

BESİN ANALİZİNDE ELEKTROFORETİK ORJİN TAYİNİ V. BAZI SERT BUĞDAY VARYETELERİ İLE MAKARNA ÖRNEKLERİNİN SULU ETANOLDE ÇÖZÜNEN PROTEİNLERİNİN (GLİADİN) POLİAKRİLAMİD JEL (PAG)-DISK ELEKTROFOREZİ İLE İNCELENMESİ*

ELECTROPHORETIC ORIGIN DETERMINATION IN FOOD ANALYSIS V. EXAMINATION OF POLYACRYLAMIDE GEL (PAG)-DISC ELECTROPHORESIS OF THE AQUEOUS ETHANOL-SOLUBLE PROTEINS (GLIADIN) OF SOME HARD WHEAT VARIETIES AND MACARONI SAMPLES*

Zafer BILGIÇ ** - Sedat İMRE **

SUMMARY

The gliadin proteins of the most cultivated 6 durum wheat varieties in Turkey has been examined by polyacrylamide gel disc electrophoresis. The obtained electrophoregrams allow to the identification of these varieties. The method was also applied to the 9 different samples of macaroni and it was observed that the obtained electrophoregrams can be used for the identification of the soft wheat in this products.

ÖZET

Türkiye'de en çok tarımı yapılan 6 durum buğdayı varyetesinin gliadin proteinleri poliakrilamid jel disk elektroforezi ile incelendi. Elde edilen elektroforegramlar bu varyetelerin teşhisine imkan vermektedir. Metod ayrıca 9 farklı makarna örneğine de uygulandı ve elde edilen elektroforegramlardan bu ürünlerde yumuşak buğdayın varlığının tesbitinde yararlanılabileceği gözlemlendi.

GİRİŞ

Genel olarak, undan yapılan besinler sert buğdaydan yapıldığında yumuşak buğdaydan yapılabildiği nazaran daha kaliteli olmaktadır. Bu yüzden bazı ürünler örneğin makarnalar, özellikle sadece sert buğdaydan yapılmaktadır ve bu husus gıda yönetmeliği ve tüzüklerinde belirtilmiştir.

* Z. Bilgiç'in Doktora Tezinin bir bölümüdür.

** İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı,
Beyazıt/İSTANBUL

Sert buğday, yumuşak buğdaya nazaran daha pahalı olduğundan, bunun teşhisi ve makarnalara yumuşak buğday karıştırılıp karıştırılmadığının tesbiti besin kontrolü açısından önem taşır. Bu alanda, pek çok ülkede 20 seneyi aşkın bir süredir elektroforetik çalışmalardan yararlanılmaktadır (1-5). Ancak yapılan literatür araştırmasında ülkemizde tarımı yapılan sert ve yumuşak buğday cinslerinin elektroforetik teşhisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Bu çalışmada daha önce buğdaylarla yapılan çalışmanın (6) devamı olarak, ülkemizde tarımı yapılan 6 sert buğday varyetesinin %70'lik etanolde çözünen gliadinleri PAG-disk elektroforezi ile incelenip elde edilen protein band dizilerinden teşhiste ne ölçüde yararlanılabileceği saptanmaya çalışıldı. Ayrıca aynı yöntem 9 ayrı firmanın ürettiği makarna örneklerine de uygulandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Kimyasal Maddeler: Akrilamid, N, N'-Metilen-bis-akrilamid (German), Coomassie Brilliantblau R 250 (Serva), Etanol (Tekel), diğer bütün kimyasal maddeler p.a. (Merck) firmasında temin edildi. Çalışmada deiyonize su kullanıldı.

2. Aletler: Elektroforez tankı, doğru akım güç kaynağı (Gelman), pH metre E 488 (Metrohm) ve Santrifüj GLC-2 (Sorvall).

3. İncelenen Örnekler: Sert buğdaylar: Gökgöl 79, Karakılçık 1133, Kunduru 1149, Çakmak 79, Tunca 79, Güneydoğu Anadolu Durum (GAD). Bu buğday örnekleri Yeşilköy-İstanbul Ziraî Araştırma Enstitüsü, Ankara Ziraî Araştırma Kurumu ve Toprak Mahsulleri Ofisi - İstanbul'dan sağlandı.

