

Süt ve Ürünlerindeki Protein Fraksiyonlarının Kapiler Elektroz (CE) İle Belirlenmesi

N.Barış TUNCEL

Onsekiz Mart Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü/Çanakkale

ÖZET

Süt proteinleri insan beslenmesinde vazgeçilmez olduğu gibi süt ürünlerinin üretimini ve kalitesini de doğrudan etkilemektedir. Bu proteinler başta kazein olmak üzere çeşitli serum proteinlerinden oluşur. Kazein proteini beyaz peynir ve bir çok değişik ürünün üretiminde birincil öneme sahiptir. Proteoliz sonucunda kazein fraksiyonlarında meydana gelen değişimler peynirde olgunlaşmanın bir göstergesi olarak yorumlanır. Bu değişimlerin izlenmesinde, süt ve ürünlerine yapılan hilelerin tespitinde, sütün orjini ve hayvan ırklarının genetik özelliklerin belirlenmesinde son yıllarda kullanılan yeni bir yöntem ise Kapiler Elektroz (CE) dir. Bu makalede çeşitli CE yöntemleri ile süt proteinlerinin fraksiyonlarına ayrılması ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Protein, Kapiler Elektroz, Süt ürünleri, Kazein

Separation of milk and milk products protein fractions by capillary electrophoresis

ABSTRACT

Milk proteins play several important roles in both milk products and human nutrition. They contain casein and whey proteins. Casein has an important role in production of cheese and other dairy products. Due to the proteolysis in cheese, ratio of protein fractions can change during ripening. Using capillary electrophoresis (CE) is a common method to determine the ratio of protein fractions, detection of adulteration, origin of milk and genetic varieties. In this review, separation of milk protein fractions with CE method and applications of CE for dairy products were covered.

Key Words: Protein, Capillary Electrophoresis, Milk, Casein

GİRİŞ

Süt, bir çok gıdaya göre yaşamsal besin öğelerinin tamamını içerdiğinden vazgeçilmez gıda maddesi olarak kabul edilir. Beslenme fizyolojisi açısından sütün önemli olmasının bir başka nedeni de bileşiminde kolaylıkla sindirilebilen ve esansiyel aminoasitlerin tamamını yapısında bulunduran, biyolojik değeri yüksek proteinleri içermesidir 1.

Süt proteinleri fizyolojik önemlerinin yanısıra teknolojik yönden de ayrı bir öneme sahiptir. Üretimi ve ürün kalitesini doğrudan etkiler. Örneğin bir süt proteini olan kazein, peynirin ana maddesini oluşturur. Peynir üretiminde randımanı doğrudan etkiler. İçme sütü, kurumaddede %3-3.5 protein içeriğine sahip olup bunun %80 ini kazein, %15 ini ise serum proteinleri (albumin, globulin, proteoz-peptonlar) oluşturmaktadır. Kazeinin başlıca 4 fraksiyonu bulunmaktadır. Bunlar s_1 , s_2 , ve kazein olup yaklaşık olarak sırasıyla 3.9: 1: 3.6 :1.3 oranlarında bulunur. Diğer kazein fraksiyonları ise çeşitli kimyasal tepkimeler ve proteoliz sonucunda oluşmaktadır. Belli başlı serum proteinleri ise -laktoglobulin ve -laktoalbumin dir 2.

Çeşitli süt ürünlerinin üretimi sırasındaki teknolojik işlemler kazeinin değişimine yol açar. Fermente süt mamülleri ve peynir imalatında kazeinin pıhtılaşması çok önemlidir. Peynir üretiminde sütü pıhtılaştırıcı proteolitik enzimler k-kazeinin spesifik peptid bağlarını proteolize ederek kazein misellerinin koagülasyonuna ve dolayısıyla da pıhtılaşmaya neden olur. Pıhtılaşma sonucunda kazeinin diğer fraksiyonları oluşur. Peynirin olgunlaşması sırasında proteolizin s_1 , s_2 , ve kazein üzerindeki etkilerinin takip edilmesi, olgunlaşma derecesi hakkında bilgi verir.

