sinir aktivasyonu yoluyla bağırsak mukus sistemini olumsuz etkileyip, gaita artırmakta ve besinlerin bağırsaktaki geçiş süresini uzamakta böylece sıvı emiliminde problemler meydana gelerek bağırsak iltihabına sebep olmaktadır (Şahin ve ark., 2018; Kumari ve ark., 2019).

$\beta$ -CN ile ilgili yapılan çalışmada A1  $\beta$ -CN sütünün Wistar sıçanlarında gastro intestinal geçiş süresinin artırdığı, A2  $\beta$ -CN içeren sütün, bağırsak mikroflorasındaki değişim ile gaitadaki kısa zincirli yağ asitlerinin oranını artırdığını ve bağırsaktaki villusları önemli derecede iyileştirdiği rapor edilmiştir (Guantario ve ark., 2020).

A2  $\beta$ -CN, 20-50 yaş aralığındaki erkek kadın bireylerde A1  $\beta$ -CN sütüne kıyasla tüketimden sonraki 1-12 saat içinde, şişkinlik, karın ağrısı, dışkı sıklığı ve dışkı kıvamı gibi gastro-intestinal semptomlara düşük olduğu ve hatta A2  $\beta$ -CN içeren sütün sebep olduğu gastro-intestinal rahatsızlıklar, hem laktozu sindirebilen ve hemde sindiremeyen bireylerde daha düşük bulunmuştur (He ve ark., 2017). Ticari olarak, sadece A2  $\beta$ -CN içeren süt bulmak zor olduğundan bu tür çalışmalar kısıtlıdır. Son yapılan çalışmalarda ise kardiyovasküler hastalık, tip 1 diyabet, otizm ve şizofreni semptomları, nörolojikotizm ve ani bebek ölümü gibi problemlerin  $\beta$ -CN tüketimi ile doğru bir orantının olduğu ve bu durumun A1 ve A2 kazeininden kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Bell ve ark., 2006; Miluchová ve ark., 2016). Ancak genel olarak A1 ve A2  $\beta$ -CN birçok hastalık faktörü olarak görülse de bazı çalışmalarda sadece A1  $\beta$ -CN kaynaklı olduğu, A2  $\beta$ -CN ise böyle bir etkisinin olmadığı kanaatine varılmıştır (Swinburn, 2004). Diğer taraftan BKM7'nin hayvanlarda diyabet ve oksidatif stres koruyucu, bağırsak mukozası deşarji, zararlı etkenlere karşı savunma gibi yararlı etkilerini belirten çalışmalar da mevcuttur (Gün ve Soyuçok, 2018).

Sütteki kazein protein varyantlarının hassas şekilde ayrılması ve belirlenmesi için birçok teknik mevcuttur. Sütteki kazein protein varyantlarının analizi için literatürde CE (Miralles ve ark., 2001), FPLC (Plank, 2008), HPLC (Gaspard ve Brodkorb, 2019) teknikleriyle yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur. Nano-LC analiz, farklı sabit fazları içeren dar iç çapa sahip kapiler kolonlarda (örneğin, 50-100 µm) gerçekleştirilir. Ters fazlı kolonlar, yüksek çözme güçlerinden dolayı protein ayırma veya proteomik analizlerde yaygın olarak kullanılan kolonlardır (Roberg-Larsen ve ark., 2021). Aminoasitle modifiye edilmiş kolonlar, protein ayırımı veya proteomik analiz için kullanılır (Dong ve ark., 2006). Grafen oksit ile işlevselleştirilmiş 50 ve 100 µm çapında bir monolit nano kolon ile proteinlerin başarılı bir şekilde nano-LC'de ayırımı yapılmıştır (Aydoğan ve ark., 2021). Yapılan diğer bir çalışmada, sütteki kazein protein varyantlarının ayrılması için 20 µm iç çaplı açık tübüler (OT) kolon kullanılmıştır. OT nano-LC için grafen oksit sabit fazına aşılınmış yeni bir poli-L-lizin (PLL) geliştirilmiştir. Bu preparasyonda metakrilolil grafen oksit nanopartikülleri (MGONP'ler) sentezlenip reaktif monomer olarak kullanılmıştır. OT kolonu,  $\alpha$ s1-CN,  $\alpha$ s2-CN,  $\beta$ -CN protein varyantlarının ayrılması incelenmiştir. Sonuçlar, kolonun hem hidrofobik etkileşimler hem de elektrostatik etkileşimler nedeniyle kazein protein varyantlarının etkin bir şekilde ayrılmasını sağladığı görülmüştür (Şeker ve ark., 2022).

#### **2.4.2. Alerjen Etki**

Ters besin reaksiyonu herhangi bir besinin vücuda alınmasından sonra besine karşı gelişen anormal yanıtı denir (Burks ve ark., 2011). Reaksiyonlar fizyolojik durumlar üzerinden oluşuyorsa 'besin intoleransı' immünolojik durumların neden olduğu durumlardan üzerinden oluşuyorsa 'besin alerjisi' olarak adlandırılır (Koca ve Akçam, 2015). Çocukluk çağında en sık karşılaşılan besin alerjileri inek sütü ve yumurta alerjileridir (Zeyrek ve ark., 2014). İnek sütü protein alerjisi (İSPA), inek sütünün yapısındaki proteinlere organizmanın immün sisteminin verdiği tepkiye denir (Koca ve Akçam, 2015). İnek sütünde 25' den fazla protein bulunmakta fakat bunların sadece birkaçı alerjen etkiye sahiptir (Hochwallner ve ark., 2014). En sık alerjiye yol açan proteinler kazein,  $\beta$ laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumindir (Fiocchi ve ark., 2010). Besin alerjisinin görülme prevalansı yaş, genetik çevresel faktörler, beslenme alışkanlıklargibi birçok faktörden etkilenmektedir (Sicherer ve Sampson, 2014). Besin alerjisi prevalans çalışmalarında

doktor tanısı ve provokasyon testleri ön görüldüğü zor çalışmalardır. Bu nedenle çalışmalarda elde edilen verilerin çoğunluğu hastaların öyküsüne ve laboratuvar testlerine dayandığı için saptanan değerler net bir sonuç vermemektedir (Longo ve ark., 2013).

Dünya genelinde yapılan çalışmalarda inek sütü alerjisinin %2 ile %4 arasında değiştiği saptanmıştır (Høst ve ark., 2002; Hahn, 2005; Matricardi ve ark., 2008). T ürkiye’de yapılan çalışmalar ise inek sütü alerjisi %0,16 ile %5,7 arasında değiştiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Küçükosmanoglu ve ark., 2008; Orhan ve ark., 2009; Zeyrek ve ark., 2014).

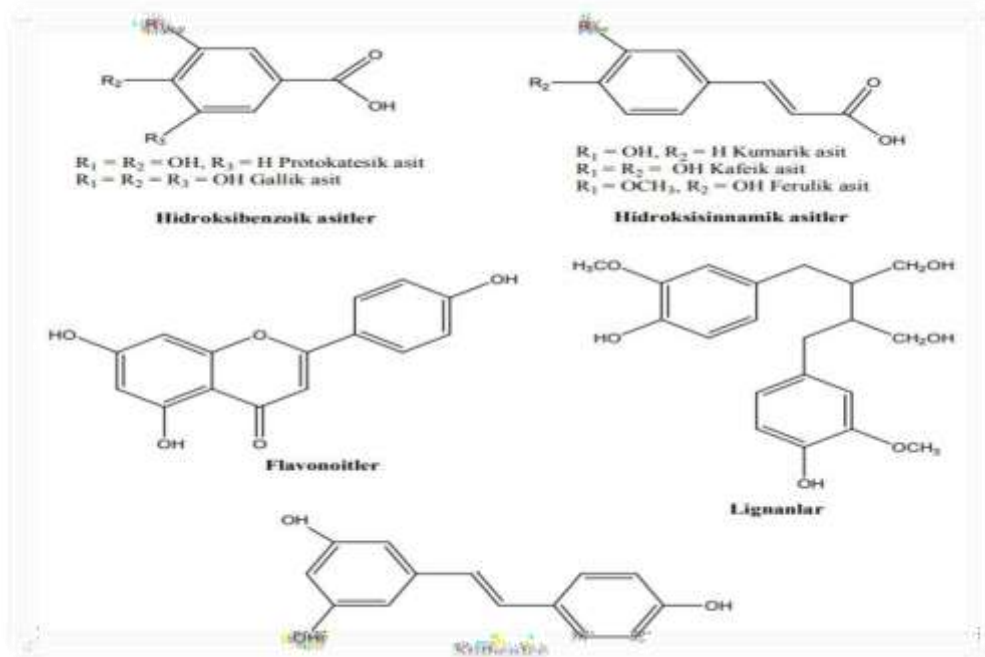
Polifenol gıda alerjisinin önlenmesi ve tedavisinde, immün yanıtı modüle edilmesini ve bağırsağın mikrobiyotasını değiştirme gibi özellikleri olan faydalı diyet bileşenleridir. Hipoalerjenik gıda üretimine yardımcı olmak için yapılan çalışmada epigallo-kateşin 3gallat (EGCG) ve klorojenik asit (CA) ile kovalent konjugasyon yoluyla sığır  $\beta$ -laktoglobulinin ( $\beta$ LG) alerjenitesini azaltması ve fonksiyonel özelliklerinin iyileştirmesi araştırıldı.  $\beta$ LG'deki polifenoller ve aminoasitin yan zincirleri arasındaki kovalent bağ, MALDI-TOF-MS ve SDS-PAGE ile analiz edildi.  $\beta$ LG ve  $\beta$ LG-EGCG,  $\beta$ LG-CA'ya göre daha düşük bir IgE bağlama kapasitesinde bir azalma olduğu  $\beta$ LG'deki polifenol bağlanma bölgesinin, IgE'nin bağlandığı bölgeyi doğrudan maskelediği ve EGCG ve CA ile konjugasyondan sonra IgE bağlanma bölgesinin konformasyonunu etkileyen  $\beta$ LG'deki ikincil yapısal değişiklikler nedeniyle IgE'nin proteine uygun şekilde erişmesini önlediği öne sürüldü. Bu gözlemlere dayanarak, polifenollerle kovalent etkileşim yoluyla hipoalerjenik gıdalar üretilebilir (Wu ve ark., 2018).

## **2.5. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması**

Bitkiler, sekonder metabolitler olarak adlandırılan farklı yapılarıdaki organik molekülleri sentezlemesinde rol oynar. Sekonder metabolitlerin sentezi fotosentez ile başlar. Sekonder metabolitler genel olarak biyosentez mekanizmalarına göre sınıflandırılır. Bunlar; terpen steroit ve alkaloidler olmak üzere üç başlık altında incelenmektedirler (Bourgaud ve ark., 2001; Bougma ve ark., 2022). Fenolik bileşikler aromatik bir halkaya bir veya birden fazla hidroksil gruplarının direkt bağlanmasıyla oluşan moleküllere denir (Vermerris, 2006). Gıdalarda 8000’den fazla fenolik bileşik vardır (Guo ve ark., 2009). Fenolik bileşikler pek

çok gıdada (bal, polen) bitkisel ürünlerde doğal olarak bulunan ve bu gıdaların renk, tat, koku gibi çeşitli karakteristik özelliklerinden sorumlu olan fitokimyasallardır (Tang ve ark., 2016).

Fenolik bileşikler temelde flavanoid ve flavanoid olmayanlar olmak üzere 2 sınıfa ayrılır. Flavanoid olmayanlar; fenolik asitler (C6-C1; kafeik asit, gallik asit vb.), stilbenler (C6C2-C6; resveratrol, piceid vb.) ve lignanlar (C6-C3-C3-C6) olarak ayrılmaktadırlar (Özdemirli ve Kamiloğlu Beştepe, 2022). Flavanoidler ise flavanoller (kateşin, proantosiyandinler vb.), flavonoller (kuersetin, mirisetin vb.) ve antosiyandinleri (siyanidin, malvinidin vb.) içeren alt gruplara ayrılmaktadır (Shahidi ve Yeo, 2016). Fenolik asitler, karboksilik asit grubu içeren fenol grubudur. Fenolik asitler; hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asit türevleri olmak üzere iki farklı yapıya sahiptir. Temel iskelet yapısı aynı olup yapısındaki hidroksil gruplarının sayısı ve aromatik halkadaki pozisyonu fenolik asitlerinin türleri arasındaki çeşitliliği sağlamaktadır (Shahidi ve Yeo, 2016). Hidroksibenzoik asit gibi türleri; protokateşik asit, gallik asit, phidroksibenzoik asit olup; hidroksisinnamik asit türleri ise kafeik asit, kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit olarak gruplandırılır (Shahidi ve Yeo, 2016). Fenolik bileşiklerin iskelet yapıları Şekil 2.7 de verilmiştir.



Şekil 2.6. Fenolik bileşiklerin iskelet yapısı (Shahidi ve Yeo, 2016)

Fenolik bileşikler bitkiler için karakteristik özellikte olup, genellikle serbest olmayıp ester veya glikozit formunda bulunur (Vermerris ve Nicholson, 2008). Bitkilerin yapısında yer alan fenolik asitlerin birçoğu ester, eter veya asetal bağlar ile bitkinin yapısında bulunan bileşiklere bağlı halde bulunurken yalnızca az miktarı serbest asit halinde bulunmaktadır. Bu durum fenolik asit analizlerini daha karmaşık hale getirir (Robbins, 2003). Meyve, sebze ve tahıllarda tohum, yaprak, kök ve gövde kısımlarında hidrosibenzoik ve hidrosisinnamik asit türevleri bulunur. Bitkinin yetiştirme koşulları birçok faktörden etkilenmiş olup fenolik asit içeriği üzerinde etkisi olmuştur. Bu durum fenolik asitlerin bitkilerde homojen olarak dağılmasına neden olmuştur (Robbins, 2003).

Beslenme türüne göre günlük fenolik asit alımı 25 mg -1 g aralığında değişmektedir (Dai ve Mumper, 2010; Myhrstad ve Wolk, 2023). Fenolik bileşikler antialerjik, antiinflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antitrombotik gibi birçok olumlu etkisi olup kardiyovasküler hastalıklar, kanser, osteoporoz, diyabetes mellitus ve nörodejeneratif gibi hastalıklarda koruyucu rol oynamaktadır (Scalbert ve ark., 2005). Proteinlerin fenolik bileşenlerle etkileşimleri biyoyararlılık çalışmaları kapsamında incelenmektedir (Bandyopadhyay ve ark., 2012; Shahidi ve ark., 2023).

