

YOĞURT JELİNİN OLUŞUMUNDA SERUM PROTEİNLERİNİN ROLÜ

ROLE OF WHEY PROTEINS ON THE FORMATION OF YOGHURT GELS

H.Barbaros ÖZER, Metin ATAMER

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü

ÖZET: Yoğurt jelini oluşum mekanizması üzerinde 1960'lı yılların başından itibaren yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Ancak, yaklaşık 30 yıldır süregelen çalışmalara rağmen bu mekanizmaya ilişkin tam olarak açıklığa kavuşmamış bazı noktalar bulunmaktadır. Günümüzde yoğurt jelinin oluşum mekanizması ile ilgili iki temel görüş çatışmaktadır. Bu derlemede, bu görüşler detaylı olarak incelenmiş ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

SUMMARY: Intensive studies has been carried out on the mechanism of formation of yoghurt gels since early 1960. Despite to these studies for about 30 years, this mechanism has not been clear yet. Today, two basic opinions related to this topic are in conflict. In this article these opinions are reviewed in detail and compared with each other.

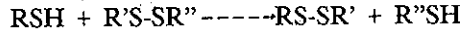
GİRİŞ

Yoğurt jeli ısı ile uyarılmış bir asit jelidir. Buna göre, jel oluşumunda ısıl işlem ve asitlik gelişimi kombine bir rol oynamaktadır. Isıl işlem özellikle serum proteinleri üzerinde etkili olarak uygun ağ yapısının (network) oluşmasını sağlamaktadır (RASIC ve KURMANN, 1978). Yoğurt jelinin özgün yapısının oluşumunda K-kazein ve β -laktoglobulin başta olmak üzere hemen hemen tüm proteinler etkin görev almaktadır (TAMIME ve ROBINSON, 1984). Sütte doğal halde ve dengede bulunan proteinler bu işlevlerini ısı etkisi ile yapılarında meydana gelen değişimler sonucu yerine getirebilmektedirler. Isıl uygulamaya sonunda, serum proteinlerinin ısı denatürasyonu ve bunu izleyen aşamada tüm protein fraksiyonları arasında özgün interaksyonlar meydana gelmektedir. Bu interaksyonlar sonucunda ise, yoğurdun özgün ağ yapısı oluşmaktadır. Günümüzde proteinler arası interaksyonların mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. Ancak, interaksyonlarda ısı etkisi ile oluşan tiol (-SH) ve disülfid (S-S) yer değişim reaksiyonlarının rol oynadığı kabul edilmektedir (SAWYER, 1969; EUBER, 1982). Bununla birlikte bir grup araştırmacı interaksyonların oluşumu için serum proteinlerinde (özellikle β -laktoglobulinde) primer ısı agregasyonunu zorunlu kabul ederken (SAWYER, 1969), diğer araştırmacılar ise böyle bir zorunluluğun söz konusu olmadığını savunmaktadırlar (EUBER, 1982). Proteinler arası interaksyonlarda birinci derecede rol oynayan tiol (-SH) ve disülfid (S-S) bağlarının yanısıra hidrojen bağları, kalsiyum bağları (Ca^{+2}) ve hidrofobik bağlar ile pH ve iyonik güç değişimleri de interaksyonları destekleyici etki yaratmaktadır.

SERUM PROTEİNLERİNDE ISI İLE OLUŞAN DEĞİŞİMLER

Serum proteinleri uzay düzleminde konformasyon adı verilen üç boyutlu bir yapıya sahiptirler. Yeni sentezlenmiş bir polipeptid zinciri, bulunduğu ortamda termodinamik olarak stabil konformasyonu almaktadır. Genellikle, bu konformasyon disülfid köprülerin oluşumu ile sabitleştirilmektedir. Proteinlerin yapısı primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner olmak üzere dört grupta sınıflandırılmaktadır. Bu yapılar içinde yer alan primer yapı aminoasit rezidülerinin polipeptid zincirinden meydana gelmektedir. Primer yapı çapraz olarak bağlanmış disülfid bağları ve peptid bağları ile stabilize olmaktadır. Isı uygulaması sırasında kovalent bağlarının konumu değişmediğinden primer yapı bozulmamaktadır. Ancak, lineer dizideki yakın ve uzak rezidüeller arasındaki sterik ilişkiler sonucu oluşan sekonder ve tersiyer yapılar ısı ile parçalanma eğilimi göstermektedir (FOX, 1984). Bunun en belirgin nedeni, sekonder ve tersiyer yapıların α -heliks ve β -plakalı yaprak yapılarını stabilize eden hidrojen (H) bağının ısı ile kolay parçalanabilir olmasıdır. Bu bağın parçalanması ve sonunda sekonder ve tersiyer yapıların bozulması, serum proteinlerinin ısı denatürasyonu olarak bilinmektedir.

