

KAZEİN : Kolloidal Yapıya Giriş

Araş. Gör. Uz. Yaşar Kemal ERDEM

H.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü — ANKARA

1. GİRİŞ

İnek sütünün yaklaşık olarak 5,3 g/kg kadar azot içerdiği bilinmektedir. Sütün yapısındaki azotun % 95 (3,2 g/kg) kadarı proteinlerin bileşiminde yer almaktadır. Süt proteinlerinin % 80 (2,6 g/kg) kadarını ise KAZEİNLER oluşturmaktadır.

İnek sütünde misel formunda yer alan kazein, süt proteinlerinin çoğunu kapsayan ve sütün bileşiminde yer alan kalsiyum ve fosfatın da önemli bir kısmını yapısında bulunduran karmaşık partiküllerdir. Çok büyük boyutlu olmalarının karşın görünürlüklerinin çok düşük olması ve yapılarında üst düzeyde çözünmez olan kalsiyum, fosfat, vb. bazı öğeleri bulundurmaları, kolloid kimyacıların ilgisini çekmektedir. Sütte yer alan kazein, 100 µm ortalama boyuta sahip kolloidal partiküller olarak karşımıza çıkmaktadır (PAYENS, 1982). Soğutulmamış sütte kazeinin hemen tamamı 0,02 - 0,3 µm çapında, 20 - 150.000 adet kazein molekülü içeren pürüzlü, küresel partiküller durumundadırlar. Bumiseller 8 g/100 g kazein kadar çoğu kalsiyum fosfat olmak üzere 212 inorganik öğeler içermektedir (WALSTRA ve JENNES, 1984). Günümüzde doğal ve yapay kazein misellerinin her ikisinde de yer alan bu inorganik bileşenin trikalsiyum fosfat konumunda olduğu ve misellerin protein bileşenini kısmi olarak kaplayarak, kolloidal kararlılığına katkıda bulunduğu genel kabul görmektedir (PAYENS, 1979; PAYENS, 1982; WALSTRA ve JENNES, 1984; SCHMIDT ve PAYENS, 1976).

Kazein partikülleri, boşluklar içeren bir yapı sergilemektedir ve misel formu ile kazein moleküllerinden görece fazla su tutmaktadır. Ayrıca düşük niceliklerde de olsa süt lipazı, plazmin, proteozpepton fraksiyonlarının da bir kısmını yapılarında bulundurmaktadırlar.

2. KAZEİN MİSELLERİNİN YAPISI NEDİR?

Biyolojik sıvılardaki proteinlerin büyük bir kısmı monomerik ya da ligomerik bir yapı sergilemektedirler. Oysa doğal kazein belirgin bü-

yüklüğü ile kolloidal bir partikül olarak karşımıza çıkmaktadır (SCHMIDT ve PAYENS, 1976; WALSTRA ve VLIET, 1986; PAYENS, 1979). Kazeinin protein yapısı genelde miseller olarak tanımlanmaktadır ve bu misellerin integrasyonunda inorganik bileşenlerin çok büyük öneme sahip olduğu uzun yıllar önce ortaya koyulmuştur (PAYENS, 1978). Sayılı elektro mikroskopik çalışmalar sonunda doğal ve yapay kazein misellerinin uniform bir yapı göstermediği, yüzlerce alt birimden (sub-miseller) oluştuğu ve görece büyük misellerde bu sayının binlere ulaştığı bildirilmiştir (SCHMIDT ve POLL, 1986). Elektronmikroskopi ve dializ yöntemleri ile çalışan SCHMIDT (1980) sözü edilen submisellerin, misel içerisinde kolloidal fosfat ile birarada tutulduğunu ortaya koymuşlardır. Benzer bir gözlem, kolloidal fosfat içermeyen süt ile orijinal sütü karşılaştıran MCGANN ve PYNE (1959) tarafından daha önce de bildirilmiştir (PAYENS, 1979). Uygun protein matriksine sahip olan submisellerin 250.000 dalton kadar bir partiküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmiştir (SCHMIDT ve POLL, 1986). Submisellerin genelde hidrofobik bağlar ile bir arada tutulan 10 - 12 altbirimden oluştuğu savunulmaktadır (SCHMIDT ve PAYENS, 1976; PAYENS, 1978). Bu model, daha önce MORR (1967) ve ROSE (1969) tarafından bildirilen modelden (PAYENS, 1976; SCHMIDT ve PAYENS, 1986) çok büyük bir sapma göstermektedir. Ancak günümüzde PAYENS (1978), SCHMIDT (1980), WALSTRA ve VLIET (1986) in çalışmalarından türetilen model genel kabul görmektedir. Bu modele ilişkin en belirgin sapmaları özetleyecek olursak: (1) Submisellerin varlığı, 15 - 20 µm çapında ve asal olarak hidrofobik bağlar ile tuz köprüleri tarafından bir arada tutulan birkaç farklı kazein molekülü içerirler. (2) Temelde iki farklı submiselin varlığı, kappa - kazein içeren ve içermeyen. Kappa - kazein içerenlerde bu fraksiyonun kazeinomakropeptid (CMP) kısmı, submiselin yüzeyinden seruma doğru «saç» şeklinde uzanır. (3) Kappa - kazeinin baskın olarak miselin dışında yer alması, bu bağlamda birbirlerine yakın olan

