

Kjeldahl Yöntemi ile Ham Protein Tayini

Her gıdada farklı oranda protein bulunur. Gıdaların besin değerin ve kalitesinin saptanmasında protein miktarının belirlenmesi gerekir. Gıdalarda çok çeşitli amaçlarla protein analizleri yapılmaktadır.

- Gıda maddesinin mevcut kalite standartlarına uygunlunun belirlenmesi
- Gıda maddesinin besleme değerinin belirlenmesi
- Bir gıda maddesinin genel bileşiminin tespit edilmesi
- Herhangi bir işleme tekniğinin proteinler üzerindeki etkisini belirlenmesi

Dondurma %4.5	Ekmek %9.1	Domates %1.1	Dana eti %19.1	Kuru fasulye %22.3	Ceviz %14.8	İncir %1.2	Sucuk %21.4
Beyaz peynir %15.4	İrmik %11.4	Bezelye %6.3	Koyun eti %16.5	Mercimek %24.7	Fındık 12.6	Kiraz %1.3	Pastırma %29.5
Yoğurt (tam yağlı) %3.5	Bisküvi %6.6	Havuç %1.1	Piliç eti %23.4	Nohut %20,5	Mısır %10.0	Üzüm %0.6	Salam %23.8
Süt (yağlı-inek) %3.3	Makarna %12.5	Karnabahar %2.7	Alabalık %18.3	Barbunya %22.9	Mantar 2.7	Elma %0.2	Yumurta %12.1
	Tarhana %12.2	Ispanak %3.3	Palamut %24.0	Soya fasülyesi %34.1		Portakal %1.0	Tahin helvası %13.5

Rutin analizlerde proteinler ve amino asitler ayrı ayrı değil toplam ham protein olarak tayin edilmektedir.

Gıdalarda toplam organik azotun büyük kısmı proteinlerden bir kısmı ise protein olmayan bileşiklerden gelir. Protein olmayan fakat yapısında azot bulunan bileşikler; nükleik asitler, azotlu karbohidratlar, alkaloidler, azotlu lipitler, porfirinler, azotlu pigmentlerdir.

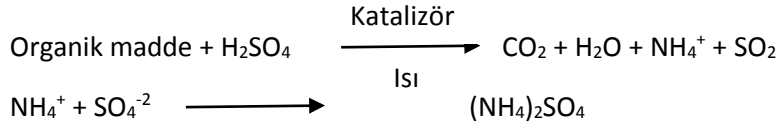
Protein tayininde birçok metot bulunmakla birlikte en çok kullanılan ve **referans metot** olarak kabul edilen yöntem Danimarkalı kimyacı Johan Kjeldahl'ın geliştirdiği Kjeldahl yöntemidir. Kjeldahl yönteminin temel amacı gıdalardaki serbest azotun (N) amonyum iyonuna (NH_4^+) çevrilmesidir. Bu yöntemde esas olarak analiz edilen örnekteki azot miktarı belirlenmekte ve azot miktarından protein miktarı saptanmaktadır.

Kjeldahl yöntemi ile protein halinde bulunmayan amin, amid ve amonyum gibi azot içeren tüm bileşikler de protein gibi belirlendiğinden bu yöntem **Ham Protein Tayini** denilmektedir.

Kjeldahl yöntemin prensibi: Azot içeren örneğin H_2SO_4 ile yakılarak içindeki tüm azotun $(NH_4)_2SO_4$ a dönüştürülmesi, çözeltinin bazikleştirilmesi ve açığa çıkan NH_3 'ün damıtılıp belli standart bir asit çözeltisi içinde toplandıktan sonra nötrleşen asit miktarının titrasyonla saptanmasıdır.

Bunun için örnek önce derişik sülfürik asit ile yüksek sıcaklıkta yakılır. Karbonlu (C) maddeler okside olarak karbondioksit (CO_2), hidrojenler suya, hidrojene bağlı azot amonyum sülfat $((NH_4)_2SO_4)$ haline dönüşür. Elde edilen çözelti ağırlıkça % 40'lık sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ile distile edilir. Serbest hale geçen amonyak (NH_3) bir asit çözeltisi içinde tutulur. Amonyakın asit çözeltisi içerisinde nötrlediği asit miktarı titrasyon ile belirlenerek azot miktarı tespit edilir.

Kjeldahl yöntemi üç aşamada yapılır. 1-YAŞ YAKMA, örnekteki organik maddelerin yakılması ve azotun $(NH_4)_2SO_4$ şeklinde elde edilmesi. **2-DAMITMA**, elde edilen $(NH_4)_2SO_4$ ten NaOH kullanılarak azotun NH_3 formunda serbest bırakılması ve serbest kalan NH_3 'ün damıtılarak ayarlı bir asit çözeltisi içinde tutulması. **3-TİTRASYON** NH_3 tarafından nötrleştirilen asit çözeltisinin titre edilmesi ve toplam azotun hesaplanması.

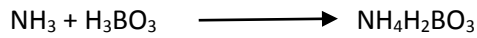
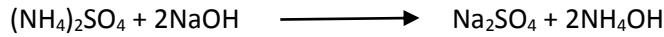
Yakma:

Yakma işleminde proteinleri oluşturan amino asitlerin amino gruplarında (NH₂) bulunan azot, amonyum iyonuna (NH₄⁺) dönüştürülür ve sülfürik asitten gelen sülfat köküne (SO₄²⁻) bağlanarak amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) haline getirilir. Yakma aşamasında asitin kaynama noktasını yükseltmek, reaksiyonu hızlandırmak için potasyum sülfat ve katalizörler kullanılır.

