

Sindirilmeyen Polisakkaritlerin Analiz Yöntemleri

Dr. Gonca PAŞIN

H.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü — ANKARA

ÖZET

Sindirilmeyen polisakkaritlerin kompleks yapıları nedeniyle tüm sindirilmeyen polisakkaritlere uygulanabilecek tek bir yöntemin geliştirilmesi mümkün değildir. Sindirilmeyen polisakkariti meydana getiren yapıtaşlarının çeşitliliği nedeniyle değişik yöntemlerin kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Özellikle kimyasal yapının değişikliğe uğramaması için ham maddeye uygulanacak ön işlemlerde maksimum dikkati göstermek gerekmektedir.

GİRİŞ

Son yıllarda yapılan araştırmalarda hücre duvarı polisakkaritlerinin yapısı hakkında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Hücre duvarı polisakkaritleri, Beslenme Biliminde diyet posası olarak bilinmekte olup büyük oranda hücre duvarı yapısında bulunurlar (2, 4).

Hücre duvarında yapısal olarak bulunan karbonhidrat yapısındaki polisakkaritlerin başında pektik maddeler, hemiselülozlar ve selülozlar ile karbonhidrat olmayan lignin ve diğer eser elemanlar gelmektedir (15).

Bu polisakkaritlere sindirilemeyen polisakkaritler de denir. Bunlar memelilerin sindirim sistemindeki enzimlerle parçalanmazlar. Ancak, bir kısmı ruminatlarda, herbivorlarda kalınbarsak ve sekum ile insan ve diğer omnivorların kalınbağırsağında parçalanıp kısa zincirli yağ asitlerini oluştururlar (15).

Diyet posası veya sindirilmeyen polisakkaritlerle zenginleştirilmiş yiyeceklere artan ilgi bu maddelerin fizyolojik etkilerini ve yapısal özelliklerini saptamak amacıyla yeni araştırmaların yapılmasına yol açmıştır (3, 8).

Sindirilmeyen polisakkaritlerin yapısı ile ilgili bilgilerin pek çoğu, odunumsu yapıdaki bitkilerin hücre duvarlarının incelenmesiyle elde edilmiştir. Diğer taraftan bitkilerin gıda olarak kabul edilen grubunun hücre duvarı yapısı hakkında ayrıntılı araştırmalar mevcut de-

ğildir. Sindirilmeyen polisakkaritlerin fonksiyonel özelliklerinin saptanmasında bunların fiziksel ve fizikokimyasal yapılarının bilinmesi gerektiği ve bu özelliklerinin de kimyasal yapı ile ilişkili olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (6, 7). Sözü edilen bu ilişki, bugüne dek kullanılan analiz yöntemlerindeki çeşitlilik ile ham maddeyi *in vitro* olarak hazırlarken yaratılan yanılıklar nedeniyle bu alandaki bilgilerimizi sınırlı kılmıştır. Bu ilişkinin tam olarak saptanabilmesi için öncelikle sindirilmeyen bu polisakkaritlerin hücre duvarından tam olarak izolasyonu, sonra da yapıtaşlarına ayrıştırılması gerekmektedir.

Gıdalarda bulunan yapısal sindirilmeyen polisakkaritlerin analizleri ortamın yapısının çok kompleks olması nedeniyle zaman alıcı ve ayrıştırma işlemi de pekçok kademededen oluştuğu için karmaşıktır. Ayrıca analizlerde kullanılan yöntem ve tekniklerdeki farklılıklar da büyük ölçüde sonucu etkilemektedir.

Sindirilmeyen polisakkarit örneğinin hazırlanması

Son zamanlarda yayınlanan analitik işlemlerde (5, 12) eğer hammadde gerektiriyorsa bir ön kurutma ile boyut küçültme işleminin önemi vurgulanmaktadır. Kurutma havadağ dondurularak veya aseton yardımı ile yapılmalı, mümkün mertebe fırında kurutma işleminden kaçınılmalıdır. Boyut küçültmede bilyeli değirmen tekniği dikkatli bir biçimde kullanılmalıdır. Aksi halde bu işlem sırasında selüloz bazen parçalanabilir.

Ortamda bulunan serbest çözünen şekerler, yağlar ve pigmentler uygun bir çözücü sistemiyle uzaklaştırılmalıdırlar. Özütleme işleminde genellikle sulu alkol kullanılır. Ancak etanol, metanol veya aseton gibi çözücülerle özütleme hücrelerarası birçok bileşiğin birlikte çökmelerini etkiler. Böylece sitoplasmik proteinlerin, enzimlerin, nükleik asitlerin, nişastanın, polifenollerin ve bunların oksidatif ürünlerinin birlikte çökmelerinden dolayı poli-

sakkaritin içeriğinde bulunuyormuş gibi yapay bir etki ortaya çıkar (11, 12).