## **2.6. Protein-Fenolik Kompleks Yapıları**

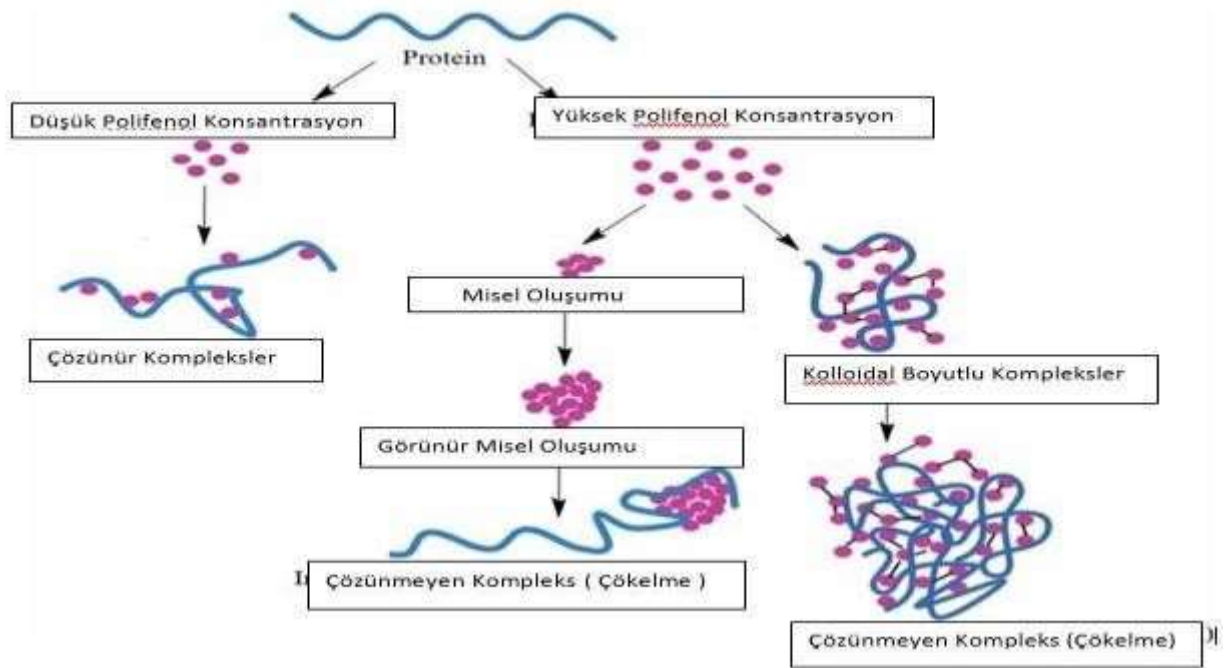
İnsan vücudunda birçok biyolojik aktiviteye sahip olan fenolik bileşiklerden yüksek düzeyde faydalanabilmek için diğer moleküllerle etkileşimlerinin bilinmesi önem taşımaktadır. Fenolik bileşikler sahip oldukları aromatik halka ve hidroksil gruplarından dolayı hidrofobik ve hidrofilik etkileşim göstererek, hidrojen ve kovalent bağlarla hücre duvarına ve ortamdaki protein, karbonhidrat, lipit gibi yapılarına bağlanabilme yeteneğine sahiptirler. Fenolik bileşiklerle makromolekül kompleksleri arasındaki kovalent olmayan etkileşimler hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerden kaynaklanıp kovalent etkileşimlerin temelinde enzimatik oksidasyon mekanizması yer almaktadır. Fenolik bileşikler yüksek protein ilgisine sahip olduğundan dolayı protein moleküllerinin iç bölgesine sızabilecek kadar küçük, peptit zinciri ile fazla bağ yapacak kadar da büyük yapılardır. Fenolik bileşikler ve proteinler arasındaki etkileşimin temelinde farklı mekanizmalar etkili olup bunlar ise hidrojen bağlama,  $\pi$ -bağlama, hidrofobik, iyonik ve

kovalent bağlanmadır (Hasni ve ark., 2011; Mulaudzi ve ark., 2012). Polifenollerin besleyici etki özelliği proteinleri çöktürmesi ve bağlaması esasına dayanmaktadır.

Protein ve polifenoller arasındaki etkileşim 3 kısımda incelenmektedir.

- I. Polifenol molekülleri, proteinlere eklendikten sonra proteinlerin peptitleriyle bağ kurması
- II. Polifenol miktarının yetersizliğinde ise iki peptit molekülü polifenol kaplı dimerler oluşturup ve çökme meydana getirebilmesi
- III. Polifenoller ile proteinlerin reaksiyonun, daha büyük kompleksler oluşturması

Protein-Fenolik Kompleksinde etkileşim proteinlerin hidrofobik bölgeler sayesinde fenolik bileşiklerle kompleks oluşturmaktadır olup bu etkileşiminin temelinde fenoliklerin aromatik halkası (-OH grupları) ile proteinlerin hidrofobik bölgeleri (-COOH grupları) arasındaki kovalent olmayan etkileşimlere dayanır (Diniz ve ark., 2008; Le Bourvellec ve Renard, 2012).



Şekil 2.7. Protein ve Fenolik Etkileşimi (Charlton ve ark., 2002)

Protein-fenolik kompleksini birden çok faktör etkiler. Bu faktörlerin başında sıcaklık, pH, protein tipi ve konsantrasyonu, fenolik bileşiklerin yapısı ve konsantrasyonu, tuz konsantrasyonu ve bazı ajanların eklenmesi sıralanabilir (Oliveira ve ark., 2015). Proteinlerle fenolik bileşiklerin kompleksinde izikokimyasal özellik olarak sıralayabileceğimiz çözünebilirlik, ısıl stabilite ve sindirilebilirlik gibi değişimler meydana gelmektedir. Proteinlerin besleyici özellikleri proteaz inhibisyonundan ve aminoasitlerin modifikasyonundan kaynaklı farklılık göstermektedir. Protein yapısının yanında gıdanın fenolik yapısı, serbest polifenol içeriği, antioksidan kapasitesi ve gıdadaki fenolik bileşenlerin biyoyararlılığı da değişebildiği gözlemlenmiştir (Thongkaew ve ark., 2014).

Protein-fenolik arasında oluşacak kompleks yapının sağlıklı olan ilişkisinden söz edecek olursak protein sindirilebilirliği yapının türüne bağlı olarak artmakta veya azalmaktadır. Fenolikler proteinlerin yapısını, kalitesini, duyuşal özelliklerini ve fonksiyonelliğini değiştirmektedir. Kompleks yapıdaki proteinler besinsel kayıpları, esansiyel aminoasitlerin yıkımı proteolitik ve glikolitik enzimlerin inhibisyonu ile ilişkilendirilmektedir. Bu durum özellikle proteince zengin olmayan diyetlerde büyük problemlere yol açabilmektedir.

Protein ve fenolikler arasındaki etkileşiminin ölçülmesinde kullanılan yöntemler arasında Matris Destekli Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektroskopisi, Kütle Spektroskopisi, Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR), Florasan spektroskopisi, FT-IR spektroskopisi (Fourier transform kızılotesi), Mikrokaleorimetri, Enzim İnhibisyonu, Protein Çöktürme, Kapiler Elektroferez, Bulanıklılık ve Nefelometre şeklinde sıralanmaktadır (Freitas ve ark., 2003).

Zhang ve ark., farklı protein ve fenolik türleri olan  $\alpha$ -laktalbumin ve  $\beta$ -laktalbumin ile klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit ve kumarik asidin interaksiyona etkisini incelemek amacıyla araştırma yapılmıştır. Yapılan çalışmada bağlanma modu, bağlanma sabitleri ve peyniraltı suyu proteinlerinin yapısı üzerine kompleks oluşturmanın etkilerini incelemek amacıyla Floresans, CD ve FTIR spektroskopilerini kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda peynir proteinlerinin yapısının değiştiğini ve  $\alpha$ -heliks miktarının azaldığı,  $\beta$ -diziminde artışın olduğu rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2013).

Gallo ve ark. yaptıkları çalışmada süt proteinleri ile kakao polifenollerinin birbirine etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmada whey proteinleri ve kazein formlarının kakao polifenollerine baēlandığı görülmüştür. Kateşin, epikateşin,  $\beta$ -laktoglobulinin interaksiyon yapısı ve baēlı olduēu bölgedeki aminoasit kalıntılarının olduēu gözlemlenmiştir (Gallo ve ark., 2013). Yukarıda belirtilen bu sonuçlar, protein-fenolik etkileşimlerin, elde edilen ürünlerin kalite özelliklerini nasıl etkilediēini göstermektedir. Bu tür etkilerin biyoaktif ve fonksiyonel özelliklere sahip yüksek kaliteli gıdaları elde etmek için uyarlanabilir.

Yapılan bir başka çalışmada proteince zengin gıdaların, fenolik bileşiklerin biyoyararlılığı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi in vitro ortamında araştırılmıştır. Süt ve yumurta ürünleri zm ekstraktı ile zenginleştirilmiştir. Endüstriyel ortamda tatlı, milkshake, omlet ve pankeke işlenen ürünlerin aēız, mide ve baēırsak kanalındaki deēiřimi izlenmiştir. Gıdalarda özellikle antosiyaninlerin baēırsak fazına bozulmadan ulaşmış olup antioksidan aktivite baēırsak kanalında azaltmıştır. Omlet sindirim sonrasında diēer ürünlere kıyasla daha yüksek oranda fenolik ieriēi ve antioksidan aktivite deēerleri elde edilmiştir (Li ve ark., 2021).

Bu çalışmada yeni bir hidrofobik karakterli monolitik nano-kolon hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Geliştirilen monolit kullanılarak  $\beta$ -CN için yeni bir tayin metodu geliştirilmiştir ve  $\beta$ -CN'nin bazı fenolik bileşenlerle etkileşimi incelenmiş makromoleküler yapı oluşturması sureti ile allerjen etkinliēinin düşürülmesi amaçlanmıştır.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Alet ve Ekipmanlar

Kromotografik analizleri için Proflow nano-LC (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series- NCS, 3500 RS) sistemi kullanıldı. Dedektör (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series- VWD-3400 RS), otosampler (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series- WPS-3400 RS), pompa (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series- NCP-3200 RS) ekipmanlardan oluşmaktadır. Analizde kullanılan diğer ekipmanlar ise ultra saf su cihazı (Direct-QR-3) millipore corporation (Billerica, MA, ABD), 100 µm ID ve 363 µm OD'ye sahip TSP050375 fused kapiler kolon (Lot: BUHT02A, BGB Analitik) yüksek saflıkta arıtılmış su için LC-pak® (No: LCPAK000) ,Taramalı elektron mikroskobu (SEM Zeiss, Evo-50), karıştırıcı (vorteks) (WN-2800), hassas terazi (HR250AZ (252 g/ 0.1 mg), su banyosu (WF-SB11), ultrasonik su banyosu (WUC-DO6H Wisd, Daihan Scientific (Korea), santrifüj HERMLE (Z327 K), 15 mL falkon santrifüj tüp (Lot:18229) Biomedical,China), pH metre (Thermo Orion Star A 111), şırınga filtre (0,20 µm) (Lot:02821008), corning NY 14831 (Almanya), otomatik pipet, eppendorf, cam deney tüpü (14 ml) ,santrifüj tüpü, kesici, septum ve GC septa kullanıldı.

#### 3.2. Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Asetonitril (ACN% 99 LC-MS Grade), 1-dodecanol (Lauryl alkol), metanol (MeOH) (%99 LC-MS Grade), benzoik asit, 4-hidroksi benzoik asit, P-toluen benzoik asit, 4-kloro benzoik asit, 2-5 dihidroksi benzoik asit, 3-5 dihidroksi benzoik asit, askorbik asit, AIBN (2,2'-Azobisisobutyronitrile) ve alkilbenzenler (etilenbenzen, propilbenzen, bütılbenzen, pentılbenzen) Merck'den (Darmstadt, Almanya), sodyum hidroksit (NaOH) Biontech Co. Ltd.'den β-CN (>%98 Lfcot: C6905) toluen (>%98) divinil benzen (DVB), 3-trimetoksilil propil metakrilat (TMSPM, %98), poli(etilenglikol) (PEG Lot:BCCD8009) Sigma Aldrich'den, Aseton(Lot: 17F154029) VWR Chemicals'dan 100 µm ID ve 363 µm OD'ye sahip TSP050375 fused kapiler kolon (Lot: BUHT02A ), BGB Analitik'den satın alındı. 9-Antrasenmetil metakrilat (ANM) monomer laboratuvarında sentezlendi.