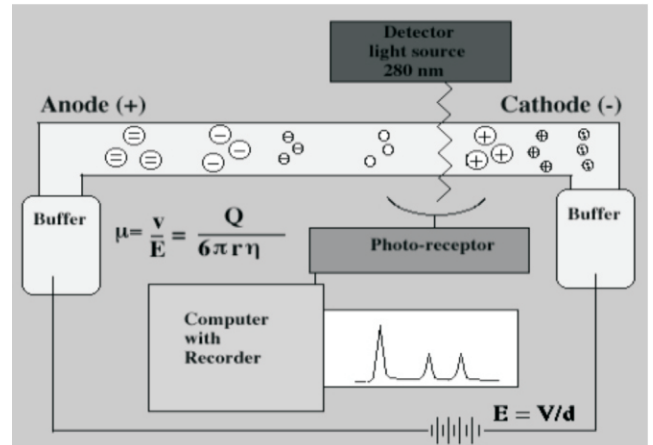
Günümüzde bu değişimlerin oran ve tipinin izlenmesinde çeşitli elektrozetik yöntemlerden (üre-PAGE ve SDS-PAGE) yararlanılmaktadır. Elektrozetik yöntemi ile süt ve ürünlerine uygulanan teknolojik işlemlerin (ısıtma işlemi, homojenizasyon) süt proteinlerine olan etkisinin izlenmesinde, sütün orjininin saptanmasında ve süt hayvanı ırkının genetik yapısının tespitinde kullanılabilir. Ayrıca ekonomik önemi olan sültere (keçi ve koyun) inek sütünün katılmasıyla yapılan tahşide kolaylıkla tespit edilmektedir. Bunun yanında PAGE yönteminin çeşitli sakıncaları vardır. Örneğin toksik bileşiklerin kullanılması, miktar belirlenmesi ve sonuçların yorumlanmasındaki zorluklar bu yöntemin olumsuz taraflarıdır. 3,4,5,6,7,8,9,10.

Kapiler Elektroz Prensibi

CE elektrokimya olduğu gibi yüzey etkisine oldukça bağlı bir yöntem olup, yüklü partiküllerin bir sıvı içerisinde ve elektriksel alan etkisi altında hareketlerini temel alır. Burada ayırım iki etkinin sonucunda olmaktadır. Bunlardan biri elektrozotik etki diğeri ise elektrozetik etkidir.

CE sistemi; içinde tampon çözeltinin bulunduğu bir kapiler kolon, dedektör ve okunan verilerin değerlendirildiği bir bilgisayar ortamından oluşmaktadır. Kapiler kolonun uzunluğu, çapı, tampon çözeltinin molaritesi ile kolona verilen elektrik akımının şiddeti çalışma süresini ve proteinlerin ayrışmasını etkilemektedir 11,12 .

Şekil 1.'de CE sisteminin çalışma prosedürü gösterilmiştir

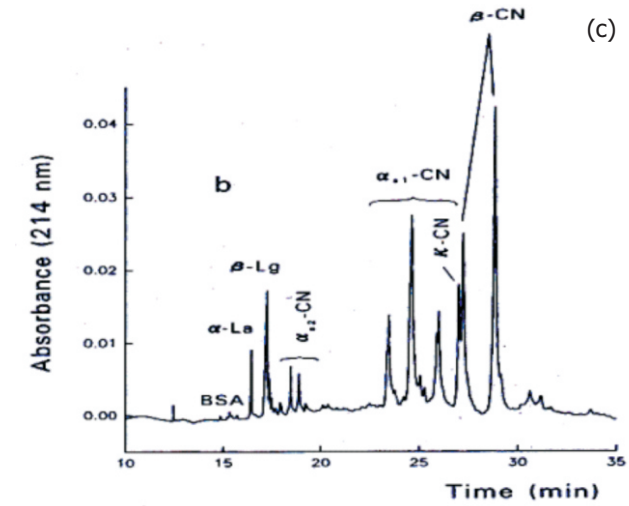
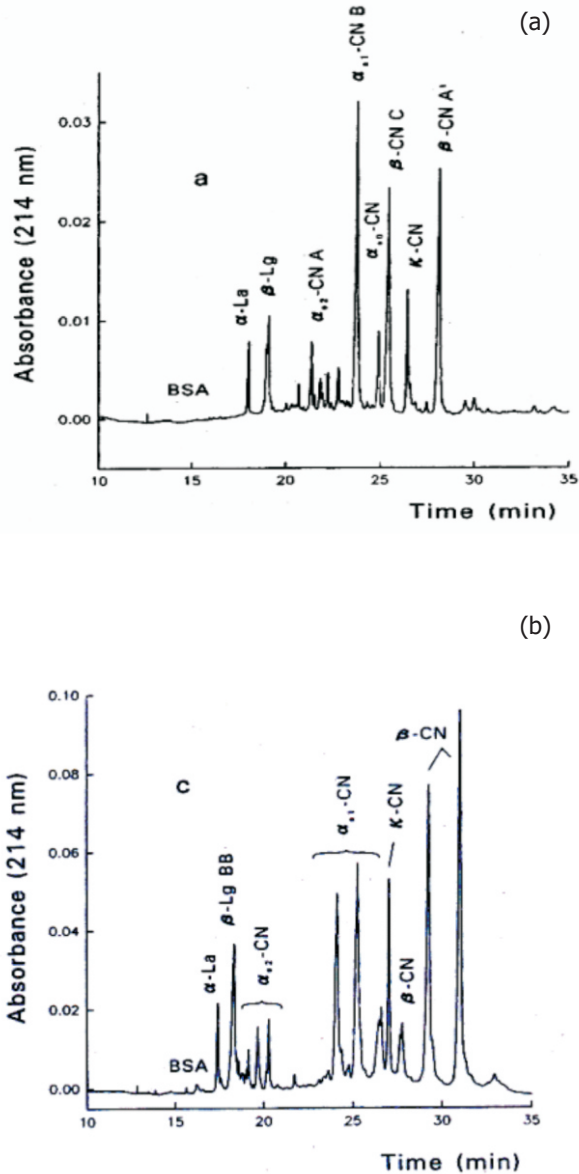


