

Türkiye'de Yetiştirilen Bazı Soya Varyetelerinin Globulin Fraksiyonlarının Jel Elektroferez (SDS-FAGE) İle Analizi(*)

Doç. Dr. Nevzat ARTIK

Ank. Üniv. Zir. Fak. Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü 06110 - ANKARA

GİRİŞ

Soya fasülyesi (*Glycine max.* L.merrill), son yıllarda dünya nüfusunun protein gereksinimi karşılamakta kullanılan önemli bitkisel bir üründür. Soya fasülyesi geleneksel Uzakdoğu gıdaları (tofu, miso, soysos ve yuba) üretiminin başka gıda katkısı olarak da tüketilebilmektedir. Et, süt ve ekmeğe katılan soya anılan gıdaların besleyici özelliklerini artırmaktadır.

Soya fasülyesi proteini 2S, 7S, 11S ve 15S globulin olmak üzere 4 ana fraksiyondan oluşmaktadır. Belirtilen bu rakamlar proteinin sedimantasyon katsayısıdır ve proteinler bu katsayı ile anılmaktadırlar. Soya protein fraksiyonlarından 7S ve 11S globulin ana fraksiyon olmakta ve soya proteininin sırasıyla % 25-35 ve % 30-35 ini oluşturmaktadırlar (WOLF ve COWAN, 1975).

Soya fasülyesi proteininin yapısının anlaşılması için proteinin fizikokimyasal ve tekstürel özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu araştırmada soya fasülyesi proteini (globulin) fraksiyonlarına ayrılmış ve jel elektroferez ile molekül ağırlıkları belirlenmiştir. Ülkemizde daha önce bu tür bir çalışmaya rastlanmamıştır.

LİTERATÜR ÖZETİ

Baklagil proteinleri genellikle iki gruba ayrılmakta, vicilin ve legümin olarak anılmaktadır. Soya proteini ultrasantrifüj analizleri sonucunda 2S, 7S, 11S ve 15S globulin olmak üzere 4 ana fraksiyona ayrılmaktadır (NAISMITH, 1955; WOLF ve BRIGGS, 1956). Anılan fraksiyonlar içinde 7S ve 11S globulin soya proteininin önemli kısmını oluşturmaktadır.

Soya protein fraksiyonlarının ayrılmasında birçok yöntem kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda SDGC (sucrose density gradient centrifugation) ve kolon kromatografi yöntemleri tercih edilmektedir.

Soya proteininin ana fraksiyonlarından olan 7S globulin jel elektroferez (SDS - PAGE) ile α ,

α' ve β olmak üzere 3 alt gruba (polipeptid) ayrılmıştır. Bu alt grupların molekül ağırlıkları sırasıyla 83000, 76000 ve 53000 dir. 11S globulin ise IS, B, A4, AS, B3, BS ve AS olmak üzere 7 ana polipeptidten oluşmaktadır. Bu polipeptidlerin molekül ağırlıkları sırasıyla 62000, 53000, 42000, 37000, 30000, 21000 ve 10000 dir (KOSHIYAMA 1972). 7S globulinin izoelektrik noktası 4.90, 11S globulinin ise 4.64 dir.

7S globulinin molekül ağırlığı 102000 ve 210000 olarak bulunmuştur (THANH ve SHIBASAKI, 1978). 11S globulinin molekül ağırlığı ise 297000 - 320000 sınırları arasında değişmektedir (KOSHIYAMA, 1972).

