

Tempe Üretiminde Asetik ve Laktik Asit Ölçümleri İçin Kullanılan İki Metodun Karşılaştırılması

Arş. Gör. Günnur TUNÇEL — Prof. Dr. Deniz GÖKTAN

Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Müh. Bölümü — İZMİR

ÖZET

Soya fasulyesinin ıslatma aşamasında fermentasyona uğraması tempe'nin daha kaliteli olmasına neden olmaktadır. Böyle bir fermentasyonda meydana gelen Laktik ve Asetik asit miktarlarının ölçülmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Araştırmada bu asitler tek olarak ve karıştırılarak HPLC ve Enzimatik yöntemle ölçülmüş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. HPLC yöntemi ile mevcut Laktik ve Asetik asit miktarlarının % 40'ı belirlenebilmiş, enzimatik yöntemde ise bu % 70'e kadar çıkmıştır.

Anahtar kelime : Asetik asit, laktik asit, HPLC, Enzimatik yöntem.

SUMMARY

THE COMPARING of 2 METHODS IN LACTIC and ACETIC ACID ANALYSES ON ACIDIFIED SOYABEANS IN TEMPEH.

It is found that good quality tempeh can be produced from fermented soaked soyabeans. During this fermentation mainly lactic and acetic acids are produced. There are number of methods of detection on these two acids. In this research only HPLC and Enzymatic methods were used. In HPLC Method 40 % of actual amount of Lactic and acetic acid could always be detected whereas in enzymatic method this amount was 70 %.

GİRİŞ

Tempe üretiminde ilk aşama soya fasulyesinin ıslatılmasıdır. Son üründe istenmeyen bakterilerin baskı altına alınması ve böylece tempe kalitesinin yükseltilmesi için bu aşamada pH'nın düşük tutulması gereklidir. Düşük pH soya fasulyelerini fermentasyona uğratarak laktik ve asetik asit oluşumuyla sağlanabileceği gibi bu asitleri dışarıdan vermek suretiyle de elde edilebilir (Shurtleff ve Aoyagi, 1980). Bu çalışmada değişik yöntemlerle yapılan laktik ve

asetik asit analizlerinden iki tanesi kullanılmış ve bunlardan hangisinin soyafasulyesi için uygun olduğu araştırılmıştır.

Bu çalışmadaki ilk asetik ve laktik asit analizleri organik bileşiklerin ayrılmasında kullanılan yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC, High Pressure Liquid Chromatography) yöntemiyle yapılmıştır. HPLC, çabuk sonuç verdiği, az miktarda örneğe ihtiyaç duyduğu ve ayırma gücü yüksek olduğu için günümüzde bir çok laboratuvarında kullanılmaktadır (Dilts, 1974). Gıda sanayindeki analizlerde uygulanan yöntemler genellikle HPLC nin en yaygın olarak kullanıldığı eczacılık endüstrisinden alınmıştır. Gıdalarda yapılan vitamin analizlerinde kullanılan kolon teknikleri, ilaç ve tabletler için geliştirilen yöntemlerle aynıdır (Saxby, 1978).

Bu çalışmada ikinci asetik ve laktik asit analizleri enzimatik kitler kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyonların spektrofotometrik olarak ölçümü prensibine dayanan kitlerin kullanımı pratik olmakla beraber pahalıdır.

Enzimatik yöntemle asetik asit tayininde oluşan reaksiyonlar aşağıda açıklandığı gibidir.

1 — Asetat, ATP, CoA ve asetil CoA sentezaz'ın bulunduğu ortamda asetil CoA'ya çevrilir.

ACS

Asetat + ATP + CoA → asetil-CoA + APM + pirofosfat

2 — Asetil-CoA, oxaloasetat ile sitrat sentezaz'ın varlığında reaksiyona girerek sitrata dönüşür.

CS

Asetil-CoA + oxaloasetat + H₂O → sitrat + CoA

3 — 2. reaksiyon için ihtiyaç duyulan oxaloasetat, malatdehidrogenaz'ın varlığında malat ve NAD'dan sentezlenir. Burada NAD NADH'ye indirgendir.

