

DİYET LİFİ TAYİN YÖNTEMLERİNİN İRDELENMESİ II-Enzimatik Yöntemler

A REVIEW OF THE DIETARY FIBER METHODOLOGY II-ENZYMATIC METHODS

Dilek BOYACIOĞLU, M.Hikmet BOYACIOĞLU

İ.T.Ü. Kimya Metalurji Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü-İSTANBUL

ÖZET: Günümüzde diyet lifi tayin metodolojisi enzimatik-gravimetrik ve enzimatik-kimyasal olarak iki kategoriye ayrılmaktadır. Bunlardan enzimatik-kimyasal yöntemler tekrar enzimatik-kolorimetrik, enzimatik-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High pressure liquid chromatography; HPLC) ve enzimatik-gaz sıvı kromatografisi (Gas-liquid chromatography; GLC) olarak sınıflandırılabilir. Halen diyet lifi tayininde en yaygın olarak tercih edilen yöntemler enzimatik-gravimetrik yöntemlerdir.

SUMMARY: Currently, dietary fiber methodology can be categorized as enzymatic-gravimetric and enzymatic-chemical. The latter can be further classified into enzymatic-colorimetric, enzymatic-high performance liquid chromatography (HPLC), and enzymatic-gas liquid chromatography (GLC) methods. At present, enzymatic-gravimetric methods are most widely used for the determination of dietary fiber.

GİRİŞ

Diyet lifinin günümüzde kabul edilen tanımı insan sindirim sisteminde yer alan enzimlerle hidrolizlenemeyen polisakkaritleri ve lignini kapsamaktadır (TROWELL ve ark., 1976). Bu tanımda yer alan polisakkaritler ise kullanılan (available) ve kullanılmayan (unavailable) polisakkaritler olarak sınıflandırılabilir (LEE ve PROSKY, 1992). Bu sınıflandırmada kullanılabilir nitelikteki polisakkaritler mevcut nişasta ve dekstrinleri, kullanılmayan nitelikteki polisakkaritler ise dirençli nişasta (resistant starch) ve nişasta olmayan polisakkaritleri içermektedir. Ancak diyet lifinin tanımına kullanılmayan polisakkaritlerle birlikte lignin de ilave edilmektedir (LEE ve PROSKY, 1992).

Günümüzde diyet lifi tayin metodolojisi enzimatik-gravimetrik ve enzimatik-kimyasal yöntemler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Enzimlerin kullanıldığı kimyasal yöntemler ise kolorimetrik, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High pressure liquid chromatography; HPLC) ve gaz-sıvı kromatografisi (Gas-liquid chromatography; GLC) tekniklerini içermektedir. Mevcut gravimetrik yöntemler içinde toplam diyet lifi, suda çözünür diyet lifi ve suda çözünür olmayan diyet lifi yöntemleri (AOAC, 1984), lif bileşenlerinin miktarları hakkında bilgi vermemekle beraber doğruluk, kesinlik ve ekonomik oluşları nedeniyle çok yaygın olarak kullanılmaktadır. ENGLYST ve CUMMINGS (1988) tarafından geliştirilen enzimatik-kolorimetrik yöntem ise tüm kimyasal yöntemler içinde en hızlı sonuç veren ve ekonomik olan yöntemdir. Bununla beraber indirgen şekerlerin ve üronik asitlerin özgün olmayan renk reaksiyonları nedeniyle yöntemin enzimatik-GLC veya enzimatik-gravimetrik yöntemlere göre kalibre edilmesi gereklidir (LEE ve PROSKY, 1992). Enzimatik-GLC ve enzimatik-HPLC yöntemleri ile diyet lifinin bileşenleri hakkında bilgi alınabilmesine karşın bu yöntemler zaman alıcı ve masraflı olmaları, tekrar edilebilirliğin düşük olması nedeniyle rutin analizlerde kullanılmamaktadır. Bu derlemede diyet lifi tayininde mevcut enzimatik yöntemler tartışılmıştır.

