

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BUĞDAY GLUTENİN PROTEİNLERİNİN
İZOELEKTRİK ODAKLAMA YÖNTEMİYLE KARŞILAŞTIRILMASI

Ebru BEYOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

84730

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Ayten SAĞIROĞLU
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

EDİRNE-1999

84730

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BUĞDAY GLUTENİN PROTEİNLERİNİN
İZOELEKTRİK ODAKLAMA (IEF) YÖNTEMİYLE KARŞILAŞTIRILMASI


Ebru BEYOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

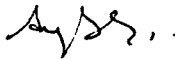
Bu tez 12/3/99 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ülkü OYMAN



Prof. Dr. Adilhan FEYİZOĞLU



Yrd. Doç. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

ÖZET

Bu çalışmada, İzoelektrik Odaklama (IEF) tekniği kullanılarak buğdaylarda bulunan glutenin proteinlerini izoelektrik noktasına (*pI*) göre ayırma amaçlandı.

Trakya Bölgesi'nde ekimi yapılan beş çeşit ekmeklik buğday (Tr. Vulgare); *Atilla-12*, *Bezostaya-1*, *Kate A-1*, *Pehlivan* ve *Prostor* unları örnek materyal olarak kullanıldı. İzoelektrik noktaları bilinen standart proteinler olarak Sığır Serum Albumini (BSA), β -Laktoglobulin, Lipaz ve Tripsinojen kullanıldı.

Buğday unlarının 10 hacim n-bütanol ile yağı uzaklaştırıldı. Gluten proteinleri, unların bidestile su ile yıkanması sonucu elastik ve yapışkan hamur formunda elde edildi. % 50 1-Propanol ve 6 M üre ile bu hamurdan ekstrakte edilen glutenin proteinleri 2-Merkaptoetanol ile indirgendi. 6 M üre içeren ekstraktlar Sephadex G-200 destek maddesi kullanılarak 1x30 cm ebatındaki kolona uygulandı ve glutenin proteinleri 3 M üre içeren 10 mM Tris.HCl tamponu (pH 8.0) ile elüe edildi. Saflandırılan glutenin proteinleri dializ tüplerinde silikajel yardımıyla konsantre edildi. Örneklerin glutenin proteini miktarları Lowry metoduna göre bulundu.

pH aralığı 3-10 olan amfolit kullanılarak poliakrilamid jeller hazırlandı. Örnekler uygulanmadan önce 15 dak. 200 Volt'da ön yürütme yapıldı. Bütün örnekler ve standart proteinler jelle uygulanarak IEF SE-600 Dikey Dilim Jel Elektroforez Ünitesi'nde 400 Volt'da gerçekleştirildi.

IEF'den sonra jeller Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası ile boyandı ve protein bantları boya çıkarma çözeltisi ile görünür hale getirildi.

Bilgisayar bağlantılı scanning dansitometre kullanılarak protein bantlarının band şiddetleri (pikler) elde edildi. Dansitometre programı ile her bir protein bandının % alan, R_f ve alan değerleri bulundu. Örnek proteinlerin *pI* değerleri standart proteinlerin R_f değerleri ile *pI* değerleri arasında çizilen standart protein grafiği yardımıyla hesaplandı.

SUMMARY

The purpose of this study was to determine the glutenin proteins in different wheat species by using the technique called isoelectric focusing.

The flour of five bread wheat (Tr. Vulgare) species which are; Atilla-12, Bezostaya-1, Kate A-1, Pehlivan and Prostor which grown in Thrace region are used as the sample material. Bovine serum albumin (BSA), β -lactoglobulin, lipase and trypsinogen were used as standarts, whose Sigma Chem Co. are IEF standarts.

Wheat flour was defatted by 10 volume of n-bütanol. Gluten proteins were isolated as the elastic and cohesive dough mass from the wheat flours by washing the bidestilled water. Glutenin proteins extracted from this dough with 50 % v/v 1-propanol and 6 M ürea were reduced with 2-mercaptoethanol (2-ME). The extracts included 6 M ürea were loaded on to a Sephadex G-200 column (1x30 cm) and glutenin proteins were eluted with 10 mM Tris.HCl, pH 8.0, containing 3 M ürea buffer. The purified glutenin proteins were concentrated in the dialysis tubes through silicagel. Protein concentration in this sample was determined by the method of Lowry with bovine serum albumin as standart.

Polyacrylamide gels included ampholites, pH 3-10, were prepared. Before the samples were applied on prerun were carried out for 15 min at 200 Volt. All samples and standart proteins on to gels and isoelectric focusing was carried out in SE-600 Vertical Slab Gel Electrophroses at 400 Volt.

After IEF, gels were stained with the Coomassie Brillant Blue R-250 dye and protein bands were archieve to the visible state by the destaining solution.

The band intensities (peaks) were obtained by using scanning densitometer connected with a computer. For each of protein bands % area, Rf and area values were found with densitometer programme. According to Rf and pI values of standarts a standart graphic were drawn and pI values of the sample proteins were calculated according to the standart protein graphic.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	I
SUMMARY	II
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2. 1. BUĞDAY'IN ÖZELLİKLERİ	2
2. 1. 1. Buğday Çeşitleri	3
2. 1. 2. Trakya Bölgesi'nde Ekilen Buğday Cinsleri	4
2. 1. 3. Buğdayda Kalite Kriterleri	6
2. 1. 4. Buğdayda Kaliteyi Etkileyen Faktörler	8
2. 1. 4. 1. Yetiştirme Şartları	8
2. 1. 4. 2. Botanik Özellik	8
2. 1. 5. Buğdayın Kimyasal Bileşimi	8
2. 1. 5. 1. Protein ve Amino Asit İçeriği	9
2. 1. 5. 2. Karbonhidrat İçeriği	11
2. 1. 5. 3. Mineral Madde İçeriği	11
2. 1. 5. 4. Lipid İçeriği	12
2. 1. 5. 5. Vitamin İçeriği	13
2. 1. 6. Buğdayların Gliadin ve Glutenin Proteinleri	13
2. 2. BUĞDAY PROTEİNLERİNİN AYRILMASI	15
2. 2. 1. Buğday Örneklerinin Hazırlanması	15
2. 2. 2. Buğday Proteinlerinin Ekstraksiyonu	15
2. 2. 3. Buğday Proteinlerinin İndirgenmesi	18
2. 2. 4. Buğday Proteinlerinin Saflaştırılması	19
2. 2. 5. Buğday Proteinlerinin Analizinde Elektroforetik Yöntemler	20
2. 2. 6. Gliadin Elektiroforezi	21

2. 2. 7. Glutenin Proteinlerinin Elektrofözezi	23
2. 2. 8. Protein Elektrofözezi Verilerinin Tarımda Değerlendirilmesi ve Bilimsel Açıdan Önemi	29
3. MATERYAL ve METODLAR	31
3. 1. MATERYALLER	31
3. 1. 1. Kullanılan Buğday Örnekleri	31
3. 1. 2. Kullanılan Kimyasallar	31
3. 1. 3. Kullanılan Alet ve Cihazlar	32
3. 1. 4. Kullanılan Çözeltiler	33
3. 2. METODLAR	35
3. 2. 1. Buğday Örneklerinin Hazırlanması Metodu	35
3. 2. 2. Glutenin Proteinlerinin İndirgenme Metodu	35
3. 2. 3. Glutenin Proteinlerinin Ekstraksiyon Metodu	36
3. 2. 3. 1. 1-Propanol ile Ekstraksiyon Metodu	36
3. 2. 3. 2. 6 M Üre ile Ekstraksiyon Metodu	36
3. 2. 4. Glutenin Proteinlerinin Saflaştırılması Metodu	37
3. 2. 5. Protein Tayin Yöntemi	38
3. 2. 6. Elektroforetik İzoelektrik Odaklama Yöntemi	39
3. 2. 7. Dansitometrik pI Tayin Yöntemi	40
4. DENEYLER VE BULGULAR	41
4. 1. DENEYLER	41
4. 1. 1. Buğday Örneklerinden Proteinlerin Elde Edilmesi	41
4. 1. 2. Buğday Örneklerinden Glutenin Proteinlerinin Ekstraksiyonu	41
4. 1. 3. Glutenin Proteinlerinin Saflaştırılma Aşamaları	42
4. 1. 3. 1. Santrifüjasyon	42
4. 1. 3. 2. Jel Filtrasyon Kromatografisi (GFC)	43
4. 1. 3. 3. Glutenin Proteinlerinin Deriştirilmesi	43
4. 1. 4. Lowry Metoduna Göre Örneklerin Protein Tayini	44

4. 1. 5. İzoelektrik Odaklama (IEF)'nin Uygulanması	46
4. 1. 6. Jellerin Hazırlanması ve Örneklerin Uygulanması	49
4. 1. 7. Jellerin Yürütülmesi	49
4. 1. 8. Jellerin Boyama İşlemleri	50
4. 2. BULGULAR	53
4. 2. 1. GFC ve Dializ Bulguları	53
4. 2. 2. Standart pI Grafiğinin Eldesi	53
4. 2. 3. Jellerin Dansitometrik Değerlendirilmesi	55
4. 2. 3. 1. Standartların Rf, pI ve Pik Alanlarının Bulunması	55
4. 2. 3. 2. Örnek Proteinlerin Rf, pI ve Pik Alanlarının Bulunması	56
4. 2. 3. 2. 1. Ham Glutenin Proteinlerinin Rf, pI ve Pik Alanlarının Bulunması	56
4. 2. 3. 2. 2. 6 M Üre ile Ekstrakte Edilen Buğday Glutenin Proteinlerinin Rf, pI ve Pik Alanlarının Bulunması	61
4. 2. 3. 2. 3. Saflaştırılan Buğday Glutenin Proteinlerinin Rf, pI ve Pik Alanlarının Bulunması	66
4. 2. 3. 2. 4. 1-Propanol ile Ekstrakte Edilen Buğday Glutenin Proteinlerinin Rf, pI ve Pik Alanlarının Bulunması	71
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	76
6. KAYNAKLAR	79
7. ÖZGEÇMİŞ	83
8. TEŞEKKÜR	84

1. GİRİŞ

Trakya Bölgesi, İç Anadolu Bölgesi'nden sonra ikinci derecede tahıl üretimi yapılan bölgedir. Trakya Bölgesi'ndeki tarımsal araştırma-geliştirme faaliyetleri Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından yürütülmekte ve alınan sonuçlara göre üreticiler bilgilendirilmektedir. Buradaki çalışmalarda özel hibrit buğday türleri geliştirilmiştir. Geliştirilen buğday türlerindeki farklılıklar; fiziksel ve kimyasal özelliklerde de görülür. Buğday proteinlerinin özellikleri genetik özelliklerinden kaynaklanır.

Çeşitli elektroforez teknikleri buğday glutenin ve gliadin proteinlerinin genetik kontrolleri ve kompozisyonları hakkındaki bilgilerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Khelifi, D., Branlard, G., 1991). Buğday depo proteinlerinin fraksiyonlanmasında iki metod daha yaygındır. *İzoelektrik Odaklama(IEF)* ve Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) birlikte veya ayrı ayrı uygulanmaktadır.

Buğday glutenin proteinleri, bir çok çeşit polipeptid alt ünitesinin disülfid (S-S) bağlarıyla birbirine bağlanarak oluşturduğu yapışkan, elastik, az çözünen proteinleridir. Bu yüzden diğer çözünen proteinler (gliadinler, albuminler v.s.) uzaklaştırıldıktan sonra iyi bir indirgeme, çözündürme yöntemi ile ekstrakta geçirilip, elektroforeze uygulanması sonucunda tanımlanabilirler (Matsumura, Y., v.d., 1984).

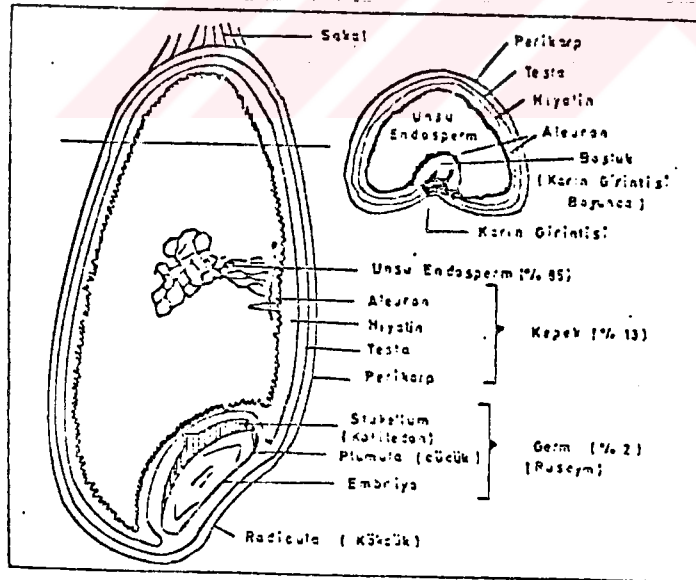
Bizim çalışmamızda önce Trakya Bölgesinde yaygın olarak ekilen beş ekmeklik buğday çeşidinin (Atilla-12, Bezostaya-1, Kate A-1, Pehlivan ve Prostor) içerdikleri glutenin proteinleri 2-merkaptetanolla indirgenip, iki ayrı yöntemle çözünmesi sağlanmıştır (Curioni, A., v.d., 1990). İzoelektrik Odaklama yöntemi ile izoelektrik noktalarına göre pH 3-10 gradient jeli üzerinde en iyi şekilde ayrılması ve belirlenmesi yapılmıştır. Buğday cinsleri arasındaki glutenin farklılık ve benzerlikleri tespit edilmiştir.

2.KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2. 1. BUĞDAY'IN ÖZELLİKLERİ

Buğday, buğdaygiller familyasının *Triticum* cinsini oluşturur. İklim ve toprak istekleri az, ziraatı ve depolanması kolay, besin değeri ve un verimi yüksek, ekmek yapımına en elverişli hububat çeşitidir (Ertugay, Z., vd., 1994). Taneleri beyaz, sarı, kırmızımsı-kahverengi, hatta kırmızı ve morumsu renkte olan buğday çeşitleri geliştirilmiştir.

Buğday tanesinin yapısı Şekil. 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Buğday tanesinin boyuna kesiti.

Unsu endosperm tanenin % 85'ini oluşturur. Nişasta deposu ve un kaynağıdır. Aleuron endosperm'in en dış tabakasıdır. Hiyalin tanenin su alış-verişini düzenler ve taneye rengini veren pigmentleri taşıyarak tane rengini belirler. Perikarp (meyve kabuğu) iç ve dış perikarp olmak üzere iki tabakadan ibarettir. İç perikarp gevşek ve aralıklı hücre yapısına sahiptir. Alınan su ve mikroorganizma sporlarının tane çevresinde dağılımını kolaylaştırır. Dış perikarp ince zar şeklindedir. Tanenin taşınması, depolanması ve temizlenmesi ile kolayca ayrılır. Ruşeym (germ) bölgesi nişasta dışındaki bileşenlerce zengindir (Ertugay, Z., vd., 1994).

Değirmencilik açısından buğdayın özellikleri 3'e ayrılır.

1. Zirai Özelliği: Yetiştirici için önemlidir. Yetiştirici buğdayın iklim ve toprağa adapte olma durumuna, ürün verimine, hastalıklara dayanma gücüne dikkat eder.

2. Kimyasal Özelliği: Ekmekçilikte önemlidir. Un kimyasal bileşimine göre çeşitli amaçlarla (ekmek veya bisküvi g.b.) kullanılır.

3. Fiziksel Özelliği: Daha çok değirmencilikte önemlidir. Un değirmenciliği endospermi (besidoku) kabuk ve embriyo'dan ayırdıktan sonra, una öğüten mekanik bir işlemdir (Topal, İ.E., 1988).

2. 1. 1. Buğday Çeşitleri

Kırıldığında çakmaktaşı gibi sert bir kesit yüzeyi veren buğday tanelerindeki protein miktarı, parmaklar arasında un gibi ufalanabilen yumuşak tanelere göre daha fazladır. Bu özelliklerine göre buğdaylar sert ve yumuşak olmak üzere iki'ye ayrılır. Türkiye'de en çok yumuşak buğday, ikinci derecede sert buğdaylar ekilir.

İklim koşullarına bağlı olarak bazı çeşitler ekim-kasım aylarında (kışlık buğday), bazıları da şubat-mart aylarında (yazlık buğday) ekilir.

Türkiye’de buğdaylar başta tür kalitesine göre iki sınıfa ayrılmaktadır (Elgün, A., Ertugay, Z., 1992).

Ekmeklik Buğdaylar : Aestivum ve compactum çeşitlerini içine alır. Başlıcaları;

- Beyaz Sert Buğdaylar
- Anadolu Kırmızı Sert Buğdaylar
- Kırmızı Sert Buğdaylar
- Beyaz Yarı Sert Buğdaylar
- Kırmızı Yarı Sert Buğdaylar

Makarnalık Buğdaylar : Bu sınıfı durum çeşitleri oluşturur.

- Anadolu Durum Buğdayları
- Diğer Durum Buğdayları

Buğday unları da kullanma amacı ve teknik değerine göre,

- Ekmeklik,
- Baklava ve Böreklik,
- Bisküvilik,
- İrmik altı olmak üzere dört çeşide ayrılır (Topal, İ.E., 1988).

2. 1. 2. Trakya Bölgesinde Ekilen Buğday Cinsleri

Başlıcaları: *Pehlivan, Kate A-1, Atilla-12, Saraybosna, Saroz-95, Prostor, Murat-1* ve *Kırkpınar-79*’dur. Bunlar hakkında daha ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir (Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Yayınları).

Pehlivan Çeşit Özellikleri:

1993 yılında melezleme yolu ile geliştirilmiş ekmeklik bir buğday çeşitidir. Kışlık bir çeşittir. Tanesi kırmızı, sert ve çok iridir. Sürmeye (mantar hastalığı) hassastır. Ekmeklik kalitesi yüksektir.

Kate A-1 Çeşit Özellikleri:

1988 yılında tescil ettirilmiş Bulgaristan orijinli ekmeklik bir buğday çeşitidir. Alternatif bir çeşittir. Tanesi kırmızı ve yarı sert yapıdadır. Kök ve kökboğazı hastalığından zarar görebilir. Trakya, Marmara ve aşırı derecede soğuk olmayan bölgelerde ekimi yapılabilir.

Atilla-12 Çeşit Özellikleri:

Macaristan orijinli, ekmeklik bir buğday çeşitidir. Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsünce tohumluk üretimi yapılmaktadır. Tanesi kırmızı, sert ve orta iriliktir. Kahverengi ve kara pasa, sürmeye çok hassastır. Virüs hastalıklarına da hassasiyet gösterir. Ekmeklik kalitesi iyidir. Trakya-Marmara bölgelerinde ekilebilir.

Saraybosna Çeşit Özellikleri:

Yugoslavya orijinli, ekmeklik bir buğday çeşitidir. Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsünce tohumluk üretimi yapılmaktadır. Kışlık bir çeşittir. Tanesi mat kırmızı renkte ve yarı-sert yapıdadır. Kahverengi pasa hassas olup ekmeklik kalitesi iyidir. Yağış rejimi iyi ve düzenli olan alanlarda ve sulama imkanı olan alanlarda ekilebilir.

Saroz-95 Çeşit Özellikleri:

Melezleme yolu ile 1995 yılında geliştirilen ekmeklik buğday çeşitidir. Kışlık bir çeşittir. Soğuklara dayanıklıdır. Tanesi kehribar renkli, sert ve orta iriliktir. Kahverengi pasa dayanıklı, sürmeye hassastır.

Prostor Çeşit Özellikleri:

Bulgaristan orijinlidir. 1995 yılında adaptasyon çalışmaları sonucu geliştirilen ekmeklik buğday çeşitidir. Tanesi kırmızı, sert ve orta iriliktir. Kuraklığa dayanıklıdır. Az yağış alan yerlerde ekilebilir.

Murat-1 Çeşit Özellikleri:

Melezleme yolu ile geliştirilen ekmeklik bir buğday çeşitidir. Tanesi mat kırmızı renkte, sert ve normal iriliktir. Kuraklığa hassastır. Kahverengi pasa dayanıklıdır. Ekmeklik kalitesi yüksektir.

Kırkpınar-79 Çeşit Özellikleri:

Ekmeklik buğday çeşitidir. Alternatif bir çeşittir. Tanesi beyaz ve yumuşak yapılıdır. Kuraklığa hassastır. Ekmeklik kalitesi ortadır. Kahverengi pasa, sürmeye karşı da hassastır. Trakya Bölgesi, Kuzey Marmara ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde ekimi yapılabilir.

2. 1. 3. Buğdayda Kalite Kriterleri

Farklı buğday parçaları arasındaki fiziksel ve kimyasal farklar göze çarpacak kadar büyüktür. Üretim, test etme ve değerlendirme, işlem den geçirme ile ilgili olsa da olmasa da bu farklılıklar geniş kapsamlı etkilere sahiptirler ve belirsiz bir şekilde kalite olarak adlandırılan kriterin temelini oluştururlar. Bir buğdayın gerçek kalitesi toprak, iklim, buğday tohumu stoğu ve tohum içi elemanların etkilerinin toplamıdır (Finney, K.F., vd., 1987).

Buğday kalitesinin temel tanımı genellikle bir buğday sınıfından diğerine değişir. Kalitenin en basit tanımı muhtemelen uygunluk bakımındandır. Arzu edilen buğday iyi kaliteye, arzu edilmeyen ise kötü kaliteye sahiptir. Yumuşak kırmızı ya da beyaz buğday tipinin kalitesi yumuşak buğday öğütümüne ve kek, kurabiye ve kraker üretimine uygunluğu bakımından tanımlanır. Durum buğdayının kalitesi irmik ve

makarna üretimine uygunluğu bakımından tanımlanır. Böylece herhangi bir buğdayın kalitesi tek bir özellik ile ifade edilmez (Finney, K.F., vd., 1987).

Değirmencilikte ise buğdayın hasattan sonra en az iki yıl dinlenmiş, dolgun, sağlam, sağlıklı, temiz (yabancı maddesi düşük), beyaz un üretimi ve işleme kalitesi yüksek, enerji sarfiyatı düşük olmalıdır. Bunu belirlemek için de değişik kriterler kullanılır (Ertugay, Z., vd., 1994).

Yetiştirildiği ekoloji ve kültür: Buğdaydaki ekim mevsimi, sulama, zirai mücadele gibi işlemler ürün kalitesi üzerinde etkili olmaktadır. Yazlık ekilen buğdaylar kışlık buğdaylardan; kıraçta yetiştirilenler sulak olanlardan; uygun şekilde gübrelenenler gübresizlerden daha yüksek kalite gösterirler (Elgün, A., Ertugay, Z., 1992).

Botanik Özellik: En önemli botanik ölçüler tür ve çeşit kalitesidir. Kültürü yapılan türlerin botanik sınıflandırılması Tablo 2.1'de verilmektedir (Elgün, A., Ertugay, Z., 1992).

