

**SÜNE ZARARININ TESPİTİ İÇİN FLOROMETRİK YÖNTEM  
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPING FLUOROMETRIC METHOD FOR  
DETECTION OF SUNN PEST DAMAGE**

**B. ZEYNEP HANÇERLİOĞULLARI**

**YRD. DOÇ. DR. FAHRİYE CEYDA DUDAK ŞEKER**  
**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

B. Zeynep HANÇERLİOĞULLARI' nın hazırladığı "Süne Zararının Tespiti İçin Florometrik Yöntem Geliştirilmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI' nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil VURAL  
Başkan

Yrd. Doç. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER  
Üye (Danışman)

Prof. Dr. Berrin ÖZKAYA  
Üye

Prof. Dr. Hamit KÖKSEL  
Üye

Yrd. Doç. Dr. Elif YOLAÇANER  
Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenikle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun 30.06.2019 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

17 / 06 / 2017

  
(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı

Begüm Zeynep HANÇERLİOĞULLARI

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

15/06/2017



B. ZEYNEP HANÇERLİOĞULLARI

## ÖZET

# SÜNE ZARARININ TESPİTİ İÇİN FLOROMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

**B. Zeynep HANÇERLİOĞULLARI**

**Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER**

**Haziran 2017, 54 Sayfa**

Ülkemizde buğdayın teknolojik özelliklerini olumsuz yönde etkileyen hububat zararlılarının başında Süne (*Eurygaster spp.*) gelmektedir. Bu zararlıların buğday tanesine bıraktıkları sindirim salgıları, özellikle içerdiği proteolitik enzimler, gluten proteinlerinin parçalanmasına neden olarak ekmeklik kalitesini düşürmektedir. Bu nedenle ürüne işlenecek unlarda süne zararının tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır. Süne zararının belirlenebilmesi için yaygın olarak kullanılan yöntemler uzun zaman almakta ve uzman personele ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle, buğdayın süne zararı görüp görmediğinin hızlı, kolay ve yerinde kantitatif tayini büyük önem taşımaktadır.

Yapılan bu çalışmada, süne proteazına yönelik, enzimin etki ettiği yüksek molekül ağırlıklı glutenin altbirimlerinin tekrarlanan dizilimleri kullanılarak, peptit yapısında substrat geliştirilmesi ve substratın florometrik analiz sisteminde denenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, öncelikle un örneklerinden süne proteazı ekstrakte edilmiş ve proteaz aktivitesinin maksimum olduğu ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir. Süne proteazı-peptit etkileşimlerinin daha ayrıntılı bir şekilde incelenebilmesi için elde edilen ekstraktan süne proteazı kısmi olarak saflaştırılmıştır. Daha sonra, peptit-süne proteazı etkileşimi için optimum koşullar belirlenmiştir. Süne proteazının yüksek oranda etki ettiği peptit dizilimi olan 15 amino asit uzunluğundaki *PGQGQQGYPTSPQQ* potansiyel substrat olarak seçilmiştir. Seçilen bu peptit dizilimi FRET donor/alıcı çiftiyle işaretlenmiştir.

Süne proteazının kantitatif tayini için substrat ve süne zararı görmüş undan elde edilen ekstrakt çözeltisi reaksiyon için belirlenen optimum pH ve sıcaklık değerlerinde karıştırılmıştır. Substratın zamana karşı floresans şiddetindeki artış floresans spektrofotometre ile ölçülmüştür. Enzim aktivite değerleri ise reaksiyon ilk hızlarından yola çıkılarak birim zamanda floresans şiddetindeki artıştan hesaplanmış ve reaksiyon hızlarının ekstrakt çözeltisinde artan proteaz konsantrasyonu ile artış gösterdiği saptanmıştır.

Geliştirilen analiz yönteminin performans parametrelerinin belirlenmesinde, ilk olarak farklı Zeleny/modifiye Zeleny fark değerlerine sahip unlardan elde edilen ekstraktlarda enzim aktivite değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra, Zeleny fark değerlerine karşılık aktivite değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Bu florometrik analiz yönteminin -16 ile 2 mL Zeleny fark değeri aralığında doğrusal sonuç verdiği ve bu aralıkta hassasiyetinin 0.14 mL olduğu saptanmıştır. Florojenik substrat ile geliştirilen analiz yönteminin alt tespit limiti ise -2.71 mL Zeleny fark değeri olarak belirlenmiştir. Ayrıca, geliştirilen analiz yönteminin doğruluğunun belirlenebilmesi için süne zararı görmüş farklı bir un örneği incelenmiştir. Un örneğinden elde edilen reaksiyon hızı ile kalibrasyon grafiği kullanılarak Zeleny fark değeri belirlenmiş ve un örneğine ait deneysel olarak elde edilen değer ile karşılaştırılmıştır. Belirlenen bu iki Zeleny fark değeri karşılaştırıldığında hata oranı % 3.1 olarak bulunmuştur.

Çalışmanın sonucunda, geliştirilen yöntemin analiz süresinin, örnek hazırlama süresi 70 dakika ve floresans ölçüm süresi 10 dakika olmak üzere, toplam 80 dakika olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, seçilen florojenik peptit diziliminin süne proteazı aktivitesinin tespiti için önemli bir substrat adayı olduğu belirlenmiştir. Belirlenen peptit substrat ile unlarda süne zararının tespiti için hızlı ve kolay bir analiz metodu geliştirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Buğday, süne, *Eurygaster spp.*, proteaz, peptit, substrat, florometrik analiz

## **ABSTRACT**

### **DEVELOPING FLUOROMETRIC METHOD FOR DETECTION OF SUNN PEST DAMAGE**

**B. ZEYNEP HANCERLIOGULLARI**

**Master of Science, Department of Food Engineering**

**Supervisor: Ass. Prof. Fahriye Ceyda DUDAK SEKER**

**June 2017, 54 Page**

Sunn Pest (*Eurygaster spp.*) is one of the most common wheat bugs in our country, causing excessive losses of crop yield and decrease in technological properties of wheats. During the feeding of Sunn Pest from wheat grain, bug salivates into the grain which contains digestive secretions of bug. Especially the proteolytic enzymes cause the degradation of the gluten proteins and decreasing in bread making quality. Therefore, detection of bug damage in wheat flour samples has critical importance. The methods widely used in the detection of bug damage are time consuming and require specialists. For this reason, rapid, easy and in-situ detection of bug damage in wheats has vital importance.

The aim of this study is the development of peptide substrate for sunn pest proteases using the repeated sequences of high molecular weight glutenin subunits which enzymes cleavage and analyzing the substrate in a fluorometric assay system. For this purpose, firstly sunn pest protease was extracted from flour samples and extraction conditions were determined for the highest protease activity. Then, sunn pest protease was partially purified to examine of peptide-protease interactions more deeply. Afterwards, optimum conditions for peptide-sunn protease interaction were determined. The 15-amino acid long *PGQGQQGYPTSPQQ* peptide sequence, which is a highly affected by proteases, was chosen as the potential substrate. The peptide, which sunn pest proteases act on, was labeled with a FRET flourophore pair.



For the quantitative determination of the sunn pest protease, the fluorescent peptide substrate and the extract solution obtained from bug damaged flour were incubated at optimum pH and temperature conditions. The increase in fluorescence intensity of the substrate was measured by fluorescence spectrophotometer. Enzyme activity values were calculated from the increase in fluorescence intensity per minute. Finally, it was found that the reaction rates were increased in accordance with varied protease concentration in the extract solution.

The determination the performance parameters of the developed analysis method, the enzyme activity values were calculated by extracts obtained from flour samples with different Zeleny / modified Zeleny difference values. Afterwards, the enzyme activity values were plotted against the Zeleny difference values to obtain the calibration curve. It was found that the results of the developed fluorometric analyze method were linear between the range of -16 to 2 mL Zeleny difference value and the sensitivity in this range was 0.14 mL. The lower detection limit of the analysis method was -2.71 mL Zeleny difference value. In addition, a different flour sample was analyzed by fluorometric method in order to determine the accuracy of the developed analysis method. The Zeleny difference value was determined by using the calibration graph with the reaction rate obtained from the flour sample and compared with the experimentally obtained value of the flour sample. When comparing these two Zeleny difference values, the error rate was found to be 3.1%.

As a result of the study, analysis time for the developed assay was determined as 80 minutes including sample preparation as 70 minutes and fluorescence measurement as 10 minutes. The results show that, the selected fluorogenic peptide sequence is an important substrate for the detection of sunn pest protease activity. A rapid and easy method of analysis has been developed for the detection of bug damage with this identified peptide substrate.

**Keywords:** Wheat, sunn pest, *Eurygaster spp.*, protease, peptide, substrate, fluorometric assay



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle bu çalışmanın bilimsel temeller ışığında şekillenmesinde yardım eden ve beni her zaman şanslı hissettiren çok değerli tez danışmanım, hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Fahriye Ceyda Dudak Şeker'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yapmış olduğum bu çalışma boyunca, laboratuvar imkânını sağlayan ve her türlü desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı ve çalışma grubuna,

İyi kötü her anımı paylaştığım, herhangi bir problem olduğunda çözüm odaklı olarak hemen yanıma koşan ve beni motive eden canım laboratuvar arkadaşlarım Nurdan Ersöz, Mücahide Köksal ve E. Merve Çanga' ya, Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığı'na ve Sayın öğretim elemanları ve personeline,

Tez aşamamda yardımcı olan, laboratuvar imkânını sunan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hamit Köksel'e,

Son olarak, ihtiyacım olduğunda maddi manevi yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, bana her zaman güvenen ve benim yanımda olan, hayatta en çok değer verdiğim ve her şeyden çok sevdiğim canım aileme, annem, babam ve kardeşime tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 1002-2150590 kodlu proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar.....	viii
ŞEKİLLER.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Buğdayın Önemi.....	3
2.2. Buğday Tanesinin Fiziksel Yapısı.....	4
2.3. Buğday Tanesinin Kimyasal Bileşimi ve Besin Değeri.....	5
2.4. Buğday Proteinleri.....	6
2.5. Buğday Kalitesini Etkileyen Başlıca Etmenler.....	10
2.5.1. Süne Zararlıları.....	11
2.5.2. Süne Enziminin Bazı Biyokimyasal Özellikleri.....	12
2.5.3. Süne Zararının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	13
3. MATERYAL VE METOT.....	16
3.1. Materyal.....	16
3.2. Metot.....	17
3.2.1. Un Örneklerinde Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	17
3.2.2. Süne Proteazının Un Örneklerinden Ekstraksiyonu.....	18
3.2.3. Süne Proteazının Kısmi Saflaştırılması.....	18
3.2.4. Sentezlenen Peptitlerin Süne Proteazı ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi.....	21
3.2.5. Peptit-Süne Proteazı Etkileşimi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	21
3.2.6. Peptit Substratın Floresans Boya İle İşaretlenmesi.....	22
3.2.7. Florojenik Peptit Substrat ile Süne Proteazı Aktivitesinin Belirlenmesi.....	23
3.2.8. Florometrik Analiz Yöntemi ile Süne Proteazının Kantitatif Tayini.....	23
4. SONUÇLAR.....	25
4.1. Süne Zararı Görmüş Unlarda Proteolitik Aktivitenin Belirlenmesi.....	25
4.2. Süne Proteazı Ekstraksiyonu.....	25

4.3. Süne Proteazının Kısmi Olarak Saflaştırılması.....	29
4.4. Süne Proteazı - Peptit Etkileşiminin İncelenmesi .....	33
4.5. Süne Proteazı-Peptit Etkileşimi İçin Optimum pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi.....	36
4.6. Florojenik Peptit Substrat ile Süne Proteazı Aktivitesinin Belirlenmesi .....	41
4.7. Florometrik Analiz Yöntemi İle Süne Proteazının Kantitatif Tayini .....	45
5. YORUM .....	47
KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ .....	54

## TABLULAR

### Sayfa

Tablo 3.1. 100 mL çözelti için gereken katı amonyum sülfat miktarı (g).....	19
Tablo 4.1. Süne proteazı substratı olarak incelenen peptitlerin dizilimleri .....	34
Tablo 4.2. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptitlerin kırılma miktarları .....	36
Tablo 4.3. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptitlerde en yüksek kırılma miktarlarının belirlendiği pH ve sıcaklık değerleri .....	41

## ŞEKİLLER

### Sayfa

Şekil 2.1. Buğday gluten proteinlerinin sınıflandırılması .....	8
Şekil 4.1. Un konsantrasyonuna karşılık ekstraksiyon çözeltilerindeki proteolitik aktivite değerleri .....	26
Şekil 4.2. İnkübasyon süresine karşılık ekstraksiyon çözeltilerindeki proteolitik aktivite değerleri .....	27
Şekil 4.3. Triton X-100 konsantrasyonuna karşılık ekstraksiyon çözeltilerindeki proteolitik aktivite değerleri .....	28
Şekil 4.4. Amonyum sülfat çözeltisinin doygunluk değerlerine karşılık çözeltilerdeki proteolitik aktivite değerleri .....	29
Şekil 4.5. Proteaz içeren çözeltilerin ekstraksiyon ve kısmi saflaştırma sonrası proteolitik aktivite değerleri .....	31
Şekil 4.6. Jel filtrasyon sisteminden toplanan fraksiyonlara ait 280 nm'deki absorbans değerleri .....	32
Şekil 4.7. Jel filtrasyon sisteminden toplanan fraksiyonlara ait proteolitik aktivite değerleri .....	33
Şekil 4.8. İnkübasyon sonrası peptit 1, enzim ve peptit 1-enzim çözeltilerine ait HPLC kromatogramları .....	34
Şekil 4.9. İnkübasyon sonrası peptit 2, enzim ve peptit 2-enzim çözeltilerine ait HPLC kromatogramları .....	35
Şekil 4.10. İnkübasyon sonrası peptit 3, enzim ve peptit 3-enzim çözeltilerine ait HPLC kromatogramları .....	35
Şekil 4.11. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptit 1'in farklı pH değerlerindeki kırılma miktarları .....	37
Şekil 4.12. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptit 2'nin farklı pH değerlerindeki kırılma miktarları .....	37
Şekil 4.13. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptit 3'ün farklı pH değerlerindeki kırılma miktarları .....	38
Şekil 4.14. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptit 1'in farklı sıcaklıklardaki kırılma miktarları .....	39
Şekil 4.15. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptit 2'nin farklı sıcaklıklardaki kırılma miktarları .....	39
Şekil 4.16. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptit 3'ün farklı sıcaklıklardaki kırılma miktarları .....	40
Şekil 4.17. Florojenik peptit substrata ait uyarma ve emisyon dalgaboyu taraması .....	42
Şekil 4.18. Kısmi saflaştırılmış enzim çözeltisi varlığında ve yokluğunda, florojenik peptit substratın floresans şiddetinin zamana göre değişimi .....	42

Şekil 4.19. Kısmi saflaştırılmış enzim çözeltisinin protein konsantrasyonuna karşılık reaksiyon hızları.....	43
Şekil 4.20. Ekstraksiyon çözeltisinin protein konsantrasyonuna karşılık reaksiyon hızları .....	44
Şekil 4.21. Un örneklerinin Zeleny sedimentasyon fark değerlerine karşılık reaksiyon hızları .....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AACC	:	American Association of Cereal Chemists (Amerikan Hububat Kimyacıları Birliği)
FAO	:	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Birleşik Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)
USDA	:	United States Department of Agriculture (Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı)
HMW-GS	:	High Molecular Weight-Glutenin Subunits (Yüksek Molekül Ağırlıklı Glutenin Alt Üniteleri)
LMW-GS	:	Low Molecular Weight-Glutenin Subunits (Düşük Molekül Ağırlıklı Glutenin Alt Üniteleri)
HPLC	:	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, YPSK)
RP-HPLC	:	Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
DAD	:	Diyot Düzenlemeli Dedektör
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
BSA	:	Sığır Serum Albumini
FRET	:	Floresans Rezonans Enerji Transferi
EDANS	:	5-[(2-Aminoetil)amino]-naftalin-1-sulfonik asit
DABCYL	:	4-(4-Dimetilaminofenilazo)benzoil



# 1. GİRİŞ

Çok eski zamanlardan bu yana, insanlığın en önemli besin öğeleri arasında bulunan tahıl grubu, başlıca buğday, arpa, mısır, çavdar, yulaf gibi hububat çeşitlerini içermektedir. İyi bir enerji kaynağı olan buğday, özellikle günlük beslenmede yer alan ekmeğın hammaddesi olması nedeniyle diğer tahıllar arasında önemli bir yere sahiptir. Buğday gerek farklı iklim koşullarında yetişebilmesi gerekse tarımsal üretim ve depolama kolaylığı sebebiyle dünyada ve ülkemizde geniş üretim alanına ve kapasitesine sahip olan bir bitki çeşididir.

Buğdayların teknolojik özelliklerini olumsuz yönde etkileyen hububat zararlılarının başında gelen süne zararlıları, buğday tanesine bıraktıkları proteolitik enzimler ile tanenin yapısında bulunan ve depo proteini olan viskoelastik özellikteki glutenin parçalanmasına neden olmaktadır. Glutenin hidrolize olması sonucu, zarar gören buğday tanelerinin öğütülmesiyle elde edilen unların kalitesi ve verimi düşerek ekmeklik kalitesi bozulmakta, ayrıca hamur daha yumuşak, cıvık ve yapışkan bir hal alıp elastikiyet azalmaktadır. Bu nedenle ürüne işlenecek unlarda süne zararının tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır. Süne zararının belirlenebilmesi için yaygın olarak kullanılan modifiye Zeleny sedimentasyon testi, SDS-protein jel analizi ve SDS sedimentasyon testi gibi analizler uzun inkübasyon süreleri ve uzman personel gereksinimi gibi dezavantajlara sahiptir. Buğdayın süne zararı görüp görmediğinin hızlı, kolay ve yerinde kantitatif tayini büyük önem taşımaktadır. Proteaz aktivitelerinin hassas ve hızlı bir şekilde saptanmasında florojenik veya kromojenik özelliğe sahip protein/peptit substratları kullanılmaktadır. Süne proteazı aktivitesinin saptanabilmesi için benzer bir substrat bulunmaya çalışılsa da, henüz bu enzime karşı spesifik bir substrat tanımlanmamıştır. Tez kapsamında, süne proteazının etki ettiği yüksek molekül ağırlıklı glutenin alt birimlerinin tekrarlanan dizilimleri kullanılarak, bu enzime yönelik peptit yapısında substrat geliştirilmesi ve bu substratın florometrik analiz sisteminde denenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, öncelikle un rnelerinden süne proteazı ekstrakte edilmiş ve proteaz aktivitesinin maksimum olduğu ekstraksiyon koşulları belirlenerek, süne proteazının kısmi saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Süne proteazının etki ettiği yüksek molekül ağırlıklı glutenin alt birimlerinin tekrarlanan dizilimleri katı faz yöntemi ile sentezlettirilip proteazın yüksek oranda etki ettiği peptit dizilimi potansiyel substrat olarak belirlenmiştir. Son olarak, seçilen peptit substratın un rnelerindeki proteolitik aktivitenin tayininde kullanılabilirliği florometrik bir yöntemle incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda ise, unlarda süne zararının tespiti için hızlı ve kolay bir analiz metodu geliştirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Buğdayın Önemi

Uzun yıllardır temel besin grubu özelliği taşıyan tahıllar, *Gramineae* bitki familyası içerisinde yer almaktadır. Bu familya başlıca, buğday, mısır, pirinç, arpa gibi hububat çeşitlerini içermektedir. Serin iklim tahılları arasında bulunan buğdayın kökeni Asya ve Afrika'nın belli bir bölgesinden gelmektedir [1].

Çok fazla tür ve çeşide sahip olan buğday (*Triticum*) genetik özellikleri bakımından 3 ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar kromozom sayılarına göre; diploid (14), tetraploid (28) ve hekzaploid (42) buğdaylardır. Makarnalık buğday olarak bilinen *Triticum durum* tetraploid buğdayken, hekzaploid yani üç farklı genoma sahip olan buğdaylar arasında, ekmeçlik buğday olarak da bilinen *Triticum aestivum ssp. vulgare* buğdayı yer almaktadır [2]. *T.aestivum* türü buğday, yetiştirildiği iklime bağılı olarak, ekim zamanına göre yazlık veya kışlık, tane rengine göre kırmızı veya beyaz, yapılarındaki hücre duvarı bakımından sert veya yumuşak olup, farklı karakteristik özellikler göstermektedir [3].

1940'lar ve 70'ler arasında dünya genelinde gözlenen "Yeşil Devrim" dönemi, tarımsal üretimin artışında, verimli tahıl türlerinin geliştirilmesinde ve sulama olanaklarının iyileştirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Özellikle yüksek verimde buğday çeşitlerinin elde edilmesi, farklı ülkelerde (Çin, Hindistan, ABD, Kanada gibi) buğdayın ekonomik açıdan zenginleşmesine olanak sağlamıştır [4]. Buğday diğere tahıllara göre önemli avantajlara sahiptir. Verimi yüksek ve tarımı oldukça kolay olan buğdayın, kendi kendini dölleme yeteneği sayesinde genetik stabilitesi fazladır. Ayrıca çeşitli iklim ve toprak koşullarına uyabildiği için dünya üzerinde geniş bir alanda yetiştirilmektedir. Depolamaya uygunluğu ve içerdği besin değeri ile tahılların arasında en önemli yere sahiptir [2].