Isı denatürasyonu ile birlikte serum proteinlerinin doğal yapısında yer alan yan zincir grupları açığa çıkmaktadır, özellikle de, sistein rezidülerinin tiol (-SH) gruplarının reaktivitesi artmaktadır. Bu grupların reaktivasyonundaki artış ile birlikte disülfidlerin (S-S) oksidasyonu meydana gelmekte ve disülfidlerde ara değişim reaksiyonu görülmektedir.



Disüflitlerde ara değişim reaksiyonu meydana geldiğinde, disüflit bağının konumu değişmektedir. Thiol grupları okside olmadıkça ve disüflitte ara değişim reaksiyonu meydana gelmedikçe ısı denatürasyonu tersiner karakterlidir. Nitekim, anılan değişimler meydana gelmediği için, 60-65°C'ye kadar olan sıcaklıklarda serum proteinlerinde oluşan denatürasyonlar tersiner özellik göstermektedir (WITT ve KLARANBEEK, 1983). Bu nedenle yoğurt yapımı sırasında klasik pastörizasyon normlarının üzerindeki sıcaklıklarda ısı işlem uygulanmakta ve böylece denatürasyon tersinmez kılınmaktadır.

Serum proteinlerinin ısı denatürasyonu sonucunda β-laktoglobulin ve K-kazein arasında meydana gelen interaksiyonlar ve oluşan kompleks yapının fonksiyonel özellikleri yoğurt jeli için belirleyici rol oynamaktadır. Buradan hareketle, β-laktoglobulin denatürasyon oranı ile yoğurdun reolojik özelliklerinin ölçümü arasında bir ilişki de kurulmaktadır (KESSLER, 1990).

β-laktoglobulin denatürasyonunun belirli bir orana kadar artışına paralel olarak set tipi yoğurtlarda konsistens artışı da gözlenmektedir. Aynı şekilde, β-laktoglobulin konsantrasyonunun artışı da konsistens üzerinde benzer etki yaratmaktadır (Şekil 1).

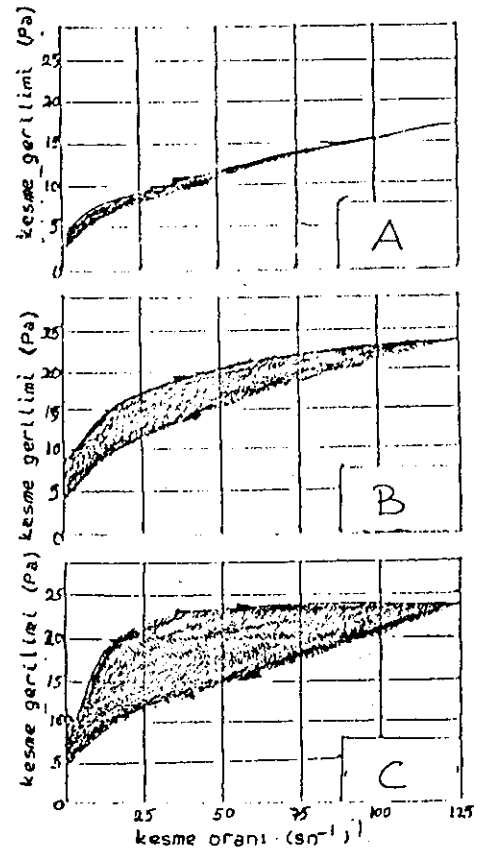
Denatürasyon derecelerindeki farklılığa rağmen jel sıklığı ile β-laktoglobulin denatürasyonu arasında büyük bir korelasyon göze çarpmaktadır.