### 3.3. Deneysel Yöntem

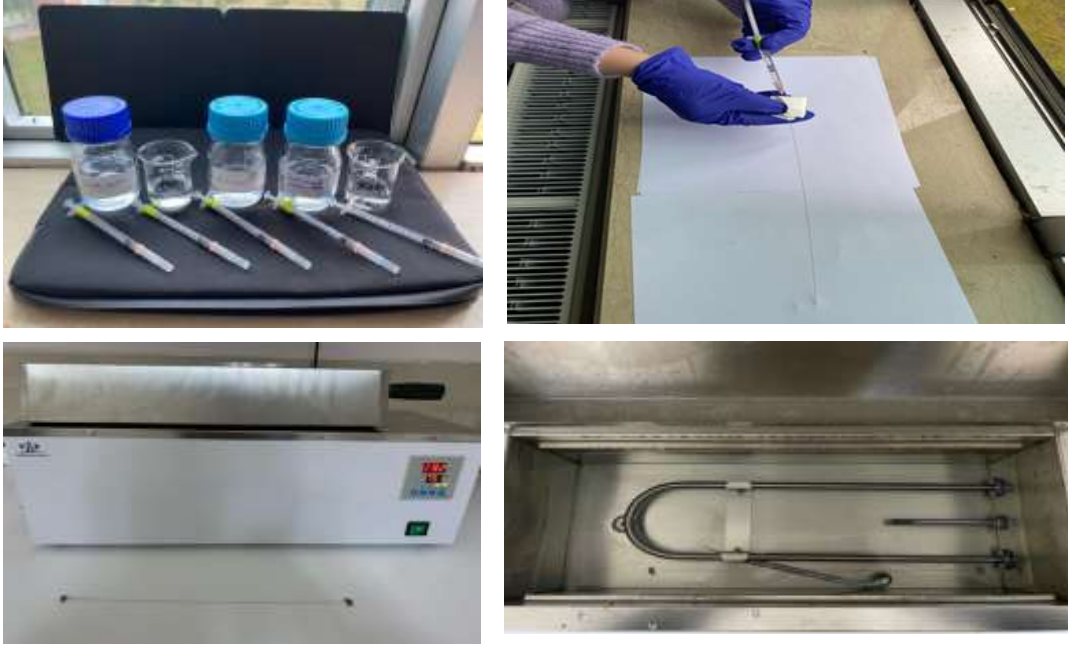
#### 3.3.1. Monomer Sentezi

ANM sentezi literatüre göre yapılmıştır (Zhang ve ark., 2014 ). Sentez 50 mL lik balon joje içerisinde 9-antrasenol kuru  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (Diklorometan ) içerisinde çözdürüldü ve 1,5 mL trietilamin ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) eklendi. Reaksiyon  $0^\circ\text{C}$ 'de 24 saat buz banyosunda gerçekleştirildi. 10 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  içerisindeki metakriloil klorür, 30 dakika boyunca damla damla huniye eklendi. Reaksiyon karışımı gece boyunca karıştırılarak oda sıcaklığına getirildi. Reaksiyonun tamamlanıp tamamlanmadığı TLC ile kontrol edildi. Reaksiyon karışımı 30 mL sulu sodyum bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), su ve tuzlu su ile yıkandı. Sodyum sülfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ortamında kurutuldu, filtrelendi ve solvent vakumla buharlaştırıldı.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /hekzan (%25) kolon kromatografisi tekniği ile tekrar saflaştırıldı ve ANM elde edildi.

#### 3.3.2. Kolon Silanizasyonu

Silanizasyon işlemi kapiler kolonun polimerizasyon aşamasından önce bir ön hazırlama işlemi olup kolonun iç duvarındaki hidrolize olmuş silanol gruplarının yoğunlaştırılması sağlayan yöntemdir. Kapiler kolonun iç yüzeyindeki siloksan grupları, polimerizasyon için bağlayıcı görevi gören silanol gruplarının yoğunluğunu artırmak için vinizilasyon nedeniyle ön işlem yapılır. Silanizasyon işleminde yüksek basınca dayanıklı ve stabil kolon hazırlayıp polimerin iç kısmına kovalent bağlanmasını sağlamaktır (Aydoğan ve ark., 2013). Silanizasyon işlemi literatürdeki çalışma baz alınarak yapılmıştır (Aydoğan, 2016). Silanlama yapılmak üzere ilk öncelikle 100 cm uzunluğunda fused kapiler kolon kesici kullanılarak kesildi. Silanlama işleminden önce 0,5 M NaOH ve TMSPM, MeOH ile %50-50 oranında karıştırılarak hazırlandı. Silanizasyon işlemi için 1 mL'lik şırınga kullanıldı. Her aşama için farklı şırıngalar kullanıldı. Silanlama için öncelikle boş kapiler kolon 15 dk boyunca 0,5 M NaOH ardından 15 dk süreyle deiyonize su kullanılarak yıkandı. Sonraki adımda ise sırasıyla kolondan 15 dk MeOH ve %50-50 oranında hazırlanan TMSPM/MeOH karışımı kolondan geçirilip kolonun her iki ucu septum ile kapatılarak önceden ayarlanmış  $35^\circ\text{C}$  su banyosunda 18-20 saat bekletildi. Ayarlanan süre sonunda su banyosundan çıkarılan kolon 15 dk boyunca metanol ile yıkandı. Bu aşamadaki amaç kapilerin iç duvara bağlanamamış yapıların kolondan arındırılmasıdır. Kolonu

kurutmak için 15 dk aseton ile yıkandı. İşlem sonunda kolonlar tamamen kurutulması için 55 °C 24 saat etüve bırakıldı.



Şekil 3.1. Kolon Silanizasyonu işlem basamakları

### 3.3.3. Monolitik Kolon Sentezi

Monolitik kolon hazırlamak için, ilk olarak önceden silanlanmış 100 µm iç çaplı 20 cm uzunluğunda kapiler kolon kesildi. Bu tezde β-CN analizi için ters faz monolit kolonlar hazırlanarak kullanıldı. Polimer solüsyonunu hazırlanmak için %41,86 (v/v) DVB, %11,63 (v/v) siklohegzanol, %46,51 (v/v) 1-dodekanol, 15 mg ANM, 2,4 mg AIBN epandorf içerisinde hazırlandı. Homojen karışım elde etmek için 5 dk boyunca ultrasonik su banyosunda homojenize edildi ve son olarak vortekste karıştırıldıktan sonra hazır hale getirildi. Polimerizasyon karışımı 0,5 mL'lik şırınga yardımıyla silanlanmış iç çapı 100 µm'lik kolona enjekte edildi. Kolonun her iki ucuna septum kapatılarak polimerizasyon için 75°C'de önceden ısıtılmış su banyosunda 4 saat bekletildi. Polimerizasyondan sonra kolon, reaksiyona girmemiş polimerleri uzaklaştırmak amacıyla 1,2µl akış hızında 1 saat boyunca. Mobil faz A, 85:15 (ACN/H<sub>2</sub>O) Mobil faz B, 50:50 (ACN /H<sub>2</sub>O) yıkaması gerçekleştirildi (Şekil 3.2). Kolonun hidrodinamik özelliğine bakıldı.



Şekil 3.2. 100 µm iç çaplı 20 cm ANM monolitik kolon sentez aşamaları

### 3.3.4. Numune Hazırlama

Alkilbenzen çözeltisi hazırlamak için 8 mL ACN içerisine etilenbenzen, propilbenzen toluen, bütilbenzen, pentilbenzen eklenip vortekste karıştırıldı. Karışıma 1 mg urasil eklenerek vortekslendikten sonra 2 ml ultra saf su eklenerek ultrasonik su banyosunda 5 dk bekletildi.

$\beta$ -CN çözeltisi hazırlamak için 10 mL %50 ACN/H<sub>2</sub>O karışımının içerisine farklı miktarda  $\beta$ -CN çözündürülerek stok çözeltisi hazırlandı. Fenolik asitler (4-hidroksi benzoik asit, P-toluen benzoik asit, benzoik asit, 4-kloro benzoik asit, 2-5 dihidroksi benzoik asit, 3-5 dihidroksi benzoik asit) yoğunluğu 0,05-0,2 mg/mL olarak hazırlandı.

$\beta$ -CN fenolik bileşiklerle etkileşimi için 20 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH:7) hazırlandı. %50 ACN ile karıştırılıp içerisine 2 mg  $\beta$ -CN eklendi daha sonra üzerine 0,5 mg sodyum dodesil sülfat (SDS) eklendi ve hazırlanan çözelti tüm fenolik bileşiklerle etkileşime konuldu. Tüm fenolik bileşiklerdens 500  $\mu$ l ultra saf suda çözündürüldü. Hazırlanan tüm numuneler analize kadar +4°C muhafaza edildi.



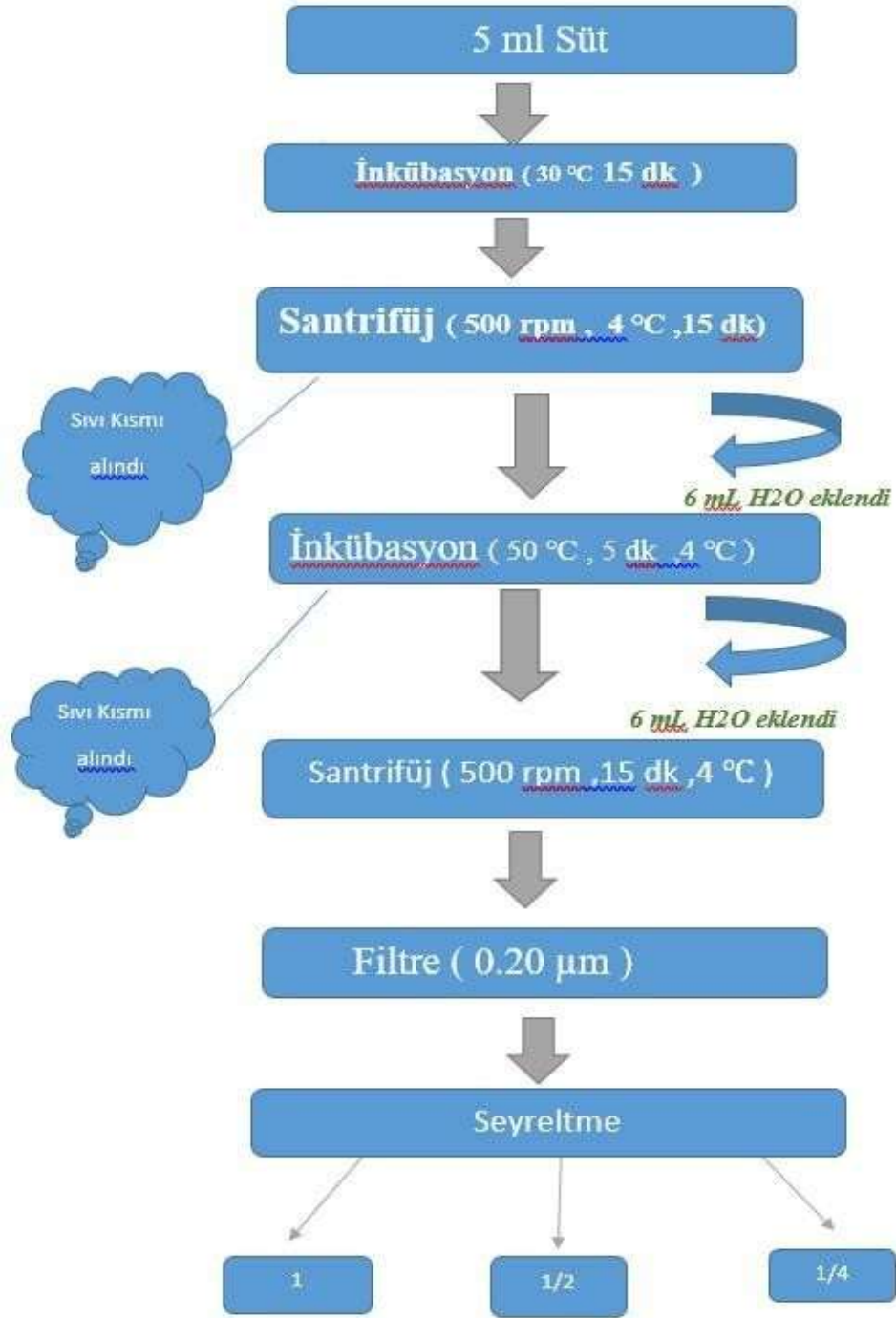


Şekil 3.3. Numune Hazırlama işlemine ait resimler

### 3.3.5. Sütün Ekstraksiyonu

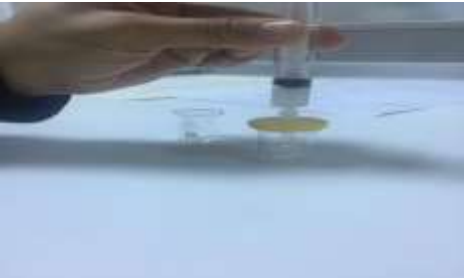
Süt numunesi, iki farklı markaya ait ticari olarak satılan Bingöl'de bulunan yerel marketlerden temin edildi. Çalışmamızda  $\beta$ -CN ultrasantrüfuj ile izolasyonuna literatürde yapılan çalışmaların değerlendirilmesi sonucu uygun koşullar oluşturuldu.  $\beta$ -CN izolasyonu için süt numuneleri toplandı. Numuneler 5 mL'lik 2 ayrı falcon tüpüne bölündü. Birinci aşamada 5 mL falcon tüpüne konulan iki farklı süt örneği 30°C 15 dakika boyunca su banyosunda bekletildi. Belirtilen süre sonunda bekletilen süt numuneleri 5000 rpm de 15 dk 4 °C'de ultrasantrüfuj edildi.

Düşük yoğunluklu süt yağı en üstte ortada ise süpernetant olarak adlandırılan sıvı kısım ve en altta yüksek yoğunluklu süt proteinler vb. bileşenler faz ayırımına uğradı. Bu aşamada sıvı kısmı uzaklaştırıldı ve örneğin üzerine 6 mL ultra saf su eklendi. Sonraki adımda ise 30°C 5 dk boyunca su banyosunda bekletildi. Süre sonunda falcon tüpünde oluşan süpernetant kısım uzaklaştırılıp 6 mL saf su eklendi ve süt numunesi tekrar 500 rpm de 15 dakika 4°C santrifüjlendi. Falcon tüplerindeki süpernetan şırınga yardımıyla 0,20  $\mu$ m gözenek çapına sahip filtreden süzüldü. Filtreden süzülen örnek 1:1, 1:2, 1:4 oranında seyreltildi. Tüm örneklerin spiklerı 20 mg/L ve 100 mg/L için yapıldı. Son adımda elde edilen analiz edilmek üzere 4°C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.4. Sütten  $\beta$ -kazein ekstraksiyon aşamaları





Şekil 3.5. Süt ekstraksiyon işlemine ait resimler

### 3.3.6. Kromatografik Koşullar

Kromatografik çalışmalar, Nano-LC NCS-3500 RS ProFlow-(Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 series) sisteminde yapıldı. Analiz edilecek bileşikler için  $\beta$ -CN standart çözelti konsantrasyonları 0.2- 100 mg/L aralığında hazırlandı. Analizde hidrofobik yapıya sahip ANM monoliti kullanıldı. Hareketli faz olarak (Hareketli Faz A : 85:15 (ACN/H<sub>2</sub>O) Hareketli Faz B: 50:50(ACN/H<sub>2</sub>O ) kullanıldı. Alkilbenzen ayırımında injeksiyon hacmi 0,01,Hareketli Faz: 80:20 (ACN/H<sub>2</sub>O ) olarak ayarlandı. Dedektörün dalga boyu 200-254 nm aralığında ayarlandı.

