

# Fermentasyon Teknolojisinde Katkı Maddeleri Kullanımının Saptanmasında İmmunolojik Yöntemlerden Yararlanma

Doç. Dr. Yılmaz SEKİN

*Türk Tuborg Bira ve Malt Sanayii A.Ş. — İZMİR*

Yrd. Doç. Dr. Necati AKBULUT

*Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi T.Ü.T. Bölümü — İZMİR*

İmmunolojik reaksiyonlardan salgın ve enfeksiyon hastalıklarla savaşmada önce tıpta yararlanılmıştır. Daha sonra başlı başına bir bilim dalı olarak gelişen immünoloji, sadece tıp, biyoloji, biyokimya değil, duyarlı ve spesifik tayinlerin gerektiği gıda bilimi alanında da kullanıma olanağı bulmuştur. Farklı protein yapılarından yola çıkarak yapılacak tayinler için spesifik antijen - antikor reaksiyonlarının yerini alabilecek kimyasal, fiziksel ya da enzimatik kökenli herhangi bir yöntem yoktur. İmmunolojik yöntemlerin, proteinleri ayırmada yararlanan fiziksel yöntemlerle -örneğin ultrantrifüjleme, elektroforez gibi - kombine edilmesi kullanıma alanlarını genişletmiştir. Bu yolla bir preparatın antijen'e dayalı safsızlıklarının kalitatif ve kantitatif tayini amacıyla birçok immunolojik yöntem geliştirilmiştir.

Bilindiği gibi besin maddelerine çoğunlukla ekonomik çıkar sağlamak amacıyla çeşitli ucuz ve fizyolojik değeri düşük katkı maddeleri katılmakta ve buna eski dilde (tağşiş) adı verilmektedir. Tağşişin belirlenmesi çok güç hatta çoğu kez olanaksızdır. İşte bu durumlarda immunolojik yöntemler tek yararlanılabilen yöntemler olmaktadır.

Besin analizlerinde immunolojik yöntemlerin kullanılmasına şu örnekler gösterilebilir;

- Et mamülllerinde protein katkıları örneğin soya proteini, kazein saptanması.
- Kıyma kontrolünde, domuz ve dana eti kıymalarının oranlarının belirlenmesi.
- Diyet besinlerde gluten/gliadin oranının saptanması.
- Kakao - çikolata kontrolünde, ötek, fıstık fıstık içinde yer fıstığı proteininin belirlenmesi.
- Yapay protein'in (Tek hücre proteini) belirlenmesi.

- Hububat ürünlerinden makarnada yumurta, yumuşak buğday gibi katkı maddelerinin nicel ve nitel yönden kontrolü
- Besin maddelerinde *Salmonella* türlerinin saptanması.

*Salmonella thyphimurium*'a karşı geliştirilen polivalent antiserumlar yardımı ile besin maddelerinde çok çeşitli *Salmonella* türleri saptanabilmektedir. Sütte *Staphylococcus aureus* tarafından oluşturulan enterotoksin bulunmuştur. Süt ürünleri içeren besin maddelerinde enterotoksin A, tavuk, ton balığı ve muz ezmelerinde ise enterotoksin B saptanmıştır.

— Meyve suyu teknolojisinde portakal ve limon şıralarının antigen farklılıklarının çok büyük olması nedeniyle piyasada satılan portakal şıralarının safiyetinin kontrolünde yararlanır.

— Çeşitli ülkelerde bira yapımında malt katkı maddeleri (pirinç, mısır, arpa, şeker v.b.) ve enzim preparatları kullanımı ya tamamen yasaklanmış ya da oranları belirtilmek suretiyle kullanımına izin verilmiştir. Malt katkılarından hangisinin ne oranda katıldığı, enzim preparatlarından hangi tipinin (proteolitik, amilolitik, sitolitik) ne miktarda kullanıldığı ancak immunolojik yöntemlerle belirlenebilmektedir. Bu anılan kontrol amaçları dışında arpa ve malthaki proteinleri, çimlenmede enzimlerde meydana gelen değişimleri ve birada köpük ve bulanıklık oluşumunda etkili olan protein fraksiyonlarını araştırmak amacı ile EBC tarafından immunolojik yöntemlerle çalışmalar organize edilmektedir (3, 5).