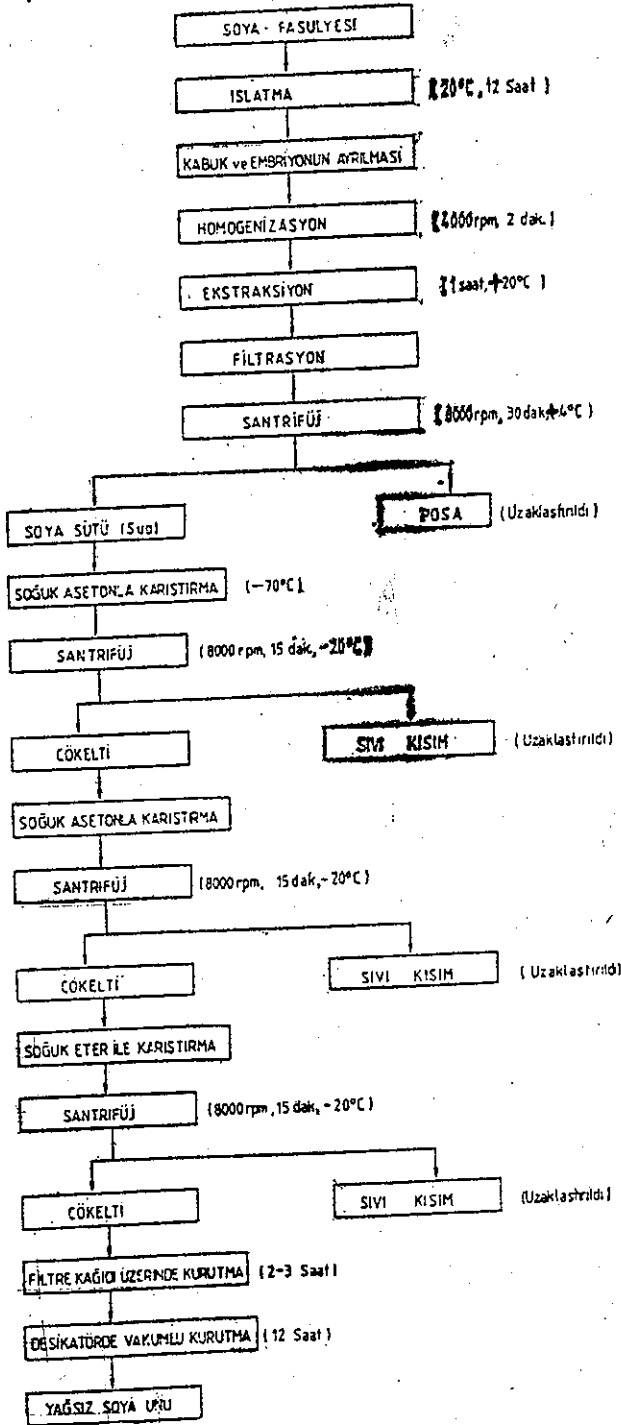
Türkiye'de yetiştirilen soya varyetelerinden 5 tanesinin globulin fraksiyonları ayrılmıştır (ARTIK, 1988). Bu araştırma sonuçlarına göre analize alınan soya varyetelerinde soya proteininin % 17.98 - 28.53'ü 2S, % 27.36 - 29.34'ü 7S, % 36.41 - 51.78'i 11S ve % 1.18 - 5.72'si 15S globulindir. Ayrıca anılan fraksiyonlardan 7S ve 11S globulinin amino asit bileşimleri de belirlenmiştir. Amino asitler içinde glutamik asit ilk sırayı almakta onu aspartik asit, lösin ve arginin izlemektedir. Her iki globulin fraksiyonunda (7S ve 11S) methionin düşük düzeyde bulunmuştur. Methionin düşüklüğü soya fasülyesinde önemli bir eksiklik olarak gözükmektedir (ARTIK, 1988).

Protein fraksiyonlarının molekül ağırlıklarının belirlenmesinde LAEMMLI, (1970) tarafından önerilen yöntem son yıllarda çok kullanılmaktadır. SDS - PAGE olarak anılan bu yöntem soya proteinleri analizinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (MORI ve Ark., 1979).

MATERYAL

Bu araştırmada Türkiye'de yetiştirilen soya fasülyesi çeşitlerinde beş tanesi materyal olarak kullanılmıştır. Bunlar ICR, CORSOY, CAL

* Bu araştırma Kyoto Univ. The Research Institute For Food Science Kyoto Uji 611 (Japonya) de yürütülmüştür.



Şekil 1: Yağsız Soya Unu Üretimi (NAKAMURA ve Ark., 1986).

LAND, BEASON ve ALTONA'dır. Bu soya çeşitlerinin 1000 dane ağırlıkları sırasıyla 208, 152, 154, 198 ve 166 gramdır.

METOD

YAĞSIZ SOYA UNUNUN HAZIRLANMASI :

Soya fasüyesi globulin (glisin) fraksiyonlarının ayrılmasında (2S, 7S, 11S ve 15S) ilk aşama yağsız soya ununun (aseton powder) üretimidir (NAKAMURA ve Ark., 1986). Bu yöntem şekil 1 de şematize edilmiştir.

