



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SÜT SERUMU PROTEİNLERİNİN
PEYNİR ALTI SUYUNDAN
ELDE EDİLMESİ**

TUĞBA BAYRAM
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. A.Süha YALÇIN

İSTANBUL-2007

D) TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımın her aşamasında değerli bilgi ve önerileriyle çalışmama yön veren, her konuda destek olan ve bilimsel bir bakış açısı kazanmamı sağlayan değerli tez danışmanı hocam Sayın Prof.Dr. A. Süha YALÇIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri, değerli hocalarım; Prof.Dr. Kaya EMERK'e, Prof.Dr. Serpil BİLSEL'e, Prof.Dr. Nesrin KARTAL ÖZER'e, Prof.Dr. Yavuz TAGA'ya, Prof.Dr. Goncagül HAKLAR'a ve Prof.Dr. Önder ŞİRİKÇİ'ye;

yüksek lisans çalışmam süresince yardımını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Ayliz VELİOĞLU ÖĞÜNÇ'e;

aynı projede görev aldığım hocam Sayın Doç.Dr. Nazlı ARDA'ya ve MSc. Murat PEKMEZ'e;

sevgili dostum Hümeysra TURAN'a ve değerli yüksek lisans arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Eğitim hayatım süresince maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen değerli ailem Cengiz ve Nuray BAYRAM'a; her konuda yanımda olan sevgili kardeşim Azize BAYRAM'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı (SAĞ-YLS-290506-0092) ve TÜBİTAK (SBAG-2972 104S507) tarafından desteklenmiştir.

II) İÇİNDEKİLER

I) Teşekkür	I
II) İçindekiler	II
III) Kısaltmalar	IV
IV) Şekil, Resim ve Tabloların Listesi	V
i. Şekillerin Listesi	V
ii. Tabloların Listesi	VII
1. Özet	1
2. Summary	2
3. Giriş ve Amaç	3
4. Genel Bilgiler	5
4.1. Süt ve Süt Proteinleri	5
4.1.1. Süt ve Yapısı	5
4.1.2. Peynir Altı Suyu ve Süt Serumı Proteinleri	6
4.2. Protein Saflaştırma Teknikleri	14
4.2.1. Protein Saflaştırmanın Amacı	14
4.2.2. Protein Saflaştırma Yöntemleri	14
4.2.2.1. Kromatografik Teknikler	14
4.2.2.2. Elektroforetik Teknikler	22
4.2.2.3. Diyaliz, Diafiltrasyon, Çöktürme ve Santrifüj	24
4.2.2.4. Mikrofiltrasyon ve Ultrafiltrasyon	26
4.2.3. UV Absorpsiyonu ile Protein İçeriğinin Belirlenmesi	27
4.2.4. Peynir Altı Suyundaki Süt Serumı Proteinlerini Ayırma	28
5. Gereç ve Yöntem	30
5.1. Gereçler	30
5.2. Yöntemler	31
5.2.1. PAST Proteinlerinin Membran Filtrasyon Yöntemiyle Ayrılması	32
5.2.2. PAST Proteinlerinin Kromatografik Olarak Ayrılması	33
5.2.3. PAST Proteinlerinin Hidrolizi ile Süt Serumı Proteinlerinin Eldesi	34
5.2.4. SDS-PAGE Yöntemi ile Protein İçeriğinin Aydınlatılması	37
5.2.5. Lowry Yöntemi ile Protein Tayini	39

6. Bulgular	41
7. Tartışma ve Sonuç	58
8. Ekler	63
8.1. Ek-1. Peynir Altı Suyu Tozu Ürün Analiz Raporu	64
9. Kaynaklar	65
10. Özgeçmiş	72

III) KISALTMALAR

APS	Amonyum persülfat
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Sığır serum albümin
CCK	Kolesistokinin
CLA	Konjuge linoleik asit
DEAE	Dietilaminoetil
GFC	Jel filtrasyon kromatografisi
GMP	Glikomakropeptid
IEF	İzoelektrik odaklama
Ig	İmmünoglobülin
Ig H	İmmünoglobülin ağır zincir
Ig L	İmmünoglobülin hafif zincir
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
MFGM	Süt yağı globul membranı (“Milk fat globule membrane”)
MWCO	Moleküler ağırlık eşiği (“Molecular Weight Cut-off”)
NMWC	Nominal moleküler ağırlık kesimi (“Nominal Molecular Weight Cut-off”)
PAST	Peynir altı suyu tozu
PKU	Fenilketonüri
QAE	Kuaterner aminoetil
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
UHT	Ultra yüksek sıcaklık

IV) ŞEKİL, RESİM VE TABLOLARIN LİSTESİ

i. ŞEKİLLERİN LİSTESİ

- Şekil 4.1. β -laktoglobulin yapısı
- Şekil 4.2. α -laktalbümin yapısı
- Şekil 4.3. Jel filtrasyon kromatografisi
- Şekil 4.4. İyon değişim kromatografisi
- Şekil 6.1. 50,000 MWCO membran filtrasyon yöntemiyle elde edilen fraksiyonların içerdiği protein miktarları
- Şekil 6.2. 50,000 MWCO membran filtrasyon yöntemiyle elde edilen fraksiyonların ve örneklerin SDS-PAGE ile kimlik doğrulamasının yapılması
- Şekil 6.3. Ön işlemlerden geçirilen PAST çözeltisinin Sephadex G-50 kolon kromatografisi ile ayrılması
- Şekil 6.4. Ön işlemlerden geçirilen PAST çözeltisinin Sephadex G-200 kolon kromatografisi ile ayrılması
- Şekil 6.5. Sephadex G-50 kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE ile kimlik doğrulamasının yapılması.
- Şekil 6.6. Ön işlemlerden geçirilen örneklerin, Sephadex G-200 kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların ve pepsin ile hidroliz işlemi sonrası örneğin SDS-PAGE ile kimlik doğrulaması.
- Şekil 6.7. Pepsin ile proteoliz (1:100) öncesi ve sonrası filtratın Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulanması
- Şekil 6.8. Filtratın ve Sephadex G-200 kolon kromatografisi ile elde edilen F-2 fraksiyonunun pepsin ve tripsin ile hidroliz işlemi sonucu elde edilen örneklerin SDS-PAGE ile kimlik doğrulamasının yapılması.
- Şekil 6.9. Sephadex G-200 kolon kromatografisi ile elde edilen F-2 fraksiyonunun pepsin ile proteolizi sonucu elde edilen örneğin Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulanması
- Şekil 6.10. Tripsin ile proteoliz öncesi ve sonrası filtratın Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulanması

Şekil 6.11. Sephadex G-200 kolon kromatografisi ile elde edilen F-2 fraksiyonunun tripsin ile proteolizi (1:50) sonrası örneğin kromatografiye uygulanması

Şekil 6.12. Tripsin ile hidroliz edilen örneklerin SDS-PAGE ile kimlik doğrulamasının yapılması

ii. TABLOLARIN LİSTESİ

Tablo 4.1.	İnek (asit) peynir altı suyunun majör protein içeriği
Tablo 4.2.	Süt proteinlerinin konsantrasyonları ve biyolojik aktiviteleri
Tablo 4.3.	Moleküler özellikler baz alınarak yapılan kromatografik sınıflama
Tablo 4.4.	Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması
Tablo 4.5.	Yaygın kullanılan iyon değıştiriciler
Tablo 5.1.	Membran filtrasyon akış diyagramı
Tablo 5.2.	Süt serumu proteinlerini elde etmede kullanılan akış şeması-1
Tablo 5.3.	Süt serumu proteinlerini elde etmede kullanılan akış şeması-2
Tablo 6.1.	Örneklerin ve membran filtrasyon ile elde edilen fraksiyonların içerdiği protein miktarları
Tablo 6.2.	Örneklerin ve kromatografi ile elde edilen fraksiyonların içerdiği protein miktarları
Tablo 6.3.	Hidroliz işlemi ile elde edilen örneklerin içerdiği protein miktarları

1. ÖZET

Süt; su, yağ, proteinleri (esas olarak kazein miselleri ve süt serumu proteinleri), karbohidratları (esas olarak laktoz) ve az miktarda biyoaktif bileşenleri; mineraller, vitaminler ve enzimleri içeren kompleks biyolojik bir sıvıdır. Bileşiminde annede bulunan bağışıklık elemanları yer aldığından, aynı zamanda yenidoğanı enfeksiyonlara karşı pasif olarak korur. Sütte kazeinin çöktürülmesinden sonra supernatanda görülen proteinler peynir altı suyu (“whey”) proteinleri olarak adlandırılırlar. Peynir üretimi sırasında süttten ayrılan peynir altı suyu toz haline getirilerek gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Peynir altı suyunun süt serumu proteinlerince zengin olduğu bilinmektedir. Majör süt serumu proteinleri β -laktoglobulin, α -laktalbümin, serum albümin, immünoglobülinler ve glikomakropeptittir. Peynir altı suyu ve onun bileşenleri; antioksidan aktivite, antikarsinojenik etki, immün düzenleme, pasif bağışıklık, hastalıktan koruma, antibakteriyel, antimikrobiyal ve antiviral etkiler, toksinleri bağlama, hücre büyümesini destekleme, platelet bağlama, antienflamatuar ve anti hipertansif etkiler dahil olmak üzere farklı biyolojik işlevlerde görev alırlar. Çalışmamızda bu işlevlere sahip olan ve endüstri yan ürünü olan peynir altı suyu tozundan süt serumu proteinlerini elde etmeyi amaçladık. Peynir altı suyu tozundaki (PAST) süt serumu proteinleri; membran filtrasyon ve kromatografi gibi yöntemler kullanılarak ayırma işlemleri gerçekleştirildi. Ön işlemlerden geçirilen peynir altı suyu tozu, 50,000 MWCO membran filtreye uygulandığında membrandaki tıkanmadan dolayı süt serumu proteinlerini ayrı ayrı elde etmek mümkün olmadı. Ön işlemlerden geçirilen peynir altı suyu tozu, Sephadex G-200 kromatografisine uygulandığında 3 fraksiyon elde edildi ve bu fraksiyonlardan birincinin Ig’ler ve BSA olduğu; ikinci fraksiyonun β -laktoglobulin ve α -laktalbümin olduğu; üçüncü fraksiyonun ise küçük peptidler olduğu SDS-PAGE yöntemiyle ispatlandı. Elde edilen F-2 fraksiyonu pepsin ile hidroliz edildiğinde β -laktoglobulin; tripsin ile hidroliz edildiğinde α -laktalbümince zengin fraksiyon elde edildi.

Anahtar Kelimeler: peynir altı suyu tozu, süt serumu proteinleri, α -laktalbümin, β -laktoglobulin, kromatografi

2. SUMMARY

SEPARATION OF MILK SERUM PROTEINS IN WHEY

Milk is a complex fluid that contains water, fat, proteins (mainly casein micelles and milk serum proteins), carbohydrates (mainly lactose) and trace amount of bioactive molecules including minerals, vitamins and enzymes. It contains molecules of the mother's immune system and thus passively protects the newborn from infections. The proteins that appear in the supernatant after precipitation of casein in milk are called whey proteins. Whey is a product of cheese manufacture. This side product is powdered and commonly used in the nutritional industry. It is known that whey is rich in milk serum proteins. Major whey proteins are β -lactoglobulin, α -lactalbumin, serum albumin, immunoglobulins and glycomacropeptide. Whey and its components are involved in different biological functions including antioxidant activity, anticarcinogenic effects, immunomodulation, passive immunity, disease protection, anti-bacterial, anti-microbial and anti-viral effects, binding of toxins, promotion of cell growth, platelet binding, anti-inflammatory and anti-hypertensive actions. In this study, we aimed to obtain milk serum proteins in whey powder which is an industrial by product and have these functions. Milk serum proteins in whey were obtained by using membrane filtration and chromatographic methods. The pre-treated whey was applied to the 50,000 MWCO membrane filter. Because of the membrane fouling it was unable to have milk serum proteins separately. The pre-treated whey was applied to Sephadex G-200 chromatography and three fractions were obtained. SDS-PAGE method was used to identify the fractions; the first fraction was immunoglobulins and serum albumin; the second fraction was β -lactoglobulin and α -lactalbumin; the third fraction was small peptides. β -lactoglobulin is obtained after hydrolysis of F-2 fraction with pepsin and α -lactalbumin enriched product is obtained after hydrolysis of F-2 fraction with trypsin.

Key Words: whey, milk serum proteins, α -lactalbumin, β -lactoglobulin, chromatography

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Süt tüm ana besin unsurlarının yanında metabolik olaylar için gerekli olan vitaminleri, eser elementleri, bazı enzimleri ve proteinleri de içeren önemli bir sıvıdır. Bileşiminde annede bulunan bağışıklık elemanları yer aldığından, aynı zamanda yenidoğanı enfeksiyonlara karşı pasif olarak korur. Yapılan çok sayıda çalışmada süt içinde bulunan antioksidan faktörler ortaya konmuş ve bu faktörlerin bazılarının sütün çeşitli işlemlerden (pastörizasyon, UHT, dondurma v.b) geçmesinden sonra kayba uğradığı gösterilmiştir.

Kesilmiş sütün sıvı kısmı peynir altı suyu veya süt serumu adını almaktadır. Peynir altı suyunda çözünür halde bulunan proteinler majör (β -laktoglobulin, α -laktalbumin, serum albumin, immünoglobülinler ve glikomakropeptidler) ve minör (laktoferrin, laktoperoksidaz, lizozim) fraksiyonlardan oluşmaktadır. Peynir üretimi sırasında süttten ayrılan peynir altı suyu toz haline getirilerek gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Farklı işlenme yöntemleri ile elde edilen peynir altı suyu proteinlerinin endüstriyel kullanım yerleri de farklıdır. Asit, tatlı ve demineralize peynir altı suyu tozu (PAST) yanında, protein içerikleri farklı olan ürünler vardır.

Son yıllarda, bazı hastalık modellerinde yapılan çalışmalarda süt serumu proteinlerinin farklı yollardan koruyucu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu arada süt serumu proteinleriyle ilgili araştırmaların sayısı dikkat çekecek derecede artmış ve antioksidan etkileri ön plana çıkmaya başlamıştır. Ayrıca süt serumunun sıçanlarda kolesterol düşürücü etkisi olduğu bildirilmiş, laktoferrin ve glikomakropeptidlerin antimikrobiyal aktivitesi rapor edilmiştir. Glikoprotein yapıda olan glikomakropeptidler ile laktoferrin ve laktoperoksidazın oldukça ilginç biyolojik aktiviteleri olduğu öne sürülmektedir. Glikomakropeptidin, beyine tokluk sinyali veren ve besinlerin midedeki hareketini yavaşlatan bir hormon olan, kolesistokininin (CCK) salınımını stimüle ettiği yolunda bulgular vardır. Laktoferrin, antiviral, antimikrobiyal (antibakteriyal ve antifungal), immünomodülatör ve antioksidan aktivitelere; laktoperoksidaz ise antibakteriyal aktiviteye sahiptir. β -laktoglobulin diğer özellikleri yanında anti-hipertansif, anti-kanser, hipokolesterolemik, opioidderjik ve antimikrobiyal etkiler de dahil olmak üzere artan sayıda birçok biyolojik aktivite göstermektedir. Sığır α -laktalbumini ve ondan elde edilen peptidlerin biyolojik fonksiyonları; β -laktoglobulin için söylenenler dışında stres azaltıcı ve uyku iyileştirici etkileridir.

Bu tez çalışmasında, süt serumu proteinlerinin eldesinde sıklıkla kullanılan kromatografik yöntemlerin yanısıra membran filtrasyon yönteminden de yararlanılarak peynir altı suyundaki majör süt serumu proteinlerinin elde edilmesi amaçlandı. Bu alışma ile, endüstriyel bir yan ürün olan peynir altı suyundan süt serumu proteinleri, kromatografik yöntem, pepsin ve tripsin ile hidroliz işlemleri ile elde edilmiştir. β -laktoglobulin'in pepsine dayanıklı olduğu gösterilmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. SÜT VE SÜT PROTEİNLERİ

4.1.1. Süt ve Yapısı

Süt; su, yağ, proteinleri (esas olarak kazein miselleri ve süt serumu proteinleri), karbohidratları (esas olarak laktoz) ve az miktarda biyoaktif bileşenleri; mineraller, vitaminler ve enzimleri içeren kompleks biyolojik bir sıvıdır (34). İnek sütü, insan sağlığı için besleyici ve teknolojik açıdan fonksiyonel bir gıdadır. Yağ, sıvı fazda yağ globulleri formunda süspansiyon halinde sütte bulunur. Süt yağı, esas olarak triağılglicerollerden ve bazı diglicerollerden, kompleks lipidlerden ve sabunlaşmayan lipofilik bileşenlerden oluşur. Süt yağı globulleri, süt yağı globul membranı (MFGM) olarak adlandırılan temel olarak fosfolipidler, proteinler, enzimler, kolesterol, glikoproteinler ve vitaminleri içeren doğal biyolojik bir membran tarafından sarılmıştır (49). Doymuş yağ asitleri, toplam yağ asitlerinin % 60-70 (w/w)'ini; doymamış yağ asitleri ise (esas olarak mono- doymamış) % 30-35'ini oluşturur. Her yağ asidi, triağılglicerol iskeletinde belirli bir pozisyonu tercih eder; böylece süt yağında binlerce farklı triağılglicerol bulunur (35). Süt yağının hastalık ve sağlığa katkısı oldukça çelişkilidir (5). Doymuş yağ asitleri ve kolesterol içeriklerinin koroner kalp hastalığında risk oluşturduğundan şüphelenilirken, bazı konjuge linoleik asitler (CLA), sfingomiyelin ve bütirik asit gibi süt lipidleri antikarsinogenik özellikler göstermiştir (59).

Proteinlerle ilgili olarak, glutamik asit, lösin, serin, lizin ve prolince zengin benzer içerikle 4 kazein sınıfı bulunmaktadır (α_{s1} , α_{s2} , β , κ). Kazeinler 150-200 aminoasitlik fosfoproteinlerdir. Kazein sınıfları, sistein ve karbohidratların varlığı, bazı amino asitlerin içerikleri, fosfoseril gruplarının sayısındaki farklılık ile birbirinden ayrılmaktadır. Sekonder yapıda olmayan kazeinler; hidrojen bağları, hidrofobik, elektrostatik ve disülfid bağları ve farklı tuzlar (kalsiyum, fosfor, magnezyum, sitrat) ile birlikte misel olarak adlandırılarak organize olurlar. κ -kazein, kalsiyum fosfat bağları ile bir arada tutularak miselin yüzeyine yerleşmiştir. Çözünür proteinler (süt serumu proteinleri), süt proteinlerinin sadece % 15-22'sini oluştururlar; albüminleri, immünoglobülinleri ve proteose-peptonları içeren kompleks bir gruba kapsamaktadırlar. Çözünür proteinler, yüksek lizin, triptofan ve sistein içeriği ile çok

yüksek bir besin değeri sağlayan globüler proteinlerdir (sekonderden $-\alpha$ -heliks ve β -kırmalı tabakadan- kuarterner yapıyı oluşturan). Kazeinlerden daha az prolin içerirler ve kompakt moleküllerdirler (52).

4.1.2. Peynir Altı Suyu ve Süt Serumı Proteinleri

Sütteki kazeinin çöktürülmesiyle süpernatantta kalan proteinler, süt serumu proteinleri olarak adlandırılırlar (Tablo 4.1). Bu globüler proteinler, kazeinden daha fazla suda çözünabilir özelliğe sahiptirler ve sıcaklıkla denatürasyona maruz bırakılmışlardır (26, 34).

Süt serumu proteinleri, her biri farklı moleküler ağırlıkta ve sağlık için önemli olan majör ve minör protein fraksiyonları olarak gruplandırılırlar (Tablo 4.2). Majör süt serumu proteinleri, β -laktoglobulin, α -laktalbümin, serum albümin, immünoglobülinler ve glikomakropeptiddir. Minör proteinler ise, laktoperoksidaz, laktoferrin, mikroglobulin, lizozim, insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF), γ -globulinler ve diğer birkaç küçük proteindir (26, 40, 68).

Tablo 4.1: İnek (asit) peynir altı suyunun majör protein içeriği

	İzoelektrik nokta (pI)	Moleküler ağırlık (kDa mol ⁻¹)
β -laktoglobulin	5.2-5.4	18.3
α -laktalbümin	4.2	14.2
Serum albümin	4.9-5.1	66.0
IgG, IgA, IgM	5.8-7.3	150.0-900.0
Laktoperoksidaz	9.6	78.0
Laktoferrin	8	78.0

[63]'den adapte edilmiştir.

Tablo 4.2: Süt Proteinlerinin Konsantrasyonları ve Biyolojik Aktiviteleri

Protein	Konsantrasyon (g/L)	Biyolojik Aktivite
Kazeinler	28	İyon Taşıyıcı (Ca, PO ₄ , Fe, Zn, Cu) Biyoaktif peptid öncüsü
β-laktoglobulin	1.3	Retinol taşıyıcı Yağ asidi bağlayıcı Antioksidan
α-laktalbümin	1.2	Laktoz sentezi Ca taşıyıcı İmmünomodülasyon Antikarsinogenik
İmmünoglobülinler	0.7	İmmün koruma
Glikomakropeptid	1.2	Bifidobakteri büyümesi İmmünomodülasyon Antiviral
Laktoferrin	0.1	Antimikrobiyal, yara iyileşmesi Antiviral Antioksidan Antikarsinogenik Antitoksin Antienflamatuar Antitrombotik İmmünomodülasyon Fe Emilimi
Laktoperoksidaz	0.03	Antimikrobiyal, yara iyileşmesi
Lizozim	0.0004	Antimikrobiyal, yara iyileşmesi Laktoferrin ile sinerjistik etki İmmünoglobülinler ile sinerjistik etki

[40]'dan adapte edilmiştir.

Süt Serumu Proteinlerinin Tarihçesi:

Modern bilim ancak son yıllarda zengin bir protein kaynağı olarak süt serumunun önemini kavramıştır. İlk uluslararası “whey” konferansı 1986’da “American Dairy Processing Institut” ve “International Dairy Federation” sponsorluğuyla düzenlenmiştir. Bunu 11 yıl sonra “Chicago, Illionis” ’te Ekim 1997’de yapılan ikinci uluslararası konferans izlemiştir. Bu konferansta 24 ülkenin sunumundan 7 tane başlık çok dikkat çekmiştir.