Günümüzde buğday, ABD, Hindistan, Çin Halk Cumhuriyeti, Rusya, Pakistan, Türkiye ve Kazakistan gibi ülkelerde geniş gıda uygulamalarına ve üretim hacmine sahip tahıl çeşididir. FAO'nun Tahıl Arz ve Talep Özeti'ne göre [5], 2016/2017 sezonunda, dünyada üretilen tahıl miktarının yaklaşık %30'u buğdaydır. USDA'nın Şubat 2017 raporu ise yine 2016/2017 sezonunda, dünya genelinde üretilen 748.2 milyon ton buğdayın, 17.3 milyon tonunun Türkiye'de üretildiğini söylemektedir [6].

Ülkemizde günlük beslenmemizde yer alan en temel gıdalar buğday ürünleri, özellikle buğday ekmeğidir. Bu nedenle buğday üretimi ekonomik açıdan oldukça önemli bir konuma sahiptir. 2016 yılında, Türkiye’de bulunan toplam tarım alanlarının, ekili alan açısından yaklaşık %40’ını tahıllar oluşturmaktadır [7] ve 76 milyon dekar ekili alanda 20 milyon 600 bin ton buğday üretilmiştir. Birim alandan elde edilen verim ise 269 kg/dekar şeklinde belirtilmiştir [8]. Türkiye, tarımsal ürünlerin yetiştirilmesinde verimli topraklara sahip olduğu halde, yine de tahıl ithalatı için her sene önemli derecede kaynak ayrılmaktadır. Örneğin, 2016 yılında bu rakam yaklaşık 1 milyon 150 bin dolar olarak açıklanmıştır [9]. Buğday ithalatı yapılmasının ve ithalatın yıllar içerisinde artış göstermesinin en önemli sebebi, buğdaya dayalı mamul madde (un, makarna, bisküvi, irmik ve bulgur) ihracatının giderek artmasıdır. Örneğin, 2016 yılında 4 milyon tonun üzerinde buğday ithal edilmiş, bu ithalat için yaklaşık 892 bin dolar kaynak ayrılmıştır [3].

## **2.2. Buğday Tanesinin Fiziksel Yapısı**

Genellikle oval şekline sahip olan buğday taneleri, 5-9 mm uzunluğunda ve 35-50 mg ağırlığında olup, büyüklükleri ve ağırlıkları, buğday çeşidine ve buldukları bölgeye bağlı olarak değişmektedir [10]. Örneğin, Kuzey Amerika taneleri ortalama 8 mm uzunluğunda ve 35 mg ağırlığında iken, Avrupa’da yetişen buğdaylar yaklaşık olarak 55 mg ağırlığındadır [11].

Buğday taneleri karyopsis olarak isimlendirilmekte ve tane, perikarp (meyve kabuğu) ve tohum kısmından meydana gelmektedir. Tanenin yaklaşık %5’lik kısmını oluşturan ve tüm taneyi saran perikarp, protein, yağ ve selüloz içermektedir. Tohum kısmı ise sırasıyla, testa (tohum kabuğu), hiyalin, endosperm ve embriyodan (ruşeym, germ) oluşmaktadır [4]. Buğdayın una öğütülmesinde elde edilen kepeğin çok önemli kısmını tohum kabuğu oluşturmaktadır. Kabuk, lifli maddeler açısından; embriyo ise protein, yağ, mineraller, vitaminler (E ve B vitamini) ve enzimler (lipaz ve proteaz) bakımından tanenin diğer kısımlarına göre daha zengindir. Endosperm ise tanenin besin deposu olarak protein ağına gömülü nişasta taneciklerinden oluşmaktadır [11]. Genel olarak özetlendiğinde buğday tanesi, yaklaşık olarak % 2-3 oranında embriyo, %13-17 oranında kepek ve %80-85 oranında da endosperm içermektedir [1].

### 2.3. Buğday Tanesinin Kimyasal Bileşimi ve Besin Değeri

Tahıl tanelerinin kimyasal bileşimine bakıldığında, yüksek miktarda karbonhidrat içerdiği görülmektedir. Karbonhidratın çoğunu endospermde bulunan nişasta oluşturmaktadır. Nişasta endospermde %56-74 oranında bulunurken, kepekte bu oran yaklaşık %2-13 arasındadır [12]. Az miktarda bulunan diğer minör karbonhidrat bileşenleri ise; arabinoksilan (%1.5-8),  $\beta$ -glukan (%0.5-7), şekerler (~%3), selüloz (~%2.5), ve glukofruktanlardır (~%1) [12].

Tahıllarda önemli miktarda bulunan bir diğer bileşen ise proteinlerdir. Genel olarak tahıl grubu %6-15 oranında protein içermektedir. Ayrıca tahıllar az miktarda lipid, mineral ve vitamin (B ve E vitamini) içerir. Örneğin lipid içeriği buğdayda, yaklaşık olarak %1-3 arasındadır [13].

Buğday tanesi, ekme ve diğer fırıncılık ürünlerinin temel bileşenleri olan un ve irmik gibi maddelere öğütüldüğü için ve buğdayın dünya popülasyonunun temel gıda kaynağı olarak yetiştirilmesi nedeniyle tanenin besleyici değeri son derece önem taşımaktadır. Buğday tanesinin bileşimi, çeşitlerine göre ve bölgesel olarak değişiklik göstermesine rağmen ortalama %12 su, %70 karbonhidrat, %12 protein, %2 yağ, %2.2 selüloz ve %1.8 kül içermektedir [3].

Tanedeki protein miktarı, merkezden dışa doğru gittikçe artmakta olup, tane içerisindeki komponentler homojen bir dağılım göstermemektedir [14]. Ana tabakayı koruyan bir kaç katmandan oluşan buğday kepeği, B vitamini ve mineral açısından zengindir ve öğütmenin ilk aşamasında endosperm kısmından ayrılmaktadır. Tahıl ve endospermi korumak için kepek, suda çözünmeyen lif içermektedir ve kepeğin yarısından fazlası lif bileşenlerinden oluşmaktadır (%53) [10]. Kimyasal kompozisyon açısından karmaşık bir dağılım gösteren kepek lifi, esas olarak selüloz, pentozan, ksiloz ve arabinoz polimerlerini içermektedir. Ayrıca, toplam kuru madde bazında buğday kepeği, aynı oranda (%16) protein ve karbonhidratlardan oluşmaktadır. Mineral içeriği ise %7'den fazladır [10]. Endospermin dış tabakası alöron tabakası olarak isimlendirilmektedir. Beslenme açısından önemli olan alöron tabakası genel olarak, protein, enzim ve vitamin (niasin, tiamin ve riboflavin) açısından zengindir [11]. Endospermin iç tabakası ise unlu endosperm olarak adlandırılmakta ve bu tabaka enerji kaynağı olan nişasta taneciklerinden meydana gelmektedir. Karbonhidrat dışında unlu endosperm, yağ (%1.5) ve

protein (%13) içermektedir [10]. Buğday tanesinin sırt ve başakçık eksenine yakın ucunda yer alan embriyo ise yüksek oranda protein (%25) ve yağ (%8-13) içermektedir. Aynı zamanda B vitamini ve E vitamini açısından önemli bir kaynak olan embriyoda nişasta molekülleri bulunmamaktadır [15].

#### **2.4. Buğday Proteinleri**

Endospermde bulunan buğday proteinleri gluten ve gluten dışı proteinler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Gluten dışı buğday proteinleri, albümin ve globülinler olup; toplam buğday unu proteinlerinin %10-20'lik kısmını meydana getirirken, gluten oluşturan proteinler ise gliadin ve gluteninlerdir. Bu proteinler de toplam buğday unu proteinlerinin yaklaşık %80-90'ını oluşturmaktadır [16].

Buğday proteinleri çözünürlüklerine göre ise dört ana gruba ayrılmaktadır. Albüminler suda çözünürken, globülinler tuzlu suda çözünmektedir. Albümin ve globülinler tahıllarda kepek ve embriyoda yoğunlaşmıştır, endospermde çok az bulunmaktadır. Beslenme açısından, içerdikleri esansiyel aminoasitlerce zengin olan bu proteinler ekmek kalitesi üzerinde etkili değildir [17]. Prolaminler, %70'lik etanolde çözünen protein grubuyken, glutelinler ise seyreltik asit ve baz çözeltilerinde çözünmektedir. Buğdayın prolamini *gliadin* proteini olup, glutelini ise *glutenin* proteindir [11]. Endospermdeki depo proteinler olan gliadin ve gluteninler un ve yeterli miktarda su ile karıştırıldığında su alıp şişmekte ve gluten adı verilen viskoelastik yapıyı oluşturmaktadır. Bu iki protein meydana getirdikleri viskoelastik yapıdaki gluten sayesinde hamur oluşturan proteinlerdir ve işlevsellikleri bakımından farklılık göstermektedir. Tek polipeptit zincirlerinden oluşan gliadin hamurun viskozitesine katkı sağlarken, polimerik yapıdaki glutenin hamura elastikiyet özelliği kazandırmaktadır [18]. Kaliteli ekmek yapımında yeterli viskozite ve elastikiyet/mukavemet dengesi önemli bir yere sahiptir. Yetersiz elastik özellikteki gluten, düşük ekmek hacmine neden olurken, yüksek elastikiyet ise daha yüksek ekmek hacminin oluşumuna yol açmaktadır [19].

Hamurun iskeletini meydana getiren gluten, suda çözünmediği için buğday unu hamurundan kolaylıkla ayrılabilir. Hamurun suyla yıkanması sonucu yapıdaki nişasta ve diğer suda çözünen maddeler glutenden ayrılmaktadır. İzole edilmiş gluten kuru madde bazında yaklaşık olarak %80 oranında protein, %8

oranında lipid içermektedir. Geriye kalan kısım ise mineraller ve diğer karbonhidrat bileşikleridir [15].

Ekmeğin oluşumunda büyük role sahip olan gluten, mayalar tarafından fermantasyon sırasında oluşturulan CO<sub>2</sub> gazını tutarak, hamurun kabarmasını sağlamaktadır. Buğday kalitesi ile öğütüldüğü unun kalitesi arasında sıkı bir ilişki vardır. Bu nedenle, ekmeğin üretiminde undaki protein miktarı ve protein kalitesi önemli rol oynamaktadır [19]. Gluten hamur kuvvetine, hamurun gaz tutma özelliklerine ve hacim artışına katkı sağladığı, elde edilen son ürünün tekstürünü iyileştirdiği ve su absorpsiyon oranını yükselttiği için daha çok fırıncılık endüstrisinde kullanılmaktadır. Ayrıca kahvaltılık gevreklerde protein miktarını arttırmak için kullanılan gluten, et ürünlerinde ise su bağlayıcı ve yapı geliştirici ajan olarak yer almaktadır [20]. Bunlara ek olarak, viskoelastik özellikleri nedeniyle gluten tek başına veya soya proteini ile birlikte sentetik peynir üretiminde kullanılmaktadır. Doğal peynirin tekstür ve duyu niteliklerini karşılayan bu sentetik peynir ürünleri, aynı zamanda yüksek maliyetli sodyum kazeinatın ~%30'unun yerini almaktadır [21].

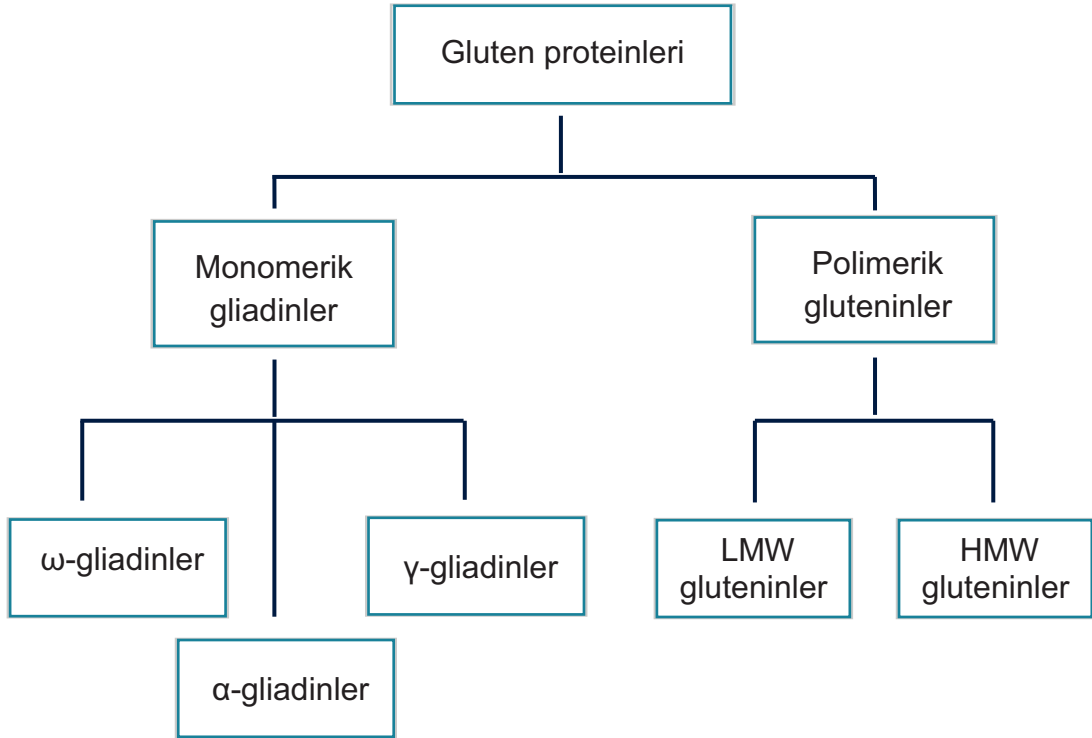
Glutenin aminoasit kompozisyonuna bakıldığında, glutamik asit, prolin ve hidrofobik aminoasit içeriğinin fazla olduğu görülmektedir. Glutenin yaklaşık %35'lik kısmını oluşturan glutamik asit glutamin formundadır. Prolin ise glutende %14 oranında bulunmaktadır. Prolin halka yapıda olduğu için  $\alpha$ -heliks oluşumunu engellemektedir [11]. Gluten proteinlerinin yapısında hidrofobik özellikte olan çok sayıda aminoasit (alanin, lösin, fenilalanin, izolösin, valin gibi) bulunmaktadır. Hidrofobik aminoasit içeriğinin fazla olması gluten yapısının stabilitesine katkı sağlamakta ve gluten proteinleri arasındaki hidrofobik etkileşim, unun reolojik ve ekmeçlik özelliklerini belirlemektedir [21].

Genellikle gluten kompleks proteini, 100 tip polipeptitten fazla polimer içeren ve yapısında kovalent ve kovalent olmayan bağlar ve etkileşimler bulunan bir karışım olarak kabul edilmektedir [22]. Gluten proteinlerinin özelliklerini ve yapısını belirlemede, kimyasal bağlar arasında disülfid bağları önemli rol oynamaktadır. Aynı polipeptit içindeki bağlar monomerik proteinlerin sterik yapısını stabil hale getirirken, farklı polipeptitler arasındaki bağlar özellikle glutenin proteininin yapısının oluşmasında etkilidir. Disülfid bağlarının yanı sıra,



gluten proteinleri arasında kovalent çapraz bağları olan ditrozin ve izopeptit bağları da yine yapı oluşumunda görev almaktadır [12]. Aynı zamanda polimerik gluten proteini, içerdiği zincirler arası hidrojen bağları nedeniyle de sıkı ve düzenli bir yapı göstermektedir [17]. Gluten proteinlerinin bir diğer önemli özelliği, çok düşük yük yoğunluğuna sahip olmalarıdır. Bu yoğunluk, lizin, histidin, arginin ve triptofan gibi bazik aminoasitlerin sayısına bağlıdır. Yapısındaki düşük miktardaki pozitif yükler nedeniyle birbirini itmeyen zincirler kolayca etkileşime girebilmektedir [16].

Buğday tanesinde depo proteini olarak görev alan ve viskoelastik özelliğe sahip olan gluten, monomerik yapıdaki gliadinlerden ve polimerik yapıdaki gluteninlerden meydana gelmiştir (Şekil 2.1) [23].



Şekil 2.1. Buğday gluten proteinlerinin sınıflandırılması ([23])

Buğdayda toplam proteinin yaklaşık %30-45'ini oluşturan buğday glutenini, birbirine disülfid bağlarla bağlanmış glutenin alt birimlerinden meydana gelen heterojen bir karışımdır. Bu alt birimler, tiyol-disülfid değişim reaksiyonlarını teşvik eden reaktiflerle işleme tabi tutularak serbest bırakılabilen alt birimler

olarak tanımlanmaktadır [11]. İki tip glutenin alt birimi polimerin yapı taşı oluşturmaktadır. Bunlar, yüksek molekül ağırlıklı glutenin alt birimi (HMW ya da HMW-GS) ve düşük molekül ağırlıklı glutenin alt birimi (LMW ya da LMW-GS) fraksiyonlarıdır. SDS-PAGE üzerinde molekül ağırlıklarına bakıldığında, HMW-GS için bu değer 80.000-160.000 Da arasındayken, LMW-GS için ise moleküler ağırlığın 30.000-50.000 Da arası değiştiği belirtilmiştir [17].

Bugüne kadar, buğday çeşitlerinde yaklaşık 40'tan fazla farklı HMW-GS bulunmuştur ve bunlar başlıca iki alt gruba ayrılmaktadır: yüksek molekül ağırlıklı *x-tip* HMW-GS ve düşük molekül ağırlıklı *y-tip* HMW-GS [22]. Düşük molekül ağırlıklı glutenin alt birimleri (LMW-GS) ise, yüksek molekül ağırlıklı glutenin alt birimlerine göre daha heterojen yapıya sahip olup, bu grup şimdiye kadar çok iyi bir şekilde karakterize edilememiştir. LMW-GS'nin karakterizasyonundaki zorluğun nedeni bunların HMW-GS'den çok daha fazla genden türemiş olmasıdır. Ayrıca yapısındaki alt birimler, moleküller arası disülfid bağlarının indirgenmesinden sonra çözülmemektedir [24]. Tek bir buğday çeşidinde bulunan farklı LMW-GS sayısının tahmini olarak 7-16 arasında olduğu bildirilmiştir ve bunlar B-, C- ve D-LMW-GS olarak adlandırılmıştır [11]. Düşük molekül ağırlıklı glutenin alt birimleri ile gliadin proteinlerinin benzer molekül ağırlık göstermesi nedeniyle bunları SDS-PAGE üzerinde ayırmanın zor olduğu bildirilmiştir. Fakat geliştirilen farklı elektroforetik yöntemler ve uygun çözücülerin kullanılmasıyla rahatlıkla bu iki protein grubu birbirinden ayrılabilir [16].

LMW-GS ve HMW-GS içerdikleri aminoasit grupları açısından da farklılık göstermektedir. Örneğin; LMW glutenin alt biriminde glisin %5 oranında bulunurken, HMW glutenin alt biriminde bu değer yaklaşık %18-20 oranındadır. Valin, lösin, izölösün ve fenilalanin LMW glutenin alt biriminde fazlayken, bu oran HMW glutenin alt biriminde daha düşüktür [15] .

Glutenin, özellikle HMW-GS, yapısında bulunan çapraz bağlı moleküller arası disülfid bağları nedeniyle yüksek molekül ağırlığına sahiptir. Polimerlerin molekül ağırlıkları da onların fiziksel özelliklerini belirlemektedir. Molekül ağırlığı arttıkça, polimerler daha esnek bir yapı göstermektedir [11]. Gluteninin bu yapıya sahip olması nedeniyle buğdaydaki gluten proteini de elastik özellik kazanmaktadır.

Gliadinler ise tek zincirli polipeptitlerin heterojenik karışımlarıdır. Yapılarında serbest sistein kalıntıları görülmez ve tüm S-S bağları intramoleküler yapı göstermektedir [18]. Gliadinlerin molekül ağırlıkları 30.000-75.000 Da arasında değişmekte olup, bu protein dört ana gruptan oluşmaktadır. Bunlar, düşük pH değerinde, elektroforetik hareketliliğe göre sırasıyla *alpha-* ( $\alpha$ -), *beta-* ( $\beta$ -), *gamma-* ( $\gamma$ -) ve *omega-* ( $\omega$ -) tip *gliadin* şeklinde isimlendirilmektedir [18]. Gliadinler buğdayda bulunan toplam proteinin yaklaşık % 40-50'sini oluşturmaktadır. Yapılarındaki aminoasit kompozisyonuna bakıldığında, gliadinlerin benzer içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Gliadinin neredeyse bütün fraksiyonlarında bulunan prolin, içerdiği fazla sayıdaki  $\beta$ -dönüşler sayesinde yapıya keskin dönüşler kazandırmaktadır [17].