CE sistemine enjekte edilen ekstrakte edilmiş protein molekülleri elektroozmotik ve elektroforetik hareketliliğe göre katoda doğru hareket eder. Kolon ortamına bağlı olarak her bir protein molekülü hep aynı sürede pik meydana getirir. Her bir pik bir protein molekülünü temsil eder. Pik alanı ve yüksekliği o proteinin kantitatif özelliğini, bir başka deyişle de proteinin miktarını gösterir.

CE yöntemi, son yıllarda proteinlerin yapısını ve özelliklerini belirlemede Jel elektroforezi ve likid kromatografisi yöntemlerine alternatif olarak başarıyla uygulanmaktadır 13. Yüksek ayırma gücünün sağladığı hassas ölçüm, araştırmacıları bu yöntem üzerine yoğunlaştırmıştır 2. Yapılan araştırmalarda CE'nin süt ürünlerindeki proteinlerin belirlenmesinde hızlı ve yüksek ayırma çözünürlüğü sağladığı belirtilmektedir.

Süt Proteinlerinde Kapiler Elektroforez Uygulamaları

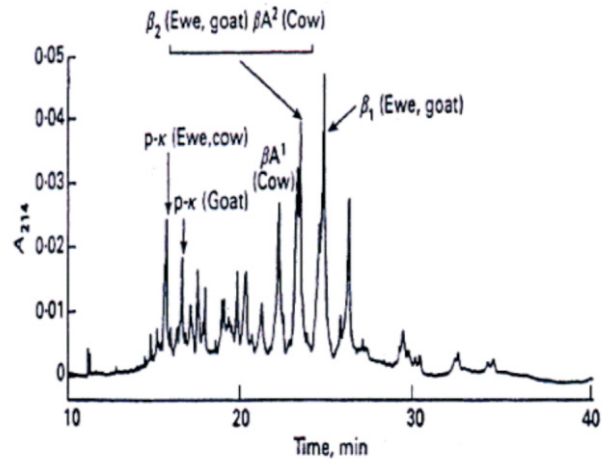
Yapılan araştırmalar bir çok CE yönteminin süt proteinleri fraksiyonlarının belirlenmesinde kullanıldığını bildirmektedir. Recio ve ark. (1997), Protein polimorfizmi, sıcaklığın süt proteinlerine etkisinin belirlenmesi, peynirdeki proteolizin izlenmesi ve süte yapılan hilelerin tespit yöntemlerini değerlendirmişlerdir (Şekil 2) 3.



Şekil 2. İnek (a), koyun (b) ve keçi (c) sütü örneklerine ait proteinlerin CE elektroforegramları (Recio ve ark., 1997)

Recio ve Olieman (1996), CE yöntemi ile laktasyon dönemi ve ırkların farklılığı gibi faktörlerin keçi sütlerindeki proteinlerin dağılımı üzerine etkisini CE yöntemi ile saptamışlardır. Protein fraksiyonlarının ayırmasının tekraredilebilirliğini ölçmüşler, göç zamanı değişiminin %0.08 olduğu mükemmel bir sonuç bulmuşlardır. Aynı metodu kullanarak peynirin olgunlaşması sürecinde kazein fraksiyonlarında meydana gelen değişimleri gözlemlemişlerdir 14.

