

Yapay Sindirim Sıvısında Doğal Zeolitlerde Meydana Gelen Morfolojik Değişmeler

Morphological Changes in Natural Zeolites in Simulated Digestion Fluid

Dilek Demirbükler Kavak¹, Serdar Özçelik², Semra Ülkü¹

1. Kimya Mühendisliği Bölümü, Müh. Fak.
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
{dilekdemirbuker,semraulku}@iyte.edu.tr

2. Kimya Bölümü, Fen Fak.
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
serdarozcelik@iyte.edu.tr

Özetçe

Doğal zeolitler biyoaktif maddelerdir. Doğal zeolitlerin hayvanlarda biyokütle arttırıcı besi katkı maddesi, insanlarda ülser tedavisinde mide asitliğini tamponlayıcı, asitliği düşürücü ilaç gibi değişik kullanım alanları mevcuttur. Değişik sağlık alanlarında kullanımlarından dolayı, zeolitlerin yapısal stabilitesinin sindirim sırasında belirlenmesi; olası olumlu veya olumsuz etkileşimleri anlamak açısından önem taşımaktadır. Gerçekleştirilen araştırmada, yapay sindirim sırasında zeolitte meydana gelebilecek olası morfolojik değişimlerin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla zeolitin ABTS ile radikal sönmülme kapasitesi araştırılmış, yapay sindirim denemeleri gerçekleştirilerek de uygulama süreci sonrası yapıda olası değişimler ve adsorpsiyonlar taramalı elektron mikroskobu, FTIR, XRD analizleri ile incelenmiştir. 3g/100ml zeolitin ABTS radikalini %45 inhibe ettiği bulunmuştur. Taramalı elektron mikroskobu deneyleri sonucunda yapay sindirilmiş örneklerin yüzey morfolojisinde değişim gözlenmemiştir. Element analizleri yapısal kaybın olmadığını, Al ve Si elementlerinin ağırlıkça yüzdelerinin, kontrol örnekleriyle (Al:8.1; Si: 39) sindirilmiş örneklerde (Al:8.2; Si: 38.3) yaklaşık aynı olduğunu göstermiştir. Infrared spektrum (IR) ve X-ray ışını kırınımı analizleri sonuçları ise bu bulguları doğrulamıştır. Ayrıca taramalı elektron mikroskobu ve IR spektrum sonuçları yapay sindirim ortamındaki maddelerin, zeolit yüzeyinde adsorplanmadıklarını göstermektedir. Sonuç olarak doğal zeolitler, yapay sindirim sırasında yapısal stabilitelelerini kaybetmemektedirler.

Abstract

Natural zeolites are bioactive materials. They have different applications; they are used as additives in animal feeds to support biomass production and used to treat stomach ulcers incisions in humans as they act as buffers to reduce stomach acidity. Based on different health applications, structural stability of zeolite during digestion is important to understand

possible interactions, positive and negative side effects with the digestion. In this study, it was aimed to investigate possible morphological changes in natural zeolites during simulated digestion. Based on this aim, radical inhibition capacity of zeolite was investigated and possible adsorptive, morphological changes were analyzed by scanning electron micrographs (SEM), Infrared spectrum (IR) and X-ray diffraction (XRD) analysis. 45% inhibition for ABTS radical was found with 3g/100ml zeolite. SEM analyses showed that there were no changes in surface morphology in digested samples. Elemental results indicated no structural loss where wt% of Al and Si element's in control (Al:8.1; Si: 39) and digested samples (Al:8.2; Si: 38.3) were almost same. Results were also confirmed by IR and XRD analysis. Besides SEM and IR results indicated that there were no adsorption of digestive matter on zeolite surfaces. It was concluded that zeolites preserved their structural stability during simulated digestion.