Gliadin proteinlerinin aminoasit dizilimleri karşılaştırıldığında,  $\alpha$ -tip ve  $\gamma$ -tip gliadinlerin LMW-GS ile bağlantılı olduğu görülmektedir. Ayrıca, bu iki tip gliadindeki sistein kalıntılarının hepsi zincir içi disülfid bağları ile ilişkilidir [11]. Diğer gliadin fraksiyonlarının aksine  $\omega$ -tip gliadin sistein kalıntısı içermez ve yapısında metiyonin amino asidi düşük miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle  $\omega$ -tip gliadin sülfür bakımından zayıf prolamin olarak da isimlendirilmektedir [19]. Gliadinin endospermden ayrılmasında ya da ekstraksiyonunda farklı metotlar uygulanmaktadır. Özellikle saflaştırılmada en çok başvurulan yöntem jel filtrasyon kromatografisidir. Yine gliadinleri çeşitlerine ayırmak için ve kalite ölçümünde HPLC ve RP-HPLC teknikleri kullanılmaktadır [22].

## **2.5. Buğday Kalitesini Etkileyen Başlıca Etmenler**

Buğdayın teknolojik kalitesini ve verimini; çeşidin genetik özellikleri ve fenolojik dönemi, iklim koşulları, toprak özellikleri, yabancı otlar, uygulanan farklı agronomik çalışmalar ve hem hasat öncesi, hem de hasat sonrası görülen hastalıklar ya da hububat zararlıları önemli ölçüde etkilemektedir [25].

Hububat zararlıları arasında, özellikle *Hemiptera* takımı, kalkan kanatlı böcekler, çevreye olan adaptasyonları ve ekolojik özellikleri nedeniyle, buğdayda kalite ve verim açısından son derece önemlidir [26]. Hasat öncesi buğdayın verimini ve teknolojik özelliklerini olumsuz etkileyen zararlılarının başında süne *Eurygaster* spp. (*Hemiptera: Scutelleridae*) ve kımıl *Aelia* spp. (*Hemiptera: Pentadomidae*) olarak bilinen böcekler gelmektedir. Süne ve kımıl, buğday üretim hacmini azaltarak, ekonomik açıdan büyük çaplarda kayıplara neden olmaktadır [27].

### 2.5.1. Süne Zararlıları

Literatürde “sunn pest”, “suni bug”, “cereal bug” veya “wheat bug” gibi farklı isimler verilen sünenin dünyada özellikle, Ortadoğu'da, Avrupa ve Asya'nın kuzeyinde, Himalayalar, Kuzey Afrika ve Arabistan'ın büyük bir kısmında yaygın olarak bulunduğu belirtilmiştir [28]. Dünyada *Eurygaster* cinsine bağlı 15 tür bulunmakla birlikte ülkemizde yedi tür tespit edilmiştir. Fakat, bu zararlılar arasında en çok olumsuzluk yaratan *Eurygaster integriceps* Put., *Eurygaster maura* L. ve *Eurygaster austriaca* Schrank türleridir. *E. integriceps* Güney, Güneydoğu Anadolu, Ege ve Trakya'da, *E. maura* ise Orta Anadolu Bölgesi'nde sıklıkla görülen zararlılardır [29].

Buğday verimini ve kalitesini olumsuz yönde etkileyen hububat zararlılarının başında gelen süne türleri bulunduğu bölgeye bağlı olarak, bazen toprak renginde, bazen siyah, kırmızımsı, bazen de kirli beyaz renkte ya da alacalı desenli olup, genellikle 9-14 mm uzunluğunda ve 7-8 mm genişliğindedir. Ayrıca üstten bakıldığında üçgenimsi şekilde (üçgen başlı) ve vücudu yassıca oval yapıda olan süne, yılda tek nesil veren, ömrü 1 sene olan ve ait olduğu familya nedeniyle pis koku salgılayan emici bir böcektir [30].

Sünenin buğdaya verdiği zarar, buğdayın zarar gördüğü anda hangi olgunlaşma döneminde olduğuna bağlı olarak, kurtboğazı, akbaşak ve tane zararı olmak üzere üç kısımda toplanmaktadır [31]. Kurtboğazı zararında, süne kardeşlenme dönemindeki buğday saplarını emip özsuyunu alarak kurutmakta ve bu zarar sonucu bitki başak bağlayamamaktadır. Başakların henüz yaprak kılıfı içinde olduğu çiçeklenme döneminde ise akbaşak zararı meydana gelmekte ve başak tane bağlayamamaktadır. Bunun sonucunda başak, karakteristik beyaz bir renk almaktadır [27]. Hububatın tane bağladığı dönem olan sarı olum evresinde süne zararlısı oluşan tanelere daha az zarar verirken; süt olum evresindeki buğday tanelerine daha fazla zarar vermektedir [32]. Buğday tanesi henüz olgunlaşmadan süne zararına maruz kaldığında, tane içeriğinin büyük bir kısmı emildiği için tane buruşuk, cılız bir hal almaktadır. Bu şekilde yapısında hasar oluşan buğdayın bin tane ağırlığı, hektolitre ağırlığı ve camsılık, sertlik gibi fiziksel kriterleri olumsuz yönde etkilenmektedir. Ayrıca, zarar gören

buğdaylardan elde edilen unların verimi büyük ölçüde azaldığı için, fırıncılık ürünlerinde kalite kaybı gözlenmektedir [28].

Sünenin buğdayı emerek beslenmesi sırasında taneye bıraktığı proteaz enzimlerini içeren sindirim salgıları, özellikle gluten proteinlerinin parçalanmasına ve bunun sonucunda buğday-un kalitesinin önemli ölçüde azalmasına neden olmaktadır [33]. Bu enzimler, süne zararı görmüş taneler öğütüldüğünde una karışmakta ve unda su içeriğinin düşük olması sonucu herhangi bir etki göstermemektedir. Enzim aktivitesinin görülebilmesi için ortamın nem ve sıcaklığının yeterli olması ve belli bir sürenin geçmesi gerekmektedir [31]. Gluten proteinlerinin hidrolize olması sonucu, hamur yumuşamakta, yoğurma ve şekil verme sırasında elastikiyet azalmakta, hamurun elde veya makinada işlenmesi güçleşmektedir. Ayrıca fermentasyonda gaz tutma kapasitesi düşerek, ekmeğin kabarması ve gözenekli bir yapıya sahip olması engellenmektedir [34]. Buğday tanelerinin sadece %2-3'lük kısmının bile süne zararına maruz kalması, ekmeklik kalitesinin bozulması için yeterli bir durumdur [35].

### **2.5.2. Süne Enziminin Bazı Biyokimyasal Özellikleri**

Süne proteazı, nötral ya da kısmi bazik bir proteaz olup, asidik pH değerlerinde düşük bir aktivite göstermektedir. Ayrıca bu proteolitik enzimin, 100°C 15 dk bir ısı işlem uygulaması ile inaktif duruma geldiği ve düşük sıcaklıklarda ise enzim aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir [20]. Süne proteazı pH 8.5 ve 35°C' de optimum aktivite gösteren ve ayrıca suda çözünen, pH 8 izoelektrik noktasına ve 15 kDa molekül ağırlığına sahip olan alkali bir proteazdır [25]. Zarar görmüş buğdaylardan ekstrakte edilerek yürütülen bir çalışmada süne enziminin serin proteazların SH- grubu içeren bir alt grubunda yer aldığı tespit edilmiş ve proteaz aktivitesi sonucunda bazı serbest aminoasitlerin miktarının arttığı ince tabaka kromatografisi ile gösterilmiştir [27]. Bu aminoasitlerden özellikle Pro, Tyr ve Leu HMW-gluteninin alt birimlerinin merkezinde tekrarlanan dizilimler bölgesinde bulunan aminoasitlerdir. Süne proteazının öncelikli olarak bu aminoasitler arasındaki peptid bağı kırması, yüksek molekül ağırlığına sahip glutenin alt birimlerini hızlı bir şekilde etkilemektedir [20].

Yüksek molekül ağırlıklı glutenin alt birimlerinde çok sayıda tekrarlanan peptit dizilimi bulunmaktadır. Yapı içerisinde tekrar eden bu dizilimler; **PGQGQQ**, **PGQGQQGQQ**, **GYPTSPQQ**, **GYPTSLQQ** sekanslarıdır [22]. Gerçekleştirilen başka bir çalışmada, Türkiye'den ve Rusya'dan toplanan süne zararı (*Eurygaster integriceps*) görmüş buğday örneklerinden, glutenini hidrolize eden proteazlar afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. HMW glutenin alt birimi yapısında tekrarlanan aminoasit dizilimlerinden yararlanılarak, rekombinant ve sentetik peptitler (NH<sub>2</sub>-PGQGQQGYPTSLQQ-OH ve NH<sub>2</sub>-GYPTSLQQPGQGQQ-OH) sentezletirilmiş ve MALDI-TOF kütle spektrometresi ile saflaştırılmış enzimlerin bu peptitler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Analiz sonucunda, proteazların GYPTSLQQPGQGQQ peptitini parçalamadığı, özellikle HMW glutenin alt birimlerinden PGQGQQ<sup>^</sup>GYPTSLQQ üzerinde etkili olduğu ve peptit bağına spesifik olarak 6. sıradaki glutaminden sonra kopardığı gözlenmiştir [36].

Serin endoproteaz özellikteki süne proteazı, gluteni meydana getiren gliadin ve glutenin proteinlerini parçalamaktadır. Fakat daha önce yapılan araştırmalarda, yüksek molekül ağırlıklı glutenin altbirimlerinin sünenin proteolitik enzimlerine karşı gliadinden daha duyarlı olduğu ve bu enzimlerin glutenin polimerinin çözünürlüğünü arttırdığı belirtilmiştir [35]. Düşük molekül ağırlıklı glutenin alt birimleri ise süne proteazından yüksek molekül ağırlıklı glutenin altbirimleri kadar büyük ölçüde etkilenmemektedir ve uzun inkübasyon sürelerinde dahi yapısının kısmen korunduğu bildirilmiştir [37].

### **2.5.3. Süne Zararının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler**

Olgunlaşmanın ileri evrelerinde gözlenen süne zararı, buğday tanelerinin göz ile muayene edilmesi sonucu kolayca tespit edilebilmektedir. Günümüzde bu tespit işlemi uzman personel tarafından gerçekleştirilmektedir. Ancak bazı tanelerde süne zararının varlığı çok dikkatli muayene ile belirlenebilmekte fakat kimi zaman da yanlış tespitler yapılabilmektedir [38]. Tane üzerinde meydana gelen küçük siyah noktalar ve noktaların etrafında bazen çöküntü ile birlikte oluşan açık (beyaz) renkli bir bölge süne zararı oluşumunun bir göstergesidir [25].

Ürüne işlenecek olan buğday ununun kalitesinin belirlenmesinde, un örneğinin süne proteazı içerip içermediğinin saptanması büyük önem taşımaktadır. Bu doğrultuda, buğday proteinlerinin fizikokimyasal ve reolojik özelliklerini

belirlemek amacıyla geliştirilmiş olan analizler modifiye edilerek süne zararının belirlenmesinde de kullanılmaktadır [20]. Günümüzde bu amaçla en fazla uygulanan yöntem; Zeleny isimli araştırmacı tarafından ortaya konulan sedimentasyon testinin modifiye edilmesi ile belirlenen “Modifiye Zeleny Sedimentasyon Testi” dir [39]. Zeleny sedimentasyon testi, zayıf asit çözeltisindeki un partiküllerinin şişerek gluten kalitesine göre hacminin artması ve bu partiküllerin belirli zaman içindeki çöken miktarının ölçülmesi esasına dayanmaktadır [40]. Modifiye Zeleny sedimentasyon testi ise, zayıf asit çözeltisindeki un partiküllerinin belirli zaman içinde oluşan çökelti miktarının gluten proteinlerinin hidrolizi sonucu azalması esasına dayanmaktadır [41]. Süne zararı gören unlarda proteolitik enzim aktivitesi sonucunda gluten parçalanmakta ve bunların modifiye sedimentasyon değeri, sedimentasyon değerinden düşük çıkmaktadır. Aradaki fark arttıkça süne zararının da arttığı anlaşılmaktadır. Modifiye Zeleny Sedimentasyon analizi aynı zamanda gluten kalitesi hakkında da fikir vermektedir [31].

Süne proteazı aktivitesini belirlemek amacıyla uygulanan bir diğer yöntem ise SDS-sedimentasyon testidir. Bu yöntemde ise un örneklerinden enzimin ekstrakte edilmesi gerekmektedir. Analiz için süne zararı görmemiş un örneğine enzim ekstraktı eklenmekte ve 1 saat boyunca 35°C’de karıştırılarak inkübe edilmektedir. İnkübasyon sonunda tüplere SDS çözeltisi ilave edilmekte ve 20 dakika bekletildikten sonra tüplerdeki çöken kısımların yükseklikleri ölçülmektedir. Proteaz aktivitesi, hacimdeki azalma ile gözlemlenmektedir [42]. Benzer bir prensibe sahip olan SDS-protein jel analizinde ise enzim ekstraktları gluten ile 2 saat boyunca 37°C’de karıştırılarak inkübe edilmekte ve inkübasyondan sonra asetik asit-SDS çözeltisi ilave edilerek jel oluşumu sağlanmaktadır. SDS-gluten jel hacmi, inkübasyon enzim miktarına bağlı olarak orantılı bir şekilde azalmaktadır [35]. Ancak süne zararının belirlenmesi için kullanılan bu yöntemler uzun sürede ve yüksek örnek miktarı ile gerçekleştirilmektedir. Sedimentasyon seviyeleri arasındaki farkın ölçülebilir seviyeye ulaşması gerektiğinden yöntemler yüksek hassasiyete sahip değildir.

Proteaz aktivitelerinin hassas ve hızlı bir şekilde saptanmasında florojenik veya kromojenik özelliğe sahip protein/peptit substratları kullanılmaktadır. Süne proteazı aktivitesinin saptanabilmesi için de benzer bir substrat bulunmaya



alışılsa da, bu proteazın buğday proteinlerine spesifik olduğu ve proteaz aktivitesi için yaygın olarak kullanılan *hemoglobin*, *jelatin*, *sitokrom-c*, *N-benzol-L-arjinin etil ester*, *benzol-L-tirozin etil ester*, *azokazein*, *keratin* gibi substratlara karşı etkin olmadığı grlmştr [43]. Yapılan başka bir çalışmada, sünenin tükürük bezinden ve midesinden ekstrakte edilen zltide serin ve sistein proteazlarına spesifik floresans substratlara karşı proteolitik aktivite olduğu görülse de, kontrol enzimi ile kıyaslandığında bu aktivitenin çok düşük olduğu saptanmıştır [44].

Tez çalışmasında, yüksek moleküler ağırlıklı glutenin birimlerinin tekrarlanan dizilimlerinin süne proteazı için peptit yapısında substrat geliştirilmesinde kullanılması ve bu substratla hızlı ve hassas analiz sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Süne Zararı Gören Un Örneklerinin Eldesi**

Araştırmada, farklı oranlarda süne zararı görmüş 2015 yaz sezonundan hasat edilen iki farklı ekmeklik buğday örneği ile zarar görmemiş un örnekleri Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Kalite Değerlendirme ve Gıda Bölümü'nden (Ankara) temin edilmiştir. Süne zararı görmüş buğday taneleri laboratuvar tipi valsli değirmende (Sertaş Makina Ltd. Şti., Ankara) öğütülüp, kepekli un örnekleri elde edilmiştir. Zarar görmüş kepekli un örnekleri 425 µm gözenek çapına sahip elekten (Endecotts Limited, İngiltere) geçirilerek kepeksiz un örnekleri elde edilmiştir.

##### **3.1.2. Kimyasal Malzemeler**

Çalışmada kullanılan laktik asit (90%), izopropil alkol (99-100%), amonyum sülfat, fosforik asit (85%) ve dimetil sülfoksit (DMSO) Merck-Millipore (MA, A.B.D) firmasından; etanol Riedel-de Haën (Seelze, Almanya) şirketinden; Superdex 75 kolon dolgu materyali GE Healthcare Life Sciences (İsviçre) şirketinden sağlanmıştır. Bromfenol mavisi ve Coomassie brilliant blue (G-250) boyları Bio-Rad (Kaliforniya, A.B.D) firmasından; etanolamin, Triton X-100, Trizma hidroklorit ve sığır serum albumini (BSA) ise Sigma-Aldrich Co. (St Louis, A.B.D.) firmasından alınmıştır.

##### **3.1.3. UV-Vis Absorpsiyon Spektrofotometresi**

Protein miktarının belirlenmesinde Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, A.B.D.) firmasından sağlanan UV-Vis Absorpsiyon Spektrofotometresi kullanılmıştır. Ölçümler, jel filtrasyon işlemi Agilent marka quartz mikro küvette (80 µL), Bradford yönteminde ise L.P. Italiana (Milano, İtalya) marka polistiren plastik makro küvet (1mL) ile gerçekleştirilmiştir.

##### **3.1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi**

Peptitlerin süne proteazı ile etkileşimlerinin belirlenmesi aşamasında kullanılan HPLC cihazı Agilent 1100 serisine ait kromatografik sistem olup Agilent Technologies Inc. firmasından (Kaliforniya, A.B.D.) sağlanmıştır. Cihaz izokratik pompa, gaz uzaklaştırıcı sistem, oto enjeksiyon sistemi ve DAD dedektör

içermektedir. Kromatografik sistemde ayırım Agilent Bio SEC-3 Size Exclusion (150 Å, 3 µm, 300 mm L, 4.6 mm ID) kolonunda gerçekleştirilmiştir.

### **3.1.5. Floresans Spektrofotometresi**

Floresans işaretli peptitler ile enzim aktivitesinin belirlenmesi aşamasında kullanılan Cary Eclipse Floresans Spektrofotometre ve quartz mikro küvet (50 µL) Varian (Hollanda) firmasından temin edilmiştir. Analiz süresince sabit sıcaklığı sağlamak için peltier sistem kullanılmıştır. Floresans şiddeti ölçülürken PMT voltajı 600 volt ve slit açıklıkları 10 nm olarak belirlenmiştir.

## **3.2. Metot**

### **3.2.1. Un Örneklerinde Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

Süne proteazı içeren kepekli un ve kepeksiz un örnekleri saf su içerisinde 0.3 g/mL konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanıp 1 saat karıştırmalı ortamda inkübe edildikten sonra 12000 g'de 25 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatantlardaki süne proteazının aktivitesi modifiye Zeleny sedimentasyon testine dayalı prosedür ile belirlenmiştir.

Bu amaç doğrultusunda, öncelikle sedimentasyon test çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için, %90'lık laktik asitten 50 mL alınıp saf su ile 200 mL'ye tamamlandıktan sonra hazırlanan çözeltinin dengeye gelmesi için, çözelti geri soğutucu altında 6 saat kaynatılmıştır. Sedimentasyon test çözeltisinin hazırlanmasında ise, elde edilen laktik asit stok çözeltisinden 18 mL alınarak üzerine 20 mL izopropil alkol ilave edilmiş ve saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Ekstraktlardaki proteaz aktivitesinin belirlenebilmesi için, sağlam un örneğinden 0.8 g alınarak üzerine 1 mL bromfenol çözeltisi (4 mg/L) ve 4 mL ekstraktan eklenerek 37°C'de 2 saat boyunca karıştırmalı ortamda inkübe edilmiştir. Kontrol olarak 4 mL ekstrakt içermeyen ekstraksiyon çözeltisi eklenmiştir. İnkübasyon sonrasında örneklere 5 mL sedimentasyon test çözeltisi ilave edilerek 5 dakika boyunca karıştırılmış ve örneklerin bulunduğu dereceli santrifüj tüpleri düz bir zemine alınarak tam 5 dk sonra, süne proteazı içeren ekstraktlar ile kontrol örneğinin çökelti hacimleri belirlenmiştir. Kontrol örneğinin çökelti hacminden ekstraktın çökelti hacmi çıkartılarak proteaz aktivite değerleri (mL) belirlenmiştir.

### **3.2.2. Süne Proteazının Un Örneklerinden Ekstraksiyonu**

Un örneklerinden süne proteazının ekstraksiyonunun optimizasyonu için öncelikle farklı konsantrasyon değerleri denenmiştir. Bu amaçla un örnekleri saf su içerisinde 0.05-0.4 g/mL konsantrasyon aralığında toplam hacim 10 mL olacak şekilde hazırlanarak 1 saat boyunca karıştırılmalı ortamda inkübe edilmiştir. Sonrasında 12000 g'de 25 dk santrifüj normu uygulanarak supernatantlar elde edilmiş ve supernatantlardaki süne proteaz aktivite değerleri modifiye Zeleny sedimentasyon testine dayalı prosedür ile yukarıda anlatıldığı şekilde belirlenip optimum konsantrasyon değeri saptanmıştır. İkinci aşamada ise, en yüksek aktivitenin görüldüğü ekstraksiyon süresi tespit edilmiştir. Bu amaçla, beş farklı inkübasyon (0, 15, 30, 45 ve 60 dk) belirlenerek ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak, proteolitik aktivitenin maksimum olduğu süre ve konsantrasyon değeri kullanılarak en yüksek aktivitenin görüldüğü ekstraksiyon çözeltisi saptanmıştır. Bu doğrultuda literatürde kullanılan ekstraksiyon çözeltileri [35,42] göz önünde bulundurularak, etanolamin ve TritonX-100 içeren saf su çözeltileri ekstraksiyon için kullanılmıştır. Öncelikle farklı konsantrasyon aralığında (% 0.005-0.05 (v/v)) Triton X-100 çözeltileri hazırlanmış ve ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ise, optimum aktivitenin gözlemlendiği Triton X-100 konsantrasyon değeri saptanmıştır. Triton X-100 çözeltisinden sonra ekstraksiyon çözeltisi olarak 0.05 M Tris-HCl (pH 9) ve 0.1M etanolamin (pH 9) çözeltileri denenmiştir. Yine bu çözeltiler ile elde edilen ekstraktlar için proteolitik aktivite, modifiye Zeleny sedimentasyon testine dayalı prosedür ile belirlenmiştir.