## İmmunolojik Reaksiyonların Mekanizması

İmmunolojik yöntemlerin asıl reagens'i **İmmun** ya da **Antikorp** = **Antiserum**'dur. Bu madde omurgalı hayvanların lenfatik organlarında oluşur ve doku içine ve kan dolaşım sistemine akıtılır. Bu oluşum ve salgılama ancak daha

önce organizmaya yabancı sayılabilecek antigen bir maddenin girmesi halinde ortaya çıkar. Antikorp'lar immunglobulin sınıfına girer ve sadece oluşumlarına neden olan antigen'lere karşı spesifiktirler başka hiçbir antigene karşı reaksiyon göstermezler.

Antigen'leri belirli bir madde grubuna sokmak olası değildir. Bunlara proteinler ve polisakkaridler dahildir. Ayrıca glikoproteinler ve glikopeptidler de antigen olabilirler. Kimyasal değişime uğramış antigenlerde vardır. Son zamanlarda geliştirilen teknikler sayesinde istenen herhangi bir molekülün protein veya sentetik bir polipeptide bağlanması mümkün olmaktadır. Gerçekten antigen olmayan bu maddeler (-bunlara Hapten denir-) aromatik halkalar, şekerler, steroidler, peptid'ler, pirimidin fluoresans bileşikler v.b. yapısında olabilir.

Antigen - Antikorp reaksiyonunda antikorp'un hücre agglutinasyonu mu yoksa presipitat şeklinde mi bağlanacağı antigen'e bağımlı olmaktadır. Antikorp antigene oranla nisbeten daha büyük parçacık halinde ise agglutinasyon söz konusudur. Presipitin oluşturacak antigenlerde ise genel olarak protein ve karbonhidrat çözeltileri söz konusudur.

Antigen ile antikorp arasında en kolay izlenen reaksiyon şayet çözünür antigen söz konusu ise - presipitasyon, şayet partiküler antigen ise - agglutinasyon'dur (2,3, 5).

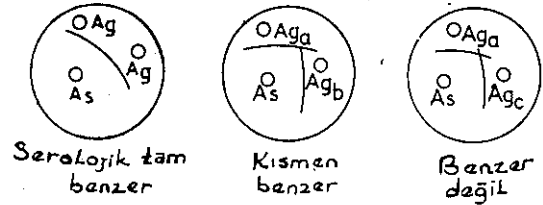
Bira kalitesi kontrolunda yararlanılan immunojik yöntemlerin esasını antigen ile gözle görülebilir agregat meydana getirmek suretiyle çözümlenmiş çökerek ayrılmaya dayalı presipitasyon reaksiyonu oluşturur. Bu nedenle burada değinilecek yöntemler presipitasyon reaksiyonuna dayalı yöntemlerdir.

Kalitatif tayinler, agar geldifüzyonu (bu yöntem Ouchterlony tekniği olarak da anılır) ve immuno-elektroforez tekniklerinden yararlanarak yapılır. Her iki yöntem de immunoji de geniş bir uygulama alanına sahiptir (1, 3, 5).

### Agar gel difüzyon yöntemi

Agar gel difüzyon yönteminde hem antigen hem de antikorp bir agar tabakası içinde birbirine doğru ilerler. Optimum antigen/antikorp ilişkisinin hakim olduğu yerlerde bir presipitasyon hattı oluşur. Bu nedenle bu olaya iki boyutlu çift difüzyon da denir.

Bu yöntemin en büyük yararı antigenlerin, kompleks karışımlar içinde tanınabilmesi ve tayin edilebilmesidir. Şekil 1'de farklı reaksiyonlar görülmektedir.

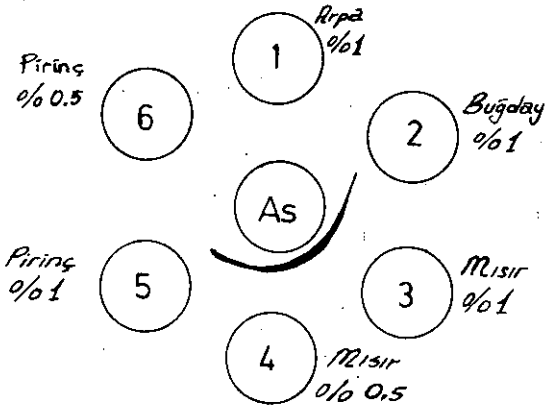


Şekil 1.

