

# ENZİMATİK-OPTİK YÖNTEMLERLE GLİKOZ, MALTOZ VE DEKSTRİN TAYINLARI

Dr. Tunay DURGUN  
A.Ü.Z.F. Fermentasyon  
Teknolojisi Kürsüsü

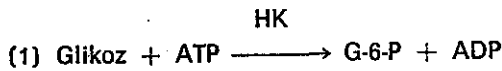
## 0. Giriş :

Özellikle tıp bilimi için geliştirilmiş bulunan bazı yöntemler, sonraları diğer bilim dallarında da kullanılmaya başlanmıştır. Bu arada, gıda maddelerinin bileşimini daha kesin olarak saptamak ve hatta imalat sırasında oluşan gelişmeleri izlemek için enzimatik-optik yöntemlerden yararlanılması gittikçe artmaktadır. Çeşitli gıda maddelerinde olduğu gibi malt ve bira teknolojisinde de yerini alan ve oldukça kesin sonuçlar veren yöntemlerden üçünü bu derleme ile sunmakta yarar görülmüştür.

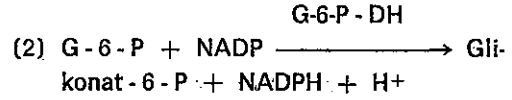
## 1. Glikoz tayini :

Maltoz, dekstrin ve sakkaroz tayinlerinde olduğu gibi, bazı enzimlerin (sakkaraz, maltaz, sellüloz) aktivitelerinin ölçülmesinin esasını teşkil ettiği için glikoz tayini büyük önem taşımaktadır. Çeşitli enzim ve ko-enzim preparatlarından yararlanılarak yapılan bu analizin prensibi aşağıda açıklanmıştır (Bergmeyer 1970; Boehringer 1971).

Formül (1) gereğince, heksokinaz (HK) enzimince katalize edilen reaksiyon sonucu glikoz, glikoz-6-fosfata ve ortama verilen adenozin-3-fosfat (ATP) ile adenozin-2-fosfata (ADP) dönüşür.



Glikoz-6-fosfat-dehidrogenazı yardımı ile, formül (2) de görüldüğü gibi, reaksiyona giren glikoz-6-fosfattan, glikonat-6-fosfat meydana gelir. Bu arada, nikotinamid-adenin-dinükleotidfosfat (NADP) ise indirgenmiş nikotinamid-adenin-dinükleotidfosfata dönüşür.



Böylece oluşan ve spektrofotometrede 366 nm de yapılacak ölçümle saptanabilen NADPH, ortamdaki glikoz ile aynı ekivalan miktarda meydana gelmiş olmaktadır.

### Gerekli çözeltiler :

1. Tampon eriyik (0,3 M trietanolamin, pH = 7,6 ve 4 mM Mg<sup>++</sup>) : 11,2 g trietanolamin-hidroklorür ve 0,2 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O tartılıp 150 ml destile suda çözündürülür, 4 ml kadar 5N NaOH ile pH sı 7,6 ya ayarlanır. Su ile 200 ml ye tamamlanır.

2. NADP (yaklaşık 11,5 mM) : 50 mg NADP-Na<sub>2</sub> tartılır ve 5 ml destile suda çözülür (Bu çözelti +4°C de 4 hafta dayanıklıdır).

3. ATP (yaklaşık 81 mM) : 250 mg ATP-Na<sub>2</sub> tartılır ve 5 ml su ile çözündürülür (+4°C de 4 hafta dayanıklıdır).

4. Heksokinaz/Glikoz-6-P-dehidrogenaz karışımı (1 mg HK/ml ve 0,5 mg G6P-DH/ml) : Mililitrede 2 mg protein ihtiva eden heksokinazdan 0,5 ml ve mililitrede 1 mg protein ihtiva eden G6P-DH dan 0,5 ml karıştırılarak kullanılır (+4°C de bir yıl dayanıklıdır).

### Deney :

Deneyin sağlıklı sonuç vermesi için numuneler, litrede 0,4-0,8 g glikoz ihtiva edecek şekilde seyreltilmelidir. Böylece bulunan seyreltme faktörü (F) not edilir. Sonra, 1 cm. ışık yollu cam küvetlere eriyiklerden aşağıdaki miktarlar pipetlenir. Denemeler paralel yürütülmeli ve sıcaklık 20-25°C ler arasında olmalıdır.

| Çözeltiler | Asıl deneme (A) | Kör deneme (K) |
|------------|-----------------|----------------|
| Puffer (1) | 2,5 ml          | 2,5 ml         |
| NADP (2)   | 0,10 ml         | 0,10 ml        |
| ATP (3)    | 0,10 ml         | 0,10 ml        |
| Numune (F) | 0,20 ml         | —              |
| Destile su | —               | 0,20 ml        |

Butunan bu değer, sakkarozun parçalanması ile oluşan ve ortamda önceden de bulun-

$$(S) \text{ Glüköz g/l} = \Delta E_s \times F_s \times 0,856$$

$$\Delta E_s = A(E_2 - E_1) - K(E_2 - E_1)$$

lit.  $E_1$  ve  $E_2$  ler okunur.