### **3.2.3. Süne Proteazının Kısmi Saflaştırılması**

Kısmi saflaştırılma işlemi amonyum sülfat ile proteinlerin çöktürülmesi ve etanol ile proteinlerin çöktürülmesi olarak iki farklı yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Proteinlerin amonyum sülfat ile çöktürülmesi işleminde, öncelikle ekstrakttaki proteinler farklı doygunlukta (%20-70) katı amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. 100 mL çözelti için gereken katı amonyum sülfat miktarları Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. 100 mL çözelti için gereken katı amonyum sülfat miktarı (g)

0°C sıcaklık değerinde		Amonyum sülfatın son konsantrasyonu (% doygunluk)					
		20	30	40	50	60	70
Amonyum sülfatın ilk konsantrasyonu (% doygunluk)	0	<b>10.6</b>	16.4	22.6	29.1	36.1	43.6
	20	0	<b>5.5</b>	11.3	17.5	24.1	31.2
	30		0	<b>5.6</b>	11.7	18.1	24.9
	40			0	<b>5.8</b>	12.0	18.7
	50				0	<b>6.0</b>	12.5
	60					0	<b>6.2</b>

Daha sonra elde edilen ekstrakt hacmine göre katı amonyum sülfat miktarı belirlenip, ekstrakta hesaplanan miktarda amonyum sülfat eklenerek, proteaz içeren amonyum sülfat çözeltileri hazırlanmıştır. 45 dk inkübasyondan sonra çözeltilere 12000 g'de 15 dk santrifüj normu uygulanmıştır. Supernatantlar ayrıldıktan sonra, geriye kalan pelletler ekstrakt hacmi kadar saf suda çözünmüştür. Son olarak, kalan amonyum sülfat çözeltisinin ortamdaki uzaklaştırılması için diyaliz işlemi uygulanmıştır. Diyaliz çözeltisi olarak saf su kullanılmıştır. Protein çözeltileri Sigma-Aldrich Co. (St Louis, A.B.D.) firmasından alınan 14 kDa cut-off değerine sahip selüloz diyaliz membranlarına ilave edildikten sonra örnekler 1 gece boyunca 4°C soğuk oda ortamında karıştırmaya bırakılmıştır. Diyalizden sonra elde edilen protein çözeltilerindeki proteolitik aktivite ise modifiye Zeleny sedimentasyon prosedürü ile belirlenmiştir.

İkinci olarak uygulanan yöntem ise etanol ile proteinleri çöktürme işlemidir [45]. Bu doğrultuda öncelikle %100'lük saf etanol, 1 gece boyunca -20°C'de soğutulmuştur. Ekstraksiyon sonrası elde edilen ekstrakt, soğuk etanol ile hacimce 1:9 oranında karıştırıldıktan sonra çözelti -20°C'de en az 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 13000 g'de 30 dk boyunca santrifüj edilip, supernatant dikkatli bir şekilde ayrılmıştır. Geriye kalan pelletin etanolden iyice uzaklaşması için, pellet 1.5-2 saat boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra, pellet ekstrakt hacmi kadar saf suda çözülmüştür. Çözünen örnek diyalize alınarak 1 gece boyunca 4°C soğuk oda ortamında karıştırmaya bırakılmıştır. Diyaliz öncesi ve sonrası elde edilen protein çözeltilerindeki proteolitik aktivitesi belirlenmiştir. Prosedürde kontrol olarak ekstrakt içermeyen saf su kullanılmıştır ve Zeleny değerleri suyla kıyaslanarak mL olarak verilmiştir.

Süne zararı gören un örneklerinden süne proteazının ekstraksiyonu ve proteazın etanol ile kısmi saflaştırılması sonrası elde edilen konsantre protein çözeltisi düşük basınç jel filtrasyon sistemi kullanılarak molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlara ayrılmıştır. Jel filtrasyon sisteminde, 5 mL'lik yatak hacmine sahip polipropilen plastik kolon Thermo Fisher Scientific şirketinden (Massachusetts, A.B.D) sağlanmıştır. Kolon dolgu materyali olarak 3-70 kDa molekül ağırlığı aralığında ayırım sağlayan, 3-12 pH aralığında stabilite gösteren Superdex 75 maddesi sabit faz olarak kullanılmıştır. Kolon, 5 mL kolon dolgu maddesi ilavesinden sonra saf suyla yıkanmıştır. 2 mL konsantre protein çözeltisi kolona yüklenerek, 1 mL hacminde fraksiyonlar toplanmıştır. Kolona beslenen konsantre protein çözeltisinin ve elde edilen fraksiyonların 280 nm dalga boylarında UV-Vis Absorpsiyon Spektrofotometresi'nde absorbans değerleri ölçülmüştür. Her bir fraksiyondaki proteolitik aktivite belirlenmiştir.

Proteaz içeren konsantre protein çözeltisinin protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir [46]. Bu doğrultuda öncelikle 0.25 - 1.5 mg/mL konsantrasyon aralığında BSA standart çözeltileri hazırlanmıştır. Bradford çözeltisine (1 mL), 40 µL kısmi olarak saflaştırılmış proteaz çözeltisi ve standart çözeltiler ilave edilip, çözeltiler iyice karıştırılmıştır. 15-20 dk oda sıcaklığında inkübasyondan sonra örneklerin 595 nm dalga boyunda UV-Vis Absorpsiyon Spektrofotometresi'nde absorbans değerleri ölçülmüştür. Değerlere göre

kalibrasyon grafiği oluşturularak proteaz içeren çözeltilerin protein miktarı belirlenmiştir.

#### **3.2.4. Sentezlenen Peptitlerin Süne Proteazı ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi**

Süne proteazına özgü peptit substratın bulunması amacıyla, proteazın spesifiklik gösterdiği yüksek moleköl ağırlıklı glutenin altbirimlerinin (HMW-GS) tekrarlanan dizilimlerine göre, X-tip HMW-GS'ye ait 15 amino asit uzunluğundaki PGQGQQGYPTSPQQ ve 18 amino asit uzunluğundaki PGQGQQGQQGYPTSPQQ peptitlerinin yanı sıra, Y-tip HMW-GS'ye ait 15 amino asit uzunluğundaki PGQGQQGYPTSLQQ peptiti, GenScript (Piscataway, NJ, A.B.D.) ticari firmasına katı faz yöntemi ile sentezletirilmiştir.

Peptitlerin süne proteazı ile etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla peptit çözeltileri, kısmen saflaştırılmış proteaz çözeltileri ve peptit-proteaz karışımı inkübe edilerek peptit yapısında meydana gelen değişimler HPLC ile analiz edilmiştir. Bu doğrultuda HPLC sisteminde mobil faz olarak %100 saf su kullanılıp, 0.4 mL/dk akış hızı ve 40 dk analiz süresi uygulanarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 20°C'de sabit tutulmuş ve örneklerin absorbansı DAD dedektör yardımıyla 280 nm dalgaboyunda tespit edilmiştir.

Öncelikle 10 µL saf suda hazırlanan peptit çözeltisi (8 mg/mL) 25 µL kısmen saflaştırılan enzim çözeltisi (2.46 mg/mL) ile karıştırılmış ve saf su ile 350 µL'ye tamamlanmıştır. Kontrol olarak enzim çözeltisi içermeyen peptit ve peptit çözeltisi eklenmemiş enzim çözeltisi aynı konsantrasyonlarda saf su ile hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm çözeltiler 37°C'de 2 saat boyunca karıştırmalı ortamda inkübe edilmiştir. Çözeltiler kolona 50 µL hacminde enjekte edilmiş ve örneklere ait kromatogramlar elde edilmiştir. Reaksiyon sonrası peptite ait pikin alanı, reaksiyona girmeyen peptit pikinin alanı ile karşılaştırılarak peptitlerin kırılma oranları belirlenmiştir.

#### **3.2.5. Peptit-Süne Proteazı Etkileşimi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi**

Proteolitik aktivite için optimum pH ve sıcaklık değerleri saptanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, 10 µL saf suda hazırlanan peptit çözeltisi (8 mg/mL) 25 µL kısmen saflaştırılan enzim çözeltisi (2.46 mg/mL) ile karıştırılmış ve farklı pH değerlerine sahip (pH 6, 7, 8, 9 ve 10) 0.05 M Tris-HCl tamponu ile 350 µL'ye

tamamlanmıştır. Kontrol olarak enzim çözeltisi içermeyen peptit ve peptit çözeltisi eklenmemiş enzim çözeltisi aynı konsantrasyonlarda Tris-HCl tamponu ile hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler 37°C'de 2 saat boyunca karıştırmalı ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında çözeltiler kolona 50 µL hacminde enjekte edilerek kırılan peptit oranları HPLC ile belirlenmiştir. HPLC sisteminde, farklı pH değerlerinde hazırlanan 0.05 M Tris-HCl çözeltileri 10 kat saf suyla seyreltilip mobil faz olarak kullanılmıştır.

Her peptit için optimum pH değeri belirlendikten sonra ikinci aşamada proteaz-peptit inkübasyonu için optimum sıcaklık değerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu aşamada, 10 µL peptit çözeltisi (8 mg/mL) 25 µL kısmen saflaştırılan enzim çözeltisi (2.46 mg/mL) ile karıştırılmış ve bir önceki aşamada belirlenen pH değerine sahip 0.05 M Tris-HCl tamponu ile 350 µL'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon çözeltisi ve kontrol çözeltileri farklı sıcaklıklarda (25, 30, 35, 37 ve 42°C) 2 saat boyunca karıştırmalı ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında farklı sıcaklıklarda peptitlerin kırılma oranları HPLC ile belirlenmiş ve optimum sıcaklık değerine karar verilmiştir.

### **3.2.6. Peptit Substratın Floresans Boya İle İşaretlenmesi**

Bir önceki aşamada süne proteazının en etkin aktivite gösterdiği peptit dizilimi potansiyel süne proteazı substratı olarak seçilmiş ve bu peptit substratın florometrik bir analiz metodu geliştirilmesinde kullanılması hedeflenmiştir.

Peptit substratların florojenik olarak işaretlenmesinde yaygın olarak Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET) yöntemi kullanılmaktadır. FRET mekanizması, enerjinin bir donör (verici) florofordan bir alıcı florofora aktarılması esasına dayanmaktadır. Bu yöntem, özellikle moleküller arası etkileşimin incelenmesinde, moleküllerin hidrolizi ve konformasyonel değişimlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Moleküllerin hidrolizinde, verici florofor uyarılan enerjiyi alıcı florofora aktarmaktadır ve floroforlar arası bağın hidrolizi sonucu aradaki mesafe artmaktadır. Aradaki mesafenin artmasıyla verici floroforda floresans ışımaya meydana gelmektedir [47]. Bu doğrultuda peptit dizilimi FRET ölçümü için donör olarak EDANS ve alıcı olarak Dabcyl çifti ile işaretlenmiştir. FRET çifti ile işaretlenen peptitler GenScript Corp. (NJ. ABD) firması tarafından katı faz yöntemi ile sentezlenmiştir. Peptitlerin saflık değerinin %90'ın üzerinde olduğu belirtilmiştir.



### **3.2.7. Florojenik Peptit Substrat ile Süne Proteazı Aktivitesinin Belirlenmesi**

FRET çifti ile işaretlenen peptit substratın süne proteazının kantitatif tayininde kullanılabilirliğinin saptanması amacıyla peptit substrat kısmen saflaştırılan süne proteazı ile etkileştirilmiş ve peptitin floresans şiddetindeki değişim incelenmiştir. Bu amaçla, FRET işaretli peptit DMSO içerisinde çözündürülerek stok substrat çözeltisi 30 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış ve optimum pH değerindeki 0.05 M Tris-HCl tamponu ile 0.67 mg/mL konsantrasyona seyreltilmiştir. Substrat çözeltisinden 60 µL alınarak farklı konsantrasyonlardaki (1.85 – 0.15 mg/mL) 40 µL kısmen saflaştırılan enzim çözeltisi ile quartz mikroküvette karıştırılmış ve floresans şiddetindeki artış zamana karşı takip edilmiştir. Ölçümler 10 dakika zaman aralığında dakikada bir alınmış ve sıcaklık 37°C'de sabit tutulmuştur.

Geliştirilen florojenik substratın kısmen saflaştırılan süne proteazı ile etkileşimi incelendikten sonra, analiz yönteminin un örneklerindeki süne proteazının kantitatif tayini için kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu aşamada süne zararı gören un örneği saf su içerisinde 0.35 g/mL konsantrasyonda hazırlanarak 45 dk boyunca karıştırmalı ortamda inkübe edilmiştir. Sonrasında 12000 g'de 25 dk santrifüj uygulanarak supernatant elde edilmiş ve süne proteazı içeren bu ekstraktan saf su ile farklı derişimlerde proteaz içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Substrat çözeltisinden (0.67 mg/mL) 60 µL alınıp, 40 µL farklı konsantrasyonlardaki süne proteazı içeren ekstraktla karıştırılmıştır. Floresans şiddetindeki artış zamana karşı takip edilmiştir. Ölçümler 10 dakika zaman aralığında dakikada bir alınmış ve sıcaklık 37°C'de sabit tutulmuştur.

### **3.2.8. Florometrik Analiz Yöntemi ile Süne Proteazının Kantitatif Tayini**

Çalışmanın son aşamasında, farklı oranlarda süne zararı görmüş un örneklerinin geliştirilen florometrik analiz yöntemi ile kantitatif tayini amaçlanmıştır. Bunun için süne zararı gören ve sağlam un örnekleri farklı oranlarda karıştırılarak, değişik oranlarda süne zararı gören un örnekleri elde edilmiştir. Bu un örneklerine modifiye Zeleny sedimentasyon testi [20] uygulanmış ve Zeleny sedimentasyon ile modifiye Zeleny sedimentasyon değerleri arasındaki fark belirlenmiştir. Bu örneklerden 7 g alınarak 20 mL saf su eklenmiş ve 45 dk boyunca karıştırmalı ortamda inkübe edilmiştir.

Sonrasında 12000 g'de 25 dk santrifüj edilerek supernatant elde edilmiştir. Un örneklerinden elde edilen supernatantlardan 40 µL alınıp, 60 µL 0.67 mg/mL konsantrasyondaki substrat çözeltisine ilave edilmiş ve floresans şiddetindeki artış zamana karşı takip edilmiştir. Ölçümler 10 dakika zaman aralığında dakikada bir alınmıştır.

Geliştirilen analiz yönteminin doğruluğunun belirlenebilmesi için süne zararı görmüş farklı bir un örneği florometrik yöntem ile analiz edilmiştir. Un örneğinden 7 g alınarak 20 mL saf su eklenmiş ve 45 dk boyunca karıştırılmalı ortamda inkübe edildikten sonra 12000 g'de 25 dk santrifüj edilerek supernatant elde edilmiştir. Elde edilen supernatanttan 40 µL alınıp, 60 µL 0.67 mg/mL konsantrasyondaki substrat çözeltisine ilave edilmiş ve floresans şiddetindeki artış zamana karşı takip edilmiştir. Un örneğindeki proteolitik aktivite bir önceki basamakta elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak belirlenmiş ve un örneğine ait Zeleny sedimentasyon ile modifiye Zeleny sedimentasyon değerleri arasındaki fark ile karşılaştırılmıştır.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. Süne Zararı Görmüş Unlarda Proteolitik Aktivitenin Belirlenmesi

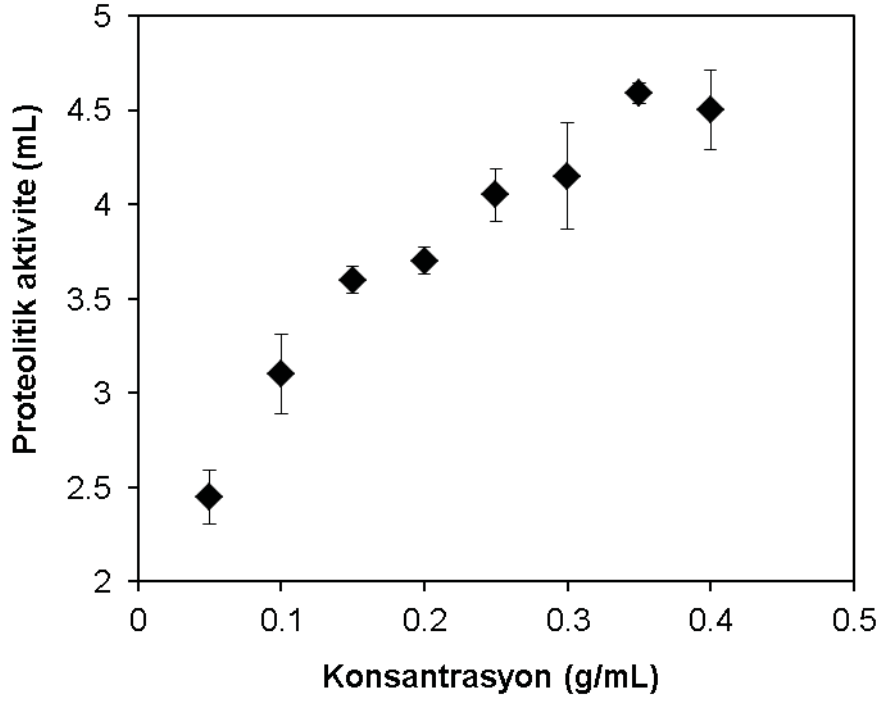
Süne zararı görmüş buğday tanelerinin öğütülmesiyle elde edilen kepekli un ve kepeksiz un örneklerindeki proteolitik aktivite modifiye Zeleny sedimentasyon testine dayalı prosedür ile belirlenmiştir. Bu aşamada un örneklerine saf su ilave edilerek süne proteazının suya geçmesi amaçlanmıştır. İnkübasyon sonunda suda çözünmeyen bileşenler santrifüj işlemi ile uzaklaştırılarak proteolitik aktiviteye sahip ekstraktlar elde edilmiştir. Ekstraktlardaki proteolitik aktivitenin kantitatif olarak belirlenebilmesi için ekstraktlar süne zararı görmemiş sağlam un örnekleriyle etkileştirilmiştir. Kontrol olarak sağlam un örneğine ekstrakt hacmi kadar saf su eklenmiştir. İnkübasyon sonrasında sağlam un örneğinin sedimentasyonu sağlanmış ve kontrol örneğinin çökelti hacminden ekstrakt içeren örneğin çökelti hacmi çıkartılarak proteaz aktivite değerleri belirlenmiştir.

Sonuçlara göre kepekli un örneğinden elde edilen ekstraktta proteolitik aktivite değeri  $3.75 (\pm 0.14)$  mL olarak bulunurken, kepeksiz un örneğinde bu değer  $3.4 (\pm 0.21)$  mL olarak bulunmuştur. Kepekli un örneğinden elde edilen ekstraktta daha yüksek proteolitik aktivite görüldüğünden, çalışmanın ilerleyen aşamalarındaki süne proteazının ekstraksiyonu ve kısmi saflaştırılmasında kepekli un örneği kullanılmıştır.

### 4.2. Süne Proteazı Ekstraksiyonu

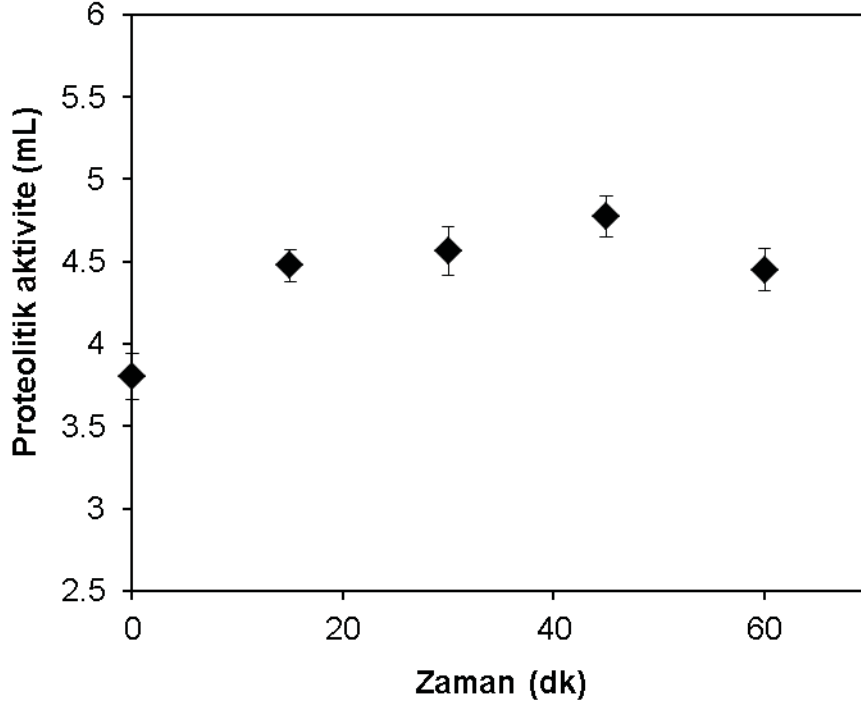
Süne proteazının un örneklerinden maksimum aktiviteyi verecek şekilde ekstrakte edilmesi amacıyla ekstraksiyon koşulları optimize edilmiştir. Öncelikle optimum konsantrasyon değerinin belirlenebilmesi için un örnekleri  $0.05-0.4$  g/mL konsantrasyon aralığında saf su ile ekstrakte edilmiş ve ekstraktlardaki süne proteaz aktivite değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.1).