Makarna örnekleri: Ayrı firmalara ait 5 adet paketlenmiş ve 4 adet dökme makarna örneği piyasadan satın alındı.

4. Örneklerin Hazırlanması (7): Elektrikli öğütücü ile öğütülerek elde edilen un örneklerinin 150 mg'ına 0.51 ml %70 lik etanol katıldı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 8 dakika santrifüj edildi (4000 devir/dakika) ve üstteki berrak kısımdan 50 µl'lik hacimler test tüplerine alındı. Bu alkollü ekstre üzerine hacimca 7.5 kısım % 0.1 oranında metil yeşili boyar maddesini içeren % 30'luk sakkaroz çözeltisi ile 1 kısım elektroforez işleminde kullanılan tampon çözelti karışımından 100 µl ilave edildi. Bu karışımdan 20 µl'lik hacimler jele uygulandı.

5. Jellerin Hazırlanması (7,8): % 7.5 konsantrasyondaki poliakrilamid jel hazırlamak için aşağıdaki çözeltiler gereklidir.

Çözelti A: 20 ml'lik bir balonjojede 2.85 g akrilamid, 0.15 g N, N'-metilen-bis-akrilamid ile 0.05 g askorbik asid, 15 ml % 0.006'lık demir-II-sülfat çözeltisinde çözündürüldü ve su ile hacmine tamamlandı.

Çözelti B: 0.06 M amonyum persülfat çözeltisi.

Çözelti C: pH sı glisin ilavesiyle 3.1 e ayarlanmış 0.376 M asetik asid çözeltisi.

Ø 6 mm x 8 cm boyutlarındaki jeller A ve C çözeltisinin 15 er ml si ile 0.3 ml B çözeltisi karışımından daha önceki çalışmada (8) bildirildiği şekilde hazırlandı.

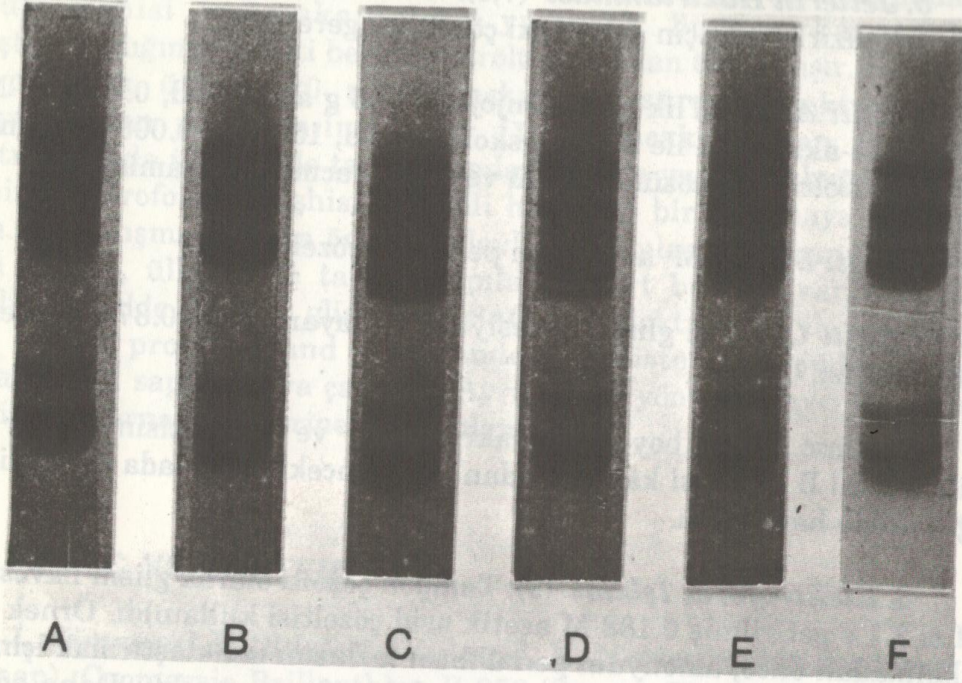
6. Elektroforez İşlemi (9): Tampon çözelti olarak glisin ilavesiyle pH sı 3.1 e getirilmiş 0.188 M asetik asid çözeltisi kullanıldı. Örnek uygulanmadan önce, amonyum persülfatın fazlasını uzaklaştırmak için 10 dakika süre ile 100 V gerilimde ön elektroforez yapıldı. Daha sonra örneklerden 20 µl'lik hacimler bir Hamilton pipetle jellere uygulandı.