Bundan sonra, numune ve su koymaksızın aynı glüköz tayninde olduğu gibi devam ettirilir. Karıştırılır ve 20-25°C de 15 dakika bekletilir.

| Asıl deneme              | Kör deneme | Çözeltiler |         |
|--------------------------|------------|------------|---------|
| (A)                      | (K)        | (1)        | (2)     |
| Asetat puffer (1)        | 0,20 ml    | 0,20 ml    | 0,20 ml |
| Numune                   | —          | 0,20 ml    | —       |
| Destile su               | —          | 0,20 ml    | 0,20 ml |
| $\beta$ -früktozidaz (2) | 0,02 ml    | 0,02 ml    | 0,02 ml |

gerekli pipetlenir.

Yine gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra, 1 cm ışık yollu küvetlere aşağıdaki şekilde,

Deney :

3. Diğer çözeltiler glüköz tayninde olduğu gibidir.

2.  $\beta$ -h-früktozidaz (5 mg/ml) : 10 mg enzim 2 ml suda eritilir (+4°C de bir hafta kadar dayanıklıdır).

1. Asetat - puffer (0,1 M, pH-4,6) : 6,7 ml 1N NaOH ve 13,5 ml 1N asetik asit 180 ml su ile karıştırılır ve pH kontrol edilir.

Gerekli çözeltiler :

bazı işlemlerle glüköz uzaktastırılarak deneyin sağlıklı sonuçlar vermesi sağlanmalıdır).

Numunede sakkaroz bulunduğu takdirde ya da sakkaroz (β-h-früktozidaz) enzimi verilip, glüköz ve früktoza parçalanması sağlanarak, meydana gelen glüköz miktarı tayin edilecektir. Böyle bulunan glüköz miktarı, maltoz için yapılan glüköz taynindekinden çıkarılarak, gerçek maltozun parçalanması ile oluşan glüköz miktarı istendiğinde ise, ortamda fazla miktarlarda glüköz bulunduğu zaman, önceden özel işlemlerle glüköz uzaklaştırılarak deneyin sağlıklı sonuçlar vermesi sağlanmalıdır).

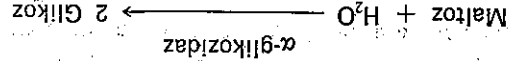
On sakkaroz taynı :

{Drawert und Hagen 1971b}.

maltoz taynı sonuçlarının maltoz + maltozidaz olarak verilmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

α-glükozidazın maltozunu da parçadığını ve ratarla yaptıkları denemelere dayanarak,

zarlar, Boehringer firmasının hazırlanan prepa-ros taynı yapılması gerekmektedir. Aynı ya-nedenle maltoz taynı sırasında bir de sakka-zun yanısıra sakkarozu da parçalamaktadır. Bu-tikler) gibi bu enzim grup-spesifik olup, malto-Ancak, Drawert ve Hagen (1970)'in de belirtti-riği gibi bu enzim grup-spesifik olup, malto-



maltoz tayninde belirtildiği gibi saptanmasına dayan-

galanmasına ve oluşan ürünün, yukarıda glüköz-tözün α - glükozidaz enziminin iki glüköze par-

Bu analizin esası da, ortamda bulunan mal-

## 2. Maltoz taynı :

dir.

Formülde (e) denemeye alınan sıranın eks-trakt miktarını g/100 ml olarak göstermekte-

$$\text{Glüköz (g/100g ekstrakta)} = \frac{10 \cdot G}{e}$$

Yeni yapıldı ise şöyle hesaplanmalıdır :

lanabilir. Örneğin, bir malt sırasında glüköz ta-İhtiva ettiği kurumadde de % olarak da hesap-

Eide olunan sonuç, gerektiğinde o sıvının

$$(G) \text{ Glüköz g/l} = \Delta E \times 0,797 \times F$$

miktarı gram olarak saptanmış olur.

analizi yapılan sıvının litresinde bulunan glüköz

lan seyreltme faktörü (F) de dikkate alınarak,

ki aşağıdaki formüle konularak ve önce yapı-

$$\Delta E = A \cdot (E_2 - E_1) - K(E_2 - E_1)$$

lanır.

neme için bulunan fark çıkarılarak ΔE hesap-

Asıl deneme için bulunan farktan, kör de-

Hesaplanması :

sorbsiyon değerleri okunur ( $E_2$ ).

lenir ve asıl ve kör denemeler için yine ab-

reaksiyon durana kadar, 15 dakika kadar bek-

Özel karıştırıcı ile yeniden karıştırılır ve

|               |         |         |
|---------------|---------|---------|
| HK/G6P-DH (4) | 0,02 ml | 0,02 ml |
|---------------|---------|---------|

pipetlemeye devam edilir.

de havaya karşı absorpsiyon okunur ( $E_1$ ). Sonra

Karıştırılır ve spektrofotometrede, 366 nm

nan-glikoz toplamını gösterecektir. Sadece sakkaroz saptanmak istendiğinde, ortamda önceden bulunan glikozun çıkarılması gerekecektir. Ancak maltoz tayininde bu çıkarmaya gerek yoktur. Zira, zaten ortamda bulunan glikoz değerinin maltozla bulunandan da çıkarılması gerekecektir. Şu halde, maltozla aşağıda anlatılacağı şekilde bulunacak olan glikoz değerinden, yukarıda bulunan, (S) ile gösterilen ve hem sakkarozun parçalanmasından oluşan ve hem de ortamda bulunan glikoz toplamının çıkarılması yeterlidir.