Un örneğinin konsantrasyonu arttıkça ekstrakttaki proteolitik aktivitenin de arttığı görülmüştür. Ancak,  $0.35$  g/mL konsantrasyon değerinin üzerinde artış görülmemiştir. Bu durumun,  $0.4$  g/mL konsantrasyonda çözeltinin oldukça viskoz bir hal almasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle, un örneklerinden süne proteazının ekstraksiyonunda optimum konsantrasyon değeri  $0.35$  g/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Un konsantrasyonuna karşılık ekstraksiyon çözeltilerindeki proteolitik aktivite değerleri

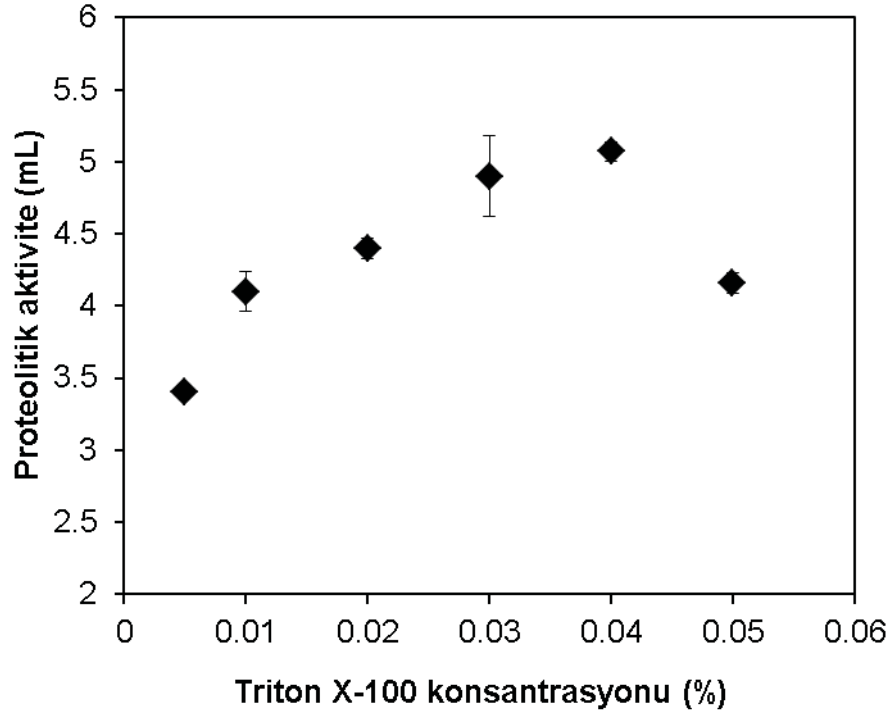
İkinci aşamada ise optimum konsantrasyon miktarı kullanılarak, ekstraksiyon süresine karşılık proteaz aktivitesindeki değişim incelenmiştir. Bu amaçla, süne proteazı içeren un örneği saf su içerisinde karıştırılıp farklı sürelerde inkübe edilmiş ve santrifüje alınmıştır. Elde edilen ekstraktlardaki proteaz aktivitesi modifiye Zeleny sedimentasyon testine dayalı prosedür ile belirlenmiştir (Şekil 4.2). İnkübasyon süresi arttıkça proteolitik aktivitenin arttığı ve 45 dakikadan sonra önemli bir değişim olmadığı görülmüştür. Un örneklerinden süne proteazının ekstraksiyonunda optimum inkübasyon süresi 45 dk olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2. İnkübasyon süresine karşılık ekstraksiyon çözeltilerindeki proteolitik aktivite değerleri

Son olarak en yüksek proteolitik aktivitenin görüldüğü konsantrasyon değeri ve ekstraksiyon süresi kullanılarak, ekstraksiyon çözeltilisine karar verilmiştir. Bu amaçla ilk olarak % 0.005-0.05 konsantrasyon aralığında Triton X-100 çözeltileri kullanılmıştır ve ekstraktlardaki proteaz aktiviteleri belirlenmiştir. Deneyde kontrol olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Triton X-100 çözeltileri kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda Triton X-100 içeren ekstraktlara ait proteaz aktivite değerleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

Ekstraksiyon çözeltilisindeki Triton X-100 miktarı arttıkça, ekstraktın proteolitik aktivitesinde de artış görülmüştür. Bu artış %0.04 Triton X-100 konsantrasyonuna kadar devam etmiş, ancak % 0.05 konsantrasyonunda önemli bir azalış gözlenmiştir. Ancak en yüksek proteaz aktivitesinin görüldüğü %0.04 Triton X-100 konsantrasyonundaki proteolitik aktivite değerinin ( $4.95 \pm 0.07$  mL) saf sudan elde edilen değere çok yakın olduğu ( $4.7 \pm 0.22$  mL) belirlenmiştir. Triton X-100 çözeltilisinin ileriki aşamalarda gerçekleştirilecek florometrik analiz yöntemine girişimde bulunma ihtimali göz önüne alınarak, bu çözeltilinin ekstraksiyon aşamasında kullanılmamasına karar verilmiştir.

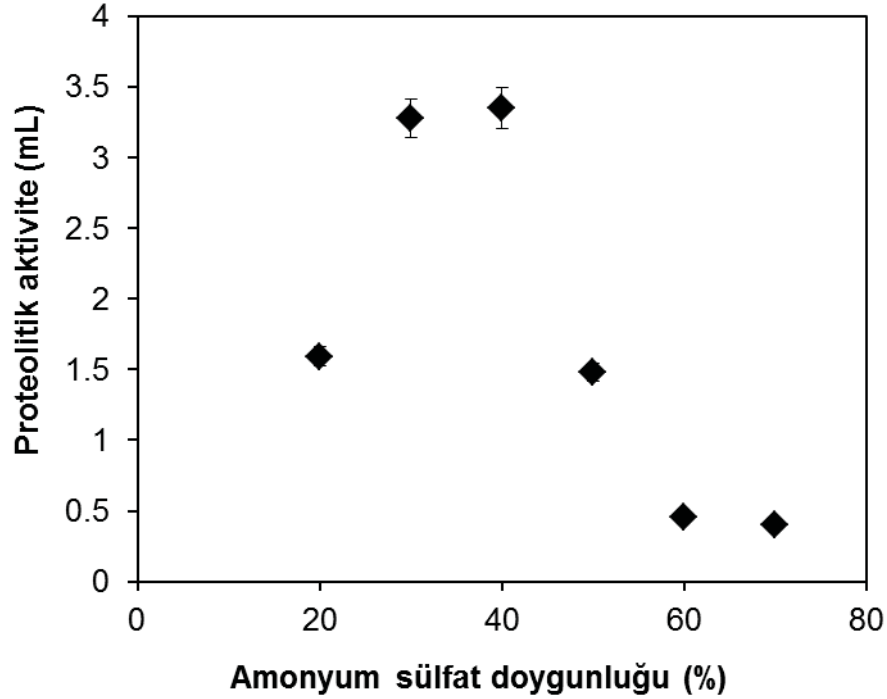


Şekil 4.3. Triton X-100 konsantrasyonuna karşılık ekstraksiyon çözeltilerindeki proteolitik aktivite değerleri

Triton X-100 çözeltilerinden sonra ekstraksiyonda sırasıyla 0.05 M Tris-HCl (pH 9) ve 0.1 M etanolamin (pH 9) çözeltileri kullanılmış ve ekstraktlardaki proteaz aktiviteleri belirlenmiştir. Süne proteazı içermeyen Tris-HCl ve etanolamin çözeltileri kontrol olarak kullanılmıştır. Modifiye Zeleny testine dayalı prosedür ile belirlenen ekstraktlardaki proteolitik aktivite değerleri incelendiğinde hem 0.05 M Tris-HCl çözeltisi için ( $2.99 \pm 0.28$  mL) hem de 0.1 M etanolamin çözeltisi için ( $1.57 \pm 0.1$  mL) bu değerlerin çok düşük olduğu görülmüştür. Ancak, un ekstraktlarındaki proteolitik aktivitenin belirlendiği çözeltilerde sedimentasyonun etkin bir biçimde gerçekleşmediği ve kontrol örneğinde de çökelti hacminin çok düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, Tris-HCl ve etanolamin çözeltilerinin ekstraktlardaki proteolitik aktivitenin belirlendiği modifiye Zeleny testine dayalı yöntemde kullanılamayacağına ve böylece diğer ekstraksiyon parametrelerinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmayacağına karar verilmiştir. Bu nedenle, un örneklerinden süne proteazının ekstraksiyonu için en iyi çözücünün su olduğu belirlenmiş ve çalışmanın sonraki aşamalarında saf su kullanılmıştır.

### 4.3. Süne Proteazının Kısmi Olarak Saflaştırılması

Süne proteazı-peptit etkileşimlerinin daha ayrıntılı bir şekilde incelenebilmesi için elde edilen ekstraktan süne proteazı kısmi olarak saflaştırılmıştır. İlk olarak ekstraktlardaki proteinler farklı doygunlukta (% 20-70) katı amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Amonyum sülfat çözeltisi santrifüj işlemi ile ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra proteinler tekrar saf su ile çözündürülmüştür. Daha sonra ortamdaki kalan amonyum sülfatı uzaklaştırmak için diyaliz işlemi uygulanmıştır. Diyaliz sonrası elde edilen proteaz içeren çözeltilerdeki proteolitik aktivite modifiye Zeleny sedimentasyon testine dayalı prosedür ile belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Amonyum sülfat çözeltisinin doygunluk değerlerine karşılık çözeltilerdeki proteolitik aktivite değerleri

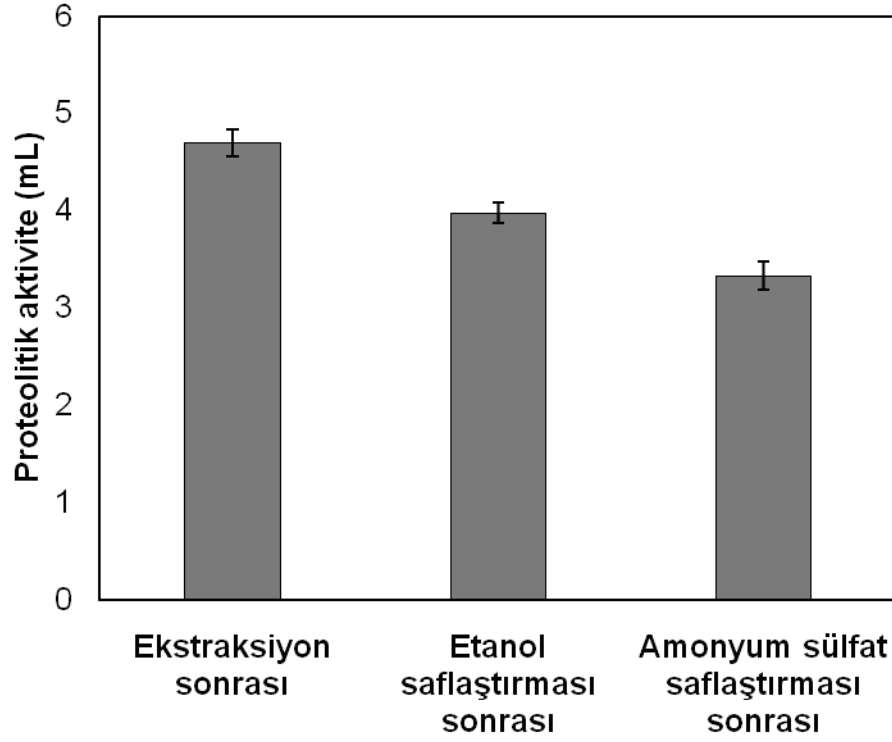
Kısmi saflaştırma işleminde kullanılan amonyum sülfat çözeltisinin doygunluk derecesi arttıkça ilk başta çözeltilerdeki proteolitik aktivite artmıştır. En yüksek proteolitik aktivitenin % 40 doygunluğa sahip amonyum sülfat ile hazırlanan protein çözeltisinde olduğu görülmüştür. Ancak bu değer üzerinde çözeltilerdeki proteaz aktivitesinin tekrar azaldığı gözlenmiştir.

Kısmi saflaştırılmada ikinci yöntem olarak etanol ile proteinleri çöktürme işlemi uygulanmıştır. Öncelikle soğuk % 100'lük saf etanol, proteaz içeren ekstrakta 1:9 oranında ilave edilmiştir. İnkübasyon ve santrifüj işlemlerinden sonra, elde edilen pellet iyice kurutularak saf suyla tekrar çözündürülmüştür. Çözelti diyalize alınarak, diyaliz öncesi ve sonrası proteolitik aktivite değerleri belirlenmiştir. Etanol kullanılarak kısmi olarak saflaştırılan çözeltinin diyaliz öncesi proteolitik aktivite değeri 3.69 mL, diyaliz sonrası ise bu değer 3.60 mL olarak ölçülmüştür. Diyaliz öncesi ve sonrası proteolitik aktivite değerleri birbirine çok yakın çıkmıştır. Bu da etanol ile ekstrakttaki proteinlerin çöktürülmesi yönteminde diyaliz işleminin çok fazla etkili olmadığını göstermektedir. Bu nedenle etanol ile kısmi saflaştırma işleminde elde edilen protein çözeltisinin diyaliz edilmemesine karar verilmiştir.

Bu iki farklı kısmi saflaştırma yöntemlerinden hangisinin daha etkili olduğunu belirlemek amacıyla un örneğinden ekstrakte edilen çözeltinin proteolitik aktivite değeri, %40 doygunlukta katı amonyum sülfatla ve etanol çözeltisi ile kısmi olarak saflaştırılmış protein çözeltilerindeki proteolitik aktivite değerleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.5).

Süne zararı görmüş un örneklerinden elde edilen ekstraktlardaki proteazın kısmi olarak saflaştırılmasında etanol ile çöktürme işleminin amonyum sülfat ile çöktürme yönteminden daha etkin olduğu görülmüştür. Ancak etanol ile kısmi saflaştırılan protein çözeltisinde de bir miktar enzim kaybı görülmüştür. Ancak etanol ile protein çöktürmesi sonrası elde edilen pellet daha düşük hacimdeki saf suyla çözündürülerek çözeltideki proteaz konsantrasyonunun artırılması düşünülmüştür.

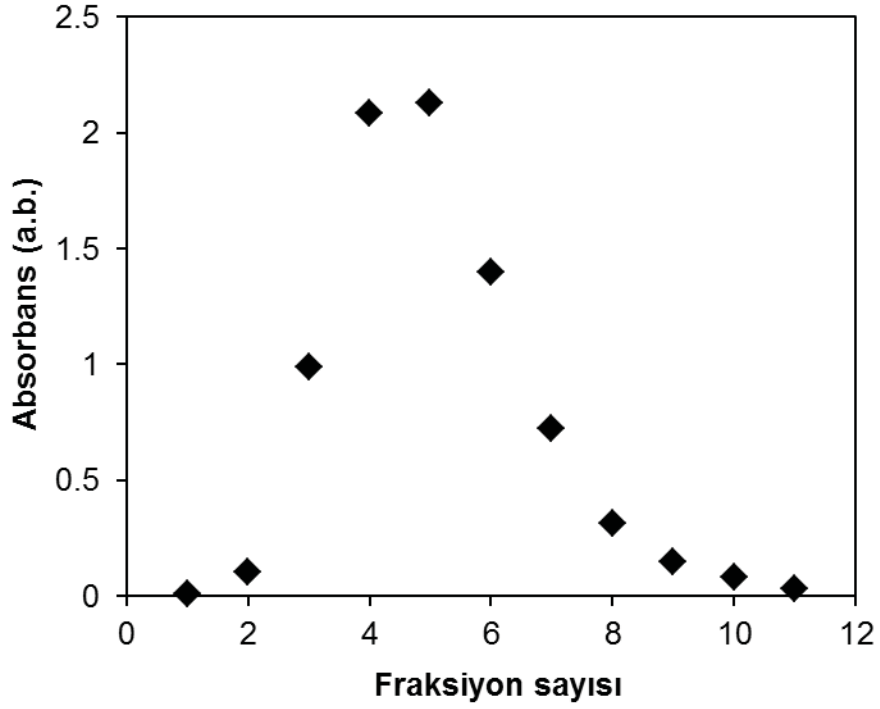




Şekil 4.5. Proteaz içeren çözeltilerin ekstraksiyon ve kısmi saflaştırma sonrası proteolitik aktivite değerleri

Çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere kısmi saflaştırma işleminde protein konsantrasyonu artırılmış ve çözeltilerin proteolitik aktivite değeri  $5 \pm 0.07$  mL olarak tespit edilmiştir. Bu çözeltilerin toplam protein miktarının belirlenebilmesi için Bradford yöntemi [46] kullanılmış ve protein miktarı 2.46 mg/mL olarak bulunmuştur.

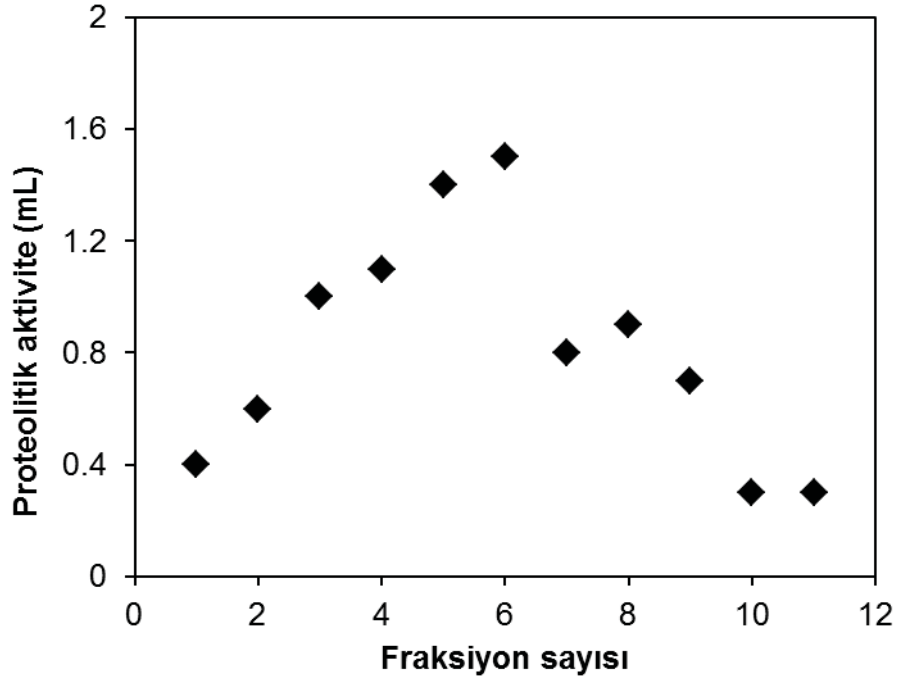
Kısmi olarak saflaştırılan süne proteazının saflık derecesinin artırılması için jel filtrasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla, kısmi olarak saflaştırılan protein çözeltilerinden 2 mL düşük basınç jel filtrasyon sistemine beslenmiş ve hacimleri 1 mL olacak şekilde 11 fraksiyon toplanmıştır. Jel filtrasyon sonucu elde edilen bu fraksiyonların protein miktarları UV-Vis Absorpsiyon Spektrofotometresi'nde belirlenmiştir. Fraksiyonların 280 nm'deki absorbans değerleri Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Jel filtrasyon sisteminden toplanan fraksiyonlara ait 280 nm'deki absorbans değerleri

Jel filtrasyon sisteminden elde edilen fraksiyonlarda süne proteazının varlığının tespiti için her bir fraksiyondaki proteolitik aktivite modifiye Zeleny sedimentasyon testine dayalı prosedür ile belirlenmiştir (Şekil 4.7).

Jel filtrasyon sonrası elde edilen fraksiyonlardaki proteaz aktivitelerinin çok düşük olduğu görülmüştür. Bunun, jel filtrasyon sisteminden elde edilen fraksiyonlarda proteinlerin çok fazla seyrelmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca, fraksiyonlardaki proteolitik aktivite değerleri, fraksiyonların protein miktarlarıyla uyumlu çıkmıştır. Yüksek protein içeriğine sahip fraksiyonlarda proteolitik aktivite yüksekken, protein miktarının azalmasıyla aktivitede de düşüş görülmektedir. Bu çözelti içerisindeki süne proteazının belirli fraksiyonlarda yoğunlaşmadığını ve kullanılan jel filtrasyon kolonunda diğer proteinlerden etkin bir şekilde ayrılmadığını göstermektedir. Bu nedenle süne proteazının jel filtrasyon sistemi ile ileri saflaştırılmasının yapılmamasına ve çalışmanın sonraki aşamalarında kısmi saflaştırılmış protein çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir.