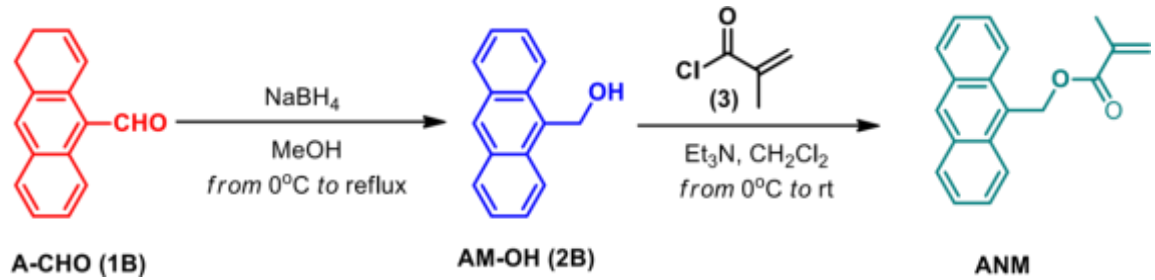
Tablo 3.1. Kromotogram analizi için flow gradient uygulaması

Zaman (dk )	Akış (L / dk )	% B	Curve	İnjesiyon Hacmi (µL)
0,000	0,300	20,0	5	0,3
9,900	0,300	40,0	5	0,3
10,000	0,500	45,0	5	0,3
19,900	0,500	50,0	5	0,3
20,000	0,300	20,0	5	0,3
30,000	0,300	20,0	5	0,3

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. 9-Antrasenmetil Metakrilat (ANM) Karakterizasyonu

ANM aşağıda verilen kimyasal tepkime sonrasında %82 verimle elde edilmiştir.



§

Şekil 4.1. ANM(9-Antrasenmetil Metakrilat ) elde edilmesi

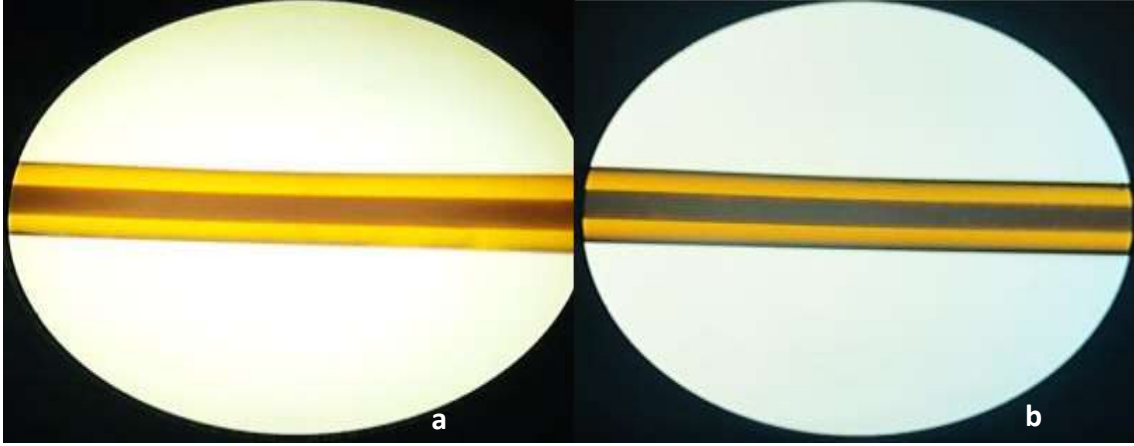
9-antrasen aldehyd kullanılarak antrasen-9-ylmethanol (2B, AM-OH) sarı katı maddesolarak elde edildi. Proton NMR sonuçları verildiği şekildedir. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.41-8.49 (m, 3H, =CH), 8.02-8.06 (m, 3H, =CH), 7.49-7.59 (m, 4H, =CH), 5.69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>). ANM için <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) ve APT <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) spektrumları verilmiştir. Karakterizasyon pikleri aşağıdaki şekildedir. Antrasen-9-ylmethyl methacrylate (82%) sarı katı madde olarak elde edildi. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.50 (s, =CH, 1H), 8.40 (d, J = 8.5 Hz, =CH, 2H), 8.03 (d, J = 8.5 Hz, =CH, 2H), 7.56-7.60 (m, 2H, =CH), 7.48-7.52 (m, 2H, =CH), 6.23 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 6.07 (s, 1H, C=CH), 5.52 (s, 1H, C=CH), 1.93 (m, 3H, CH<sub>3</sub>); APT <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 18.61 (CH<sub>3</sub>), 59.38 (CH<sub>2</sub>), 124.27 (CH), 125.33 (=CH<sub>2</sub>), 126.29, 126.61, 126.83, 129.32, 129.37, 131.33, 131.60, 136.65, 167.85.

### 4.2. Monolitik Kolon Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında süt numunelerinde bulunan alerjen proteini olan β-CN nano-LC'de kromotografik analizi için ANM bazlı hidrofobik monolitik nano-kolon

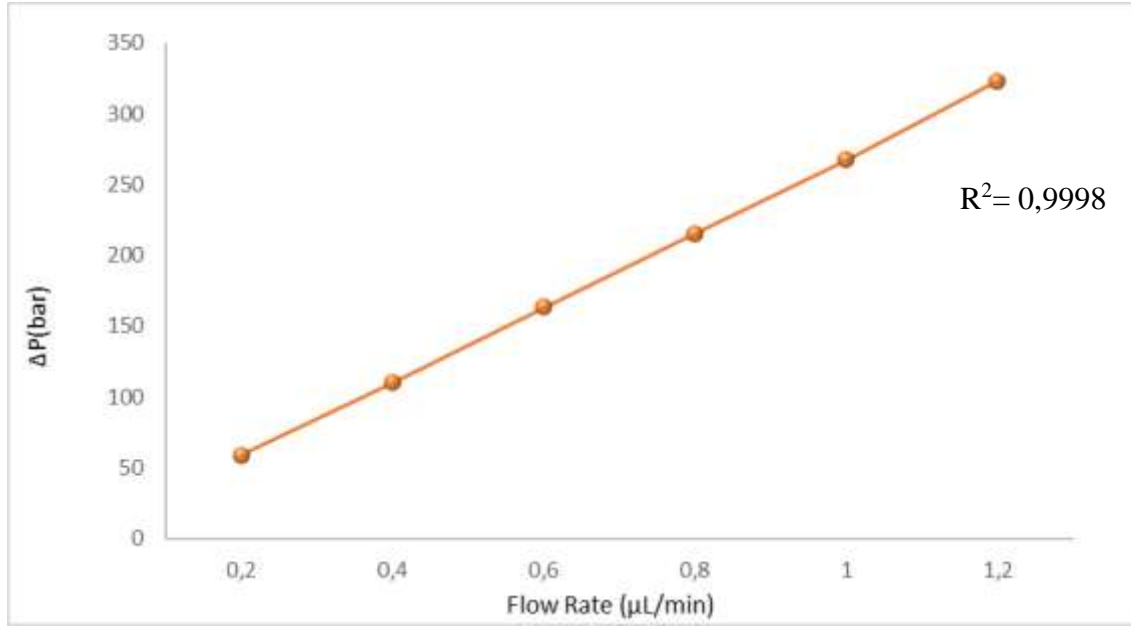
sentezlenmiştir. Hazırlanan kolon literatürde yer alan polimer monolit kolon hazırlama esasına göre oluşturulmuş ve optimize edilmiştir.

Nano-LC sisteminde monolitik kolon türlerinin yüksek verimli ayırmanın gerçekleştirilmesi önemlidir (Aydoğan, 2019b). Yeni bir monolitin hazırlanmasında monomer içeriği, çapraz bağlayıcı içeriği ve parojenik içeriğin seçimi gibi temel değişkenlerin optimizasyonu gerekmektedir. Söz konusu bu parametreler monolitik kolonların fiziksel ve kimyasal bileşimi ile ilgilidir. Bu tezde 100 µm iç çaplı, 20 cm uzunluğunda ANM monolit oluşturmak için farklı oranlarda monomer ve parojen içeren polimer karışımı hazırlanmıştır. Parojen sistemi olarak Sikloheksanol (%11,63 (v:v), 1-Dodekanol (%46,51(v:v) kullanılmıştır. ANM bu parojen sisteminde homojen bir şekilde çözülmüş ve daha önce silalanmış boş kolonun içine doldurulmuş 75°C’de 4 saat polimerleşmenin gerçekleşmesi için su banyosunda bekletilmiştir. Hazırlanan ANM monoliti akıştan önce ve akıştan sonra optik mikroskop görüntüleri alındı ve görüntülerde polimerleşmenin iyi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. ANM monoliti akıştan önce (a) ve akıştan sonra (b) mikroskop görüntüleri

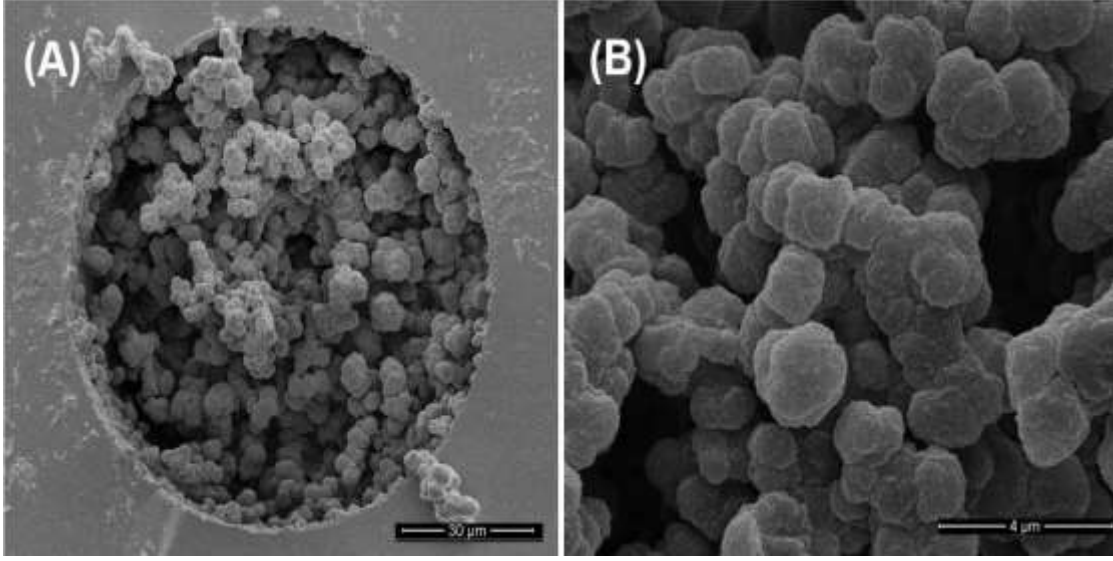
ANM monolitik kolonun mekanik stabilitesi, nano-LC sisteminde %80 ACN ve %20 H<sub>2</sub>O hareketli fazı ile farklı akışlarda kolon geri basıncının ( $\Delta P$ ) ölçülmesi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.3). Kolonun akış hızının arttırılması ile geri basınç artmıştır. Bu artış doğrusal olarak gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Akış hızı ve kolon geri basıncı arasındaki ilişki  $R^2$  ile ifade edilmektedir.  $R^2$  değeri 0,9998 olarak bulunmuştur. Böylelikle aralarında doğrusal bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Söz konusu bu doğrusal ilişki kolonun mekanik dayanımının iyi olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.3. ANM monolitik kolonun geri basıncına karşı akış hızının kalibrasyon grafiği (Kromotografik koşullar mobil faz: % 80 ACN, %20 H<sub>2</sub>O (v/v) , injeksiyon hacmi 0,01 μl, dalga boyu 200 nm, kolon iç çapı 100 μm, kolon uzunluğu 20 cm.)