Yağsız soya unu eldesi için soya fasüyesi, üzerindeki toz, kir ve benzerlerinin uzaklaştırılması amacıyla musluk suyu ile iyice yıkandı. Yıkama sonunda damıtık su ile +20°C de 12 saat ıslatıldı. ıslatma suyu uzaklaştırılan soya fasüyelerinin kabuk ve embrio kısımları uzaklaştırıldı. Kabuk ve embrio kısımları ayrılan soya fasüyeleri homojenizasyon çözeltisi içinde NISSIN ACE homojenizatör aygıtında 4000 devirde 2 dakika homojenize edildi. Homojenizasyon çözeltisi olarak 0.063 M Tris-HCL, 0.001 M 2-Markaptoetanol ve % 2 NaNO₃ içeren ve pH değeri 7.8 olan bir karışım kullanıldı. Homojenizasyondan sonra elde edilen çözelti hacmi 750 ml ye eritildi ve yeterli ekstraksiyon yapımı için +20°C de 1 saat süreyle magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Ekstraksiyon işleminden sonra 3 katlı tülbentten filtre edilerek kaba posa parçacıkları ayrıldı. Filtrat, soya sütü (sup) ve posa kısmının ayrılması amacıyla HITACHI marka sıcaklık kontrollü santrifüj aygıtında 8000 devirde, +4°C de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen soya sütü (sup) içindeki yağların uzaklaştırılması amacıyla (-70°C) de soğuk aseton eklendi. Posa kısmı ayrılarak uzaklaştırıldı. Soğuk aseton ekleme işlemi kuru buz ile sürekli soğutulan etil alkol içinde yapıldı. Bunun amacı sıcaklığın yükselmesini önlemek ve protein parçalanmasını engellemektir. Aseton ve soya sütü karışımı HITACHI marka soğutmalı santrifüj aygıtında 8000 devirde (-20°C) de 15 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı ve çözelti kısmı yeniden soğuk aseton (-70°C) ile karıştırılarak aynı koşullarda santrifüj edildi. Ayrılan çözelti 450 ml soğuk eter (-20°C) ile karıştırıldı ve 8000 devirde -20°C de 15 dakika santrifüj edildi. Eter ile karıştırma işlemi de 2 defa tekrarlandı. Santrifüj ile elde edilen soya unu filtre kağıdı üzerine serildi ve ara sıra karıştırılıp 2-3 saat laboratuvar koşullarında kurutuldu. Daha

sonra bir beherglasaya alınan yağsız soya unu desikatörde 12 saat vakum altında kurutuldu. Elde edilen yağsız soya unu daha sonraki analizler için buzdolabında +4°C de saklandı.

YAĞSIZ SOYA UNUNDAN GLOBULİN FRAKSİYONLARININ AYRILMASI :

Yağsız soya unundan globulin fraksiyonlarının ayrılması amacıyla 0.3 yağsız soya unu (aceton powder) tartıldı ve 5 ml 0.035 M K-Pi puffer içinde çözüldürüldü. Bu çözelti; 0.5 M KPi puffer; 0.4 M NaCl, 0.001 M 2-merkaptto-etanol ve % 2 NaNO₃ içermekte olup pH sı 7.6 dir. Ekstraksiyonun yeterli şekilde gerçekleşmesi için +4°C de 12 saat süreyle magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Bu süre sonunda ekstrakt 9000 devirde, (+4°C) de 20 dakika HITACHI marka soğutmalı santrifüj aygıtında santrifüj edildi. Ayrılan çözelti uzaklaştırıldı, sıvı protom çözeltisinin (sup) optik dansite (absorbans) değerleri 280 nm de SHIMADZU marka spektrofotometrede saptandı. Globulin fraksiyonlarının ayrılmasında ISCO marka SDGC (sucrose density gradient centrifugation) aygıtı kullanıldı (NAKAMURA ve ark., 1984). Hazırlanan protein çözeltilerinin optik densite değerleri 30'a ayarlandı (100 ml örnek için). Bu çözeltiden SDGC için 0.4 ml (150 mg protein) % 10 ve % 30 luk sakkaroz çözeltileri kullanılarak hazırlanan ve ultrasantrifüj sonunda yoğunluk esasına göre plastik SDGC tüpü içinde dizilecek sakkaroz çözeltilisine kondu. Her protein çözeltisi için 3 paralel deney hazırlandı. Plastik tüpler HITACHI marka ultrasantrifüj aygıtında (20°C) de 36000 devir ve 50 mm Hg basınç altında 17.5 saat süreyle santrifüj edildi. Protein fraksiyonları 0.4 ml lik 35 fraksiyona ayrıldı. Ayrılan fraksiyonların O.D. (absorbans) değerleri 280 nm de saptandı. SDGC için kullanılan % 10 ve % 30 luk sakkaroz çözeltileri 0.5 M K-Pi puffer, % 2 NaNO₃, 0.4 M NaCl ve 0.001 M 2-Merkaptoetanol içermektedir. 2-merkapttoetanol kullanımdan hemen önce eklenmiştir (THANH ve SHIBASAKI, 1978).

JEL ELEKTROFOREZ (SDS - PAGE)

Son yıllarda protein analizlerinde SDS-PAGE yöntemi kullanılmaktadır (LAEMMLI, 1970). Bu yöntemde sodyum dodesil sülfat ve poliakrilamid kullanılmaktadır. Poliakrilamid jel, akrila-

midin polimerizasyonu ile elde edilir. Akrilamidin polimerizasyonunu amonyum persülfat veya riboflavin sağlamaktadır. Bunlardan başka N, N, N, N-tetrametilendiamin (TEMED) polimerizasyonu hızlandırır (HAMES ve RICKWOOD, 1981). TEMED ve amonyum persülfat konsantrasyonunun artması polimerizasyonu hızlandırmaktadır. Polimerizasyon sırasında ortamdaki oksijen uzaklaştırılmalıdır. Aksi halde polimerizasyon gerçekleşmez.

SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez)

SDS-PAGE yönteminde 9 ayrı çözelti söz konusudur. Türkçe kaynaklarda pek rastlanamayan bu yöntem aşağıda özetlenmiştir.

SDS - PAGE Çözeltileri

A Çözeltisi : 73 gram akrilamid ve 2 gram BIS (N,N metilenbisakrilamid = C₇H₁₀N₂O₂ = 154.17) damıtık su ile çözündürülerek 250 ml ye tamamlanır.

B Çözeltisi : (1.5 M Tris-HCL) 45.43 gram Tris ve 1 gram SDS (sodyum dodesil sülfat) 12N HCL ile 250 ml seyreltilir. Bu çözeltinin pH değeri 8.8 dir.

C Çözeltisi : (0.5 M Tris-HCL) 6.06 gram Tris ve 0.4 gram SDS 6 N HCL ile 100 ml ye erıştırilir. Bu çözeltinin pH değeri 6.8 dir.

D Çözeltisi : 0.2 gram amonyum peroksidi sülfat [(NH₄)₂S₂O₈ = 224.17] damıtık su ile 2 ml ye erıştırilir ve çözündürülür.

E Çözeltisi : (Elektroforez çözeltisi) (0.025 M Tris, 0.192 M Glisin, % 0.1 SDS) 3.03 gram Tris, 14.41 g glisin ve 1 gram SDS damıtık su ile 1 litreye erıştırilir.

F Çözeltisi : (Örneğin içinde çözündürüldüğü örnek çözeltisi) (0.125 M Tris, % 20 gliserin ve % 4 SDS) 1.514 gram Tris ve 20 mL gliserin karıştırılır. Çözelti pH değeri % 36 lik HCL ile 6.8 ile ayarlanır. Daha sonra 4 gram SDS eklenir ve çözelti damıtık su ile 100 ml ye seyreltilir.

G Çözeltisi : 1 gram Coomassie Brilliant Blue 250, 500 ml metil alkol içinde çözündürülür ve 100 ml asetik asit eklenir ve litreye damıtık su ile tamamlanır.

H Çözeltisi : 100 ml metil alkol ve 70 ml asetik asit damıtık su ile 1 litreye erıştırilir.

I Çözeltisi : 10 mg brom fenol mavisi, 2 ml gliserin ve 0.2 ml 0.5 M Tris-HCL (pH 6.8) damıtık su ile 10 ml ye tamamlanır.

Bu çözeltilerden soya fasülyesi protein analizi için 1X120X160 mm boyutlarında % 12.5 luk bir jel hazırlandı. Bu amaçla öncelikle A, B çözeltileri belirli oranda karıştırıldı. Üzerine damıtık su eklendi. A ve B çözeltileri iyice karıştırıldıktan sonra D çözeltisi ve TEMED eklendi. Bu anda oluşan gaz vakum altında uzaklaştırıldı. Daha sonra bu çözelti ATTO SJ 1060-SD marka elektroforez aygıtının cam plakaları arasına döküldü.

Jelin üst kısmının düz halde jelleşmesi için 1 ml damıtık su mikrosilindirle çözeltinin üst kısmına verildi. 40 dakika jelleşme için beklenildi. Daha sonra konsantre üst jel hazırlandı. Bu üst jel için A, C, D çözeltileri TEMED ve damıtık su kullanıldı, vakumda gazı uzaklaştırıldı ve üzerindeki damıtık su uzaklaştırılan düşük konsantredeki jel üzerine döküldü. Numune konul-

ması amacıyla aralık oluşması için plastik (1 mm aralıklı) aparat kondu ve 40 dakika beklenildi. Daha sonra 2S globulin fraksiyonu 15 mikrolitre 7S globulin fraksiyonu 5 mikrolitre ve 11S globulin fraksiyonu 10 mikrolitre olarak jel hücrelerine kondu. Tüm fraksiyonlar I çözeltisi (işaretleyici) içermekte idi. Plakalar içinde bantlar 9 cm yürüyene kadar 1 saat 50 V ve 4 saat 120 V akım uygulandı. Jel daha sonra cam plakalar arasından dikkatle G çözeltisi içine kondu. Böylece bantların renklenmesi sağlandı. 20 dakika sonunda H çözeltisi içine konuldu ve sürekli çalkalandı. Jel beyazlaşınca kadar çözelti değiştirmeye devam edildi (4 defa). Daha sonra jel vakum altında ve 40°C de kurutuldu ve resimleri çekildi. Bantların ayrımı için -ME ve +ME uygulandı.