miseller arasında sterik ve elektrostatik bir itme gelişir.(4) Submiseller asal olarak kolloidal kalsiyum fosfat (CCP) tarafından bir arada tutulurlar.

Çalışmanın bundan sonraki açıklamalarında kazein, bu model çerçevesinde tartışılacaktır.

Belirli bir derişimdeki tam (Whole) kazeinin pH ve iyonik direnci doğal ve yapay sistemlerde önemli bir farklılık göstermemektedir, ancak yapay sistemdeki göreceli olarak düşük Ca^{+2} aktivitesi ve küçük boyutlu topraklar şeklinde karşımıza çıkar. Boyutlarına ilişkin öne nürülen görüşlerde birliktelik yoktur. Çapının 10-20 μm , moleküller ağırlığının ise 250.000-2.000.000 dalton arasında olduğu bildirilmektedir (WALSTRA ve JENNES, 1984). Bu bağlamda miseller 10-100 arasında değişen sayıda kazein molekülü i;erebileceklerdir. Topakları, globüler proteinlerde olduğu gibi hidrofobik bir öze sahiptir, bu da çevresi hidrofilik bir dış katman ile çevrili yapıyı ortaya koyar. Bu hidrofilik (liyofilik) dış katman, asidik (karboksilik veya fosforik) grupları yapısında bulundurur, tam kazeinin submiseller olarak anılan bu topraklarının her biri farklı kazein molekülleri içerir. Misellerde fraksiyonların yer alma oranının alfa - s_1 : (beta + gama) : kappa : alfa - s_2 = 8 : 8 : 3 : 2 şeklinde olduğu bildirilmektedir (WALSTRA ve JENNES, 1984).

Kappa-kazein sütte, birbirine kovalent (-S-S-) bağlar ile bağlanmış birkaç molekülü içeren bir oligomer yapıdadır. Submiseller, bu fraksiyonu içerenler ve içermeyenler olarak ikiye ayrılır. Ortamdaki Ca^{+2} aktivitesinde artış olması durumunda fraksiyonların ve submisellerin bir araya gelme olasılığı çarpıcı bir biçimde artmaktadır. Bu etkileşimde kalsiyum fosfat birleştirici ajan olarak rol oynamaktadır, ancak diğer bağlanma biçimlerinin de yer aldığı bilinmektedir, yalnızca protein-protein bağlanmaları yer almayabilir. Buna ek olarak van der Waals çekmelerinin de belirli bir değere sahip olduğu öne sürülmektedir (PAYENS, 1978)

Kazein misellerinin belirli bir su tutma kapasitesine sahip olduğu, kolloid biliminin te-

rimleri ile bir hidrodinamik ve internal hacimsellikleri sözkonusudur. Literatür, kazein miselinin 4,4 ml/g gibi yüksek bir hacimsellik gösterdiği belirtmektedir. Ancak BLOOMFIELD ve MORR (1973) hidrodinamik hacimselliğinin 3,7 ml/g proteine eşdeğer olduğunu öne sürmektedir (PAYENS, 1978). WALSTRA ve VLIET (1986) ise internal hacimselliğinin 2,2 ml/g, hidrodinamik hacimselliğinin ise 3,9 ml/g olduğunu bildirmektedir.