TAYİN YÖNTEMLERİ

Southgate Yöntemi

1960'ların sonuna doğru Southgate çözünür olan ve olmayan diyet lifi tayin yöntemlerinin geliştirilmesine öncülük etmiştir (SOUTHGATE, 1969; SOUTHGATE ve ark., 1978). Yöntemde selülöz, selülöz olmayan polisakkaritler ve lignin bileşenleri kullanılmayan karbonhidratlar şeklinde tanımlanan toplam diyet lifi olarak tayin edilmektedir (Şekil 1). Aynı zamanda selülöz olmayan polisakkaritlerin heksoz, pentoz ve üronik asit kompozisyonu da elde edilmektedir. Southgate'in bu fraksiyonlara ayırma işlemi alkol ile yıkama ve enzimle nişastanın hidrolizini takiben, seyreltik sülfürik asitle selülöz olmayan polisakkaritlerin

hidrolizini ve daha sonra da derişik sülfürik asitle selülozün hidrolizini içermektedir. Bu hidrolizlerden açığa çıkan şekerler ve üronik asitler ise kolorimetrik olarak tayin edilmekte ve geriye kalan kalıntı lignin olarak tanımlanmaktadır. Elde edilen veriler basit şekerler cinsinden ifade edildiği için diğer yöntemlerle karşılaştırmada bu değerlerin polisakkarit cinsinden miktarlarının yaklaşık %10 daha fazla olduğu dikkate alınmalıdır (SOUTHGATE ve WHITE, 1981).

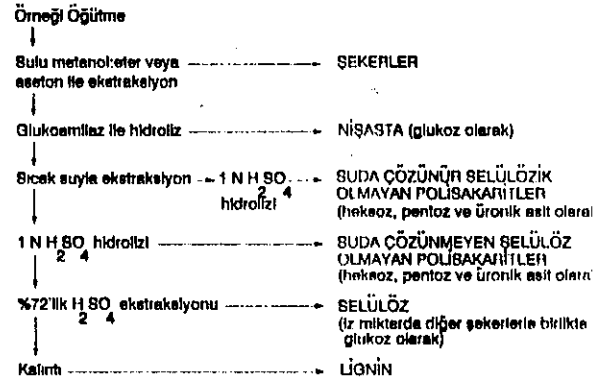
Yöntemin dezavantajları; 1) alkol ekstraksiyonu ile hücre duvarı materyalleri ile birlikte bazı fenol karakterde maddelerin, nükleik asitlerin, depo polisakkaritlerinin ve hücre duvarı proteinlerinin çökmesi, 2) gıdanın hücre yapısını tam olarak parçalanması ve bunun nişastanın uzaklaştırılmasında problem yaratması, 3) amiloglukozidaz ile muamele edilmiş kalıntının sıcak suyla ekstraksiyonunun pektik yapıdaki maddelerin ve bazı selüloz olmayan polisakkaritlerin çözünür hale geçmesini engellemesi, 4) selüloz olmayan polisakkaritlerdeki nötral şekerlerin asitle hidroliz sırasında serbest hale geçmesi, ve 5) lignin miktarının ligninle birlikte çökelen diğer maddeler nedeniyle hatalı olarak tahminlenmesi şeklindedir (SELVENDRAN ve ark., 1981).