Protein fraksiyonlarının molekül ağırlıklarının belirlenmesi amacıyla PHARMACIA firmasının düşük molekül ağırlık tespitine yarayan kalibrasyon kiti kullandı. Bu kit ile ilgili bazı bilgiler tablo 1 de gösterilmiştir. Bu standart protein jelin iki kenarına kondu ve standart protein bantları ve Rf değerleri belirlendi

Tablo 1 : Düşük molekül ağırlık tespitine yarayan kalibrasyon kitinin bazı özellikleri

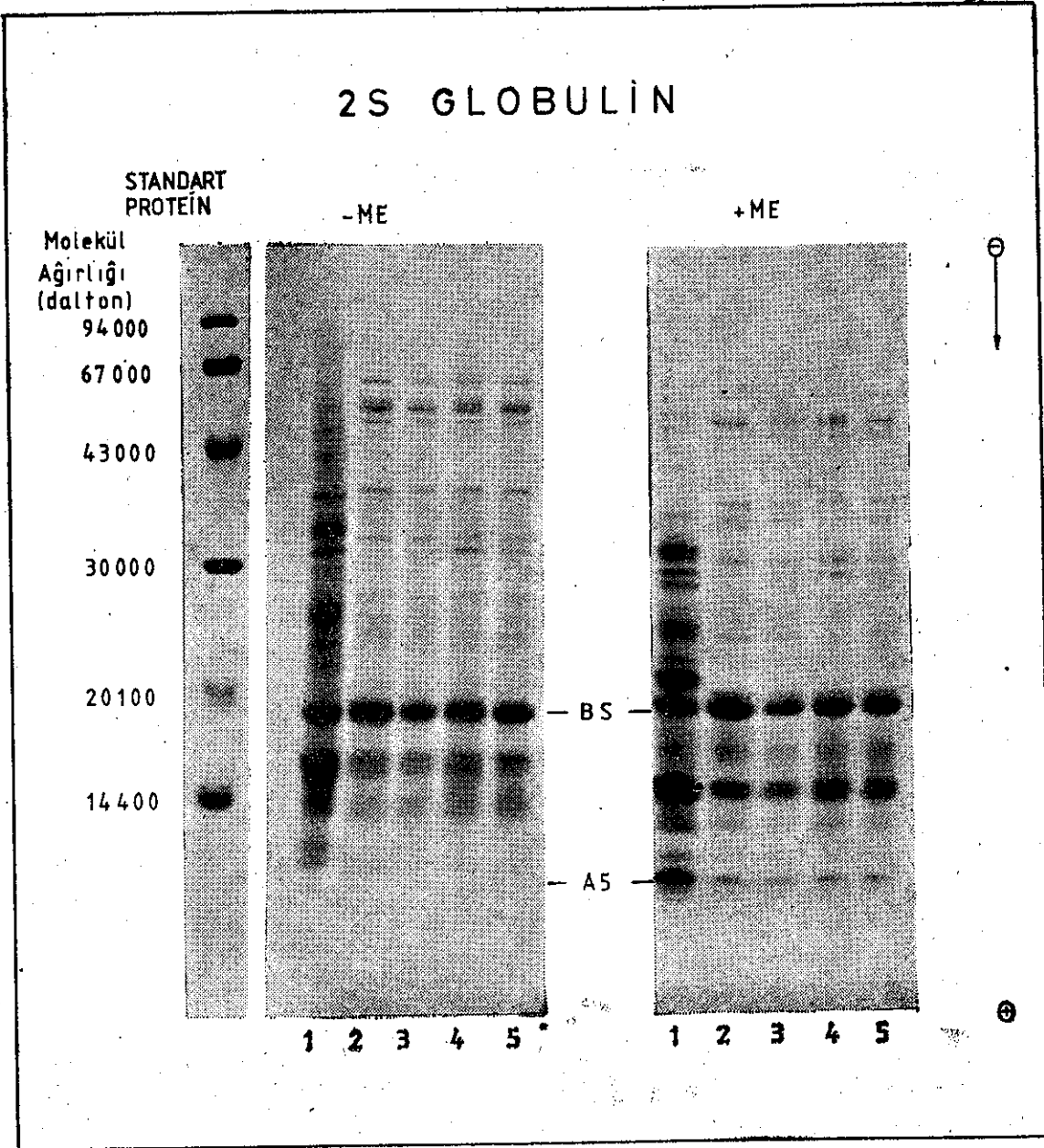
Protein	Ağırlığı	Değeri	Kaynağı
	Molekül	Rf	
Fosforilaz b	94000	4.87	Tavşan kası
Albumin	67000	4.83	Siğir serumu
Ovalbumin	43000	4.63	Yumurta akı
Karbonik Anhidraz	30000	4.48	Siğir eritrosit
Tripsin İnhibitor	20100	4.30	Soya fasülyesi
α -Laktalbumin	14400	4.16	İnek sütü

Merkaptoetanol peptid bağlarını parçalamaya yarar. 1 ml protein fraksiyonuna 3 mikrolitre 2 merkapto-etanol karıştırıldı.