MDH

Malat + NAD⁺ → Oxaloasetat + NADH + H⁺
Burada oluşan NADH spektrofotometrik olarak ölçülür (Anon, 1986a).

Laktik asit tayininde ise reaksiyonlar,
Laktik asit, laktat dehidrogenaz'ın varlığında NAD prüvat'a okside olur. L-Laktat + NAD⁺ + LDH → prüvat + NADH + H⁺ Bu reaksiyonun dengesi laktat tarafına doğrudur. Ancak L-glutamat ve glutamat prüvat transaminaz'ın varlığında bu reaksiyonun yönü tersine yani prüvat ve NADH tarafına olabilir.

GPT

2 — Prüvat + L glutamat → L-alanin + 2 — oxoglutarat
Oluşan NADH'nin miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür (Anon, 1986b).

Bu araştırmada ısıtılmış soya fasulyesine belli miktarlarda eklenen laktik ve asetik asit miktarları yukarıda açıklanan HPLC ve enzimatik yöntemle belirlenmiş ve farklılıklar tartışılmıştır.

Materyal ve Metod

Mekaniksel olarak kabuğu ayrılmış soya fasulyeleri çeşme suyu ile yıkandıktan sonra 3 katı su eklenerek ısıtılmıştır. Bu ısıtma suyunun değişik konsantrasyonlarda laktik ve asetik asit ilâve edilerek fermentasyonu önlemek amacıyla buzdolabında 24 saat bekletilmiştir. Isıtma suları süzülerek, fasulyelerin pH ları ölçülmüştür. Enzimatik analiz ve HPLC için aynı örnek kullanılmış olup, saflaştırma farklı metodlarla yapılmıştır.

I Enzimatik yöntemle analiz

a) Örneklerin saflaştırılması

10 gram örnek benderde homojenize edildikten sonra 5 ml 1 molar konsantrasyonunda peklorik asit çözeltisi eklenerek santrüfuj edilmiştir. Üstte kalan sıvı, nötralize edilmek amacıyla 2 molar KOH çözeltisi ile pH 7 ye gelinceye kadar titre edilmiştir. Burada titre edilen sivinin ve harcanan KOH in miktarları sulandırma faktörünü hesaplamak için kaydedilmiştir. KClO₄'ün çökmesi için buzdolabında 20 dakika bekletildikten sonra filtreden geçirilmiş, elde edilen sıvı laktik asit konsantrasyonu 0.02 - 0.2 g/l asetik asit konsantrasyonu ise

0.01 - 0.15 g/l arasında olacak şekilde sulandırıldıktan sonra kullanılmıştır.

b) Laktik asit analizinin yapılışı ve hesabı
Kullanılan çözeltiler;

Çözelti 1 : 440 mg L-glumatik asit + stabilizatör + tampon olarak pH sı 10 olan glisilglisin (toplam hacim 30 ml).

Çözelti 2 : Liyofilize edilmiş 210 mg NAD, 6 ml redestile suda çözülmüştür.

Çözelti 3 : 0.7 ml glutamat-prüvat transaminaz (1100 U)

Çözelti 4 : 0.7 ml L-laktat dehidrogenaz (3800 U)

Analizin Yapılışı:

Spektrofotometre
kuvetine koyulan

çözeltiler	Kontrol	Örnek
Çözelti 1	1.00 ml	1.00 ml
Çözelti 2	0.20 ml	0.20 ml
Redestile su	1.00 ml	0.90 ml
Çözelti 3	0.02 ml	0.02 ml
Örnek	—	0.10 ml

Karıştırılmış ve yaklaşık 5 dakika sonra okunan absorpsans A₁ olarak kaydedilmiştir.

Çözelti 4	0.02 ml	0.02 ml
-----------	---------	---------

Karıştırılmış ve yaklaşık 20 dak. sonra reaksiyon tamamlanmıştır. Kontrol ve örneğin absorpsansları (A₂) okunmuştur.