Molina ve ark (2000), eşit miktarda karıştırılan keçi koyun ve inek sütlerinden yapılan peynirdeki kazein proteinleri ile parçalanma ürünlerinin ayırmasını ve tanımlanmasını CE yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir 15. Bununla ilgili elektroforegram Şekil 3.'de gösterilmiştir.



üretilen peynirin kazein proteinlerinin CE elektroforegramı.

Madsen ve Qvist (1997), hidrolize olmuş süt proteinlerinin ayrıştırılmasında pH 2.0 'lık 100 mM fosfat tamponu ve 18 kV akım kullanmışlardır. Bir başka çalışmada Vallejo-Cordoba (1998), poliakrilamid kaplı kapiler kolon içinde tampon çözelti olarak %0.1 Tween 20 ve 4 M üre bulunan 50 mM fosfat tamponu (pH 2.2) kullanmış ayırım 20 kV akım altında gerçekleştirmiştir. Süt proteinlerin göç zamanının tekraredilebilirliğinin iyi olduğunu, standart proteinlerde farkın %1 den, süt proteinlerinde ise %2 den az, kantitatif tekraredilebilirliğinde iyi olduğunu belirlemiştir 4.

GarciaRuiz ve ark. (1999), süt serum proteinlerini ve soya proteinlerini eşzamanlı olarak, içinde 1 M üre ve metilhidroksietilselüloz bulunan 50 mM fosfat tamponu içerisinde (pH 8.0) 15 kV voltaj altında başarıyla ayırmışlardır 7.

Cartoni ve ark. (1999), keçi sütlerinden yapılan süt ürünlerine hile amacıyla katılan inek sütlerinin miktarının belirlenmesinde metil-silanize kapiler kolon içerisinde borat tamponu (pH 9.2) olan CE sistemini kullanmışlardır. Bu yöntemde inek sütünün tanımlanmasında temel serum proteinlerinin oluşturduğu kalibrasyon kurveleri kullanılmıştır. Tespit edilebilen minimum inek sütü değeri peynirlerde %4, süt karışımlarında ise %2 olarak belirtilmiştir. Ayrıca inek-keçi-koyun ve keçi koyun sütü karışımlarında kalitatif analizler yapılmıştır 6.

Herrero-Martinez ve ark. (2000), İspanyada satılan keçi ve koyun sütlerinde inek sütünün olup olmadığını, ayrıca bu sütlerle yapılan peynirlerde bulunan serum proteinlerini asidik izoelektrik tampon kullanarak CE ile incelemişlerdir. Keçi ve koyun sütlerine %1 inek sütü karıştırılsa bile bunun tespit edilebileceğini belirtmişlerdir 16.

Strickland ve ark. (2001), Süt ürünlerinde protein ve

peptidlerin kalitatif ve kantitatif analizlerini iki ayrı yöntem kullanarak CE'de uygulamışlardır. Birinci yöntemde, polimer kaplanmış kapiler kolon içerisine 4 M üre ilaveli sitrat-fosfat tamponu (pH 3.3), ikinci yöntemde ise kapsız kapiler kolon içerisinde sitrat-fosfat tamponu (pH 2.8) kullanılmıştır. Birinci yöntemde sütteki peptid ve proteinlerin kalitatif ve kantitatif tayinlerini, ikinci yöntemde ise peynirlerde kazeinden türemiş peptidlerin analizlerini başarı ile uygulamışlardır 2.

Izawa ve ark. (1997), Gouda peynirinin üretimi esnasından olgunlaşma periyodu boyunca protein fraksiyonlarındaki değişimi incelemiş, -S ve -S₁ kazein, olgunlaşma sürecinde en erken parçalanma göstermiş ve 84 günlük olgunlaşma sürecinde %90'ının parçalandığını belirlemişlerdir. Buna karşın -S₂ kazeinin %38'i, -A₁ kazeinin %67'si ve -A₁ kazeinin %84'ünün parçalanmadığını bulmuşlardır. Para-kappa kazein'in kappa kazeinden rennet enzimi aktivasyonu nedeniyle azda olsa parçalandığı görülmüştür. Olgunlaşma boyunca iki ana kazeinin parçalanma ürünleri gözlemlenmiştir. -S₁-I / -S₁ kazeinin oranı ve olgunlaşma periyodu arasındaki yüksek korelasyon katsayısının, peynirin olgunluk haline dair hüküm veren bir parametre olduğunu bulmuşlardır 17.