Tablo 2. 1. Buğdayların Botanik Sınıflandırılması

Grup	2n	Tür Adı
Diploid	14	Tr. monococcum
Tetraploid	28	Tr. durum (makarnalık) Tr. polanicum Tr. turgidum
Hexaploid	48	Tr. vulgare (ekmeklik) Tr. compactum (bisküvilik) Tr. spelta

Tane Özellikleri: Laboratuarda yapılan fiziksel ve teknolojik analiz metodlarıyla belirlenen tane özellikleridir (Ertugay, Z., Elgün, A., 1994)).

- a. Botanik Sınıflama: Buğdayın türü ve çeşidi,
- b. Fiziksel Özellikleri: Hacim ağırlığı, bin tane ağırlığı, irilik, sertlik ve camsılık, yabancı madde miktarı, renk, koku v.s.,
- c. Kimyasal Özellikleri: Su, protein, ve kül miktarı,
- d. Teknolojik Özellikleri: Gluten (öz) miktarı ve kalitesi, amilaz ve proteaz aktivitesi gibi özellikleridir.

2. 1. 4. Buğdayda Kaliteyi Etkileyen Faktörler

2. 1. 4. 1. Yetiştirme Şartları

Yetiştirildiği ekoloji (iklim ve toprak) ve kültür şekli (gübre, sulama, toprak işleme, mücadele, ekim zamanı v.s.) kaliteyi etkiler.

2. 1. 4. 2. Botanik Özellik

Tanenin genetik potansiyeline bağlı olarak tür ve çeşit kalitesi önemli birer kriterdir. Gerçek kalite faktörü bu olup, açığa çıkış düzeyini yetiştirme şartları belirler.

2. 1. 5. Buğdayın Kimyasal Bileşimi

Buğday tanesinin kimyasal yapısına göz atıldığında karbonhidrat, protein, enzim, lipid, vitamin, su ve mineral maddeler göze çarpar. Özellikle karbonhidrat, protein, A, B, ve E vitaminlerince zengin olduğu görülür.

2. 1. 5. 1. Protein ve Aminoasit İçeriği

Simmonds (1978) tarafından yapılan bir çalışmada, tahıl proteinlerinin dağılımını incelenmiş ve çözünürlüklerine göre sınıflandırılmıştır. Elde ettiği sonuçlar Tablo 2.2'de verilmektedir.

Tablo 2.2. Çözünürlüklerine göre tahıl endosperm proteinlerinin dağılımı (%).

Tahıl (Hububat)	Protein aralığı (%)	Albuminler (suda çözülebilir)	Globulinler (tuzda çözülebilir)	Prolamin Gliadin (alkolde çözülebilir)	Artık ve Gluteninin (alkalide çözülebilir)	En önemli protein grubunun adı
Arpa	10-16	3-4	10-20	35-45	35-45	Hordein
Mısır	7-13	2-10	10-20	50-55	30-45	Zein
Yulaf	8-20	5-10	50-60	10-15	5	Avenin
Pirinç	8-10	2-5	2-8	1-5	85-90	Oryzin
Çavdar	9-14	20-30	5-10	20-30	30-40	Secalin
Buğday (HRS*)	10-15	5-10	5-10	40-50	30-40	Gliadin
Buğday (durum)	12-16	10-15	5-10	40-50	30-40	Gliadin

HRS = Sert kırmızı yazlık buğday*

Yine aynı araştırmacı tahıllardaki aminoasit kompozisyonlarını da incelemiş ve elde ettiği bulgular Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2. 3. Bazı tahılların aminoasit kompozisyonları (% wt ile)

Aminoasit	Buğday	
	(HRS*)	Çavdar
Triptofan	1.24	1.13
Treonin	2.88	3.70
Izolösin	4.34	4.26
Lösin	6.71	6.72
Lizin	2.82	4.08
Metiyonin	1.29	1.58
Sistin	2.19	1.99
Fenilalanin	4.94	4.72
Trozin	3.74	3.22
Valin	4.63	5.21
Arginin	4.79	4.88
Histidin	2.04	2.28
Alanin	3.50	5.13
Aspartik asit	5.46	7.16
Glutamik asit	31.25	21.26
Glisin	6.11	4.79
Prolin	10.44	5.20
Serin	4.61	4.13
Toplam protein %	14.0	17.13

Tahıl komponentlerindeki farklılıklar aminoasit kompozisyonlarındaki uyumsuzluğu açıklar. Alkolde çözünebilen fraksiyonlar (prolaminler) yüksek derecede glutamik asit, prolin ve düşük düzeyde lisin bulundurur.

Tahıllarda sadece ekmeklik buğdayda ve bir dereceye kadar da çavdarda depo proteinleri bulunur. Bu proteinlerde hamur (glutenler) formunda kuvvetli ve elastik özelliklere sahiptir. Tahıllardaki depo proteinleri toplam tane proteinlerinin daha büyük fraksiyonlarını içermektedir.

Depo proteinlerinin % 85'ini içeren buğday endosperm proteinleri, gliadin (alkolde çözülebilen) ve glutenin (alkali yada asitte çözülebilen) proteinlerinden oluşur. Depo proteinlerinin oranı örneğin protein içeriğine bağlı olarak değişir.

2. 1. 5. 2. Karbonhidrat İçeriği

Tahıl tanesi karbonhidrat deposudur. En önemlisi de nişastadır. Nişasta endosperm hücreleri içinde, protein matrisine gömülü nişasta tanecikleri halindedir. Selüloz tanenin kabuk kısmında ve hücre duvarlarında yoğundur (Ertugay, Z., vd., 1994).

Becker ve arkadaşları tane doldurma sırasında buğday ve çavdar gibi bazı tahılların sakkarid içeriğini çalışmışlardır. Tane doldurma süresince monosakkaridlerin azaldığı, maltoz ve maltotriose'un değişmediği ve düşük miktarlarda bulunduğu görülmüştür. Tane olgunlaştıkça sükroz, rafinoz ve ketoz artmış, tetrasakkaritler azalmıştır. Tahılların sakkarid içeriklerinin farklı olduğu anlaşılmıştır (Becker, R., vd., 1977).

2. 1. 5. 3. Mineral Madde İçeriği

Tanede mevcut mineraller, bulundurdıkları miktar ve önemlerine göre majör (K, P, Mg, Ca, Na gibi), minör (Fe, Zn, Mn, Cu gibi) ve eser (Ba, Br, Al gibi) elementler olmak üzere üç bölümde incelenebilir (Elgün, A., Ertugay, Z., 1992).

Çıplak buğday tanesinin yaklaşık % 95'ini potasyum, magnezyum, kalsiyum fosfat ve sülfat tuzları oluşturur. Tane KH_2PO_4 , K_2HPO_4 fitin fosforu olarak iyi bir fosfat kaynağıdır (Elgün, A., Ertugay, Z., 1992).

Lockhart ve Nesheim (1978) yaptıkları çalışmalarında tahıl taneleri ve tahıl ürünlerinin mineral madde içeriklerini araştırmışlardır (Tablo 2.4).

Tablo 2. 4. Tahıl tanelerinin mineral madde içerikleri (mg.10¹ kg)

	Ca	Fe	Mg	P	K	Na	Cu	Mn	Zn
Çavdar	60	10	120	340	460	1	0.78	6.69	3.05
Buğday (tane)	50	10	160	360	520	3	0.72	4.88	3.40
Buğday (kepek)	140	70	550	1170	1240	9	1.23	11.57	9.80

Mineral maddeler tanenin kabuk kısmında yoğunur. Endosperm merkezine doğru yok denecek kadar azalır.

Bazı araştırmacılar farklı buğday çeşitlerinin mineral madde içeriklerinin farklı olduğunu bildirmiştir. Bir kısmı bu farklılıkların hem kalıtsal, hem de çevresel nedenlere bağlı olduğunu ileri sürerken, bir kısmı da farklılıkların sadece genetik nedenlere bağlı olarak ortaya çıktığını ileri sürer.

Tanenin kül miktarı genetik-ekolojik faktörler ve uygulanan kültürel işlemlerle değişmektedir. Besin maddelerince zengin, gübrelenmiş topraklarda, kıraç koşullarda, kepek oranı yüksek çeşitler fazla kül içeriğine sahiptir (Elgün, A., Ertugay, Z., 1992).

2. 1. 5. 4. Lipid İçeriği

Buğdayda özellikle ununda minör bileşenler içinde yer alır. Serbest lipidler petrol eteri ile, polar olanları ise n-bütanol ile ekstrakte edilebilirler. Tahıl tohumlarındaki yağ asitlerinin büyük miktarı nötral lipid, fosfolipid ve glikolipid olarak meydana gelir (Olson, R.A., Frey, K.J., 1987).

2. 1. 5. 5. Vitamin İçeriği

Tahıl endospermini genetik olarak daha üstün vitamin içeriğiyle teşhis etmede kullanılan denemeler bilinmesede buğday tiamin (B₁), riboflavin (B₂), niasin (nikotin amid, B₃) ve pridoksin (B₆) vitaminlerinin önemli bir kaynağıdır. Buğday tohumu da E vitaminince (tokoferol) zengindir (Ksarda, D.D., vd., 1976).

2. 1. 6. Buğdayların Gliadin ve Glutenin Proteinleri

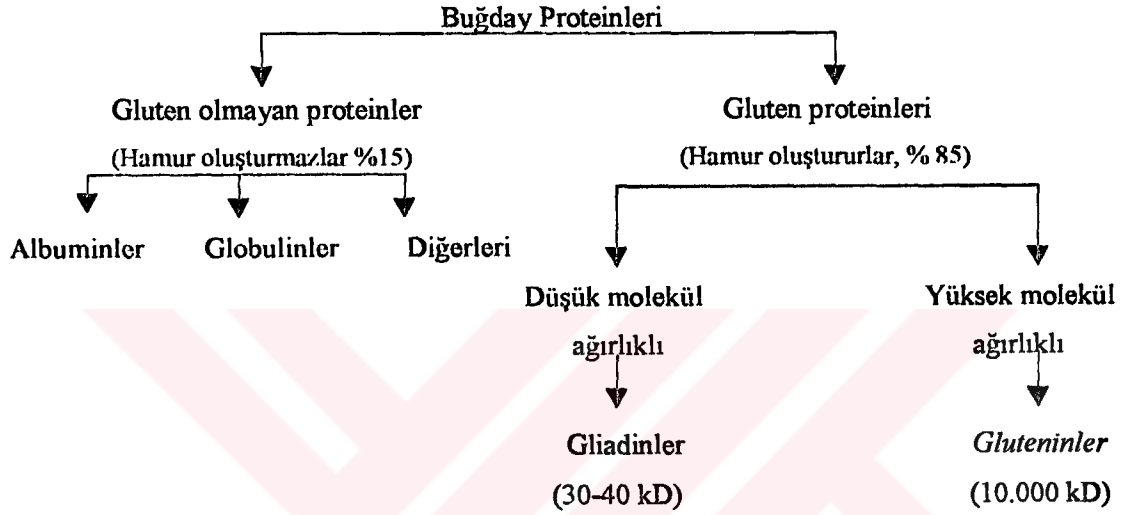
Buğday tahılının depo proteinleri endosperm içinde sentezlenir, elektroforetik mobiliteleri ve eriyebilme özelliklerine göre de sınıflandırılır. Sulu alkol ile undan ekstrakte edilebilen proteinler olarak ifade edilen gliadinler monomerik altbirimlerdir (30-40 kD) (Ksarda, D.D., vd., 1976). Gluteninler ekstraksiyon için aşırı pH ya da denatüre solventler gerektirirler. Non-kovalent etkileşimlerle ve 10⁴ kD ya da daha büyük olan agregatların içindeki disülfid bağlarıyla birleşmişlerdir (Ewart, J.A.D., 1987).

Buğday glutenini, buğday unundan hazırlanan hamur; nişasta ve çözülebilir proteinleri temizlemek için yıkandığında kalan yapışık ve elastik protein kümesidir. Disülfid bağları (S-S) sayesinde birbirine bağlanan, alt birim polipeptidlerinin bir çok türlerinden ibaret olan polimer proteindir. Gluteninin polipeptid içi disülfid bağlarından başka, polipeptid arası disülfid bağlarına da sahip olabilir. Kaç gluteninin alt biriminin bağlı olduğunu anlamak için alt birimlerindeki polipeptid içi ve arası disülfid bağlarının sayısını ayrı ayrı saptamak gereklidir. Bundan önce ana gluteninin alt birimlerine ayrılmalı ve bunlardaki S-S bağları belirlenmelidir (Matsumura, Y., vd., 1984).

Yüksek molekül ağırlıklı (HMW) glutenin alt birimlerinin, ekmeklik buğday (*Tr. aestivum*) glutenin'inin en önemli bileşenlerinden biri olarak düşünülür fakat yapıları ve diğer glutenin proteinleriyle karşılıklı etkileşimleri hala bilinmemektedir. Ancak bu alt birimlerin (HMW) varlığı yada yokluğunun ekmek yapımı özelliklerindeki buğday çeşitleri arasındaki farklılıkla ilgili olduğu görülür.

Gluten olmayan proteinler ise tuzda çözülebilir globulinler, suda çözülebilir albuminler ve gliko-proteinlerdir. Gluten olmayan proteinler önemlidir çünkü büyük ölçüde gluten proteinlerinin işlevselliğini arttırmaları (Finney, K.F., vd., 1987).

Buğdayda bulunan proteinleri basit olarak aşağıdaki gibi gösterebiliriz.



Şekil 2. 2. Buğday proteinlerinin şematik olarak gösterilmesi

2. 2. BUĞDAY PROTEİNLERİNİN AYRILMASI

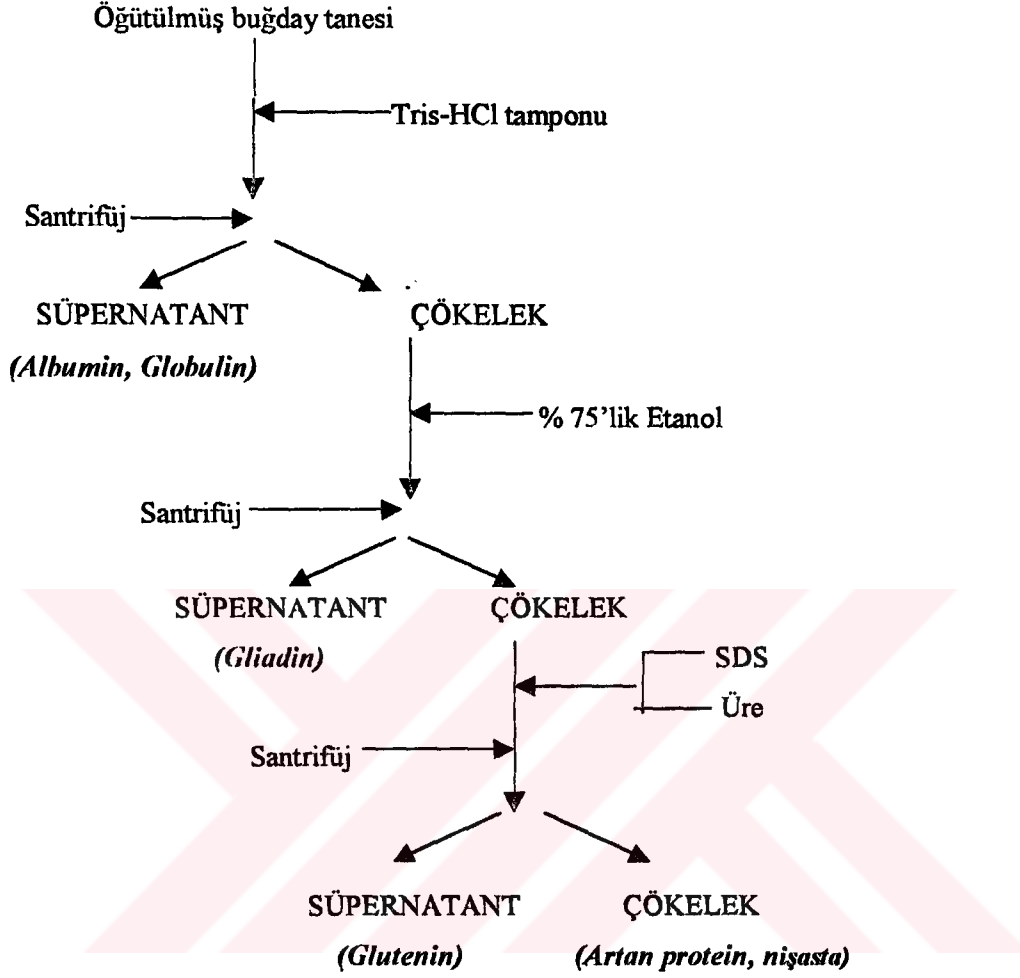
Tahıl proteinlerinin ayrılması ve saflandırılmasında yaygın olarak elektroforez teknikleri (düz yatak; horizontal, dikey; vertikal slab jel veya tüp (disk) sistemi) kullanılmaktadır.

2. 2. 1. Buğday Örneklerinin Hazırlanması

Bazı çalışmalarda seçilen buğday örneklerinden alınan tek tane kağıt arasında veya havan içinde ezilerek ya da değirmenle öğütülerek örnekler hazırlanmıştır. Bazı çalışmalarda ise buğday taneleri un haline getirilip, gözenek büyüklüğü 0.5 mm–0.8 mm olan eleklerden geçirildikten sonra kullanılmıştır.

2. 2. 2. Buğday Proteinlerinin Ekstraksiyonu

Buğday proteinleri Osborne (1907) tarafından tarif edilen metoda göre basamak tarzı ekstrakte edilebilirler. Osborne'un metodu değiştirilerek yapılan ekstraksiyon işlemi Şekil 2.3.'de verilmektedir (Weiss, W., vd., 1993).



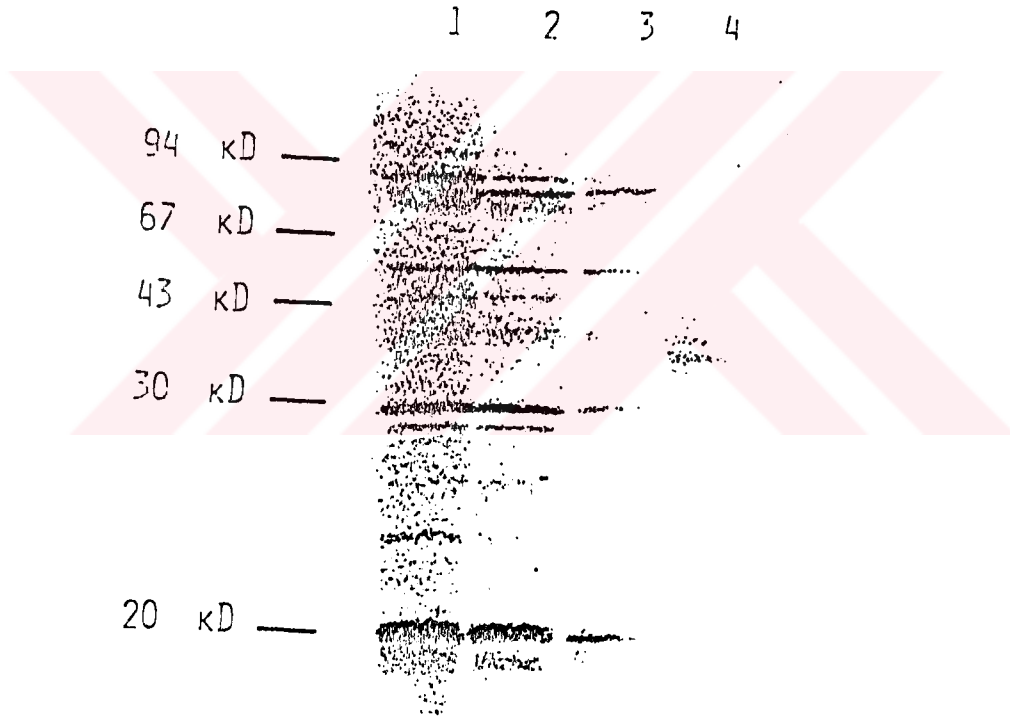
Şekil 2. 3. Buğday tanelerinden albumin, globulin, gliadin ve glutenin proteinlerinin ekstraksiyon işleminin şematik olarak gösterilmesi.

Bu işlem üç protein fraksiyonu ile sonuçlanmaktadır (Weiss, W., vd., 1993 ve Penttila, I.A., vd., 1991).

1. Tuzda eriyebilir proteinler (albuminler ve globulinler),
2. Sulu alkolde eriyebilir proteinler (gliadinler),
3. SDS/DTT'de eriyebilir proteinler (gluteninler).

Osborne(1907) proteinlerin çözünlüklerine göre yaptığı sınıflandırılmasını protein elektroforezi ve disülfid bağlarının keşfinden önce gerçekleştirmiştir (Penttila, I.A., vd., 1991).

Tamás (1989) ekmeklik buğdayın gliadin proteinlerini hem % 70 (v/v) etanol ile, hem de % 25 etilen klorhidrin'in eşit miktarlarıyla ekstrakte etmiştir. Toplam buğday endosperm proteinlerini ise farklı çözücülerle farklı pH'larda ekstrakte ederek SDS-PAGE'ne uygulamıştır. Şekil 2. 4.'de verilen elektroforegram sonuçlarını elde etmiştir.



Şekil 2. 4. Değişik çözücüler kullanılarak ekstrakte edilen buğday proteinlerinin SDS - PAGE ile M_w tayini.

1: 68 mM Tris-HCl, % 1 SDS Tamponu, pH 7.0

2: 68 mM glisin-asetik asit, % 1 SDS tamponu, pH 5.0

3: % 25 etilen klorhidrin

4: % 70 etanol ile ekstrakte edilen protein bandlarıdır.

2. 2. 3. Buğday Proteinlerinin İndirgenmesi

Disülfid bağları protein yapısında, peptid bağlarından sonra en önemli kovalent bağlardandır. Aynı veya farklı protein zincirlerindeki iki sistein bileşiği arasında bir yükseltgenme reaksiyonu ile meydana gelir. Disülfid bağlarının en önemli fonksiyonu, diğer etkileşimler sonucu katlanma ve bükülmelerle ortaya çıkan yapıya daha fazla kararlılık kazandırmasıdır. Yapısal protein zincirleri arasındaki disülfid bağları visko-elastik özelliklerini kısmen de olsa sağlar. Buğday glutenindeki disülfid bağları hamurun yapışkan ve esnek özelliğini oluşturur. Proteinlerdeki S-S köprüleri tiol grubu (S-H) taşıyan bileşikler tarafından indirgenerek parçalanabilir. Öncelikle proteinin 8-10 M üre ile denatüre edilmesi gerekir (Telefoncu, A., 1988)

Matsumura ve arkadaşları (1984) glutenin proteinindeki disülfid bağlarını iki farklı şekilde indirgemişlerdir. Uyguladıkları ilk yöntem disülfid bağlarının kısmi indirgenmesidir. % 0.4 protein konsantrasyonlarındaki glutenin 0.01 N Asetik asit içinde dağıtılır ve N₂ gazı ile muamele edilir. Değişik konsantrasyonlardaki 2-Merkaptoetanol glutenin çözeltisine katılır ve indirgeme pH'ı 6.0 ya yükseltmekle başlar. pH'ın yükselmesiyle birlikte glutenin hemen agregatlaşır. Diğer yöntem disülfid bağlarının tam redüksiyonudur. 1 mM EDTA içeren 0.1 M Fosfat tamponu (pH 8.8) içindeki %1 glutenin çözeltisi 20 dakika N₂ gazı ile havası alınır. 4.5 saat 20 °C'de 5 mM 2-Merkaptoetanol ile indirgenir.