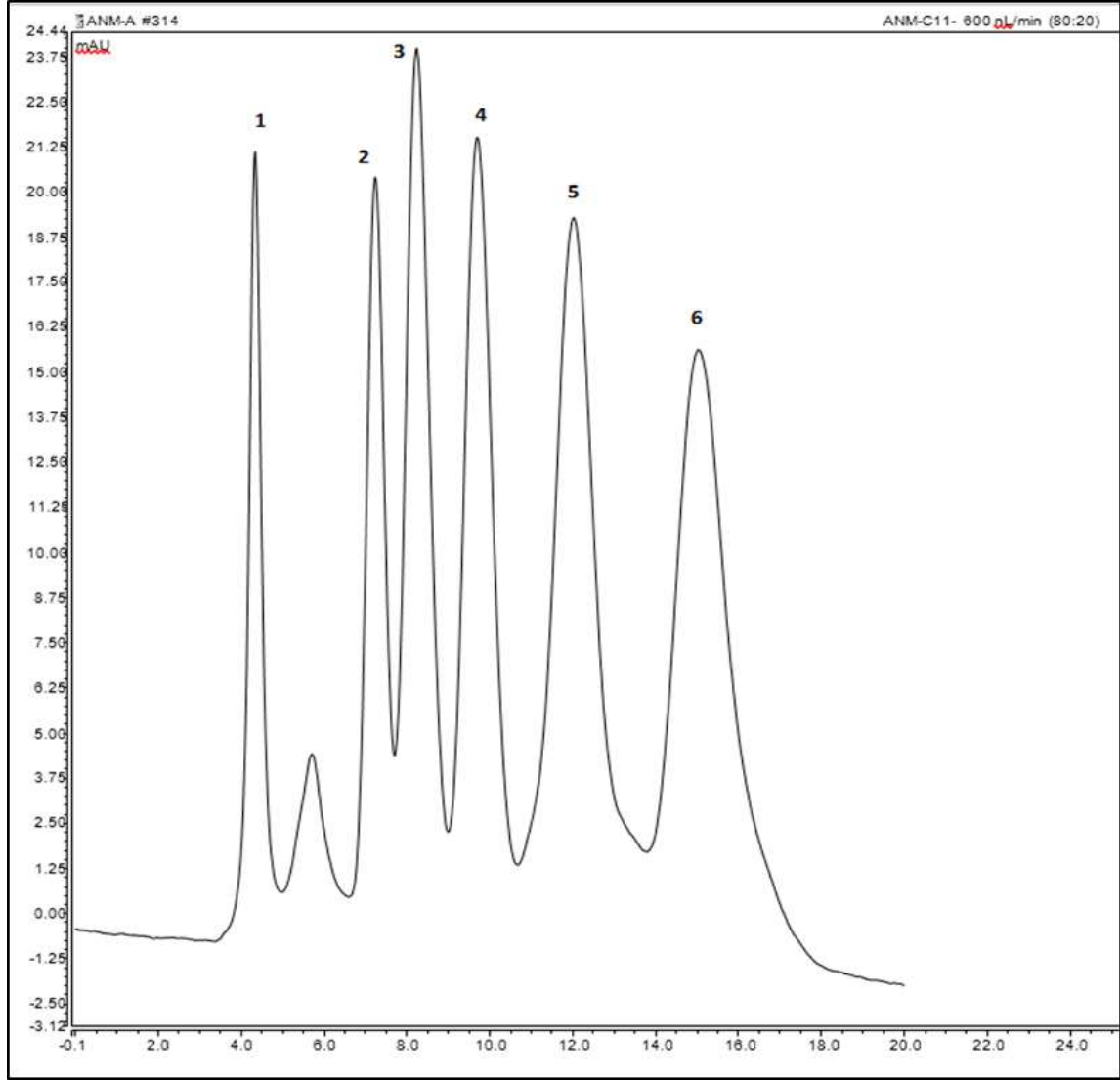
Kolonun morfolojik yapısını değerlendirmek monolitin SEM görüntüleri alınmıştır. SEM analiz sonucunda kolonda iyi bir homojenizasyon gözlenmiştir. Şekil 4.4'de ANM monolitik kolonunun iki farklı büyütme seviyesindeki SEM görüntülerini gösterilmiştir. Şekil 4.4 de gösterildiği gibi, polimer kolon yüzeyi üzerinde sıkı bir şekilde kaplanırken, 100 nm'den küçük nano yapılar elde edilmiştir (bkz. Şekil 4.4 B). Monolitlerin gözenek yapısı ayırma performansını etkilerken, mezo gözeneklerin eksikliği numunenin aşırı yüklenmesine neden olmaktadır.

SEM görüntülerinde gösterildiği gibi birbirine bağlı makro gözenekler, proteinler gibi hem küçük hem de büyük moleküller için hızlı kütle transferine izin verebilmektedir.



Şekil 4.4. ANM monolitik kolonun A(5000x ) ve B(10000x) büyütmeli SEM görüntüleri

Hidrofobik kolonunun etkileşme davranışının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan urasil ve polar olmayan alkilbenzen türevi (ABs) olarak metilbenzen, etilbenzen, propilbenzen, butilbenzen ve pentilbenzen seçilmiştir. ABs analizi nano-LC sisteminde ANM monolit kolon kullanılarak yapılmıştır. Bu ayırımında kromatografik koşullar, %80 ACN ve %20 H<sub>2</sub>O (v/v), akış hızı 600 nL/dk, injeksiyon hacmi 0,01 µl, dalga boyu 200 nm şeklinde oluşturulmuştur (Şekil 4.5). ABs ler yüksek ACN (%80) içerikli hareketli faz kullanılarak iyi ayrıldığı gözlenmiştir. Burada monolitik yapı ve alkilbenzen yapılarında bulunan aromatik yapılardan kaynaklı  $\pi$ - $\pi$  etkileşimlerinin yoğun olduğu görülmektedir. Bu bağlamda, ANM monoliti ile kolonun yüksek hidrofobisite içerdiğini göstermektedir. Kromatografik ayırımında pik sıralaması metilbenzen, etilbenzen, propilenzen, butilbenzen ve pentilbenzen şeklinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).



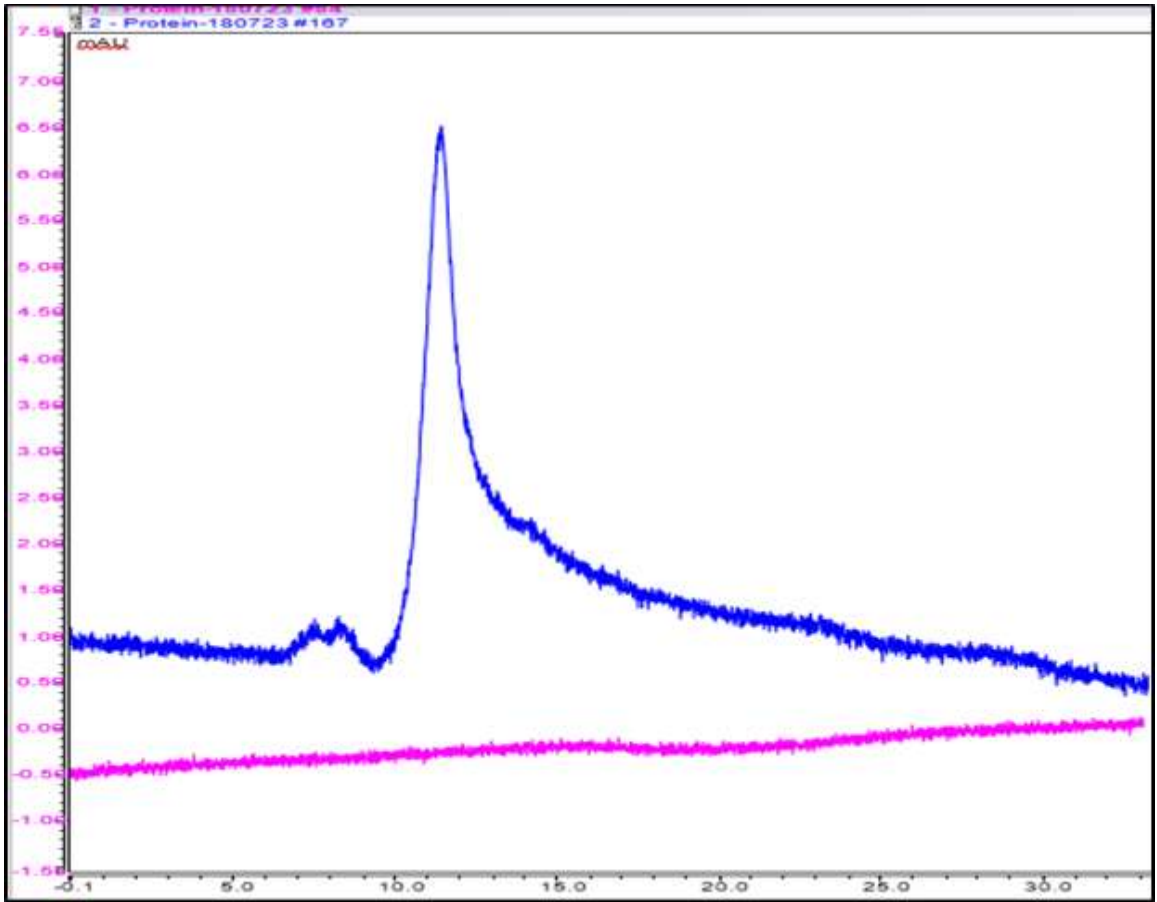
Şekil 4.5. Alkilbenzenlerin ANM monolitik kolonda kromatografik ayrımı: Kromatografik koşullar hareketli faz %80 ACN, %20 H<sub>2</sub>O (v/v) ,akış hızı 600 nL/dk, injeksiyon hacmi 0.01 µl, dalga boyu 200 nm, kolon iç çapı 100µm, kolon uzunluğu 20 cm. Pik sıralaması 1)ursil, 2)metilbenzen, 3)etilbenzen, 4)propilbenzen, 5)butilbenzen ve 6)pentilbenzen

### 4.3. Nano-LC Sisteminde $\beta$ -CN Tayini İçin Metod Geliştirilmesi

ANM monolitik kolon kullanılarak,  $\beta$ -CN'in nano-LC sisteminde analizi yapılmıştır. İlk olarak kromatografik koşullar optimize edilmiştir. Burada optimizasyon çalışmaları özellikle  $\beta$ -CN'in yapısında bulunan 209 aminoasit ve 23.980 kDa molekül ağırlıklı yapısı ve hidrofobik karakteri dikkate alınarak ters-faz kromatografik koşullar uygulanmıştır. ProFlow nano-LC sisteminde ANM monolitik kolonu kullanılarak blank solüsyon ve  $\beta$ -CN içeren solüsyon sisteme verilmiştir. Ters-faz kromatografik koşullar altında ve 300-

500 nL/dk akışta etkin sonuçlar elde edilmiştir.  $\beta$ -CN standardı farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak nano-LC de analiz edilmiştir (Şekil 4.6).

Analiz 200-244 nm, injeksiyon hacmi 0,30  $\mu$ L, 30 dakikada 300-500 nL/dk akışlarda yapılmıştır (Tablo.3.1). ANM ters-faz monolitinde  $\beta$ -CN dedeksiyonunun iyi olduğu gözlemlenmiştir. Blank solüsyonda herhangi pik gözlenmezken 20 ppm  $\beta$ -CN etkin olarak kromatogramda gözlenmiştir (Şekil 4.6). Burada, özellikle ANM monolitinin yapısında bulunan aromatik yapının  $\beta$ -CN ile etkin  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri gösterdiği vurgulanmalıdır.



Şekil 4.6.  $\beta$ -CN blank (kırmızı line) ve 20 ppm kromatogramı (mavi line). Kromatografik koşullar: mobil faz A %50/50 ACN/H<sub>2</sub>O (v/v), mobil faz B %90/10 ACN/H<sub>2</sub>O (v/v), akış hızı 300-500 nL/dk, injeksiyon hacmi 0,30  $\mu$ l

Literatürde yapılan bir çalışmada HPLC sisteminde florimetrik dedektörde  $\beta$ -CN çalışılmış ve tespit edilememiştir (Palomino ve ark., 2014). LC-MS sisteminde (Liu ve ark., 2023) ve UPLC-HRMS sisteminde (Fuerer ve ark., 2019) yapılan çalışmalarda  $\beta$ -CN tespiti yapılmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda  $\beta$ -CN tayinin yüksek hassasiyet ve yüksek



verimli ayırma etkisi gösterdiği görülmektedir. Bu çalışma kapsamında nano-LC/UV dedektörü kullanılarak  $\beta$ -CN tayini için metod geliştirilmiş ve  $\beta$ -CN tespit edilmiştir. Literatürde yüksek ppm ve üzeri düzeylerde  $\beta$ -CN tayini çalışması yapıldığı ve geliştirilen metodun LOD değeri 0,02 mg/L olarak bulunmuş ve bazı  $\beta$ -CN varyantların 0,05 mg/L düzeylerinde olduğu görülmüştür.

Tablo 4.1.  $\beta$ -CN için nano-LC/UV sisteminde validasyon parametreleri

Analit	LOD mg/L	LOQ mg/L	R2	Precision (RSD %) <sup>a</sup>	
				Inter day	Intra day
$\beta$ -CN	0,02	0,2	0,9990	1,7	2,2

LOD: dedeksiyon limiti ; LOQ: kantitatif limit ; a) RSD (n=5).

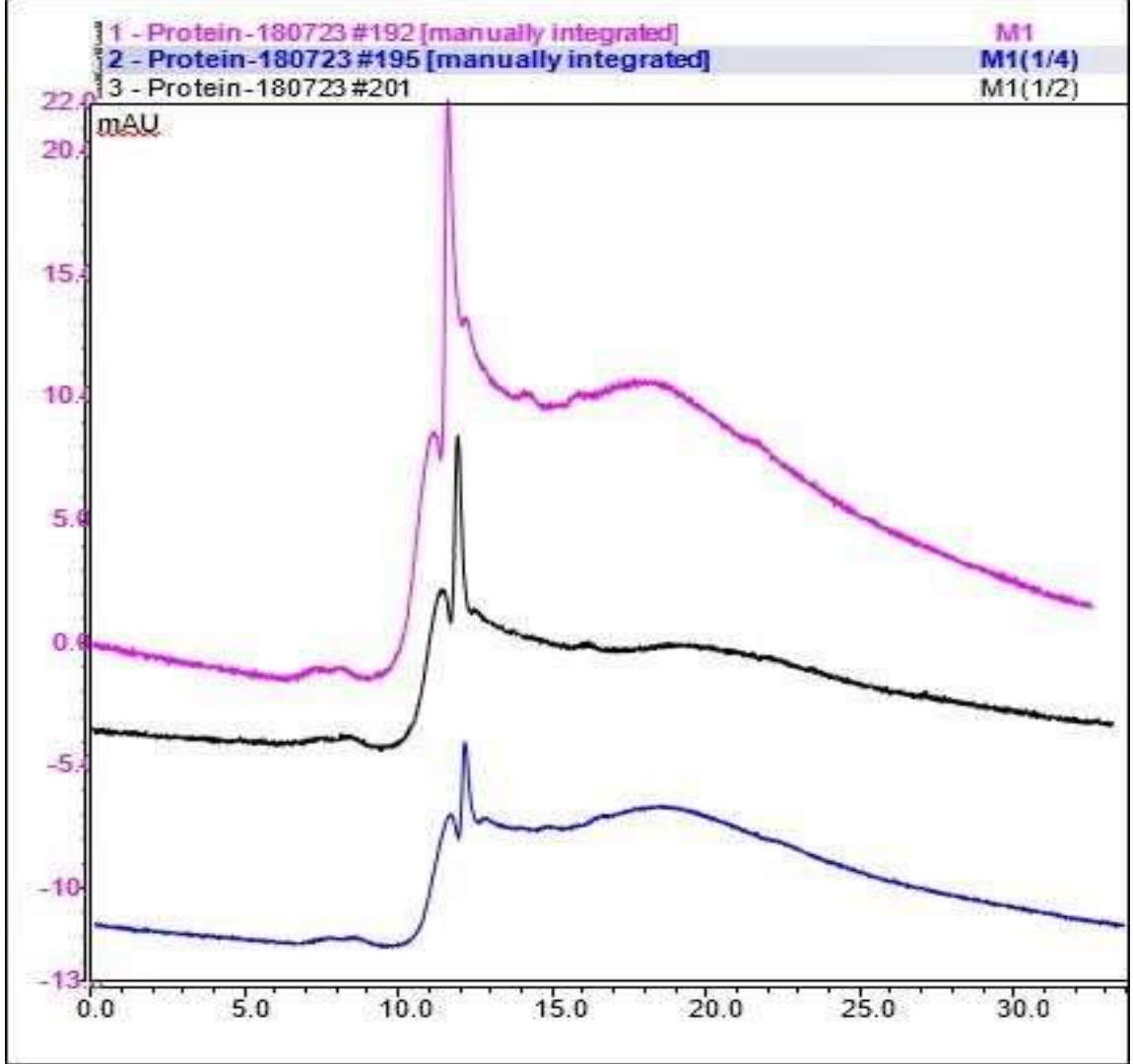
LOD, LOQ ve RSD validasyon parametreleri ile yöntem doğrulaması, geliştirilen monolit ile nano-LC kullanılarak analiz edildi. Tekrarlanabilirliği değerlendirmek amacıyla, blank numunelere numunelerine 0,02-5000  $\mu$ g/kg konsantrasyon seviyelerinde ekleme yapıldı. Tablo 4.1'de  $\beta$ -CN nin RSD değerleri görülmektedir. Literatüre göre bu çalışmada daha hassas  $\beta$ -CN tayini geliştirilmiş olduğu görülmektedir.