Tablo 1. Süt ve Süt Ürünlerinin protein fraksiyonlarının ayrılmasında kullanılan bazı CE yöntemleri 3.

Protein	Analiz özelliği	Kapiler kolon özelliği	Yürütme tamponu	Uygulamalar
α -La, β -Lg A ve B α_s ve β kazein	Pik Alanından miktar tayini yapılır	Fused-silica kapiler	0.5 M fosfat tamponu (Ph 6.0-9.0) ve 4 M üre veya deęil	Sütün taze mi yoksa süt tozundan sulandırılarak mı yapıldığı tespit edilir. β Kazein/ α -La oranından tespit edilir.
α -La, β -Lg, α_s ve β kazein	Miktar tayini yapılamaz	Kaplı-silica kapiler	250 mM borat tamponu (pH 10)	Süt ve yumurta proteinlerinin kalitatif analizi yapılır
Major kazein fraksiyonları ve hidroliz ürünleri	Miktar tayini yapılamaz	Kaplı-silica kapiler	0.1 M fosfat tamponu, 4 M üre (pH 7.3)	Kazein hidrolizinin gözlemi yapılır
α -La, β -Lg A ve B, BSA ve major kazein fraksiyonları	Miktar tayini yapılamaz	Nötral hidrofilik kaplı kapiler	10 mM sodyum fosfat tamponu,%0.05 MHEC, 6M üre (pH 2.5) ve 10 Mm sodyum sitrat tamponu, ,%0.05 MHEC, 6 M üre (pH 2.45)	İnek, keçi ve koyun sütlerinin proteinlerinin ayrılması ve genetik özelliklerinin tespiti.sıcaklıkla parçalanana kazeinler. İnek keçi, koyun ve insan sütlerinin kalitatif analizi.
α -La, β -Lg A ve B ve koyun sütünün major kazein fraksiyonları	Miktar tayini yapılamaz	Nötral hidrofilik kaplı kapiler	20 mM sodyum sitrat tamponu,%0.05 MHEC, 6 M üre (pH 3.0)	Koyun sütü proteinlerinin ve bazı genetik çeşitliklerin kalitatif analizi
α -La, β -Lg A, BSA ve major kazein fraksiyonları	0.5 mg/100 ml α -La, 6.5 mg/100 ml β -Lg hassasiyette miktar tayini yapılır	Nötral hidrofilik kaplı kapiler	20 mM sodyum sitrat tamponu,%0.05 MHEC, 6 M üre (pH 3.0)	Koyun, keçi ve inek sütlerinde Kazein fraksiyonlarının ve genetik çeşitliklerin belirlenmesi, kazeinin proteoliz ürünlerinin belirlenmesi
α -La, β -Lg A, B, IgG ve BSA	Her serum proteini için ayrı standart kurve çizilir. Miktar tayini yapılır	Fused-silica kapiler	ProSort SDS-Protein analiz kiti	Serum proteinlerinin miktarlarının belirlenmesi
α -La, β -Lg A, B ve BSA	0.4mg/100 ml β -Lg A, 0.4 mg/100 ml β -Lg B hassasiyette miktar tayini yapılır	Fused-silica kapiler	100 mM borat tamponu (pH 8.2) ile 30 mM sodyum sülfat	UHT sütlerin depolanması sırasında serum proteinlerin miktarlarındaki değişimlerin belirlenmesi

SONUÇ

CE sistemi ile süt proteinleri diğer elektroforetik yöntemlere göre hızlı ve yüksek ayırma çözünürlüğü sağlanmaktadır. Dijital okuma yöntemi ile proteinleri fraksiyonlarına ayırması sonuçların güvenilir olmasını sağlar. CE pahalı bir cihaz olmakla beraber, üre-PAGE ve SDS-PAGE yöntemlerine göre son derece az kimyasal madde sarfiyatının yanında, çalışanları solventlerin toksik etkilerinden en az düzeyde etkiler. Bu özellikler dikkate alındığında CE; süt proteinlerinin fraksiyonlarına ayrılması, süt hayvanı ırklarının belirlenmesi, süt ve peynire yapılan hilelerin hassasiyetle tespit edilmesi ve sütlerin teknolojik özelliklerinin ortaya çıkartılması gibi amaçlar için son derece kullanışlıdır.