Wieser ve arkadaşları (1990) gluten'in disülfid bağlarını Friedman ve arkadaşlarının (1970) metoduna göre indirgemişdir.

Curioni ve ekibinin İtalya'da yaptığı çalışmasında (1990) da yerel buğday glutenindeki S-S bağlarını 2-Merkaptoetanol ve ditioeritrol varlığında indirgemişdir .

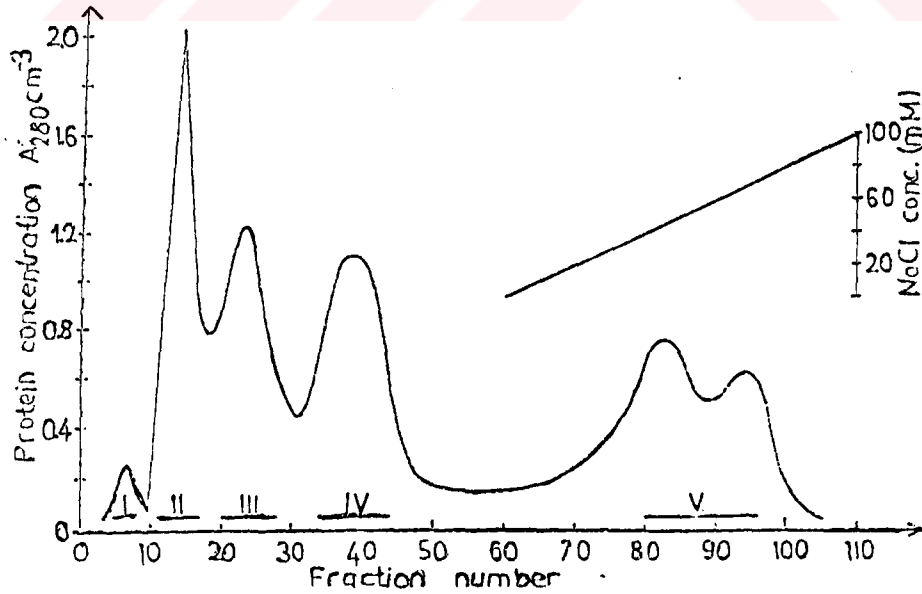
2. 2. 4. Buğday Proteinlerinin Saflaştırılması

Proteinlerin saflaştırılmasında kromatografik ve elektroforetik teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Tahıllar üzerinde yapılan çalışmalarda buğday endosperm proteinleri iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılmıştır.

Curioni ve arkadaşları (1990) buğday glutenin proteini içeren süpernatantı bio-jel P-6 kolonu üzerinde (2.6x26 cm) saflaştırmıştır. Kromatografi 15 ml/saat'lik bir akış oranında gerçekleştirmiştir. Örnekleri kolondan 3 M üre içeren 10 mM Tris HCl (pH 8) tamponu kullanılarak elüe etmiştir.

Matsumura ve grubu (1984) ise glutenini CM-Sephadex ile saflaştırmıştır.

Tamás (1989) gliadin proteinlerini katyon değişim CM- ve anyon değişim DEAE- selüloz kolonlarında ayırmıştır. CM- ve DEAE- selüloz aktive edildikten sonra 0.3 M NaCl çözeltisinde süspansiyon edilmiştir. 2x65 cm ebatında kolonlar hazırlanmıştır. Gliadin örnekleri kolona % 70 (v/v) etanol içinde uygulanmıştır. Örnekleri 4 ml'lik fraksiyonlar halinde kolondan toplamış ve 280 nm'de absorbanları ölçülmüştür (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5. Etanol ile ekstrakte edilen gliadinlerin etanol içeren DEAE – Selüloz kolonunda kromatografik ayrılması (Akış oranı 15 ml/saat).

2. 2. 5. Buğday Proteinlerinin Analizinde Elektroforetik Yöntemler

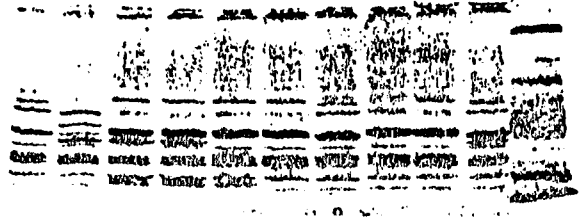
Çeşitli elektroforez tekniklerinin uygulamaları, buğday gliadinlerinin ve glutenin'in yüksek molekül ağırlıklı alt birimlerinin genetik kontrolü ve bileşimi hakkındaki bilgilerimizi geliştirmede önemlidir.

Bütün depo proteinlerinin ayrılmasında iki metot ortaklaşa olarak kullanılmaktadır. Daha asidik polipeptidler için; iki farklı elektroforez tekniğinin bir kombinasyonu olan IEF x SDS-PAGE, daha bazik polipeptidler için; dengelenmemiş pH gradient elektroforezi (NEPHGE) x SDS-PAGE kullanılabilir. Aynı zamanda üç farklı bir-boyutlu tekniklerin bir kombinasyonu olan A-PAGE gliadin polipeptidleri için kullanılmaktadır. Glutenin'in yüksek molekül ağırlıklı (HMW) ve düşük molekül ağırlıklı (LMW) alt birimleri için de bir-boyutlu SDS-PAGE basamakları kullanılır (Khelifi, D., Branlard, G., 1991).

Bazı araştırmacılar proteinlerin yapısını ve biyokimyasal özelliklerini incelemek amacıyla jel filtrasyonu, elektroforez, "izoelektrik odaklama", yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) gibi çeşitli teknikleri kullanmışlardır.

Elektroforez metotlarının dikkate değer dezavantajı ise, diğer saflandırma yöntemlerine göre daha zaman alıcı olmasıdır. Ancak son yıllarda son derece popüler olan minyatür elektroforez sistemlerinin kullanımı ile bu problem aşılmıştır (Telefoncu, A., 1996).

Avusturalya'lı bir çalışma grubu, buğday çeşitlerinin tespiti için, minyatür poliakrilamid gradient jellerine dayanan hızlı bir elektroforez metodu tanımlamışlardır. Bu metot bir saat içinde elektroforetik tespiti imkanı sağlamaktadır. Etilen glikol ile gliadin proteinlerinin ekstraksiyonundan sonra Na-Laktat tamponu (pH:3.1) kullanılarak MG-315 jelini 300 Volt'da 9 dakika katodik elektroforeze tabi tutmuşlardır. Hızlı lekeleme (20 dakika'dan az) "Gradipure" lekesi içinde yüksek sıcaklıkta (50 °C) gerçekleştirilmiştir. Şekil 2. 6. 'da görülen elektroforegram sonuçlarını elde etmişlerdir (Wringley, C.W., vd., 1991).



Şekil 2.6. Etilen glikol ile Avustralyan buğday tanelerinden ekstrakte edilen gliadin proteinlerinin mikrograd elektroforetik örnekleri

Üstelik minyatür jellerin kullanımı hızlılık (önceden kullanım için hazır jelleri kapsadığından), yeniden üretilebilirlik, uygunluk ve emniyetli oluşu (jel oluşumu için nörotoksit akrilamid monomerlerinin elle kullanımını sakındığından) avantajlarını birleştirmektedir (Wringley, C.W., vd., 1991).

2. 2. 6. Gliadin Elektrofeksi

Elektroforez çalışmalarında alkolde çözünen protein olan gliadin elektroforegramı çeşit ayırımında en çok tercih edilen yöntemdir. Bu proteinin avantajı çevre koşullarından etkilenmemesi, çok az örneğe gereksinim duyması ve kapasitesinin yüksek oluşudur.

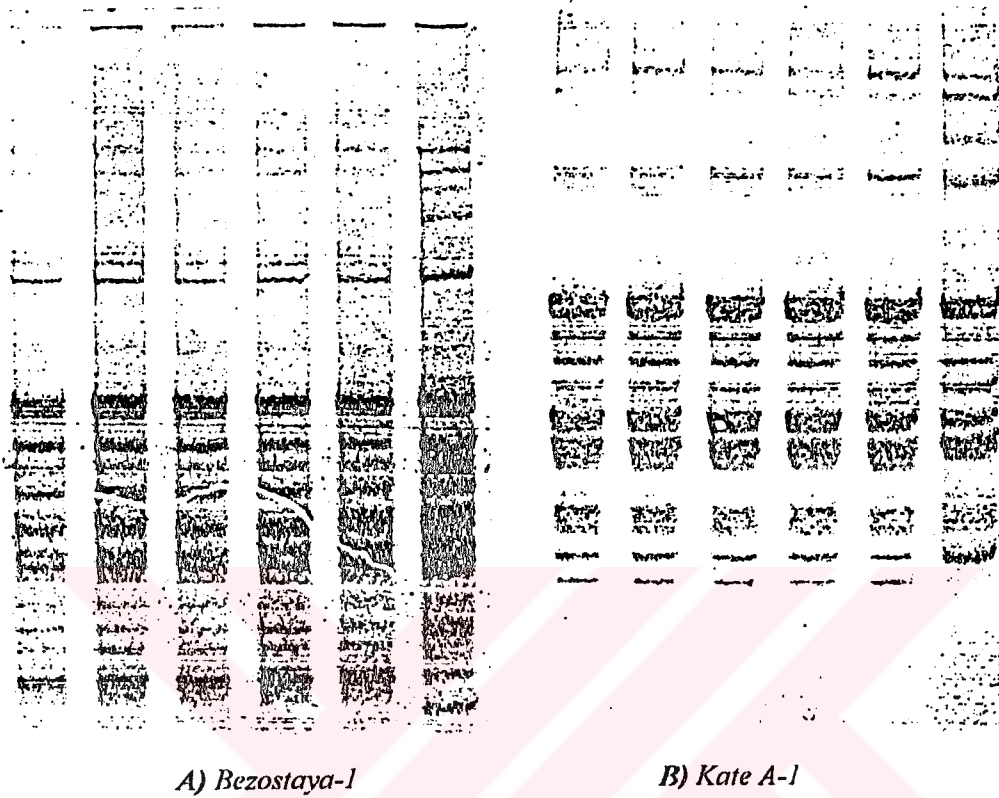
Basit olarak ifade edildiğinde gliadin elektroforezi proteinlerin moleküler büyüklük ve elektriksel yüklerine göre ayırımıdır. Asidik pH'da gliadinler pozitif yüklüdürler ve bir jel ortamında elektrik akımının etkisi altında negatif yüklü elektroda doğru hareket ederler. Bu hareketin hızı, moleküler büyüklük ve yük yoğunluğuna bağlıdır (Aktan, B., Atlı A.).

Gliadinlerin yaygın olarak bulunan türdeşleri, bireysel protein bileşimlerinin saf bir formda izolasyonunu güçleştirmektedir. Küçük miktarlarını temizlemek için 1- ve 2- boyutlu jel elektroforezi ve izoelektrik odaklama (IEF) gibi yüksek kararlılığa sahip metotlar kullanışlıdır (Bushuk, W., Zillman, R.R., 1978). Fakat daha büyük miktarlar da kolon kromatoğrafisi tekniklerinin kararlılığı yetersiz kalmaktadır (Brown, J.W.S., vd., 1981, Payne, P.I., Corfield, K.G., 1979). Saf gliadin proteinlerinin ekstraksiyonu için affinite kromatoğrafisi kullanılabilirse de spesifik antibadilerin temini zordur. Ters-faz yüksek-performans sıvı kromatoğrafisinin (HPLC) kararlılığı yüksektir, ancak nicel ve nitel analizlerde kullanım için daha uygundur.

Buğday besidokusunun (endosperm) depo proteinlerinden biri olan gliadinler asit poliakrilamid jel elektroforezi (A-PAGE) içinde azalan elektroforetik mobilitelerine uygun olarak α , β , γ ve ω grupları şeklinde kısımlara ayrılmıştır (Tamás, L., vd., 1989, Masci, S., vd., 1991).

Bushuk ve Zillman (1978) yaptıkları çalışmalarında, gliadin elektroforez sistemini geliştirmişler ve gliadin bandlarına yeni bir adlandırma sistemi önermişlerdir.

Aktan ve arkadaşları Bushuk ve Zillman'a ait metodun modifiye edilmiş şeklini kullanmışlardır. Jelin dayanıklılığı arttırdığı ve gliadin bandlarını daha iyi ayırdığı için modifiye yöntemi tercih etmişlerdir. Elektroforez işlemi LKB 2001 dikey elektroforez aletinde, 500 Volt'luk elektrik akımında, 15 °C'de, 160x180x1.5 mm boyutlarındaki jellerde gerçekleştirilmiştir. Boyama % 95'lik etil alkol'de çözünmüş Coomassie Brilliant R-250 ile, boya giderme ise % 12'lik Trikloroasetik asit çözeltisi ile yapılmıştır. Ekmeklik buğdaylardan elde ettikleri gliadin band desenleri Şekil 2.7'de gösterilmiştir (Aktan, B., Atlı, A.).



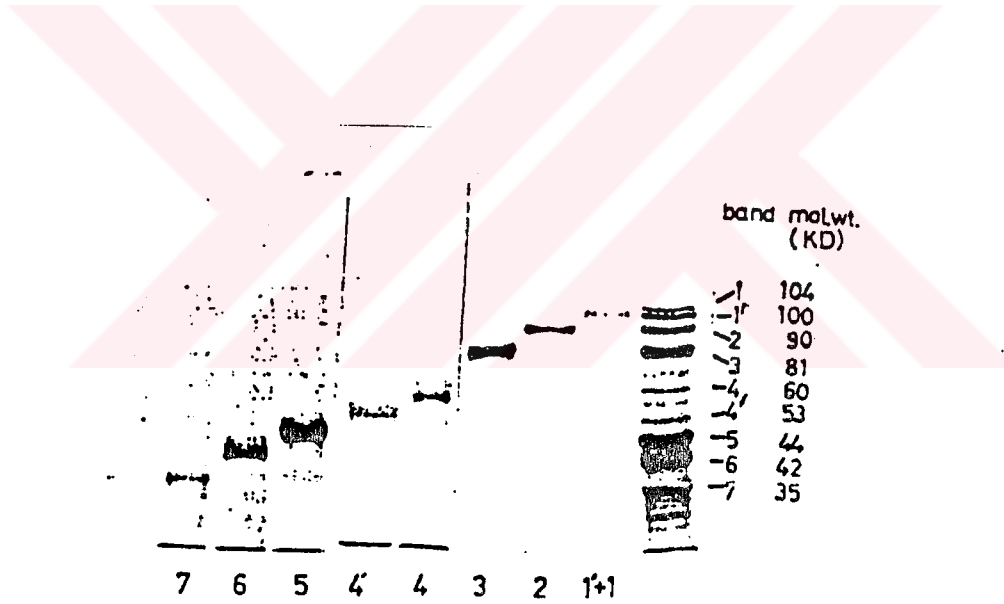
Şekil 2. 7. İki ekmeklik buğday çeşidinin gliadin elektroforegramları

2. 2. 7. Glutenin Proteinlerinin Elektrofrezisi

Glutenin proteinlerinin alt birimlerine ayrılmasında izoelektrik odaklama (IEF), ters-faz yüksek-performans sıvı kromatografisi (RP-HPLC), sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektrofrezisi (SDS-PAGE) yada 2-boyutlu elektrofrez teknikleri (IEFxSDS-PAGE v.b.) kullanılmaktadır. Buna rağmen gluteninin alt birimlerine ayrılmasına ilişkin elimizde az bilgi mevcuttur.

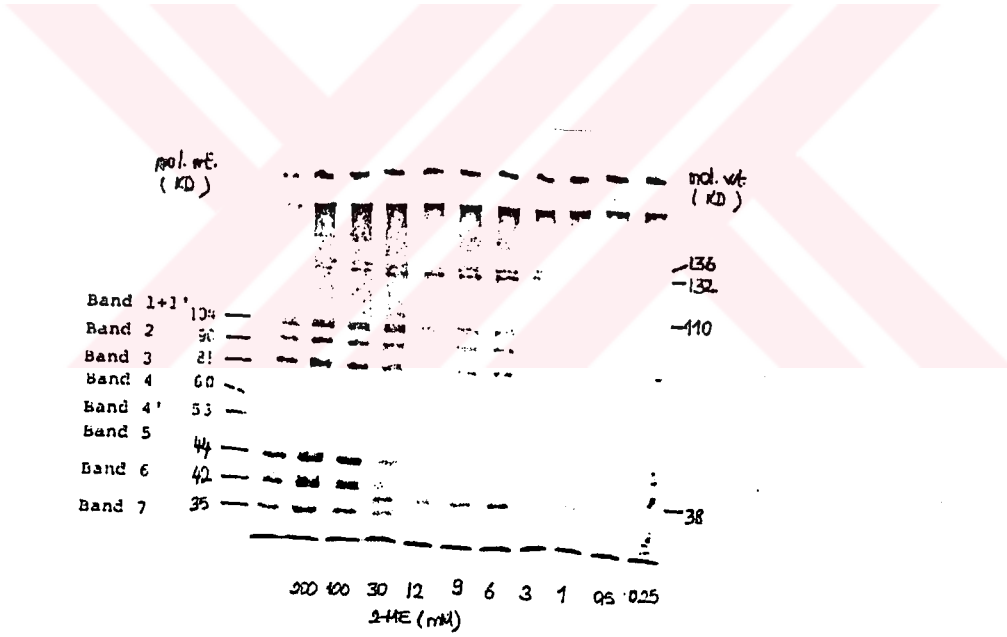
SDS-PAGE glutenin proteinlerinin molekül ağırlıklarına göre alt birimlerine ayrılmasında çok sık kullanılan bir metottur. Matsumura ve arkadaşlarının(1984) iki farklı çalışması örnek olarak verilebilir. Bu Japon araştırma grubu yerel buğday unlarından elde ettikleri glutenini indirgedikten sonra alt birimlerini Laemmli'nin

(1970) süreksiz tampon sistemini kullanarak SDS-PAGE ile ayırmışlardır. Elektroforezi 20 °C'de 16~20 saat 20 mA'de gerçekleştirmişlerdir. Elektroforezden sonra SDS'yi jelden uzaklaştırmak için SDS-PAGE jelini metanol-su-asetik asit (10:83:7 v/v) çözeltisi ile ıslatmışlardır. Görünür bandları jiletle kesip çıkarmışlar ve her bir jel fragmentini küçük parçalar halinde ezmişlerdir. Ezilen jeli % 4 SDS ve % 20 gliserol içeren Tris-HCl tamponunda (pH 6.8) çalkalamışlar, SDS'nin proteine bağlanmasını sağlamak için 5 dakika 100 °C'de ısıtmışlardır. Jelden proteinin elektroforetik ekstraksiyonunu 20 mm çapındaki bir cam tüp içinde Laemmli tampon sistemi ile, 16~20 saat, 20 °C'de, 40 mA'de yürütmüşlerdir. Elektroforegram sonuçları Şekil 2. 8.'de verilmiştir.



Şekil 2. 8. Glutenin'in alt birim polipeptidlerinin SDS-PAGE ile ayrılması ve Mw tayini.

Yine aynı grup bir başka çalışmada aynı buğday örneklerini kullanarak pH 6.0'da 2-Merkaptoetanol'ün değişik konsantrasyonlarıyla glutenini indirgemişlerdir. Polipeptid arası S-S bağlarının kısmi indirgeme ile kırılıp-kırılmadığını araştırmak için alt birim monomerlerinin serbest bırakılmasını SDS-PAGE ile gözlemişlerdir. SDS-PAGE Laemmlı'nin tampon sistemini kullanarak, aynı yöntemle uygulamışlardır. Aşağıda görülen sonuçları elde etmişlerdir (Şekil 2.9). Buna göre band 1+1', band 2, band 3 ve band 7 2-Merkaptoetanol'ün düşük konsantrasyonlarında bile ortaya çıkmaktadır. 136 kD, 132 kD ve 110 kD molekül ağırlığına sahip olan diğer band grubu 2-Merkaptoetanol'ün düşük konsantrasyonlarında görünmüş, fakat aşırı yüksek konsantrasyonlarda görülmemiştir.



Şekil 2. 9. 2-Merkapto etanol'ün değişik konsantrasyonlarıyla kısmi olarak indirgenen gluteninin SDS-PAGE ile Mw tayini.

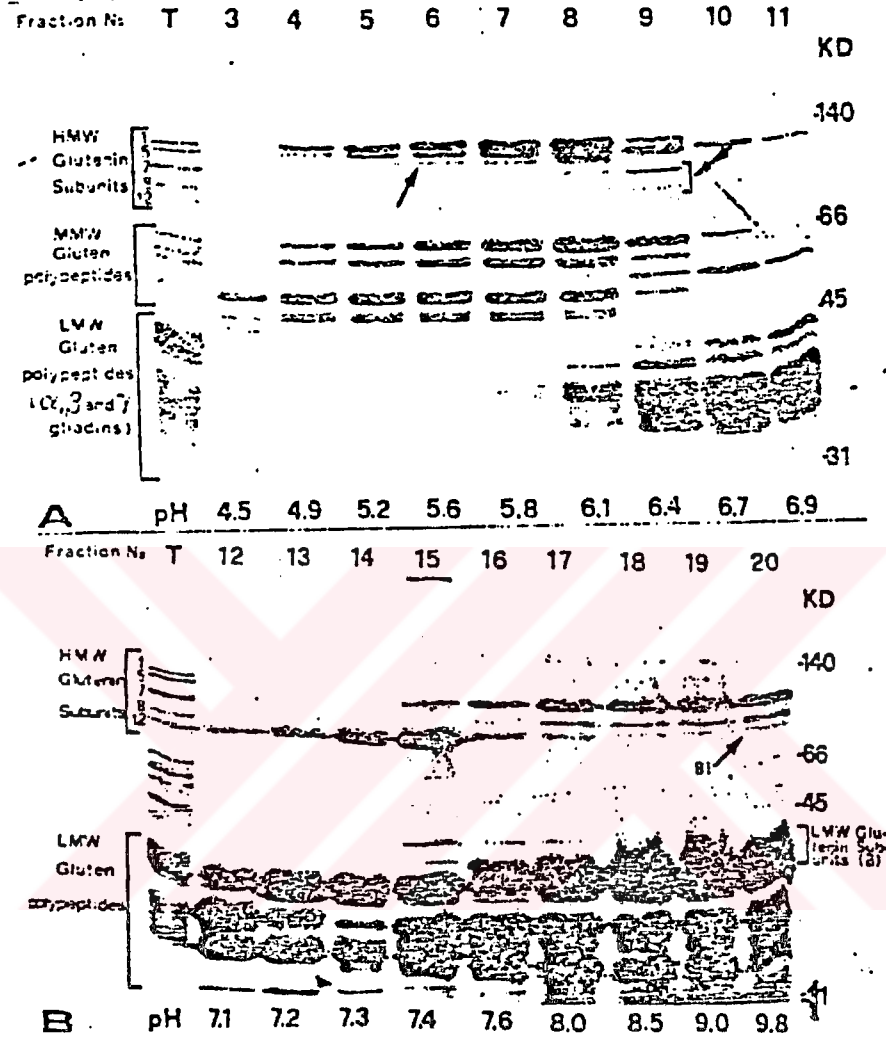
SDS-PAGE örneklerinin incelemeleri, alt birimlerin türlerine göre polipeptid arası S-S bağlarının reaktivitelerinin farklı olduğu izlenimini uyandırmaktadır.