Esas elektroforez işlemi, önce 7 dakika süre ile 100 V ve sonra boyar maddenin jeli terketmesi gözlenerek yaklaşık 15 dakika süre ile 400 V gerilimde, katod yönüne doğru gerçekleştirildi.

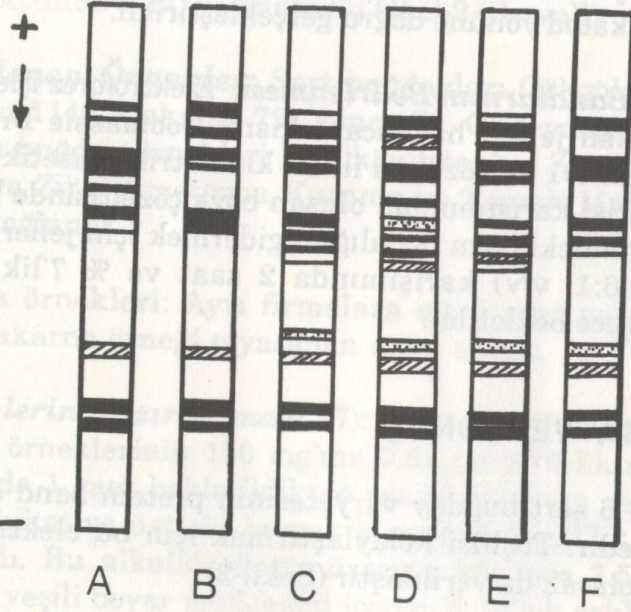
7. Protein Bandlarının Belirlenmesi: Elektroforez işlemi bitiminde tüplerden çıkarılan jeller, hacimca 1 kısım Coomassie Brilliantblau R 250'nin etanoldeki %1 lik çözeltisi ile 25 kısım triklorasetik asidin sudaki % 12 lik çözeltisi karışımından oluşan boya çözeltisinde bir gece bekletildi. Jel zeminindeki boya fazlalığını gidermek için jeller, su/metanol/asetik asid (14:6:1; v/v) karışımında 2 saat ve % 7'lik asetik asid çözeltisinde bir gece bekletildi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

İncelenen 6 sert buğday varyetesinin protein band dizileri Şekil-1'de görülmektedir. Teşhisi kolaylaştırmak için bu elektroforegramlar ayrıca şematik olarak da verilmiştir (Şekil-2).



Şekil-1. Sert buğday varyetelerinin elektroforegramları. A- Gököl 79, B- Karakilçık 1133, C- Çakmak 79, D-Kunduru 1149, E-Tunca 79, F-GAD



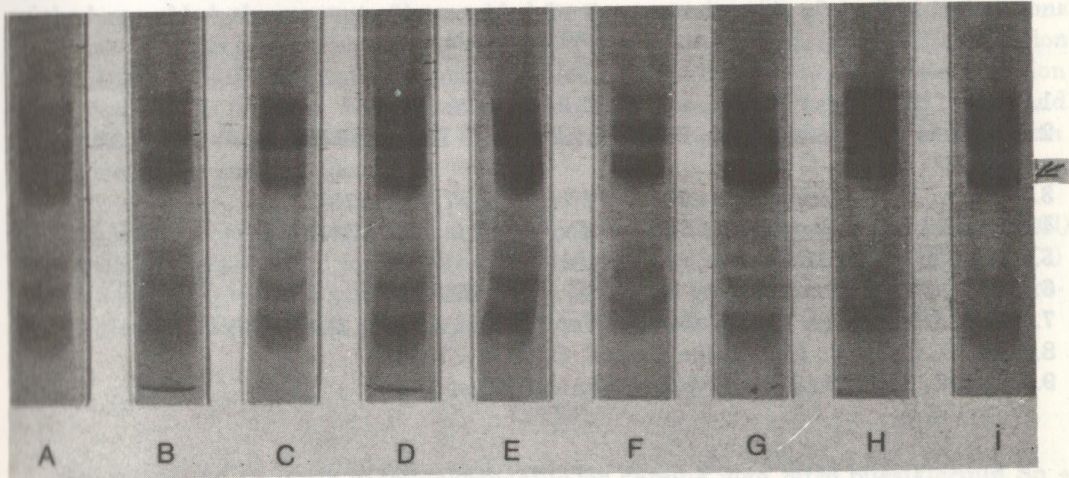
Şekil- 2. 1. Şekildeki sert buğday varyetelerinin şematik elektroforegramları.