Alkole muameleden sonra dietil eter ile ve edilerek yağ ve pigmentler ortamdaki uzaklaştırılır.

Sindirilmeyen polisakkaritleri hammaddeyi ayrıştırırken kimyasal yapısını bozmama ya dikkat etmek gerekir. Ortamda bulunan nişasta genellikle enzimatik yolla ayrıştırılır. Nişastanın enzimlerle kolayca parçalanmasını sağlamak için nişasta jelatinize edilir.

Jelatinazasyon 15 dakika sıcak suda kaynatmayla olumlu sonuçlar vermektedir (9).

Bazı araştırmacılar çeşitli hububatlarda sindirilmeyen polisakkaritleri nişastadan ayırmak için sıcak suda jelatinazasyon yöntemi yerine dimetil sülfoksit ile nişastayı çözünür hale getirmişlerdir. Ancak bu yöntemde dimetil sülfoksitin nişasta ile beraber bazı β -glukanları ve bir miktarda arabinoksilanları da çözdüğü görülmüştür.

Analitik bir çalışma amaçlandığında çözünen bu polisakkaritler ortamdaki tekrar izole edilebilirler. Ancak preparatif bir çalışmada bu polisakkaritler sindirilmeyen polisakkaritlerden bir daha geriye dönüşemez bir biçimde ayrılmış olurlar.

Nişastanın sindirilmeyen polisakkaritlerden ayrıştırılmasında yaş bilyeli değirmen yöntemi de kullanılmaktadır (13). Mekanik ayrıştırma bazen maddenin polimerik yapısını değiştirdiği için bu yöntem dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır.

Sindirilmeyen polisakkaritlerin izolasyonları sırasında ortamdaki proteinlerin de ayrıştırılması gerekmektedir. Bazı hücre duvarlarının protein yapısındaki kısmı bitki hücresinin sindirilmeyen bölümü olarak kabul edilir. Bu kısım çok önemli bir bölümü teşkil etmez ancak sistemde bulunan diğer maddelerle birlikte çökelti halinde bulunur. Hububatlarda olduğu gibi birçok bitkide bu proteinleri pratikte ayırt etmek çok zordur. Bu nedenle *in vitro* çalışmalarda ortamdaki sadece hücre duvarının sindirilmeyen kısmındaki proteinin bırakılması hemen hemen olanaksızdır.

Proteinler ortamdaki enzimatik yolla ayrıştırılırlar. Genellikle bu işlemde uygun bir deterjan kullanılır (1, 10, 14).

Enzimatik ayrıştırmada en çok kullanılan enzim pepsindir. Pepsin asidik ortamda (pH 2) çalışır. Ortamın asitliği glukon ve arabinoksilanları etkileyerek polisakkaritlerin kimyasal yapısını değiştirmektedir. Örneğin soya fasulyesinin pepsinle yıkımı sırasında sıcak suda çözünür polisakkaritlerin yarısının suda çözünür hale geçtiği bildirilmiştir (14).

Soya fasulyesi kabuğunda ve çavdar kepeğinde yapılan çalışmada pepsinle muameleden sonra sıcak suda çözünen ve çözünmeyen polisakkaritlerin oranında düşüş görülmüştür (9).

Aynı çalışmada asidik ortamda en çok pentoz yapısındaki karbonhidratların kayba uğradığı da saptanmıştır. Bunun aksine ise Pepsinle muamele gören polisakkaritlerdeki toplam heksozların miktarları pepsinle muamele görmeyen polisakkaritlere oranla daha fazla bulunmuştur. Bunun nedeni olarak ön işlem sırasında % 80 ağırlık etanolle çöktürmeden en az heksozların etkilenebileceği öne sürülmüştür. Ortamın asidik olması istendiği takdirde pepsin enzimi yerine fungus proteazları da kullanılabilir. Fungus proteazları pH 3,5-9 arasında aktivite gösterdiğinden pankreatik α -amilaz ile birlikte (0,1 M fosfat tamponu ile pH 6'da) kullanılabilir.