Glutenin proteinlerinin ayrılmasında kullanılan bir diğer teknik *İzoelektrik Odaklama (IEF)* tekniğidir. Elektrofokaslama olarak da adlandırılmaktadır.

Proteinlerin izoelektrik noktasına göre belli bir pH'da ayrılmasında izoelektrik odaklama önemli bir metottur. Protein molekülünün net yükünün sıfır olduğu pH değeri (*pI*) izoelektrik noktadır. Bu pH'da protein molekülleri elektroforetik olarak hareket edemezler (Giulian, G.G., vd., 1984).

IEF'nin temel dezavantajları; pH gradienti oluşturmak için kullanılan sentetik taşıyıcı amfolitten kaynaklanır. Pratikte pH gradienlerinin uzun süre stabil kalması zordur. Bu durum zamanla pH gradienti ve proteinlerin katoda doğru kaymaları, gradientin bozulması ve örnek kaybı ile sonuçlanır. Buna rağmen izoelektrik odaklama duyarlılığı yüksek olan bir yöntemdir. Temelde analitik amaçlarla kullanılmasına rağmen, kromafokaslama'ya benzer şekilde preparatif amaçla da kullanılabilir (Telefoncu, A., 1996).

Bu teknikle Curioni ve ekibi (1990) glutenin proteinlerinin preparatif izoelektrik odaklanmasını gerçekleştirmiştir. Yerel buğday unundan elde ettikleri glutenin proteinlerini 1-propanol ve 6 M üre ile ekstraksiyon işlemi sırasında indirgemişlerdir. İndirgenen glutenin polipeptidlerini pH:3-10 olan Bio-Lyte amfolit ile IEF'ye uygulamışlardır. IEF 9 saat 20 W sabit güçte yürütülmüştür. Boyama Coomassie Brilliant Blue R-250 ile yapılmıştır. Başarılı bir ayırım gerçekleştirmişlerdir. Örneklerin Şekil 2.10.'da görüldüğü gibi izoelektrik noktalarına göre molekül ağırlığı bulunmuştur.

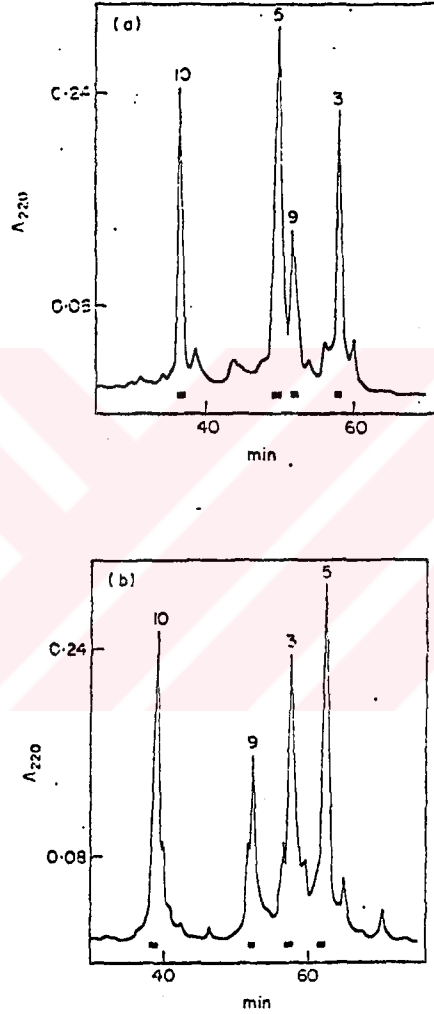


Şekil 2. 10. Buğday glutenin proteinlerinin izoelektrik odaklama yöntemi ile ayrılması ve Mw tayini.

Son zamanlarda ters-faz yüksek-performans sıvı kromatografisi (RP-HPLC) de glutenin alt birimlerini ayırmada kullanılmaktadır.

Bu teknik ile ayırmada elimizde bulunan bir çalışma da Alman araştırma grubunca yapılan çalışmadır. Rektör çeşidi buğdaydan elde ettikleri glutenin'in yüksek

molekül ağırlıklı alt birimlerinin (HMW) alkilatlanmış ve alkilatlanmamış örnekleri C₈ silikajel üzerinde preparatif RP-HPLC ile ayırmışlardır. Sonuçlar Şekil 2.11.'de gösterilmiştir (Wieser, H., vd., 1990).



Şekil 2. 11. Rektör çeşidinden glutenin'in HMW alt birimlerinin RP-HPLC.

Çözücü A; % 15 (v/v) 2-propanol / % 0.1 (v/v) trifloroasetik asit / N₂

Çözücü B; % 80 (v/v) asetonitril / % 0.1 (v/v) trifloroasetik asit / N₂

(a) Alkilatlanmamış alt birimler

(b) Pridiletilatlı alt birimler

(Toplanan kromatoğram parçaları siyah çubuklarla belirtilmiştir.)

Hem alkilatlı, hem de alkilatlanmamış örneklerin dört önemli komponente ve çeşitli önemsiz komponentlere sahip olduğu görülmüştür. Alkilatlı alt birimler, alkilatlanmamış alt birimlere göre daha düşük asetonitril konsantrasyonlarıyla elde edilmiştir. Alkilatlı alt birimler 10, 9, 3 ve 5 (Şekil 2.11.(b)) sırasında elue edildiği halde alkilatlanmamış alt birimler 10, 5, 9 ve 3 (Şekil 2.11.(a)) sırasında elue edilmiştir.

2.2.8. Protein Elektrofrez Verilerinin Tarımda Değerlendirilmesi ve Bilimsel Açıdan Önemi

Canlıların yapısında bulunan proteinler yapı proteinleri, depo proteinleri, enzimler, hormonlar, immunolojik proteinler gibi farklı şekillerde bulunmaktadır. Hububat depo proteinleri ise değişime uğramadan endospermde depolandıklarından, bitkinin kalıtsal özelliklerini direkt olarak yansıtır. Yani depo proteinlerindeki aminoasit diziliş sırası, DNA'daki baz diziliş sırasına bağlıdır. Genetik yönden farklı bir bireyin, çeşidin ve ırkın kendine özgü protein imzası (finger print) vardır. Böylece depo proteinlerinin incelenmesiyle ortaya çıkan bilgiler o çeşidin genetik olarak tanınmasında parmak izi olarak kullanılabilir.

Çeşitler arasında ayırım yapabilen yöntemler yaklaşık on yıldan beri bilinmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan yöntem, poliakrilamid jel elektrofrez yöntemidir.

Elektrofrez teknikleri özellikle buğday taneleri içindeki özdeşliğin belirlenmesinde yararlı olmaktadır. Bu nedenle de hasattaki tanelerin kaliteli tipini belirlemede ve tohum üretiminde, tohumun saflığı ve farklı tiplerin yapısını belirlemede kullanılır (Wringley, C.W., vd.,1991).

Tohum depo proteinleri 4 ana bölgede genetik marker olarak kullanılmaktadır (Stoyanova, S.D., Kolev, K.D., 1996).

- Çoğalmalar arasındaki ve içindeki genetik farkın analizi,
- Üreme ve genetik koruma ilişkisiyle bitki evcilleştirilmesi,
- Genome akrabalıkları,
- Bitki yetiştirilmesinde bir araç olarak.

Moleküler seviyede buğday endosperminin kimlik tespiti ve genetik yapısının belirlenmesi için gliadin elektroforezi bir metod olarak kabul edilmiştir.

Stoyanova (1996) Bulgaristan da ekimi yapılan buğdayların elektroforetik örnekleri kullanılarak biyokimyasal seviyede genetik çeşitliliği belirlemiştir. Gliadin proteinleri % 70'lik etanol ile ekstrakte edilmiş ve (pH 3.1) Asit poliakrilamid jel elektrofozi (A-PAGE) ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Gliadinler 3 mm'lik bir kalın yatay tabakada, 20 °C' de, 7 saatte, kuyucuk başına 5 mA'lik akımda elektroforeze tabi tutulmuşlardır.

Çeşit belirlenmesi gliadin elektroforezi dışında izoenzim elektroforezi ile de yapılmaktadır. Çok sayıda izoenzim sistemi bitkiler arasındaki genetik, biyokimyasal, fizyolojik v.b. farklılıkları kalitatif ve kantitatif olarak belirlemede kullanılmaktadır. Yine HPLC tekniğide çeşit belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Gliadin elektroforezinde olduğu gibi glutenin, albumin ve globulin elektroforezinden de çeşit ayırımında yararlanılabilir. Fakat albumin ve globulin daha çok tür ayırımında kullanılır. Glutenin ise elektroforezden önce alt birimlerine ayrılması gerektiğinden daha az kullanım sahası bulunur (Bietz, J.A., 1987).

Tıpta allerjik astımın bir şekli olan ve meslek hastalığı olarak tanımlanan baker's astımına sebep olan buğday tanesi allerjenlerini belirlemede izoelektrik odaklama ve yatay sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi sonuçlarından yararlanır (Weiss, W., vd., 1993). Glutenin sindiriminden kaynaklanan bir hastalık olan coeliac hastalığındaki buğday proteininin kimliğini belirlemede de SDS-PAGE kullanılmıştır (Penttila, I.A., vd., 1991).

3. MATERYALLER VE METODLAR

3. 1. MATERYALLER

3. 1. 1. Kullanılan Buğday Örnekleri

Materyal olarak kullanılan *Atilla-12*, *Bezostaya-1*, *Kate A-1*, *Pehlivan Prostor* çeşiti ekmeklik buğdaylar Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden öğütülmüş, unları halinde temin edilmiştir.

3. 1. 2. Kullanılan Kimyasallar

- Akrilamid: C_4H_5ON (Merck)
- Amfolit pH 3-10 (Fluka)
- Amonyumpersülfat: $N_2H_8 S_2O_8$ (Merck)
- Asetik asit: $C_2H_4O_2$ (Merck)
- Bakır Sülfat: $CuSO_4$ (Atabay)
- Bromofenol: $C_{19}H_{10}O_5Br_4S$ (Merck)
- n-Bütanol: $C_4H_{10}O$ (Merck)
- Coomassie Brilliant Blue R-250: (Karlan)
- Dializ Tüpü (Sigma)
- Etanol: C_2H_6O (Merck)
- EDTA: $C_{10}H_{16}O_8N_2$ (Atabay)
- Folin Ciocalteu Reaktifi: $C_{10}H_5NaO_5S$ (Sigma)
- Gliserin: $C_3H_8O_3$ (Atabay)
- β -Laktoglobulin (Sigma)
- Lipaz (Sigma)
- 2-Merkaptoetanol: C_2H_6OS (Sigma)

- N,N'-Metilenbisakrilamid: $C_7H_{10}O_2N_2$ (Sigma)
- Sephadex G-200 (Sigma)
- Sığır Serum Albumini (Sigma)
- Silikajel G-60 (Merck)
- SDS: $C_{12}H_{25}O_4S$ (Merck)
- Sodyum Hidroksit: NaOH (Merck)
- Sodyum Potasyum Tartarat: $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ (Merck)
- Sodyum Sülfid: Na_2SO_3 (Merck)
- Sülfirik asit: H_2SO_4 (Merck)
- TCA: $C_2HCl_3O_2$ (Merck)
- TEMED: $C_6H_{16}N_2$ (Karlan)
- Tripsinojen (Sigma)
- Tris HCl: $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ (Sigma)
- Üre: $C H_4ON_2$ (Merck)

3. 1. 3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Santrifüj: MSE MS 60 Sanyo Ultrasantrifüj
- UV Spektrofotometre: Shimadzu UV-160A
- pH metre: Jenway 3010 pH meter
- Vortex: Fisons
- Isıtıcı ve Manyetik Karıştırıcı: Kermanlar
- Terazî: Gec Avery
- Shaker: Clifton
- Mikropipet: Volac (50 μ l, 500 μ l, 1000 μ l)
- Elektroforez: Hoeffler (SE 600 Vertical Slab Electrophoresis)
- Güç Kaynağı: Hoeffler (PS 500xT PC. Power Supply)
- Taraklar: 15 örnek kuyusu olan

- Scanning Dansitometre: Hoefffer (GS 300)
- Bilgisayar: Pentium 166 MMX

3. 1. 4. Kullanılan Çözeltiler

1-Propanol ile Ekstraksiyon için ;

- % 50 (v/v) 1-Propanol çözeltisi
- 1 ml 2-merkaptoetanol çözeltisi

6 M Üre ile Ekstraksiyon için;

- % 50 (v/v) 1-Propanol çözeltisi
- 1 ml 2-merkaptoetanol çözeltisi
- 1 mM EDTA çözeltisi
- 6 M Üre çözeltisi
- 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 8)

Kolon Tampon Çözeltisi için;

- 3 M Üre
- 10 mM Tris-HCl (pH 8)

Protein Örneklerinin Deriştirilmesi için;

- % 3 (w/v) Na₂SO₃ çözeltisi
- % 0.2 (v/v) H₂SO₄ çözeltisi

Protein Tayini için;

- 0.1 N NaOH içinde hazırlanmış % 2 Na₂CO₃ çözeltisi
- % 0.1'lik sığır serum albumini (BSA)
- % 1 CuSO₄ çözeltisi
- % 2 Na-K tartarat çözeltisi

Elektroforez için;

- Monomer çözeltisi (% 30 T, % 27 C)
- Amonyumpersülfat (% 10'luk)
- Anot çözeltisi (0.02 M Asetik asit)
- Katot çözeltisi (0.02 M NaOH)
- Fiksatif-1 çözeltisi (% 20 TCA)
- Fiksatif-2 çözeltisi (% 40 Etanol, %10 Asetik asit, 0.25 SDS)
- Lekeleme çözeltisi (% 40 Etanol, %10 Asetik asit, % 0.125 Coomassie blue R-250)
- Leke çıkarma çözeltisi (% 40 Etanol, %10 Asetik asit)
- Bromofenol çözeltisi
- Örnek tampon çözeltisi
- Referans örneklerin çözeltisi (Sığır Serum Albumini, Lipaz, Tripsinojen, β -Laktoglobulin)
- Buğdayların örnek tampon çözeltileri
- Referansların örnek tampon çözeltileri
- Amfolit (pH:3-10)

3. 2. METODLAR

3. 2. 1. Buğday Örneklerinin Hazırlanması Metodu

Biz bu çalışmada hem buğdaydaki glutenin proteininin ve cinsinin belirlenmesi, hem de farklı buğday cinsleri veya hibrit türleri arasındaki glutenin proteini farklılıklarını görmek amacıyla buğday gluten proteinlerini Poliakrilamid jellerde, İzoelektrik Odaklama (IEF) metoduyla, izoelektrik noktasına göre ayırdık. Bu amaçla Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nce bölgemizde yaygın olarak ekildiği belirlenen beş farklı ekmeclik buğday unlarından glutenin proteinleri A. Curioni ve arkadaşlarının (1990) İtalya'da yapılmış çalışmaları esas alınarak elde edilmiş ve İzoelektrik Odaklama'ya uygulanmıştır.

İlk olarak unlardan gluten proteinleri elde edilir. Tartımı yapılan unların yağları 10 hacim n-bütanol ile ekstrakte edilerek uzaklaştırılır ve havada kurutulur. Kuru unlar bidestile su ile sürekli yıkanır. Böylece çözünebilen nişasta ve albumin proteinleri hamurdan uzaklaştırılır ve gluten proteinleri elastik, yapışkan bir formda hamurdan ayrılır.

3. 2. 2. Glutenin Proteinlerinin İndirgenme Metodu

Disülfid bağları, proteinlerin strüktürünü oluşturan güçlü kovalent bağlardan biridir. Zincir içi veya zincirler arasında bulunabilen bu bağlar, proteinlerin yapısında katlanmalara neden olarak aktif merkezi oluşturan amino asitlerin düzenlenmesinde rol oynarlar. Ayrıca, disülfid bağları yapısal çalışmalarda bazı karmaşalara neden olabileceğinden uygun türevlerine dönüştürülerek stabilize edilmelidir.

Disülfid bağlarında indirgeme; denatüre olmuş proteinlerin hafif alkali pH da ve oksijensiz ortamda düşük molekül ağırlıklı bir tiol bileşenin aşırıyla muamelesine dayanır. Tiol reaktifleri olarak; sistein, 2-merkaptotilamin, glutation,

ditiyotritol ve 2-merkaptolanol kullanılır. Siyanat iyonları uzaklaştırılmış, 8-10 M üre çözeltileri reaksiyon için en iyi ortamdır (Telefoncu, A., 1988).

Proteinlerin indirgenme reaksiyonunu aşağıdaki gibi gösterebiliriz.



Glutenin proteinleri arasındaki S-S köprüleri 2-merkaptolanol tarafından ekstraksiyon sırasında indirgenmiştir.

3. 2. 3. Glutenin Proteinlerinin Ekstraksiyon Metodu

Glutenin proteinleri hamurdan iki şekilde ekstrakte edilmiştir.

3. 2. 3. 1. 1-Propanol ile Ekstraksiyon

Gluten 2-merkaptolanol ve distile su içindeki % 50 (v/v)'lik 1-propanol ile ekstrakte edilir. Bu karışım oda sıcaklığında bir gece karıştırılır. 15 dakika, 10 °C'de 31.000 x g 'de santrifüjlenir. Süpernatant IEF için kullanılır (Curioni, A., vd., 1990).

3. 2. 3. 2. 6 M Üre ile Ekstraksiyonu

Gluten 2-merkaptolanol ve distile su içindeki % 50 (v/v)'lik 1-propanol ile karıştırılır. 1 mM EDTA ve 6 M üre içeren 20 mM Tris HCl tamponunun (pH 8) ilave edilir. Bu karışım 37 °C'de 2 saat karıştırılır. 15 dakika, 10 °C'de 31.000 x g 'de santrifüjlenir. Süpernatant jel filtrasyon kromatografisi (GFC) ile saflandırıldıktan sonra IEF için kullanıldı (Curioni, A., vd., 1990).

3. 2. 4. Glutenin Proteinlerinin Saflaştırılması

Glutenin proteinleri dekstran esaslı Sephadex G-200 tarafından jel filtrasyon kromatografisi (GFC) yöntemi ile saflaştırıldı. Jel geçirgenlik veya moleküler eleme gibi adlarla da anılan bu yöntem moleküler boyuta bağımlı bir seperasyon gerçekleştirmektedir.

GFC'nin temel prensibini, örnek moleküllerinin durgun faz ile mobil faz (solvent faz) arasında dağılımı oluşturmaktadır. Seperasyon olayı, kolonda bulunan porlu jel matrisi (boncuk formunda) ve çevresindeki solvent aracılığı ile meydana gelmektedir. Kolona uygulanan örnek molekülleri, porların boyutundan çok büyük ise durgun faz tarafından tutulmakta ve kolonu ilk olarak terk etmektedir. Küçük moleküller ise matrisi porlarına girmekte ve burada alıkonmaktadır. Bunu izleyen basamakta, porlar tarafından tutulan küçük moleküller diffüzyon ile ayrılmakta ve mobil fazın akışı ile ortamdan süpürülmektedir. Bu şekilde bütün moleküller azalan boyutlarına bağımlı olarak kolondan elüe olmaktadır.

GFC'de kullanılan materyallerin inerte olması gerekmektedir. Destek jeller olarak en çok tercih edilenler, çarpaz bağlı poliakrilamid, agaroz, dekstran veya bunların kombinasyonlarıdır. Bir uygulama için en uygun jel matrisi seçiminde fraksiyasyon aralığı, temperatur, pH ve organik solventlere karşı kararlılığı gibi çeşitli faktörler değerlendirilmelidir.

Jel kromatografisini diğer kromatografi tiplerinden ayıran karakteristik özellik, kromatografi yatağındaki durgun fazı oluşturan taneciklerin yüksüz bir jel içermesidir. Bu jel kromatografi yatağındaki solvent ile şişirilmektedir (Telefoncu, A., 1996)

3. 2. 5. Protein Tayin Yöntemi

Örneklerdeki toplam protein içeriğinin belirlenmesinde Lowry yöntemi kullanıldı. Bu yöntem protein konsantrasyonu tayininde kullanılan çok hassas yöntemlerden biridir. Kompleks inorganik tuz yapısındaki Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi peptid bağları ile alkali bakır iyonlarının koyu mavi renk oluşturmasının yanı sıra reaktif serbest veya peptid bağıyla bağlı tirozin ve triptofan ile şiddetli mavi-yeşil renk vermektedir. Yöntem aşağıdaki gibi uygulanır:

Gerekli Çözeltiler:

- *Stok Protein Çözeltisi:* % 0.1'lik serum albumini çözeltisi
- *Alkali Bakır Reaktifi:* 1ml % 1'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1ml % 2'lik sodyum potasyum tartarat ve 98 ml 0.1 N NaOH'de hazırlanmış % 2'lik Na_2CO_3 sırasıyla karıştırıldı. Her deneme için taze olarak hazırlanır.
- *Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi:* Denemelerde Merck tarafından üretilmiş, hazır Folin-Ciocalteu reaktifi (2N) kullanıldı.

Yöntemin Uygulanışı:

- Kör numune (500 μl saf su)
- Standart protein çözeltileri: Stok protein çözeltisi kullanılarak 500 μl 'de 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175, 0.200 mg protein içeren çözeltiler hazırlandı.
- Daha önce saflaştırılan ve protein tayini yapılacak olan *Bezostaya – 1*, *Pehlivan*, *Kate A-1*, *Atilla-12* ve *Prostor*'un protein çözeltilerinde protein tayinleri yapıldı. Protein tayininde yukarıdaki çözeltilerden farklı hacimlerde üçer örnek alınarak toplam hacim tamponla 500 μl 'ye tamamlandı.
- Hazırlanan bütün çözeltilere 3 ml alkali bakır reaktifi eklenip çalkalandı. 10 dakika beklenip her çözeltiliye 0.1 ml Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifinden

eklenir. Vorteks ile karıştırılıp 30 dakika beklenir. Ölçüm alınmadan önce vorteksle tekrar çalkalanarak 500 nm’de UV’de okuma yapılır.

Serum albumini ile çizilmiş olan standart protein grafiğinden yararlanarak adı geçen protein çözeltilerinin protein miktarları hesaplandı.

3. 2. 6. Elektroforetik İzoelektrik Odaklama Yöntemi

İzoelektrik odaklama proteinlerin sürekli bir pH gradientinde izoelektrik noktasına göre ayrılması temeline dayanan ideal bir methodtur. Proteinler yüklerine göre, net yüklerinin sıfır olduğu pH değerine (*pI*) kadar göç ederler ve bu noktada hareketsiz kalarak, dar bir bölgede odaklanırlar.

İzoelektrik odaklama; doğal koşullar altında jellerin sadece amfolitleri içerdikleri durumlarda, non-iyonik deterjanlar varlığında, denatüre edici koşullarda (yüksek konsantrasyonlarda üre varlığında) uygulanabilir.