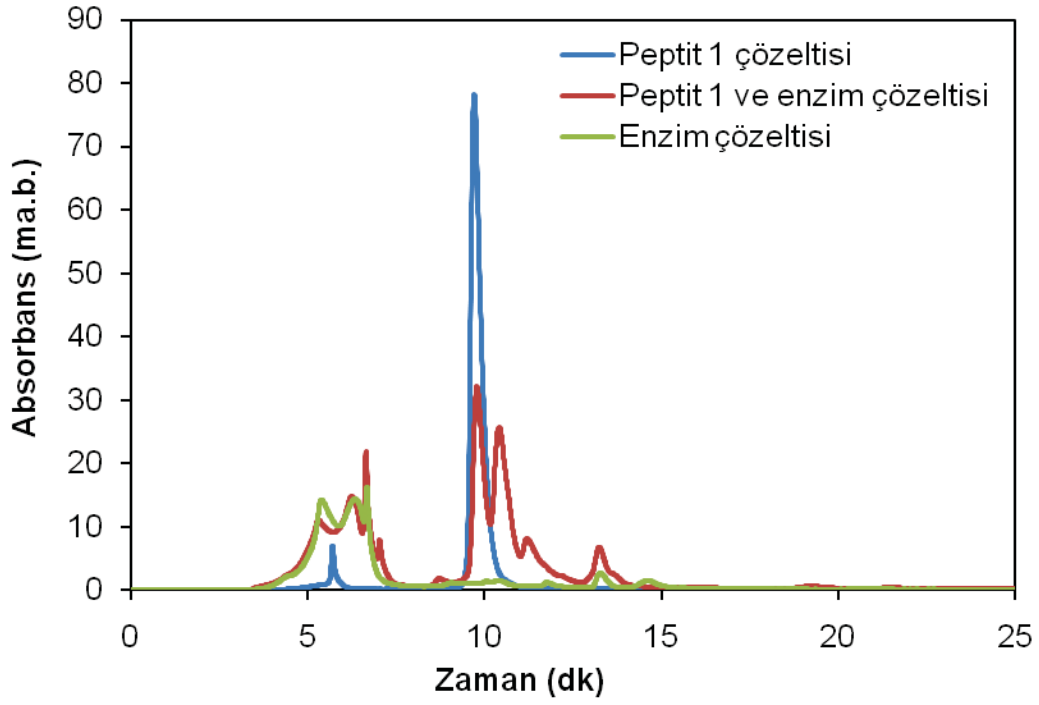
Şekil 4.7. Jel filtrasyon sisteminden toplanan fraksiyonlara ait proteolitik aktivite değerleri

#### 4.4. Süne Proteazı - Peptit Etkileşiminin İncelenmesi

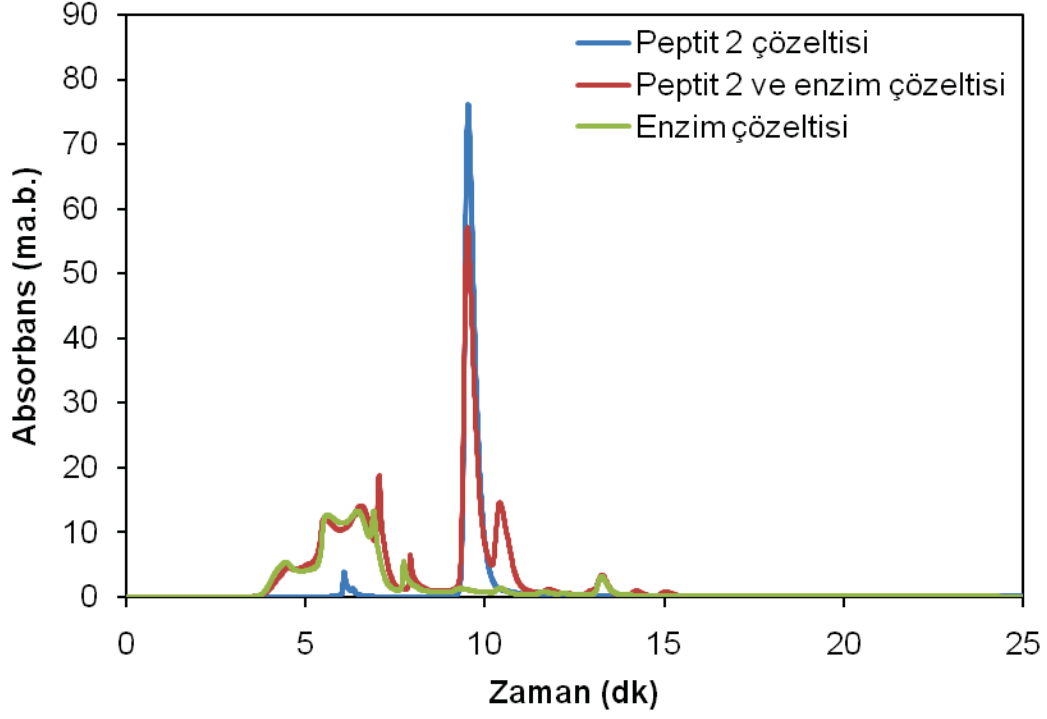
Süne proteazına özgü substrat olarak kullanılması düşünülen peptitlere ait amino asit dizilimleri ve peptit kodları Tablo 4.1'de verilmiştir. İlk olarak kepekli un örneklerinden süne proteazı belirlenen optimum ekstraksiyon koşullarında ekstrakte edilmiştir. Daha sonra ekstrakttaki proteinler saf etanol ile kısmi olarak saflaştırılmış ve derişik hale getirilmiştir. Kısmi saflaştırma sonrası elde edilen proteaz içeren çözeltinin, sentezlenen 3 farklı peptit ile etkileşimi HPLC'de incelenmiştir. Bu amaçla, saf su içinde hazırlanan enzim çözeltisi peptit çözeltisi ile karıştırılmış ve 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Peptit yapısında meydana gelen değişimlerin belirlenebilmesi için aynı konsantrasyonlarda enzim içermeyen peptit ve peptit içermeyen enzim çözeltileri saf su kullanılarak hazırlanmış ve aynı şekilde inkübe edilmiştir. Peptit 1, peptit 2 ve peptit 3'ün süne proteazı ile etkileşimlerinden elde edilen kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.1. Süne proteazı substratı olarak incelenen peptitlerin dizilimleri

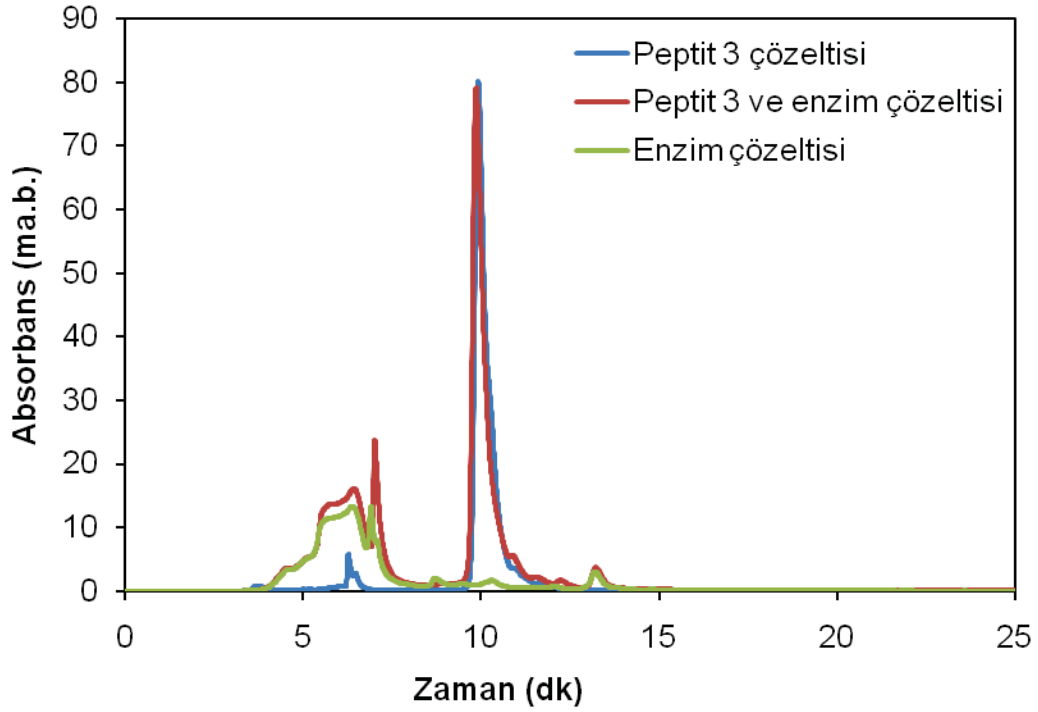
<b><u>Peptit 1</u></b>	<i>PGQGQQGYPTSPQQ</i>
<b><u>Peptit 2</u></b>	<i>PGQGQQGQQGYPTSPQQ</i>
<b><u>Peptit 3</u></b>	<i>PGQGQQGYPTS_LQQ</i>



Şekil 4.8. İnkübasyon sonrası peptit 1, enzim ve peptit 1-enzim çözeltilerine ait HPLC kromatogramları



Şekil 4.9. İnkübasyon sonrası peptit 2, enzim ve peptit 2-enzim çözeltilerine ait HPLC kromatogramları



Şekil 4.10. İnkübasyon sonrası peptit 3, enzim ve peptit 3-enzim çözeltilerine ait HPLC kromatogramları

Elde edilen kromatogramlarda kısmi olarak saflaştırılan enzim çözeltisinin 4. dakikadan başlayıp yaklaşık olarak 8. dakikaya kadar geniş bir aralıkta pik verdiği görülmüştür. Peptitlere ait pikler ise 10. dakikada görülmüştür. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptit çözeltilerine ait kromatogramlar incelendiğinde 10. dakikada görülen pikte azalmayla birlikte, hemen arkasından kırılan peptit fraksiyonlarına ait yeni oluşan pik gözlenmiştir. Peptitlere ait 10. dakikadaki pikin alanı, enzimle etkileşim sonrası aynı pikin alanıyla karşılaştırılarak peptitlere ait % kırılma miktarları hesaplanmış ve Tablo 4.2’de verilmiştir.

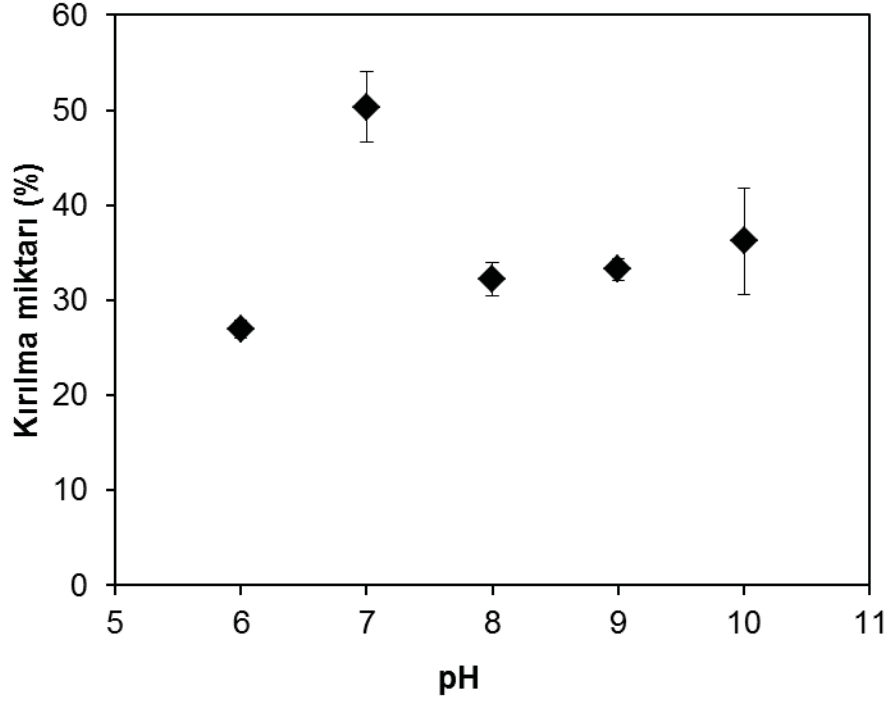
Tablo 4.2. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptitlerin kırılma miktarları

<u>Peptit kodu</u>	<u>Kırılma miktarı (%)</u>
Peptit 1	58.9
Peptit 2	21.4
Peptit 3	4.73

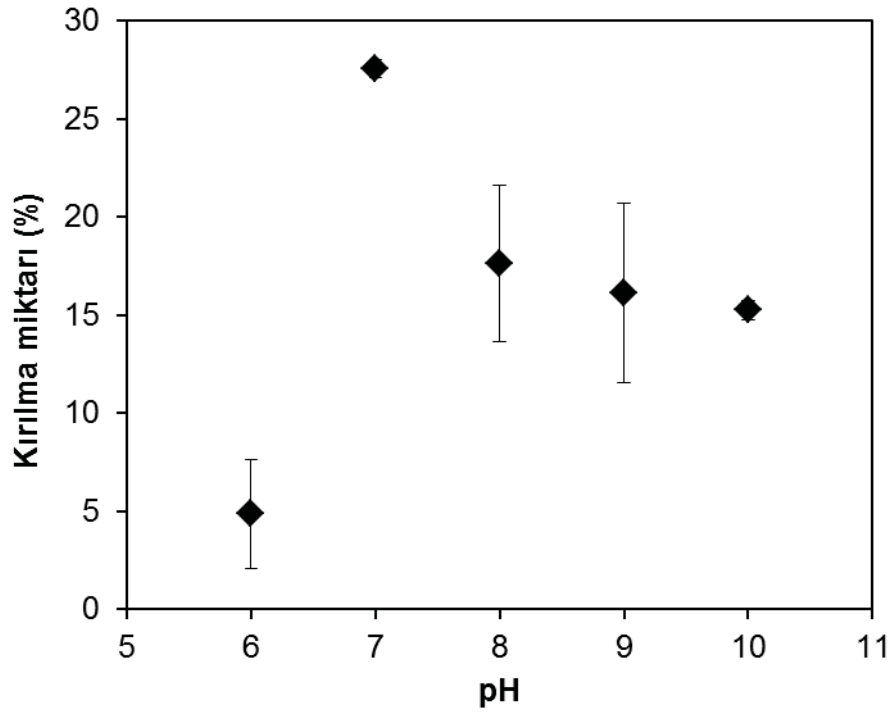
Süne proteazı içeren kısmi saflaştırılmış protein çözeltisi ile etkileşim sonrasında her üç peptitte de kırılma gözlenmiştir. En yüksek kırılmanın peptit 1’e ait olduğu görülmüştür. Peptit 3’de ise bu değişim oldukça azdır.

#### **4.5. Süne Proteazı-Peptit Etkileşimi İçin Optimum pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi**

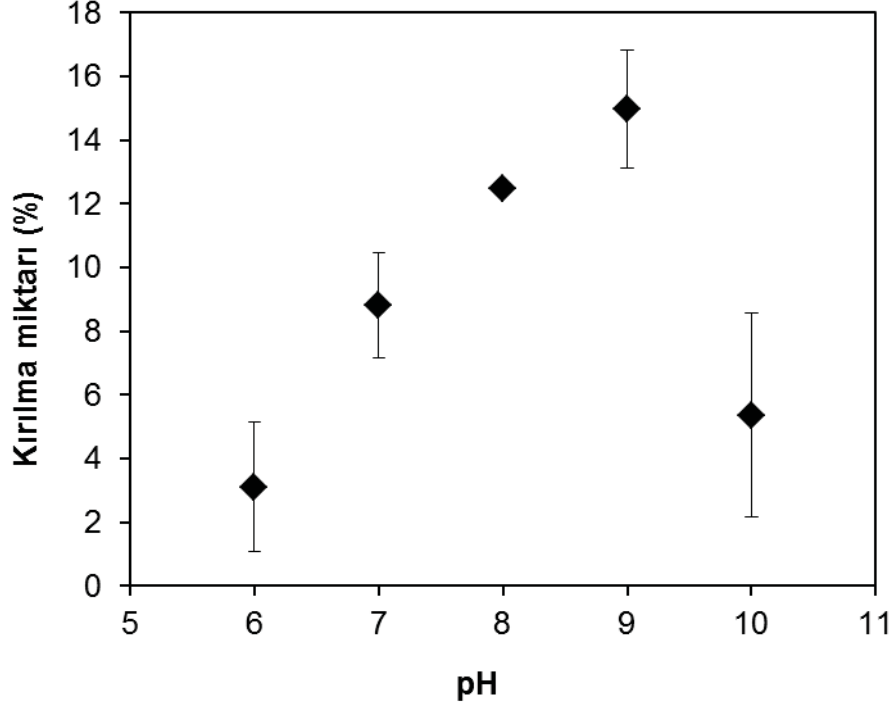
Potansiyel süne proteazı substratları olarak kullanılması düşünülen peptitlerin enzim ile etkileşimlerinde optimum pH ve sıcaklık değerlerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, sadece enzim içeren, sadece peptit içeren, enzim ve peptit içeren çözeltiler farklı pH değerlerine ( pH 6, 7, 8, 9 ve 10) sahip tampon çözeltileri kullanılarak hazırlanmış ve örnekler 37°C’de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Peptitlerin enzim çözeltisi ile etkileşimleri HPLC’de incelenmiştir. Peptitlere ait pikin alanı, enzimle etkileşim sonrası aynı pikin alanıyla karşılaştırılarak peptitlere ait % kırılma miktarları hesaplanmıştır. Herbir peptit için farklı pH değerlerindeki % kırılma miktarları belirlenmiştir (Şekil 4.11,4.12 ve 4.13).



Şekil 4.11. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptit 1'in farklı pH değerlerindeki kırılma miktarları



Şekil 4.12. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptit 2'nin farklı pH değerlerindeki kırılma miktarları

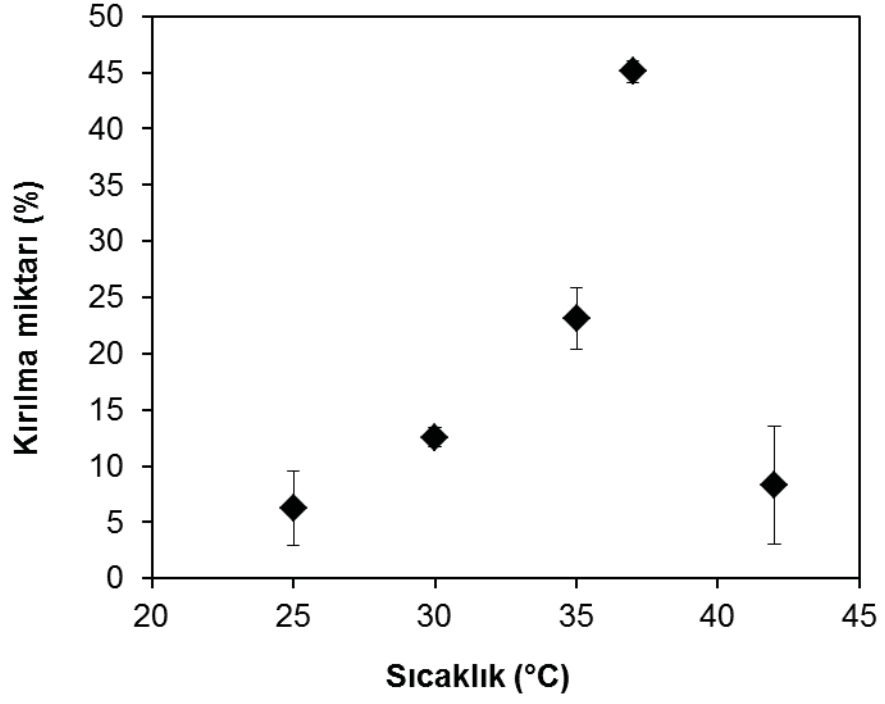


Şekil 4.13. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptit 3'ün farklı pH değerlerindeki kırılma miktarları

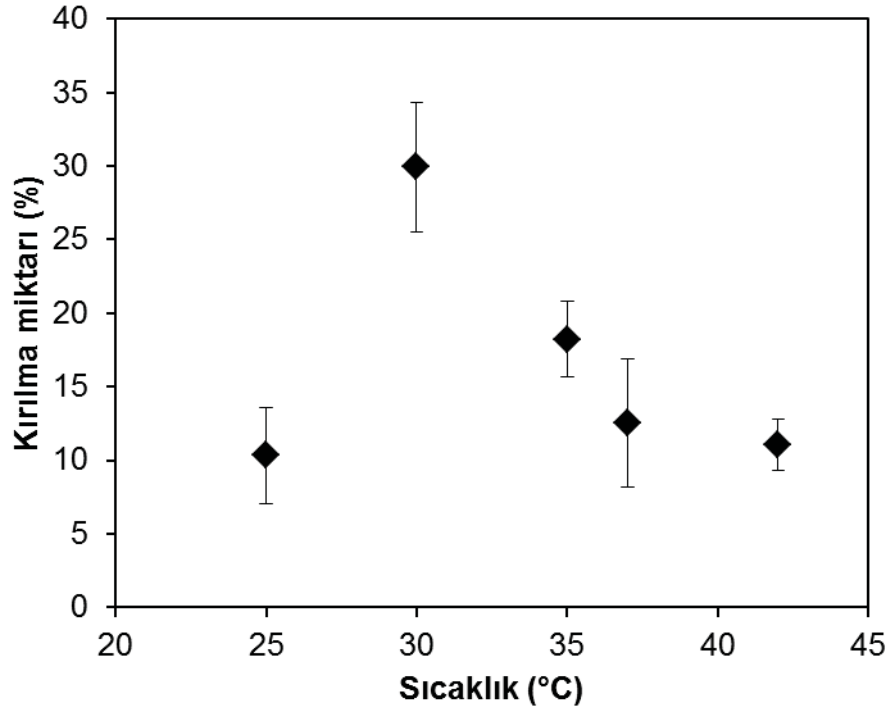
Optimum peptit-proteaz etkileşiminin görüldüğü pH değerleri, peptit 1 ve peptit 2 için pH 7, peptit 3 için ise pH 9 olarak belirlenmiştir. Peptit 1 ve peptit 2 için pH değişimiyle birlikte kırılma miktarlarında önemli bir değişim görülmekle birlikte, peptit 3'ün pH değişimine karşılık duyarlılığının daha düşük olduğu saptanmıştır.