1. Diyetle alınan antioksidanların (düşük molekül ağırlıklı peptidler [MW: 300-3,000 Da] dahil) kanser ve kalp hastalıklarını önlemedeki yardımı.
2. Üç peynir altı suyu peptidinin (BSA, alfa-laktalbümin ve laktoferrin) esas hücre koruyucularını arttırarak immün durumu yükseltmesi: glutatyon.
3. Süt serumu proteininin sıçanlarda timus gelişimini arttırarak kolon kanserini azaltması.
4. Fotodinamik terapiyle birlikte peynir altı suyu tozu takviyesinin sıçanlardaki tümör genişliğini %60 azaltması.
5. Peynir altı suyu peptidlerinin (laktoproteinler) kolesistokinin (CCK) salınımını arttırarak diyetle yardımcı olması, iştah kesici potansiyeli.
6. Üç peynir altı suyu peptidinin (laktoferrin, laktoperoksidaz ve immünoglobülin) serbest radikal savunmasında ve antibakteriyel olarak görev alması.
7. Whey içeriğindeki büyüme faktörlerinin (IGF-I ve II) bağırsak içi ve dışı yara iyileşmesine yardım etmesi. <http://www.wheyprotein.com/sec1.html> 28.08.2006.

Üçüncü uluslararası “whey” konferansı Eylül 2001 yılında Almanya, Münih’te; dördüncü uluslararası “whey” konferansı ise Eylül 2005 yılında “Chicago, IL’de gerçekleştirilmiştir. 2005 yılında gerçekleştirilen konferansta; fiziksel olarak aktif olan yetişkinlerin performansını attırmaya yönelik “whey”den elde edilen biyoaktif bileşenlerin gösterilmesi, kas dokusunu attırmaya yardımcı olması, kardiyovasküler sağlığı desteklemesi, kilo düzenlemesi ve immün savunma sistemini geliştirmesi konuları üzerinde durulmuştur.

Ayrıca süt serumunun sıçanlarda kolesterol düşürücü etkisi olduğu bildirilmiş (87), laktoferrin ve glikomakropeptidlerin antimikrobiyal aktivitesi rapor edilmiştir (45). Laktoferrin, antiviral, antimikrobiyal (antibakteriyel ve antifungal),

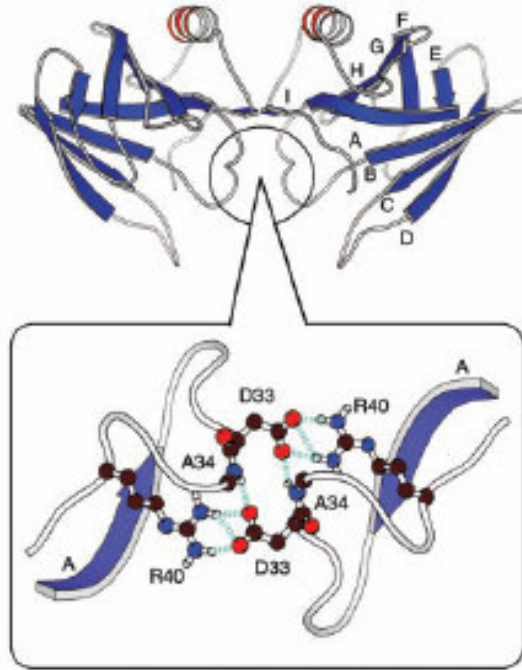
immünomodulator ve antioksidan aktivitelere; laktoperoksidaz ise antibakteriyel aktiviteye sahiptir.

Sıçan meme karsinomunda süt serumu proteinleri ile beslenmenin hücre proliferasyonunun gerilemesine yol açtığı ve meme dokusunda glutatyon düzeyini arttırdığı bildirilmiştir (33). Süt protein konsantrasyonunun anti-kanser özellikleri ürünün biyoaktivitesi olarak tanımlanmaktadır.

Bugün peynir altı suyu, antimikrobiyal aktivite, immün düzenleme, kas gücü ve vücut bileşenlerini arttırmada; kalp damar hastalıkları ve osteoporozu önlemede etkili popüler bir protein desteğidir (48).

β-laktoglobulin:

β-laktoglobulin, inek sütündeki toplam süt serumu proteinlerinin yaklaşık yarısını oluşturan majör süt serumu proteindir (1, 15) (Şekil 4.1). İki internal disülfid bağı ve bir serbest tiyol grubu içeren nonkovalent olarak bağlı dimer yapıdadır. Kalsiyum ve çinkoyu bağlar ve retino bağlayıcı proteinler ile kısmi dizi homolojisi göstermektedir. β-laktoglobulin, lipidler, yağda çözünen vitaminler ve mineraller için çok sayıda bağlanma bölgesi içermektedir (84).



Şekil 4.1: β-laktoglobulin yapısı. Protein data bankası kodu 1BEB (14) ile Molscript tarafından yapılmıştır (41).

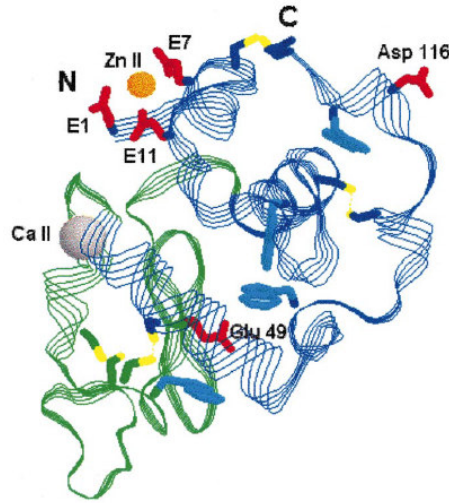
AB bölgeleri arasında 8 hidrojen bağı bulunmaktadır. Pozitif yüklü Arg40 ve negatif yüklü Asp33 arasındaki elektrostatik etkileşimin (örneğin, tuz köprüsü) önemli bir rol oynadığı görülmüştür. Hidrojen bağlarından veya elektrostatik etkileşimden sorumlu kalıntıların değişmesi, monomer-dimer durumunda değişikliğe yol açmaktadır (73).

α -laktalbümin:

α -laktalbümin, toplam inek süt serumu proteinlerinin % 25'ini oluşturan majör süt serumu proteindir (Şekil 4.2). Kalsiyum bağlayan bir proteindir; kalsiyum emilimini artırır ve lizin, lösin, treonin, triptofan ve sistein bakımından zengin bir kaynaktır (84).

α -laktalbümin, küçük (MA 14,200), asidik (pI 4-5), birçok açıdan önemli olan, Ca^{+2} bağlayıcı süt proteindir (64).

α -laktalbümin, insan, kobay, sığır, keçi, deve, at ve tavşan proteinleri de dahil olmak üzere 123 aminoasit kalıntısı içermektedir [örnek olarak (55)]. Sadece sıçan α -laktalbümini, ek olarak 17 C-terminal kalıntısı içermektedir. Doğal α -laktalbümin, 2 kısımdan oluşmaktadır: büyük α -sarmal kısmı ve küçük β -tabaka kısmı. Bu bölgeler birbirine Ca^{+2} bağlayıcı bölge ile bağlanmaktadır. α -sarmal bölgesi, 3 majör α -sarmaldan (5-11, 23-24 ve 86-98 kalıntıları) ve 2 kısa 3_{10} sarmaldan (18-20 ve 115-118 kalıntıları) oluşmaktadır. Küçük bölge, bir seri bölümden oluşmaktadır; küçük 3 katlı antiparalel β -kırmalı tabaka (41-44, 47-50 ve 55-56 kalıntıları) ve kısa 3_{10} heliks (her dönüşte 3 kalıntı ve 10 atom içeren zincir içi hidrojen bağı bölümü; 77-80 kalıntıları). İki bölge aralarındaki derin yarık ile birbirinden ayrılmıştır. Aynı zamanda, iki bölge 73 ve 91 kalıntıları arasındaki sistein köprüsü ile Ca^{+2} bağlanma bölgesini oluşturarak bir arada tutulmaktadır. İkinci önemli disülfid bağı 61-77, 2 bölgeyi birbirine bağlamaktadır. Sonuçta, α -laktalbümin yapısı, 4 disülfid bağı ile stabilize edilmektedir (6-120, 61-77, 73-91 ve 28-111) (64).



Şekil 4.2: α -laktalbümin yapısı. “Brookhaven” protein data bankasından alınmıştır (64).

α - kısmı mavi, β kısmı yeşil ile gösterilmiştir. Trp kalıntısı mavi ile ve S-S disülfid bağları sarı ile gösterilmiştir. Zn^{+2} iyonu ile koordinasyona katılan kalıntılar kırmızı ile gösterilmiştir (64).

α -laktalbümin ve oleik asidin oluşturduğu kompleks molekül, HAMLET (**h**uman **α** -lactalbumin **m**ade **l**ethal to **t**umor cells) olarak adlandırılmaktadır. HAMLET molekülünün elde edilmesinde uygulanan yöntemde önce α -laktalbümin EDTA ile muamele edilerek Ca^{+2} iyonu uzaklaştırılır. Oluşan apo α -laktalbümin oleik asit ile muamele edilmiş matriks içeren iyon değişim kromatografisine uygulanır. Yüksek tuz konsantrasyonu ile elüsyon sağlanır ve HAMLET molekülü elde edilir. Sığır α -laktalbümininden elde edilen kompleks ise BAMLET (**b**ovine **α** -lactalbumin **m**ade **l**ethal to **t**umor cells) olarak adlandırılmıştır. HAMLET molekülünün tümör hücrelerinde apoptozis benzeri hücre ölümünü indüklediği, ancak sağlıklı hücelere etki etmediği gözlenmiştir. HAMLET molekülünün tümör hücrelerinde tümörü ortadan kaldırması ve bunu sağlıklı hücelere zarar vermeden gerçekleştirmesi molekülün önemini ortaya koymaktadır. Molekülün etki mekanizmasının tam olarak belirlenmesi ile ileride daha spesifik tümör tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir (53).

Serum Albümin (BSA):

İnek serum albümini (BSA), toplam süt serumu proteinlerinin yaklaşık % 10-15'ini oluşturan büyük bir moleküldür. BSA, esansiyel aminoasit kaynağıdır ancak potansiyel tedavi edici aktivitesi üzerinde elde edilen çok az kullanışlı bilgi mevcuttur (48).

İmmunoglobulinler:

İmmunoglobulin (Ig), bir antikor, gama-globulindir. 5 sınıf antikor vardır: IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM. IgG, yetişkin bir insanda toplam antikorların yaklaşık % 75'ini oluşturur (48).

Sütün süt serumu fraksiyonunun %10-15'i gibi önemli bir miktarı immünoglobülinleri içermektedir (48).

Glikomakropeptid:

Glikomakropeptid (GMP), peynir altı suyunda % 10-15 oranında bulunan, kazein makropeptid olarak da adlandırılan bir proteindir. Peynir üretimi sırasında, kazein üzerine “chymosin” etkisi ile oluşur. GMP, sadece üretimde “chymosin” kullanıldıysa bulunur (13). GMP, dallanmış zincirli amino asitler bakımından zengindir ve fenilalanin, triptofan ve tirozin gibi aromatik amino asitlerce fakirdir. Fenilalanin içermeyen ve doğal olarak oluşan birkaç proteinden biridir ve bu durum fenilketonüri (PKU) olan kişiler için GMP'nin güvenli olmasına neden olmaktadır (48).

Laktoperoksidaz:

Peynir altı suyu, hidrolazlar, transferazlar, liyazlar, proteazlar ve lipazlar da dahil olmak üzere çok sayıda enzim içermektedir. Laktoperoksidaz, sütün süt serumu fraksiyonunda bulunan önemli bir enzimdir. Laktoperoksidaz, peynir altı suyunda bulunan toplam proteinlerin % 0.25-0.5'ini oluşturur. Hidrojen peroksidin indirgenmesini de içeren, bazı molekülleri katalizleme özelliği bulunmaktadır (7). Bu enzim sistemi, birçok bakteri türlerini öldüren veya inhibe eden ürünleri oluşturan

birçok halojenürleri (örneğin, iyot ve brom) ve tiyosiyanatın peroksidasyonunu katalizler (42). Pastörizasyon işlemi sırasında laktoperoksidaz inaktif olmadığından bu durum koruyucu olarak stabilitesini de göstermektedir (48).

Laktoferrin:

Laktoferrin; monomerik, bilobal, yaklaşık 80 kDa moleköl ağırlığında bir glikoproteindir (23).

İnsan ve sığır kaynaklı laktoferrinler %69 dizi homolojisi gösterirler ve tersiyer düzeyde yapısal olarak bakıldığında birbirlerine çok benzedikleri görülmektedir (67).

4.2. PROTEİN SAFLAŞTIRMA TEKNİKLERİ

4.2.1. Protein Saflaştırmanın Amacı:

Protein saflaştırmanın amacı sadece saf protein elde etmek değil aynı zamanda daha sonraki çalışmalar için kullanılabilecek bir protein preparatı hazırlamaktır. Bu çalışmalar; proteinin aktivitesinin araştırılması ve bu aktiviteden biyoteknolojik üretim, analitik veya terapötik amaçla yararlanılmasına yönelik olabileceği gibi, protein yapısının veya yapı-fonksiyon ilişkisinin araştırılmasını da hedefleyebilir (78).

4.2.2. Protein Saflaştırma Yöntemleri

İlk kez Berzelius tarafından kullanılan ve 1840 yılında ders kitaplarına geçen “Protein” adı yunanca bir numara, birinci sırada olmak anlamına gelen “protos” kelimesinden türetilmiştir. Proteinler bu adı haklı olarak taşımaktadır. Sayısız hayat fonksiyonu proteinlere bağlıdır ve proteinsiz bir canlı söz konusu olamaz. Her hücrenin bileşeni olan proteinlerin enzimatik kataliz, transport, depolama, mekanik destek, koordine hareket, sinir impulslarının transmisyonu, immün koruma, büyüme ve farklılaşmanın kontrolü gibi fonksiyonları vardır. Proteinlerin saflaştırılması hem bu fonksiyonları yapan molekülün belirlenmesi ve olayın mekanizmasının aydınlatılması hem de *in vitro* koşullarda endüstriyel veya analitik amaçla kullanılma olanağının araştırılması açısından büyük önem taşır (78).

4.2.2.1. Kromatografik Teknikler

Kromatografi kelimesi Yunanca “Chroma” renk ve “Graphein” yazmak kelimelerinden kaynaklanmıştır. İlk defa yirminci yüzyılın başlarında gözle görünen, renkli bitki pigmentlerinin ayrılmasında kullanılmış bir tekniktir (13).

Kromatografi farklı bileşiklerin değişken bir şekilde farklı fazlarda dağılmasına dayanır. Bir durağan faz (stasyoner faz) ve bir de hareketli faz (mobil faz) vardır. Hareketli faz durağan fazın üzerinden geçer ve ayrılması istenen maddeyi de beraberinde sürükler. Ayrılacak madde bileşenleri farklı derecede durağan fazla etkileşime girerler. Durağan fazla etkileşimi fazla olan bileşenler daha ağır, etkileşimi az olan bileşenler ise daha çabuk hareket ettiklerinden bileşenler birbirlerinden

ayrılırlar. Bileşiklerin bileşenlerine ayrılmasında, durağan faz ile bileşenler arasındaki etkileşimin tabiatına göre farklı kromatografik yöntemler geliştirilmiştir (Tablo 4.3, 4.4). Bu etkileşim molekül büyüklüğüne, polariteye, spesifik bağlanma özelliklerine veya elektrostatik çekim gücüne dayanabilir (20).

Tablo 4.3: Moleküler Özellikler Baz Alınarak Yapılan Kromatografik Sınıflama (60)

Moleküler Özellik	Kromatografi Yöntemi
Polarite	Dağılım Kromatografisi
Yük	İyon Değişim Kromatografisi
Moleküler ağırlık	Jel filtrasyon Kromatografisi
Hidrofobik özellikler	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
Spesifik molekül bağlama özellikleri	Affinite Kromatografisi

Tablo 4.4: Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması (60)

	Hareketli fazın tipi	Sabit fazın tipi	Ayırma mekanizması	Teknik	Kromatografik yöntemin ismi
Kromatografi	Gaz kromatografisi	Sıvı	Dağılma	Kolon	Gaz Sıvı Kromatografisi
		Katı	Adsorpsiyon	Kolon	Gaz Katı Kromatografisi
	Sıvı kromatografisi	Sıvı	Dağılma	Kolon	Klasik Sıvı Sıvı Kromatografisi
				Düzlemsel	İnce Tabaka Kromatografisi
		Bağlı Sıvı	Modifiye edilmiş dağılma	Kolon	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
				Düzlemsel	Yüksek Performans İnce Tabaka Kromatografisi
		Katı	Adsorpsiyon	Kolon	Klasik Sıvı Katı Kromatografisi
					Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
				Düzlemsel	İnce Tabaka Kromatografisi
					Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
			İyon Değişim	Kolon	Kağıt Kromatografisi
					İyon Değişim Kromatografisi
			Dışlama	Kolon	Dışlama Kromatografisi veya Jel Filtrasyon Kromatografisi

Adsorpsiyon Kromatografisi:

Adsorpsiyon, bazı maddelerin katı, polar bir maddenin yüzeyine fiziksel olarak bağlanmasıyla gerçekleşen bir işlemdir. Polar bir bileşiğin çözeltisi, aktif kömür, silika gibi çok ince öğütülmüş bir katı ile temas ettirildiğinde katının yüzeyinde oldukça geniş bir adsorpsiyon yer alır. Adsorbanların büyük çoğunluğu polar, asidik (silika) veya bazik (alumina) olup adsorpsiyon derecesinin yüksek olabilmesi için büyük yüzey alanlarına sahiptirler (61).

Katı-sıvı kromatografinin bir şekli olan adsorpsiyon kromatografisinde, ayrılacak bileşikler katı bir materyalin (durağan fazın) üzerinde adsorplanırlar. Durağan faz, üzerinde ayrılacak bileşen ile dipol-dipol etkileşimleri, hidrojen bağı ve/veya van der Waals etkileşimleri nedeni ile adsorpsiyonun gerçekleştiği gözenekli ince öğütülmüş bir katıdır. Bu bileşikler bir çözücü veya çözücü sistemi yardımıyla adsorban katıdan desorbe edilirler. Bileşiklerin ayrılması, çözücüdeki çözünürlükleri ile adsorbana olan ilgileri arasındaki bağıl dengeye bağlıdır (61).

Adsorbandan ayrılacak bileşiklerin bağıl etkileşimi, maddelerin kimyasal yapısının çözücünün ve adsorbanın doğasının bir fonksiyonudur. Genellikle adsorban olarak alumina, silika jel, aktif kömür, selüloz, nişasta, kalsiyum fosfat jeller, hidroksiapatit ve sakkaroz kullanılır. Yaygın olarak kullanılan çözücüler ise, hekzan, benzen, petrol eteri, dietil eter, kloroform, diklorometan ve etil, propil, n-bütül alkol gibi çeşitli alkoller ve çeşitli sulu tamponlar ve tuzlar, çeşitli kombinasyonlardaki çözücülerdir (61).

Dağılım Kromatografisi:

Dağılım kromatografisi, bir örnekteki çözünmüş maddeleri, iki sıvı faz arasındaki veya bir gaz ve bir sıvı faz arasındaki “dağılımlarındaki” farklılıklara dayanarak ayıran bir işlemdir. Dağılım kromatografisinin her iki tipinde de sabit faz sıvı iken hareketli faz bir sıvı veya bir gazdır (37).

Sıvı-sıvı dağılım kromatografisinde çözünmüş maddenin ayırımı, bir organik (nonpolar) çözücü ve bir sulu (polar) çözücü içinde relatif çözünürlüğüne dayanır. Sıvı-sıvı dağılımı (partisyon [ekstraksiyon]) en basit şekilde bir ayırma hunisinde gerçekleştirilir. Bir sulu çözelti içinde polar ve nonpolar gruplar içeren moleküller,

birbirine karışmayan bir organik çözücüye eklenir. Düzenli ve şiddetli çalkalamadan sonra, ayrılmaya hazır iki faz oluşur. Polar moleküller sulu çözücü içinde kalırken nonpolar moleküller organik çözücü içinde kalırlar. Böylelikle, çözünen madde moleküllerinin iki ayrı sıvı faz içinde dağılımı gerçekleşmiş olur (6).

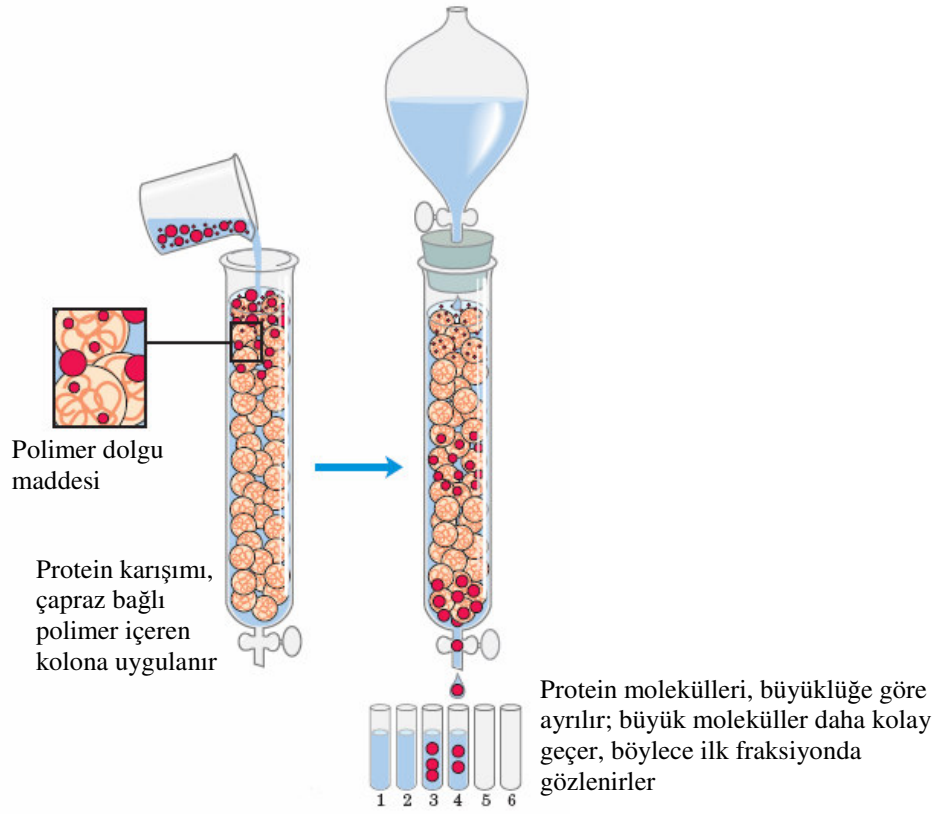
Jel Filtrasyon (Dışlama) Kromatografisi:

Jel filtrasyon kromatografisi, moleküler boyuta bağımlı bir separasyon gerçekleştirmektedir (43).