Konsantrasyon aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$V \cdot MW$$

$$C = \frac{E \cdot d \cdot v \cdot 1000}{V \cdot MW} \times \Delta A \text{ (g/l)}$$

$$E \cdot d \cdot v \cdot 1000$$

$$V = \text{toplam hacim (ml)}$$

$$v = \text{örnek hacmi (ml)}$$

$$MW = \text{laktik asitin molekül ağırlığı (g/mol)}$$

$$d = \text{küvet genişliği (ışığın geçtiği yoi) (cm)}$$

$$E = \text{NADH nin absorpsiyon katsayısı}$$

$$340 \text{ nm de } 6.3 \text{ (} 1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{)}$$

$$\Delta A = \Delta A \text{ örnek} - \Delta A \text{ kontrol}$$

Örnek sulandırıldıysa, sulandırma faktörüyle çarpılmıştır.

D — laktik asit analizi, L-laktik asitten sonra aynı kuvette yapılmıştır.

Bu durumda L-laktik asit reaksiyonu tamamlandıktan sonra kontrol ve örneğe 0.05'er ml

D-LDH ilâve edilmiştir. Hesap için formüdeki toplam hacim düzeltilmiştir.

C) Asetik asit analizinin yapılışı ve hesabı;

Kullanılan Çözeltiler :

Çözelti 1 : 134 mg L-malik asit + 67 mg Magnezyum klorür + stabilizatör + ph sı 8.4 olan triethanolamin (tampon toplam hacim 32 ml.)

Çözelti 2 : 175 mg ATP + 18 mg CoA + 86 mg NAD + Stabilizatör liyofilize edilmiş bu karışım 7 ml redestile suda çözülerek kullanılmıştır.

Çözelti 3 : Malat dehidrogenaz (1100 U) + sitrat sentezaz (270 U)ın 0.4 ml lik enzim suspansiyonu

Çözelti 4 : Asetil-CoA-sentezaz (5 U) 0.25 ml redestile suda çözülerek kullanılmıştır.

Analizlerin Yapılışı

Spektrofotometre

küvetine koyulan

çözeltiler	Kontrol	Örnek
Çözelti 1	1.00 ml	1.00 ml
Çözelti 2	0.20 ml	0.20 ml
Redestile su	2.00 ml	1.90 ml
Örnek	—	0.10 ml

Karıştırılmış ve okunan absorbens A_0 olarak kaydedilmiştir.

Çözelti 3	0.01 ml	0.01 ml
-----------	---------	---------

Karıştırılmış ve 3 dak. sonra okunan absorbens A_1 olarak kaydedilmiştir.

Çözelti 4	0.02 ml	0.02 ml
-----------	---------	---------

Karıştırılmış 10-15 dak. reaksiyonun tamamlanması beklenmiştir. Okunan absorbens A_2 olarak kaydedilmiştir. 15 dak. sonra reaksiyon tamamlanmamışsa, absorbanstaki artma 2 dak. süre içinde sabit kalıncaya kadar okumaya devam edilmiştir. Konsantrasyon aşağıdaki formülle hesaplanmıştır. Örnek sulandırıldıysa sulandırma faktörüyle de çarpılmıştır.

$$C = \frac{V \cdot MW}{E \cdot d \cdot v \cdot 1000} \times \Delta A \text{ (g/l)}$$

V = toplam hacim (ml)
v = örnek hacmi (ml)

MW = Asetik asitin molekül ağırlığı (g/mol)

d = küvet genişliği (ışığın geçtiği yol) (cm)

E = NADH nin absorpsiyon katsayısı

340 nm de 6.3 ($1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

$$\Delta A = \left[\frac{(A_2 - A_0) \text{ örnek} - \frac{(A_1 - A_0)^2 \text{ örnek}}{(A_2 - A_0) \text{ örnek}}}{(A_2 - A_0) \text{ Kontrol} - \frac{(A_1 - A_0)^2 \text{ Kontrol}}{(A_2 - A_0) \text{ kontrol}}} \right]$$

II HPLC yöntemiyle analiz

Analiz Spectra - physics'in HPLC cihazıyla yapılmıştır. 30 cm x 7.8 mm (ID) boyutlarında Aminex HPX-87-H isimli kolon ve shodex RI SE-61 refraktif index dedektörü kullanılmıştır. 0.01 N sülfirik asitte çözülen örnek kolondan 0.6 ml/dak. akış hızında 30°C de geçirilmiştir.