Görüldüğü üzere, protein bandları biri jelin anod kısmındaki ve diğeri ise katod kısmındaki yarısında olmak üzere iki grup halinde ayrılmışlardır. Katod kısmındaki bandların sayıları az, intensiteleri de zayıf olup, varyeteler arasında önemli bir fark gözlenmemektedir.

Anoda yakın band dizileri ise karakteristik olup, teşhiste yararlanılabilecek niteliktedir. Karakılçık 1133, Çakmak 79, Kunduru 1149, Tunca 79'un protein band dizileri birbirlerinden bariz farklılık göstermektedir. Gökgöl 79 ve GAD'unki ise birbirine oldukça benzemektedir. Ancak istisnai olarak iki varyetenin katod grubu bandlarının gösterdikleri ufak farklılıktan yararlanılarak ayırt edilmeleri söz konusu olabilir.

Sert buğdayların uygulanan PAG-disk elektroforezi yöntemi piyasadan sağlanan değişik firmaların 5 paketlenmiş ve 4 dökme makarna örneğine de uygulandı ve buğdaylardakine benzer sonuçlar alındı.

Elde edilen elektroforegramların fotoğrafları Şekil-3'de verilmiştir.



Şekil-3. Makarna örneklerinin elektroforegramları. A-E: beş ayrı firmanın paketlenmiş makarnaları, F-İ: dört ayrı firmanın dökme makarnaları.

Burada da teşhiste yararlanılabilecek band dizileri jelin anod tarafındaki yarısında şekillenmiştir. A, B, C, D, E firmalarının paketlen-

miş makarnalarının tümü birbirinin aynısı ve durum buğdaylarından GAD ve Gököl 79'a uyan protein band dizileri vermiştir. Dökme makarnalar ise paket makarnalardan belirgin farklılık göstermektedir. Farklılık gösteren bu ana bantlardan sadece bir tanesinin (Şekil 3'deki I örneğinde okla işaretli olan) mobilitesi sert buğdaylardan Karakılçık 1133'ün aynı mobilitedeki bandına uymaktadır. Diğerleri ise büyük bir olasılıkla yumuşak buğdaylardan ileri gelmektedir. Sonuç olarak gerek sert buğdaylara ve gerekse makarnalara uyguladığımız PAG-disk elektroforezi yöntemi, teşhis yönünden değerlendirilebilecek, tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir. Ancak ülkemizde tarımı yapılan tüm sert buğdayların elektroforetik teşhislerinde yararlanılabilecek bir tayin anahtarının hazırlanabilmesi için daha bir dizi çalışmanın gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Fiyat bakımından ucuz olan dökme makarnalara yumuşak buğday katılıp katılmadığının ve/veya ne oranda katıldığının kesin olarak saptanabilmesi için ise önce böyle örneklerin ve laboratuvarlarda farklı oranlarda sert ve yumuşak buğday karışımından yapılan makarna örneklerinin elektroforetik analizleri yapılmalı ve daha sonra elektroforegramların dansitometrik taranması sonucu elde edilen dansitogramlar birbirleri ile kıyaslanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Resimli, P., Bernadi, G.: *Tecnica Molitoria*, **20**, 70 (1969).
2. Windemann, H., Müller, U., Baumgartner, E.: *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, **153**, 17 (1973).
3. Resmini, P., De Bernadi, G.: *Tecnica Molitoria*, **27**, 97 (1976).
4. Kobrehel, K., Feillet, P.: *Ann. Falsif, Expert. Chim.* **69**, 47 (1976).
5. Cooke, R.J.: *Electrophoresis*, **5**, 59 (1984).
6. İmre, S., Bilgiç, Z.: *J. Pharm. Univ. Mar.*, **2**(2), 133 (1986).
7. Maier, G., Wagner, K.: *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, **170**, 343 (1980).
8. İmre, S., Çelik, T.: *Doğa Bilim Dergisi*, **C**, **10**, 43 (1986).
9. Bilgiç, Z., İmre, S.: *J. Fac. Pharm.*, İstanbul, (Baskıda).