Anderson ve Clydesdale Yöntemi

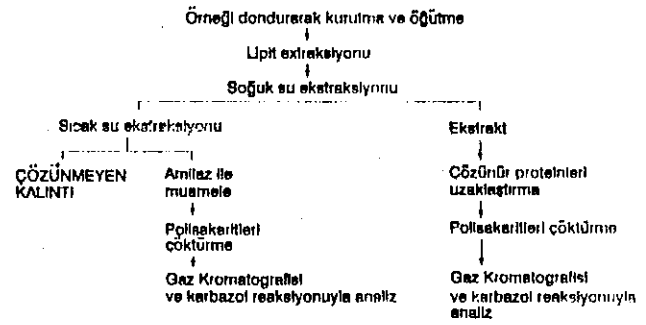
Anderson ve Clydesdale (1980)'ın suda çözünür diyet lifinin tayini amacıyla geliştirdikleri yöntemde sıcak ve soğuk su ekstraksiyonları üzerinde durulmaktadır (Şekil 2). Yöntemde soğuk su ekstraktı 90°C'a dek 5 dakika ısıtılmakta ve proteinler santrifüjlenerek uzaklaştırılmaktadır. Polisakkaritler alkol ile çöktürülmekte, santrifüjleme ile toplanmakta ve daha sonra nötral ve asidik şekerler analizlenmektedir. Sıcak su ekstraktı nişastayı hidrolizlemek amacıyla amilazla muamele edilmekte ve polisakkaritler benzer şekilde çöktürülmekte, toplanmakta ve analizlenmektedir. Soğuk ve sıcak su ekstraktlarından çöktürülen polisakkaritlerin toplamı suda çözünür diyet lifi miktarını vermektedir. Bu yöntem pek çok gıdanın çözünür diyet lifi miktarını karşılaştırmada kullanılabilir.

Englyst Yöntemi

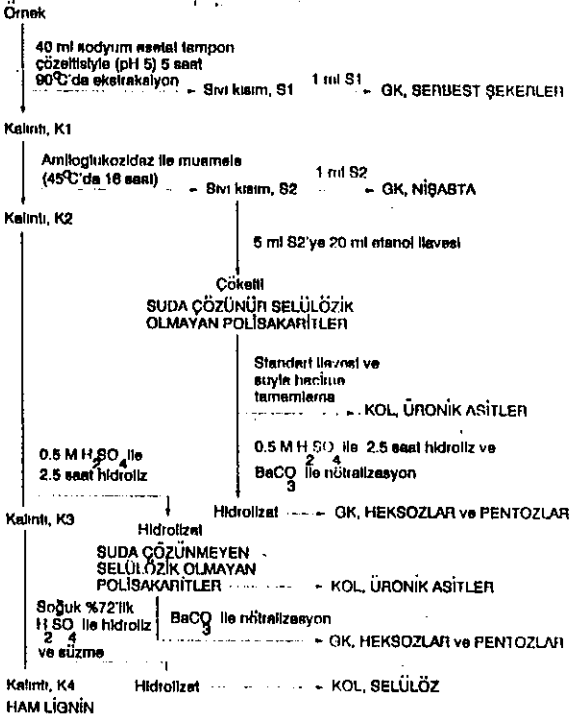
Nişastanın uzaklaştırılması ve şeker miktarlarının tayinlerinde mevcut problemler Englyst'i Southgate yöntemini modifiye etmeye yönlendirmiştir (ENGLYST ve CUMMINGS, 1984.) Bu yöntemde nişastayı daha sonraki enzimle muamele işlemine hazırlamak ve çözünür hale getirmek için dimetilsulfoksit kullanılmıştır (Şekil 3). Nişasta olmayan polisakkaritler etanolle çöktürülmekte ve sülfürik asitle monosakkaritlere hidrolizlenmektedir. Bu hidrolizle oluşan şekerler ise alditol asetat esterleri olarak gaz kromatografisi ile analizlenmektedir. Pektinlerin bir kısmını oluşturan üronik asitler kolorimetrik olarak tayin edilmektedir. Englyst'in toplam diyet lifi tanımına dahil etmediği lignin ise tayin edilmemektedir. Bu yöntemin daha sonraki modifikasyonları ise; 1) gaz kromatografisi olmayan laboratuvarlarda kolorimetrik bir şeker tayin yönteminin ilavesi, 2) gaz kromatografisinde kapiler kolonların kullanımı, 3) nişasta hidrolizi