#### 4.4. Sütten $\beta$ -CN Tayini

Her iki süt örneği uygun koşullarda ekstraksiyon edilmiştir. Standart  $\beta$ -CN tayini için kullanılan metod ProFlow-nano-LC-UV sisteminde ekstrakte edilen ticari iki süt örneği için yapılmıştır. Nano-LC sisteminde ANM monolitik kolon (100  $\mu$ m i.d.  $\times$  20 cm'lik) kullanılarak , %60-80 B mobil fazı 30 dakikada, 300-500 nL/dk akış hızı, injeksiyon hacmi 0,30  $\mu$ l kromatografik koşullarda çalışılmıştır.

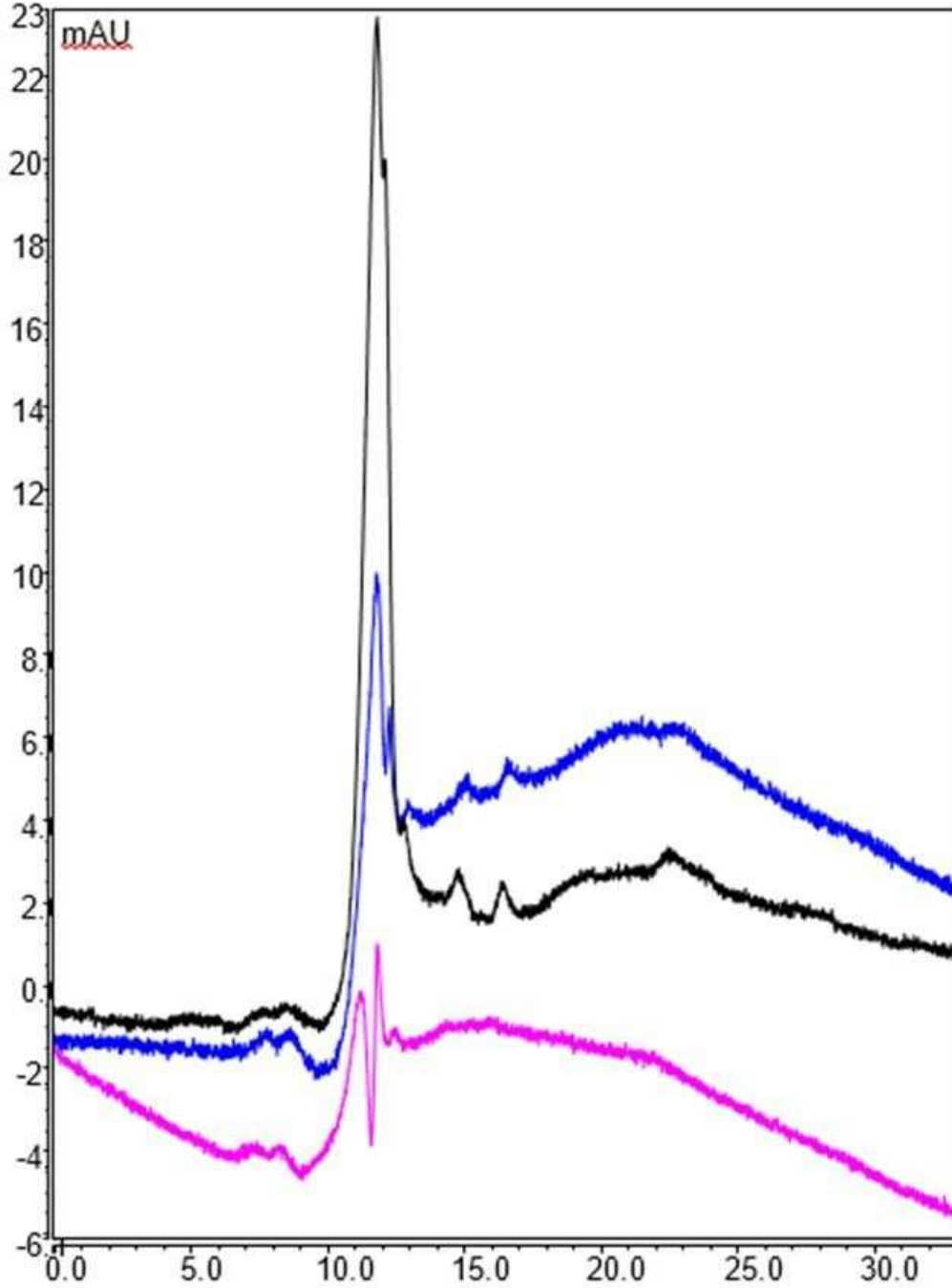
M1 numuneleri ekstrakt (M1), 1, 1:2 ve 1:4 oranında seyreltilerek nano-LC sisteminde  $\beta$ -CN kromatogramları gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). Seyreltme oranı artması ile  $\beta$ -CN içeriği

azalmıştır.  $\beta$ -CN kromatogramları UV dedektörde 200, 214 ve 254 nm dalga boylarında alınmış ve en iyi kromatogramlar 200 nm dalga boyunda gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. M1, M1 (1:2) ve M1 (1:4) süt örnekleri  $\beta$ -CN kromatogramı. (Kromatografik koşullar: mobil faz A %50/50 ACN/H<sub>2</sub>O (v/v), mobil faz B %90/10 ACN/H<sub>2</sub>O (v/v), akış hızı 300-500 nL/dk, injeksiyon hacmi 0,30  $\mu$ l)

P1 Numuneleri ekstrakt (P1), 1:2 ve 1:4 oranında seyreltilerek nano-LC sisteminde  $\beta$ -CN kromatogramları gözlemlenmiştir (Şekil 4.8). Konsantrasyonun oranının artmasıyla  $\beta$ -CN içeriği azalmıştır.  $\beta$ -CN kromatogramları UV dedektörde 200, 214 ve 254 nm dalga boylarında alınmış ve burada en iyi kromatogramlar 200 nm dalga boyunda gözlemlenmiştir (Şekil 4.8).



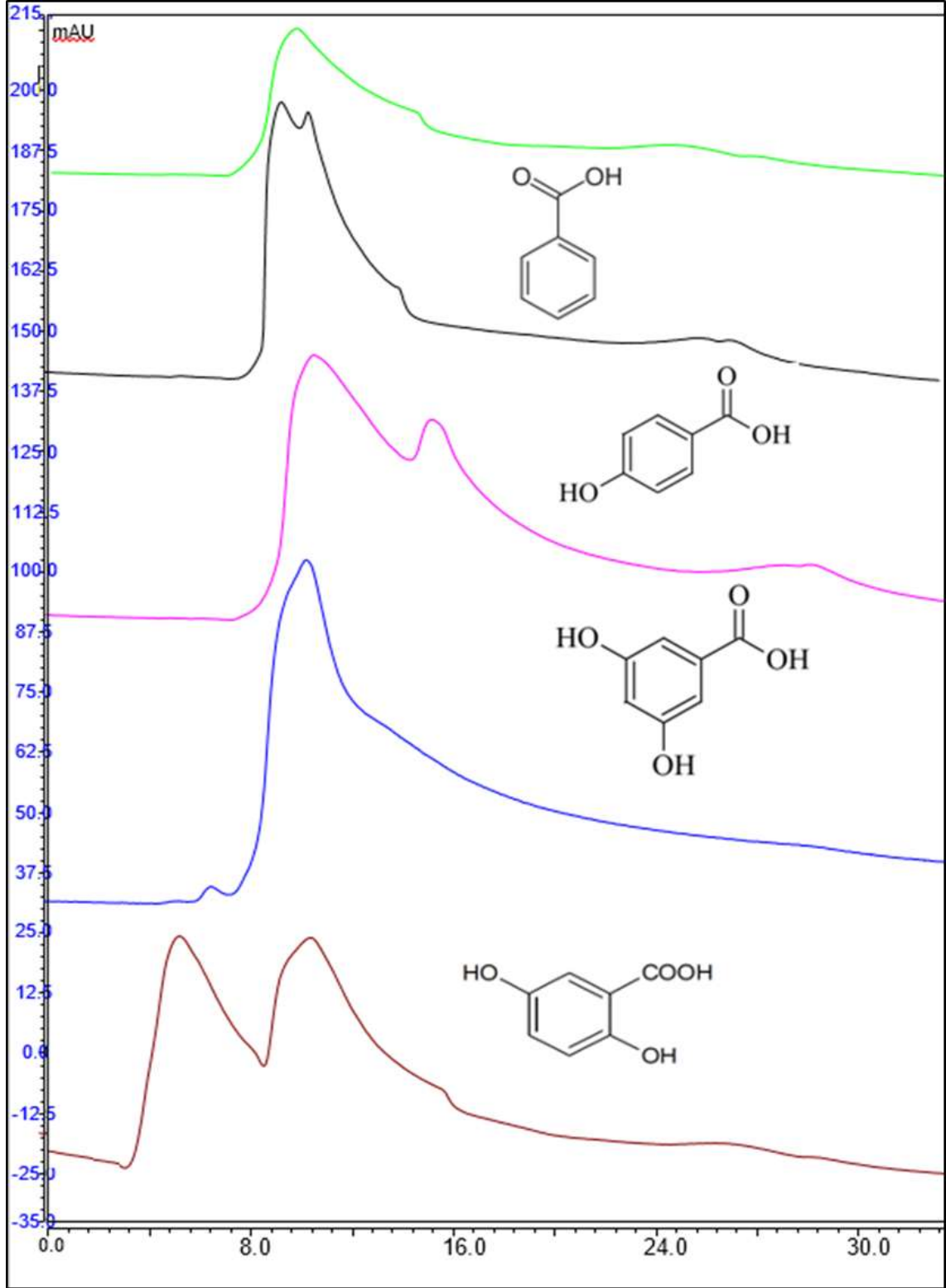
Şekil 4.8. P1, P1 (1:2) ve P1 (1:4) süt örnekleri  $\beta$ -CN kromatogramı. Kromatografik koşullar: Mobil faz A %50/50 ACN/H<sub>2</sub>O (v/v), Mobil faz B %90/10 ACN/H<sub>2</sub>O (v/v), akış hızı 300-500 nL/dk, injeksiyon hacmi 0,30  $\mu$ l, dalga boyu 200 nm

M1 ve P1 ekstrakt  $\beta$ -CN kromatogramları karşılaştırıldığında  $\beta$ -CN konsantrasyonları birbirine yakın olduğu gözlemlenmiştir. Konsantrasyon oranının artmasıyla M1 ve P1 örneklerinde  $\beta$ -CN içeriğinde doğrusal bir azalış gözlenmiştir. Literatürde g/L düzeylerinde sütte  $\beta$ -CN bulunduğu rapor edilmiştir (Montalbano ve ark., 2016).

Çalışmamızda M1 numunesinde daha düşük  $\beta$ -CN varlığı gözlenirken P1 numunesinde daha yüksek  $\beta$ -CN olduğu değerlendirilmiştir.

#### **4.5. Nano-LC Sisteminde $\beta$ -CN Fenolik Bileşiklerin Etkileşimlerinin İncelenmesi**

Fenolik bileşikler, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan bitki sekonder metabolitleridir. Proteinlerle etkileşime girerek yapılarını ve özelliklerini değiştirdikleri bilinmektedir. Bu nedenle bunlar arasındaki etkileşimler, gerek insan sağlığına potansiyel faydaları gerekse gıda endüstrisi yönlerinden dolayı giderek daha fazla ilgi görmektedir. Fenolik bileşikler ve proteinler kovalent bağlantılar yoluyla kompleksler oluşturabilir ve hidrofobik, elektrostatik, Van Der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları yoluyla kovalent olmayan etkileşimler gösterebilir. Bu çalışmada bazı fenolik bileşenlerin  $\beta$ -CN ile etkileşimleri incelenmiştir.  $\beta$ -CN ile fenolik bileşikler etkileşime konularak aynı sistem ve metotla incelenmiştir. Fenolik bileşiklerin  $\beta$ -CN ile etkileşime girerek konjuge yapılar oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.9). Fenolik bileşiklerin  $\beta$ -CN ile kompleks yapılar oluşturduğu ve bunların alerjen etkiyi azalttığı ayrıca yararlı yapılara dönüştüğü ön görülmektedir.