Odaklama iki adımda oluşur.

I. adımda; pH gradienti oluşturulur. Amfolit olarak tanımlanan, yüksek mobiliteye sahip, sentetik poliamino-polikarboksilik asitlerin karışımları olan amfoterik bileşiklerin karışımını içeren jel polimerleştirilir. pH gradienti oluşturulmak için sisteme akım verilir. Amfolitler izoelektrik noktaların göre jelde düzenlenirler. Asidik olan anoda, bazik olan da katoda doğru ilerler.

II. adımda; örnek proteinler jele uygulanır ve yüklerine göre anoda ve katoda doğru hareket ederler. Protein, jel üzerindeki herhangi bir pH değerinde izoelektrik noktasına ulaştığında net yükü sıfır olur ve hareket etmez. Örnekte kaç çeşit protein olduğu ve izoelektrik noktaları belirlenir. Dansitometre yardımıyla daha hassas olarak jeller üzerinde transmittansları ölçülerek de belirlenebilir (Telefoncu, A., 1996).

3. 2. 7. Dansitometrik pI Tayin Yöntemi

Örneklerin ve referansların yürütüldüğü jel üzerinde görülen polipeptid bandlarının okunmasında bilgisayar bağlantılı dansitometre kullanılır. Dansitometri bilgisayara bağlanır. Okuma yapılacak jel, cam plaka üzerine alınarak dansitometrenin ilgili bölümüne yerleştirilir. Okuma işlemlerinin kaydedileceği, sonuçların değerlendirileceği ve dansitometre programının bulunduğu disket bilgisayara yerleştirilir. Dansitometri programı bilgisayarın windows 3.1 üzerinden çalıştırılarak sıfır (zero) ayarı yapılır. Jelde bulunan bütün bandların koyuluğuna göre scan'ı seçilip bandlar okunur. Bilgisayar ekranında her polipeptid bandına karşılık gelen band şiddetleri (pikler) oluşur. Elde edilen her değer kaydedilir. Bilgisayar programında yer alan fonksiyonlarına göre pikler numaralandırılır, düzenlemeler yapılır. Her bandın Rf, alanı ve % alanı bulunarak çizilecek bir grafik yardımıyla örneklerdeki bandların *pI* değerleri bulunur.

4. DENEYLER VE BULGULAR

4. 1. DENEYLER

4. 1. 1. Buğday Örneklerinden Proteinlerin Elde Edilmesi

Araştırmada 5 ekmeklik buğday (*Tr. Aestivum*) örneği kullanılmıştır. *Bezostaya-1, Atilla-12, Kate A-1, Pehlivan* ve *Prostor* tipi buğday unlarından 1g ve 10 g tartıldı. Herbirine 10 hacim n-bütanol ilave edildi ve bir gece oda sıcaklığında bekletildi. n-Bütanol'ü ekstraktlar süzülür ve havada kurutuldu. Kuru unlar yavaş akıtılan bidestile su ile sürekli karıştırıldı ve 3-4 kere yıkandı. Yıkama sonunda unlar süzülür. Gluten proteinleri elastik, yapışkan bir hal alır. 10 g tartımı alınarak elde edilen gluten proteinleri iki eşit parçaya ayrıldı. 1 g tartımı alınan örneklerden gliadin proteinlerinin uzaklaştırılması amacıyla % 70'lik etanol ilave edildi. Karışım süzülerek, çöktürler alındı. Bu şekilde elde edilen glutenin proteinlerindeki S-S köprüleri kırılmadan IEF'ye uygulandı.

4. 1. 2. Buğday Örneklerinden Glutenin Proteinlerinin Ekstraksiyonu

Buğday unlarından elde edilen hamurdan glutenin polipeptidleri iki şekilde ekstrakte edildi.

Glutenin Proteinlerinin 1-Propanol İle Ekstraksiyonu

Gluten proteinlerinin herbirine % 50'lik 100 ml 1-Propanol-distile su çözeltisi ve 1 ml 2-merkaptoetanol ilave edildi. Çöztürler bir gece buz banyosunda karıştırıldı.

Glutenin Proteinlerinin 6 M Üre İle Ekstraksiyonu

Gluten proteinlerinin diğer yarısına ise % 50'lik 100 ml 1-Propanol-distile su çözeltisi, 1 ml 2-merkaptoetanol, 1 mM EDTA ve 6 M Üre içeren 20 mM Tris-HCl (pH 8) tamponunun 30 ml'si ilave edilerek 3 saat buz banyosunda karıştırıldı.

4. 1. 3. Glutenin Proteininin Saflaştırma Aşamaları

4. 1. 3. 1. Santrifüjasyon

Gerek 1-propanol ile, gerekse 6 M üre ile ekstrakte edilen gluten proteinleri karışımları 10 °C'de 31.000xg 'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar alınarak, çökeltiler atıldı (Tablo 4. 1.).

1-Propanol ile ekstraksiyon işleminden elde edilen gluten proteini süpernatantları İzoelektrik Odaklama'da kullanılmak üzere karanlıkta -4 °C'de saklandı.

6 M üre ile ekstraksiyon işleminden elde edilen gluten proteini süpernatantları ise saflandırıldı. Önce jel filtrasyon kromatografisi uygulandı, daha sonra konsantre edilerek izoelektrik odaklama'ya tatbik edildi.

Tablo 4. 1. Buğday gluten proteinlerinin ekstraksiyon ve süpernatant hacimleri

ÖRNEKLER	EKSTRAKSİYON HACİMLERİ		SÜPERNATANT HACİMLERİ	
	1-PROPANOL	6 M ÜRE	1-PROPANOL	6 M ÜRE
Atilla-12	52.5 ml	83 ml	46 ml	78 ml
Bezostaya-1	53 ml	83 ml	47 ml	78 ml
Katea-1	55 ml	85 ml	47 ml	80 ml
Pehlivan	51 ml	81ml	44 ml	76 ml
Prostor	56 ml	86 ml	49 ml	79 ml

4. 1. 3. 2. Jel Filtrasyon Kromatografisi (GFC)

* Glutenin proteinlerinin saflaştırılmasında kullanılan bir diğer adımda jel filtrasyon kromatografisidir. GFC'ye sadece 6 M üre ile ekstrakte edilen glutenin proteinleri uygulandı.

Bu işlem için önce kolon dolgu maddesi olarak kullanılan Sephadex G-200'den 0.76 g tartılıp, 50 ml kolon tampon çözeltisi (3 M üre içeren 10 mM Tris-HCl pH 8) ilave edilerek 1 gece şişmesi için oda sıcaklığında bekletildi.

Kolonun (1x30 cm) ağzı biraz cam pamukla tıkandı. Cam pamuk bir miktar tampon ile ıslatılarak havası alındı. Bir gün önceden hazırlanan Sephadex G-200 ve tampon karışımı kolona döküldü. Jelin oturuşması için 1,5-2 saat bekletildi. 50 ml'lik tampon çözeltisi ile jel yıkandı. Tampon kolondan iyice alındıktan sonra protein örneklerinin 1.5 ml'si kolona uygulandı. Proteinler kolona uygulanır uygulanmaz musluk açılarak proteinin jele geçmesi sağlandı. Proteinler jele tamamen geçtikten sonra devamlı olarak tampon ilave edildi ve kolonun ağzının kurumamasına dikkat edildi. Kolondan proteinler 3 ml'lik fraksiyonlar halinde cam tüplere alındı.

Spektrofotometre'de 280 nm'de absorbans veren protein fraksiyonları toplandı.

4. 1. 3. 3. Glutenin Proteinlerinin Deriştirilmesi

Kolon kromatografisinden elde edilen glutenin polipeptid fraksiyonlarının 280 nm'de ölçülen absorbansları sonunda uygun olan fraksiyonlar birleştirilerek deriştirildi.

Bu aşamada 1 cm çapındaki dializ torbaları kullanıldı. Dializ torbalarından yaklaşık 10 cm uzunluğunda kesildi ve kullanım için hazırlandı. Bu amaçla torbalar 3-4 saat akan musluk suyu altında tutuldu. 80 °C'de ısıtılmış % 0.3 (w/v) Na₂SO₃ içinde 1 dakika bekletildi. 60 °C'deki sıcak su ile yıkandı. Sonra 2 dakika % 0.2 (v/v) H₂SO₄ çözeltisi içine atıldı. Sıcak su ile asitlik gidinceye kadar tekrar tekrar yıkandı. 5-10 dakika bidestile su içinde bekletildi.

Dializ torbaları kullanım için hazırlandıktan sonra alt kısmı sıkıca bağlandı. Deriştirilecek protein fraksiyonları dializ torbalarına boşaltılarak üst kısımda bağlandı. – 4 °C’de hacmi 1-2 ml kalıncaya kadar deriştirildi. Tablo 4. 2. ’de deriştirme sonunda kalan protein hacimleri verilmiştir.

Tablo 4. 2. Deriştirme sonunda elde edilen glutenin proteini hacimleri

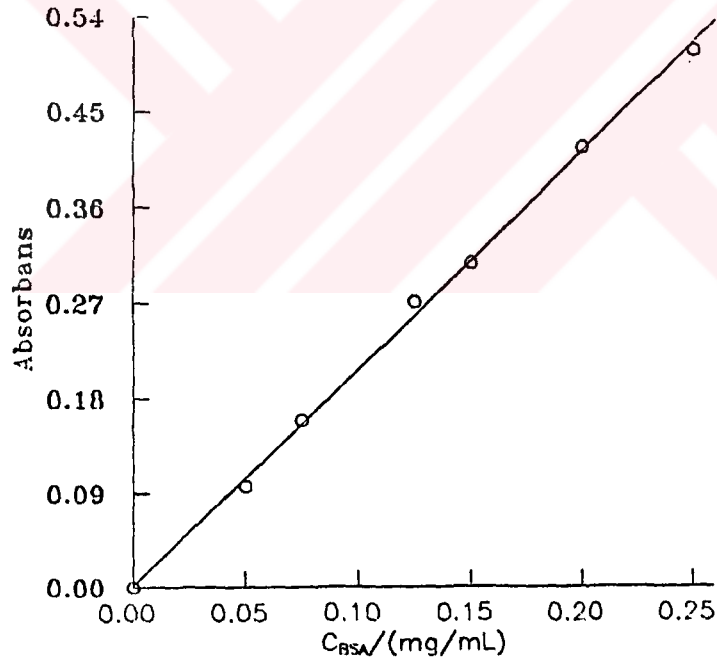
ÖRNEKLER	DERİŞTİRİLEN PROTEİN HACMİ	DERİŞTİRME SONUNDA PROTEİN HACMİ
Atilla-12	19 ml	10.5 ml
Bezostaya-1	25 ml	15 ml
Kate A-1	22 ml	11.5 ml
Pehlivan	22 ml	11 ml
Prostor	22 ml	12 ml

4. 1. 4. Lowry Metoduna Göre Örneklerin Protein Tayini

% 0.1’lik sığır serum albumininin (BSA) değişik konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanları arasında çizilmiş olan standart protein grafiği ve Lowry metodu kullanılarak 1-propanollü, ürel ve kolon sonrası elde edilen *Atilla – 12*, *Bezostaya – 1*, *Kate A – 1*, *Pehlivan* ve *Prostor*’un protein içeriği mg/ml olarak bulunmuştur.

Tablo 4. 3. Değişen BSA konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanlar

BSA Konsantrasyonları (mg/ml)	Absorbans ($\lambda = 500$ nm)
0	0.000
0.050	0.097
0.075	0.160
0.125	0.271
0.150	0.307
0.200	0.415
0.250	0.507



$$C_{BSA} = K \times ABS + B \quad (K = 487.94; B = -1.0163)$$

Şekil 4. 1. % 0.1 sığır serum albumini kullanılarak elde edilen standart protein grafiği

Örneklerde bu yolla bulunan gluten protein miktarları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4. 4. Seçilen buğday örneklerinde glutenin proteini içerikleri

ÖRNEKLER	PROTEİN İÇERİĞİ (mg/ml)		
	1-PROPANOL	ÜRE	GFC SONUNDA
Atilla-12	2.175	5.022	7.364
Bezostaya-1	1.844	4.436	4.534
Katea-1	1.170	4.045	4.924
Pehlivan	1.756	4.144	5.510
Prostor	1.844	4.290	5.461

4. 1. 5. İzoelektrik Odaklama (IEF)'nin Uygulanması

İzoelektrik odaklama Hoeffler SE 600 Dikey Dilim Jel Elektroforez Ünitesi ile yapılmıştır. Bu üniteye 1.5 mm kalınlığında 14 x 16 cm ebatındaki bir jelde yapılan ayırmada standart protein örnekleri ile birlikte *Atilla - 12*, *Bezostaya - 1*, *Kate A-1*, *Pehlivan*, ve *Prostor* buğdaylarından elde edilen glutenin proteinlerinin örnekleri uygulanmıştır. Çift jel dökülmüş, işlem 4 saat sürmüştür. Standartların *pI* 'ları ile jel üzerindeki yürüme oranı *Rf* arasında grafik çizilir. Bu grafikten faydalanılarak yukarıda belirtilen örneklerin protein bandlarının *Rf* değerlerine karşılık gelen *pI* değerleri bulunur.

İzoelektrik odaklamada kullanılan stok çözeltiler;

- **Monomer çözeltisi (%30 T, % 27 C)**

Akrilamid	29.2 g
Bis	0.8 g
H ₂ O	100 ml
4 °C'de karanlıkta saklandı.	

- **Amonyumpersülfat çözeltisi**

(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	0.5 g
H ₂ O	5 ml

- **Anot çözeltisi (0.002 M Asetik asit)**

Glasiyal asetik asit	4.6 ml
H ₂ O	4 lt

- **Katot çözeltisi (0.002 M NaOH)**

NaOH	40 ml (1M)
H ₂ O	2 lt

- **Fiksatif – 1 (% 20 TCA)**

TCA	40 g
H ₂ O	200 ml

- **Fiksatif – 2 (% 40 Etanol, % 10 Asetik asit, 0.25 SDS)**

Etanol	200 ml
Asetik asit	50 ml
SDS	1.25 g
H ₂ O	500 ml

- **Lekeleme çözeltisi (% 40 Etanol, % 10 Asetik asit, % 0.125 Coomassie Brilliant Blue R – 250)**

Etanol	40 ml
Asetik asit	10 ml
Coomassie Brilliant Blue	12.5 ml (%1)
H ₂ O	100 ml

- **Leke çıkarma çözeltisi (% 40 Etanol, % 10 Asetik asit)**

Etanol	200 ml
Asetik asit	50 ml
H ₂ O	500 ml

- **Bromofenol mavisi**

Bromofenol	0.05 g
H ₂ O	10 ml

A – Örnek Tamponunun Hazırlanması

3.5/10 Doğal

H ₂ O	790 µl
Gliserin	150 µl
Amfolit	60 µl

B – Jelin Hazırlanması

3.5/10 Doğal

H ₂ O	1.48 ml
Gliserin	4.8 ml
Monomer çöz.	8.8 ml
Amfolit (3.5-10)	2.8 ml

Bunlar katıldıktan sonra 15 dakika vakum yapılır.

TEMED	92 µl
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	200 µl

C – Referans Proteinlerin Hazırlanması

Burada referans olarak kullanılan *Sığır Serum Albumini*, β – *Laktoglobulin*, *Lipaz* ve *Tripsinojen*'den 0.001 g tartılarak 200 μ l su içinde çözüldü.

D – Örneklerin Elektroforeze Hazırlanması

Referanslar da dahil olmak üzere buğday gluten proteinleri örneklerinin herbirinden 100 μ l alınıp, 100 μ l örnek tamponu ve 2 μ l Bromofenol mavisini katılmıştır.

4. 1. 6. Jellerin Hazırlanması ve Örneklerin Uygulanması

Cam plaka sandviçleri hazırlanırken 1.5 mm'lik ayarlık ayarlayıcılar kullanıldı. Aralık ayarlayıcılar cam plakalar arasında ve kenarlarda olacak şekilde yerleştirilip tepelerinden düzeltildi. Daha sonra sıkıştırıcılar yardımıyla sıkıştırılıp, döküm desteğindeki yerine yerleştirildi.

Hazırlanan jeller sandviçlerin içine dolduruldu ve taraklar batırıldı. Bir süre bu şekilde bekletilerek jellerin polimerize olması sağlandı. Taraklar çıkarılarak su ile örnek kuyuları durulandı. Her kuyunun suyu tamamen alındı. Örnekler uygulanmadan jel kuyularına ve üst tanka katot çözeltisi, alt tanka da anot çözeltisi konularak 200V'da 15 dakika ön yürütme yapıldı. Kuyular tekrar su ile durulanıp, örnekler uygulandı.

4. 1. 7. Jellerin Yürütülmesi

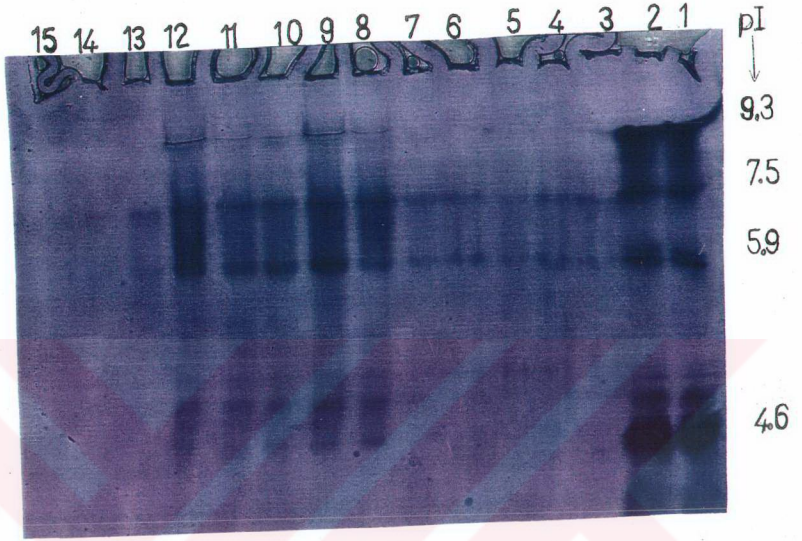
Jellerin yürütülmesinde alt tampon kabına 4 lt anot çözeltisi doldurulup ısı değiştiriciler yerleştirildi. Magnetik karıştırıcı konularak karıştırma esnasında soğutma da sağlanmış oldu.

Alt tanka ise katot çözeltisi dolduruldu. Daha önceden örneklerin ve referansların uygulandığı jel yerine yerleştirilip, düzenek güç kaynağına bağlandı. 400 Volt'da yürütme yapıldı. Yürütme işlemi 4 saat devam etti.

4. 1. 8. Jellerin Boyanma İşlemleri

Yürütme işleminden sonra jeller kama yardımıyla çıkarılıp uygun bir kaba alındı. Fiksatif-1'in 100 ml'sini bulunduran bir kaptaki 5-10 dakika çalkalandı. Jeller dikkatlice kabın dışına alındı. Bu noktada jeller serttir. Ardından Fiksatif-2'nin 100 ml'si içinde 5-10 dakika çalkalandı. Sonra leke çıkarma çözeltisi ile 15 dakika daha çalkalandı. Bu çözeltiden sonra lekeleme çözeltisi içinde bir gece çalkalanılarak bekletildi ve tekrar leke çıkarma çözeltisi içine konuldu. Şekil 4. 2. ve Şekil 4. 3.'de IEF ile ayrılan protein bantları verilmiştir.





Şekil 4. 2. 1 .Jelin fotoğrafı

1, 2: Standartlar (Siğır Serum Albumini, β -Laktoglobulin, Lipaz, Tripsinojen)

3: Propanollü Atilla-12

4: Propanollü Bezostaya-1

5: Propanollü Kate A-1

6: Propanollü Pehlivan

7: Propanollü Prostor

8: Üreli Atilla-12

9: Üreli Bezostaya-1

10: Üreli Kate A-1

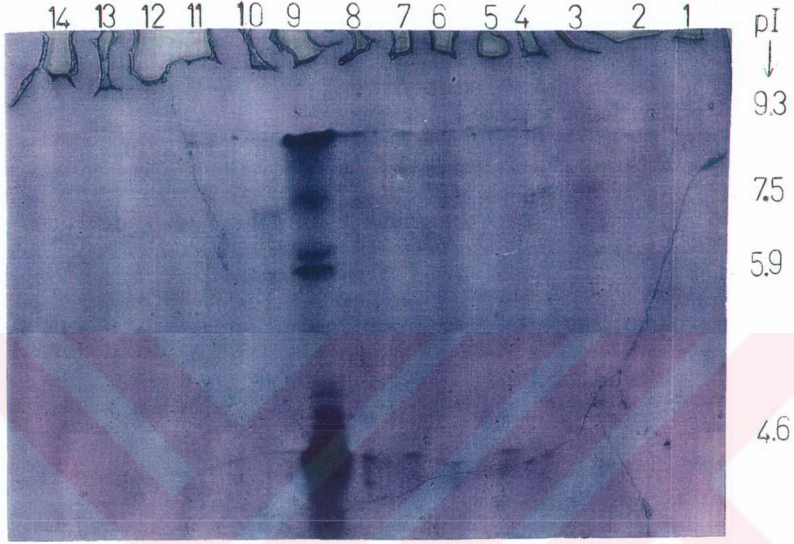
11: Üreli Pehlivan

12: Üreli Prostor

13: Saflaştırılmış Atilla-12

14: Saflaştırılmış Bezostaya-1

15: Saflaştırılmış Kate A-1



Şekil 4. 3. II . Jelin Fotoğrafi

1: Saflaştırılmış Kate A-1

2: Saflaştırılmış Pehlivan

3: Saflaştırılmış Prostor

4: Ham Atilla-12

5: Ham Bezostaya-1

6: Ham Kate A-1

7: Ham Pehlivan

8: Ham Prostor

9: Standartlar

10: Saflaştırılmış Atilla-12

11: Saflaştırılmış Bezostaya-1

12: Saflaştırılmış Kate A-1

13: Saflaştırılmış Pehlivan

14: Saflaştırılmış Prostor

4. 2. BULGULAR

4. 2. 1. GFC ve Dializ Bulguları

Jel filtrasyon kolonlarından elde edilen 6 M üre içeren glutenin fraksiyonları 280 nm'de ölçülerek, protein bulunan fraksiyonlar birleştirildi ve aşağıda verilen miktarlarda fraksiyon hacmi elde edildi.

Tablo 4. 5. 6 M Üreli ekstraktın GFC sonunda 280 nm'de ölçülen glutenin proteini fraksiyon hacimleri

ÖRNEKLER	GFC'DEN TOPLANAN	DERİŞTİRİLEN
	HACİM	HACİM
Atilla-12	33 ml	21 ml
Bezostaya-1	36 ml	27 ml
Kate A-1	39 ml	24 ml
Pehlivan	33 ml	24 ml
Prostor	33 ml	24 ml

Glutenin proteini içeren bu çözeltiler GFC sonunda oldukça seyrelmiş olarak elde edildiğinden elektroforeze uygulanmadan önce protein yapıları korunarak konsantre edilmesi amacıyla soğukta dializ tüpleri ile silikajel G-60'dan yararlanıldı. Yaklaşık olarak her bir örnek 1/10 hacme düşürülerek birim hacmin protein içeriği artırıldı.