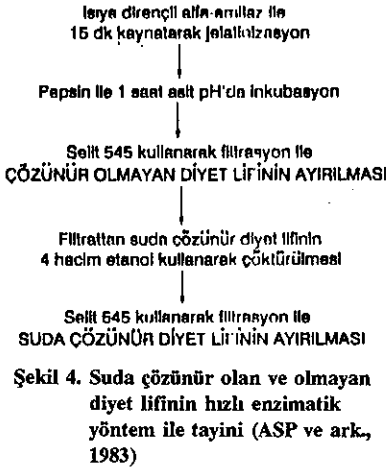
Şekil 1. Southgate diyet lifi tayin yöntemi (SOUTHGATE ve ark., 1978)



Şekil 2. Suda çözünür polimerlerin Anderson ve Clydesdale yöntemi ile analizi (ANDERSON ve CLYDESDALE, 1980)



Şekil 3. Englyst yöntemiyle serbest şekerler, nişasta olan ve olmayan polisakaritlerin sınıflandırılması GK=Gaz kromatografisi; KOL=Kolorimetrik analiz (ENGLYST, 1981)



için geliştirilmiş bir enzim sisteminin kullanımını (ENGLYST ve CURMINGS, 1988), ve 4) ligninin de tayin edilmesi için proteolitik ve lipolitik enzim aktivitesine sahip porcine pankreatin enziminin kullanımı, elde edilen kalıntının yıkanmasında su yerine %80-85 etanolün tercih edilmesi ve aseton ile kurutma işleminin ilavesidir (FLINT ve CAMIRE, 1992). Englyst yöntemi diyet lifi komponentlerinin kompozisyonunu incelemeye de olanak verdiği için özellikle araştırma amacıyla tercih edilen bir yöntemdir. Oldukça uzun olan ve tecrübe gerektiren bu yöntem rutin amaçlı olarak kullanılmamaktadır.

Asp Yöntemi

ASP ve ark. (1983) suda çözünür olan ve olmayan diyet lifinin tayini için enzimatik ve hızlı sonuç veren bir yöntem geliştirmişlerdir (Şekil 4). Yöntemde nişastanın tümünü ve proteinin büyük bir kısmını oldukça kısa bir sürede parçalayabilen bir enzim sistemi kullanılmakta ve diyet lifi hidrolize olmuş nişasta ve proteinden selit yardımıyla filtrasyon suretiyle ayrılmaktadır. Bu yöntem çeşitli gıdaların diyet lifi miktarlarının karşılaştırılmasında rutin amaçlı olarak kullanılabilir.

Theander ve Westerlund Yöntemi

THEANDER ve WESTERLUND (1983 ve 1986) suda çözünür olan ve olmayan diyet lifinin tayini amacıyla üç farklı akım şemasını kapsayan bir yöntem geliştirmişlerdir (Şekil 5). Yöntemde nişastanın uzaklaştırılmasında ısıya dayanıklı amilaz ve amiloglukozidaz enzimleri kullanılmaktadır. A yöntemi ile etanol/hekzan ekstraksiyonu ve enzimlerle muameleden sonra çözünür olan ve olmayan kısımlar ayrılmaktadır. B yöntemi çözünür olan ve olmayan lifle beraber nişastayı (enzimle muamele olmaksızın) ve C yöntemi ise çözünür olan ve olmayan diyet lifini tayin etmektedir. Her üç yöntemle elde edilen kalıntılarda şekerler gaz kromatografisiyle alditol asetat türevleri olarak, üronik asitler dekarboksilasyon reaksiyonuyla ve lignin de Klasson yöntemiyle gravimetrik olarak tayin edilmektedir.