Jel filtrasyon kromatografisinin temel prensibini, örnek moleküllerinin, poröz yapı ile tanımlanan sabit faz (=stationary phase) ile hareketli faz (=mobile phase) arasındaki dağılımı oluşturmaktadır. Separasyon olayı, kolonda paketlenmiş porlu jel matriks (boncuk formunda) ve çevresinde çözücü aracılığı ile meydana gelmektedir. Kolona uygulanan örnek molekülleri, porların boyutundan çok büyük ise sabit faz tarafından tutulmamakta ve kolonu ilk olarak terk etmektedir. Küçük moleküller ise matriks porlarına girmekte ve burada alıkonmaktadır. Bunu izleyen basamakta, porlar tarafından tutulan küçük moleküller difüzyon ile ayrılmakta ve mobil fazın akışı aracılığı ile ortamdan süpürülmektedir. Ara boyuttaki örnek molekülleri bir dereceye kadar porlara girmekte, ancak derin penetrasyon eksikliği nedeniyle küçük moleküller gibi kolaylıkla tutulmamaktadır. Bu şekilde bütün moleküller azalan boyutlarına bağımlı olarak kolondan elüe olmaktadır (43) (Şekil 4.3).

Şekil olarak globüler yapıya sahip olmayan bazı proteinler jel filtrasyon kromatografisinde farklı davranış göstermektedir. Genel olarak uzun ince proteinler, aynı boyuttaki globüler proteinlerden daha erken elüe olmaktadır (38).

Destek jeller olarak en çok tercih edilenler, çapraz bağlı poliakrilamid, agaroz, dekstran veya bunların kombinasyonlarıdır (24).



Şekil 4.3: Jel filtrasyon kromatografisi (43).

Jel kromatografisini diğer sıvı dağılım (partisyon) kromatografi tiplerinden ayıran karakteristik özellik, kromatografi yatağındaki durgun fazı oluşturan taneciklerin yüksüz bir jel içermesidir. Bu jel kromatografi yatağındaki çözücü ile şişirilmektedir. Tipik olarak, kullanılan çözücüye yüksek affiniteli makromolekülleri içeren jeller kullanılmaktadır. Bu makromoleküller çapraz bağlanarak ve üç boyutlu bir ağ oluşturarak yapıya çözünmez özellik vermektedir. Sonuçta sıvıda çözünmek yerine büyük miktarda sıvı olarak şişmektedir (38).

Dekstran ve agaroz kaynaklı matrisler, biyolojik yıkıma uğramaları nedeni ile antimikrobiyal ajan (örnek: sodyum azid, merthiolat, kloreton, etil merkürük tiosalisilat) varlığında saklanmaktadır (24, 74).

İyon Değişim Kromatografisi:

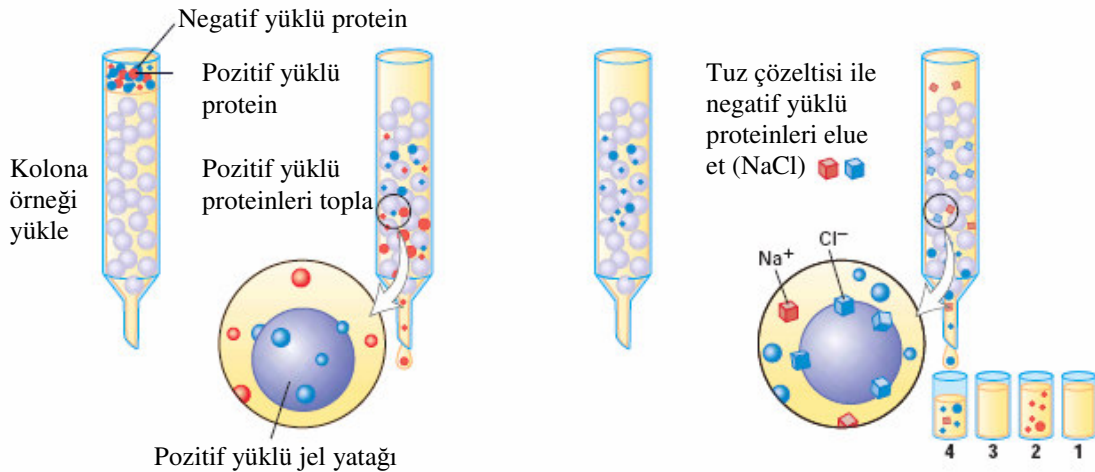
Elektrostatik çekime dayanan bu adsorpsiyon kromatografisinde örnekte bulunan bileşenler yüklü durağan faza olan afinitelerine göre ayrılırlar. İyon değiştiriciler iki kısımdan oluşur:

1. İçinde ve yüzeyinde kimyasal olarak (kovalent bağlarla) bağlanmış yüklü gruplar bulunan üç boyutlu, çapraz bağlarla bağlanmış çözünür olmayan dolgu maddesi (matriks)

2. Hareketli karşı iyonlar.

Karşı iyonlar tersinir olarak aynı yükteki başka iyonlarca, çözünür olmayan dolgu maddesinde herhangi bir değişikliğe yol açmadan değiştirilebilirler (9, 65, 66) (Şekil 4.4).

İyon değiştirici dolgu maddesi şayet pozitif gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar negatif olup bu tür iyon değiştiriciler negatif iyonları değiştirdiklerinden anyon değiştiriciler adını alırlar. Benzer şekilde şayet dolgu maddesi negatif gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar pozitif olup bu tür iyon değiştiriciler pozitif iyonları değiştirdiklerinden katyon değiştirici adını alırlar (20) (Tablo 4.5).



Şekil 4.4: İyon değişim kromatografisi (46).

Tablo 4.5: Yaygın kullanılan iyon değiştiriciler (20)

İyonik Grup	pH Aralığı	Dolgu Maddeleri
Anyon Değiştiricileri		
Zayıf Anyon Değiştiricisi Dietilaminoetil (DEAE) Fonksiyonel Grup: $-O-CH_2.CH_2.N^+(C_2H_5)_2HCl^-$ Karşı iyon: Cl^-	2-9	Dekstran, agaroz, lifli selüloz, mikrogranüler selüloz
Kuvvetli Anyon Değiştiricisi Kuarter aminoetil (QAE) Fonksiyonel Grup: $-O-CH_2.CH_2.N^+(C_2H_5)_2.CH_2CH(OH)CH_3Cl^-$ Karşı iyon: Cl^-	2-10	Dekstran, lifli selüloz
Kasyon Değiştiricileri		
Zayıf Kasyon Değiştiricisi Karboksimetil (CM) Fonksiyonel Grup: $-O-CH_2COO^-Na^+$ Karşı iyon: Na^+	3-10	Dekstran, agaroz, lifli selüloz, mikrogranüler selüloz
Kuvvetli Kasyon Değiştiricisi Sülfopropil (SP) Fonksiyonel Grup: $-O-CH_2CH_2CH_2SO_3^-Na^+$ Karşı iyon: Na^+	2-12	Dekstran, mikrogranüler selüloz

Proteinler iyon değiştiricilere zıt yüklü gruplar arasındaki iyonik etkileşimle tersinir olarak bağlanırlar. Bağlanan proteinler ya tampon çözeltisinin iyonik gücü kademeli olarak arttırılarak ya da tampon çözeltisinin pH'ı değiştirilmek suretiyle protein yüzeyindeki etkileşen grupların yükü yok edilmek suretiyle kolondan ayrı ayrı elüe edilirler. Bütün bu işlemler sırasında iyonik değiştiricinin yükü sabit kalacak bir pH aralığı seçilmelidir yoksa bütün proteinler kolondan ayrılmadan birlikte elüe olurlar (20).

Bağlanma gücü hem proteinin izoelektrik noktasıyla hem de toplam yükü ile bağlantılıdır. Dolayısıyla aynı izoelektrik noktasına sahip iki protein izoelektrik odaklama ile ayrılmazken iyon değişim kromatografisiyle ayrılabilirler (36).

4.2.2.2. Elektroforetik Teknikler

Yüklü bir molekül iki elektrod arasında bir elektrik alanına konulduğunda (+), ya da (-) yüklü olmasına göre, katod ya da anoda ger. Bu elektrik alanında göçme işine “elektroforez” denir (58).

Elektroforezin kullanım amaçları:

- Saflaştırma
- Saflık kontrolü
- Molekül ağırlığı saptanması
- Kalıtsal ya da kalıtsal olmayan bir hastalığın tanısı
- Bir enzimin izomerlerinin saptanmasında
 - Popülasyon alışmasında
 - Adli tıp çalışmalarında
 - Bir hastalığın tanısında
- İmmünoloji ve moleküler biyoloji çalışmalarında (58).

Elektroforezde; genelde, örnek bir destek matriksi üzerinde g eder. Bu matriks; kağıt, selüloz asetat, nişasta jel, agaroz veya poliakrilamid jeli olabilir (86).

Agaroz; jellerinin gözeneklerinin büyük olması nedeniyle, genelde daha büyük molekül kütleli, nükleik asitler ve protein komplekslerinin ayrılmasında kullanılır.

Poliakrilamid; küçük gözenekli jeller oluşturur, birçok proteinin ve küçük oligonükleotidlerin ayrılmasında kullanılır (86).

Doğal koşullar altında elektroforez; genelde çözünür proteinlerin, biyolojik ve enzimatik aktivitelerinin kaybedilmeden incelenmesi gereken durumlarda kullanılır. Anyonik deterjan sodyum dodesil sülfat varlığında gerçekleştirilen poliakrilamid jel elektroforezinde proteinler moleküler büyüklüğe göre karakterize edilirler. Protein saflaştırılmasındaki diğer önemli yöntem ise izoelektrik noktalara göre ayırım yapan izoelektrik odaklama (odaklama) dır (86).

Poliakrilamid jelleri, akrilamid monomerlerinin bir çapraz bağlayıcı ajanla polimerizasyonu sonucu meydana gelir. Poliakrilamid jeller için, en çok kullanılan çapraz bağlayıcı ajan N,N-metilen bisakrilamid (Bis) tir. Reaksiyon, amonyum persülfat ve N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED) ile başlatılır (86).

Akrilamid jelleri, çözeltide bulunan akrilamidin total yüzdesi ile belirtilir. Jeldeki gözenek boyutu akrilamid ve bisakrilamid'in konsantrasyonlarını değiştirerek ayarlanabilir (%3-30 akrilamid konsantrasyonu aralığında). Düşük yüzdeli jeller büyük gözenek çapına, büyük yüzdeli jeller ise küçük gözenek çapına sahiptir (86).

Sodyum dodesil sülfat, anyonik bir deterjandır. Proteinlerin, büyük bir kısmı, gram protein başına 1.4 g SDS bağlarlar. Bu şekilde, etkin olarak polipeptid zincirlerinin net yükü maskelenir ve negatif yüklü SDS molekülleri içeren bir seri oluşur. Elektroforetik ayırma sadece etkin moleküler kütleye bağlıdır ve jeldeki moleküler elek doğrultusunda ayrılma gerçekleşir. Kullanılan poliakrilamid jel konsantrasyonu etkin ayırmayı saptayan olgudur. SDS-PAGE'e uygulanacak örnekler; merkaptotanol, SDS, bromfenol mavisi ve sükroz veya gliserol içeren tamponla muamele edilirler. Merkaptotanol; proteinin tersiyer yapısını bir arada tutan disülfid bağlarını indirger. SDS ise proteini denatüre eder; bir SDS molekülü kuvvetlice her bir-iki amino asit artığına bağlanır ve yük maskelenir. Bromfenol mavisi; iyonize olabilen bir boyadır ve elektroforezin kolay izlenebilmesi açısından ortama ilave edilir. Sükroz veya gliserol ise örnek solüsyona bir yoğunluk kazandırması ve elektroforez hücreğine uygulandığında, örneğin elektroforez tamponunda kolayca çökmesini sağlamak açısından kullanılır (86).

İzoelektrik Odaklama:

İzoelektrik odaklama (IEF); proteinlerin sürekli bir pH gradientinde izoelektrik noktalarına göre ayrılması temeline dayanan ideal bir metottur. Proteinler yüklerine göre, net yüklerinin sıfır olduğu pH değerine (pI) kadar göç ederler ve bu noktada hareketsiz kalarak, dar bir bölgede odaklanırlar. İzoelektrik odaklama; proteinleri yük özelliklerine göre ayırdığı için, moleküler elek etkisini minimuma indirmek gerekmektedir (86).

İki Yönlü Jel Elektroforezi (2D-PAGE):

İki yönlü jel elektroforezi, yüke bağımlı bir ayırma yöntemi olan izoelektrik odaklama (IEF) ve boyuta bağlı SDS-poliakrilamid jel elektroforezinin bileşimidir. İki yönlü jel elektroforezi (2D-PAGE) proteinlerin ayrılmasında kullanılan en gelişmiş analitik metottur (86).

Birinci yönde, izoelektrik odaklama; tüplerde poliakrilamid jelinde, amfolit, 8 M üre ve bir non-iyonik deterjan varlığında gerçekleştirilir. Denatüre olmuş proteinler bu jelde izoelektrik noktalarına göre ayrılırlar. Jel daha sonra tüplerden çıkarılır ve 30 dakika sodyum dodesil sülfat içeren tamponda, denatüre proteinlerin bağlanmasını sağlamak için bekletilir ve ikinci yönde SDS jel sisteminin ayırma jeli üzerine yerleştirilir ve agaroz ile fikse edilir. Elektroforez başlatılır ve SDS-bağı proteinler molekül büyüklüklerine göre ayrılırlar.

4.2.2.3. Diyaliz, Diafiltrasyon, Çöktürme ve Santrifüj**Diyaliz:**

Diyaliz, küçük moleküllerin genellikle tuzların uzaklaştırılmasında veya tampon değişiminde kullanılmaktadır. Sistemin işleyişi; membranla ayrılan iki faz arasındaki konsantrasyon yani kimyasal potansiyel farkına dayalı difüzyonla (osmoz) gerçekleşmektedir. Diyaliz işleminde küçük moleküllerin geçişi, membranın her iki yüzeyinde kimyasal potansiyel farkı eşitleninceye kadar devam eder. Diyaliz işlemi, por çapı 1-20 nm arasında olan seluloz asetat veya nitrattan üretilmiş ve por büyüklüğü

NMWC (Nominal Molecular Weight Cut-off) olarak tanımlanan diyaliz torbaları veya tüpleriyle gerçekleştirilir (77).

Torba düşük iyon şiddetli +4 °C deki tampona yerleştirilir ve tampon karıştırılır, diyaliz torbasının porlarından tuzlar ve geçebilen proteinler, peptidler, nükleotidler, koenzim, adenozin trifosfat (ATP) dışarıya difüze olurlar ve torbadaki iyon şiddeti azalır. Membran içindeki ve dışındaki iyon şiddetinin dengeye gelmesi 3-5 saat sürebilir (77).

Diafiltrasyon:

Protein çözeltisindeki tuzun giderilmesi ve tampon değişimi amacıyla 100 ml'den büyük hacimlere uygulanabilir. Alternatif hızlı bir yöntemdir. Klasik diyalizde membranla ayrılmış iki çözelti arasında relatif tuz konsantrasyonunun dolayısıyla basıncın farklı olması tuzun membrandan geçişinde itici güç oluşturmaktadır. Tuzlar membrandan çözgen akışı doğrultusunda taşınırlar (79).

Çöktürme:

Proteinlerin çözünürlüklerindeki farklanmalar; proteinlerin büyüklük ve şekilleri ile yüzeylerinde çözücünün oluşturduğu iyonik, polar ve apolar bölgelerin dağılım ve konsantrasyonlarının bir fonksiyonudur (77).

Proteinlerin çökmesi; moleküllerin pH ve iyonik kuvvet değişimi ile organik çözgen, diğer inert bileşen veya polimer ilavesi gibi değişen faktörlerle agregasyonu sonucu meydana gelir (4, 32, 74).

Santrifüj:

Santrifüjle ayırma tekniği; merkezkaç kuvveti etkisi altındaki partiküllerin, bağlı molekül ağırlığına, yoğunluğuna ve şekline bağlı davranış farklılığı göstermesi ilkesine dayanmaktadır (25, 71).

Diferansiyel Santrifüj; yöntemin temeli, farklı yoğunluk ve büyüklükteki partiküllerin çökme hızlarının birbirinden farklı olması ilkesine dayanmaktadır.

Santrifüj büyük parçaların çökmesiyle başlayacaktır. Aynı ağırlıkta fakat farklı yoğunluktaki partiküllerden yüksek yoğunluktakiler daha az yoğunluktakilere kıyasla daha hızlı çökelecektir (77).

Yoğunluk gradienti santrifüj; bölgesel hız ve izopiknik (eşit yoğunluk) tekniği yöntemleriyle uygulanmaktadır (77).

Bölgesel hız tekniği; partikülün boyut, şekli ve yoğunluğuna; ortamın yoğunluk ve viskozitesine ve uygulanan merkezkaç kuvvetine bağlıdır. Aynı tip partiküllerin bölgesel hız tekniğiyle ayrımı büyüklüklerindeki farklılıklarına göre gerçekleşir (77).

İzopiknik santrifüjle, partiküller yoğunluklarına göre ayrılmakta olup, partikülün şekli, büyüklüğü ve santrifüjün süresi etkin değildir. Ancak, partikül büyüklüğü, gradientte izopiknik (aynı yoğunluktaki) tabakaya ulaşma hızında etkindir. Bu nedenle, benzer yoğunluğa sahip proteinler bu yöntemle genelde ayrılamazlar (77).

4.2.2.4. Mikrofiltrasyon ve Ultrafiltrasyon

Mikrofiltrasyon:

Filtrasyon, sıvı ve gaz fazındaki katı partiküllerin yanı sıra çözültide çözünmüş moleküllerin bağl büyüklüklerine göre seçimli fraksiyonlanarak ayrılması ve konsantre olması amacıyla uygulanmaktadır (77).

Uygulanan hidrostatik basınçla gerçekleştirilen mikrofiltrasyonda akış hızı yüksektir, işlem çabuktur ve dolayısıyla ayrışma verimliliği yüksektir (29, 69, 70).

Por büyüklükleri 0.1-10 μm arasında olan mikrofiltrelerle (MF), analizde kullanılacak tampon, reaktif veya örneklerden partiküllerin uzaklaştırılması gerçekleştirilebilir (77).

Ultrafiltrasyon:

Ultrafiltrat membranlar; mikrofiltrelerde olduğu gibi por çaplarına göre değil, membrandan geçemeyen küresel molekül (Nominal Molecular Weight Cut-off, NMWC) ağırlığına göre tanımlanır. Günümüzde, ultrafiltrasyon membranlarla hidrostatik basınç ve santrifüj gibi transmembran kuvvetlerin etkisiyle $\sim 300 \mu\text{l}$ 'lik

örneklerde dahi protein, peptid, polisakkarit, DNA ve RNA fraksiyonlanarak konsantre edilebilmektedir (17, 32, 47, 50, 70).

Molekölün şekli, porlardan membran transportunu etkilemektedir. Molekül ağırlığı 100,000 olan globüler protein 100,000 NMWC olan bir membrandan geçemezken doğrusal moleküller geçebilirler. Membrandaki por büyüklüğü ortalama bir değerde dağılım gösterirler. Bu özellik membran yapımında uygulanan yönteme ve üretici firmaya göre değişmektedir. Por büyüklüğünde 10 katlık bir değişim NMWC’de 100 katlık bir farklanmayla sonuçlanır. Bu nedenle, membranın NMWC’si protein molekül ağırlığından %20 oranında daha az olmalıdır. NMWC’deki azalmayla membran akış hızı azalır. Bu durumda, daha uzun işlem süresine veya daha yüksek transmembran basıncına ihtiyaç olur (76).

Ultrafiltrasyonda akış hızı, membran basıncıyla ve dolaylı olarak da membrandan geçen moleküllerin direnciyle orantılıdır. Bu direnç; membran direnci, konsantrasyon polarizasyonu ve kirlilik faktörlerinin toplamı olup membrandan filtratın akış hızının optimizasyonunda önemlidir (76).

Konsantrasyon polarizasyonu membran yüzeyinde moleküler birikimle oluşur (8, 57, 81). Oluşan bu jel tabakası, membran yüzeyinde ikinci bir ultrafiltrasyon tabakası gibi davranır ve membran akış hızını azaltır.

Çözelti ortamındaki parçacıkların veya makromoleküllerin membranda adsorblanması veya fiziksel olarak porlarda birikmeleriyle kirlenmeler oluşur ve dolayısıyla ultrafiltrasyon performansı düşer (3, 22, 75).

4.2.3. UV Absorbsiyonu ile Protein İçeriğinin Belirlenmesi

UV absorpsiyonu, çözeltideki protein konsantrasyonunu ölçmede kullanılan en basit metoddur. Tipik bir protein absorpsiyon spektrumunda, triptofan ve tirozin gibi aromatik amino asitlere bağlı olarak 280 nm’de bir absorpsiyon mevcuttur, 220 nm’nin altında da peptid bağlarına bağlı olarak absorpsiyon artar. Kolaylığı nedeniyle, UV absorpsiyonu, kromatografi kolonundan elde edilen eluatlardaki protein konsantrasyonunu sürekli görüntüleme (yarı kantitatif) amacıyla kullanılan bir metottur (18).