Örnekler santrfüj edilip, üstteki sıvı ayrıldıktan sonra filtreden geçirilmiş ve 20 μ / hacmindeki saflaştırılmış örnek sisteme enjekte edilmiştir.

Sonuçlar ve Tartışma

Soyafasulyelerinin ıslatıldıkları suya ilave edilen asit miktarları ile bunların HPLC ve enzimatik yöntemle belirlenen % leri tablo 1'de görülmektedir. % 0.2 laktik asit ilave edilen örnekte enzimatik yöntemle % 0.09; % 1 laktik asit ilave edilende % 0,528 ve % 2 laktik asit ilave edilende ise % 1,292 bulunmuştur. Bu analizlerdeki belirleme oranları sırasıyla % 45, % 53, ve % 70 olarak hesaplanmıştır. Buradan anlaşıldığı gibi enzimatik yöntemle yapılan analizlerde laktik asit konsantrasyonu arttıkça belirleme oranında artmaktadır. Analiz HPLC ile yapıldığı zaman ise laktik asit konsantrasyonu ne olursa olsun belirleme oranı % 40 civarında bulunmuştur. Asetik asit analizi enzimatik yöntemle yapıldığı zaman belirleme % sinin % 90 civarında olduğu görülmüştür. Analiz HPLC ile yapıldığı zaman ise belirleme oranı yine laktik asit analizinde olduğu gibi % 40 civarında kalmıştır. Bütün örneklerde belirleme oranının % 40 civarında olması HPLC metodunun soyafasulyesinde laktik ve asetik asit analizlerinde güvenli bir şekilde kullanılamayacağına göstermektedir. Diğer taraftan enzimatik kitlerin pahalı olması da HPLC nin tercih edilmesini gerektirmektedir. Bu durumda soya fasulyesinde asetik ve laktik asit analizlerinde HPLC yi kullanabilmek için saflaştırma metodlarının geliştirilmesi yoluna gidilmelidir.

Tablo 1. Eklenen laktik ve asetik asit miktarlarının HPLC ve enzimatik yöntemle analizi ve belirleme yüzdeleri.

Örnek	İlave edilen asit (%)	pH	Bulunan miktar (%)		Belirleme oranı (%)	
			HPLC	Enzimatik	HPLC	Enzimatik
1	Laktik asit	0.0	0.000	0.000		
	Asetik asit	0.0	0.000	0.000		
2	Laktik asit	0.2	0.080	— ^a	40	— ^a
	Asetik asit	0.0	0.000	0.000		
3	Laktik asit	0.2	0.075	0.090	32.5	45
	Asetik asit	0.1	0.000	0.093	0	93
4	Laktik asit	2.0	0.800	1.292	40	65
	Asetik asit	0.5	0.227	0.452	45.4	90
5	Laktik asit	0.0	0.000	0.000		
	Asetik asit	0.5	0.195	0.341	39	68
6	Laktik asit	2.0	0.830	1.403	41.5	70
	Asetik asit	0.0	0.000	0.000		
7	Laktik asit	1.0	0.410	0.528	41	53
	Asetik asit	0.0	0.000	0.000		

^a Analiz yapılmadı.

KAYNAKLAR

- Anonymous, (1986 a) UV Method for the Determination of Acetic acid in Food Foodstuffs and Other Materials Cat. No. 148, 261 Boehringer Mannheim GMBH Biochemica.
- Anonymous, (1986 b) UV Method for the Determination of L-lactic acid in Foodstuffs and Other Materials Cat. No. 139 048. Boehringer Mannheim GMBH Biochemica.
- Dilts, R.V., (1974) Analytical Chemistry, D. Van Nostrand Company New York.
- Saxby, M.J., (1978) Applications of High Pressure Liquid Chromatography in Food Analysis. In Developemnts in Food Analysis Techniques-1 (Ed. R. D. King), Applied Science Publishers Ltd. London.
- Shurtleff, W., Aoyagi, A., (1980). Tempeh Production. The Book of Tempeh, Vol. II. Published by New Age Foods,