İkinci aşamada proteaz-peptit inkübasyonu farklı sıcaklıklarda (25, 30, 35, 37 ve 42°C) gerçekleştirilerek, her peptit için kırılan peptit miktarı saptanmıştır. (Şekil 4.14, 4.15 ve 4.16)

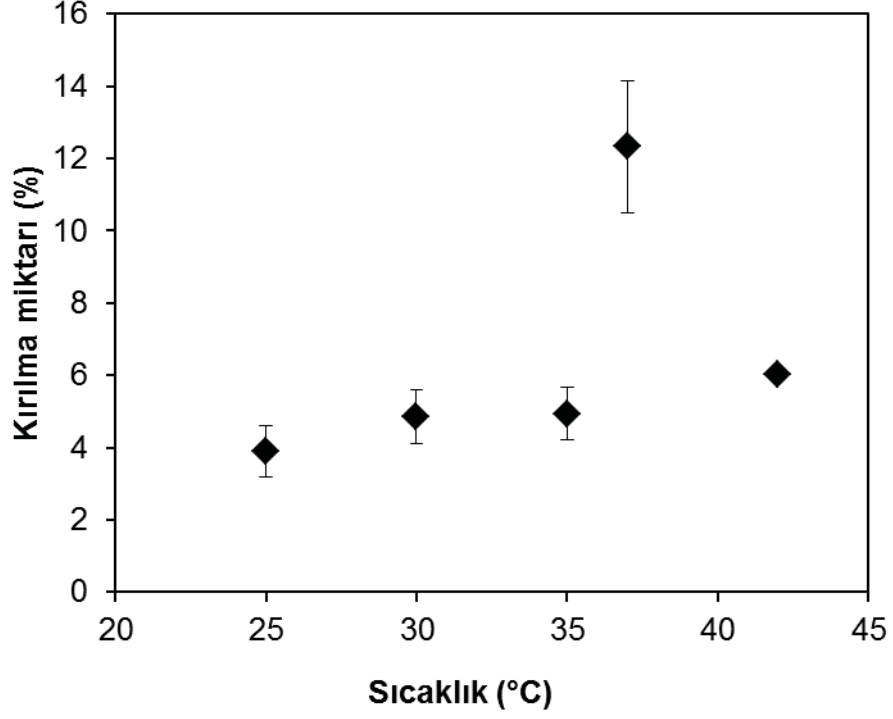




Şekil 4.14. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptit 1'in farklı sıcaklıklardaki kırılma miktarları



Şekil 4.15. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptit 2'nin farklı sıcaklıklardaki kırılma miktarları



Şekil 4.16. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptit 3'ün farklı sıcaklıklardaki kırılma miktarları

Optimum peptit-proteaz etkileşiminin görüldüğü sıcaklık değerleri peptit 1 ve peptit 3 için 37°C, peptit 2 için ise 30°C olarak saptanmıştır. Herbir peptit için proteaz aktivitesinin en yüksek olduğu pH ve sıcaklık parametreleri ve bu noktadaki peptitlerin kırılma miktarları Tablo 4.3' de gösterilmiştir. Kısmi olarak saflaştırılan süne proteazının en yüksek aktiviteyi peptit 1 üzerinde gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, florometrik analiz yönteminin geliştirilmesinde substrat olarak peptit 1'e ait aminoasit diziliminin kullanılmasına karar verilmiştir.

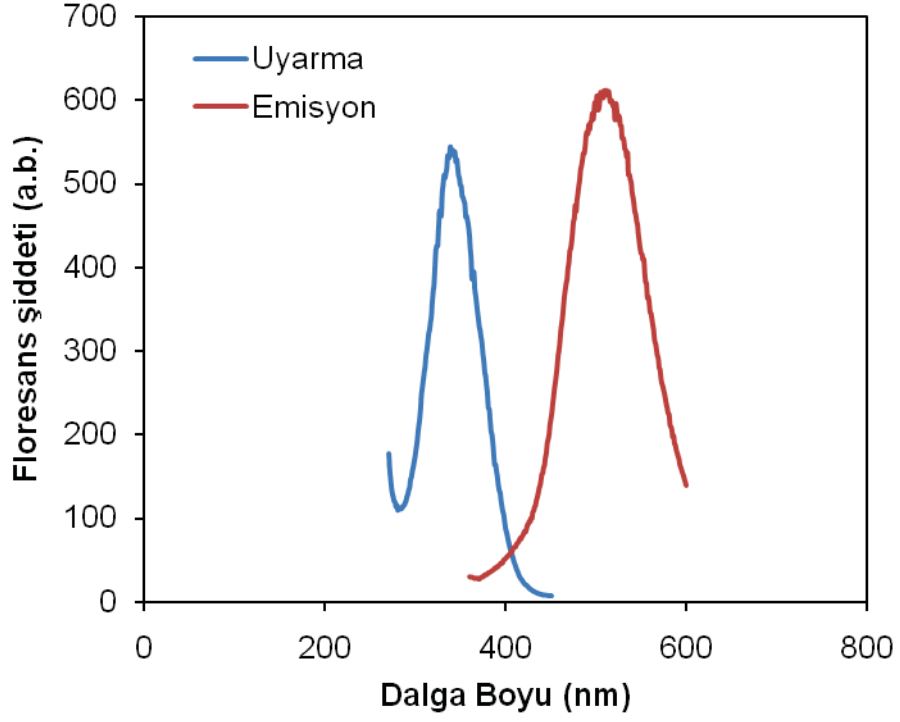
Tablo 4.3. Enzim çözeltisi ile etkileştirilen peptitlerde en yüksek kırılma miktarlarının belirlendiği pH ve sıcaklık değerleri

Peptit	Optimum pH Değeri	Optimum Sıcaklık Değeri	Kırılma Miktarı (%)
Peptit 1	pH 7	37 °C	% 45.09
Peptit 2	pH 7	30 °C	% 29.94
Peptit 3	pH 9	37 °C	% 12.32

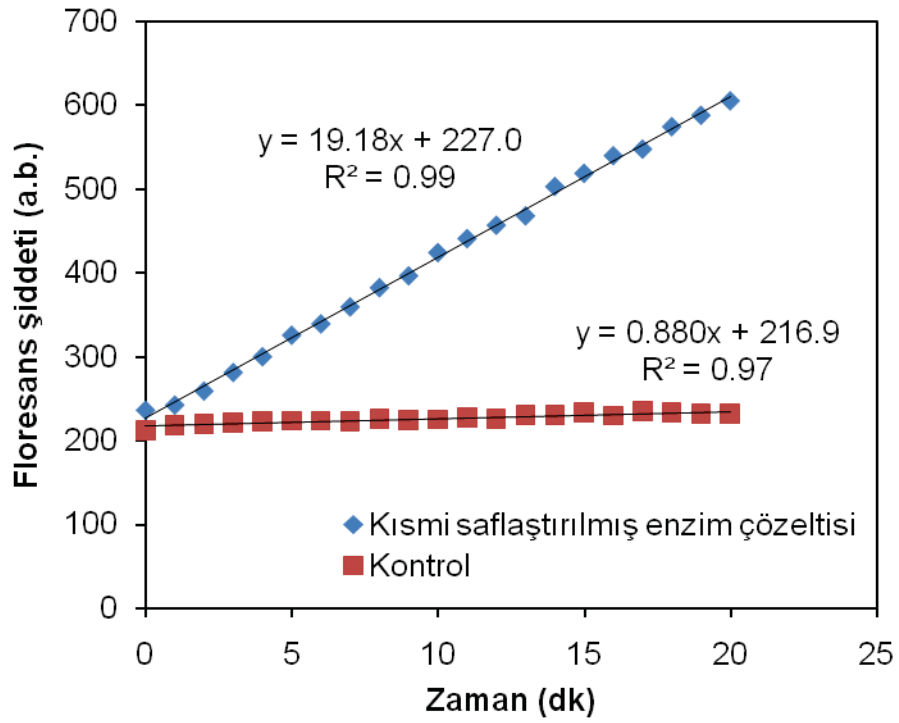
#### 4.6. Florojenik Peptit Substrat ile Süne Proteazı Aktivitesinin Belirlenmesi

Süne proteazının en etkin aktivite gösterdiği peptit 1 potansiyel süne proteazı substratı olarak seçilmiş ve bu peptit EDANS/Dabcyl FRET çifti ile işaretlenmiştir. Florojenik peptit substratın maksimum uyarma ve emisyon dalga boylarının belirlenmesi amacıyla, substrat çözeltisi enzim çözeltisi ile 20 dakika inkübe edilmiş ve çözelti quartz mikroküvete alınarak floresans spektrofotometrede uyarma ve emisyon dalgaboyları taranmıştır (Şekil 4.17). FRET çifti ile işaretlenen peptit substrata ait maksimum uyarma dalgaboyu 338 nm ve maksimum emisyon dalgaboyu 511 nm olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen peptit substratın süne proteazı aktivitesinin ölçümünde kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için kısmi saflaştırılan proteaz çözeltisinden 40 µL alınarak, 60 µL peptit çözeltisi (0.67 mg/mL, 0.05 M Tris-HCl, pH 7) ile karıştırılmış ve floresans şiddetindeki artış zamana karşı ölçülmüştür (Şekil 4.18). Kontrol olarak enzim çözeltisi içermeyen substrat çözeltisinin floresans şiddetindeki değişim ölçülmüştür. Enzim varlığında substrata ait floresans şiddetinin zamana karşılık lineer biçimde arttığı görülmüş, ancak tek başına substratın floresansında önemli bir değişime rastlanmamıştır. Bu, proteaz aktivitesinin florojenik substratla takip edilebileceğini göstermiştir.

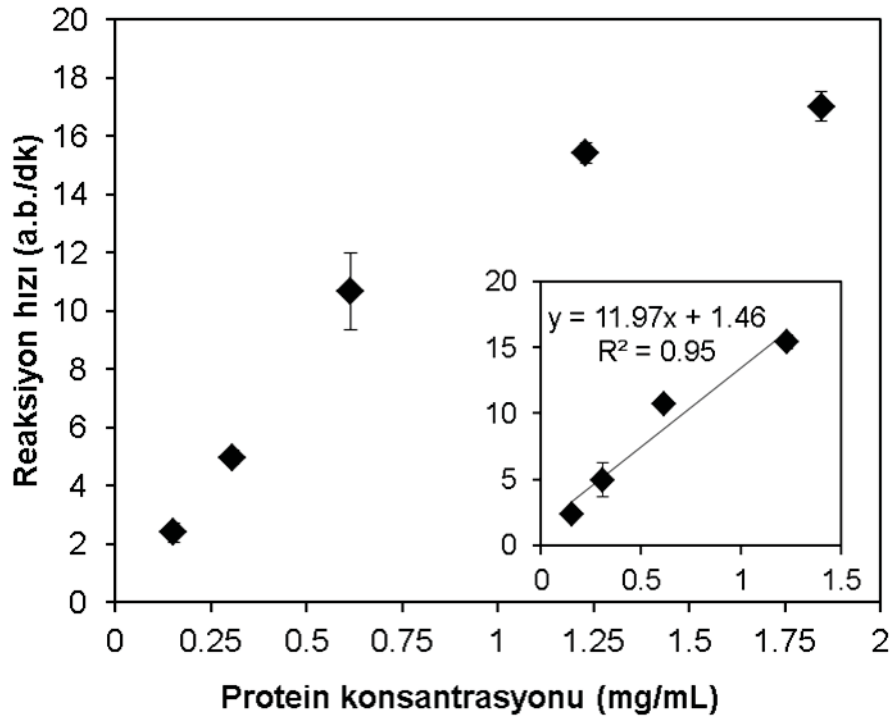


Şekil 4.17. Florojenik peptit substrata ait uyarma ve emisyon dalgaboyu taraması



Şekil 4.18. Kısmi saflaştırılmış enzim çözeltisi varlığında ve yokluğunda, florojenik peptit substratın floresans şiddetinin zamana göre değişimi

Bir sonraki aşamada, florojenik peptit substratın süne proteazının kantitatif tayininde kullanılabilirliğinin saptanması amacıyla peptit substrat kısmen saflaştırılan süne proteazının farklı konsantrasyonları ile etkileştirilmiş ve peptitin floresans şiddetindeki değişim incelenmiştir. Proteolitik aktivite değerleri reaksiyon ilk hızlarından yola çıkılarak ilk 10 dakikada birim zamanda floresans şiddetindeki artıştan hesaplanmıştır. Enzim çözeltisinin protein konsantrasyonuna karşılık proteolitik aktivite değerleri Şekil 4.19'da görülmektedir.

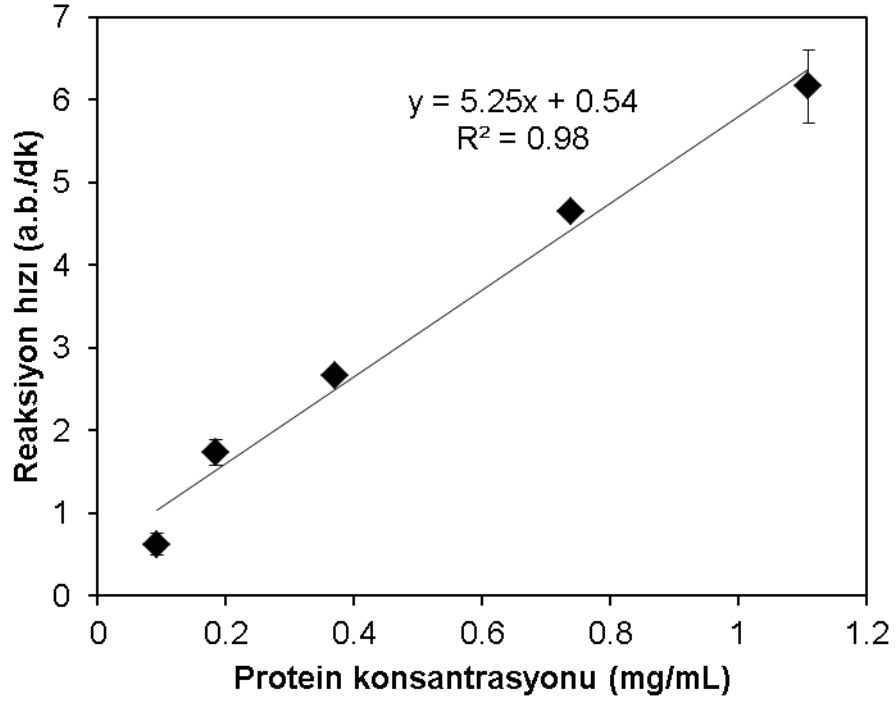


Şekil 4.19. Kısmi saflaştırılmış enzim çözeltisinin protein konsantrasyonuna karşılık reaksiyon hızları

Çözeltideki enzim miktarı arttıkça reaksiyon hızında da artış görülmektedir. Bu artış 1.85 mg/mL enzim konsantrasyonuna kadar doğrusal olarak, bunun üzerindeki konsantrasyonlarda doğrusallıktan sapmaktadır. Bu sapmanın, 1.85 mg/mL enzim konsantrasyonunun üstünde peptit substratın sınırlayıcı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Geliştirilen florojenik substratın kısmen saflaştırılan süne proteazı ile etkileşimi incelendikten sonra, analiz yönteminin un örneklerindeki süne proteazının kantitatif tayini için kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu aşamada süne zararı gören

un örneğinden saf su ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiş, herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmamıştır. Ekstraktan saf su ile farklı derişimlerde proteaz içeren çözeltiler hazırlanmış ve bu çözeltiler peptit substrat ile etkileştirilerek floresans şiddetindeki değişimler ölçülmüştür. Proteolitik aktivite değerleri reaksiyon ilk hızlarından yola çıkılarak ilk 10 dakikada birim zamanda floresans şiddetindeki artıştan hesaplanmıştır. Un örneğinden elde edilen ekstraksiyon çözeltilisinin protein konsantrasyonuna karşılık proteolitik aktivite değerleri Şekil 4.20’de görölmektedir.



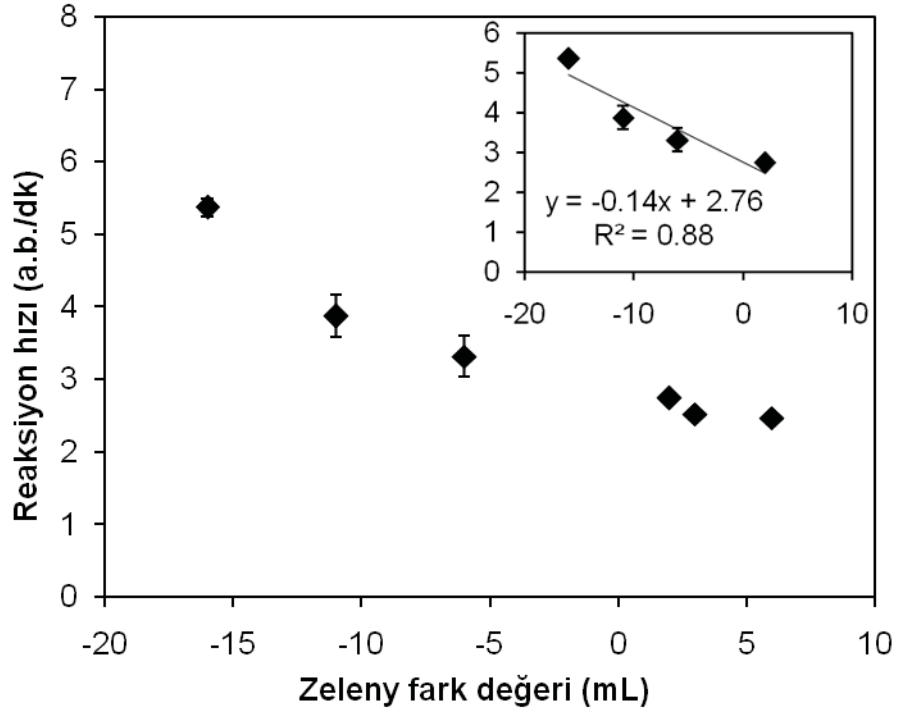
Şekil 4.20. Ekstraksiyon çözeltilisinin protein konsantrasyonuna karşılık reaksiyon hızları

Kısmen saflaştırılan enzim çözeltilisinden elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak, un örneğinden ekstrakte edilen çözeltide de protein miktarı arttıkça reaksiyon hızında da artış görölmüştür. Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmamış ekstraksiyon çözeltilisinde, protein miktarına karşılık daha düşük reaksiyon hızları saptanmıştır. Bunun, protein dışındaki suda çözünen diğer bileşenlerin floresans ölçümde girişime neden olmasından kaynaklandığı düşünölmektedir. Reaksiyon hızı ile ekstraksiyon çözeltilisinin protein konsantrasyonu arasında doğrusal bir değişim görölmüştür. Buna göre, un örneklerinden ekstrakte edilen

çözelti için substrat miktarının aşırı olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, florojenik peptit substratın un örneklerindeki süne zararının tespitinde kullanılabileceği düşünülmüştür.

#### 4.7. Florometrik Analiz Yöntemi İle Süne Proteazının Kantitatif Tayini

Geliştirilen florometrik yöntemin un örneklerindeki süne zararının kantitatif tayininde kullanılması amaçlanmıştır. Bunun için süne zararı gören ve sağlam un örnekleri farklı oranlarda karıştırılarak, Zeleny sedimentasyon ile modifiye Zeleny sedimentasyon değerleri arasındaki fark belirlenmiştir. Bu örneklerden saf su ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiş ve elde edilen çözeltiler peptit substrat ile etkileştirilmiştir. Proteolitik aktivite değerleri reaksiyon ilk hızlarından yola çıkılarak ilk 10 dakikada birim zamanda floresans şiddetindeki artıştan hesaplanmıştır. Zeleny sedimentasyon ile modifiye Zeleny sedimentasyon değerleri arasındaki farklara karşılık reaksiyon hızları Şekil 4.21` de verilmiştir.