Prosky Yöntemi

Toplam diyet lifi tayininde enzimatik ve gravimetrik yaklaşımlar oldukça tatminkar sonuçlar vermekte ve lif komponentlerinin tayini mümkün olmaktadır. Ancak bu yöntemlerin pek çoğunun oldukça zaman alıcı olması, Resmî Analitik Kimyaçılar Derneği'nin (Association of Official Analytical Chemists; AOAC) 1981 yılında düzenlediği toplantıda hızlı sonuç veren bir yöntemin geliştirilmesini hedeflemesine neden olmuştur. Bu kararın üzerine Asp, Englyst, Furda, Schweizer, Southgate, Theander ve Van Soest'in çalışmalarına dayanılarak bir yıl içinde enzimatik ve gravimetrik bir yöntem geliştirilmiştir (PROSKY ve

ark., 1984). Bu yöntem çeşitli ülkelerdeki 32 laboratuvarında denenmiş ve AOAC yöntemi olarak kabul edilmiştir.

Bu yöntemde örnek amilaz ile hidrolize edildikten sonra proteaz ve amiloglukozidaz ile muamele edilmekte ve protein ile nişasta uzaklaştırılmaktadır. Daha sonra çözünür lif fraksiyonu etanol (%78) ile çöktürülmektedir. Geriye kalan kalıntı süzülmekte, etanol ve aseton ile yıkanmakta ve kurutulup tartılmaktadır. Protein ve kül miktarları kalıntı miktarından düşürülerek geriye kalan miktar toplam diyet lifi olarak rapor edilmektedir. Yöntemde insan sindirim sistemindeki faaliyetler dikkate alındığı için toplam diyet lifinin fizyolojik tanımına uygun sonuçlar alınmaktadır.

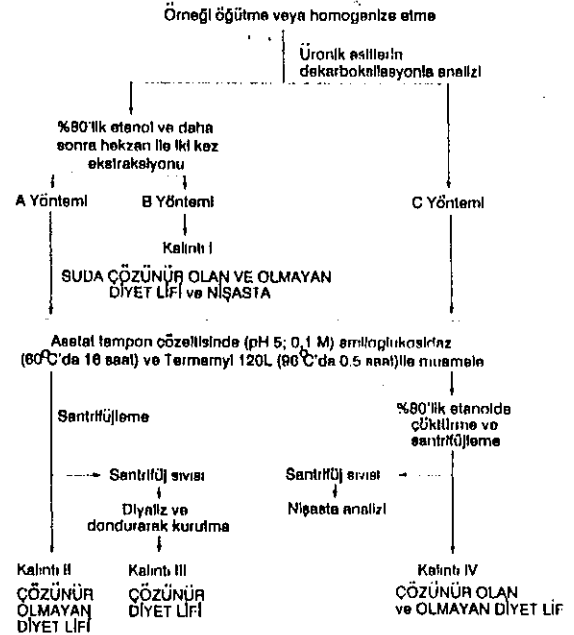
Prosky veya AOAC yöntemi adıyla bilinen bu yöntemde gıdalara ilave edilen polidekstroz ve sentetik hidroksipropil selüloz gibi çözünür yapıdaki polisakaritler tayin edilememektedir. Bu maddeleri kazanmak için alkol yerine asetonun çöktürücü olarak kullanımı denenmiş olmasına rağmen sonuçlar tutarlı değildir (HALL, 1989). Ayrıca toplam diyet lifi kalıntısı, özellikle pişmiş hububat bazlı ürünlerde enzimlere karşı dirençli olan nişastayı da içermektedir. Sindirime dirençli olan nişasta ince barsakta sindirilmemekle beraber kalın barsakta kolayca fermente olmaktadır. Bu nedenle dirençli nişastanın toplam diyet lifinin bir bileşeni olarak tayin edilmesi tartışma konusudur (HALL, 1989). Bununla beraber bu yöntem halen rutin çalışmalarda en çok tercih edilen yöntemdir.