ANALİZ SONUÇLARI

Her soya fasülyesine ait protein fraksiyonlarından 4. fraksiyon 2S, 12. fraksiyon 7S, 18 fraksiyon 11S ve 25. fraksiyon 15S globulin olarak belirlendi. Bu fraksiyonlar jel elektroforez analizine ayrı ayrı -ME ve +ME koşul-

larında alındı. Türkiye'de yetiştirilen soya var yetelerinin 2S, 7S, ve 11S globulin fraksiyonlarının SDS-PAGE analiz sonuçları şekil 2, 3 ve 4 de ayrıntılı gösterilmiştir. 2S globulinin SDS-PAGE analizi sonucunda BS ve A5 bantları belirlendi. A5 bantı +ME koşulunda daha ayrıntılı şekilde gözlemlendi. Bu bantların molekül ağırlıkları sırasıyla 19000 ve 10000 dalton olarak belirlendi. Bu tespit standart proteinin rf değerine göre kıyaslama ile yapılmıştır.

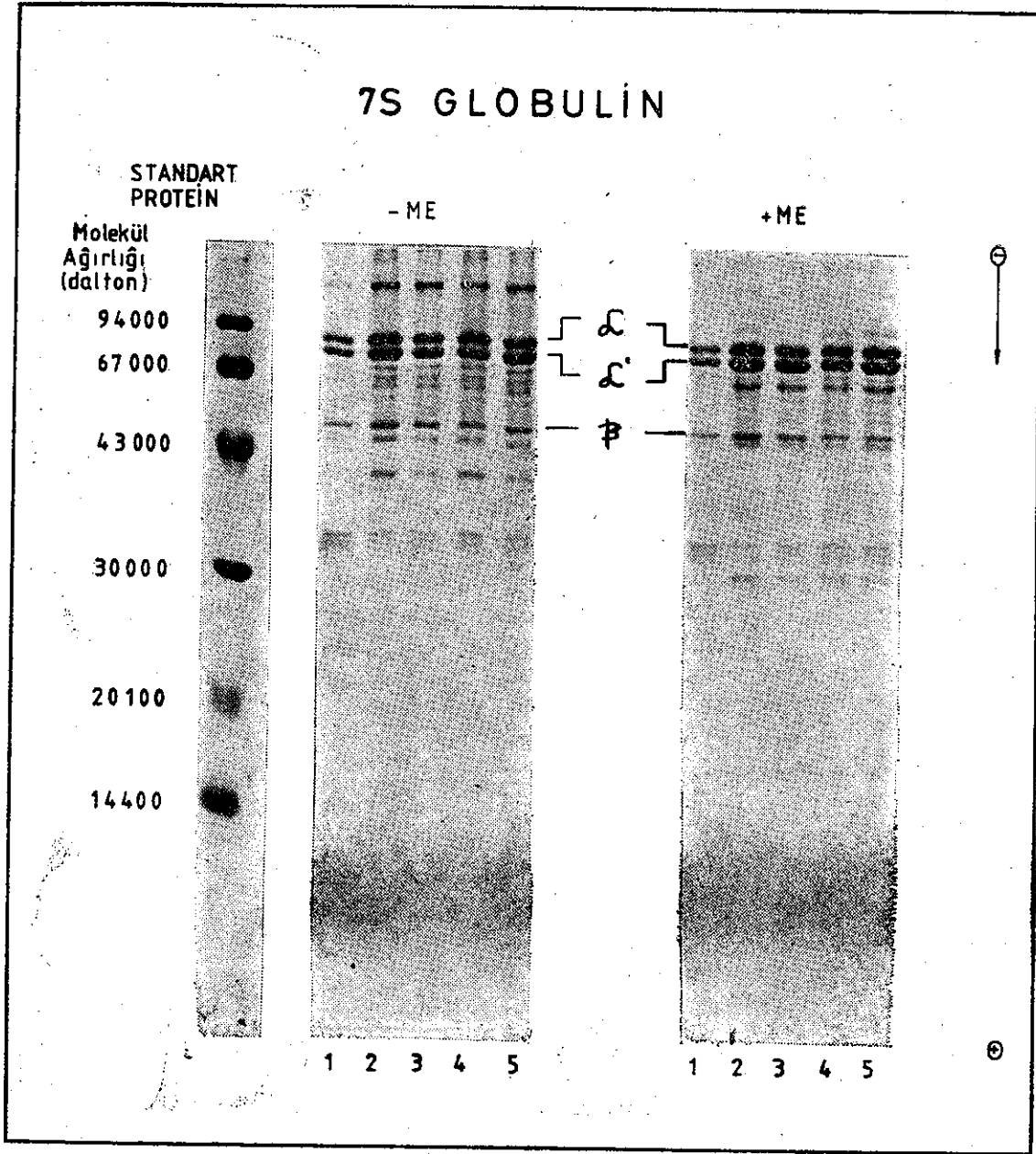


Şekil 2 : Türkiye'de yetiştirilen bazı soya varyetelerinin 2S globulin fraksiyonlarının SDS - PAGE analizi, 1 : ICR, 2 : ALTONA, 3 : CORSOY, 4 : CALLAND ve 5 : BEASON.