KAYNAKLAR

1. Metin, M. 1996. Süt Teknolojisi. E.Ü. Mühendislik Fakültesi Yayın No:33, 1. Bölüm, 3. Baskı, İzmir.
2. Strickland, M., Johnson, M.E., Broadbent, J.R. 2001. Qualitative and quantitative analysis of proteins and peptides in milk products by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 22, 1510-1517.
3. Recio, I., Amigo, L., Lopez-Fandino, R. 1997. Assessment of the quality of dairy products by capillary electrophoresis of milk proteins. *Journal of Chromatography B*. 697, 231-242.
4. Madsen, J.S., Qvist, K.B. 1997. Hydrolysis of milk protein by a *Bacillus licheniformis* protease specific for acidic amino acid residues. *Journal of Food Science*. 62, 579-582.
5. Vallejo-Cordoba, B. 1998. Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by capillary electrophoresis. *Journal of Capillary Electrophoresis*. 5, 219-224.
6. Cartoni, G.P., Coccioli, F., Jasionowska, R., Masci, M. 1998. Determination of cow milk in buffalo milk and mozzarella cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. *Italian Journal of Food Science*.

10, 127-135.

7. Garcia-Ruiz, C., Torre, M., Marina, M.L. 1999. Analysis of bovine whey proteins in soybean dairy-like products by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 859, 77-86
8. Recio, I., Garcia-Risco MR, Amigo L, Molina E, Ramos M, Martin-Alvarez PJ. 2004. *Journal of Dairy Science*. 87 (6): 1595-1600
9. Cartoni, G.P., Coccioli, F., Jasionowska, R., Masci, M. 1998. Determination of cow milk in ewe milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. *Italian Journal of Food Science* 10, (4), 317-327.
10. Garcia-Risco, M.R, Molina, E., Ramos, M., Lopez-Fandino, R. 2000. Capillary electrophoresis and Western blotting detection of ovine and caprine cheese whey added to bovine milk. *Milchwissenschaft*, 55 (10): 555-559.
11. Watzig, H. and Dette, C., 1993. Precise quantitative results by capillary electrophoresis (CE): Instrumental aspects. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 345, 403-410.

12. Li, S.F.Y. 1994. *Capillary Electrophoresis*, Elsevier Co., Amsterdam

13. Otte, J., Zakora, M., Kristiansen, K.R., Qvist, K.B. 1997. Analysis of bovine caseins and primary hydrolysis products in cheese by capillary zone electrophoresis. *Lait*. 77, 241-257.
14. Recio, I., Olieman, C. 1996. Determination of denatured serum proteins in the casein fraction of heat-treated milk by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. 17, 1228-1233
15. Molina, E., Frutos, M.D., Ramos, M. 2000. Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cows', ewes' and goats' milks. *Journal of Dairy Research*. 67, 209-216.
16. Herrero-Martinez, J.M., Simo-Alfonso, E.F., Ramis-Ramos, G., Gelfi, C., Righetti, P.G. 2000. Determination of cow's milk in non-bovine and mixed cheeses by capillary electrophoresis of whey proteins in acidic isoelectric buffers. *Journal of Chromatography A*. 878, 261-271.
17. Izawa, N., Izumi, T., Asakawa, S., Hayashi, K. 1997. Application of capillary electrophoresis to the study of proteolysis during ripening of Gouda-type cheese. *Journal of The Japanese Society for Food Science and Technology*. 44 (12): 871-876.

V. ULUSLARARASI BESLENME ve DİYETETİK KONGRESİ

V. INTERNATIONAL NUTRITION and DIETETICS CONGRESS

12-15 Nisan 2006
April 12-15, 2006

Hacettepe Üniversitesi Kültür Merkezi
Hacettepe University Cultural Center

Bilimsel Sekreteryä

Prof. Dr. Gülden Pekcan - Prof. Dr. Yasemin Beyhan
Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü
TEL: +90 312 311 96 49 FAX: +90 312 309 13 10

eposta:

ybeyhan@hacettepe.edu.tr
gpekcan@hacettepe.edu.tr