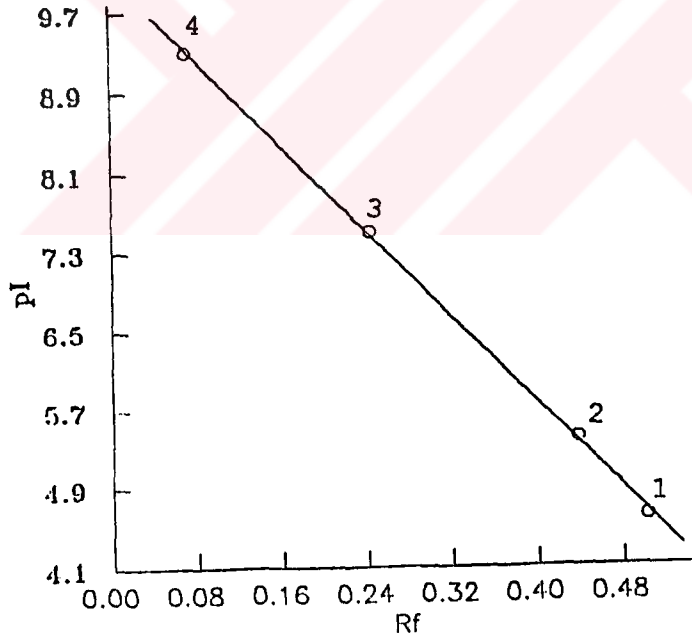
4. 2. 2. Standart pI Grafiğinin Eldesi

Leke çıkarma çözeltisinden çıkarılan jeller, bilgisayar bağlantılı dansitometrede okunarak protein bantları pik olarak görüntülendi. Rf değerleri tespit

edilerek standartlar yardımıyla izoelektrik noktaları (pI) bulundu. Tablo 4. 5. ve Şekil 4. 4.'de kullanılan standartlar ve pI değerleri verilmiştir.

Tablo 4. 6. IEF'de kullanılan standartlar, pI , M_w ve R_f değerleri.

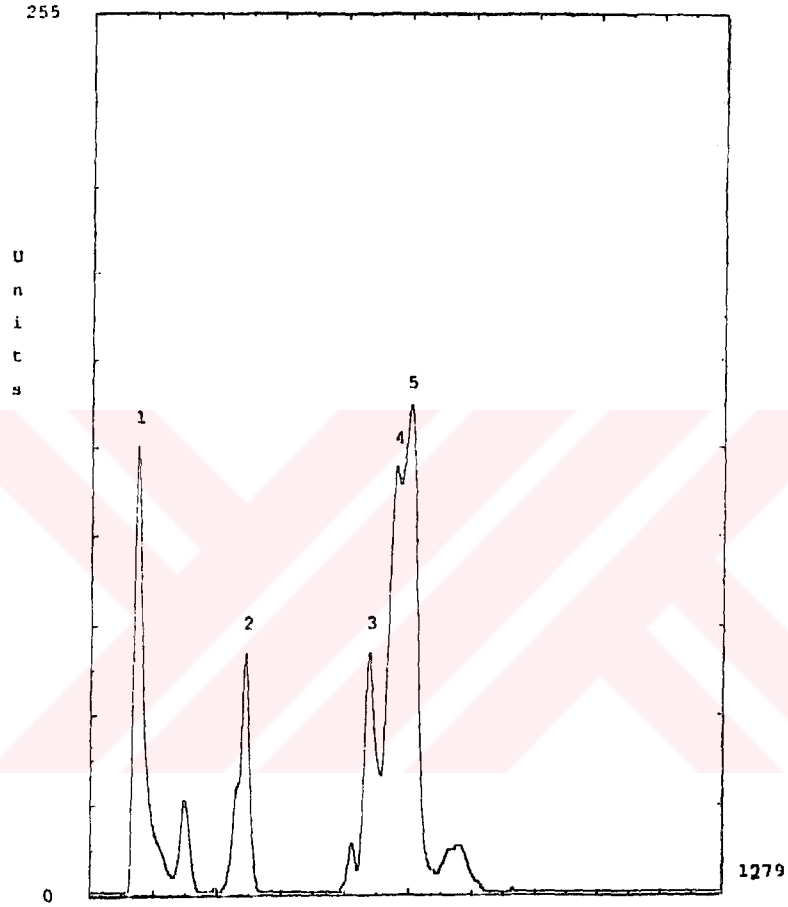
Pik No	STANDARTLAR	pI	M_w	R_f
1	BSA	4.6	66000	0.502
2	2-laktoglobulin	5.9	18400	0.437
3	Lipaz	7.5	52000	0.243
4	Tripsinojen	9.3	24000	0.071



Şekil 4. 4. İzoelektrik Odaklama (IEF)'de kullanılan standartların R_f değerleri ile pI 'lerinin değişimi.

4. 2. 3. Jellerin Dansitometrik Değerlendirilmesi

4. 2. 3. 1. Standartların Rf, pI ve Pik Alanlarının Bulunması



Şekil 4. 5. IEF ile ayrılan standartların dansitometreden elde edilen band şiddetleri

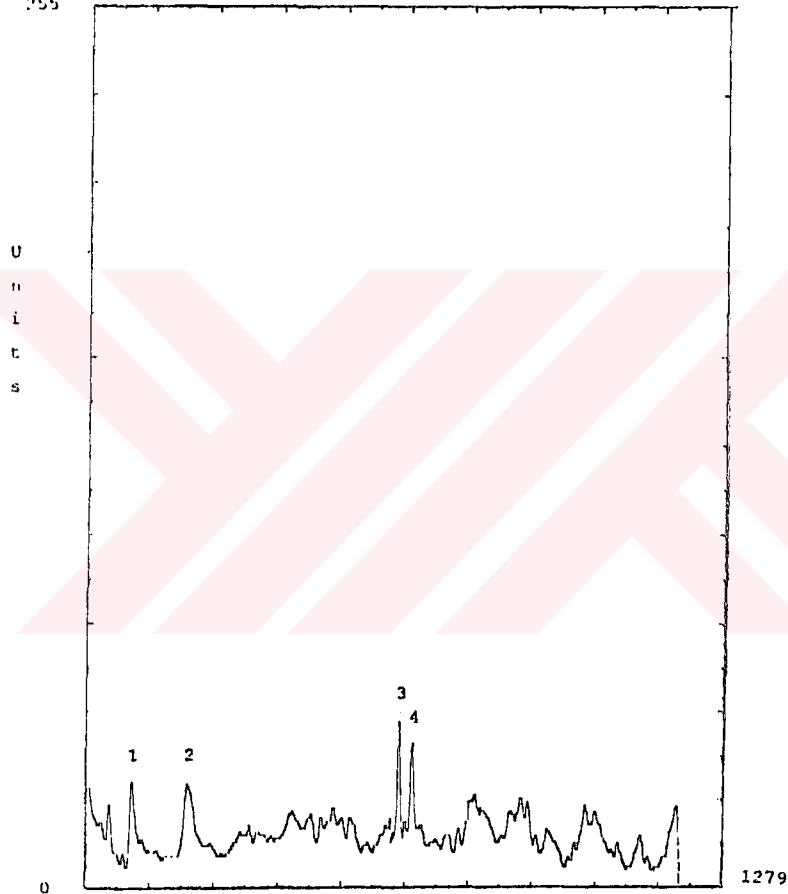
Tablo 4. 7. Standart proteinlerin % alan, Rf, alan ve pI şiddetleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	18.6	0.070	9.34	3282
2	10.3	0.243	7.46	1804
3	12.6	0.437	5.36	2226
4	17.4	0.480	4.89	3069
5	37.4	0.502	4.65	6583

4. 2. 3. 2. Örnek Proteinlerin Rf, pI ve Pik Alanlarının Bulunması

4. 2. 3. 2. 1. Ham Glutenin Proteinlerinin Rf, pI ve Pik Alanlarının Bulunması

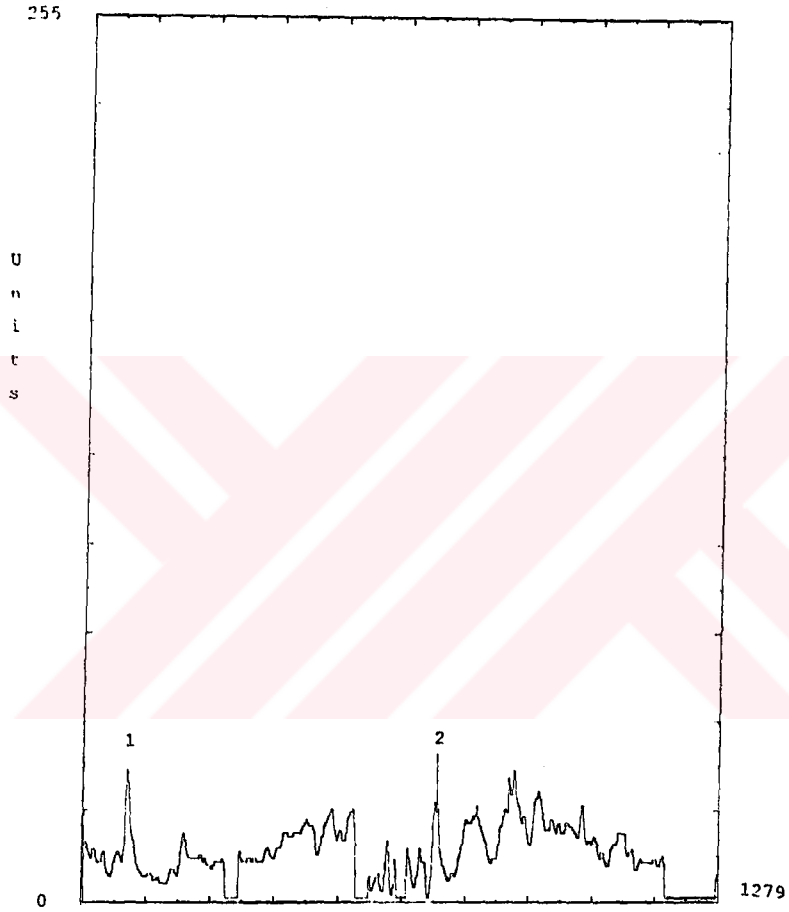
Ham Atilla-12



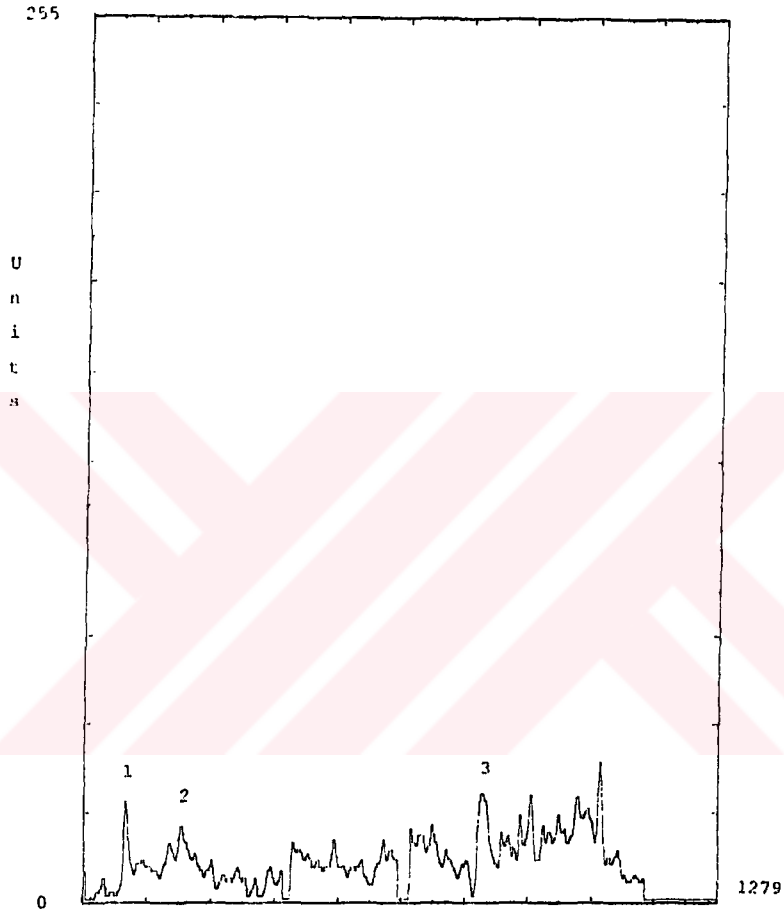
Şekil 4. 6. Ham Atilla-12 glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 8. Ham Atilla-12 glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

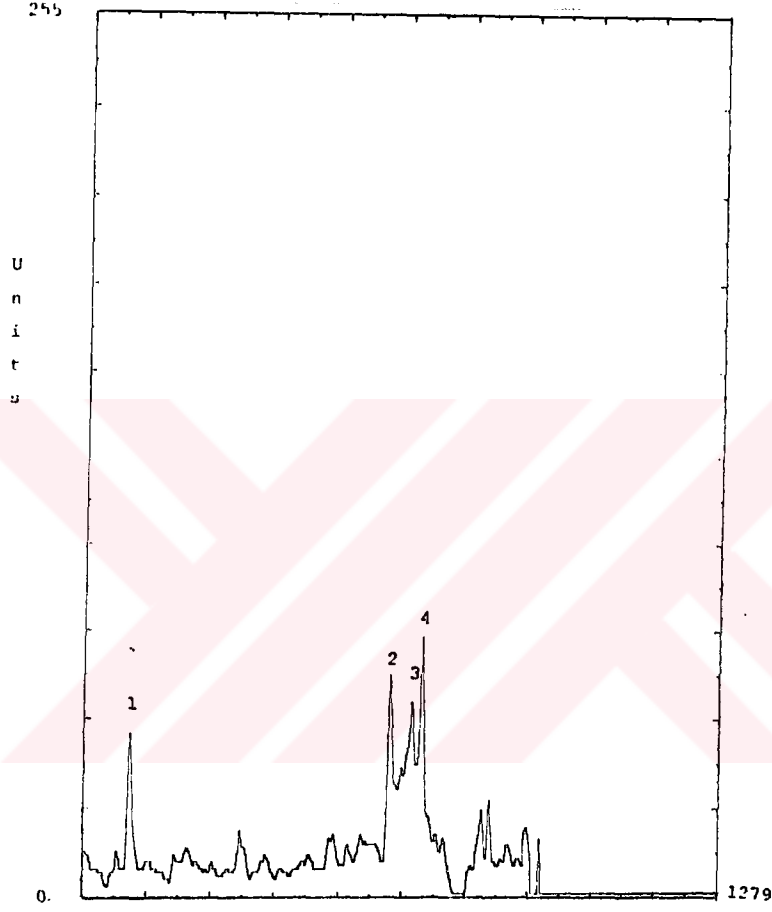
Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	12.5	0.069	9.35	2110
2	8.9	0.157	8.40	1505
3	33.1	0.491	4.77	5593
4	9.3	0.511	4.55	1571

Ham Bezostaya-1**Şekil 4. 7. Ham Bezostaya-1 glutenin proteinlerinin band şiddetleri****Tablo 4. 9. Ham Bezostaya-1 glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri**

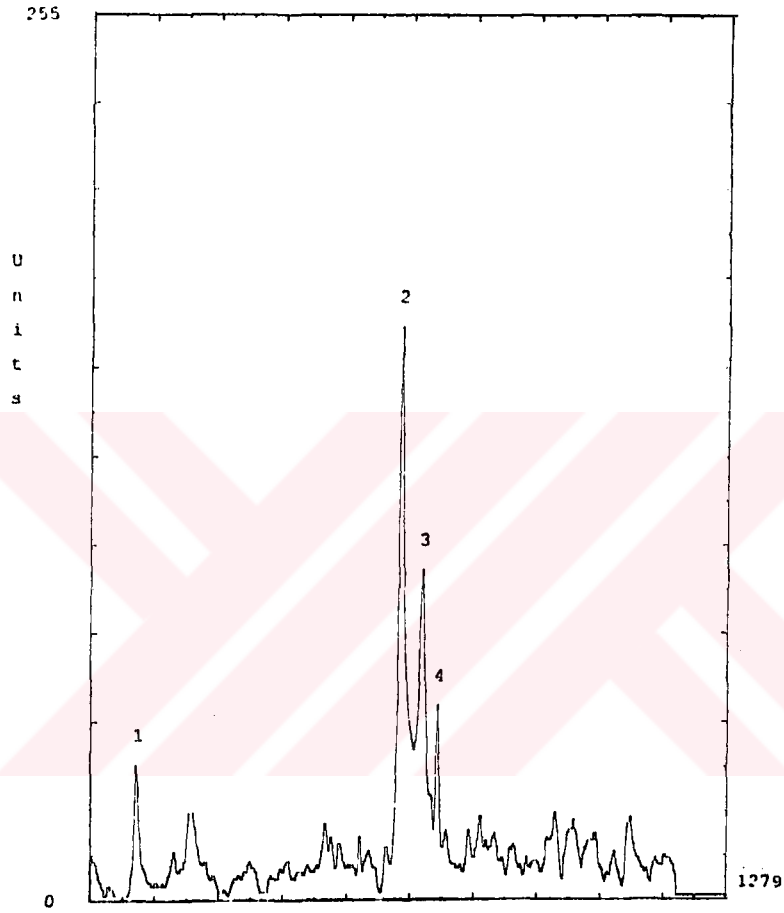
Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	43.8	0.067	9.37	6755
2	7.7	0.554	4.09	1187

Ham Kate A-1*Şekil 4. 8. Ham Kate A-1 glutenin proteinlerinin band şiddetleri**Tablo 4. 10. Ham Kate A-1 glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri*

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	8.4	0.063	9.42	1160
2	16.1	0.150	8.47	2225
3	37.3	0.629	3.27	5155

Ham Pehlivan**Şekil 4. 9. Ham Pehlivan glutenin proteinlerinin band şiddetleri****Tablo 4. 11. Ham Pehlivan glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri**

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	13.7	0.070	9.34	1600
2	40.5	0.480	4.89	4727
3	13.9	0.515	4.51	1622
4	31.8	0.530	4.35	3714

Ham Prostor

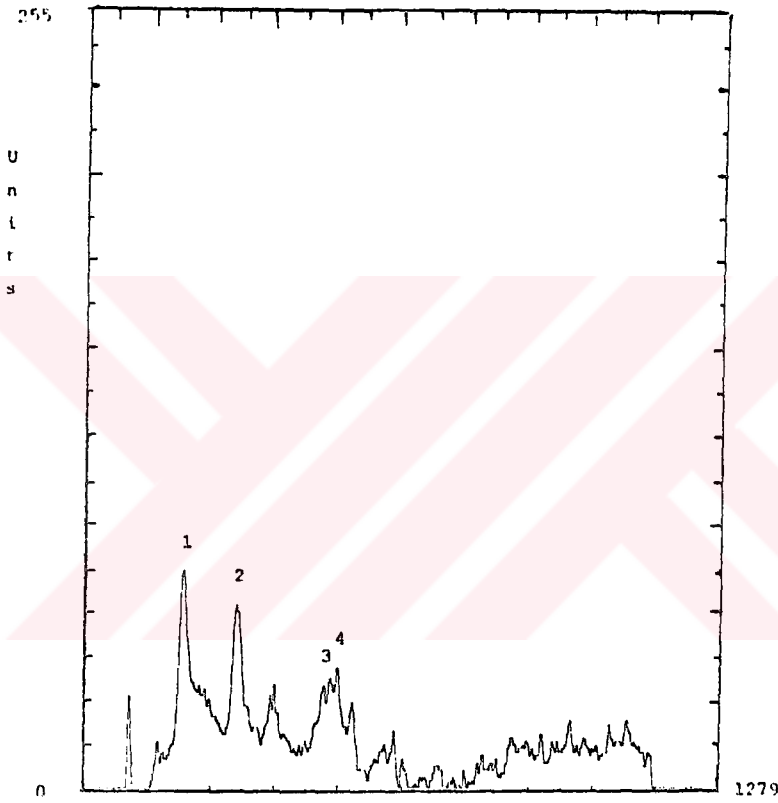
Şekil 4. 10. Ham Prostor glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 12. Ham Prostor glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	12.5	0.069	9.35	1976
2	34.6	0.485	4.84	5485
3	13.5	0.519	4.47	2138
4	39.4	0.544	4.20	6245

4. 2. 3. 2. 2. 1-Propanol ile Ekstrakte Edilen Buğday Glutenin Proteinlerinin Rf, pI ve Pik Alanlarının Bulunması

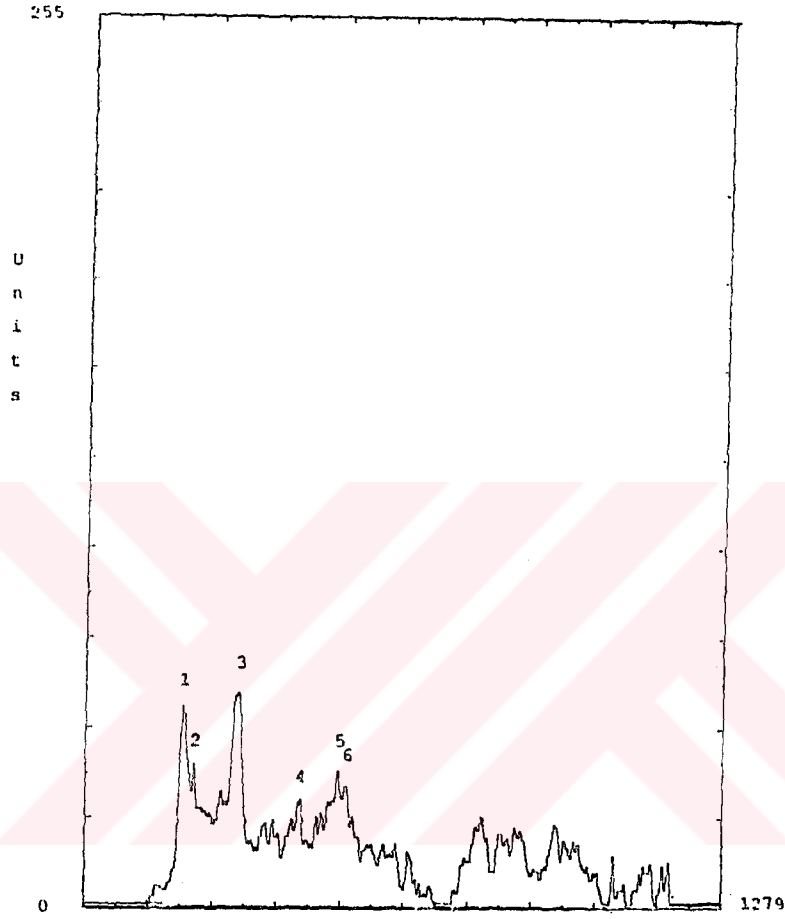
Propanollü Atilla-12



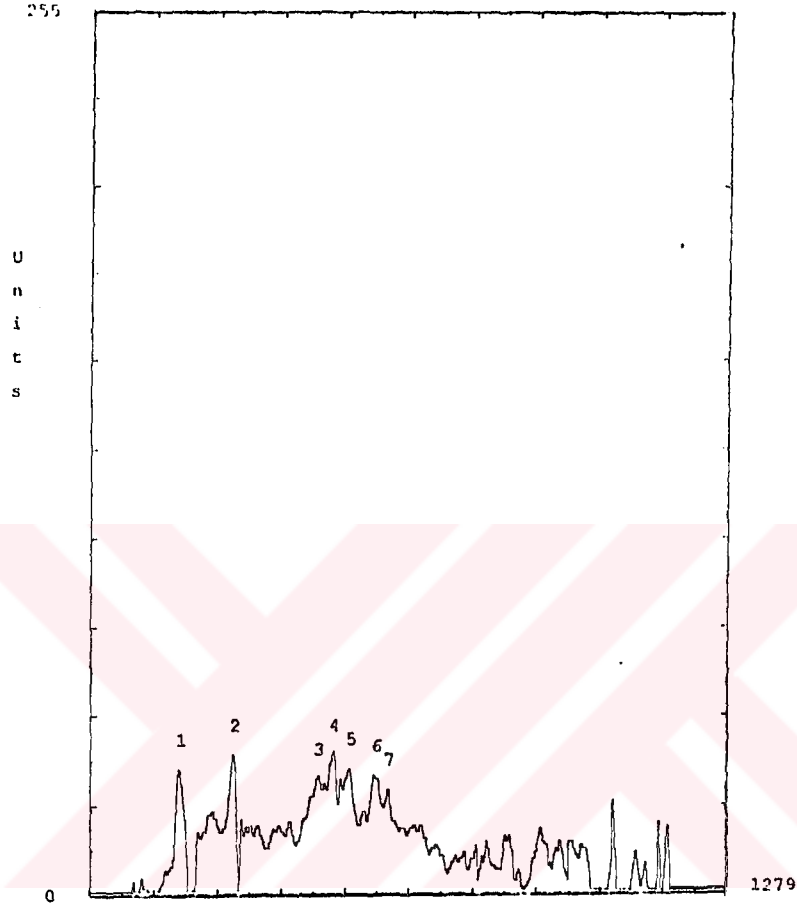
Şekil 4. 11. Propanollü Atilla-12 glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 13. Propanollü Atilla-12 glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	28.3	0.154	8.43	3054
2	19.3	0.239	7.51	2079
3	10.7	0.377	6.01	1158
4	38.2	0.399	5.77	4114