3. KAZEİN MİSELLERİNİN KOLLOİDAL KARARLILIĞI

Miselin kolloidal kararlılığı üzerinde koruyucu rol oynayan kappa-kazeinin C-terminali aşırı hidrofilik özellik gösterir, özellikle karbohidrat içeren moleküller bu özellik üzerinde etkilidir. Ayrıca bu terminal (uç), belirgin bir negatif yüke sahiptir. Ortam sıcaklığının düşürülmesi, miselde yer alan beta-kazeinin büyük bir kısmının, kappa-kazeinin de bir kısmının CCP'sinin dissosiyasyonuna yol açacağı ve bunun, misellerin ortalama boyutunda azalmaya (SCHMIDT ve POLL, 1986) ve hacimselliğinde artmaya neden olacağı öne sürülmektedir. Bu misellerin ise her türlü flokulasyona karşı kararlı olacağı bildirilmektedir (WALSTRA ve JENNES, 1984). Kolloidal kararlılıktaki artış cıasılıkla (beta-kazeinin) polipeptid zincirlerinin kısmi olarak misel yüzeyinde seruma çıkarak hidrodinamik hacimselliğini ve sterik itmeyi arttırmamasından kaynaklanacaktır.

Sütün asitlendirilmesi de CCP dissosiyasyonuna neden olur (HOOYDONK ve ark. 1986). pH 5,0'da CCP tamamen miselden uzaklaşmış olur. Bunun yanısıra pH 5,4 dolayında maksimum olmak üzere kazein fraksiyonlarının da miselden dissosiyasyonu söz konusudur (beta, kappa, alfa - s_1 sırasıyla), dissosiyasyon pH 4,6'da sifıra iner. Günümüzde kazein misellerinin eklenen elektrolite karşı gösterdiği tepkinin Schulze-Hardy Yasası'na uyum göstermediği ve kazein misellerinin gerçek liyofobik kolloidlerden farklı olduğu bilinmektedir. Ortama NaCl eklenmesi durumunda (1 M'a kadar) miselde bir Ca-Na değişimi olduğu ve bunun da flokulasyonu engellediği bildirilmektedir (PAYENS, 1979).

Schulze - Hardy Yasası; 1-1'lik bir elektrolit varlığında 50 mM ve 2-1'lik elektrolitle 1 mM dolayındaki tuz derişimlerinde başlayan hızlı bir kaugulasyonu öngörür. Bu olay serbest Ca^{+2} derişiminin 2,5 mM ve iyonik direncin normalde 0,075 M olduğu sütte (PARRY, 1974) kazein misellerinde gözlenmez. Kazeinin elektrokratik doğasını tanıda izoelektrik presipitasyonu yeterli değildir. Doğal olarak proteinlerin izoelektrik noktadaki çözünürlüklerinin minimuma inmesi kazeinleri de kapsamaktadır, ancak misel için bu kavram makromoleküller çözeltilerin termodinamikleri ile açıklanmalıdır.