4.2.4. Peynir Altı Suyundaki Süt Serumı Proteinlerini Ayırma Yöntemleri

Seçimli Çöktürme:

Bu ayırma prosesi, çözeltiden çözünmeyen partikülleri uzaklaştırmak amacıyla fiziksel özellikleri değiştirmeyi kapsamaktadır. Proteinler, izoelektrik noktalarına yakın pH'da ve düşük iyonik şiddetteki çözeltielerde en az çözünürler ve bu koşullar altında çökme eğilimindedirler. Örneğin, Pearce (62), α -laktalbümini denature edip çöktürmek için peynir altı suyunun pH'ını 4.2'ye ayarladı ve solüsyonu 65 °C'ye ısıttı. Supernatanda, α -laktalbümin bulunmuyordu ve β -laktoglobulin gibi diğer kalan proteinlerce zengindi. Benzer olarak, Amundson et al. (1), elektodiyaliz ile pH 4.65'de peyniraltı suyunu demineralize ederek, sıcaklığı değiştirmeden β -laktoglobulin çökeltisi oluşturdu. Seçimli çöktürme, daha seyreltik supernatan çözeltisi ve daha konsantre çökelti oluşturarak peyniraltı suyunu çözeltisini fraksiyonlara ayırır (21).

Membran Filtrasyon:

Bu ayırma prosesi geleneksel olarak, sadece moleküler ağırlıktaki farklılıklara dayanmaktadır. Fraksiyonlamadan daha çok konsantre etmek amacıyla en yaygın olarak kullanılan metottur. Örneğin; 5,000-10,000 g/mol moleküler kütleli membranlar, peynir altı suyundaki tüm proteinlerin bir karışımı olan peynir altı suyu proteinleri konsantresi elde etmede sıklıkla kullanılırlar. Proteinleri fraksiyonlamada membran kullanma iki durumda mümkündür:

1. moleküler ağırlıkları arasındaki fark çok büyük olan proteinler (örn; α -laktalbümin ve immünoglobülin G)

2. hem büyüklük hem de yükleri arasındaki farkın çok büyük olduğu proteinler.

Son zamanlara kadar membran proseslerinin, moleküler kütlesi en az 10 faktör olarak farklı proteinlerin ayırımında başarıyla kullanılabileceği düşünülüyordu. Bununla birlikte, solüsyon pH'ının ve iyonik gücün dikkatli bir şekilde ayarlanmasıyla, moleküler kütleleri arasında çok az fark olan ya da hiç fark olmayan proteinlerin ayrılmasında kullanılmıştır (88). Düşük tuz konsantrasyonları (1-20 mmol/L), membran tarafından oluşturulan sterik ve elektrostatik itmeleri artırır. Peynir altı suyunun, iyonik

güç ve pH'ının birlikte ayarlanmasıyla bir dizi membran ayırma prosesi kullanılarak proteinlerin fraksiyonlanması gerçekleştirilebilir.

Seçimli Adsorpsiyon:

Süt serumu proteinleri için birçok seçimli adsorpsiyon prosesi örneği mevcuttur. α -laktalbümin adsorpsiyonu için Gurgel ve ark. (28) immobilize hekzapeptid WHWRKR kullandılar; Noppe ve ark. (56) immobilize fenil grupları kullandılar. β -laktoglobulin adsorpsiyonu için Wang ve ark. (82) immobilize retinal kullandılar. Bütün bu seçimli adsorpsiyon proseslerinde, bir tek saflaştırılmış protein, bu proteince fakir peynir altı suyu solusyonu ile birleştirilerek elde edilir.

Seçimli Elusyon:

Seçimli elusyon, seçimli adsorpsiyona karşı etkileyici bir alternatiftir (19). Seçimli elusyonda, karışımındaki bütün proteinler adsorbana bağlanırlar, kontaminantlar yıkanır ve birçok farklı saflaştırılmış protein elde etmek için birer birer elue edilirler. İdeal olarak, proste pahalı olmayan ve gıda-değerinde tamponlar ve adsorban kullanılır ve proses yüksek akış hızında gerçekleşir.

Çöktürme ve membran ile ayırma prosesleri hacim bağımlı ayırma yöntemleridir. Seçimli adsorpsiyon ve seçimli elusyon prosesleri daha az hacim bağımlıdır çünkü adsorban kapasitesi çoğunlukla elde edilen protein kütlesine bağlıdır; uygulanan sıvı hacmine bağlı değildir (44).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereçler

Cihazlar:

Buzdolapları: Profilo (+4°C), Uğur soğutma (-20 °C), Türkiye.

Büyük boy elektroforez tankı: Protean II xi Cell sistem, Bio-Rad, ABD.

Etüv: Heraeus D 6450, Almanya.

Fraksiyon toplayıcı: Frac-100 Pharmacia, İsveç.

Güç kaynağı: Pharmacia ECPS 3000/150, İsveç.

Kromatografi kolonu (1.5x30 cm kolon): Pharmacia, İsveç.

Manyetik karıştırıcı: HI 300N HANNA instruments, Singapur.

Otomatik mikropipet: BIOHIT Proline Pipette, Finlandiya.

pH metre: Inolab, WTW, Almanya.

Pompa: Bio-Rad Econo Pump, ABD.

Santrifüj: Sigma 2-16K Sartorius, Almanya.

Spektrofotometre: Spectronic 601 Bausch & Lomb, ABD.

Su banyosu: Dedeoğlu, Türkiye.

Terazi: Scaltec SBA 53, Almanya. AND GF-300, Japonya.

Ultra saf su: Sartorius arium 611, Almanya.

Vorteks: Retsch Mixer, Almanya.

Kimyasallar ve Çözeltiler:

0.45 µm filtre

2-Merkaptoetanol

Akrilamid

Amonyum persülfat (APS %10)

Asetik asit

Bromophenol Blue

Coomassie Brilliant Blue R 250

CuSO₄.5H₂O

Folin reaktifi

Glycerol

Glycine

Hidroklorik asit
Isopropanol
 K_2HPO_4
 KH_2PO_4
Moleküler ağırlık belirteci
N,N-metilen-bis-akrilamid
 Na_2CO_3
NaOH
Pepsin (Sigma P-7012)
Sephadex G-200 (Pharmacia)
Sığır Serum Albümin (BSA)
Sodyum Dodecyl Sülfat (SDS)
Sodyum potasyum tartrat
Tetrametilendiamid (TEMED)
Tripsin (Fluka 93610)
Tris
Vivaspin 20 50,000 MWCO membran filtre (VivaScience, Sartorius)

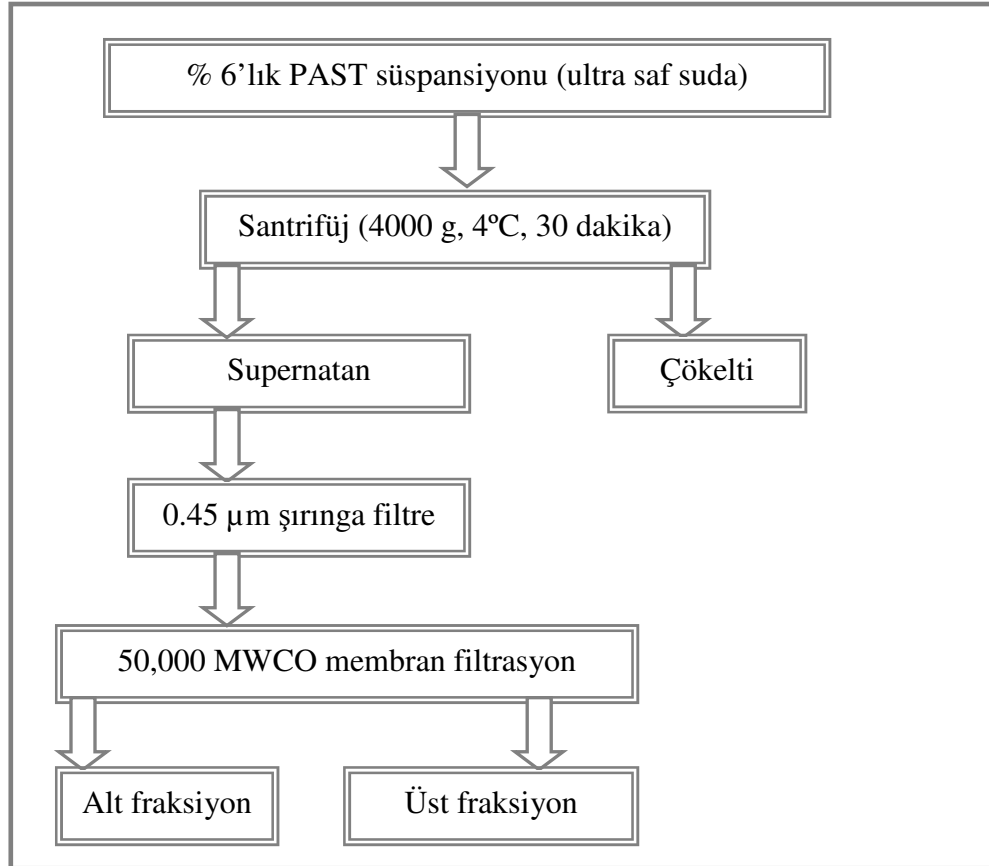
5.2. Yöntemler

Araştırmamızda süt serumu proteinleri kaynağı olarak Sütaş Bursa ve Havalisi Pastörize Süt ve Süt Mamülleri Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş.'den temin edilen peynir altı suyu tozu (PAST) kullanıldı. Tatlı peynir altı suyu tozu ürün spesifikasyonu Ek 1'de verilmiştir.

5.2.1. PAST Proteinlerinin Membran Filtrasyon Yöntemiyle Ayrılması

PAST'ndaki süt serumu proteinlerini elde etmek amacıyla membran filtrasyon yönteminden yararlanıldı (Tablo 5.1).

Tablo 5.1: Membran filtrasyon akış diyagramı



Cihazlar ve Malzemeler:

0.45 µm şırınga filtre

Santrifüj

Vivaspin 20 50,000 MWCO membran filtre

Deneyin Yapılışı:

% 6'lık peynir altı suyu tozu ultra saf suda süspansiyon haline getirildi. 4,000 g'de, 4°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Supernatan 0.45 µm şırınga filtreden geçirildi. Vivaspin 20 50,000 MWCO membran filtreye uygulandı. Optimum süreyi belirlemek amacıyla 4,000 g'de 4 °C'de 10'ar dakika arayla toplam 60 dakika santrifüj edildi. Alt ve üst fraksiyonlar ayrıldı.

5.2.2. PAST Proteinlerinin Kromatografik Olarak Ayrılması (2)

PAST'ndaki süt serumu proteinlerini elde etmek için jel filtrasyon kromatografisi kullanıldı.

Cihazlar ve Malzemeler:

0.45 µm şırınga filtre

Fraksiyon toplayıcı: Frac-100 Pharmacia

Kromatografi kolonu (1.5x30 cm; Pharmacia)

Peristaltik pompa

Santrifüj

Spektrofotometre

Tampon kabı

Kimyasallar ve zeltiler:

Fosfat tamponu (0.02 M, pH 8.6)

Sephadex G-200 (Pharmacia)

Sephadex G-50 (Pharmacia)

Deneyin Yapılışı:

rnek: n ayırma işlemleri uygulanan PAST zeltisi ve hidroliz işlemi sonrası elde edilen örnekler kullanıldı.

% 6'lık peynir altı suyu tozu ultra saf suda süspansiyon haline getirildi. 4000 g'de, 4°C'de 60 dakika santrifüj edildi. Supernatan 0.45 µm şırınga filtreden geçirildi.

Kolonun hazırlanışı: 1 g Sephadex G-200 tartıldı, üzerine 100 ml fosfat tamponu (0.02M, pH 8.6) eklendi, cam baget ile karıştırdıktan sonra oda sıcaklığında 2 saat bekletildi.

10 g Sephadex G-50 tartıldı, üzerine 100 ml fosfat tamponu (0.02 M, pH 8.6) eklendi, cam baget ile karıştırdıktan sonra oda sıcaklığında 2 saat bekletildi.

Jel kolona döküldü, kolonun dengelenmesi için kolon hacminin 2 katı kadar fosfat tamponu (0.02 M, pH 8.6) kolondan geçirildi. 0.45 µm şırınga filtreden geçirilen PAST örneği kolona yüklendi. Elusyon fosfat tamponu (0.02 M, pH 8.6) ile yapıldı. Akış hızı; 0.3 ml/dakika olarak ayarlandı. Fraksiyon toplayıcıda toplanan fraksiyonların (1 ml) 280nm’de spektrofotometrede absorbansları ölçüldü. Microsoft Excel programında grafikleri çizildi.

5.2.3. PAST Proteinlerinin Hidrolizi ile Süt Serumu Proteinlerinin Eldesi:

Peynir altı suyundaki süt serumu proteinlerini elde etmek amacıyla örnek pepsin veya tripsin ile hidroliz edildi (Tablo 6.4).

Cihazlar ve Malzemeler:

Etüv

Vorteks

pH metre

Kimyasallar ve Çözeltiler:

Pepsin

Tripsin

HCl

NaOH

Örnek: % 6’lık peynir altı suyu tozu ultra saf suda süspansiyon haline getirildi. 4000 g’de, 4 °C’de 60 dakika santrifüj edildi. 0.45 µm şırınga filtreden geçirilen örnek kullanıldı. Filtrat ve filtratın Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulanmasından sonra elde edilen F-2 fraksiyonu kullanıldı.

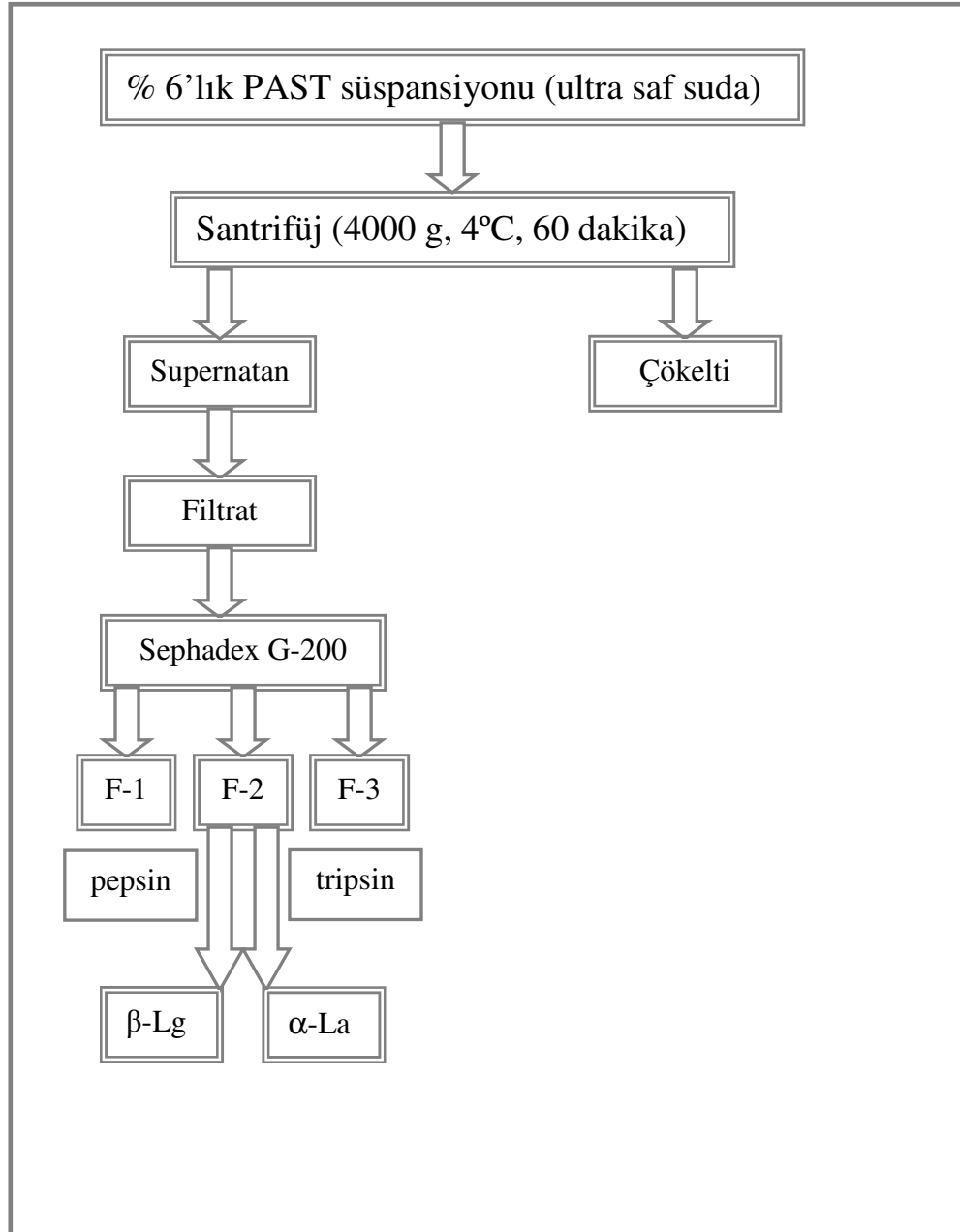
Deneyin Yapılışı:

Pepsin ile Hidroliz:

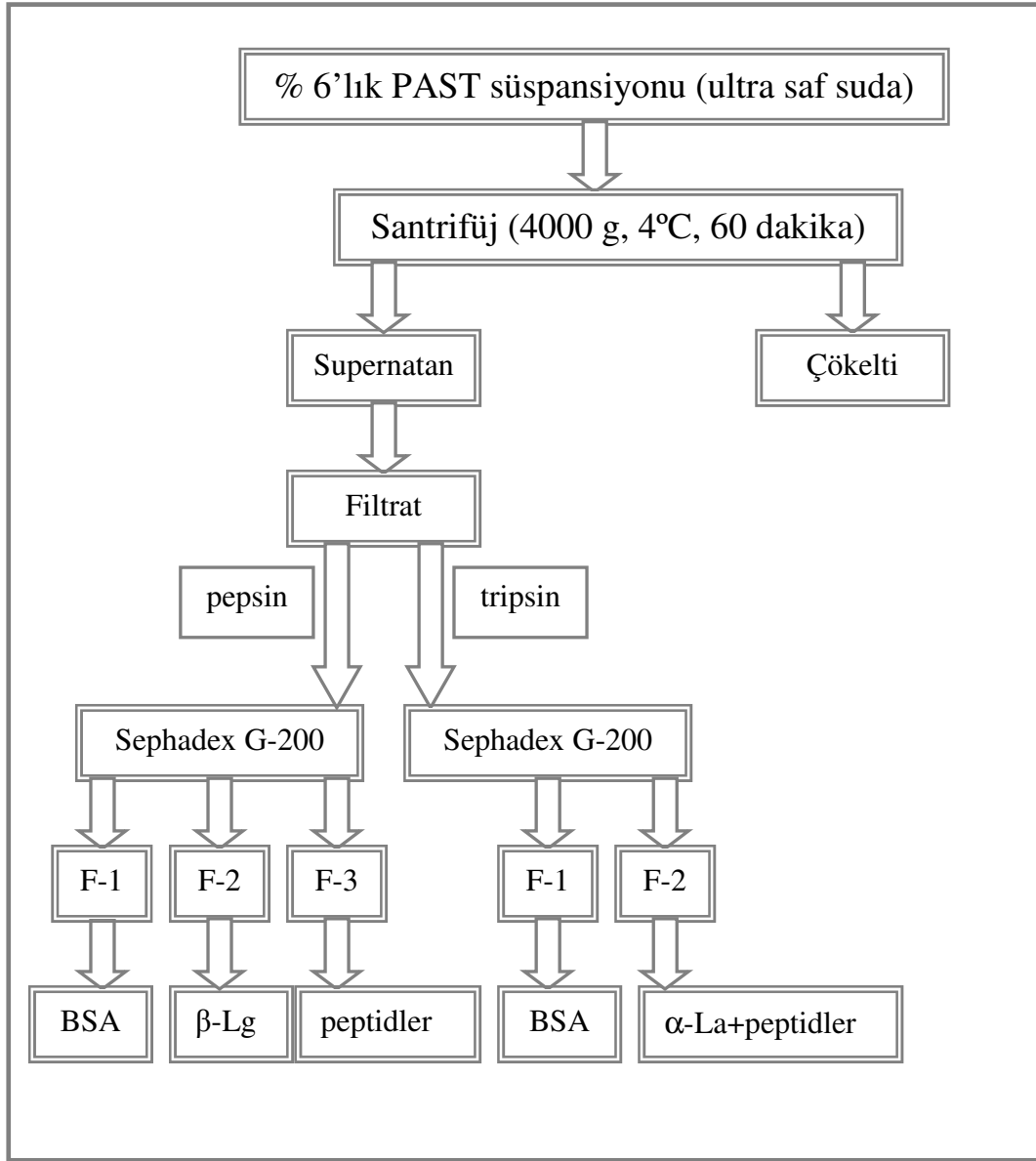
Örneğin pH’sı 1.0 M HCl ile 1.5’a ayarlandıktan sonra enzim: substrat oranı 1:50 veya 1:100 olacak şekilde pepsin (5 mg/ml; 0,01M HCl içinde) ile 37 °C’de 30 dakika hidroliz edildi. Hidroliz pH 7.8’e 1.0 M’lık NaOH ile ayarlanarak durduruldu.

Tripsin ile Hidroliz:

Örneğin pH'sı 1.0 M NaOH ile 9.0'a ayarlandıktan sonra enzim: substrat oranı 1:50 veya 1:100 olacak şekilde tripsin (5 mg/ml; ultra saf su içinde) ile 37 °C'de 30 dakika hidroliz edildi. Hidroliz 150 mM Na₂CO₃ ile sonlandırıldı.



Tablo 5.2.: Süt serumu proteinlerini elde etmede kullanılan akış şeması 1



Tablo 5.3.: Süt serumu proteinlerini elde etmede kullanılan akış şeması 2

5.2.4. SDS-PAGE Yöntemi ile Örneklerin Protein İçeriğinin Aydınlatılması (12, 30, 31, 51, 80)

Prensip:

Proteinlerin negatif yüklü SDS molekülleri kaplandıktan sonra moleküler ağırlıklarına göre poliakrilamid jel ortamında elektrik alan içinde göç etmesi ve boya maddesi ile bandların görünür hale getirilmesi prensibine dayanır.