Bundan sonra asıl maltoz tayini yapılmıştır. Bunun için gerekli çözeltiler şunlardır :

1. Asetat - puffer (0,1 M, pH - 6,6) : 1,36 g sodyumasetat 3H<sub>2</sub>O tartılıp 80 ml destile su da çözündürülür. 1 ml kadar 0,1 N asetik asit ile pH 6,6 ya ayarlanır ve su ile 100 ml ye tamamlanır.

2. α-glukozidaz (5 mg protein/ml) : Enzim preparatı seyreltilmeden olduğu gibi kullanılır ( +4°C de 6 ay dayanıklıdır).

3. Diğer çözeltiler aynen glikoz tayininde olduğu gibidir.

Numune analiz öncesi yine gerektiği kadar seyreltilir ve seyreltme faktörü (F<sub>m</sub>) not edilir. Sonra, numunede bulunan maltozun α-glikozidaz tarafından parçalanması işlemi yaptırılır. Bu amaçla tüplere aşağıdaki miktarlar pipetlenir.

Santrifüj tüplerine veya tüplere

| Çözeltiler               | Asıl deneme (A) | Kör deneme (K) |
|--------------------------|-----------------|----------------|
| Asetat - puffer (1)      | 0,50 ml         | 0,50 ml        |
| Numune (F <sub>m</sub> ) | 0,50 ml         | —              |
| Destile su               | —               | 0,50 ml        |
| α-glikozidaz             | 0,05 ml         | 0,05 ml        |

kariştirildikten sonra 20-25°C lerde 20 dakika bekletilir. Kaynamakta olan su banyosunda 3 dakika tutulur ve santrifüje edilir veya süzülür. Süzüntüde glikoz tayini yapılır. Normal glikoz tayininde asıl deneme için numune, kör deneme için ise destile su pipetlenmektedir. Burada ise, asıl deneme için asıl deneme tüpünün süzüntüsünden, kör için de kör deneme süzüntüsünden pipetlenir ve su verilmaz.

Maltoz tayini için de ΔE değeri bulunur.

$$\Delta E_m = A(E_2 - E_1 - K(E_2 - E_1))$$

Daha önce yapılan ön sakkaroz tayini ve ilgili seyreltme faktörleri de dikkate alınarak, numunenin litresinde bulunan maltoz (Drawert ve Hagen (1971b)'e göre maltoz + maltotrioz) miktarı şöyle hesaplanabilir.

$$(M) \text{ Maltoz + maltotrioz g/l} = [ (\Delta E_m \times F_m \times 0,797 \times 2,1) - (\Delta E_s \times F_s \times 0,856) ] \times 0,95$$

Bu formülde şunlar gösterilmiştir :

ΔE<sub>m</sub> = Maltoz tayini amacıyla yapılan glikoz tayininde ekstinksiyonlar farkı,

F<sub>m</sub> = Maltoz tayini öncesi yapılan seyreltme faktörü

0,797 = Glikoz hesabından sabit sayı,

2,1 = Maltoz parçalanması sırasındaki seyreltme,

ΔE<sub>s</sub> = Sakkaroz tayini için bulunan ekstinksiyonlar farkı,

0,856 = Sakkaroz tayini için glikoz hesabı sabit sayısı,

F<sub>s</sub> = Sakkaroz tayininde yapılan seyreltme faktörü,

0,95 = Glikozdan maltoza çevirme faktörü,

Bulunan sonuç, istendiği taktirde ayrıca analize tabi tutulan numunenin kurumadesinde % olarak da hesaplanabilir. Örneğin, bir şiranın 100 g ekstraktında maltoz + maltotrioz gram olarak şöyle hesaplanabilir :

$$\text{Maltoz + maltotrioz g/100 g ekstrakt} = \frac{10 M}{e}$$

(e) ile o şıradaki ekstrakt (kurumadde) miktarı g/100 ml olarak gösterilmiştir.

### 3. Dekstrin tayini :

Dekstrinlerin seyreltik asitlerle kaynatılıp, hidrolize edilerek yapı taşları olan glikozlara parçalanması ve böylece oluşan ürünün tayin edilmesinden sonra hesaplanarak bulunması gerekmektedir.

#### Hidrolizasyon :

Bu işlem, Pawlowski - Schild (1972) veya Silbereisen ve Kremkow (1966) ya da Drawert