Lam üzerindeki çukurun içinde saf formda bir antigen varsa, antikorp ile bir presipitasyon çizgisi oluşturur. İki antigen serolojik olarak aynı değilse bunların oluşturduğu presipitasyon çizgileri birbirini kesmektedir. Kısmi bir identite söz konusu ise presipitasyon çizgileri kısmen iç içe geçmekte ve sadece sporn adı verilen kısa bir çizgi oluşumunu sürdürmektedir.

Serolojik spesifite yüksek duyarlılığına rağmen belirli sınırlara sahiptir. Her ne kadar proteinlerden pek azının kesin, detaylı strüktürü biliniyorsa da, bunların ait oldukları organizmanın çeşidine bağlı bir spesifiteye sahip oldukları da ortadadır. Aynı durum çeşitli hububatın proteinleri içinde geçerlidir, bunlar da türlere bağlı farklılıklar gösterirler.

Şekil 2'de arpa, buğday ve pirinç antigenleri ile doyurulduktan sonraki spesifik immuneserum'un mısır - antigeni ile verdiği reaksiyon görülmektedir. Şekilden izlendiği gibi mısır antikorp'u sadece kendi homolog reaksiyon partneri ile reaksiyona girmektedir.



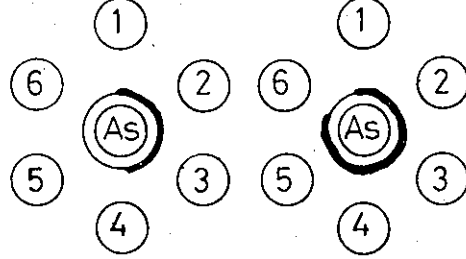
### İmmunelektroforez Yöntemi

Gel - diffüzyon teknikleri ile bütün presipitasyon çizgilerini tanılamak çoğunlukla güçtür. İmmunelektroforez yönteminde fiziksel ve immunolojik yöntemlerin kombinasyonu söz konusudur ve bu yöntemde diffüzyon dışında araştırılan maddenin elektroforetik mobilitesine dayalı olarak daha iyi ayrılması ve tanınması olasıdır.

### Maltlanmamış Hububat Katılıp Katılmadığının Saptanması

Şekil 3 bira yapımında mısır katkısının kontrolünün 2 değişik immunserum kullanılarak yapılışını göstermektedir. Deneyin duyarlığı serumun antikorptilerine bağlıdır. Şekilde sağ tarafta yer alan serum'un % 0.3 gibi konsantrasyondaki mısır antijeninin presipitasyonunu sağladığı halde öteki serum aynı şeyi yapamamıştır, yani ancak daha yüksek konsantrasyonlarda duyarlık göstermiştir.

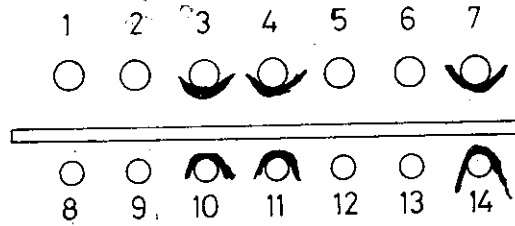
### AS 1 Agardiffüzyontest AS 2



Şekil 3. Agardiffüzyontest

(1'den 6'ya kadar örnek no'ları % 10'dan % 0.3'e kadar antikorptiter seyreltmelerini göstermektedir.)

Agargel - diffüzyonunda çok kullanılan tekniklerden biri de örnek konulan çukurcukların bir doğru boyunca dizilmesidir. Şekil 4'de 7 bira örneğinde pirinç katkısı kontrolü görülmektedir. Bu örneklerden üçünde katkı bulunmamaktadır.



Şekil 4. Pirinç katkısı kontrolü

1 - 7 ve 8 - 14 ile işaretlenmiş biralar birbirinin aynıdır. Aralarındaki tek fark serumun bulunduğu çukurcuk ile örneklerin bulunduğu çukurcuklar arasındaki mesafedir. Presipitat oluşumu antijen ile antikor arasındaki konsantrasyon farkının yüksek veya düşük oluşuna da bağlıdır (4, 5, 7).