Çözeltiler:

%10'luk Amonyum persülfat (APS)

2-Mercaptoethanol

Akrilamid

Asetik asit

Bromophenol Blue

Coomassie Brilliant Blue R 250

Glycerol

Glycine

Hidroklorik asit

Isopropanol

N,N-metilen-bis-akrilamid

Sığır Serum Albümin (BSA)

Sodyum Dodecyl Sülfat (SDS)

Tetrametilendiamid (TEMED)

Tris

Sığır serum albümin (BSA) çözeltisi: Standart çözelti olarak kullanılır. 10 mg BSA 10 ml dH₂O'da çözülür.

Akrilamid-bis akrilamid çözeltisi (%30): 29.2 gr Akrilamid ve 0.8 gr N,N-metilen-bis-akrilamid 100 ml dH₂O'da çözülür.

%10 SDS çözeltisi: 10 gr SDS, 100 ml dH₂O içinde çözülür.

%10 Amonyum persülfat (APS): 0.5 gr APS 5 ml dH₂O içinde çözülür.

Yükleme jeli tamponu (Stacking gel buffer): 0.5M Tris-HCl (pH=6.8): 6 g Tris 60 ml dH₂O içinde çözülüp, 100 ml'e tamamlanır.

Ayırma jeli tamponu (Resolving gel buffer): 1.5M Tris-HCl (pH=8.8): 54,45 gr Tris 150 ml dH₂O içinde çözülüp pH'ı 6 M HCl ile 8.8'e ayarlanır. Çözelti 300 ml'e tamamlanır.

Elektrot tamponu (pH=8.3): 5x stok çözelti: 15 gr Tris, 72 gr glisin, 5 gr SDS 1litre dH₂O içinde çözülür. Kullanılırken 300 ml stok çözelti 1.2litre dH₂O ile dilue edilir.

Örnek tamponu: 12.5 ml yükleme tamponu, 50 ml dH₂O, 2.5 ml %0.4 bromofenol blue çözeltisi, 10 ml gliserol ve 20 ml %10 SDS ile hazırlanır.

%0.05 Coomassie Brilliant Blue R 250 çözeltisi: 25 ml isopropanol, 10 ml asetik asit ve 65 ml dH₂O içinde 0.05 gr boya maddesi çözülerek hazırlanır.

Boya giderme çözeltisi: 10 ml isopropanol, 10 ml asetik asit ve 80 ml dH₂O'dan oluşur.

Yükleme jeli (%4.0): 2.6 ml %30'luk akrilamid çözeltisi, 12.2 ml dH₂O, 5 ml yükleme tamponu, 200 µl %10'luk SDS, 100 µl %10'luk APS ve 20 µl TEMED ile hazırlanır.

Ayırma jeli (%18): 30 ml %30'luk akrilamid çözeltisi, 6.4 ml dH₂O, 12.5 ml ayırma tamponu, 500 µl %10'luk SDS, 500 µl %10'luk APS ve 20 µl TEMED ile hazırlanır.

Örnek: Ultrafiltrasyon, kromatografi, hidroliz ve ön ayırma işlem basamaklarında elde edilen örnekler kullanıldı.

Yöntem:

Süt serumu proteinlerini ayırmak için yükleme ve ayırma jeli olarak iki parçalı jel, maksi elektroforez düzeneğine dökülmüş ve polimerize olması beklenmiştir.

Taraklar yardımı ile yükleme jelinde örnek kuyucukları açılmıştır.

%6'lık PAST örnekleri, 1:1 oranında örnek tamponu ile karıştırılıp, tüplere 20 µl merkaptotanol/ml eklendikten sonra 1 saat oda ısısında bekletilmiştir.

Örnekler kaynayan su banyosunda 4 dakika tutulup, jele 50 µl'lik ölçülerde yüklenmiştir.

Düzeneğe 1.2 litre elektrot tamponu döküldükten sonra elektrotlar bağlanıp, güç kaynağı açılmış ve 200 voltajda 4-5 saatlik yürütme yapılmıştır.

Yükleme ve ayırma jeli elektroforez düzeneğinden ayrılmış, 1 gece Coomassie Brilliant Blue R 250 ile boyanarak protein bantları görünür hale getirilmiştir.

Jel boya giderme çözeltisi ile yıkanarak, bağlanmayan boyanın akması ve protein bantlarının belirginleşmesi sağlanmıştır.

5.2.5. Lowry Yöntemi ile Protein Tayini (83)

Prensip: Proteinlerin peptid bağları, alkali koşullar altında bakır ile reaksiyona girer ve Cu^+ indirgenir. İndirgenen bakır Folin reaktifi ile reaksiyona girer ve aslında aromatik amino asitlerin bakır katalizli oksidasyonu ile fosfomolibdotungstat, heteropolimolibden mavisine indirgenir. Reaksiyon, kısmen tirozin ve triptofan içeriğine bağlı olarak koyu mavi renk oluşumuyla sonlanır.

Örnek: Ultrafiltrasyon, kromatografi ve hidroliz ve ön işlem basamaklarında elde edilen örnekler kullanıldı.

Cihaz, Malzeme, Kimyasal ve Çözeltiler:

2 N NaOH

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Folin reaktifi

Na_2CO_3

Sodyum potasyum tartrat

Spektrofotometre

Vorteks

Çözelti A: %2 (w/v) Na_2CO_3 distile suda

Çözelti B: %1 (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ distile suda

Çözelti C: %2 (w/v) sodyum potasyum tartrat distile suda

Kompleks oluşturma reaktifi: 100:1:1 (v:v:v) oranında A,B,C çözeltileri karışımı kullanmadan hemen önce hazırlandı.

2N NaOH

Folin Reaktifi: 1N

BSA standartları: 4 mg/ml stok

Deneyin Yapılışı:

100 µl örnek/standart/blank'e 100 µl 2 N NaOH eklendi. 100 °C kaynar su banyosunda 10 dakika hidroliz edildi.

Hidrolizat oda sıcaklığına soğutuldu ve 1ml taze hazırlanmış kompleks oluşturma reaktifi eklendi. Çözelti oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

100 µl Folin reaktifi vorteksle karıştırarak eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

550 nm’de absorbans ölçüldü.

Hesap: Sığır serum albümini(BSA) ile hazırlanan standart eğriden yararlanılarak protein konsantrasyonu hesaplandı.

6. BULGULAR

6.1. PAST Proteinlerinin Membran Filtrasyon Yöntemiyle Ayrılması

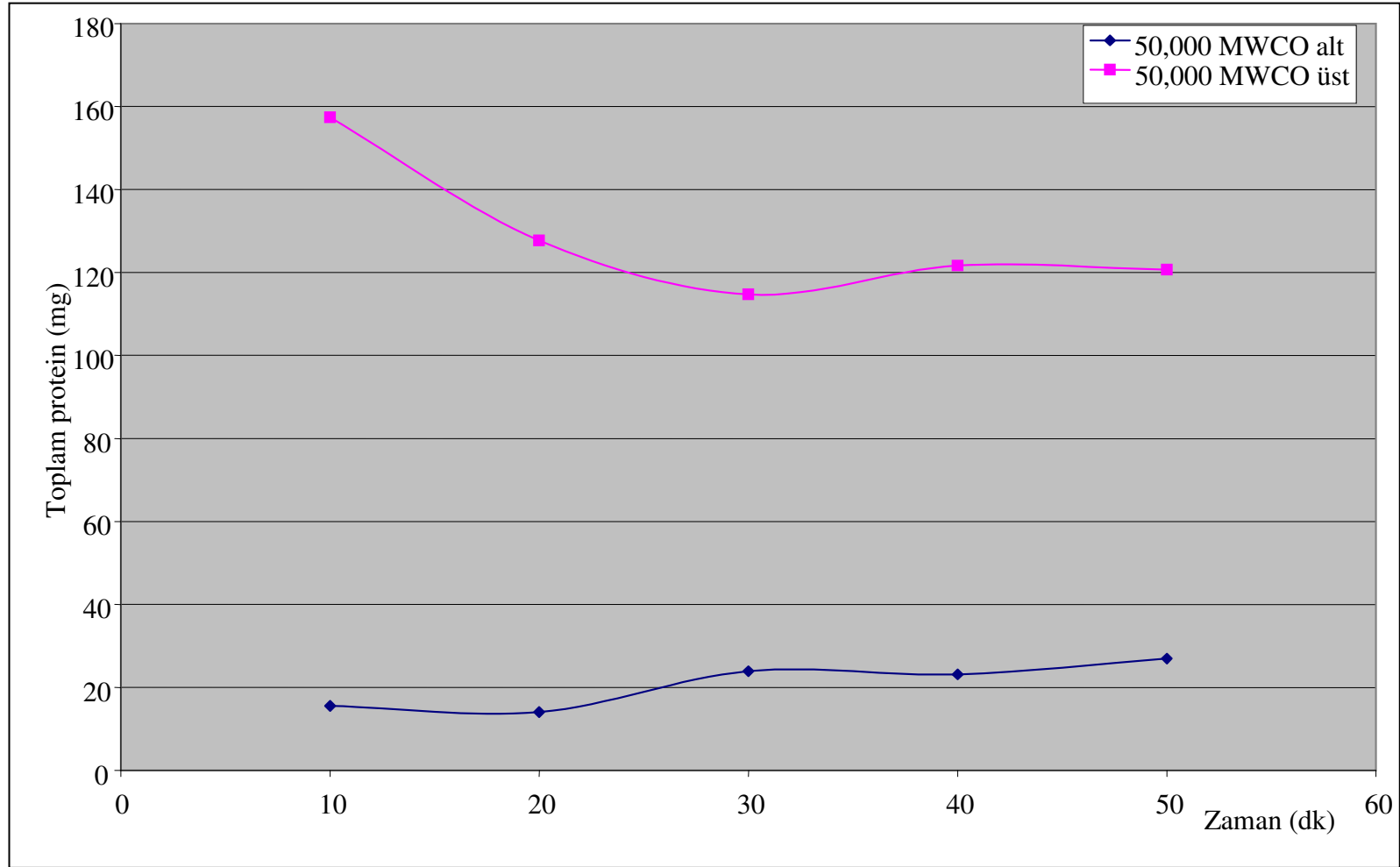
% 6'lık PAST çözeltisine önce ön ayırma teknikleri uygulandı, sonra örnek 50,000 MWCO membran filtreye uygulandığında alt ve üst fraksiyonlar ayrıldı (Şekil 6.1). Her işlem basamağında alınan örneklerin protein miktarları belirlendi (Tablo 6.1). Örneklerin ve elde edilen fraksiyonların kimlik doğrulaması SDS-PAGE yöntemiyle yapıldığında 50 dakika sonunda; üst fraksiyonun Ig'ler, BSA, β -laktoglobulin ve α -laktalbumin içerdiği, alt fraksiyonun ise düşük molekül ağırlıklı peptidleri içerdiği gözlemlendi (Şekil 6.2).

Vivaspin 20 50,000 MWCO membran filtre dışında 30,000 ve 100,000 MWCO membran filtreler ile de denemeler yapıldı ve benzer sonuçlar elde edildi.

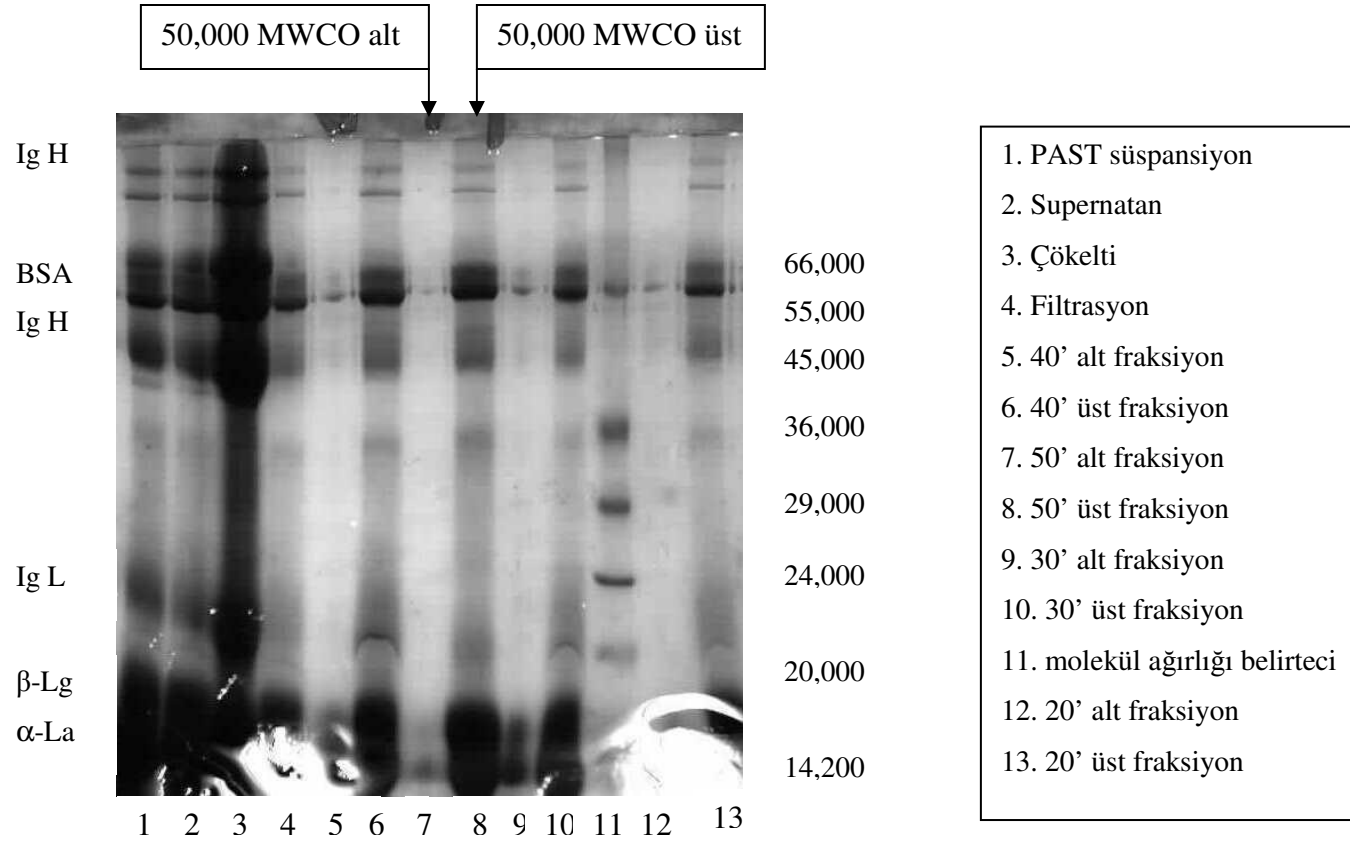
Sonuçlar, 3 deneyi temsil etmektedir.

Tablo 6.1.: Örneklerin ve membran filtrasyon ile elde edilen fraksiyonların içerdiği protein miktarları

Örnek	Protein (mg/ml)	Hacim (ml)	Toplam protein (mg)
PAST süspansiyonu	9.43	51.0	480.93
Supernatan	8.36	49.0	409.64
Çökelti	27.00	2.6	70.20
0.45 μ m filtrasyon	8.95	41.0	366.95
10 dk alt fraksiyon	6.62	2.4	15.89
10 dk üst fraksiyon	8.92	17.6	156.99
20 dk alt fraksiyon	2.94	3.8	11.17
20 dk üst fraksiyon	8.40	14.2	119.28
30 dk alt fraksiyon	3.54	4.8	16.99
30 dk üst fraksiyon	8.55	11.2	95.76
40 dk alt fraksiyon	2.57	6.0	15.42
40 dk üst fraksiyon	11.35	8.0	90.80
50 dk alt fraksiyon	2.52	6.7	16.88
50 dk üst fraksiyon	12.98	5.3	68.79



Şekil 6.1.: 50,000 MWCO membran filtrasyon yöntemiyle elde edilen fraksiyonların içerdiği protein miktarları.



Şekil 6.2.: 50,000 MWCO membran filtrasyon yöntemiyle elde edilen fraksiyonların ve örneklerin SDS-PAGE ile kimlik doğrulamasının yapılması.

6.2. PAST Proteinlerinin Kromatografik Olarak Ayrılması

Sephadex G-50 kolon kromatografisi:

PAST'na ön ayırma teknikleri uygulandıktan sonra örneğin 5 ml'si Sephadex G-50 kolonuna uygulandığında 2 ana fraksiyon elde edildi (Şekil 6.3). Bu fraksiyonlarda protein tayini yapıldı (Tablo 6.2). SDS-PAGE ile bu fraksiyonlardan birincisinin Ig'ler, BSA, β -laktoglobulin ve α -laktalbümin, ikincisinin ise küçük molekül ağırlıklı peptidler içerdiği gözlemlendi (Şekil 6.5).

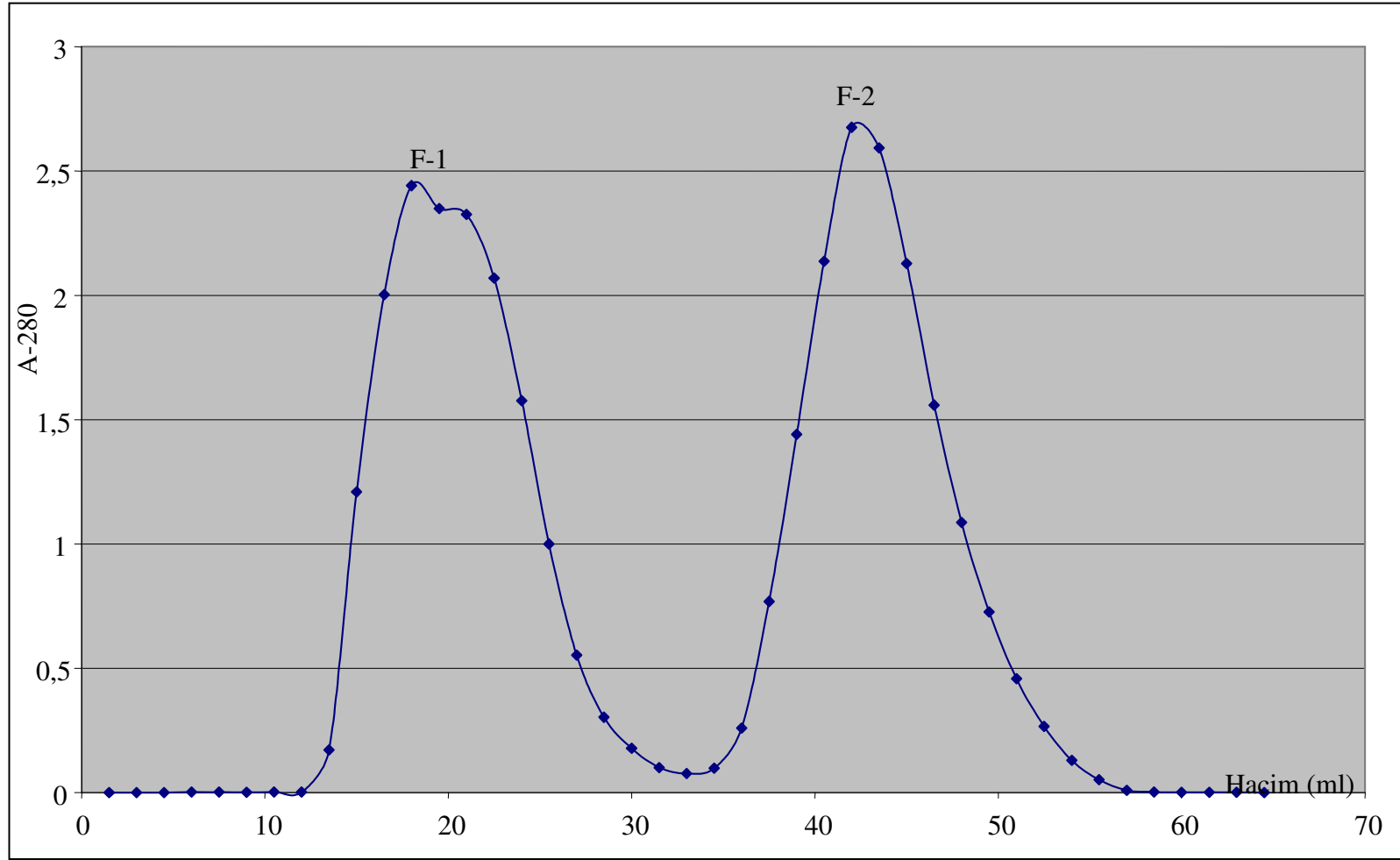
Sephadex G-200 kolon kromatografisi:

PAST'na ön ayırma teknikleri uygulandıktan sonra örneğin 5 ml'si Sephadex G-200 kolonuna uygulandığında 3 ana fraksiyon elde edildi (Şekil 6.4). Bu fraksiyonlarda protein tayini yapıldı (Tablo 6.2). SDS-PAGE ile bu fraksiyonlardan birincisinin Ig'ler ve BSA, ikincisinin β -laktoglobulin ve α -laktalbümin, üçüncüsünün ise küçük molekül ağırlıklı peptidler içerdiği ispatlandı (Şekil 6.6).