Yoğurt jelinin oluşumu proteinler arası interaksiyonlar temelinde dayandığından, sütün protein dengesinde meydana gelen değişimler jel özellikleri üzerinde etkili olmaktadır. Süt proteinlerinin yaklaşık % 80'ini kazeinler oluşturmaktadır. Yoğurt sütünün kuru maddesi artırılırken peynir altı suyu tozu, yağsız süttozu, kazeinat ve co-presipitate gibi protein kaynakları kullanıldığında sütte kazein ve kazein olmayan azot arasındaki oran değiştiğinden pıhtı stabilitesi de değişime uğramaktadır. Yoğurt sütünde serum proteini oranı arttıkça, diğer bir deyişle oransal olarak kazein içeriği azaldıkça pıhtı stabilitesi zayıflama eğilimi göstermektedir. Serum proteini konsantrasyonu artışıyla birlikte kazein misellerinin yüzeyine daha fazla serum proteini floküle olmakta ve bu nedenle miseller uzun aralıklarla ayrılmakta, aralarında zincir halinde bağlantı meydana gelmektedir (MODLER ve KALAB, 1983). Bunun sonucu olarak da pıhtı stabilitesi azalmakta, serum ayrılması ise artış göstermektedir. Kazein ve kazein olmayan azot arasındaki oran arttığında pıhtı stabilitesinde artış gözlenmektedir (Çizelge 1). Buna göre, en sıkı pıhtı yapısının sodyum kazeinat katkılı yoğurtlarda meydana geldiği ileri sürülmektedir (TAMİME ve ROBINSON, 1985).

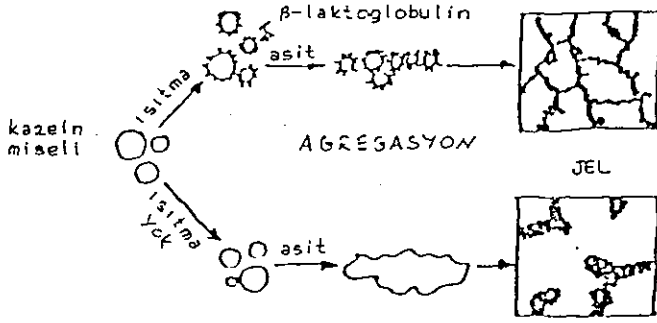
Çizelge 1. Değişik şekillerde kurumaddeisi artırılmış yoğurtlarda kazein ve kazein olmayan azot oranları.

Yoğurt Sütü	Kazein	Kazein olmayan azot	Kazein/ Kazein olmayan azot
Yağsız süttozu	4,12	1,22	3,38
Evaporasyon	3,91	1,22	3,20
Ultrafiltrasyon	3,88	1,14	3,40
Hiperfiltrasyon	4,16	1,24	3,55
Sodyum kazeinat	4,30	0,93	4,62

Yoğurtta jel oluşumu için ısı işlem ve asitlik kombinasyonu zorunludur Bu iki parametreden birinin ya da her ikisinin yeterli etkiyi yaratmaması yoğurdun özgün ağ yapısının (network) oluşumunu engellemektedir (Şekil 2).



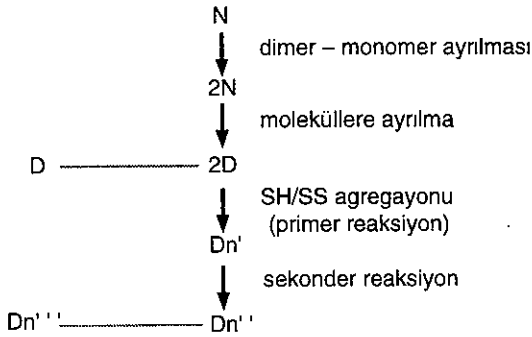
Şekil 1. Farklı denatürasyon derecelerinde B-laktoglobulin B'ye sahip sütlerden üretilen set tipi yoğurtlarda akış kuryeleri
A: % 10 B-laktoglobulin B denatürasyonu
B: % 60 B-laktoglobulin B denatürasyonu
C: % 90 B-laktoglobulin B denatürasyonu



Şekil 2. Isıl işlem ve asitlik gelişiminin yoğurdun mikro yapısı üzerine etkileri

meydana gelmektedir. Bu reaksiyonların sonunda ise, β -laktoglobulin agregasyonu başlamaktadır. 65°C 'nin üzerinde meydana gelen primer reaksiyon sonunda β -laktoglobulin partikülleri 4 kat büyümektedir. Primer reaksiyona göre daha düşük sıcaklıklarda oluşan sekonder reaksiyonlarda ise, partikül büyüklüğü ile birlikte elektroforetik hareketlilik de artmaktadır (SAWYER, 1969; Mc KENZIE, 1971; EUBER, 1982).