Proteini ortamdaki uzaklaştırmak için sadece enzimatik yöntem kullanılmaz. Çeşitli hububat ürünlerini sulu sodyum deoksikolat ve fenol:asetik asit: su karışımı ile muamele ettiklerinde ortamdaki proteinin başarı ile uzaklaştırıldığı bildirilmiştir (13). Ancak, pektik yapıdaki maddelerin ve β -1, 3 ve 1, 4 bağlı glukozların sodyum deoksikolatındaki kısmi çözünürlüklerinden dolayı, kullanılan çözücü karışımının farklı kökenli bitkiler için farklı bileşimde olması gerekmektedir. Bugüne değin bu konudaki yeterli bilgi mevcut değildir. Kullanılacak yöntem seçilirken gözönünde bulundurulması gerekli en önemli konu polisakkaritin yapısı ve bileşimidir. Ortamdaki yağlar, şekerleri, pigmentleri ve proteinleri uzaklaştırdıktan sonra geri kalan kısım sindirilmeyen polisakkaritler

Tablo 1. Hücre Duvarından Sindirilmeyen Polisakkaritlerin İzolasyonu

Bilçşik Pektik maddeler	Özütleme İşlemleri
Hemisellülozlar (A) ve (B)	EDTA veya amonyum oksalat gibi kelatların eklenmesinden sonra sıcak su ile özütleme N ₂ atmosferi altında seyreltik alkali ile özütleme (A) Nötralizasyon sırasındaki çözelti (B) Nötralizasyonu takiben alkol eklenmesiyle meydana gelen çözelti.
Hemisellüloz (C) Sellüloz	N ₂ atmosferi altında derişik alkali ile özütleme % 17,5 NaOH ile çözünmeyen kalıntı (α - Sellüloz)
Lignin	% 72 ağı/ağı H ₂ SO ₄ ile çözünmeyen kalıntı (Klason lignini)

olup, bunu da fraksiyonlarına ayırmak mümkündür (Tablo 1).

Suda çözünen polisakkaritlerin ayrıştırılması

Ortamdaki pektik maddelerin ayrıştırılması için 90 - 100°C'de sıcak su veya sıcak 0,5 % ağı/hac amonyum oksalat çözeltisi kullanılır. Ortam soğuduktan sonra çözelti asitlendirilir; etanol veya aseton eklenmesiyle pektik maddelerin çökmesi sağlanır (15).

Delignifikasyon

Delignifikasyon işlemi yapılmadan odunmsu yapıların hücre duvarı polisakkaritleri tamamen ayrıştırılamazlar. Delignifikasyon işlemi diğer otsu yapılar içinde geçerlidir (15). Ortamdan lignini uzaklaştırmak için genellikle florin veya sulfit kullanılır.

Bitkisel maddelerden ligninin ayrıştırılması yöntemi Whistler ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (16).

Delignifikasyon işlemi şiddetli bir kimyasal reaksiyona neden olduğundan ortamdaki bazı polisakkaritlerin yapısını bozmaktadır. Bu nedenle az miktarda lignin içeren maddelerde delignifikasyon işlemi gerekmez ve protein açısından zengin materyalde delignifikasyon işleminden kaçınılmalıdır.

Hemisellülozların alkali ile hidrolizi

Bu işlemde genellikle çeşitli kuvvetteki alkaliler kullanılır. Ancak ençok % 5 ve % 24

ağı/hac KOH ile % 4 ve % 10 ağı/hac NaOH kullanılmaktadır (15). Hidroliz sırasında ortamda O₂ bulunmamalıdır, işlem N₂ atmosferi altında yapılır. Alkali ile özütleme birkaç kez tekrarlanır. Ortamı asetik asitle hafif asitlendirerek hemisellülozun A fraksiyonu ayrıştırılır. Hemisellülozun B fraksiyonu ise ortama 4 hacim etanol eklenerek elde edilir.

Sellülozun özütlenmesi

Hemisellülozunda alkali ile hidrolizinden sonra kuvvetli alkalide çözünmeyen kısmı α - sellüloz ve β - 1, 4 - glukandır. Ortamda bazen α - sellülozun yıkımı ile eser halde bulunan diğer şekerlere de raslanabilir. Bunlar ksilan tipi hemisellüloz veya kaynağı ne olursa olsun, bunların hücre duvarındaki fibrillerde yakın ilişkili olduğu bilinmektedir (15). Ortamdaki sellüloz % 72 hac/hac H₂SO₄ ile hidroliz edilir.

Polisakkarit fraksiyonlarının ölçülmesi

Çözelti halinde bulunan fraksiyonların gravimetrik olarak ölçülmesi sakıncalıdır. Zira bu çözelti tamamen saf olmayabilir. Özellikle hemisellüloz, protein ve α - sellüloz (buna kitinde dahildir) ayrıca eser halde lignin ve inorganik madde de ortamda mevcut olabilir.