1. Giriş

Zeolitler alkali ve toprak alkali kristal yapıya sahip sulu alüminyum silikatlar olarak tanımlanırlar. Yapılarında SiO_4^{4-} ve AlO_5^{4-} dörtyüzlüsü, ortak oksijen atomları ile birbirlerine bağlanmıştır. Ülkemizin de önemli doğal yeraltı zenginliklerinden olan zeolitler, iyon değişim, katalitik ve adsorpsiyon özellikleri nedeniyle çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmaktadırlar. Ayrıca yüksek stabiliteye sahip güçlü adsorbant olmaları nedeniyle zeolitlerin sağlık alanında da değişik biyoaktif madde taşıyıcıları olarak kullanımları araştırılmaktadır. Son yıllarda yapılan hayvan deneyi çalışmaları, ağız yoluyla alınan doğal bir zeolit olan klinoptilolitin toksik özellik göstermediği ve deneklerin genel sağlık durumunu iyileştirdiği, et süt verimini arttırdığı, yaşam sürelerine de olumlu etkide bulunduğunu göstermiştir [1, 2, 3]. Ayrıca doğal zeolitlerin değişik sağlık problemlerinde tedavi amaçlı kullanımları da incelenmiştir. Gümüş yüklü zeolitlerin patojenlere antimikrobiyal etki gösterdikleri tespit edilmiştir [4]. Yapılan çalışmalarda doğal zeolitler tamponlama etkisi göstererek yüksek mide asiditesini düşürmede etkili rol oynamışlar, bu sebeple mide ülseri tedavisinde alternatif

olarak kullanılabilirler belirlenmiştir [5]. Sindirim sistemi, besin emilimi ve bağışıklık sisteminde oynadığı rol nedeniyle önemlidir. Bu sebeple zeolit yapısının sindirim sırasında olası değişimi ve maddelerle olabilecek etkileşimler, sindirim sistemindeki florayı ve metabolitleri etkileyecek koşullar doğurabilmekte, insan sağlığı için de önem taşımaktadır. Bu çalışma, biyoaktif madde olan zeolitin yapay sindirim sırasında olası yüzey morfolojisi ve yapısal değişiminin incelenmesine yönelik bir ön çalışmadır. Böylece, bu konuya yönelik ileride yapılacak sağlık etkileri çalışmalarında yapısal stabilitesini tamamen kaybedip kaybetmediği, eğer kaybettiye ne şekilde olduğu ve ne sonuçlar doğurduğu incelenebilecektir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Klinoptilolit minerali Manisa Gördes yöresinden Enli Madencilik Firması'ndan temin edilmiştir. Analiz amaçlı kullanılan kimyasallar Sigma (Almanya)'dan temin edilmiştir. Bu kimyasallar; antioksidan aktivitesi için ABTS (2,2-Azino-bis-3-Ethylbenz-Thiazoline-6-Sulfonik asit) ve KBr; yapay sindirim denemeleri için ise Pepsin, Pankreatin, Safra Ekstraktı HCl, NaHCO₃'tür.

2.2. Yöntem

2.2.1. Antioksidan aktivite ölçümleri

Örneklerin antioksidan aktiviteleri ABTS di-amonyum tuzu radikali renk kaybı metoduna dayanılarak spektrofotometrik (Perkin Emler, UV-Spektrofotometre) yöntemle 734 nm de analizlenmiştir. Sonuçlar ölçüm süresi başındaki absorpsiyon ve sonundaki absorpsiyon (A₁₀, A₁₆) değerleriyle aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmış ve yüzde inhibisyon olarak verilmiştir:

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 \times [(A_{10} - A_{16}) / A_{10}] \quad (1)$$

2.2.2. Yapay sindirim denemeleri

Yapay mide sıvısı son konsantrasyonu 3.2 mg/ml pepsin içeren 0.1 M HCl ile hazırlanmış ve örnekler 1 saat süreyle bu sıvıda 37°C de inkübe edilmiştir. Daha sonra pH değeri 5.5 e 1 M NaHCO₃ ile yükseltilmiş ve safra ekstraktı ve pankreatin içeren 0.1 N NaHCO₃ ile (son konsantrasyonlar 2.4 ve 0.4 mg/mL) pH 7.5'e ayarlanarak 2 saat süreyle inkübasyona devam edilmiştir.