Özellikle, $70-90^{\circ}\text{C}$ arası sıcaklıklarda β -laktoglobulin önemli ölçüde agregasyona uğramaktadır (KRESHECK, 1963). Primer reaksiyon sonucu oluşan agregasyonda moleküllerarası disülfid bağları rol oynamaktadır. Sekonder reaksiyonda ise, disülfid bağları yer almamaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. B-laktoglobulin agregasyonunun şematik gösterimi.

SH/SS ara değişim reaksiyonunu içeren primer reaksiyon oluşmaktadır (Dn'). Bu birleşmenin ardından oluşan sekonder reaksiyonda ise, spesifik olmayan agregatlar meydana gelmektedir (Dn''). Ortamda SH gruplarını bloke eden bir madde bulunduğu oluşan agregatlar disülfid bağlarını içermemektedir (D).

Bu şekilde oluşan β -laktoglobulin agregasyonu sonucunda (ki burada primer reaksiyon belirleyici rol oynamaktadır) β -laktoglobulin ve K-kazein interaksyonu gerçekleşmektedir (SAWYER ve COULTER, 1963; SAWYER, 1969). β -laktoglobulin'in üç majör varyantı (β -A, β -B ve β -C) değişik oranlarda agregasyona uğramaktadır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Eşit ısıtma koşullarında agregasyona uğrayan β -laktoglobulin oranları.

Varyant	Agregasyon oluşturan β -lg (%)	Agregasyon oluşturmeyen β -lg (%)
β -lg A	37	63
β -lg B	55	45
β -lg C	72	28

Çizelge 2'de agregasyona uğramayan β -laktoglobulin oranının gözardı edilemeyecek düzeyde olduğu görülmektedir. β -laktoglobulin/K-kazein kompleksinin oluşumunda β -laktoglobulinin agregasyonunu zorunlu gören hipotez, agregasyona uğramış kısımların reaksiyona katılıp katılmadığı konusuna açıklık getirmektedir.

JEL OLUŞUMUNDA PROTEİN İNTERAKSİYONLARININ ROLÜ

Çok geniş çalışmalar yapılmasına karşın β -laktoglobulin ve K-kazein birleşmesinin mekanizması ve oluşan kompleks yapıyı stabilize eden güçler tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu reaksiyonların oluşumu ile ilgili iki temel görüş ileri sürmektedir.

Birinci görüşe göre; β -laktoglobulin pH 7,0 dolayında ısı ile denatüre olduğunda iki ayrı reaksiyon

Doğal halde β -laktoglobulin iki monomerik subunitin bir dimeri halinde bulunmaktadır. Bu dimer yapıyı oluşturan monomerler arası bağlantı ise kovalent bağ özelliği göstermektedir. Isı uygulaması ile bu dimer yapısı monomerlere ayrılmaya başlamaktadır ($N-----2N$). Ardından herbir monomer moleküllere kadar parçalanmaktadır ($2N-----2D$). Moleküllere ayrılma sona erdiğinde

Kesin olarak kanıtlanmamakla birlikte, β -laktoglobulin ve K-kazein interaksyonunun moleküllerarası disülfid bağlarını içerdiği görüşü kabul görmektedir (LONG, 1963; HARTMAN, 1965). Bu konuya açıklık kazandırmak amacıyla yapılan bir çalışmada -SH gruplarını bloke eden N-etilmaleimide (NEM) gibi bir maddenin ve -SS gruplarını indirgeyen mercaptoethanol (ME) gibi bir indirgenin varlığında β -laktoglobulin/K-kazein kompleksi oluşumunun engellendiği gözlenmiştir (DAVIES ve ark., 1978). β -laktoglobulin agregasyonunda yer alan disülfid bağları ME ile çok çabuk reaksiyona girmektedir. Bu yüzden, ME ilavesiyle β -laktoglobulin agregasyonu parçalanmakta ve β -laktoglobulin, K-kazeinden ayrılmaktadır.

β -laktoglobulin ve K-kazein birleşmesi için ortaya sürülen ikinci görüş ise, kompleks oluşumu için β -laktoglobulin'in primer agregasyonunun zorunlu olduğu görüşünü reddetmektedir (EUBER, 1982). Bu hipoteze göre, β -laktoglobulin ve K-kazein kompleksi intermoleküler disülfid bağları ile stabilize olmaktadır. SH gruplarını bloke eden bir maddenin varlığında yalnızca β -laktoglobulin ile K-kazeinin kovalent olmayan bağlantısını sağlayan disülfidler agregasyona uğramakta ve kompleks oluşumu engellenmektedir. Burada da ilk görüşte olduğu gibi β -laktoglobulinin agregasyona uğrayan ve uğramayan kısımlarının interaksyonda ne gibi bir rol oynadığı kesin olarak belirtilmemektedir.