Kazeinin bu yüzyılın başlarından beri bilinen bir kolloidal kararlılığı sözkonusudur. Bu olay ilk kez FREUNLICH (1932) tarafından açıklanmıştır (PAYENS, 1979). Bir liyofobik kolloidin kararlılık gücü genelde altın - sayısı adıyla anılan bir ölçüm ile belirlenir. Bu denemede 10 ml'lik bir altın çözeltisinde (0,05 - 0,06 g Au/l), 1 ml % 10'luk NaCl eklenerek liyofilik kolloidin flokulasyonunun önleme boyutu belirlenir. Liyofobik kolloidlerin altın - sayısı değerleri incelenecek olursa, kazeinin görece kararlı olduğu görülecektir. Kazein/Au oranı (ağırlıkça) 0,01'ken miseldeki kazein/kolloidal fosfat oranı 15 dolayındadır. Bu sonuç sürpriz değildir çünkü bu bağlamda misel, anılan elektrolit karakteri ile liyofobik kolloidden çok bir protein yapısı sergilemektedir. Buradaki kararlılık görüngüsü liyofobik partikülün tamamen liyofilik maddelerce kaplanması yaklaşımı ile açıklanamaz. Çünkü CCP'nin ayrılması ve yapıya yeniden girmesi süt serumunun iyonik kompozisyonundaki derişimlerce kolaylıkla regüle edilebilmektedir. Kolloidal etkinlik ya da «sterik stabilizasyon» kavramına ilişkin ilk gerçekçi yaklaşım NAPPER (1977) tarafından ortaya atılmıştır (PAYENS, 1979). Araştırmacıya göre liyofobik kolloidin tamamen liyofilik madde tarafından kaplanmasının bir zorunluluk olmadığı görüşü geçerlidir. Ayrıca MCGANN ve FINE (1959) ile SAITO (1973)'ün çalışmaları sonucu, misele beta -kazein bağlanması ile CCP varlığı arasında dolaylı bir ilişkinin var olduğu ortaya çıkmıştır. Hem misel entegrasyonu hem de miselden beta -kazein dissosiyasyonu CCP tarafından engellenmektedir (PAYENS, 1979).

Misellerin kalsiyum fosfat içeriği ısıtmanın etkisi ile artar, pH'nın düşmesi ile azalır. Misellar kalsiyum fosfatın yapıdan uzaklaşması, misellerin daha küçük birimlere ayrılmasına yol açar.

Süte yüksek basınç uygulanması - örneğin, 100 MPa, 1 saat - miselin submisellerine geri dönüşümsüz olarak ayrılmasına neden olur. Bunun olası nedeni kalsiyum fosfattan hidroksiapatit oluşumudur. Sıcaklığın düşürülmesi - örneğin 5°C'a - kazein misellerinin hidrofobik etkileşimlerini zayıflatır ve özellikle beta -kazeinin dissosiyeye olmasına neden olur. Ancak daha önce de belirtildiği gibi bu etki hacimselliği artırır.

Kolloid kimyasından ve yukarıdaki açıklamalardan, kazeinin kolloidal kararlılığının çok karmaşık bir kavram olduğu ortaya çıkmaktadır. Kazein misellerinin kararlılığını etkileyen en belirgin etkenler özetlenecek olursa :

(1) Tuz bileşimi; serumun Ca^{+2} aktivitesini ve misellerin kalsiyum fosfat içeriğini etkiler. Örneğin $CaCl_2$ eklenmesi Ca^{+2} aktivitesini ve miseller kalsiyum fosfatı artırır ve pH'yı düşürür. Bu derişimlerin hepsi kararlılık üzerinde belirleyicidir. NaCl eklenmesi iyonik direnci arttıracaktır ancak misellerin kalsiyum fosfat içeriğini düşürecektir bu da çoğu zaman kararlılığı artırır. Sodyum sitrat katımı kararlılığı artırırken, sodyum fosfat eklenmesi Ca^{+2} aktivitesini düşürür, miseldeki fosfatı artırır ve pH'yı da etkileyebilir.

(2) pH'nın düşmesi öncelikle kolloidal kalsiyum fosfatın çözünmesini beraberinde getirir. Bu misel hacimselliğinde bir düşüşe ve kimi misellerin çözünmesine neden olur. pH düştükçe çözünen fosfat niceliği de artar ve kazein çökmeye başlar. Olasılıkla kazein hala net negatif bir yüke sahipken kalsiyum fosfat bu bölgede pozitif yüklenir. pH 4,8 yakınında fosfatın hemen tamamı çözülmüş olur ve pH 4,6'da kazeinin çözünürlüğü ihmal edilebilir düzeydedir. Artık miselin de ötesinde kazein çökmektedir.