Propanollü Bezostaya**Şekil 4. 12. Propanollü Bezostaya-1 glutenin proteinlerinin band şiddetleri****Tablo 4. 14. Propanollü Bezostaya-1 glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri**

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	9.1	0.151	8.46	1533
2	7.8	0.168	8.28	1308
3	19.4	0.239	7.51	3250
4	6.5	0.336	6.45	1084
5	10.0	0.394	5.82	1671
6	43.6	0.407	5.68	7295

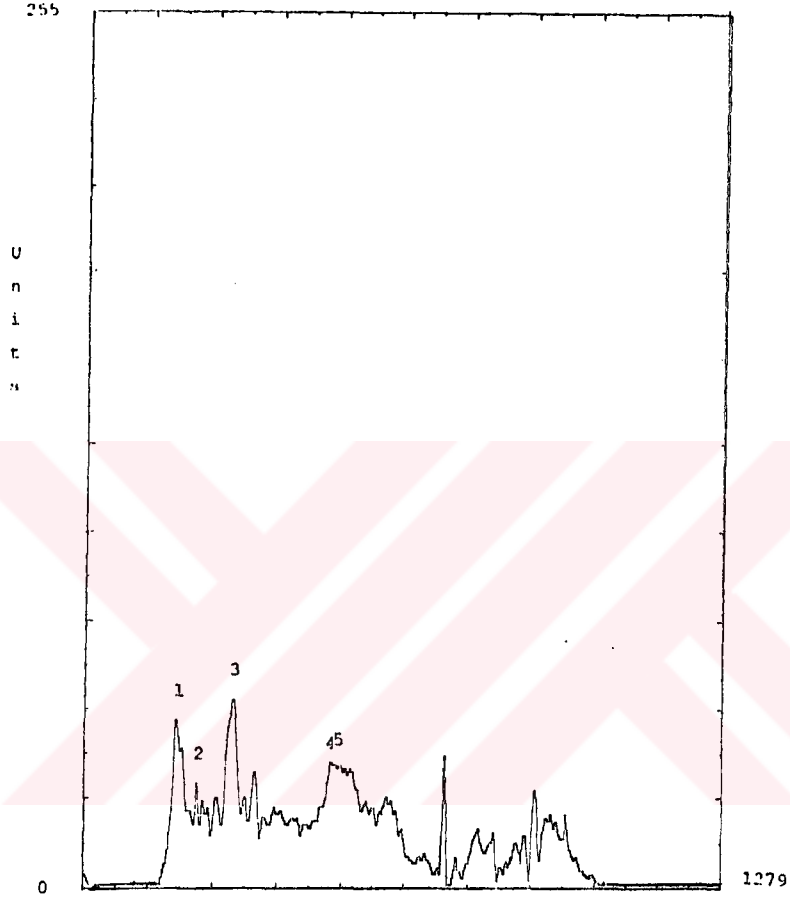
Propanollü Kate A-1

Şekil 4. 13. Propanollü Kate A-1 glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 15. Propanollü Kate A-1 glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	6.3	0.135	8.64	938
2	12.0	0.222	7.69	1789
3	20.9	0.356	6.24	3110
4	5.4	0.379	5.99	811
5	8.0	0.405	5.71	1186
6	8.9	0.446	5.26	1321
7	36.7	0.466	5.04	5473

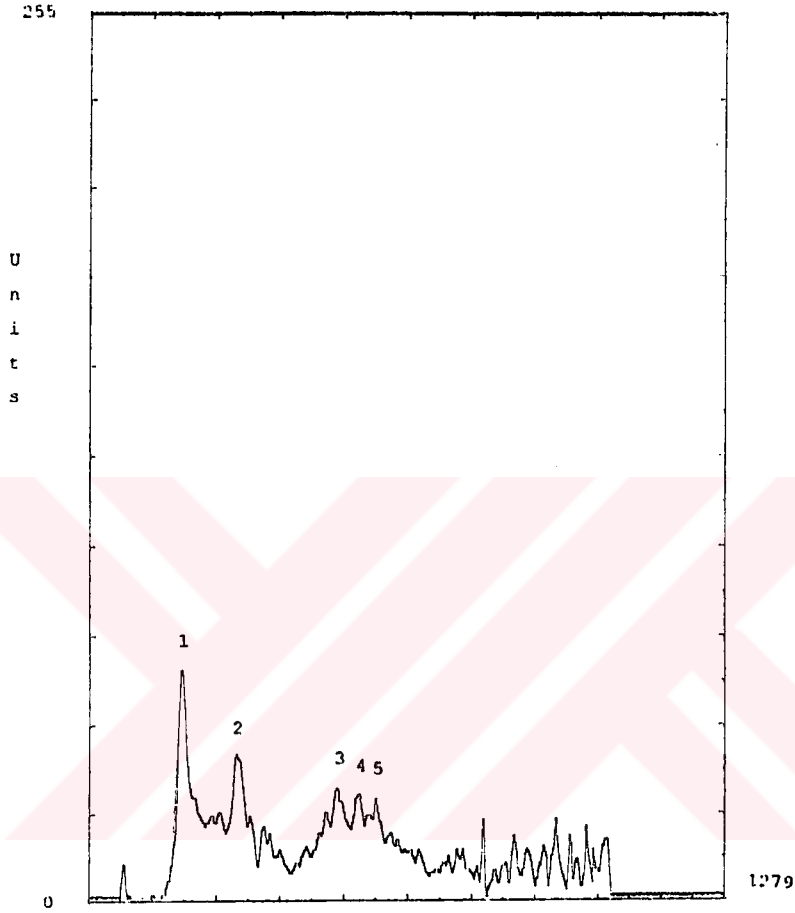
Propanollü Pehlivan



Şekil 4. 14. Propanollü Pehlivan glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 16. 1-Propanollü Pehlivan glutenin proteininin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	11.6	0.142	8.56	1658
2	5.3	0.173	8.22	754
3	15.0	0.229	7.61	2158
4	21.5	0.383	5.94	3079
5	26.1	0.390	5.87	3741

Propanollü Prostor

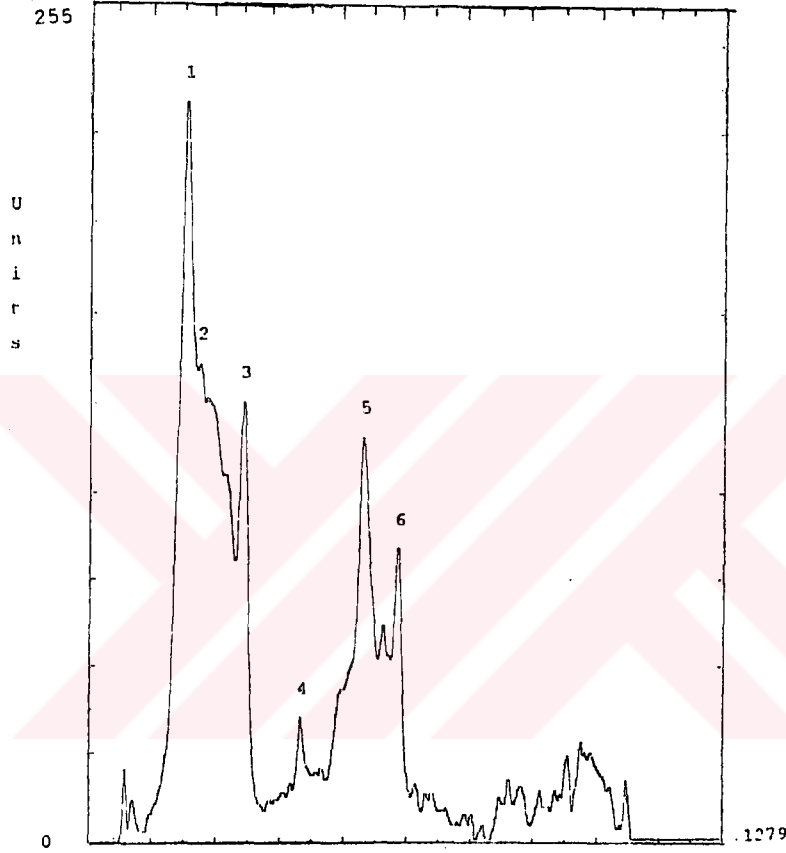
Şekil 4. 15. Propanollü Prostor glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 17. Propanollü Prostor glutenin proteininin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	23.2	0.143	8.55	3425
2	18.0	0.229	7.61	2651
3	14.7	0.388	5.89	2205
4	5.0	0.424	5.50	710
5	39.1	0.450	5.22	5761

4. 2. 3. 2. 3. 6 M Üre ile Ekstrakte Edilen Buğday Glutenin Proteinlerinin Rf, pI ve Pik Alanlarının Bulunması

Üreli Atilla-12

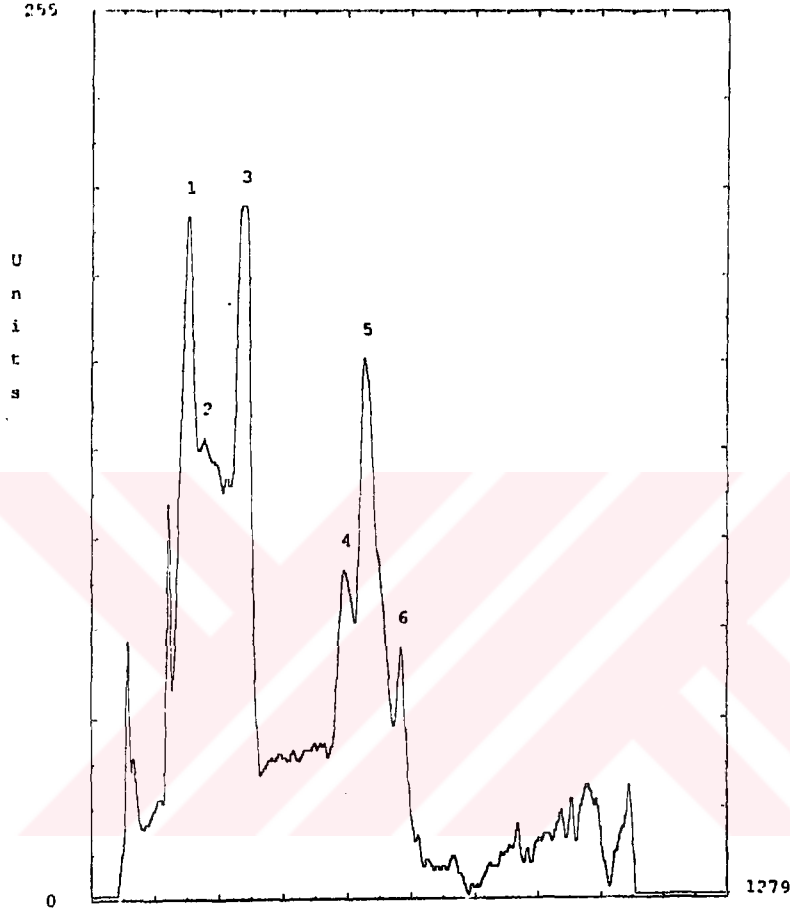


Şekil 4. 16. Üreli Atilla-12 glutenin proteininin band şiddetleri

Tablo 4. 18. Üreli Atilla-12 glutenin proteininin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	22.7	0.149	8.48	8812
2	22.8	0.172	8.23	8876
3	9.6	0.239	7.51	3744
4	5.6	0.330	6.52	2183
5	16.0	0.428	5.46	6210
6	23.3	0.484	4.85	9057

Üreli Bezostaya-1

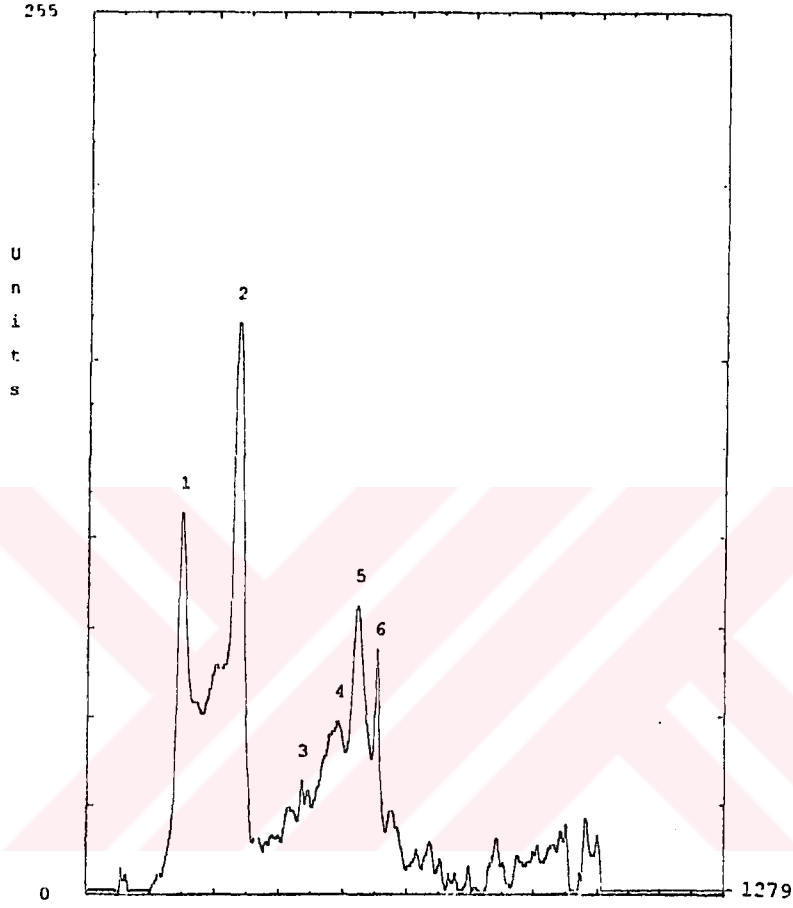


Şekil 4. 17. Üreli Bezostaya-1 glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 19. Üreli Bezostaya-1 glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	14.5	0.149	8.48	7598
2	10.9	0.177	8.18	5681
3	16.3	0.237	7.53	8494
4	6.9	0.395	5.81	3619
5	15.3	0.428	5.46	7985
6	5.6	0.483	4.86	2932

Üreli Kate A-1

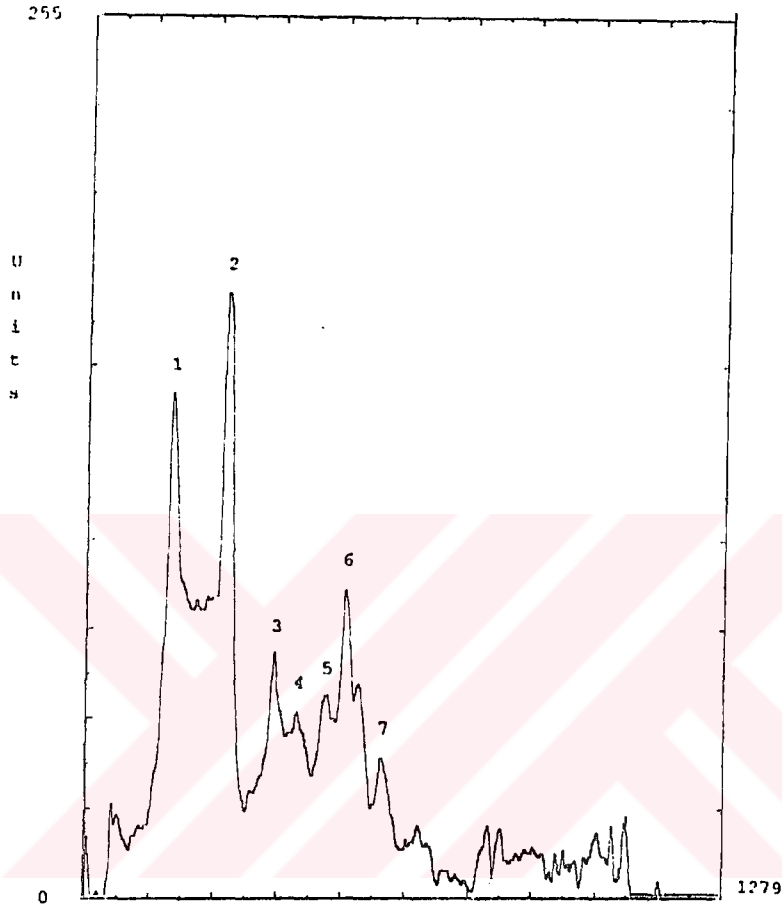


Şekil 4. 18. Üreli Kate A-1 glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 20. Üreli Kate A-1 glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	16.7	0.145	8.53	4119
2	33.2	0.233	7.57	8195
3	6.3	0.334	6.48	1560
4	10.9	0.390	5.87	2700
5	12.4	0.422	5.52	3071
6	19.0	0.452	5.19	4697

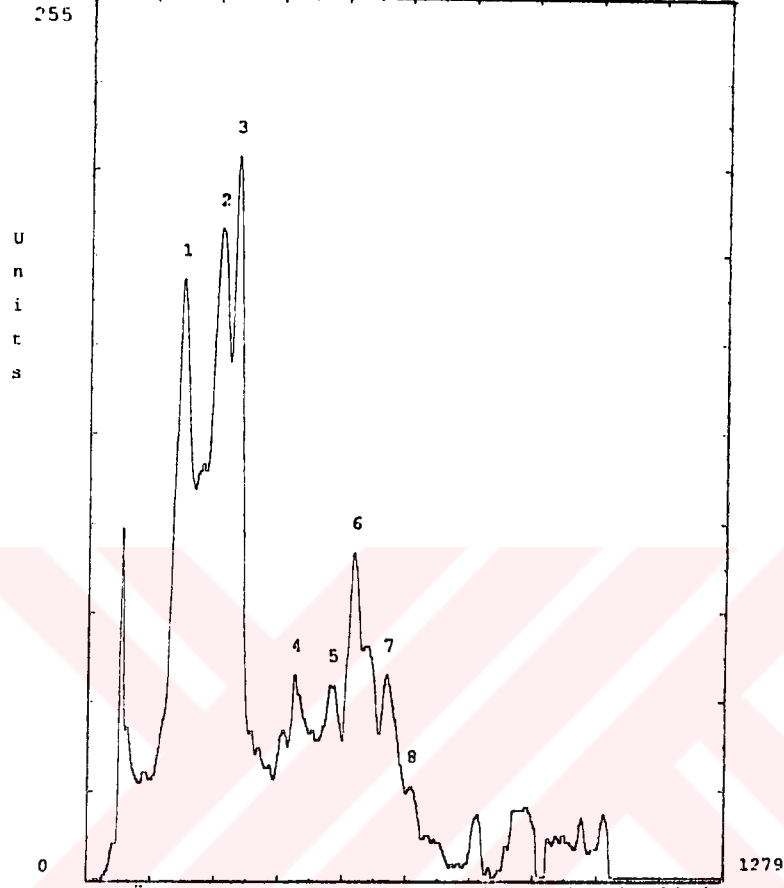
Üreli Pehlivan



Şekil 4. 19. Üreli Pehlivan glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 21. Üreli Pehlivan glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	22.5	0.130	8.69	8386
2	21.9	0.217	7.75	8134
3	9.0	0.293	6.92	3337
4	6.6	0.330	6.52	2456
5	5.6	0.375	6.03	2068
6	7.6	0.405	5.70	2817
7	17.6	0.425	5.49	6536

Üreli Prostor

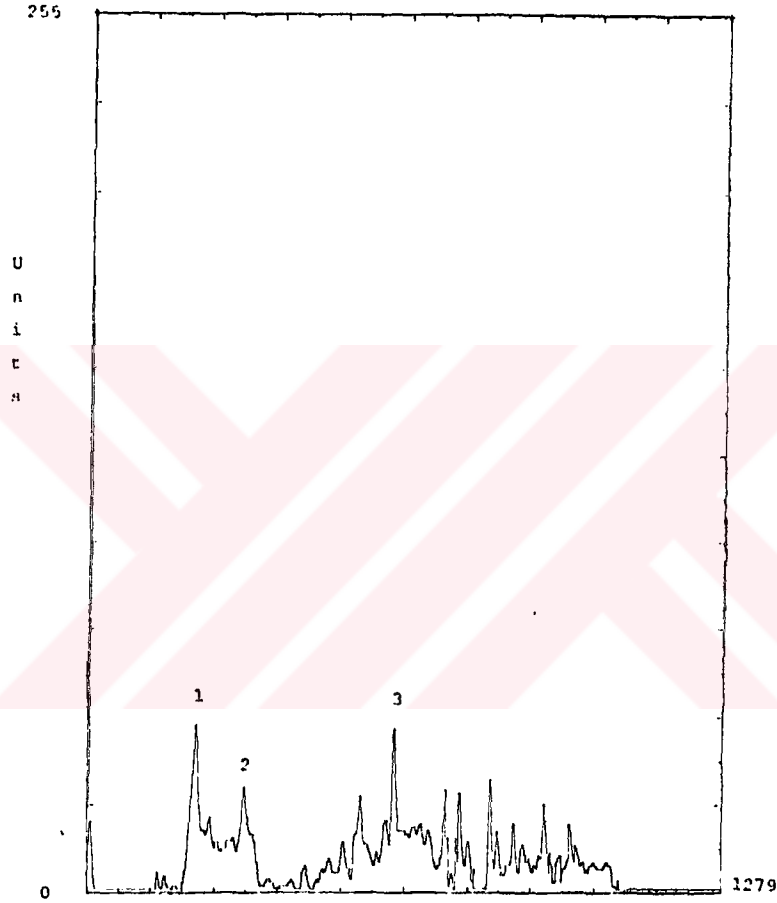
Şekil 4. 20. Üreli Prostor glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 22. Üreli Prostor glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	17.2	0.145	8.53	7960
2	21.6	0.205	7.88	10004
3	14.0	0.229	6.86	6502
4	5.7	0.324	6.58	2643
5	5.0	0.384	5.93	2340
6	6.5	0.416	5.59	3008
7	5.4	0.470	5.00	2486
8	9.5	0.508	4.59	4409