% 98'lik yoğunluğu d=1.84 g/cm³ olan H₂SO₄

K₂SO₄ + CuSO₄ Kjeldahl tableti

Parçalanmış, öğütülmüş örnek homojenize edilir, örnekten 1 g kadar tartılır ve Kjeldahl balonuna konur. Üzerine tablet ve 25 mL derişik H₂SO₄ eklenir. Kjeldahl balonu yakma setine yerleştirilir. Başka bir Kjeldahl balonuna tablet ve 25 mL derişik H₂SO₄ konularak kör deneme hazırlanır. Sıcaklık kademeli artacak şekilde ayarlanarak yakma işlemi başlatılır. Örnek 350–420°C'de siyah nokta kalmayınca kadar yakılır. Örneklerin rengi açık yeşil veya sarımsı yeşil olduğunda yakma işlemine son verilir. Tüpler oda sıcaklığına kadar soğutulur.

Damıtma:

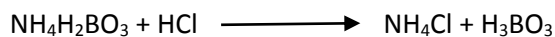
Kjeldahl protein tayin yönteminin damıtma(destilasyon) aşamasında yakma sırasında oluşan amonyum sülfat (NH₄)₂SO₄, % 40'lık sodyum hidroksit ile reaksiyona girerek sodyum sülfat ve amonyum hidroksit oluşur. Amonyum hidroksitte parçalanarak amonyak ve su oluşur. NaOH yakma karışımının pH'ını yükseltir. Bu da (NH₄)₂SO₄ 'taki NH₄⁺ iyonlarının NH₃ gazına dönüşmesini kolaylaştırır ve NH₃ serbest hale getirilir. Gaz haline gelmiş amonyak geri soğutucu yardımı ile belli miktar ayarlı borik asit içinde tutulur.

% 40'lık NaOH çözeltisi

% 4'lük Borik asit çözeltisi

İndikatör çözeltisi; metil kırmızısı + bromkresol yeşili

Kjeldahl balonlarına 100 ml % 40'lık NaOH ilave edilir, erlene 50 mL borik asit çözeltisi ve 10 damla indikatör çözeltisi konur, erlen destilasyon cihazına yerleştirilir, işlem başlatılır, yaklaşık 100–150 mL destilat elde edilinceye kadar destilasyona devam edilir, bu aşamada başlangıçta menekşe-mor renginde olan erlendeki borik asit çözeltisi yeşil renge dönüşür.

Titrasyon:

Borik asit çözeltisinde tutulan ve amonyak miktarının belirlenmesi için titrasyon işlemi yapılır. Titrasyon sonunda zayıf bir baz olan amonyak, konsantrasyonu belli bir asit ile nötralize edilir. Amonyum borat hidroklorik asitle reaksiyona girdiğinde amonyum klorür ve tekrar borik asite dönüştüğünden erlendeki

yeşil renk damıtmanın başlangıcındaki menekşe-mor renge dönüşür, harcanan asit miktarından formülle toplam azot hesaplanır.

0.1 N HCl çözeltisi

Bürete 0.1 N HCl doldurulur ve içinde amonyağın tutulduğu borik asit çözeltisi büretteki asit çözeltisi ile başlangıçtaki menekşe-mor renk oluşuncaya kadar titre edilir.

Azot Miktarının Hesaplanması

$$\%Azot = \frac{(S1 - S0) \times N \times F \times meş}{\ddot{O}} \times 100$$

S1: Titrasyonda harcanan HCl çözeltisi miktarı (mL)

S0: Kör deneme titrasyonunda harcanan HCl çözeltisi miktarı (mL)

N: Titrasyonda kullanılan HCl çözeltisinin normalitesi (0.1 N)

Meş: Azotun mili eşdeğer ağırlığı (0,014)

Ö: Örnek miktarı (g veya mL)

F: 0.1 N HCl çözeltisinin faktörü

Protein Miktarının Hesaplanması

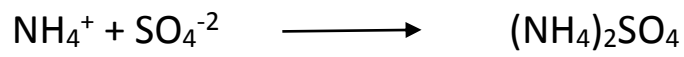
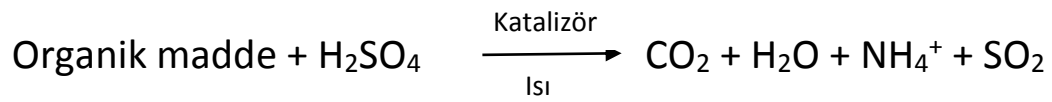
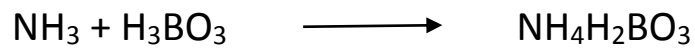
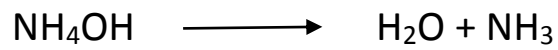
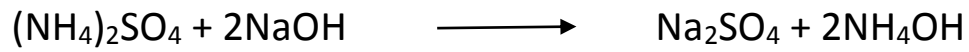
Proteinler C, H, O, N, S, P' dan meydana gelmiştir. Protein molekülü içerisindeki **azotun miktarı** ortalama **% 16** (100/16, 6.25) ise de bu oran değişik gıda maddelerinde farklıdır.

Bu sebeple titrasyonda elde edilen N miktarından belli bir katsayı kullanılarak protein miktarı hesaplanır.

$$\%Protein = \%Azot \times F$$

F: Protein çevirme faktörü

Et, yumurta, fasulye, bezelye ve mısırdaki **6.25**, Buğday, makarna ve unda **5.70**, Arpa, çavdar, yulaf ve darıda **5.83**, Süt ve ürünlerinde **6.38**, Kabuklu yemişlerde **5.30**

Yakma:**Damıtma:****Titrasyon:**