(3) Sıcaklık da büyük bir etkiye sahiptir. 0°C yakınında miselin topaklanması çok güç gerçekleşir. Bu koşulda topaklaşmanın Q_{10} değeri 2 ile 5 arasında değişmektedir. Sıcaklık düşüşü hacimselliği artırır, Ca^{+2} aktivitesinde çok az bir artışa neden olur, çözünürlük artacağı için miseldeki kalsiyum fosfat azaltır ve ortalama misel boyutu düşer.

(4) Kurutma (dehidrasyon) misellerin topaklaşmasına yol açar. Yapıdan suyun uzaklaştırılması görece düşük pH'ya -dolayısıyla yüzey geriliminin azalmasına -daha yüksek Ca^{+2} aktivitesine, daha yüksek iyonik dirence ve misellar kalsiyum fosfatın artmasına yol açacağı için kararlılığı azalır.

(5) Bazı hidrokolloidler, özellikle kappa-karragenan kazein misellerine bağlanırlar. Ne-

gatif yüklü karragenanın kappa-ve alfa-s₂-kazeinlerin pozitif yüklü bölgeleri ile etkileşimi söz konusudur. CMC de olasılıkla aynı yolla pH 7,5'de etkileşime girer. Bu kolloidlerin aşırı niceliklerde eklenmesi çökmeye neden olur ve çökeltinin yağsız süt fazından ayrıldığı görülür.

(6) Hemen bütün yüzey aktif maddeler genelde hidrofobik etkileşimler ile proteinlere bağlanırlar. Katyonik yüzey aktif maddeler (DAB) zeta potansiyelinin mutlak değerini azaltır, bu da kararlılığın azalması anlamına gelir. Anyonik olanlar ise tam tersi bir etkiye sahiptir.

(7) Yağ - su, hava - su arasında etkileşimlere girerek kararlılıkları olumsuz etkilenebilir.

KAYNAKLAR

HOOYDONK, A.C.M. van, H.G. HAGEDOORN, I.J. BOERRIGTER. 1986. pH - induced physicochemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 1. Effect of acidification on Physico - chemical properties. Neth. Milk Dairy J. 40: 281 - 296.

PAYENS, T.A.J. 1978. On enzymatic clotting process. 111. Flocculation rate constants of paracasein and fibrin. Faraday Discussions of the Chemical Society. No: 65: 164 - 174.

PAYENS, T.A.J. 1979. Casein micelles: the colloid - chemical approach. J Dairy Res. 46: 291 - 306.

PAYENS, T.A.J. 1982. Stable and unstable casein micelles. J. Dairy Sci. 65: 1863 - 1873.

SCHMIDT, D.G. 1980. Colloidal aspects of casein. Neth. Milk Dairy J. 34: 42 - 64.

SCHMIDT, D.G., T.A.J. PAYENS. 1976. Micellar aspects of casein. Surface and Colloid Science. Vol. 5. (Ed. E. Matkovic) J. Wiley and Sons Inc. New York, 165 - 229.

SCHMIDT, D.G. J.K. KOLL. 1986. Electrokinetic measurements on unheated casein micelle systems. Neth. Milk Dairy J. 40: 269 - 280.

SCHMIDT, D.G., P. BOTH. Studies on the precipitation of calcium phosphate. 1. experiments in the pH range. 5,3 to 6,8 at 25°C and 50°C in the absence of additives. Neth. Milk Dairy. 41: 105 - 120.

WALSTRA, P.J. van VLIET. 1986. The physical chemistry of curd making. Neth. Milk Dairy. J. 40: 241 - 259.

WALSTRA, P., R. JENNES. 1984. Dairy Chemistry and Physics. Wiley and Sons Co.: New York.

PARRY, R.H. 1974. In Fundamentals of Dairy Chemistry, Chp. 11., Eds WEBB, JHONSON ve ALFORD Av Publ. Co., Westport, Conn.