Şekil 4.21. Un örneklerinin Zeleny sedimentasyon fark değerlerine karşılık reaksiyon hızları

Geliştirilen florometrik analiz yöntemi kullanılarak un örneklerinde artan süne zararına karşılık reaksiyon hız değerinin de arttığı görülmüştür. Ancak süne zararı görmemiş, Zeleny sedimentasyon fark değeri 6 mL olan un örneğinde de 2.48 a.b./dk reaksiyon hız değerine rastlanmıştır. Bu durumun pozitif modifiye

Zeleny sedimentasyon değerine sahip unlarda dahi proteolitik aktivitenin görülebmesinden kaynaklandığı düşünölmektedir. Elde edilen kalibrasyon grafiği incelendiğinde, -16 ile 2 mL Zeleny sedimentasyon fark değeri aralığında reaksiyon hızı ve un örneklerindeki süne zararı arasında doğrusal bir ilişki görölmüştür. Geliştirilen florometrik analiz yönteminin hassasiyeti kalibrasyon grafiğinin eğiminden yola çıkılarak 0.14 mL Zeleny sedimentasyon fark değeri olarak bulunmuştur. Yöntemin tespit limitinin belirlenebilmesi için en düşük Zeleny fark değerinin standart sapmasının 3 katı alınmış ve kalibrasyon eğrisinden bu değere karşılık gelen modifiye Zeleny sedimentasyon fark değeri -2.71 mL olarak hesaplanmıştır.

Geliştirilen analiz yönteminin doğruluğunun belirlenebilmesi için süne zararı görmüş farklı bir un örneği florometrik yöntem ile analiz edilmiştir. Un örneğinden elde edilen ekstraksiyon çözeltisi substrat çözeltisine ilave edilmiş ve floresans şiddetindeki artış zamana karşı takip edilmiştir. Un örneğinden elde edilen reaksiyon hızı bir önceki basamakta elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak Zeleny fark değeri belirlenmiş ve un örneğine ait deneysel olarak elde edilen değer ile karşılaştırılmıştır. Bu un örneğine ait deneysel olarak bulunan Zeleny sedimentasyon fark değeri -21 mL olarak saptanmıştır. Uygulanan florometrik yöntemde, un örneğine ait reaksiyon hızı  $5.791 \pm 0.1$  a.b./dk olarak bulunmuştur. Hesaplanan reaksiyon hız değeri kalibrasyon grafiğinde yerine konularak Zeleny fark değeri belirlenmiştir. Bu değer ise -21.65 mL olarak hesaplanmıştır. Belirlenen bu iki Zeleny fark değeri karşılaştırıldığında hata oranı % 3.1 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuç, peptit yapısındaki substrat ile geliştirilen bu florometrik analiz yönteminin yüksek doğrulukta cevap verdiğini göstermiştir.



## YORUM

Ülkemizde, Orta Doğu'da, Batı ve Orta Asya'da, buğdayda hasat öncesi verimin düşmesine neden olan hububat zararlılarının başında gelen süne (*Eurygaster* spp.), buğdayların teknolojik özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir. Süne zararlısı buğday tanesinden beslenirken taneye de sindirim salgılarını bırakmaktadır. Bu sindirim salgıları, özellikle içerdiği proteolitik enzimler, buğdayın ekmeklik kalitesinin bozulmasına neden olmaktadır. Bu nedenle ürüne işlenecek unlarda süne zararının tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır. Süne zararının belirlenebilmesi için yaygın olarak kullanılan modifiye Zeleny sedimentasyon testi, SDS-protein jel analizi ve SDS sedimentasyon testi gibi analizler uzun inkübasyon süreleri ve uzman personel gereksinimi gibi dezavantajlara sahiptir. Buğdayın süne zararı görüp görmediğinin hızlı, kolay ve yerinde kantitatif tayini büyük önem taşımaktadır.

Proteaz aktivitelerinin hassas ve hızlı bir şekilde tayin edilmesinde florojenik veya kromojenik olarak işaretlenmesiyle peptit substratları başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Çalışma kapsamında süne proteazına yönelik peptit yapısında substratın geliştirilmesi ve florometrik analiz sisteminde kullanılması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, süne proteazının etki ettiği yüksek molekül ağırlıklı glutenin altbirimlerinin tekrarlanan dizimleri yeni substratın geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Öncelikle, un örneklerinden proteazın en etkin biçimde ekstrakte edilmesi amacıyla ekstraksiyon koşulları optimize edilmiştir. Ekstraksiyon çözeltisinde en yüksek proteolitik aktivite 0.35 g/mL un konsantrasyonunda ve 45 dakika inkübasyon süresinde görülmüştür. Ekstraksiyon aşaması için en uygun çözücü olarak, hem yüksek proteolitik aktivite göstermesinden hem de florometrik analiz yöntemi ile en az girişime neden olabilecek çözücü olmasından dolayı, saf suya karar verilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, yüksek molekül ağırlıklı glutenin altbirimlerinin tekrarlanan dizimlerinden yola çıkılarak belirlenen peptit dizimlerinin süne proteazı ile etkileşimleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, aynı süne proteazı miktarında peptit 1'in peptit 2 ve peptit 3'e göre daha fazla kırıldığını ortaya koymuştur. Peptit 1 ve peptit 2 çok benzer amino asit dizimlerine sahip olmakla

birlikte, peptit 2'nin 3 amino asit kadar daha uzun olmasının, peptitin katlanmasını arttıracığından, proteolitik aktivitenin azalmasına neden olduğu düşünülmüştür. Peptit 1 ve peptit 3 ise aynı amino asit uzunluğunda olmakla birlikte sadece tek bir amino asit kalıntısında değişiklik vardır. Peptit 1'in 13. sıradaki prolin amino asitinin yerine lösin geldiğinde proteolitik aktivitede önemli bir azalış görülmüştür. Bu süne proteazının yüksek seçiciliğinin bir sonucu olabileceği gibi, prolin amino asitinin yerine lösinin gelmesiyle peptit konformasyonunun ve hidrofobitesinin değişmesinden de kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda peptit 1'in süne proteazı substratı olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Çalışmanın son aşamasında, unlarda süne zararının tespiti için florometrik analiz yönteminin geliştirilmesi amaçlanmış ve bu doğrultuda seçilen peptit dizilimi FRET donör/alıcı çiftiyle işaretlenmiştir. Florojenik peptit substrat belirlenen optimum pH ve sıcaklık koşullarında süne zararı görmüş undan elde edilen ekstrakt çözeltisi ile etkileştirildiğinde zamana karşı floresans şiddetinde artış meydana gelmiştir. Bu geliştirilen peptit substratın ekstrakttaki proteaz enzimleri ile kırıldığını göstermektedir. Floresans şiddetinin birim zamandaki artışından proteolitik reaksiyon hızları hesaplanmış ve reaksiyon hızlarının ekstrakt çözeltisinde artan proteaz konsantrasyonu ile artış gösterdiği saptanmıştır. Geliştirilen florometrik yöntemin un örneklerindeki süne zararının kantitatif tayininde kullanılması amacıyla farklı Zeleny/modifiye Zeleny fark değerlerine sahip un örneklerinden elde edilen ekstraktlarda proteolitik reaksiyon hızları belirlenmiştir. Zeleny fark değerlerine karşılık reaksiyon hızları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Geliştirilen florometrik analiz yönteminin -16 ile 2 mL Zeleny fark değeri aralığında doğrusal sonuç verdiği ve bu aralıkta hassasiyetinin 0.14 mL olduğu saptanmıştır. Florojenik substrat ile geliştirilen analiz yönteminin alt tespit limiti ise -2.71 mL Zeleny fark değeri olarak saptanmıştır. Sistemin hassasiyetinin ve alt tespit limitinin iyileştirilmesi için floresans şiddeti ölçüm süresinin artırılması veya ekstraksiyon sonrası kısmi saflaştırma basamağı ile örnek hazırlama prosedürünün geliştirilmesi mümkündür. Ancak bu işlemler analiz süresini uzatmaktadır. Geliştirilen yöntemde analiz süresi, örnek hazırlama süresi 70 dakika ve floresans ölçüm süresi 10 dakika olmak üzere, toplam 80 dakika olarak belirlenmiştir.

Bu süre, süne zararının belirlenebilmesi için yaygın olarak kullanılan modifiye Zeleny sedimentasyon testi (~135 dakika) veya SDS sedimentasyon testi (~110 dakika) süreleriyle karşılaştırıldığında oldukça kısa olsa da, örnek hazırlama sürecinde yapılacak değişikliklerle bu sürenin daha da kısaltılabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla ileriki çalışmalarda, ekstraksiyon süresinin kısaltılarak yöntemin performansındaki değişimlerin incelenmesi ve herhangi bir ekstraksiyon aşaması olmadan saf suyla hazırlanan un örneklerinde florometrik ölçümün gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir.

Çalışma kapsamında geliştirilen peptit substratın un örneklerinde süne zararının kantitatif tayininde kullanılma potansiyeli taşıdığı düşünülmektedir. Bu florometrik yöntemin un örneklerinde kullanılabilirliğinin ortaya konması için farklı buğday çeşitlerinin de kullanıldığı validasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Ancak, elde edilen sonuçlar geliştirilen peptit diziliminin süne proteazı aktivitesinin tespiti için önemli bir substrat adayı olduğunu göstermiştir. Peptit yapısındaki substratlar üzerinde kolaylıkla modifikasyon yapılabilmesi ve peptitlerin farklı moleküllerle işaretlenebilmesi, geliştirilen bu substrat molekülünün test çubukları ve mikroakışkan çipler gibi farklı analiz sistemlerinde de kullanılmasını mümkün kılmaktadır.

## KAYNAKLAR

- [1] Belderok, B., Mesdag, J., Donner, D.A., *Bread-Making Quality of Wheat: A Century of Breeding in Europe*, (eds: Donner, D. A.), Springer Science+Business Media, Dordrecht, 3-16, **2000**.
- [2] Serna Saldívar, S., *Cereal Grains Properties, Processing and Nutritional Attributes*, (eds: Barbosa-Cánovas, G.), Taylor & Francis Group, Florida, 4-21, **2010**.
- [3] Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü, *Hububat Raporu*, **2016**, <http://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/hububat/hububatraporu2016.pdf>
- [4] Kent, N. L., Evers, A.D., *Technology of Cereals: An Introduction for Students of Food Science and Agriculture*, Elsevier Science Ltd., Oxford, 6-36, **1994**.
- [5] FAO, Arz ve Talep Özeti, <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/> (Mayıs, **2017**).
- [6] USDA, Economic Research Service, Wheat Outlook, <https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/82471/whs-17b.pdf?v=42779> (Mayıs, **2017**).
- [7] Türkiye İstatistik Kurumu, Temel İstatistikler/ Tarım/ Tarım Alanları, <http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist> (Mayıs, **2017**).
- [8] Türkiye İstatistik Kurumu, Veritabanları/ Bitkisel Üretim İstatistikleri/ İstatistiksel Tablolar ve Dinamik Sorgulama/ Tahıllar ve Diğer Bitkisel Ürünler/ Tahıllar [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001) (Mayıs, **2017**).
- [9] Türkiye İstatistik Kurumu, Konularına Göre İstatistikler/ Dış Ticaret İstatistikleri/ İstatistiksel Tablolar ve Dinamik Sorgulama/ Fasıllara Göre Dış Ticaret/ Fasıllara Göre İthalat, [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1046](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1046) (Mayıs, **2017**).
- [10] Šramková, Z., Gregová E., Šturdík, E., Chemical composition and nutritional quality of wheat grain, *Acta Chimica Slovaca*, 2, 115 - 138, **2009**.
- [11] Delcour, J. A., Hosney, R.C., *Principles of Cereal Science and Technology*, AACC International, Inc., Minnesota, 3-64, **2010**.
- [12] Koehler, P., Herbert W., *Handbook on Sourdough Biotechnology*, Chapter 2 Chemistry of Cereal Grains, (eds: Gobbetti M., Gänzle M.), Springer Science+Business Media, New York, **2013**.
- [13] McKevith, B., Nutritional aspects of cereals, *British Nutrition Foundation*, 29, 111-142, **2004**.
- [14] Özkaya H., Buğday, Un ve Ekmeğin Besin Değeri ve Ekmeğin Zenginleştirilmesi, *Gıda*, 3, 165-173, **1986**.
- [15] Cauvain, S. P., *Breadmaking Improving Quality*, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, 53-56, **2012**.

- [16] Khatkar, B., Functionality of wheat flour components and bakery ingredients, *Bakery Science and Technology*, **2017**, <http://www.ddegjust.ac.in/studymaterial/pgdbst/pgdbst-02.pdf>
- [17] Kuktaitè, R., *Protein Quality in Wheat: Changes in Protein Polymer Composition during Grain Development and Dough Processing*, Doktora Tezi, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, **2004**.
- [18] Wang, C., *Effects of Wheat Endosperm Protein Content and Composition on White Noodle Quality*, Doktora Tezi, Food and Nutritional Sciences University of Manitoba, Manitoba, **2002**.
- [19] Veraverbeke, W. S., Delcour, J. A., Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **42**, 179-208, **2002**.
- [20] Olanca, B., *Süne (Eurygaster spp.) Zararı Görmüş Buğdaydan Gluten Hidrolizatlarının Eldesi, Karakterizasyonu, Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2010**.
- [21] Day, L., Augustin, M. A., Batey, I. L., Wrigley, C. W., Wheat-gluten uses and industry needs, *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 82-90, **2006**.
- [22] Lasztity, R., *Cereal Chemistry*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 86-92, **1999**.
- [23] Shewry, P. R., Tatham, A. S., Forde, J., Kreis, M., Mifflin, B. J., The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment, *Journal of Cereal Science*, **4**, 97-106, **1986**.
- [24] Masci, S., D'Ovidio, R., Lafiandra D., Kasarda D., Characterization of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer, *Plant Physiology*, **118**, 1147–1158, **1998**.
- [25] Dizlek, H., *Süne Zararına Uğramış Ekmeklik Buğdayların Bazı Niteliklerinin İncelenmesi ve İyileştirilmesi Olanakları Üzerine Bir Araştırma*, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2010**.
- [26] Mehrabadi, M., Bandani, A.R., Allahyari, M., Serrão, J.E., The Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (*Hemiptera: Scutelleridae*) digestive tract: histology, ultrastructure and its physiological significance, *Micron*, **43**, 631-637, **2012**.
- [27] Kıvanç, Ö., S., *Süne-Kıvılcık (Eurygaster spp. ve/veya Aelia spp.) Zararı Görmüş Unların Kek, Bisküvi ve Ekmeklerde Akriamid ve Hidroksimetilfurfural (HMF) Oluşumuna Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2013**.
- [28] Critchley, B.R., Literature review of sunn pest *Eurygaster integriceps* Put. (*Hemiptera, Scutelleridae*), *Crop Protection*, **17**, 271-287, **1998**.
- [29] İslamoğlu M., Kornoşor S., Tarla Ş., Türkiye'de Süne, *Eurygaster spp. (Hemiptera: Scutelleridae)* mücadelesindeki gelişmeler (1928 – 2010), *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, **2**, 63-78, **2011**.

- [30] Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, *Zirai Mücadele Teknik Talimatları Cilt 1*, **2008**, <http://www.tarim.gov.tr/TAGEM/Belgeler/Teknik%20tal%C4%B1matlar%202008/C%C4%B0LT%201.pdf>
- [31] Özkan M., Babaroğlu N., *Süne*, Ses Reklam İletişim ve Baskı Hizmetleri, Ankara, 40-44, **2015**.
- [32] Köksel H., Atlı A., Dağ A., Sivri D., Commercial milling of suni bug (*Eurygaster spp.*) damaged wheat, *Nahrung/Food*, 46, 25-27, **2002**.
- [33] Parker, B. L., Amir-Maafi, M., Skinner, M., Kim, J. S., El Bouhssini, M., Distribution of Sunn Pest, *Eurygaster integriceps* Puton (*Hemiptera: Scutelleridae*), in overwintering sites, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14, 83-88, **2011**.
- [34] Ozberk, I., Atlı, A., Pfeiffer, W., Ozberk, F., Coskun, Y., The effect of sunn pest (*Eurygaster integriceps*) damage on durum wheat: impact in the marketplace, *Crop Protection*, 24, 267-274, **2005**.
- [35] Darkoh, C., El-Bouhssini, M., Baum, M., Clack, B., Characterization of a prolyl endoprotease from *Eurygaster integriceps* puton (Sunn pest) infested wheat, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 74, 163-178, **2010**.
- [36] Konarev, A. V., Frédéric B., Marsh J., Vilkova N., Nefedova L., Sivri D., Köksel H., Shewry P. R., Lovegrove A., Characterization of a glutenin-specific serine proteinase of Sunn Bug *Eurygaster integriceps* Put., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2462-2470, **2011**.
- [37] Sivri D., Köksel H., Bushuk W., Effects of wheat bug (*Eurygaster maura*) proteolytic enzymes on electrophoretic properties of gluten proteins, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 26, 117-125, **1998**.
- [38] Turhal K., Turhal Ç., Yapay sınır ağları ile süne zararlısının buğday danesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 15, 25-30, **2014**.
- [39] Mutlu, Ç., Canhilal, R., Karaca, V., Duman, M., Gözüaçık, C., Kan, M., Economic threshold revision of the Sunn Pest (*Eurygaster integriceps* Put.) (*Hemiptera: Scutelleridae*) on wheat in Southeastern Anatolia Region, *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 4, 157, **2014**.
- [40] Zeleny, L., A simple sedimentation test for estimating the bread-baking and gluten qualities of wheat flour, *Cereal Chemistry*, 24, 465-475, **1947**.
- [41] Greenaway, W. T., Neustadt, M.H., Zeleny, L., Communication to the editor: A test for stink bug damage in wheat, *Cereal Chemistry*, 42, 577-579, **1965**.
- [42] Konarev, A. V., Nefedova, L. I., Gubareva, N. K., Sivri Ozay, D., Analysis of gluten-hydrolyzing proteinase polymorphism in wheat grains damaged by Sunn Pest *Eurygaster integriceps* Put. and related bugs, *Russian Agricultural Sciences*, 39, 390-395, **2013**.

- [43] Every, D., Sutton, K. H., Shewry, P. R., Tatham, A. S., Coolbear, T., Specificity of action of an insect proteinase purified from wheat grain infested by the New Zealand wheat bug, *Nysius huttoni*, *Journal of Cereal Science*, 42, 185-191, **2005**.
- [44] Hosseininaveh V., Bandani A., Hosseininaveh F., Digestive proteolytic activity in the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*, *Journal of Insect Science*, 9, 1-11, **2009**.
- [45] iGEM, Ethanol Precipitation of Proteins, [http://2011.igem.org/Team:Cambridge/Protocols/Ethanol\\_Precipitation\\_of\\_Proteins#/Protocols/Ethanol\\_Precipitation\\_of\\_Proteins](http://2011.igem.org/Team:Cambridge/Protocols/Ethanol_Precipitation_of_Proteins#/Protocols/Ethanol_Precipitation_of_Proteins) (Mayis, **2017**).
- [46] Bradford, M., A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254, **1976**.
- [47] Bachem, Chromophores/Fluorophores: Spectral Properties and Characteristics, [http://documents.bachem.com/fret\\_substrates.pdf](http://documents.bachem.com/fret_substrates.pdf) (Haziran, **2017**).



## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Begüm Zeynep HANÇERLİOĞULLARI  
Doğum Yeri : Ankara  
Medeni Hâli : Bekâr  
E-posta : zeynephancerli91@gmail.com  
Adresi : Atadan Caddesi 30/3 Etlik Ankara

### Eğitim

Lise : Çankaya Anadolu Lisesi (2005-2009)  
Lisans : Hacettepe Üniversitesi Gıda Müh. Bölümü (2009-2014)

### Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : İleri  
Almanca : Başlangıç  
Fransızca : Başlangıç

### İş Deneyimi

-

### Deneyim Alanları

Biyoteknoloji, enzim kinetiği, enzim aktivitesi.

### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

2150590 kodlu “Süne Proteazına Karşı Yeni Bir Substrat Geliştirilmesi” adlı  
1002-Tübitak Projesi.

### Tezden Üretilmiş Yayın

-

### Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu İle Katıldığı Toplantılar

-





HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 17/06/2017

Tez Başlığı: Süne Zararının Tespiti İçin Florometrik Yöntem Geliştirilmesi

Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 54 sayfalık kısmına ilişkin, 17/06/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 'tir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza  
17/06/2017

Adı Soyadı: B. ZEYNEP HANÇERLİOĞULLARI

Öğrenci No: N14223066

Anabilim Dalı: GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Programı: GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR

YRD.DOC.DR.F.CEYDA DUDAK ŞEKER  
(Unvan, Ad Soyad, İmza)