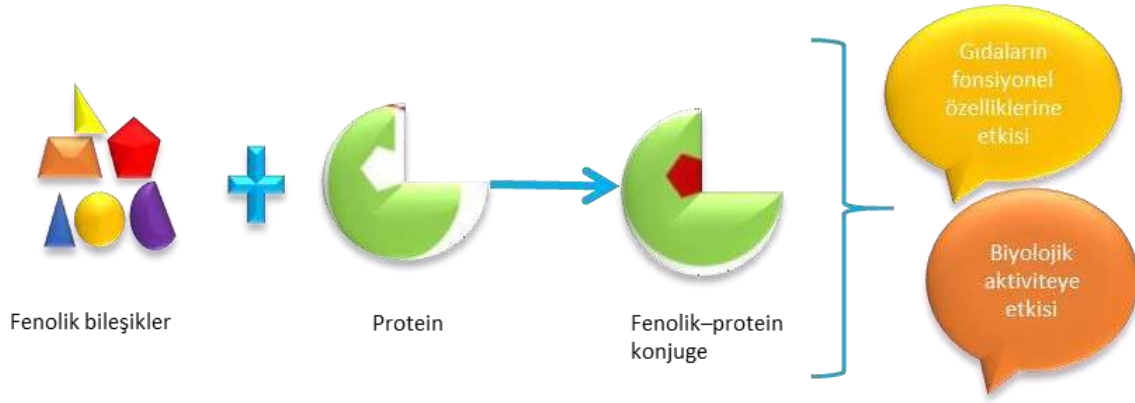


Şekil 4.9. Fenolik bileşiklerin  $\beta$ -CN ile etkileşim kromatogramı. Kromatografik koşullar: Mobil Faz A %50/50 ACN/H<sub>2</sub>O (v/v), Mobil Faz B %90/10 ACN/H<sub>2</sub>O (v/v), akış hızı 300-500 nL/dk, injeksiyon hacmi 0,30  $\mu$ l, dalga boyu 200 nm

$\beta$ -CN fenolik bileşiklerle etkileşimini hazırlanan tampon çözelti varlığında incelendiğinde etkileşimin daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar fenol-protein kompleksi

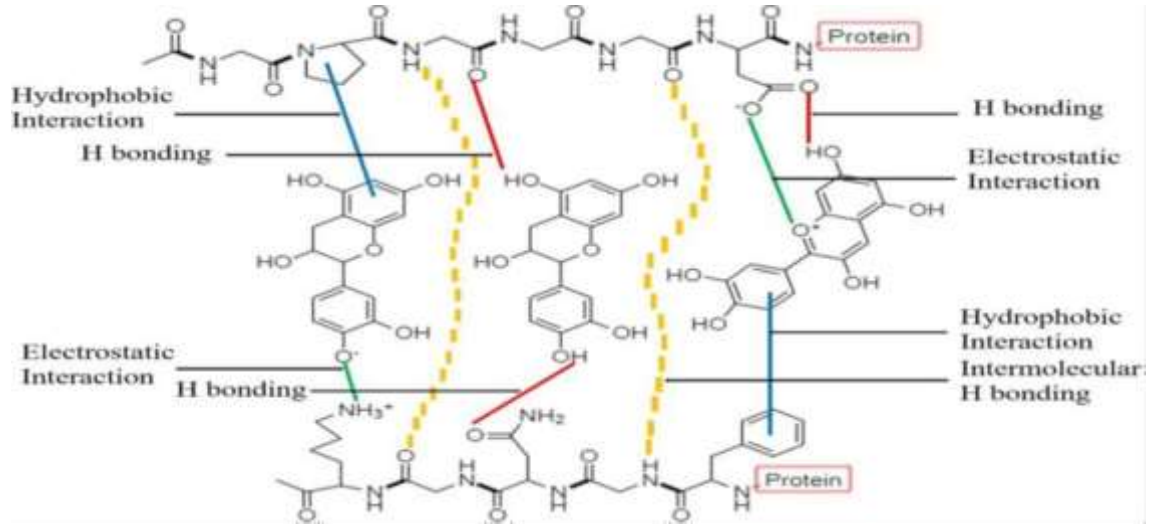
oluşumunun olası mekanizmalarının daha çok yapısal etkileşimler içerdiği ve  $\beta$ -CN'in polifenollerle bağlanması ile farklı yapıda kompleks bileşenlerin oluştuğu gözlenmiştir.

Bitki fenolikleri proteinlere kovalent olarak veya kovalent olmayan şekilde bağlanabilir ve etkileşimlerin türü fenolik/proteinin mol oranına bağlıdır. Birkaç fenolik bir protein molekülüne bağlanabilir veya bir fenolik birkaç protein bölgesine veya protein molekülüne bağlanabilir ve dolayısıyla etkileşimlerin sırasıyla çok bölgeli veya çok dişli olduğu bilinmektedir (Prigent ve ark. 2003) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Fenolik bileşiklerin proteinlerle etkileşimi

Fenoliklerin ve proteinlerin çoğunlukla geri dönüşümlü bir etkileşim olan kovalent olmayan bağlanma yoluyla birbirlerine bağlandıklarını ve etkileşimin daha sonra hidrojen bağıyla stabilize edilebilecek hidrofobik birleşme ile oluştuğu gösterilmiştir (Shahidi ve Dissanayaka, 2023). Bir proteinin fenolik bileşikleri ve nötr aminoasitleri arasında hidrofobik etkileşimler meydana gelirken, proteindeki yüklü aminoasitlerle fenolik bileşiklerin nitrojen veya oksijen ve hidroksil grupları arasında hidrojen bağı meydana gelebilir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Polifenoller ve proteinler arasındaki başlıca kovalent olmayan etkileşimler; yeşil, kırmızı ve mavi çizgiler sırasıyla elektrostatik etkileşimleri, hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimi gösterir (Shahidi ve Dissanayaka, 2023)

Birçok çalışma, polifenollerin bu etkileşimler yoluyla proteine karşı güçlü bağlanma afinitelerine sahip olduğunu, bunun sonucunda yapılarını ve özelliklerini değiştirdiğini ve polifenollerin biyoerişilebilirliğini ve biyoyararlanımını önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir (Li He, ve ark., 2021; Li, Ritzoulis, ve ark., 2021; Shahidi ve Dissanayaka, 2023).

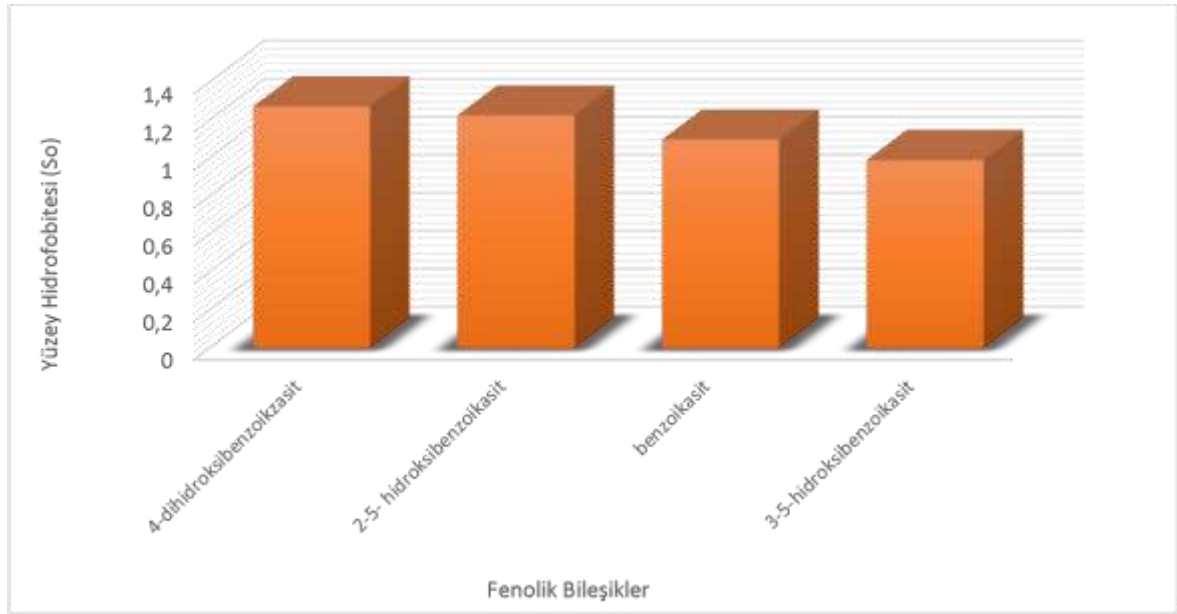
#### 4.6. $\beta$ -CN Yüzey Hidrofobitesisi

Proteinlerin yüzey hidrofobitesisi proteinlerin konformasyon ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi için önemlidir (Xu ve ark., 2016). Fenolik bileşiklerin varlığında  $\beta$ -CN in yüzey hidrofobitesini hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanılmıştır. Fenolik bileşikler  $\beta$ -CN eklendiğinde bu değer azalır (Şekil 4.12).

$$S_0 \frac{\Delta UV}{\Delta C} \quad (4.1)$$

Burada,  $S_0$  yüzey hidrofobitesisi,  $\Delta UV$  dedektörün UV dalga boyu(nm),  $\Delta C$  konsantrasyon değeridir. Yüzey hidrofobitesisi 4-dihidroksi benzoik asit, 2-5-hidroksi benzoik asit, benzoik asit ve 3-5-hidroksibenzoik asit için sırasıyla 1,273, 1,226, 1,099 ve 0,990 bulunmuştur (Şekil 4.12).

Yüzey hidrofobitesinde gözlemlenen azalma protein yapısının değişmesi ve protein yüzeyinde açıkta kalan hidrofobik bölgelerin azalmasıyla ilişkilidir (Bi ve ark., 2016; Li ve ark., 2018). 4-hidroksi benzoik asit diğerlerine göre daha az etkileşim verirken 3-5 hidroksi benzoik asit en iyi etkileşimi verdiği gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar fenolik bileşiklerin üzerinde polar olmayan bölgeler olduğunu gösterdi.  $\beta$ -CN yüzeyindeki polar olmayan bölgelere bağlanan fenolik bileşikler proteinin genel yüzey hidrofobitesini azaltmıştır.



Şekil 4.12.  $\beta$ -CN yüzey hidrofobitesi



## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada alerjen protein  $\beta$ -CN için nano-LC sisteminde ANM monolitik kolon kullanılarak metod geliştirilmiş ve süt numunelerinde uygulaması yapılmıştır. Ayrıca bazı fenolik bileşiklerle etkileşimine incelenmiştir. ANM monolitik kolon iç çapı 100  $\mu$ m ve 20 cm uzunluğunda hazırlanmıştır. Monolit içerisinde polimerleşinin izlenmesi için akış öncesi ve akış sonrası optik mikroskop görüntüleri incelenmiş (Şekil 4.2) ve kolonun morfolojik yapısını değerlendirmek için SEM görüntüleri incelenmiştir. SEM analiz sonucunda kolonda iyi bir homojenizasyon gözlenmiştir (Şekil 4.4). Nano-LC sisteminde ANM monolitik kolonun geri basıncına karşı akış hızının kalibrasyonu için mobil faz: %80 ACN, %20 H<sub>2</sub>O (v/v), injeksiyon hacmi 0,01  $\mu$ l, dalga boyu 200 nm de farklı akışlarda kolon geri basıncının ( $\Delta P$ ) ölçülmesi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.3). Akış hızı ve kolon geri basıncı arasındaki ilişki  $R^2$  ile ifade edilmiştir.  $R^2$  değeri 0,9998 olarak bulunmuştur. Hidrofobik kolonunun etkileşme davranışının değerlendirilmesinde alkilbenzenlerin kromatogramına bakılmıştır. Alkilbenzenler ANM monolit kolonda kromatografik ayrımı hareketli faz olarak %80 ACN, %20 H<sub>2</sub>O (v/v), akış hızı 600 nL/dk, injeksiyon hacmi 0.01  $\mu$ l, dalga boyu 200 nm de yapılmış ve pik sıralaması 1)urasil, 2)metilbenzen, 3)etilbenzen, 4)propilbenzen, 5)butilbenzen ve 6) pentilbenzen bulunmuştur (Şekil 4.5). ANM monolitik kolon kullanılarak,  $\beta$ -CN 'in nano-LC sisteminde analizi yapılmıştır.  $\beta$ -CN standartından farklı konsantrasyonlardan hazırlanan çözeltiler nano-LC de analiz edilmiştir (Şekil 4.6). Analiz 200 nm, injeksiyon hacmi 0,30  $\mu$ L, 30 dakikada 300-500 nL/dk akışlarda yapılmıştır (Tablo.3.1). ANM ters- faz monolitinin de  $\beta$ -CN ayrımının iyi olduğu gözlemlenmiştir. Blank solüsyonda herhangi pik gözlenmezken 20 ppm  $\beta$ -CN etkin olarak kromatogramda gözlenmiştir (Şekil 4.6).