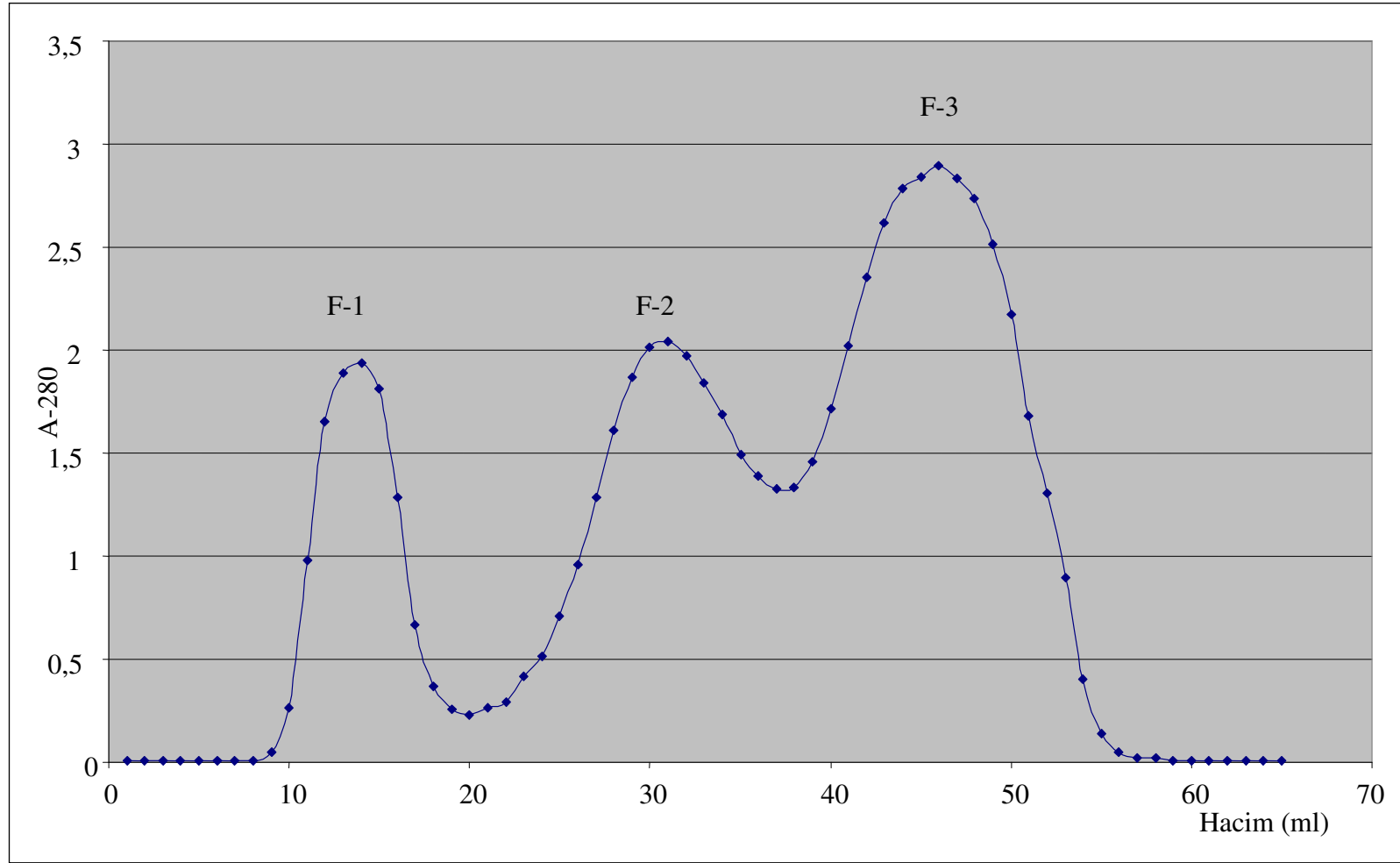
5 deneyi temsil eden sonuçlar verilmiştir.

Tablo 6.2.: Örneklerin ve kromatografi ile elde edilen fraksiyonların içerdiği protein miktarları

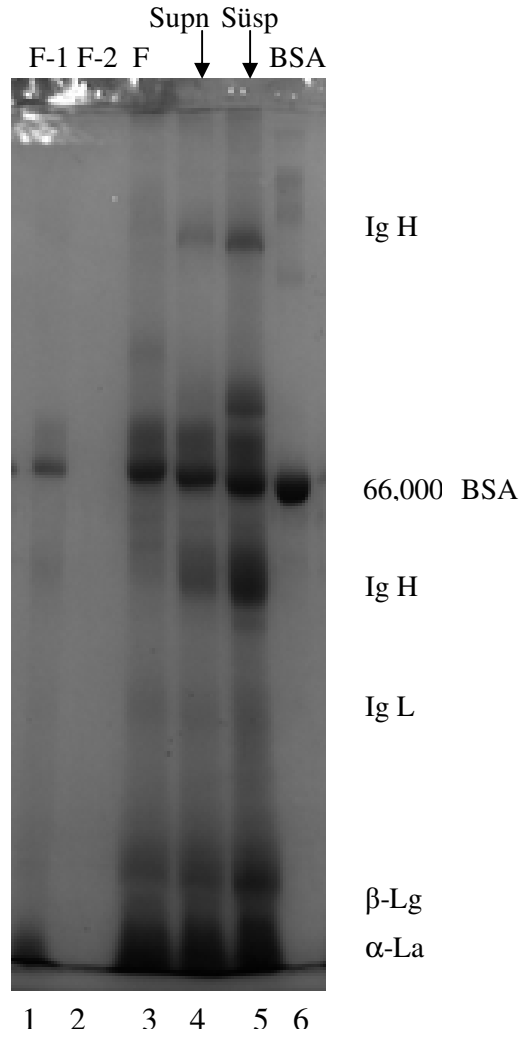
Örnek	Protein (mg/ml)	Hacim (ml)	Toplam protein (mg)
PAST süspansiyonu	8.60	51.0	438.50
Supernatan	7.82	49.0	383.23
Çökelti	16.42	2.7	44.33
0.45 μ m filtrasyon	7.75	33.0	255.84
Sephadex G-200 F1	0.34	6.0	2.05
Sephadex G-200 F2	1.60	9.0	14.42
Sephadex G-200 F3	2.25	9.6	21.57
Sephadex G-50 F1	1.10	13.5	14.42
Sephadex G-50 F2	1.31	15.0	19.59



Şekil 6.3.: Ön işlemlerden geçirilen PAST çözeltisinin Sephadex G-50 kolon kromatografisi ile ayrılması.



Şekil 6.4.: Ön işlemlerden geçirilen PAST çözeltisinin Sephadex G-200 kolon kromatografisi ile ayrılması.



1. G 50 F-1
2. G 50 F-2
3. Filtrasyon (F)
4. Supernatan (Supn)
5. Süspansiyon (Süsp)
6. Serum albümin (BSA)

Şekil 6.5.: Sephadex G-50 kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE ile kimlik doğrulamasının yapılması.

6.3. PAST Proteinlerinin Hidrolizi ile Süt Serumu Proteinlerinin Eldesi:

Pepsin ile Hidroliz:

Filtrasyonun pepsin ile proteolizi (1:100) sonucu elde edilen örneğin 5 ml'si Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulandığında, hidroliz öncesine kıyasla her üç fraksiyonun absorbansının değiştiği F-1 de ve F-2 de azalma, F-3 de ise artış olduğu gözlemlendi (Şekil 6.7). Bu fraksiyonlarda protein tayini yapıldı (Tablo 6.3). SDS-PAGE ile bu fraksiyonlardan birincisinin çok az miktarda Ig'ler ve BSA içerdiği, ikincisinin β -laktoglobulin içerdiği, üçüncüsünün ise küçük molekül ağırlıklı peptidler içerdiği ispatlandı (Şekil 6.8).

Filtrasyon sonrası örneğin Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulanmasından sonra elde edilen F-2 fraksiyonunun pepsin ile proteolizi sonrası, örneğin 2 ml'si Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulandığında, tek bir fraksiyon elde edildi (Şekil 6.9). Bu örnekte protein tayini yapıldı (Tablo 6.3). SDS-PAGE ile bu örneğin β -laktoglobulin içerdiği ispatlandı (Şekil 6.6).

3 deneyin temsili sonuçları verilmiştir.

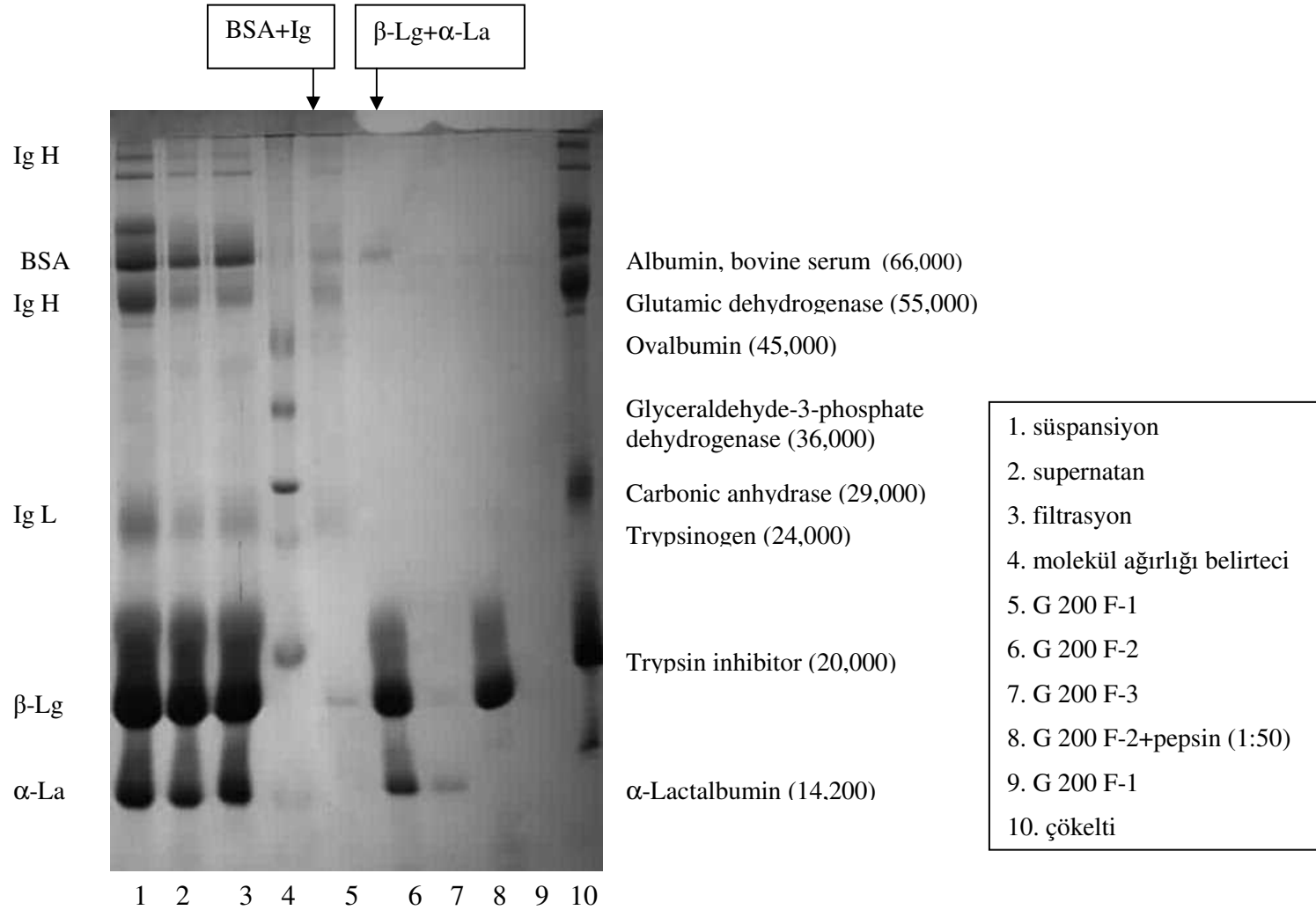
Tripsin ile Hidroliz:

Filtratın tripsin ile proteolizi sonucu elde edilen örneğin 5 ml'si Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulandığında, hidroliz öncesine kıyasla absorbansların ve fraksiyonların değiştiği gözlemlendi. Filtratın tripsin ile (1:50) hidrolizi sonucu iki ana fraksiyon gözlemlendi. Hidroliz öncesinde elde edilen F-1 fraksiyonunda hidroliz sonrası azalma olduğu, F-2 ve F-3 fraksiyonlarının tek bir fraksiyonda toplandığı gözlemlendi (Şekil 6.10). Bu fraksiyonlarda protein tayini yapıldı (Tablo 6.3). SDS-PAGE ile bu fraksiyonlardan birincisinin çok az miktarda BSA içerdiği, ikincisinin ise α -laktalbumin ve küçük molekül ağırlıklı peptidler içerdiği ispatlandı (Şekil 6.8).

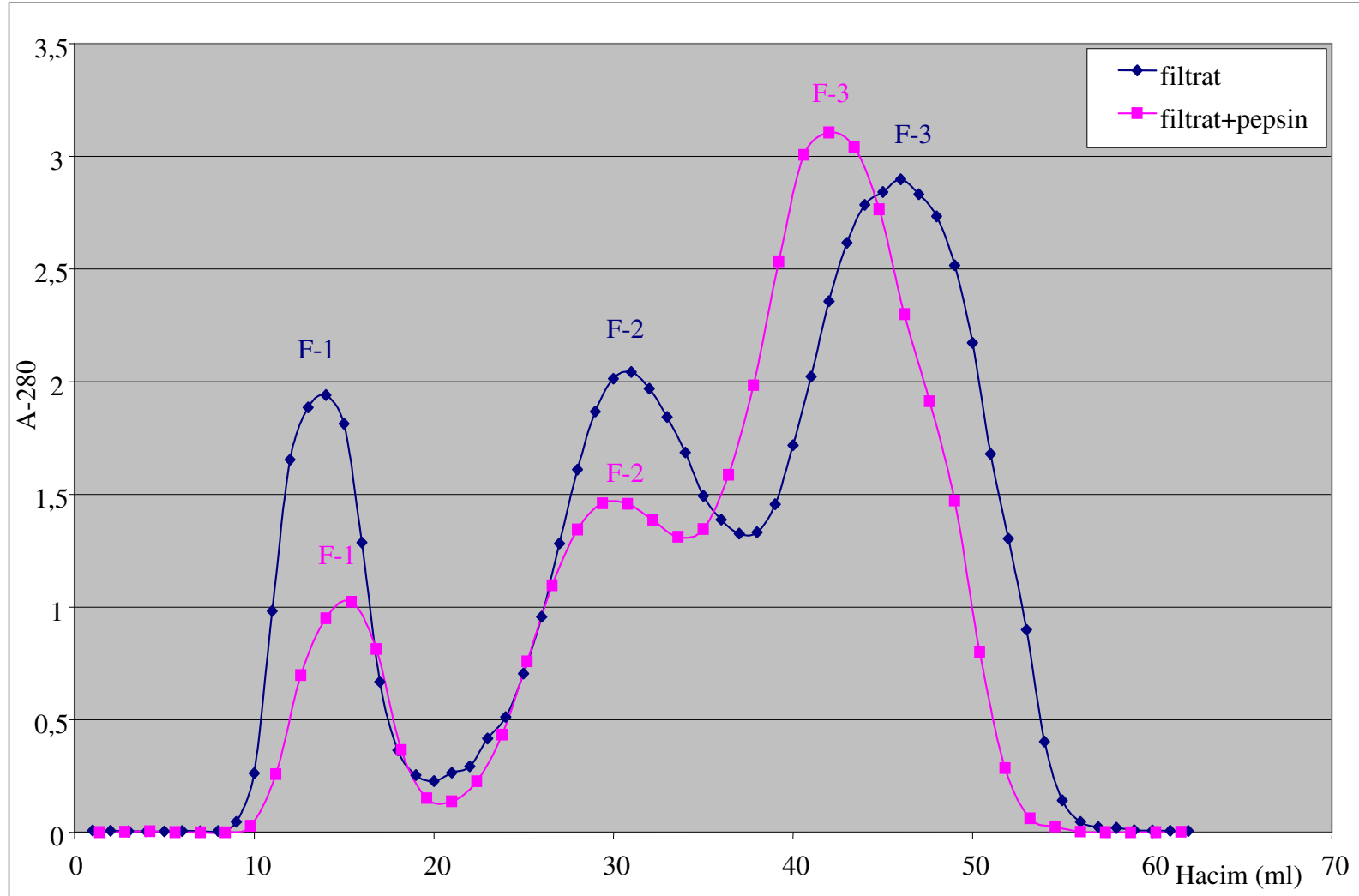
Filtrasyon sonrası örneğin Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulanmasından sonra elde edilen F-2 fraksiyonunun tripsin ile (1:50) proteolizi sonrası, örneğin 2 ml'si Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulandığında, tek bir fraksiyon elde edildi (Şekil 6.11).

Bu örnekte protein tayini yapıldı (Tablo 6.3). SDS-PAGE ile bu örneğin çoğunlukla α -laktalbümin ve küçük molekül ağırlıklı peptidler içerdiği ispatlandı (Şekil 6.12).

Sonuçlar, 3 deneyi temsil etmektedir.



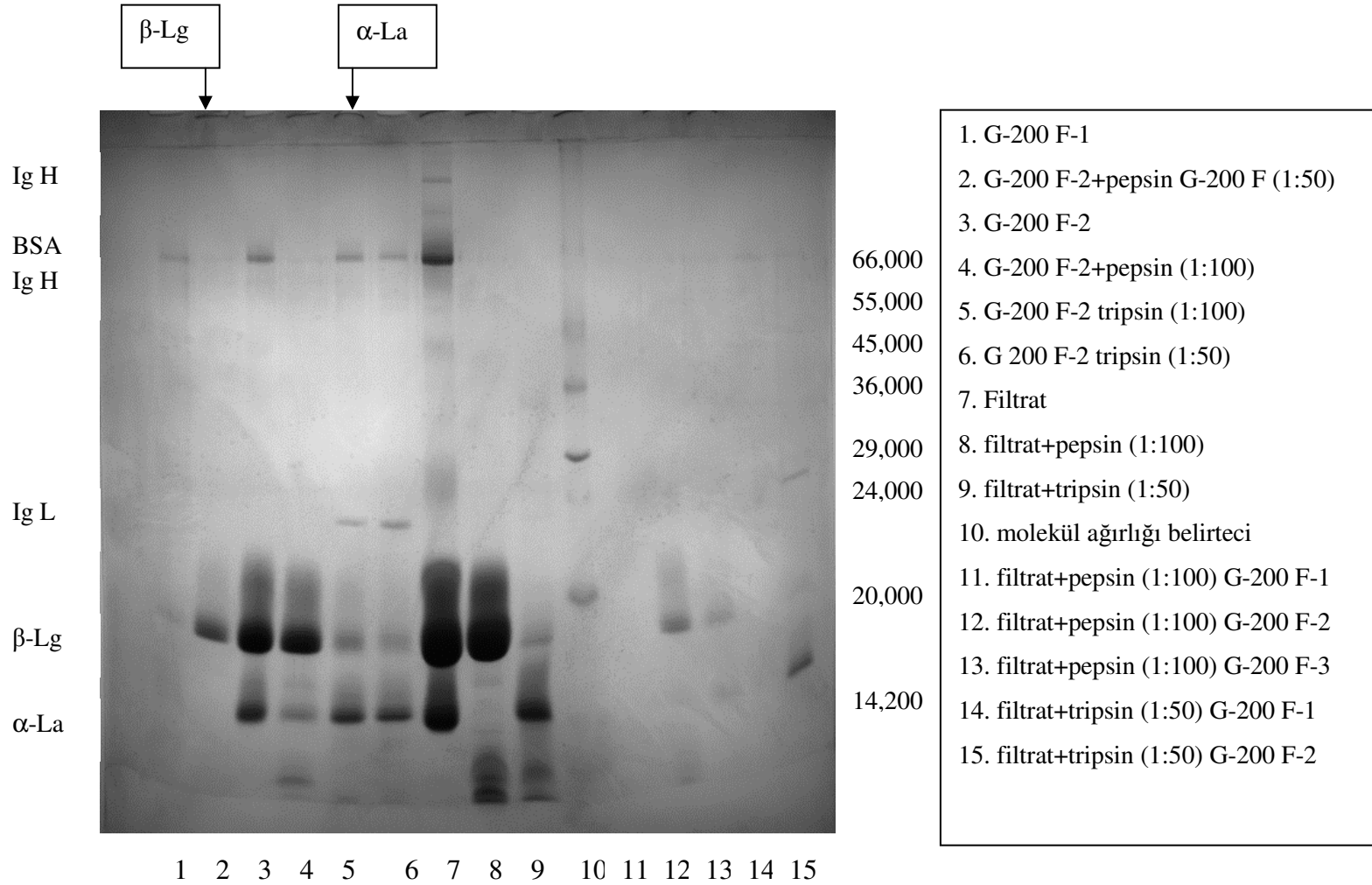
Şekil 6.6.: Ön işlemlerden geçirilen örneklerin, Sephadex G-200 kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların ve pepsin ile hidroliz işlemi sonrası örneğin SDS-PAGE ile kimlik doğrulaması.



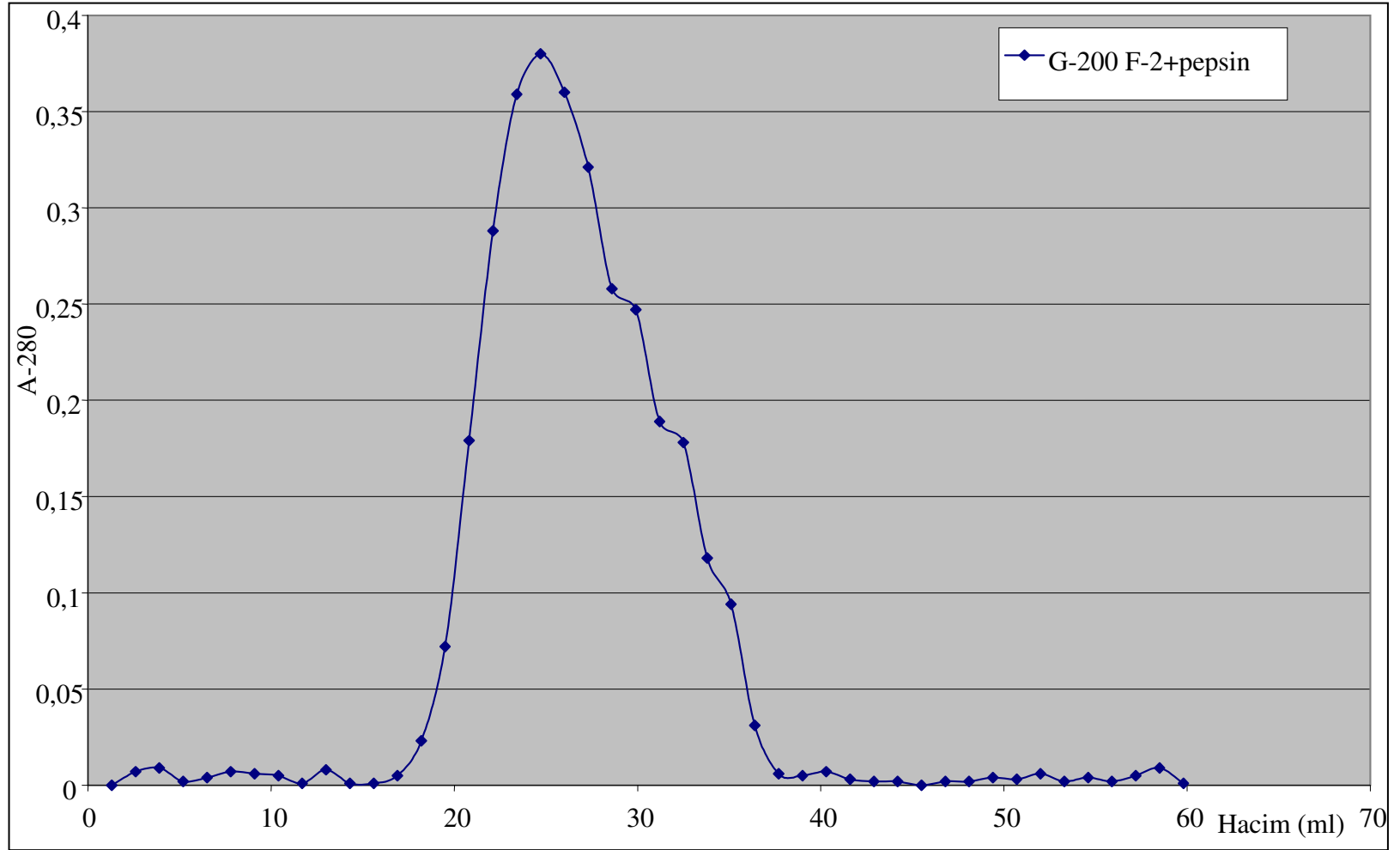
Şekil 6.7.: Pepsin ile proteoliz (1:100) öncesi ve sonrası filtratın Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulanması.