Sonuç olarak, her iki görüşü savunan araştırmacıların bazı ortak noktalarda birleştikleri de söylenebilmektedir. Her iki grup araştırmacı da, β -laktoglobulin ile K-kazein arasında bir interaksyonun var olduğunu ve bu interaksyonda muhtemelen intermoleküler disülfid bağlarının rol oynadığını kabul etmektedir. Ayrıca, ısı etkisiyle ısı işlem normuna bağlı olarak β -laktoglobulin varyantlarında değişik oranda agregasyon meydana geldiği de kabul edilmektedir. Ancak, bu iki görüş interaksyon mekanizması konusunda ayrılmaktadır. Bir grup araştırmacı interaksyon için β -laktoglobulin agregasyonunu zorunlu kabul etmekte ve interaksyonun bu agregatlar üzerinden gerçekleştiğini savunmaktadır. Diğer araştırmacılar ise, β -laktoglobulin agregasyonunu interaksyon için ön koşul görmemekte ve bu yapının oluşumunda thiol-disülfid yer değişim reaksiyonunun etkili olduğunu ileri sürmektedir. Bu konu henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşmuş değildir.

Yoğurt yapımında kullanılan süte uygulanan ısı işlem normu ile jel yapısı ve serum ayrılması arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. 85°C'de 20 dak. dolayında ısı işlem ile optimum yapı elde edilebilmektedir (GRIGOROV, 1966; KALAB, 1976). 85°C'de β -laktoglobulin ile K-kazein arasında meydana gelen interaksyon maksimuma çıkmaktadır. Daha yüksek sıcaklıklarda ise, proteinlerin hidrofilik özelliğinde meydana gelen zayıflamadan ötürü interaksyon oranı azalma göstermektedir (Çizelge 3).

Çizelge 3. Isıl işlemin β -laktoglobulin ile K-kazein interaksyon oranına etkileri.

Isıl uygulama normu (20 dak.)	İnteraksiyona giren B-Ig (%)
25°C	-
65°C	3,4
70°C	15,4
75°C	48,8
80°C	67,8
85°C	82,9
99°C	76,7

Yoğurt jelinin oluşumunda etkin rol oynayan interaksyon β -laktoglobulin ile K-kazein arasında gerçekleştiğinden ağırlıklı olarak bu interaksyon mekanizması üzerinde durulmaktadır. Ancak, bunun yanında diğer serum proteini ve kazein fraksiyonları da kompleks oluşturabilmektedir. Bu interaksyonlar, β -laktoglobulin ile α -laktalbumin, β -laktoglobulin ile α -kazein (KRESHECK, 1963; HARTMAN, 1965), α -laktalbumin ve K-kazein, serum albumin ve K-kazein ve immünoglobulinler ile K-kazein arasında

meydana gelmektedir (WALSTRA ve JENNES, 1984). β -kazein ise, yapısında methionine bağlı S'den başka sülfür grubu içermediği için β -laktoglobulin ile interaksyona girebilme yeteneğinde değildir (SAWYER, 1963).

PROTEİN İNTERAKSİYONUNDA ROL OYNAYAN DİĞER FAKTÖRLER

Kalsiyum iyonları, β -laktoglobulin ile K-kazein arasındaki interaksyonda birinci derecede olmasa bile rol oynamaktadır. Düşük β -laktoglobulin konsantrasyonunda ve kalsiyum iyonları varlığında proteinler arası interaksyonların oranı artmaktadır. Kalsiyum, proteinlerin iyonik grupları ile bağlanarak ısı etkisi ile birleşmeyi artırıcı etki yapmaktadır. Kalsiyum bağları ile bağlanan proteinlerin moleküller arası itine güçleri