2.2.3. Örneklerin karakterizasyonu

Örneklerin yapılarında meydana gelen değişimler taramalı elektron mikroskobu (Phillips XL30S FEG elektron mikroskobu) ve element düzeyindeki değişimler EDX dedektörü kullanılarak analizlenmiştir. Ayrıca yapısal değişimler için KBr pellet tekniği ile hazırlanmış örneklerin 400 and 4000 cm⁻¹ arasında IR analizleri yapılmıştır (Shimadzu FTIR-8201 model Fourier Transformed Infra-red Spektrometre). Örneklerin kristal yapıları ise X-ray ışınları kırınımı tekniğiyle (Philips X-Pert Pro) 2θ: 2°-40° aralığında analizlenmiştir.

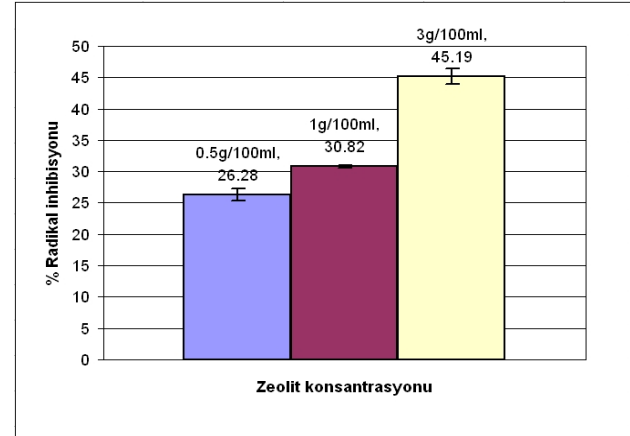
2.2.4. Yapay sindirim sırasındaki olası madde adsorpsiyonlarının incelenmesi

Elektron mikroskobu analizleri ile yapılan yüzey incelemeleri ve IR analizi sonucunda elde edilen spektrumdaki ekstra bantların varlığı (özellikle protein yapıları için Amide bölgeleri) incelenerek olası adsorpsiyon ile ilgili bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Zeolitin antioksidan aktivitesi

Bioaktif madde olan doğal zeolitler, sağlık açısından önemli bir rol oynayan antioksidan aktivite göstermektedirler. Doza bağlı yapılan radikal inhibisyonu deneylerinde zeolitin yüksek antioksidan kapasitesi olduğu tespit edilmiştir. Bu inhibisyon etkisinin Şekil 1 de belirttiği üzere zeolit konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmaktadır.

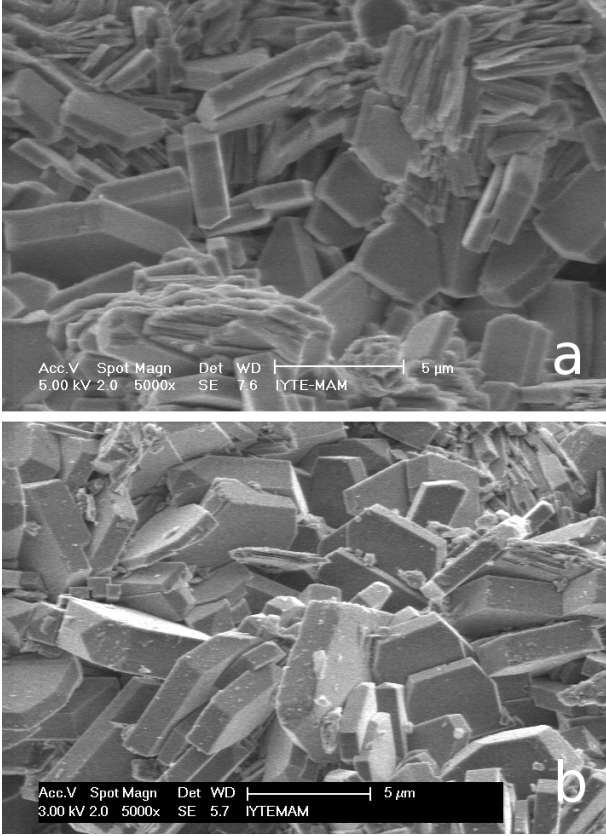


Şekil 1: ABTS radikalinin değişik konsantrasyonlardaki zeolitlerle % inhibisyonu.