Tablo 6.3.: Hidroliz işlemi ile elde edilen örneklerin içerdiği protein miktarları

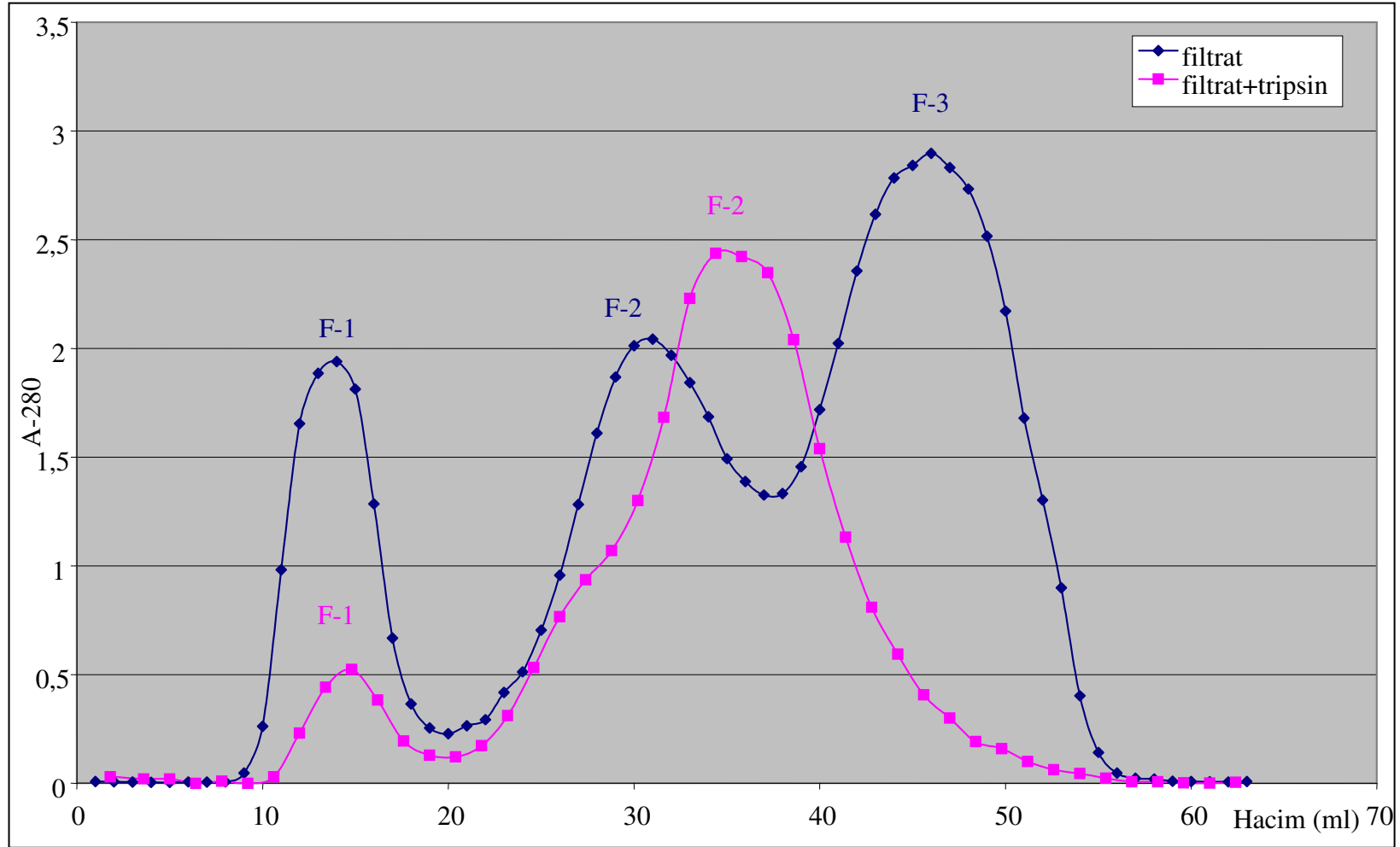
Örnek	Protein (mg/ml)	Hacim (ml)	Toplam protein (mg)
Filtrat	6.98	10.0	69.80
Filtrat+pepsin	6.80	10.0	68.00
Filtrat+tripsin	6.99	10.0	69.90
G-200 F-2	1.57	2.0	3.14
G-200 F-2 pepsin (1:50)	1.42	2.0	2.84
Filtrat+pepsin G-200 F-1	0.13	7.8	1.01
Filtrat+pepsin G-200 F-2	0.43	6.5	2.80
Filtrat+pepsin G-200 F-3	1.82	14.3	26.03
Filtrat+tripsin G-200 F-1	0.13	5.0	0.65
Filtrat+tripsin G-200 F-2	1.68	21.0	35.29



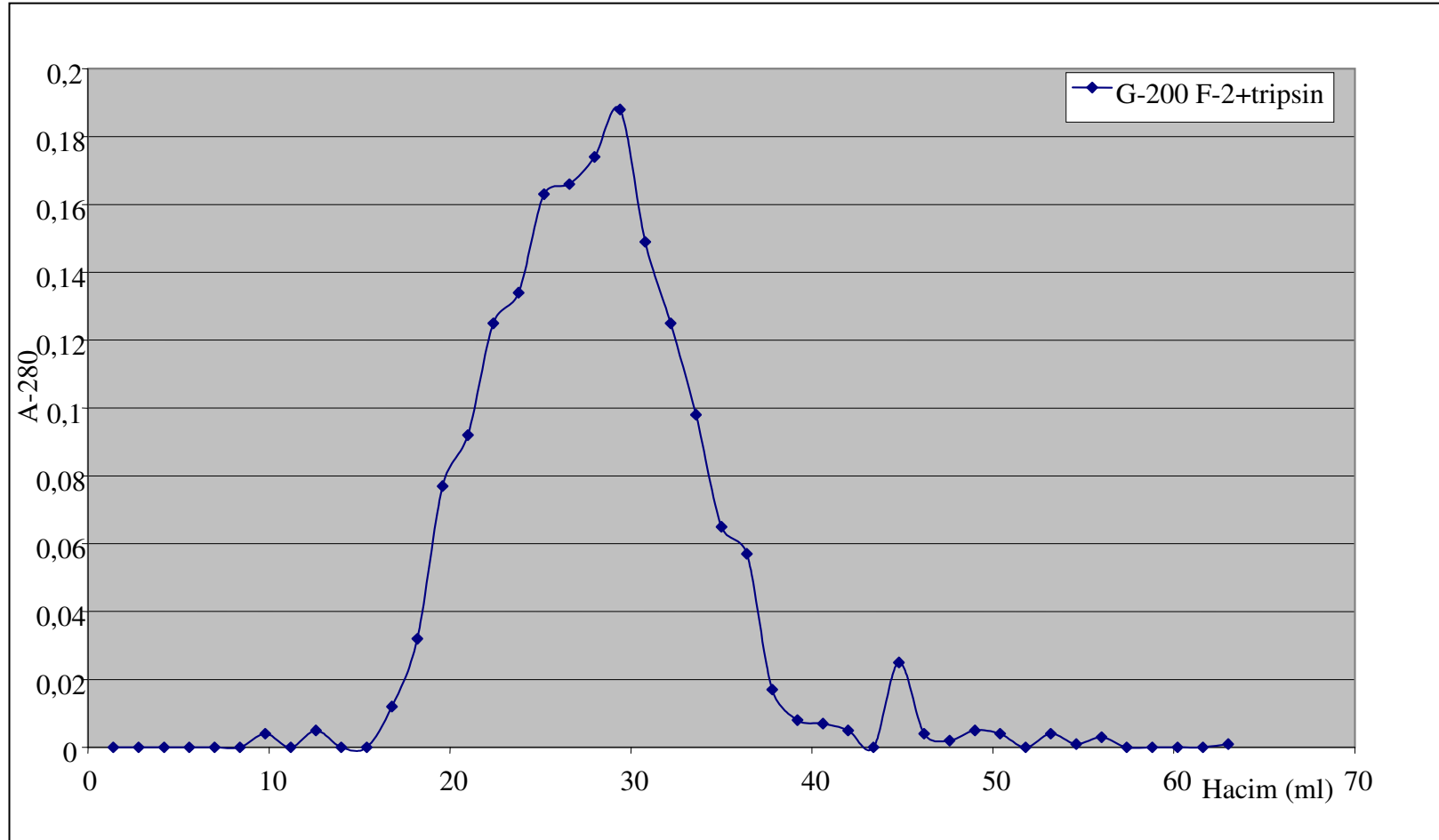
Şekil 6.8.: Filtratın ve Sephadex G-200 kolon kromatografisi ile elde edilen F-2 fraksiyonunun pepsin ve tripsin ile hidroliz işlemi sonucu elde edilen örneklerin SDS-PAGE ile kimlik doğrulamasının yapılması.



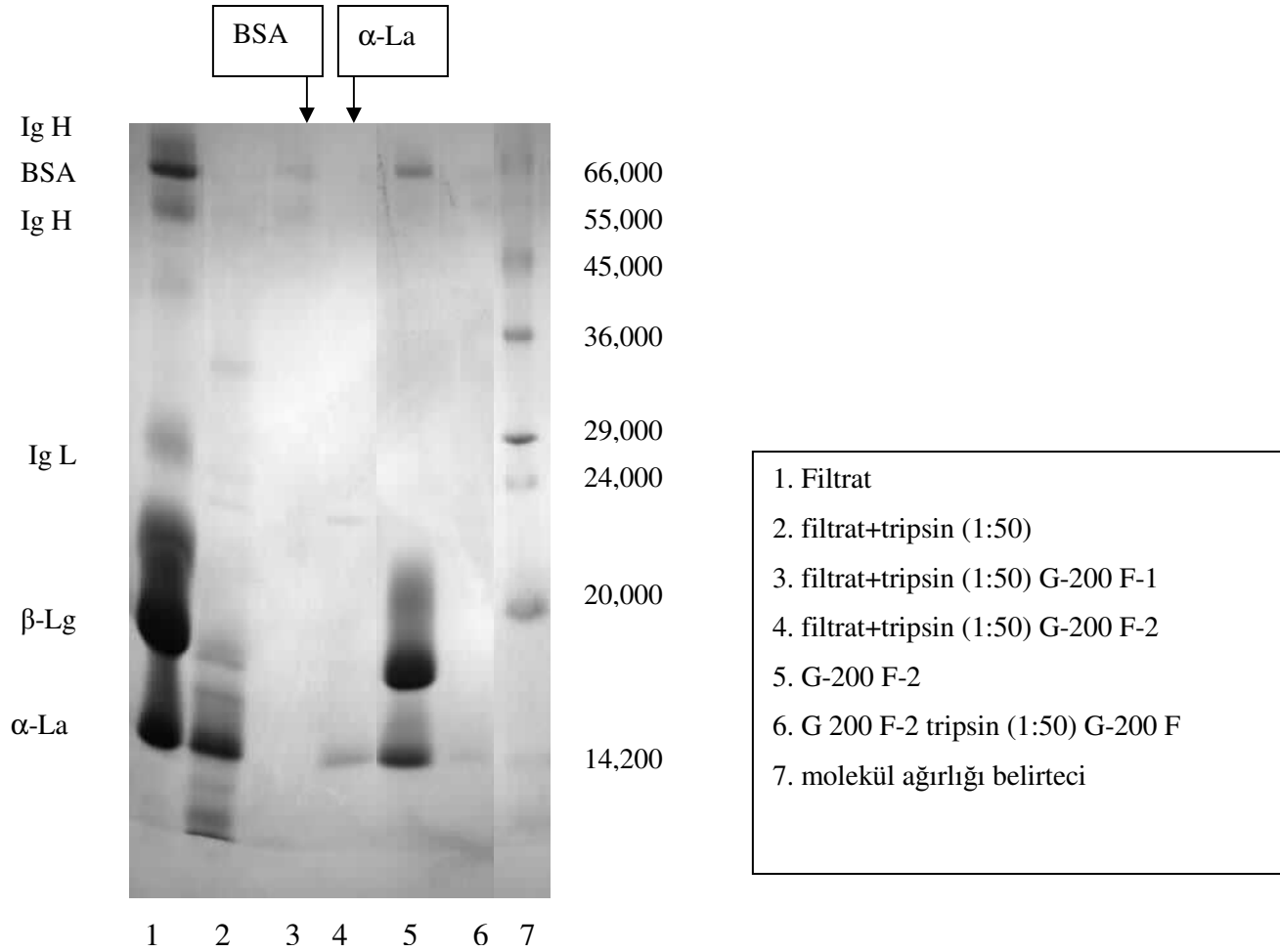
Şekil 6.9.: Sephadex G-200 kolon kromatografisi ile elde edilen F-2 fraksiyonunun pepsin ile proteolizi (1:50) sonucu elde edilen örneğin Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulanması.



Şekil 6.10.: Tripsin ile proteoliz (1:50) öncesi ve sonrası filtratın Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulanması.



Şekil 6.11.: Sephadex G-200 kolon kromatografisi ile elde edilen F-2 fraksiyonunun tripsin ile proteolizi (1:50) sonrası örneğin kromatografiye uygulanması.



Şekil 6.12.: Tripsin ile hidroliz edilen örneklerin SDS-PAGE ile kimlik doğrulamasının yapılması.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Peynir üretimi sırasında süttten ayrılan peynir altı suyu toz haline getirilerek gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Farklı işlenme yöntemleri ile elde edilen peynir altı suyu proteinlerinin endüstriyel kullanım yerleri de farklıdır. Asit, tatlı ve demineralize peynir altı suyu tozu (PAST) yanında, protein içerikleri farklı olan ürünler vardır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda süt serumu proteinlerinin farklı yollardan koruyucu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Süt serumu proteinleriyle ilgili araştırmaların sayısı dikkat çekecek derecede artmış ve antioksidan etkileri ön plana çıkmaya başlamıştır.

Peynir altı suyu tozundaki süt serumu proteinlerini elde etmek amacıyla kromatografi, membran filtrasyon, çöktürme, diyaliz, ultrafiltrasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Kromatografi en sık kullanılan yöntemdir, ancak membran filtrasyon yöntemi de pratik olması açısından peyniraltı suyundaki süt serumu proteinlerini elde etmede tercih edilen bir yöntemdir.

Cheang ve Zydney (16) bir çeşit ultrafiltrasyon yöntemi olan yüzeysel akış filtrasyon yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada farklı MWCO (30,000 ve 100,000) selüloz mebranları kullanarak peynir altı suyundaki β -laktoglobulin ve α -laktalbümini ayrı ayrı elde etmişlerdir. Roger ve ark. (72), 50,000 MWCO ve daha düşük MWCO membran filtreleri kullanarak peynir altı suyundan α -laktalbümince zengin bir ürün elde etmişlerdir.

Membranın akış hızı zamanla azalır ve bu azalma konsantrasyon miktarına ve membran yüzeyindeki akış hızına bağlı olarak değişir. Ultrafiltrasyonda akış hızındaki bu azalma, konsantrasyon polarizasyonuna ve membran kirlenmesine (membran ve oluşan ikincil tabakanın porlarındaki adsorpsiyona, çökeltiye ve tıkanmaya) bağlanmaktadır (14). Bahsedilen membran kirliliğinin oluşması durumu ayırma yönteminin başarısız olmasıyla sonuçlanmaktadır.

Çalışmamızda, peynir altı suyu tozunu süspansiyon haline getirdikten sonra santrifüj, mikrofiltrasyon gibi ön saflaştırma işlemleri uyguladığımız örneği 50,000 MWCO membran filtreye uyguladık. 50 dakikalık santrifüj süresi sonunda alt fraksiyonun çok az miktarda β -laktoglobulin ve α -laktalbümin içerdiği; üst fraksiyonda ise BSA ve çoğunlukla

β -laktoglobulin ve α -laktalbümin içerdiği gözlemlendi. Vivaspin 20 30,000 ve 100,000 MWCO membran filtreler ile yaptığımız çalışmalarda da benzer sonuçlar gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda; santrifüjün kullanıldığı ultrafiltrasyon yöntemi ile membranın tıkanması nedeniyle etkili bir ayırma sağlanamamıştır. Ultrafiltrasyon yöntemiyle süt serumu proteinlerini elde etmek amacıyla, santrifüj yerine basıncın kullanıldığı membran filtreler kullanılabilir.

Peynir altı suyundaki süt serumu proteinlerini ayırmada en sık kullanılan bir diğer yöntem kromatografidir. Ye ve ark. (85), kuvvetli katyon değiştirici olan sülfopropil ve kuvvetli anyon değiştirici olan kuartir aminoetil iyon değişim kromatografileri ile peynir altı suyundan laktoperoksidaz, laktoferrin, α -laktalbümin, β -laktoglobulin B ve β -laktoglobulin A'yı ayrı ayrı elde etmişlerdir.

Gerberding ve Byers (27) yaptığı çalışmada anyon değiştirici reçine kullanarak tatlı peynir altı suyundaki α -laktalbümin, β -laktoglobulin, serum albümin, immünoglobülin G ve laktozu elde etmişlerdir.

β -laktoglobulin, gıda işlevselliği açısından etkileyici özellikleri ile değerli, etkili bir proteindir ve tek katkı maddesi olarak gıda endüstrisinin ihtiyacını karşılamaktadır. β -laktoglobulin diğer özellikleri yanında anti-hipertansif, anti-kanser, hipokolesterolemik, opioiderjik ve antimikrobiyal etkiler de dahil olmak üzere artan sayıda birçok biyolojik aktivite göstermektedir. Böylece bu majör sığır peynir altı suyu proteini; bu proteini içeren içecekler ve yeni besinler geliştirmek için çok sayıda fırsatı endüstriye sunarak tam işlevsellik göstermektedir (15).

Sığır α -laktalbümini, insan α -laktalbümini ile yüksek derecede aminoasit benzerliği göstermesi özelliği ile bebeklerin beslenmesine katkı sağlama açısından ideal olarak uygundur. Sığır α -laktalbümini ve ondan elde edilen peptidlerin biyolojik fonksiyonları; β -laktoglobulin için söylenenler dışında stres azaltıcı ve uyku iyileştirici etkileri de içermektedir. Bununla birlikte, süttten veya peynir altı suyundan bu proteinlerin endüstriyel olarak saflaştırılma veya zenginleştirilme şekli, birçok biyolojik aktivitenin elde edilmesinde kritik bir öneme sahiptir. İşlem boyunca uygulanan sıcaklıkla muamele, proteinin yapısını farklılaştırabilir ve böylece az sindirilebilirliğe ve proteinin biyolojik aktivitesinin değişmesine neden olabilir (15).

Az miktarda β -laktoglobulin içeren α -laktalbümince zengin “whey” protein fraksiyonları, bebekler için üretim yapan imalatçılar için yüksek bir ilgi alanı olmuştur. Proteomik bir yaklaşımla “immunoblotting” ile birlikte gözlenen sonuca göre, β -laktoglobulinin de dahil olduğu tüm majör süt proteinleri alerjendirler ancak α -laktalbümin için herhangi bir kanıt bulunamamıştır (54).

Çalışmamızda, peynir altı suyu tozu süspansiyon haline getirildikten sonra süt serumundaki çözünmeyen molekülleri ve lipidleri uzaklaştırmak amacıyla santrifüj edildi ve supernatan filtre edildi. Süspansiyon, supernatan ve filtrasyonun az miktarda immünoglobulinleri, serum albümin, α -laktalbümin, β -laktoglobulin ve küçük molekül ağırlıklı peptidleri içerdiği gösterildi. Santrifüj sonrası elde edilen çökeltinin ise ağırlıklı olarak immünoglobulinleri, serum albümini ve az miktarda β -laktoglobulin içerdiği gözlemlendi.

Ön saflaştırma teknikleri uygulanan filtrat Sephadex G-50 kolon kromatografisine uygulandığında 2 fraksiyon elde edildi. Bu fraksiyonlardan birincisinin çok az miktarda immünoglobulinler, serum albümin, α -laktalbümin ve β -laktoglobulin; ikincisinin ise küçük molekül ağırlıklı peptidleri içerdiği gözlemlendi. Daha ileri bir ayırım sağlamak amacıyla ön işlemler sonrası elde edilen filtrat Sephadex G-200 jel filtrasyon kolon kromatografisine uygulandığında ise 3 ana fraksiyon elde edildi. Birinci fraksiyonun serum albümin ve immünoglobulinleri içerdiği, ikinci fraksiyonun α -laktalbümin ve β -laktoglobulin içerdiği, üçüncü fraksiyonun küçük molekül ağırlıklı peptidler içerdiği ispatlandı.