7S globulin fraksiyonunda α , α' ve β olmak üzere 3 bant gözlemlendi. Bu bantların molekül ağırlıkları sırasıyla 83000, 76000 ve 53000 dalton olarak belirlendi. Bu sonuçlar literatür bilgileri ile uyumludur (KOSHIYAMA, 1972).

11S globulin fraksiyonunda —ME koşulunda I, A4, A5 ve B3 bantları belirlendi. Bu bant-

ların molekül ağırlıkları sırasıyla 62000, 38000 ve 30000 dalton olarak belirlendi. + ME koşulunda ise A3, A4, A1-2 BS ve A5 bantları belirlendi. Bu bantlardan A3, A4 ve A1-2 nin molekül ağırlıkları 42000, 38000 ve 36000 olarak saptandı. +ME koşulunda bantların iyi bir şekilde ayrıldığı gözlemlendi.

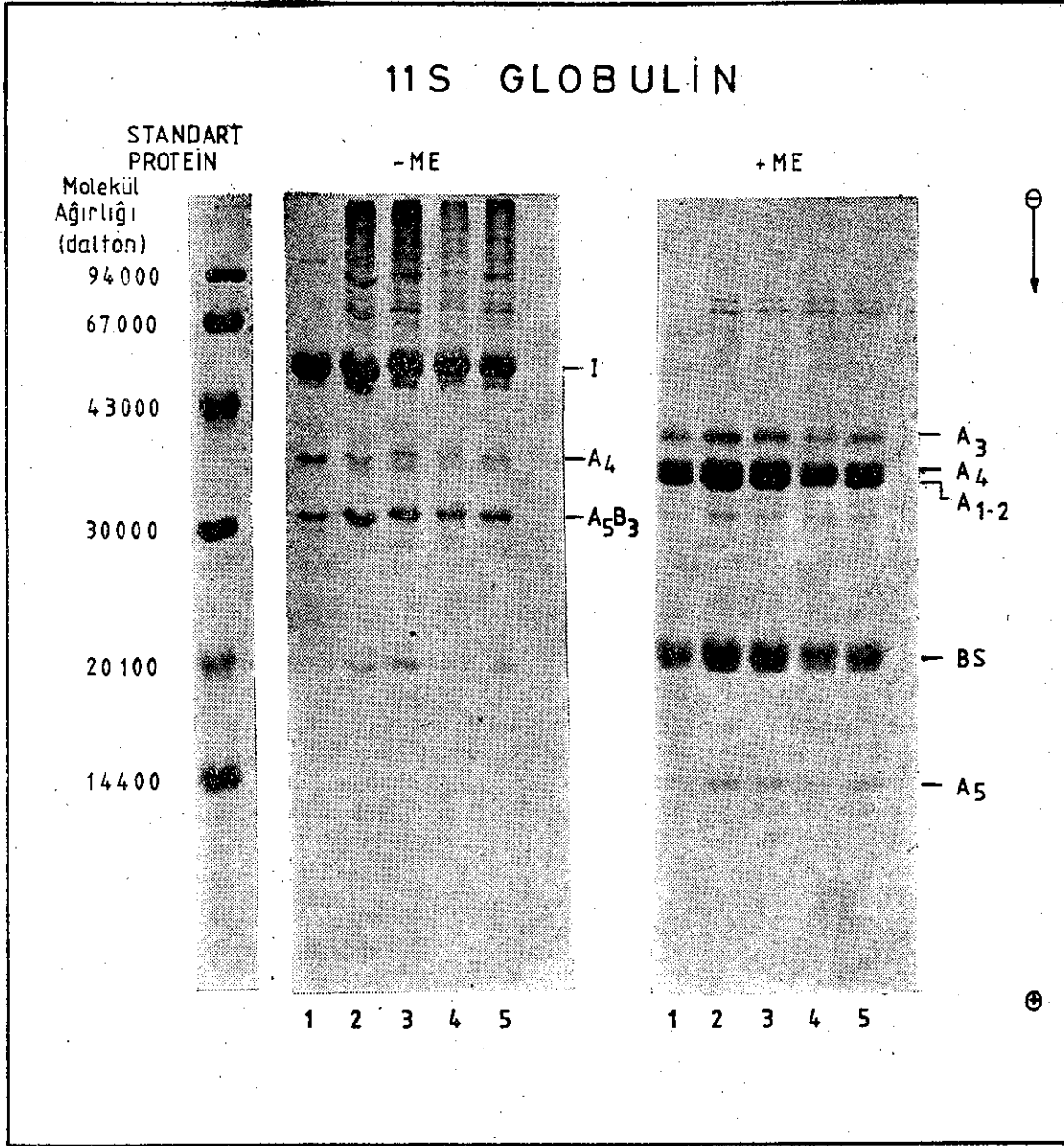


Şekil 3 : Türkiye'de yetiştirilen bazı soya varyetelerinin 7S globulin fraksiyonlarının SDS - PAGE analizi 1 : ICR, 2 : ALTONA, 3 : CORSOY, 4 : CALLAND ve 5 : BEASON.