azalmakta ve moleküller arası hidrofobik bağlar oluşmaktadır. Kalsiyum ısıyla indüklenmiş serum proteini agregatlarının oluşumunda da benzer rol oynamaktadır (MORR ve JOSEPHSON, 1968). Moleküller arası itmenin azalmasıyla hidrofobik bağların oluşumu pH değişimleri sonucunda da meydana gelmektedir. Düşük pH değerlerinde β -laktoglobulin ile K-kazein arasındaki ısıyla indüklenmiş interaksyonların oranı artarken, yüksek pH değerlerinde anılan oran düşmektedir. Aynı zamanda düşük asitlikte β -laktoglobulin'in agregat oluşturma yeteneğinde artış gözlenmektedir. β -laktoglobulin'in izoelektrik noktası olan 5,8 pH dolayında, denatüre olmuş ve agregat oluşturmamış β -laktoglobulin agregatlaşmaya başlamaktadır. pH 5,8 civarında 90°C/20 dk. ısı işlemiyle büyük miktarda β -laktoglobulin presipitasyona uğramaktadır. pH 6,8'den 7,3'e çıktığında, β -laktoglobulin'in sedimentasyonunda azalma görülmektedir (PETRUS, 1980). Isıyla indüklenmiş β -laktoglobulin ve K-kazein interaksyonunda iyonik güç de etkili olmaktadır. İyonik gücün azalmasıyla jel sıklığı da azalma göstermektedir. Buna misellerin yüzey yüklerinde meydana gelen değişimler neden gösterilebilmektedir. İyonik gücün azalmasıyla misellerin elektroforetik hareketliliğinde artış gözlenmektedir.

KAYNAKÇA

- DAVIES, F.L.; SHANKAR, P.A.; BROOKER, B.E. ve HOBBS, D.G. 1978. A heat induced change in the ultrastructure of milk and its effect on gel forming in yogurt. *J. Dairy Res.*, 45 (1), 53-58.
- WITT, J.N. ve KLARANBEEK, G. 1983. Effect of various heat treatment on structure and solubility of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 66 (2), 1396-1397.
- EUBER, J.R. ve BRUNNER, J.R. 1982. Interactions of K-caseins with immobilized β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.*, 65 (2), 2384-2386.
- GRIGOROV, H. 1986. Effect of heat treatments on cow's milk on the hydrophilic properties of the protein in Bulgarian yogurt. 17 th: Intern. Dairy Congress, Section F, 5, 649.
- HARTMAN, G.H. ve SWANSON, A.M. 1965. Changes in mixture of whey proteins and K-casein due to heat treatments. *J. Dairy Sci.*, 48 (2), 1161-1167.
- KALAB, M. ve EMMONS, D.B. 1976. Milk gel structure. V. Microstructure of yogurt as related to the heating of milk. *Milch.*, 31, (7), 402-407.
- KESSLER, H.G. 1990. New milk foods via new technologies. The 23 th. Intern. Dairy Congress. Vol. 3, 2005-2019.
- KRESHCEK, G.C.; Von WINKLE, Q. ve GOULD, I.A. 1963. Physical changes in milk proteins at elevated temperatures as determined by light scattering. II. Interaction between β -lactoglobulin and whole, α - and K-casein buffer. *J. Dairy Sci.*, 46(1), 126-129.
- LONG, J.E.; Von WINKLE, Q. ve GOULD, I.A. 1963. Heat induced interaction between crude K-casein and β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.*, 46(2), 1329-1334.
- Mc KENZIE, G.H.; NORTON, R.S. ve SAWYER, W.H. 1971. Heat induced interaction of β -lactoglobulin and K-casein. *J. Dairy Res.*, 38 (1), 343-351.
- MORR, J.V. ve JOSEPHSON, R.V. 1968. Effect of calcium, N-ethylmaleimide and casein upon heat induced whey protein aggregation. *J. Dairy Sci.*, 51 (2), 1349-1355.
- PETRUS, S. ve Van BROUNWERSHAVEN, J. 1980. Heat induced association of β -lactoglobulin and casein micelles. *J. Dairy Res.*, 47 (1), 313-325.
- RASIC, J. ve KURMANN, J.A. 1978. *Yogurt*. Vol. 1., Technical Dairy Publishing House, Copenhagen.
- SAWYER, H.W. ve COULTER, W.H. 1963. Role of sulphhydryl groups in the interactions of K-casein and β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.*, 46 (1), 564-570.
- SAWYER, H.W. 1968. Heat denaturation of bovine β -lactoglobulin and relevance of disulphide aggregation. *J. Dairy Sci.*, 51 (1), 323-329.
- SAWYER, H.W. 1969. Complex between β -lactoglobulin and K-caseins. A review. *J. Dairy Sci.*, 52 (2), 1347-1353.
- TAMIME, A.Y. ve ROBINSON, R.K. 1984. *Yogurt Science and Technology*. Pergamon Press, Oxford.