Sephadex G-200 kolon kromatografisi ile elde edilen α -laktalbümin ve β -laktoglobulin içeren F-2 fraksiyonu pepsin ile proteoliz edildiğinde, proteoliz sonrasında α -laktalbüminin hidrolize uğradığı, β -laktoglobulinin ise hidrolize uğramadığı gözlemlendi. Hidroliz sonrası örnek Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulandığında, tek bir fraksiyon elde edildi. Bu fraksiyonun β -laktoglobulin olduğu ispatlandı. Bu yöntemlerle süt serumu proteinlerinden, β -laktoglobulin saflaştırılmış oldu. Yaptığımız çalışmalar sonucu, β -laktoglobulinin pepsine dayanıklı olduğunu söylüyoruz.

Kineka ve Kitabatake (39) yaptığı çalışmada, pepsin ile muamele ve membran filtrasyon işlemlerini kombine ederek peynir altı suyundan β -laktoglobulini saflaştırmışlardır.

Sephadex G-200 kolon kromatografisi ile elde edilen β -laktoglobulin ve α -laktalbümin içeren F-2 fraksiyonu tripsin ile hidroliz edildiğinde, β -laktoglobulinin hidrolize uğradığı, α -laktalbüminin ise kısmen hidrolize uğradığı gözlemlendi. Hidroliz sonrası örnek Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulandığında, tek bir fraksiyon elde edildi. Böylece süt serumu proteini karışımından, kısmen β -laktoglobulinin içeren α -laktalbüminin proteini elde edilmiş oldu.

Ön ayırma teknikleri uygulandıktan sonra elde edilen filtrat pepsin ile hidroliz edildiğinde örneğin kısmen serum albümin, β -laktoglobulin ve küçük molekül ağırlıklı peptidleri içerdiği gözlemlendi. Örnek Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulandığında üç ana fraksiyon elde edildi. Bu elde edilen fraksiyonlar hidroliz öncesiyle kıyaslandığında, hidroliz sonrası F-1 ve F-2 fraksiyonunun absorbansında azalma olduğu, F-3 fraksiyonunda ise artış olduğu gözlemlendi. F-1 fraksiyonunun çok az miktarda serum albümin içerdiği, F-2 fraksiyonunun β -laktoglobulin içerdiği, F-3 fraksiyonunun ise küçük molekül ağırlıklı peptidleri içerdiği ispatlandı.

Ön ayırma teknikleri uygulandıktan sonra elde edilen filtrat tripsin ile hidroliz edildiğinde örneğin kısmen serum albümin, α -laktalbümin ve küçük molekül ağırlıklı peptidler içerdiği gözlemlendi. Örnek Sephadex G-200 kolon kromatografisine uygulandığında 2 ana fraksiyon elde edildi. Bu fraksiyonlardan birincisinin çok az miktarda serum albümin içerdiği, ikincisinin ise çoğunlukla α -laktalbümin ve küçük molekül ağırlıklı peptidler içerdiği gözlemlendi.

Sonuç olarak çalışmamızda; Süttaş Bursa ve Havalisi Pastörize Süt ve Süt Mamülleri Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş.'den temin edilen peynir altı suyu tozu (PAST) süspansiyon haline getirildikten sonra santrifüj ve filtrasyon işlemleri sonrası Sephadex G-200 jel filtrasyon kolon kromatografisine uygulandığında elde edilen F-2 fraksiyonu pepsin ile hidroliz edildiğinde β -laktoglobulin; tripsin ile hidroliz edildiğinde ise α -laktalbümin elde edildi. Filtratın Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisine uygulanmasıyla elde edilen F-1 fraksiyonu ile de BSA elde edildi. Elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak β -laktoglobulinin pepsine dayanıklı olduğunu söylemekteyiz. Çalışmamızda elde ettiğimiz fraksiyonların biyolojik ve antioksidan aktiviteler açısından incelenmesi ile biyoaktif

moleküllerin elde edilebileceğini ve bu fraksiyonlardan daha ileri ayırma yöntemleri ile Ig'ler ve laktoferrin gibi minör proteinlerin de elde edilmesinin mümkün olacağını düşünmekteyiz.

8. EKLER

8.1. EK-1

Peynir Altı Suyu Tozu Ürün Analiz Raporu

**ÜRÜN ANALİZ RAPORU**

TARİH :11.02.2006

Bakırcı

Ürün Adı :25 kg Peyniraltı Suyu Tozu

Parti No : 011-006106

Üretim Tarihi :11.01.06

Son Kullanma Tarihi : Raf ömrü 1 yıl.

ÜRÜN SPESİFİKASYONU	ANALİZ SONUÇLARI
Ürünün adı	Peyniraltı Suyu Tozu
İçerik Bilgileri	Tatlı peynir altı suyu
Üretim İzin Tarih ve No	07.06.2000 16-00017-00017-3
Ambalaj	25 kg.'lık içte PE, dışta Kraft torba
Depolama şartları raf ömrü	Kuru ve serin yerde saklanmalıdır.1 yıl.
Firma adı, adresi, ürünün üretildiği yer	Süttaş AŞ. 16700 Karacabey/BURSA
	Süttaş Karacabey tesislerinde üretilmiştir.
1- Fiziksel ve Kimyasal	
% Nem	1,9
% Yağ	1,47
% Protein	
% Laktöz	
pH	6,68
Asitlik (% L.A. Cinsinden)	0,128
% Çözünürlük	99,8
Kirlilik	A
Aflatoksin M1(µg / ppb)	0,004
2. Mikrobiyolojik Özellikler	
Toplam Canlı Sayısı (adet/g)	29.500
Küf-Maya (adet/g)	0
Koliform (adet/g)	0
E.Coli	0
Salmonella(adet/25g)	0
3. Duyusal Özellikler	
Tat ve Koku	Kendine özgü tat ve kokuda.
Renk ve Görünüm	İnce kristal akıcı formda, beyaz renkte.

25100.F.079

Yayın No : 02

Kalite İzleme Müdürü

9. KAYNAKLAR

1. Amundson C.H., Watanawanichakorn S. & Hill C.G.: Production of enriched protein fractions of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin from cheese whey. J. Food Process Pres., 6: 55-71, 1982.
2. Ars D.: Peynir altı suyundaki süt proteinlerinin ayrıştırılması ve antioksidan etkilerinin incelenmesi. M. . Sağlık Bilimleri Enstit s , Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2004 (Danışman: Prof.Dr. A.S. Yalçın).
3. Baker R.J., Fane A.G., Fell C.J.D. and Yoo B.H.: Factors affecting flux in crossflow filtration. Desalination., 53: 81-93, 1985.
4. Belter P.A., Cussler E.L. and Hu S.W.: Bioseparations Downstream Procession for Biotechnology. John Wiley and Sons, New York, 1988.
5. Berner L.A.: Defining the role of milk fat in balanced diets. Adv. Food Nutr. Res., 37: 131-257, 1993a.
6. Bishop M.L., Duben-Engelkrik J.L., Fody E.P.: Clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations. Ed: Bishop M.L., Duben-Engelkrik J.L., Fody E.P. Vol. 4, s. 94, Lippincott Williams and Wilkins, Walters Kluwer Company, Philadelphia, 2000.
7. Bjork L.: Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychotropic bacteria in milk. J. Dairy Res., 45: 109-118, 1978.
8. Blatt W.F., Dravid A., Michaels A.S. and Nelsen L.: Membrane Science and Technology Ed: Flinn J.E., s. 47-97, Plenum Press, New York, 1970.
9. Boyer R.F.: Modern Experimental Biochemistry. Vol.2, s. 75-80, The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., California, 1993.
10. Brody E.P.: Biological activities of bovine glycomacropeptide. Br J Nutr., 84: 39-46, 2000.
11. Brownlow S., Cabral J.H.M., Cooper,R., Flower,D.R., Yewdall S.J., Polikarpov I., North A.C.T. and Sawyer L.: Structure., 5: 481–495, 1997.
12. Burr R.: Protein purification from milk. Ed: Roe S., Protein Purification Applications. Vol. 2, s. 87-115, Oxford University Press, New York, 2001.

13. Campbell, M.K: Biochemistry. s. 199, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1991.
14. Carić M.Đ., Milanović S.D., Krstić D.M., Tekić M.N.: Fouling of inorganic membranes by adsorption of whey proteins. J. Membr. Sci., 165: 83-88, 2000.
15. Chatterton D.E.W., Smithers G., Roupas P., Brodkorb A.: Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin-Technological implications for processing. Int. Dairy J., 16: 1229-1240, 2006.
16. Cheang B., Zydney A.L.: A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. J. Membr. Sci., 231: 159-167, 2004.
17. de Fillipi R.P. and Goldsmith R.L.: Membrane Science and Technology. Ed: Flinn J.E., s. 33-46, Plenum Press, New York, 1970.
18. Dennison C.: A Guide To Protein Isolation. Kluwer Academic Publishers, New York, 2002.
19. Doultani S., Turhan K.N. and Etzel M.R.: Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography. Proc. Biochem., 39: 1737-1743. (2004).
20. Enginün M.: İyon-Değişim Kromatografisi ve Kromatofokuslama. Ed: Telefoncu A., Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Böl. 7, s. 109–125, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, İzmir, 1996.
21. Etzel M.R.: The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health, manufacture and use of dairy protein fractions. J. Nutr., 134: 996-1002, 2004.
22. Fane A.G. and Fell C.J.D.: A review of fouling and fouling control in ultrafiltration. Desalination, 62: 117-125, 1987.
23. Farnaud S., Evans R.W: Lactoferrin- a multifunctional protein with antimicrobial properties. Mol. Immunol., 40: 395-405, 2003.
24. Fischer L.: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Ed: Work T.S. and Burdon R.H. Vol. 2, s. 137-148, Elsevier/ North Holland Biomedical Pres, New York, 1980.
25. Ford T.C., Rickwood D.: An Introduction to Centrifugation. Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford, 1991.

26. Fox PF, Flynn A.: "Biological properties of milk proteins", in Advanced Dairy Chemistry. Ed: Fox PF., Proteins. Vol. 1, s. 255-284, Elsevier, London, 1992.
27. Gerberding S.J., Byers C.H.: Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. J. Chromatogr. A, 808: 141-151, 1998.
28. Gurgel P.V., Carbonell R.G. and Swaisgood H.E.: Fractionation of whey proteins with a hexapeptide ligand affinity resin. Bioseparation, 9: 385-392, 2000.
29. Gutman R.G.: Membrane Filtration. Adam Hilger, Bristol, 1987.
30. Hames B.D.: One-dimensional polyacrilamid gel electrophoresis. Ed: Hames B.D. and Rickwood D., Gel Electrophoresis of Proteins. Vol. 2, s. 1-60, IRL Press, 1996.
31. Harlow E., Lane D.: Antibodies, A Laboratory Manual. Appendix-1 Electrophoresis, s. 635-657, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
32. Harris E.L.V.: Protein Purification Methods- A Practical Approach. Ed: Harris E.L.V. and Angal S. s. 125-174, IRL Pres Oxford, New York, 1989.
33. Harshanjit G., Cross M.L.: Anticancer properties of bovine milk. Br. J. Nutr., 84: 161-166, 2000.
34. Jensen, R. G.: Handbook of Milk Composition. Academic Press, San Diego, CA, 1995.
35. Jensen, R. G.: The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. J. Dairy Sci., 85: 295–350, 2002.
36. Johnstone A., Thorpe R.: Immunochemistry in Practice. s. 9-16, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982.
37. Kaplan A. L. And Pesce A. J.: Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation. Vol. 3, s. 106-127, Elsevier Science Health Science div, St. Louis, MO: Mosby, 1996.
38. Kırkali G.: Jel Filtrasyon. Ed: Telefoncu A., Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Böl. 8, s. 126–137, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, İzmir, 1996.
39. Kinekawa Y., Kitabatake N.: Purification of β -lactoglobulin from whey protein concentrate by pepsin treatment. J. Dairy Sci., 79: 350-356, 1996.
40. Korhonen H, Pihlanto-Leppala A, Rantamaki P, Tupasela T.: Impact of processing on bioactive proteins and peptides. Trends Food Sci. Technol., 9: 307-319, 1998.
41. Kraulis P. J.: MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. J. Appl. Crystallogr., 24: 946-950, 1991.

42. Kussendrager K.D., van Hooijdonk A.C.: Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *Br. J. Nutr.*, 84: 19-25, 2000.
43. Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.C.: *Principles of Biochemistry*. Vol. 2, s.138-139, Worth Publishers, New York, 1993.
44. Lightfoot E.N. and Cockrem M.C.M.: What are dilute-solutions. *Sep. Sci. Technol.*, 22: 165-189, 1987.
45. Lindmark-Mannson H., Akesson B.: Antioxidative factors in milk. *Br. J. Nutr.*, 84: 103-110, 2000.
46. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky L., Darnell J.: *Molecular Cell Biology*. Vol. 5, W.H. Freeman and Company, New York, 2003.
47. Lonsdale H.K.: The growth of membrane technology. *J. Membr. Sci.*, 10: 81-181, 1982.
48. Marshall K.: Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med., Review*, Vol. 9, No. 2, 2004.
49. Mather I.A.: A review and proposed nomenclature for the major proteins of the milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.*, 83(2): 203–247, 2000.
50. McGregor W.C.: *Membrane Separations in Biotechnology*. Ed: McGregor W.C. Vol. 1, s. 1-87, New York and Basel, Marcel Dekker Inc., 1986.
51. Merin U., Bernstein S., Bloch-Damti A., Yagil R., Van Creveld C., Lindner P., Gollop N.: A comparative study of milk serum proteins in camel (*Camelus dromedarius*) and bovine colostrum. *Livestock Prod. Sci.*, 67: 297-301, 2001.
52. Michalski M.C., Januel C.: Does homogenization affect the human health properties of cow's milk?. *Trends Food Sci. Technol.*, 17: 423-437, 2006.
53. Mok K.H., Petersson J., Orrenius S., Svanborg C.: HAMLET, protein folding, and tumor cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354: 1-7, 2007.
54. Natale M., Bisson C., Monti G., Peltran A., Perono G. L., Valentini S., Claudio F., Enrico B., Alessandra C., Amadeo C.: Cow's milk allergens identification by two dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Mol. Nutr. Food Res.*, 48 (5): 363-369, 2004.
55. Nitta K. and Sugai S.: The evolution of lysozyme and alpha-lactalbumin. *Eur. J. Biochem.*, 182: 111-118, 1989.

56. Noppe W., Haezebrouck P., Hanssens I. and De Cuyper M.: A simplified purification procedure of alpha-lactalbumin from milk using Ca^{2+} -dependent adsorption in hydrophobic expanded bed chromatography. *Bioseparation*, 8: 153-158, 1998.
57. Ofsthun N.J. and Colton C.K.: Visual evidence of concentration polarization in cross-flow membrane plasmapheresis. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 33: 510-517, 1987.
58. Özer N., Ögüş H.: Elektroforez ve İzoelektrik Odaklama. Ed: Telefoncu A., Salnikov J., Zihnioğlu F., Kılınç A., *Biyokimyada Temel ve Modern Teknikler*. Böl. 14, s. 251-267, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kurs Kitabı*, İzmir, 2000.
59. Parodi, P. W.: Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J. Nutr.*, 127: 1055-1060, 1997.
60. Pazarlıoğlu N.: Kromatografik Teknikler. Ed: Telefoncu A., Salnikov J., Zihnioğlu F., Kılınç A., *Biyokimyada Temel ve Modern Teknikler*. Böl. 5, s. 128-140, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kurs Kitabı*, İzmir, 2000.
61. Pazarlıoğlu N.: Adsorpsiyon Kromatografisi. Ed: Telefoncu A., Salnikov J., Zihnioğlu F., Kılınç A., *Biyokimyada Temel ve Modern Teknikler*. Böl. 6, s.141-169, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kurs Kitabı*, İzmir, 2000.
62. Pearce R.J.: Thermal separation of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin in bovine Cheddar cheese whey. *Aust. J. Dairy Technol.*, 38: 144-149, 1983.
63. Pedersen L., Mollerup J., Hansen E., Jungbauer A.: Whey proteins as a model system for chromatographic separation of proteins. *J. Chromatogr. B*, 790: 161–173, 2003.
64. Permyakov E.A., Berliner L.J.: α -lactalbumin: structure and function. *Febs Letters*, 473: 269-274, 2000.
65. Pharmacia Fine Chemicals AB Sephadex Ion Exchangers: A Guide to Ion Exchange Chromatography. s. 5: 46 Appelbergs Boktryckeri AB, Sweden, 1970.
66. Pharmacia Fine Chemicals AB Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods. s. 4-8, Rahms i Lund, Sweden, 1980.
67. Pierce A., Colavizza D., Benaissa M., Maes P., Tartar A., Montreuil J., Spik G.: Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.*, 196: 177–184, 1991.

68. Pihlanto A, Korhonen H.: Bioactive peptides and proteins. Ed: Taylor S.L. Adv. Food Nutr. Res., 47: 175-276, Elsevier, San Diego, 2003.
69. Porter M.C.: Membrane filtration, in Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers. Ed: Schweitzer P.A. Vol. 3, s. 3-103, McGraw Hill, New York, 1979.
70. Pusch W. and Walch A.: Synthetic membranes-preparation, structure and application. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 21: 660-685, 1982.
71. Rickwood D.: Centrifugation. Ed: Rickwood D., Practical Approaches in Biochemistry. Vol. 2, IRL Pres, Oxford/ Washington DC., 1984.
72. Roger L., Maubois J.L., Brule B. And Piot M.: Process for obtaining an alpha-lactalbumin enriched product from whey and uses thereof, U.S. Patent No. 4485040, 1984.
73. Sakurai K., Goto Y.: Manipulating monomer-dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin by amino acid substitution. J. Biol. Chem., Vol. 277, No. 28: 25735-25740, 2002.
74. Scopes R.K.: Protein Purification, Principles and Practice. Vol. 2, Springer-Verlag, New York, 1987.
75. Suki A., Fane A.G. and Fell C.J.D.: Flux decline in protein ultrafiltration. J. Memb. Sci., 21: 269-283, 1984.
76. Tarhan L.: Ekstraktın Deriştirilmesi. Ed: Telefoncu A., Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Böl. 6, s. 78-108, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, İzmir, 1996.
77. Tarhan L.: Ekstraksiyon ve Ön Ayırma Teknikleri. Ed: Telefoncu A., Salnikov J., Zihnioğlu F., Kılınç A., Biyokimyada Temel ve Modern Teknikler. Böl. 3, s. 27-115, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kurs Kitabı, İzmir, 2000.
78. Telefoncu A.: Protein Saflaştırma Stratejisi ve Amacı. Ed: Telefoncu A., Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Böl. 1, s. 1-12, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, İzmir, 1996.
79. Tutunjian R.S.: Ultrafiltration process in biotechnology. Ann. N.Y. Acad. Sci., 413: 238-253, 1983.
80. Velioğlu Ögünç A.: Süt ve süt proteinlerinin antioksidan etkileri. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2004 (Danışman: Prof.Dr. A.Süha Yalçın).

81. Vilker V.L., Colton C.K. and Smith K.A.: The osmotic pressure of concentrated protein solutions: Effect of concentration and pH in saline solutions of bovine serum albumin. *J. Coll. Interf. Sci.*, 79: 548-552, 1981.
82. Wang Q. and Swaisgood H.E.: Characteristics of beta-lactoglobulin binding to the all-trans-retinal moiety covalently immobilized on CeliteTM. *J. Dairy Sci.*, 76: 1895-1901, 1993.
83. Waterborg J.H. and Matthews H.R.: *Basic Protein And Peptide Protocols*. Ed: Walker J.M., *Methods in Molecular Biology*. Vol. 32, s. 1-4, Humana Press, New Jersey, 1994.
84. Yalçın A.S.: Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides. *Curr. Pharm. Des.*, 12: 1637-1643, 2006.
85. Ye X., Yoshida S., Ng T.B.: Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin B and β -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. *Int. J. Biochem Cell Biol.*, 32: 1143-1150, 2000.
86. Zihnioğlu F.: *Elektroforetik Yöntemler*. Ed: Telefoncu A., *Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*. Böl. 10, s. 150-165, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu*, İzmir, 1996.
87. Zommara M., Tachibana N., Sakono M., Suzuki Y., Oda T., Hashiba H., Imaizumi K.: Whey from cultured skim milk decreases serum cholesterol and increases antioxidant enzymes in liver and red blood cells in rats. *Nutr Res.*, 16: 293-302, 1996.
88. Zydney A.L. Protein separation using membrane filtration: New opportunities for whey fractionation. *Int. Dairy J.*, 8: 243-250, 1998.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Tuğba Bayram
Doğum Tarihi: 10.08.1982
Doğum Yeri: Konya
Medeni Durumu: Bekar
E-mail Adresi: tugba1008@yahoo.com
Adresi: 59 Ada Manolya 4/3 B K: 6 D: 31 Ataşehir/İstanbul
Öğrenim Durumu:
2004- Yüksek Lisans
M.Ü.Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
2000-2004 Lisans
Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü
1996-2000 Lise
Kadir Has Süper Lisesi
1988-1996 Cemal Diker İlköğretim Okulu

Stajlar:

2003 Bayer İlaç Fabrikası Kalite Kontrol Bölümü
2002 Göztepe SSK Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı

Çalıştığı Kurumlar:

2004- M.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Öğrencisi

Uluslararası Bildiriler:

1. **Bayram T.**, Pekmez M., Önay Uçar E., Arda N., Yalçın A.S. Antioxidant, antiviral, antimicrobial activities and identification of the structural properties of whey proteins and their hydrolysates. V. International Nutrition And Dietetics Congress, April 12-15, 2006, Ankara (poster sunumu).

2. **Bayram T.**, Pekmez M., Önay Uçar E., Arda N., Yalçın A.S. Antioxidant potential of whey protein fractions. 31st Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, June 24-29, 2006, İstanbul (poster sunumu).

3. **Bayram T.**, Pekmez M., Önay Uçar E., Arda N., Yalçın A.S. Antioxidant potential of whey protein fractions, FEBS Journal, 273: 299, 2006.

Ulusal Bildiriler:

4. **Bayram T.**, Yalçın A.S. Peyniraltı suyundaki majör proteinlerin kromatografik yöntemlerle eldesi. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği IV. Ulusal Kongresi, 9-12 Mayıs 2005, Antalya (poster sunumu).