ÖZET

SDS-PAGE analizinde 2S, 7S ve 11S globulin fraksiyonları analize alındı. 2S globulinin SDS-PAGE analizi ile BS ve A5 gibi iki bant gözlemlendi. Bu iki bantın molekül ağırlığı sırasıyla 19000 - 10000 dalton olarak değerlendirildi. 7S globulinin SDS-PAGE analizinde α , α' ve β olarak üzere 3 bant gözlemlendi. Bu bantların molekül ağırlıkları sırasıyla 83000, 76000 ve 53000 dalton olarak saptandı.

11S globulinin SDS-PAGE analizinde —ME koşulunda, I, A4, A5B3 bantları belirlendi. Bu bantların molekül ağırlıkları sırasıyla 62000, 38000, 30000 dalton olarak bulundu. + ME durumunda ise A3, A4, A1-2, BS ve A5 bantları teşhis edildi. Bu bantlardan A3, A4 ve A1-2'nin molekül ağırlıkları 42000 - 38000 ve 36000 olarak saptandı.



Şekil 4 : Türkiye'de yetiştirilen bazı soya varyetelerinin 11S globulin fraksiyonlarının SDS-PAGE analizi, 1: IOR, 2: ALTONA, 3: CORSOY, 4: CALLAND ve 5: BEASON.

SUMMARY

GEL ELECTROPHORES (SDS-PAGE) ANALYSIS OF GLOBULIN FRACTIONS OF SOME SOYBEAN VARIETIES GROWN IN TURKEY

2S, 7S and 11S globulin fraction, were used for SDS-PAGE analysis. 2S globulin gave two bands as BS and A5 in SDS-PAGE. Molecular weight of these bands were 19000 - 10000 dalton respectively.

7S globulin showed 3 bands which named α , α' and β , their molecular weights were 83000 76000 and 53000 dalton respectively.

11S globulin gave three bands under —ME conditions which these are I, A₄, A₅B₃ and molecular weights 62000, 38000 and 30000 dalton respectively. Under + ME conditions A₃, A₄, A₁₋₂, BS and A₅ band were observed. Molecular weights of A₃, A₄ and A₁₋₂ were 42000, 38000 and 36000 respectively.

KAYNAKLAR

1. ARTIK, N. 1988. Türkiye'de Yetiştirilen Bazı Soya Varyetelerinin Globulin (Glisinin) Fraksiyonlarının Ayrılması ve Amino Asit Bileşimlerinin Belirlenmesi. «Gıda Sanayi» Dergisi Cilt 2, Sayı 2, 19 - 26.
2. HAMES, B.D. ve D. RICKWOOD, 1981. Gel Electrophoresis of Proteins. IRL Press Limited London 290 S.
3. KOSHIYAMA, I., 1972. Purification and Physico-chemical Properties of the 11S Globulin in Soybean Seeds Int. Journal Peptide Protein Research 4: 167 - 176.
4. LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of the Heads of Bacteriophage T4. Nature 227 : 680 - 685.
5. HORI, T.S. UTSUMI ve H. INABA, 1979. Interaction Involving Disulfide Bridges Between Subunits of Soybean Seed Globulin and Between Subunits of Soybean and Sesame Seed Globulins. Agr. Biol. Chem. 43: 2317 - 2322.
6. NAKAMURA, T., UTSUMI, S. ve MORI, T. 1984. Network Structure Formation In Thermally Induced Gelation of Soybean Glycinin. Journal Agricultural Food Chemistry 32 : 349.
7. NAKAMURA, T., UTSUMI, S., ve MORI T., 1986. Interactions During Heat-Induced Gelation In A Mixed System of Soybean 7S and 11S Globulins. Agricultural Biological Chemistry. 50 (10), 2429 - 2435.
8. NALSMITH, W.E.F., 1955. Ultracentrifuge Studies on Soya Bean Protein. Biochim. Biophys. Acta 16: 203 - 210.
9. THANH, V.H., ve SHIBASAKI, K., 1978. Major Proteins of Soybean Seeds. Subunit Structure of β -conglycinin. Journal Agricultural Food Chemistry 26: 692-695.
10. WOLF, W.J. ve BRIGGS, D.R. 1956. Ultracentrifugal Investigation of Effect of Neutral Salts On the Extraction of Soybean Proteins. Arch. Biochem. Biophys. 63 40.
11. WOLF, W.J. ve COWAN, J.C., 1975. Soybeans As a Food Source Rev. ed. CRC Press Cleveland. OH.