Berlin Yöntemi

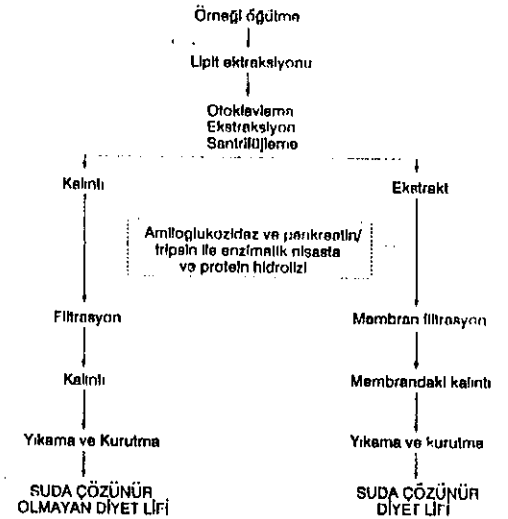
BECKER ve ark., (1986) suda çözünür olan ve olmayan diyet lifini, ilk kademede santrifüjleme işlemi kullanarak ayıran bir yöntem geliştirmişlerdir (Şekil 6). Yöntemde her fraksiyon nişasta ve proteini hidrolizleyen enzimlerle ayrı ayrı muamele edilmektedir. Suda çözünemeyen lif filtrasyonla ve çözünür lif membran filtrasyonuyla elde edilmektedir.

Yakın Kızıl Ötesi Yansıtma (Near Infrared Reflectance; NIR) Yöntemi

Diyet lifinin insan beslenmesindeki öneminin giderek daha iyi anlaşılması lif ingredientlerinin çeşitli ürünlerde kullanımını arttırmış ve dolayısıyla gıda üreticilerinin lif miktarlarını etikette beyan etmeleri zorunluluğu doğmuştur. Bu nedenle özellikle gıda sanayinin çok hızlı sonuç veren yöntemlere olan gereksinimleri artmıştır. Gıda sanayinde kalite kontrol amacıyla kullanılan en hızlı enstrümanlardan biri "Near Infrared Reflectance Spectroscopy" (NIR)'dir. Bu



Şekil 5. Theander ve Westerlund'un diyet lifi tayin yöntemi (THEANDER ve WESTERLUND, 1986)



Şekil 6. Berlin diyet lifi tayin yöntemi (BECKER ve ark., 1986)

enstrümanın lif tayininde kullanımına A.B.D. Tarım Bakanlığı laboratuvarlarından Norris ve Baker öncülük etmiş ve ham lif ve nötral deterjan lifi miktarlarıyla korelasyonlar kahvaltılık hububat ürünleri için geliştirilmiştir (BAKER, 1983). Buğday ve yulafda toplam diyet lifinin NIR yöntemi ile tayin sonuçları AOAC yöntemi ile mükemmel bir uyum göstermektedir. Bu sonuçlar yayımlanmamış olmakla beraber bugün A.B.D. gıda sanayi NIR yöntemini rutin amaçla kullanmaktadır (HALL, 1989).

SONUÇ

Tıp alanındaki buluşlara bağlı olarak diyet lifi tanımındaki değişiklikler fizyolojik faaliyetlerin benzetilmeye çalışıldığı enzimatik yöntemlerin geliştirilmesine neden olmuştur. Kolorimetrik, HPLC ve GLC gibi tekniklerin kullanıldığı bu yöntemlerin arasında rutin olarak analize imkan veren gravimetrik yöntemler büyük ilgi çekmektedir. Ancak bu yöntemlerin de eksikliği diyet lifi tanımına dahil edilen dirençli nişastanın tayin edilememesidir. Bununla beraber diyet lifinin fonksiyonel öneminin daha iyi anlaşılması için tayin metodolojisinin gelecek dönemde kapsayacağı konular; özellikle bazı oligosakkaritlerin fizyolojik önemlerinin dikkate alınması, diyet lifinin oluştuğu şeker birimlerinin saptanması, molekül ağırlığının ve yapısal farklılıklarının tayin edilmesi, viskozite, fermente edilebilirlik ve su tutma kapasitesinin ölçülmesine ait metodların geliştirilmesi üzerinde olacaktır.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