4. 2. 3. 2. 4. Saflaştırılan Buğday Glutenin Proteinlerinin Rf, pI ve Pik Alanlarının Bulunması

Saflaştırılmış Atilla-12

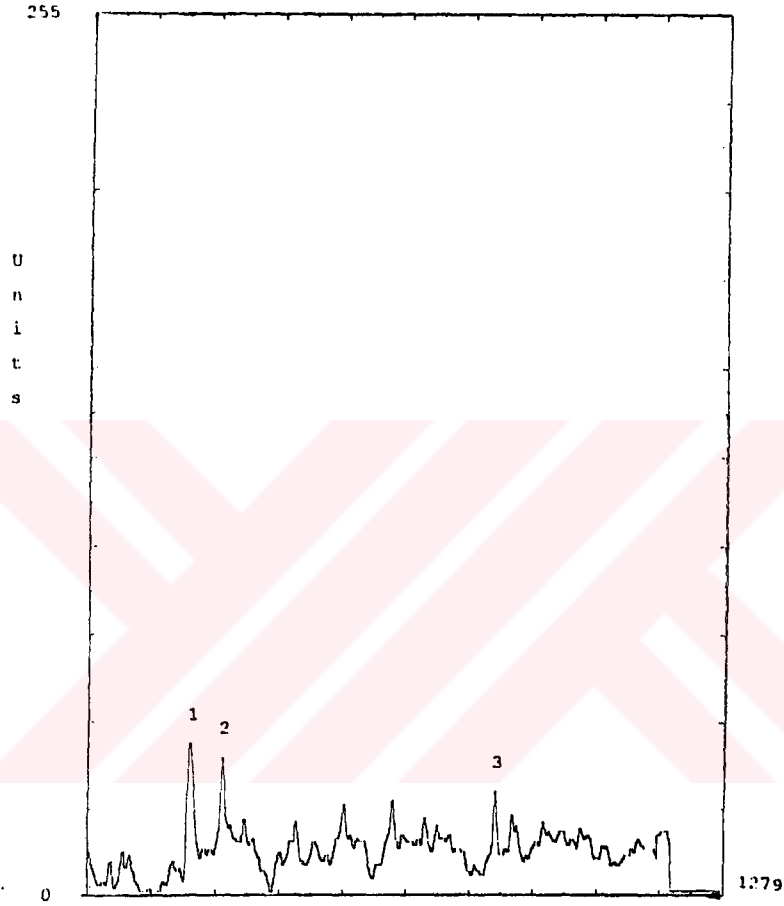


Şekil 4. 21. Saflaştırılmış Atilla-12 glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 23. Saflaştırılmış Atilla-12 glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	18.6	0.168	8.28	1798
2	12.4	0.246	7.43	1195
3	69.0	0.483	4.86	6652

Saflaştırılmış Bezostaya-1



şekil 4. 22. Saflaştırılmış Bezostaya-1 glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 24. Saflaştırılmış Bezostaya-1 glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	11.1	0.158	8.39	1606
2	14.6	0.209	7.83	2126
3	74.3	0.645	3.10	10793

Safılaştırılmış Kate A-1

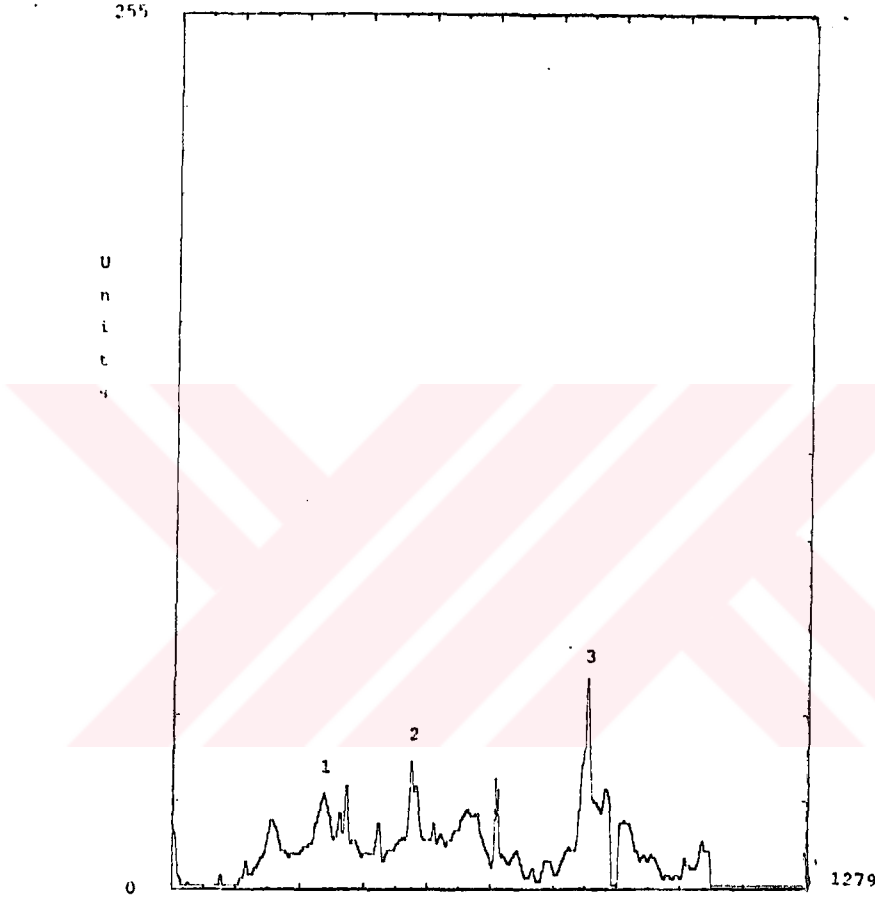


şekil 4. 23. Safılaştırılmış Kate A-1 glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 25. Safılaştırılmış Kate A-1 glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	66.4	0.305	6.79	9516

Safılaştırılmış Pehlivan

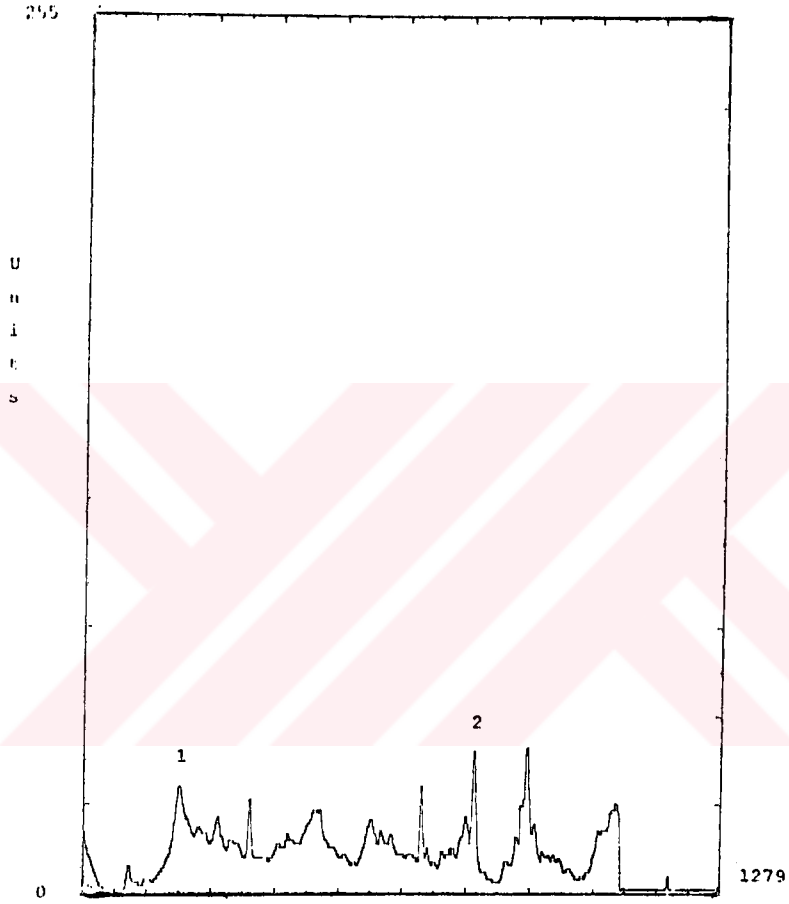


şekil 4. 24. Safılaştırılmış Pehlivan glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 26. Safılaştırılmış Pehlivan glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	27.6	0.237	7.53	3359
2	37.4	0.373	6.05	4551
3	15.6	0.654	3.00	1892

Safılaştırılmış Prostor



şekil 4. 25. Safılaştırılmış Prostor glutenin proteinlerinin band şiddetleri

Tablo 4. 27. Safılaştırılmış Prostor glutenin proteinlerinin % alan, Rf, alan ve pI değerleri

Pik No	% Alan	Rf	pI	Alan
1	63.7	0.147	8.50	7967
2	10.9	0.614	3.44	1367

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından Trakya Bölgesi'nde en çok ekildiği belirlenen (T.T.A.Enstitüsü Yayınları) beş çeşit ekmeklik buğday unlarından elde edilen glutenin proteinleri İzoelektrik Odaklama (IEF)'ya uygulanmış ve her bir bandın izoelektrik noktası (*pI*) belirlenmiştir.

Bu çalışmada, *Atila-12*, *Bezostaya-1*, *Kate A-1*, *Pehlivan* ve *Prostor* buğdaylarının unları kullanılmıştır. Her aşamada örneklerin içerdiği glutenin proteini miktarları Lowry yöntemiyle tespit edilmiştir (Tablo 4. 4). Undaki toplam glutenin proteinlerinin yaklaşık % 3-4'ü 6 M üre ile, % 2-3'ü ise 1-propanol (%50) ile elde edilmiştir. 1-Propanole kıyasla üre ile daha çok glutenin proteininin ekstrakte edildiği bulunmuştur. Protein tayini sonuçlarına göre; en fazla glutenin içeriğine *Atila-12* (% 8.02) ekmeklik buğday çeşitinin, en düşük glutenin içeriğine de *Kate A-1* (% 5.67) ekmeklik buğday çeşitinin sahip olduğu bulunmuştur.

IEF sonunda elde edilen glutenin polipeptid bandları GS-600 scanning dansitometre programı kullanılarak okunmuş ve her bandın Rf değeri bulunmuştur. Standart proteinlerin Rf değerleri ile pI değerleri arasında çizilen grafikten yararlanarak (Şekil 4. 4.) örnek bandların pI değerleri hesaplanmıştır.

Dansitometrede piklerin değerlendirilmesi "quick integrasyon" yöntemiyle yapılmış, alan miktarı % 5'den az olanlar dikkate alınmamıştır.

Ham glutenin proteini ekstraktları jel üzerinde biri ortalama pI 9.3 civarında, diğeri de ortalama pI 4 civarında olmak üzere iki protein bandı vermektedir. Bu durumun glutenin proteininin visko elastik özelliğinden sorumlu olan S-S köprülerinin indirgenmemiş olmasından dolayı iyi çözünmediğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

1-Propanol (%50) ile ekstrakte edilen kısmın dansitometrik incelenmesi sonucunda örnek buğdayların glutenin proteinlerinin birbirine benzer ve hemen hemen eşit sayıda band verdiği görülmüştür. Özellikle pI 8.5 civarındaki ilk pik ve pI 8-7.5 civarındaki ikinci pik karakteristiktir. Diğer piklerin 7.5-5 arasında izoelektrik noktaya sahip glutenin proteinleri olduğu görülmüştür.

6 M Üre ile ekstrakte edilen beş buğday çeşidi gluteninlerinin izoelektrik noktalarına göre ayrılan ve dansitometre ile analiz edilen bandlara göre; toplam gluteninlerin hemen hepsi iyi bir şekilde çözülmüş olarak ekstrakta geçtiği söylenebilir. Çünkü 1-propanol ile ekstrakte edilene göre hem konsantrasyonu daha yüksektir, hem de sayıca daha fazladır. Dansitometrik grafiklere göre dört tane yoğun protein piki beş örnekte de mevcuttur. İlk piklerin izoelektrik noktaları sırasıyla, 8.48, 8.48, 8.53, 8.69, 8.53 olarak hesaplanmıştır. İkinci piklerin pI 8.3-7.5 arasında, üçüncü piklerin pI 7.5-6.5 arasında, dördüncü piklerin de pI 6.5-5.8 arasında değiştiği bulunmuştur. Diğerlerinden farklı olarak üre ekstraktlarının daha şidetli ve keskin pikler verdiği göze çarpar.

GFC kolonlarında saflaştırılan 6 M üre ekstraktlarında genel olarak protein konsantrasyonunda ve band sayısında azalma olduğu söylenebilir. Bu beklenen bir durumdur. Çünkü minimum miktarlarda kolona uygulanan örneklerdeki molekülü çok düşük ve aşırı büyük glutenin fraksiyonları kolondan toplanan elüantların dışında kalırlar. Bu durumdan dolayı, ancak 5000-800000 aralıkta molekül ağırlığına sahip olanlar IEF'ye uygulanmış olur.

Dansitometrik analiz sonuçlarına göre; ortalama 2-3 şiddetli protein piki beş ekmeklik buğday çeşitinde de görülmektedir. İzoelektrik noktaları ise 8.5-3 arasında değişmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda kolon dolgu maddesi olarak kullanılan Sephadex G-200'ün glutenin proteinlerinin saflandırılması için uygun olmadığı söylenebilir. Daha dar aralıklı bir dolgu jeli ile daha iyi sonuç alınabilir.

Genel olarak; buğday glutenin proteinlerinin izoelektrik noktalarına göre IEF yöntemiyle iyi bir ayırımı ve dansitometrik incelenmesinin yapılması, glutenin proteinlerinin temiz olarak ayrılması ve 2-merkaptöetanol varlığında yüksek konsantrasyonlu (>6 M) üre kullanılarak indirgenip iyi çözünür hale getirilmesi ile

mümkün olabileceği bu çalışmanın sonucunda anlaşılmaktadır. Bu ekstraksiyon metodunda ortam pH'ının 8 olması da iyi çözünmeyi sağlayan sebeplerden biridir. Bu bulgularımız Curioni ve arkadaşlarının (1990) İtalyan ekmeçlik buğdayları üzerinde yaptıkları çalışma sonuçları ile çok benzerlik göstermektedir.

2-Merkaptoetanol ile 1-Propanollü ortamdaki glutenin ekstraksiyonu ile elde edilen buğday çeşitlerinin hepsine ait glutenin ekstraktları IEF ile ayırma uygun bir çözünme göstermemişlerdir.



6. KAYNAKLAR

1. Aktan, B., Atlı, A. "Türkiye'de Tescilli Yapılan Eski ve Yeni Buğday Çeşitlerinin Elektroforez Yöntemi ile Gliadin Elektroforegramlarının (Katalog) Belirlenmesi".
2. Becker, R., Lorenz, K., Saunders, M.R. "Saccharides of Maturing Triticale, Wheat and Rye". *J. Agric. Food Chem.* 25:1116-1118 (1977).
3. Bietz, J.A. "Genetic and Biochemical Studies of Nonenzymic Endosperm Protein In: Wheat and Wheat Improvement ". Ed. E.G. Hayne. ASA, Inc, OSSA, Inc Publishers. Madison, Wisconsin USA (1987).
4. Brown, J.W.S., Law, C.N., Worland, A.J. and Flavell, R.B. "Genetic Variation in Wheat Endosperm Proteins: An Analysis by Two-Dimensional Electrophoresis Using Intervarietal Chromosomal Substitution Lines". *Theor. Appl. Genet* 59: 349-361 (1981).
5. Bushuk, W., Zillman, R.R. "Wheat Cultivar Identification by Gliadin Electrophoregrams". I. Apparatus, Method and Nomenclature, *Can. J. Plant Sci.*, 58,505-515, (1978).
6. Curioni, A., Peruffo, A.B.D., Pogna, N.E. "Preparative Isoelectric Focusing of Reduced Wheat Gluten Proteins". *Electrophoresis* 11, 462-467 (1990).
7. Elgün, A., Ertugay, Z. "Tahıl İşleme Teknolojisi". Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Erzurum 1992.
8. Ertugay, Z., Elgün, A., Kurt, A., Gökalp, H. "Gıda Bilimi ve Teknolojisi". Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Erzurum 1994.

9. Ewart, J.A.D. "Calculated Molecular Weight Distribution for Glutenin". *J. Sci Food Agric* 38:227-289 (1987).
10. Finney, K.F., Yamazaki, W.T., Youngs, V.L., Rubenthaler, G.L. "Quality of Hart, Soft and Durum Wheats". *Wheat and Wheat Improvement* E.G. Heyne Edition Modison, Wisconsin USA 1987.
11. Friedman, M., Krull, L.H. and Cavins, J.F. *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 3868-3871.
12. Giulian, G.G., Moss, R.I. and Greaser, M. "Analytical Isoelectric Focusing Using A High-Voltage Vertical Slab Polyacrylamide Gel System". *J. Anal. Biochem.* 142: 421-436 (1984).
13. Khelifi, D., Branlard, G. "A New Two-Step Electrophoresis Method for Analysing Gliadin Polypeptides and High and Low Molecular Weight Subunits of Glutenin of Wheat". *Journal of Cereal Science.* 13, 41-47 (1991).
14. Ksarda, D.D., Bernadin, J.E., Qualset, C.O. "Relationships of Gliadin Protein Components to Chromosomes in Hexaploid Wheats (*Tr. aestivum* L)". *Proc Natl Acad Sci USA* 73:3646-3650 (1976).
15. Laemmli, U.K. "Clevage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4". *Nature*, 227: 680-685 (1970).
16. Lockhart, H.B., Nesheim, R.O. "Nutritional Quality of Cereal Grains". *American Association of Cereal Chemists* p.201-221, St. Paul 1978.
17. Masci, S., Porceddu, E., Lafiandra, D. "Two Dimensional Electrophoresis of 1D-Encoded B and D Glutenin Subunits in Common Wheats with Similar Omega Gliadins". *Biochemical Genetics*, Vol. 29, Nos 7/8 403-413 (1991).
18. Matsumura, Y., Kawamura, Y., Matoba, T. and Yonezawa, D. "Liberation of Subunit Polypeptides of Glutenin by Partial Reduction at pH 6.0". *Agric. Biol. Chem.*, 48(6), 1487-1943 (1984).

19. Matsumura, Y., Kawamura, Y., Matoba, T. "Separation of Subunit Polypeptides of Glutenin by SDS-PAGE and Determination of Their Cysteine Contents". *Agric Biol. Chem.*, 48(5), 1281-1285 (1984).
20. Olson, R.A., Frey, K.J. "Nutritional Quality of Cereal Grains". *Genetic and Agronomic Improvement*. Madison, Wisconsin USA 1987.
21. Osborne, T.B. "The Proteins of the Wheat Kernel". *Carnegie Inst. Washington Publ.* 84, Judd and Detweiler, Washington 1907.
22. Payne, P.I., Corfield, K.G. "Subunit Composition of Wheat Glutenin Proteins, Isolated by Gel Filtration in A Dissociating Medium". *Planta* 145: 83-88 (1979).
23. Penttila, I.A., Devery, J.M., Gibson, C.E., La Brooy, J.T. and Skeritt, J.H. "Cellular and Humoral Responses in Coeliac Disease. 1. Wheat Protein Fractions". *Clinica Chimica Acta*, 204, 95-98 (1991).
24. Simmonds, D.H. "Structure Composition and Biochemistry of Cereal Grains". *American Association of Cereal Chemists* p.105-137, St. Paul (1978).
25. Stoyanova, S.D. and Kolev, K.D. "Gliadin Electrophoresis in The Evaluation of Bulgarian Wheat Germplasm". *Plant Genetic Resources Newsletter*, No. 108: 59-63 (1996).
26. Tamás, L., Lásztity, D., Lásztity, R. "The Effect of Ethanol in The Separation of Wheat Gliadins by CM- and DEAE- Cellulose Chromatography". *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 24 (3), pp.183-190 (1989).
27. Telefoncu, A. "Protein Yapısı ve Fonksiyonu". *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü İzmir*, 1988.
28. Telefoncu, A. "Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu". *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü İzmir*, 1996.

29. Topal, İ.E. "Hububat ve Mamülleri Üretim Tekniği, Kalite Kontrolü ve Denetimde Dikkat Edilecek Hususlar". T.C. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı İstanbul İl Müdürlüğü, İstanbul 1988.
30. Trakya Tarımsal Araştırma Entitüsü Yayınları, "Serin İklim Tahıllarından Buğday-Arpa Çeşitleri ve Özellikleri". Edirne 1997.
31. Weiss, W., Wogelmeier, C., Görg, A. "Electrophoretic Characterization of Wheat Grain Allergens from Different Cultivars Involved in Bakers' Asthma". *Electrophoresis* 14, 805-816 (1993).
32. Wieser, H., Seilmeier, W. and Belitz, H.-D. "Characterization of High Molecular Weight Subunits of Glutenin Separated by Reverse-phase High-performance Liquid Chromatography". *Journal of Cereal Science* 12, 223-227 (1990).
33. Wringley, C.W., Gore, P.J., Manusu, H.P. "A Rapid (<10 minute) Electrophoresis Method for Identification of Wheat Varieties". *Electrophoresis* 12, 384-385 (1991).

7. ÖZGEÇMİŞ

31.07.1974 Erzincan doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Erzincan'da tamamladım. 1992 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne girdim. Bu bölümü 1996 yılında bitirerek kimyager lisans diploması aldım. Aynı yıl Yüksek Lisans yapmaya hak kazandım. Halen Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı'nda Yüksek Lisans öğrenimimi sürdürmekteyim.

TC. YÖNEMLİKLERİN BAŞLIĞINDA
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

8. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde yardımlarını ve rehberliğini esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Ayten SAĞIROĞLU'na en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Buğday örneklerini temin eden ve bu konuda kaynak yardımında bulunan Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürü Dr. Ahmet BÜLBÜL'e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yakın desteklerini gördüğüm aileme ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Ebru BEYOĞLU