Deneyisel çalışmalarla elde edilen bu fraksiyonlar hidroliz edilir ve yapıtaşları olan şekerlerin ölçümü yapılır. Hücre duvarı polisakkaritlerinin bir çoğu mineral asit ile tamamen yıkılabildikleri gibi bunlar hidrolitik olarakta yıkılabilirler.

Genelde tüm polisakkaritlere uygulanabilir genel bir işlem söz konusu değildir. Analizi yapılacak ham maddenin özelliğine uygun yöntem seçilmelidir. Hidroliz işlemi için genellikle 0,4 N veya NH_2SO_4 triklorasetik asit veya trifluoroasetik asit kullanılır.

Hidroliz işlemi için trifluoroasetik asit kullanımını daha sonra gazlıkit kromatografisi ile alditoil asetatlarının ölçümünde yarar sağlamaktadır.

Hidrolizi tamamlanan polisakkaritlerin ana-

lizisi için en iyi yöntemin iyon değiştirme kromatografisi olduğu kabul edilmektedir (15).

Ortamda eğer üronik asit mevcutsa, polisakkaritlerin hidrolizinden önce veya sonra spektrofotometrik yöntemle ölçülebilir.

Pektik maddelerin hidrolizi ve ölçümü içinde çeşitli yöntemler mevcuttur (15). Halen piyasada hemisellüloz enzim preparatları bulunmadığından ve mevcut selüloz pereparatlarında çok az aktivite gösterdiğinden analizlerde kullanılmaları sınırlanmaktadır.

S U M M A R Y

With so many ill-defined and changing variables for methods equally applicable in all situations would be difficult to develop for nondigestible polysaccharides. Variability in the nature of the nondigestible polysaccharides

may require different technics that should be used only with a particular type of material. In order to prevent of altering the chemical pattern of the material utmost attention should be given in the preparation stage.

K A Y N A K L A R

- 1 — Anderson, N.E., and F.M. Clydesdale (1980). An analysis of the dietary fiber content of a standard wheat bran, *J. Food Sci.* 45: 336.
- 2 — Burkitt, D.P., and H.C. Trowell, eds. (1975). *Refined Carbohydrates and Disease. Some implications of Dietary Fiber.* Academic Press New York and London.
- 3 — Dubois, D.K. (1978). The practical application of fiber materials in bread production. *Bakers Dig.* 52 (2): 30.
- 4 — Inglett, G.E. and I. Falkehag, eds (1979). *Dietary Fibers: Chemistry and Nutrition.* Academic Press, New York and London.
- 5 — James, W.P.T., and O. Theander, eds. (1980). *The Analysis of Dietary Fiber in Food.* Markel Dekkar, Inc. New York.
- 6 — Jeltama, N.S., and M.E. Zabik. (1979). Fiber components. Quantitation and relationship to cake quality *J. Food. Sci.* 44: 1732.
- 7 — Mc Conell, A.A., A.M. Eastwood and W.D. Mitchell. (1974). Physical characteristics of vegetable foodstuffs that would influence bowel function. *J. Sci. Food. Agric.* 25: 1457.
- 8 — Pomeranz, Y., M.D. Shogren, K.T. Finney and D.B. Bechtel. (1977). Fiber in bread making. Effects and functional properties *Cereal chem.* 54: 25.
- 9 — Rasper, V.D. (1981). Analysis and Testing of Non digestible polysaccharides. *Cereal Foods World.* 26 (5): 228.
- 10 — Saunders. R.M., and E. Hautala. (1979). Relation among crude fiber, neutral detergent fiber, invitro dietary fiber and in vivo (rats) dietary fiber in wheat foods. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 1188.
- 11 — Selvendran. R.R. (1975). Analysis of cell wall material from plant tissues: Extraction and purification. *Phytochemistry.* 14: 1011.
- 12 — Selvendran, R.R., S.G. Ring and M.S. du Pont. (1979). Assessment of procedures used for analysing dietary fibre and some recent developments. *Chem. Ind.* 7 (4): 225.
- 13 — Selvendran, R.R., and M.S. du Pont. (1980). An alternative method for the isolation and analysis of cell wall material from cereals. *Cereal chem.* 57: 278.
- 14 — Schwizer, T.F., and P. Würsch. (1979). Analysis of dietary fiber. *J. Sci. Food. Agric.* 30: 613.
- 15 — Southgate, D.A.T. (1976). *Determination of food carbohydrates.* Appliedscience Publishers Ltd. London.
- 16 — Whistler, R.L., Bachrach, J. and Bowman, Dr. R. (1948). *Arch. Biochem.* 18. 25.