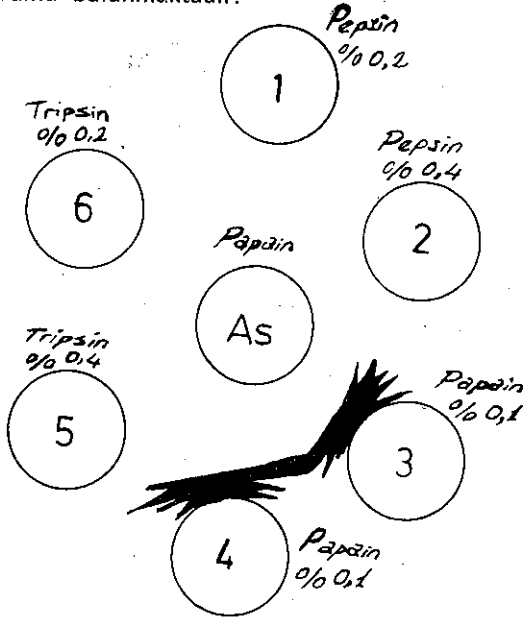
### Proteolitik Enzimlerin Saptanması

Biralara stabilizasyonunda ve berraklaştırılmalarında en doğal yol olarak, mekaniksel veya adsorbe edici etkiye sahip maddelerin, bulanıklığa neden olan maddeleri biradan çöktürüp ayırması kabul edilmektedir. Kimi ülkelerin gıda tüzüklerinde biralarda gerek stabilizatör ve gerekse berraklaştırıcı olarak kullanılacak maddeler konusunda sınırlamalar bulunmaktadır. Bunun yanında pek çok ülkede de biranın stabilizasyonu ve filtrasyonunda Papain, Ficin, Bromelin, Pepsin gibi preparatlar yaygın biçimde kullanılmaktadır.

Proteolitik enzimlerin bulunup bulunmadığı normal olarak enzim aktivitesi tayini ile belirlenebilir. Ancak pastörize edilen biralarda buna olanak yoktur. Stabilizatör olarak enzim preparatı kullanılmışsa biranın mutlaka pastörizasyonu gereklidir. Zira elde olunan stabilitenin korunması ve biranın biyolojik dayanıklılığının sağlanması ancak pastörizasyonla olasıdır.

İmmünojenik yöntemle yapılan kontrolde kullanılan enzimin aktivitesi üzerinden değil, strüktürü üzerinden gidilmektedir. Burada önemli olan nokta, kullanılacak antiserumların yan aktivitelere sahip olup olmadıklarının kontrolüdür. Bir başka deyişle bunlar arpa proteinleri veya diğer proteazlarla reaksiyona girmemelidirler (5, 6).

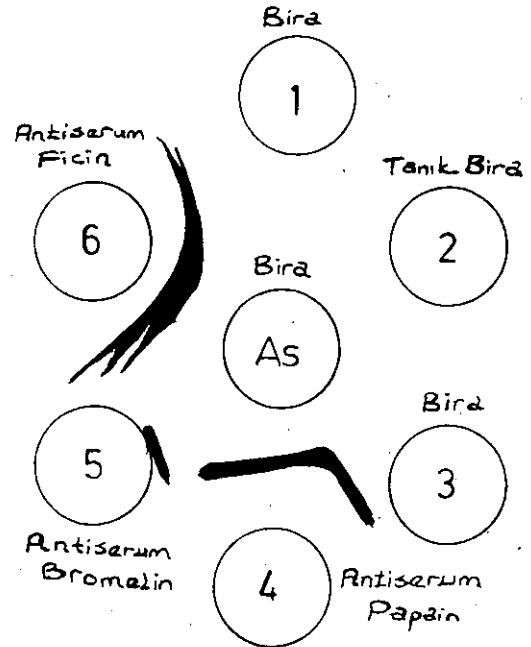
Şekil 5'de ortadaki çukurda Papain antiserumu bulunmaktadır.



Şekil 5. Papain kullanımı kontrolü

Etrafında ise Papain, Pepsin ve tripsin antijen olarak konulmuştur. Antiserum sadece 3 ve 4 numaralı çukurcuklara konulan Papain antijeni ile reaksiyon vermiştir. Serolojik identite belirgin olarak görülmektedir.