M1 ve P1 süt örneklerinde belirlenen ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edilmiştir ve her iki örnekte 1:2 ve 1:4 oranında seyreltilmiştir.  $\beta$ -CN tayini için kullanılan metod ile bir UV-VIS dedektörüne bağlı ProFlow-nano-LC-UV sisteminde kromatogram analizi yapılmıştır. Nano-LC sisteminde daha önce sentezlenen ANM monolitik kolon (100  $\mu$ m i.d.  $\times$  20 cm'lik), %60-80 B mobil fazı 30 dakikada, 300-500 nL/dk akış hızı, injeksiyon hacmi 0,30  $\mu$ l ve 200 nm dalga boyuyla çalışılmıştır. Her iki süt örneğinde seyreltme artması ile  $\beta$ -CN

içeriği azalmıştır.  $\beta$ -CN ile bazı fenolik bileşikler etkileşime konularak aynı sistem ve metotla incelenmiştir. Fenolik bileşiklerin  $\beta$ -CN ile etkileşime girdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.9). Proteinlerin konformasyon ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi için yüzey hidrofobitesi hesaplanmıştır. Yüzey hidrofobitesi 4-dihidroksi benzoik asit, 2-5hidroksi benzoik asit, benzoik asit ve 3-5hidroksibenzoik asit için sırasıyla 1,273, 1,226, 1,099 ve 0,990 bulunmuştur (Şekil 4.12). Bu çalışmayla birlikte alerjen etkiye sahip proteinlerin nano-LC sistemde araştırılması, alerjen etkilerinin fenoliklerle etkileşimiyle inhibe edici özelliklerinin belirlenmesi ve biyokimyasal etkisinin ortaya konulması açısından yol gösterici olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmanın alerjen besinlerinin asıl etkenleri olan proteinlerin belirlenmesi ve bu alerjen etkilerin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara açısından katkı sunacağı düşünülmektedir. Ayrıca allerjen protein olan  $\beta$ -CN farklı yapılarda fenolik bileşenler ile konjuge yapı oluşturduğu görülmüş bu yapının gıdalar için biyoaktivite gösterebilme potansiyeli olduğu öngörülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Andiç, S., Ayaz, R. M., and Şehriban, O. (2021). A1 milk and beta-casomorphin-7. *Food and Health*, 7(2), 128-137.
- Arrua, R., Causon, T., and Hilder, E. (2012). Recent developments and future possibilities for monoliths in separation science. *The Analyst*, 137, 5179-5189.
- Asensio-Ramos, M., Fanali, C., D'Orazio, G., and Fanali, S. (2017). Nano-liquid chromatography. In *Liquid chromatography* (637-695). Elsevier.
- Aydoğan, C. (2019). Nanoscale separations based on LC and CE for food analysis: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 121, 115693.
- Aydoğan, C., and El Rassi, Z. (2019). MWCNT based monolith for the analysis of antibiotics and pesticides in milk and honey by integrated nano-liquid chromatography-high resolution orbitrap mass spectrometry. *Analytical Methods*, 11(1), 21-28.
- Aydoğan, C., Aslan, H., Günyel, Z., Demir, N., Erdoğan, İ. Y., Alharthi, S., and El Rassi, Z. (2021). Graphene oxide-octadecylsilane incorporated monolithic nano-columns with 50 µm id and 100 µm id for small molecule and protein separation by nano-liquid chromatography. *Electrophoresis*, 42(24), 2637-2646.
- Aydoğan, C., Karakoç, V., and Denizli, A. (2015). Chiral ligand-exchange separation and determination of malic acid enantiomers in apple juice by open-tubular capillary electrochromatography. *Food chemistry*, 187, 130-134.
- Bandyopadhyay, P., Ghosh, A. K., and Ghosh, C. (2012). Recent developments on polyphenol-protein interactions: Effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. *Food and function*, 3(6), 592-605.
- Bougma, S., Hama-Ba, F., Garanet, F., Kabre, J. D. A. W., Guira, F., Cissé, H., and Savadogo, A. (2022). Impact of Health and Nutrition Interventions in the Prevention and Recovery of Child Malnutrition in Sub-Saharan Africa from 2010 to 2020. *Health*, 14(7), 810-831.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., and Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.

Burks, A. W., Jones, S. M., Boyce, J. A., Sicherer, S. H., Wood, R. A., Assa'ad, A., and Sampson, H. A. (2011). NIAID-sponsored 2010 guidelines for managing food allergy: applications in the pediatric population. *Pediatrics*, *128*(5), 955-965.

Bi, H., Tang, L., Gao, X., Jia, J., and Lv, H. (2016). Spectroscopic analysis on the binding interaction between tetracycline hydrochloride and bovine proteins  $\beta$ -casein,  $\alpha$ -lactalbumin. *Journal of Luminescence*, *178*, 72-83.

Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J., Haslam, E., Davies, A. P., and Williamson, M. P. (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(6), 1593-1601.

Dai, J., and Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, *15*(10), 7313-7352.

Diniz, A., Escuder-Gilabert, L., Lopes, N. P., Villanueva-Camañas, R. M., Sagrado, S., and Medina-Hernández, M. J. (2008). Characterization of interactions between polyphenolic compounds and human serum proteins by capillary electrophoresis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *391*, 625-632.

Dong, M. W. (2019). *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists*. John Wiley and Sons.

Fiocchi, A., and Martelli, A. (2006). Dietary management of food allergy. *Pediatric Annals*, *35*(10), 755-763.

De Freitas, V., Carvalho, E., and Mateus, N. (2003). Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry*, *81*(4), 503-509.

Gallo, M., Vinci, G., Graziani, G., De Simone, C., and Ferranti, P. (2013). The interaction of cocoa polyphenols with milk proteins studied by proteomic techniques. *Food research international*, *54*(1), 406-415.

Gaspard, S. J., and Brodkorb, A. (2019). The use of high performance liquid chromatography for the characterization of the unfolding and aggregation of dairy proteins. *Protein Self-Assembly: Methods and Protocols*, 103-115.

Ghanem, A., Marzouk, A. A., Sobhy, M., and Fouad, A. (2022). A polymer-based monolithic capillary column with polymyxin-B chiral selector for the enantioselective nano- High performance liquid chromatographic pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography A*, *1662*, 462714.

Guo, W., Kong, E., and Meydani, M. (2009). Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutrition and cancer*, *61*(6), 807-810.

Hahn, E. L., and Bacharier, L. B. (2005). The atopic march: the pattern of allergic disease development in childhood. *Immunology and Allergy Clinics*, 25(2), 231-246.

Hasni, I., Bourassa, P., Hamdani, S., Samson, G., Carpentier, R., and Tajmir-Riahi, H. A. (2011). Interaction of milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins with tea polyphenols. *Food chemistry*, 126(2), 630-639.

Hochwallner, H., Schulmeister, U., Swoboda, I., Spitzauer, S., and Valenta, R. (2014). Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods*, 66(1), 22-33.

Host, A., Halken, S., Jacobsen, H. P., Christensen, A. E., Herskind, A. M., and Plesner, K. (2002). Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatric Allergy and Immunology*, 13(15), 23-28.

Kang, Y., Jimenez-Flores, R., and Richardson, T. (1986). Casein genes and genetic engineering of the caseins. *Genetic engineering of animals: an agricultural perspective*, 95-111.

Koca, T., ve Akçam, M. (2015). İnek sütü protein alerjisi. *Dicle Tıp Dergisi*, 42(2), 268-273.

Kucukosmanoglu, E., Yazı, D., Yesil, O., Akkoc, Tunç, Gezer, M., Bakirci, N., and Barlan, I. B. (2008). Prevalence of egg sensitization in Turkish infants based on skin prick test. *Allergologia et immunopathologia*, 36(3), 141-144.

Ladisch, M., and Zhang, L. (2016). Fiber-based monolithic columns for liquid chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408, 6871-6883.

Le Bourvellec, C., and Renard, C. M. (2012). Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(3), 213-248.

Li, Y., He, D., Li, B., Lund, M. N., Xing, Y., Wang, Y., and Li, L. (2021). Engineering polyphenols with biological functions via polyphenol-protein interactions as additives for functional foods. *Trends in Food Science and Technology*, 110, 470-482.

Li, T., Hu, P., Dai, T., Li, P., Ye, X., Chen, J., and Liu, C. (2018). Comparing the binding interaction between  $\beta$ -lactoglobulin and flavonoids with different structure by multi-spectroscopy analysis and molecular docking. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 201, 197-206.

Lima, I. D. P., Valle, S. P., de Oliveira, MAL., Marques, F. F. D. C., and Vaz, F. A. S. (2023). Monolithic stationary phases preparation for use in chromatographic and electromigration techniques: The state-of-the-art. *Microchemical Journal*, 190, 12.

Lin, C. S., Huang, M. C., Choo, K. B., and Tseng, Y. H. (1993). Sequence analysis and comparison of bovine  $\alpha$ 1-casein genomic DNA. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 6(4), 541-547.

Liu, K., Aggarwal, P., Lawson, J. S., Tolley, H. D., and Lee, M. L. (2013). Organic monoliths for high-performance reversed-phase liquid chromatography. *Journal of separation science*, 36(17), 2767-2781.

Longo, G., Berti, I., Burks, A. W., Krauss, B., and Barbi, E. (2013). IgE-mediated food allergy in children. *The Lancet*, 382(9905), 1656-1664.

Montalbano, M., Segreto, R., Di Gerlando, R., Mastrangelo, S., and Sardina, M. T. (2016). Quantitative determination of casein genetic variants in goat milk: Application in Girgentana dairy goat breed. *Food Chemistry*, 192, 760-764.

Matricardi, P. M., Bockelbrink, A., Beyer, K., Keil, T., Niggemann, B., Grüber, C., and Lau, S. (2008). Primary versus secondary immunoglobulin E sensitization to soy and wheat in the Multi-Centre Allergy Study cohort. *Clinical and Experimental Allergy*, 38(3), 493-500.

McLachlan, C. N. S. (2001).  $\beta$ -casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Medical Hypotheses*, 56(2), 262-272.

Miralles, B., Rothbauer, V., Manso, M. A., Amigo, L., Krause, I., and Ramos, M. (2001). Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para- $\kappa$ -casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 915(1-2), 225-230.

Montalbano, M., Segreto, R., Di Gerlando, R., Mastrangelo, S., and Sardina, M. T. (2016). Quantitative determination of casein genetic variants in goat milk: Application in Girgentana dairy goat breed. *Food Chemistry*, 192, 760-764

Mulaudzi, R., Ndhkala, A., Kulkarni, M., and Staden, J. (2012). Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever. *Journal of ethnopharmacology*, 143, 185-193.

Myhrstad, M. C., and Wolk, A. (2023). Antioxidants and phytochemicals—a scoping review for Nordic Nutrition Recommendations 2023. *Food and nutrition research*, 67.

Neal, A. C. (1995). HPLC and column liquid chromatography. In *Journal of Chromatography Library* (Vol. 56, 347-374).

Orhan, F., Karakas, T., Cakir, M., Aksoy, A., Baki, A., and Gedik, Y. (2009). Prevalence of immunoglobulin E-mediated food allergy in 6–9 year old urban schoolchildren in the eastern Black Sea region of Turkey. *Clinical and Experimental Allergy*, 39(7), 1027-1035.

Özdemirli, N., ve Beştepe, S. K. (2022). Kavun Çekirdeği Şerbetinde (Sübye) Fenolik Bileşiklerin Biyoerişilebilirliğinin Değerlendirilmesi. *Gıda*, 47(6), 1130-1139.

Plank, J., Andres, P. R., Krause, I., and Winter, C. (2008). Gram scale separation of casein proteins from whole casein on a Source 30Q anion-exchange resin column utilizing fast protein liquid chromatography (FPLC). *Protein expression and purification*, 60(2), 176-181.

Prigent, S. V., Gruppen, H., Visser, A. J., Van Koningsveld, G. A., De Jong, G. A., and Voragen, A. G. (2003). 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(17), 5088-5095.

Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2866-2887.

Roberg-Larsen, H., Wilson, S. R., and Lundanes, E. (2021). Recent advances in on-line upfront devices for sensitive bioanalytical nano LC methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 136, 116190.

Roginski, H., Fuquay, J. W., and Fox, P. F. (2003). *Encyclopedia of dairy sciences. Volumes 1-4*. Academic press.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.

Šesták, J., Moravcová, D., and Kahle, V. (2015). Instrument platforms for nano liquid chromatography. *Journal of Chromatography a*, 1421, 2-17.

Shahidi, F., and Dissanayaka, C. S. (2023). Phenolic-protein interactions: insight from in-silico analyses—a review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 5(1), 1-21.

Shahidi, F., and Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21(9), 1216.

Sicherer, S. H., and Sampson, H. A. (2014). Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), 291-307.

Svec, F. (2004a). Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths. *Journal of separation science*, 27(10-11), 747-766.

Svec, F. (2004b). Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths. *Journal of separation science*, 27(10-11), 747-766.

Svec, F., and Fréchet, J. M. (1992). Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Analytical Chemistry*, 64(7), 820-822.

Şeker, S., Alharthi, S., and Aydoğan, C. (2022). Open tubular nano-liquid chromatography with a new polylysine grafted on graphene oxide stationary phase for the separation and determination of casein protein variants in milk. *Journal of Chromatography A*, 1667, 462885.

Talebi, M., Nordborg, A., Gaspar, A., Lacher, N. A., Wang, Q., He, X. Z., and Hilder, E. F. (2013). Charge heterogeneity profiling of monoclonal antibodies using low ionic strength ion-exchange chromatography and well-controlled pH gradients on monolithic columns. *Journal of Chromatography A*, 1317, 148-154.

Tang, K. S., Konczak, I., and Zhao, J. (2016). Identification and quantification of phenolics in Australian native mint (*Mentha australis* R. Br.). *Food Chemistry*, 192, 698-705.

Thongkaew, C., Gibis, M., Hinrichs, J., and Weiss, J. (2014). Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate–pectin coacervates. *Food Hydrocolloids*, 41, 103-112.

Maciel, E. V. S., de Toffoli, A. L., Sobieski, E., Nazário, C. E. D., and Lancas, F. M. (2020). Miniaturized liquid chromatography focusing on analytical columns and mass spectrometry: A review. *Analytica chimica acta*, 1103, 11-31.

Vermerris, W., and Nicholson, R. (2007). *Phenolic compound biochemistry*. Springer Science and Business Media.

Wilson, S. R., Olsen, C., and Lundanes, E. (2019). Nano liquid chromatography columns. *Analyst*, 144(24), 7090-7104.

Wu, X., Lu, Y., Xu, H., Lin, D., He, Z., Wu, H., and Wang, Z. (2018). Reducing the allergenic capacity of  $\beta$ -lactoglobulin by covalent conjugation with dietary polyphenols. *Food Chemistry*, 256, 427-434.

Xu, Z., and Howard, L. R. (Eds.). (2012). *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals*. John Wiley and Sons.



Xu, X., Liu, W., Liu, C., Luo, L., Chen, J., Luo, S., .and Wu, L. (2016). Effect of limited enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of rice glutelin. *Food Hydrocolloids*, 61, 251-260.

Yi, L., Piehowski, P. D., Shi, T., Smith, R. D., and Qian, W. J. (2017). Advances in microscale separations towards nanoproteomics applications. *Journal of Chromatography A*, 1523, 40-48.

Zajickova, Z. (2017). Advances in the development and applications of organic–silica hybrid monoliths. *Journal of separation science*, 40(1), 25-48.

Zeyrek, D., Koruk, I., Kara, B., Demir, C., and Cakmak, A. (2014). Prevalence of IgE mediated cow's milk and egg allergy in children under 2 years of age in Sanliurfa, Turkey: the city that isn't almost allergic to cow's milk. *Minerva Pediatrica*, 67(6), 465-472.

Zhang, H., Yu, D., Sun, J., Guo, H., Ding, Q., Liu, R., and Ren, F. (2014). Interaction of milk whey protein with common phenolic acids. *Journal of Molecular Structure*, 1058, 228-233.