- ANDERSON, N.E., F.M.CLYDESDALE. 1980. An analysis of the dietary fiber content of a standard wheat bran. *J.Food Sci.*45:336.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 1984. Official Methods of Analysis of the AOAC. 14th Ed. The Association, Washington, D.C.
- ASP, N.G., G.-G.JOHANSSON, H.HALLMER, M.SILJESTROM. 1983. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. *J.Agric.Food.Chem.*31:476.
- BAKER, D.B. 1983. Determination of fiber in processed cereal foods by near infrared reflectance spectroscopy. *Cereal Chem.* 60:217.
- BECKER, H.G., W.STELLER, W.FELDHEIM, E.WISKER, W.KULIKOWSKI, P.SUCKOW, F.MEUSER, W.SIEBEL. 1986. Dietary fiber and bread: intake, enrichment, determination and influence on colonic function. *Cereal Foods World* 31:306.
- ENGLYST, H. 1981. Determination of carbohydrate and its composition in plant material. sayfa 71-93. In "The Analysis of Dietary Fiber. Eds. James, W.P.T. ve O.Theander". Marcel Dekker, Inc., New York.
- ENGLYST, H.N., J.H. CUMMINGS. 1984. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst* 109:937.
- ENGLYST, H.N., J.H. CUMMINGS. 1988. Improved method for measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *J.AOAC* 71:808.
- FLINT, S.I., M.E.CAMIRE. 1992. Recovery of lignin during non-starch polysaccharide analysis. *Cereal Chem.* 69:444.
- HALL, J.M. 1989. A review of total dietary fiber methodology. *Cereal Foods World* 34:526.
- LEE, S.C., L.PROSKY. 1992. Dietary fiber analysis for nutrition labeling. *Cereal Foods World* 37: 765.
- PROSKY, L., N.G.ASP, I.FURDA, J.W. DE VRIES, T.F.SCHWEIZER, B.F.HARLAND. 1984. Determination of total dietary fibers in foods, food products, and total diets: interlaboratory study. *J.AOAC* 67:1044.
- SELVENDRAN, R.R., S.G. RING, M.S. DU PONT. 1981. Determination of dietary fiber content of the EEC samples and a discussion of the various methods of analysis. Sayfa 95-121. In "The Analysis of Dietary Fiber. Eds. James, W.P.T. ve O. Theander". Marcel Dekker, Inc., New York.
- SOUTHGATE, D.A.T. 1969. Determination of carbohydrates in foods II- Unavailable carbohydrates. *J. Sci. Food Agric.* 20:331.
- SOUTHGATE, D.A.T., M.A.WHITE. 1981. Commentary on results obtained by different laboratories using the Southgate method. Sayfa 37-50. In "the Analysis of dietary Fiber. Eds.James, W.P.T. ve O.Theander". Marcel Dekker, Inc., New York.
- SOUTHGATE, D.A.T., G.J. HUDSON, H.ENGLYST. 1978. The analysis of dietary fiber. *J.Sci. Food Agric.* 29: 979.
- THEANDER, O., E.A. WESTERLUND. 1983. Determination of individual components of dietary fiber. *J.Agric. Food Chem.* 31:476.
- THEANDER, O., E.A. WESTERLUND, 1986. Studies on dietary fiber. 3. Improved procedures for analysis of dietary fiber. *J.Agric. Food Chem.* 34:330.
- TROWELL, H.C. 1972. Ischaemic heart disease and fiber. *Am. J.Clin. Nutrition* 25:926.
- TROWELL, H.C., D.A.T.SOUTHGATE, T.M.S. WOLEVER, A.R., LEEDS, M.A.GASSUL, D.J.A.JENKINS. 1976. Dietary fibre redefined. *Lancet*, 1:967.