Şekil 6 Bromelin, Ficin ve Papain enzimlerinin bir bira örneğinde saptanmasını göstermektedir. Burada uygulanan presipitasyon teknikleri sayesinde -iyi antiserumlar da kullanı-Heidelberger'in presipitin analiz tekniğidir. Bu birleşmesi olasıdır.



### Kantitatif Tayin Yöntemleri

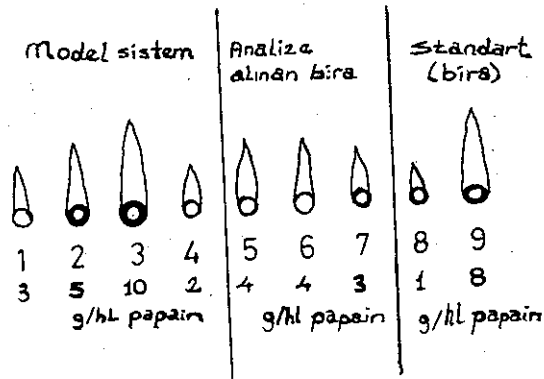
Bu yöntemlerde en eski ve en basit olanı Heidelberger'in presipitin analiz tekniğidir. Bu yöntemle Heidelberger ve ark. daha 1929'larda antijen - antikörper reaksiyonlarını duyarlı biçimde saptayabilmişlerdir. Kantitatif presipitasyon reaksiyonu sayesinde biyolojik sıvılardaki birçok protein belirlenebilmiştir.

Yeni kantitatif yöntemlerle çalışmalarda çoğunlukla monospesifik immünserum kullanmak zorunludur. Böyle bir serum'un elde edilebilmesi için ise antijen'in çok iyi arıtılmış olması ya da saf madde olarak bulunması ön koşuldur (5).

### Elektroimmundiffüzyon

Laurell tarafından geliştirilen bu kantitatif yöntemde, doğru akımın etkisi altında antijen anoda doğru agarosegel içindeki antiserum'a doğru çekilir. Böylece uzunlamasına çekilmiş

bir immunpresipitat oluşur. Bunun ucunda antijen'in elektroforetik hareketliliğine göre az veya çok sivri bir pik ortaya çıkar.



Şekil 7.

Şekil 8'de biranın protein fraksiyonları üzerine çeşitli stabilize edici maddelerin etkileri görülmektedir.

Örneklerden 1'den 4'e kadar olanlar % 4,3, 2, 1 oranında seyreltilmiş standart biralardır.

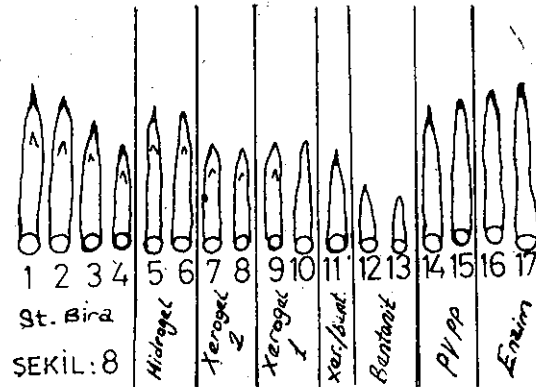
5 no'lu biraya	70 g/hl,	6 no'lu biraya	140 g/hl	Hidrojel,	
7 "	"	70 g/hl,	8 "	"	140 g/hl Xerogel 2,
9 "	"	70 g/hl,	10 "	"	140 g/hl Xerogel 1,
11 "	"	70/70 g/hl	Xerogel/Bentonit	karışımı,	
12 "	"	70 g/hl,	13 no'lu biraya	140 g/hl	Bentonit,
14 "	"	40 g/hl,	15 "	"	20 g/hl PVP
16 "	"	4 g/hl,	17 "	"	2 g/hl Enzim

katılmıştır.

Antiserum olarak stabilize edilmemiş bira kullanılmıştır. Şekil 8'de bentonit ile stabilize edilen 12 ve 13 no.lu örneklerde büyük moleküllü N'lu maddelerin en fazla tutulduğu, Hidrojel ile Xerogel uygulamasında da bu azalmanın daha düşük oranda olduğu izlenmektedir. Stabilize edici maddeyi 70 g/hl den 140 g/hl'ye yükseltmek stabilizasyon açısından çok az bir fark meydana getirebilmektedir.

1 ve 8 g/hl papain katılmıştır. 5 - 6 - 7 kontrol alınan örneklerdir ve bunlarda 4,4 ve 3 g/hl papain bulunmuştur.

Şekil 7 Biralarda elektroimmundiffüzyon yöntemi ile papain belirlenmesini göstermektedir. 1 - 4 nolu örnekler model örnek olup içlerine sırasıyla 3 - 5 - 10 ve 2 g/hl papain katılmıştır. 8 ve 9 no.lu örneklerde standart olup



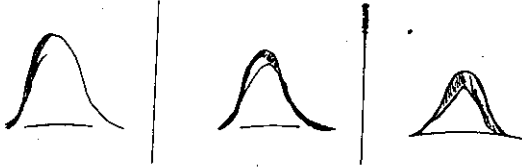
Şekil 8.

Burada standart olarak değişik oranlarda seyreltilmiş, stabilize edilmemiş (dialize edilmiş) bira kullanılmıştır.

### İki Boyutlu Elektroforez

Yukarıda anlatılan olay yani büyük moleküllü protein fraksiyonlarının etkilenmeleri iki boyutlu elektroforez ile de tayin edilebilir. İlk boyutta antikorp içermeyen agaroz-gel içinde elektroforetik ayırma yapılır. İkinci boyutta kantitatif olarak değerlendirilebilen immunpresipitasyon işlemi yapılır. Bu işlemde agaroz-gel'i oligospesifik veya polispesifik antiserum içerir.

Şekil 9'da stabilizatörün farklı dozlarının birada büyük molekülü protein fraksiyonları üzerine etkisi görülmektedir. Soldan sağa stabilizatörün dozu arttıkça, stabilize edici etkisinin de yükseldiği izlenmektedir (Büyük mol-N azalıyor). Birada malt katkı maddelerinin oranı da aynı biçimde belirlenebilmektedir.



Şekil 9.

#### Radioimmunoassay (RIA)

En duyarlı immunolojik yöntemdir. Biralarda enzim katkısı en sağlıklı olarak bu yöntem

le sağlanabilir.

RIA, Antigen - antikor reaksiyonunun yüksek spesifitesi ile radyoaktivite ölçmelerinin ekstrem büyük duyarlılığını biraraya getiren yöntemdir ve böylece en küçük miktarların bile saptanmasını mümkün kılar.

RIA yönteminde radyoaktif maddeler örneğin iyot 125 işaretleme maddesi olarak belirli bir antigene veya bir hormon ile reaksiyon veren maddeye (receptor) bağlanır.

RIA prensibi küçük antigen ve antikor miktarları arasındaki geri dönüşlü olabilen karşılıklı etkileşime dayanır.

Bu yöntemle birada papain, bromelin ve ficin gibi enzimler 10 - 25 ng/ml gibi çok düşük miktarlarda bile saptanabilmektedir.

#### KAYNAKLAR

- 1 — Baudner, S., Bonacker, L., 1971. «Immunologische Bestimmungsmethoden», Dt. Ges. f. klin. Chemie e.v. Mitteilungen 4, 78 - 90.
- 2 — Baudner, S., 1977, «Analysis of plant protein using immunological techniques based on the antigen - antibody precipitation» Annales de la nutrition et de l'alimentation, Vol. 31, No. 2, 165 - 178.
- 3 — Baudner, S., 1978, «Immunologische Lebensmittelanalytik. Begriffe - Methoden - Beispiele aus der Getreidelforschung», Getreide, Mehl und Brot 32, 330 - 337.
- 4 — Dondauser, S., 1976, «Die Anwendung immunologischer Methoden in der Brauerei - Analytik», Brauwelt No. 47, 1560 - 1566.
- 5 — Donhauser, S., 1981. «Immunochemische Methoden für die Qualitätskontrolle von Lebensmitteln», Brauwelt 440 - 446.
- 6 — Ehrendorfer, I., Günther, H.O. 1978, «Nachweis von Enzymen und Rohrucht in Bier» Brauwelt 3, 52 - 53.
- 7 — Schur, F., Andregg, P., Pfenninger, H., 1977, «Nachweis einer Mitverwendung von Gerstenmalzsurrogaten bei der Bierherstellung» Schweizer Brauerei - Rundschau, Nr. 11, 281 - 300.