3.2. Yapay sindirim uygulanmış örneklerdeki değişimler

3.2.1. Taramalı elektron mikroskobu sonuçları

Yapay sindirime tabi tutulmuş zeolit örneğiyle hiçbir işleme tabi tutulmamış kontrol zeolit örneğinin taramalı elektron mikroskopik görüntüleri Şekil 2 de verilmektedir. Her iki şekilde de heksagonal klinoptilolit kristalleri belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Ayrıca iki zeolit örneğinin yüzey morfolojisinde belirgin bir değişiklik olmadığını tespit edilmiştir.



Şekil 2: Taramalı elektron mikroskopikler a) Kontrol zeolit örneği, b) Yapay sindirime tabi tutulmuş zeolit örneği (büyütmeye: 5000x)

3.2.2. Elemental analiz sonuçları

Zeolitlerin yapısındaki elementlerin yapay sindirim sırasında sıvı ortama değişimleri, farklı pH değerlerinden dolayı yapısal değişimler yaklaşık olarak EDX dedektörü aracılığıyla analizlenmiştir. Tablo 1 de doğal zeolitlerin yapısında bulunan önemli elementlerin analiz sonuçları verilmektedir. Ayrıca yapılan iz element analizleri sıvı ortama geçen iz elementlerin düzeyinin de kabul edilebilir olduğunu göstermiştir.

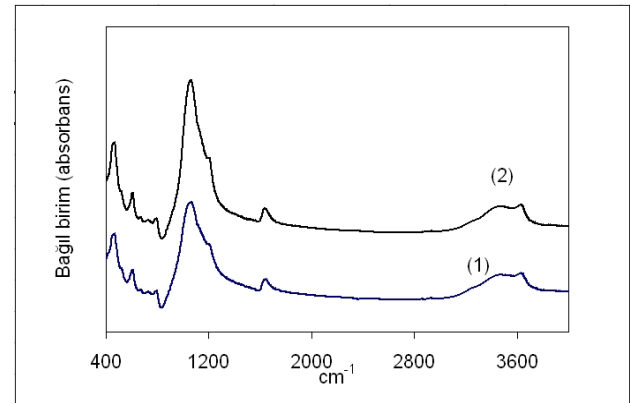
Tablo 1 : Elemental analiz sonuçları (\pm %5)

Element	Kontrol Zeolit (%Ağırlık)	Yapay sindirilmiş zeolit (% Ağırlık)
O	42.8	41.2
Na	1.2	1.9
Mg	0.7	0.6
Al	8.1	8.2
Si	39.0	38.3
Cl	0.1	0.2
K	4.6	4.0
Ca	1.9	2.1
Fe	1.6	1.5

Zeolitlerde Si/Al oranı yapısal stabilite açısından önemlidir. Zeolit in gördüğü işlemler sonucunda Al'daki miktarsal azalmalar yapısal bozulmalarla ilişkilendirilmektedir. Yapay sindirime tabi tutulmuş zeolit kontrol örneğiyle kıyaslandığında belirgin bir fark tespit edilmemiştir. Özellikle Si ve Al elementlerinde belirgin bir fark olmaması, değişen pH değerlerinin olduğu yapay sindirim sürecinde dealuminasyon gibi yapısal değişimin olmadığını belirtmektedir. Daha ilerideki deneysel sonuçlar da bunu doğrulayıcı yönde gelişmiştir.

3.2.3. FTIR analizi sonuçları

FTIR analiz sonuçlarında (Şekil 3) her iki örnek için zeolit yapısına ait karakteristik pikler gözlemlenmiştir. Bunlar; 472 cm^{-1} ve 615 cm^{-1} de içsel ve dışsal Si(veya Al)-O çift halkası, 1058 cm^{-1} de kuvvetli simetrik ve asimetrik gerilim vibrasyonları ve 3450 cm^{-1} de su vibrasyonlarıdır.



Şekil 3: FTIR spektrasi (1) Kontrol zeolit örneği, (2) Yapay sindirime tabi tutulmuş zeolit örneği

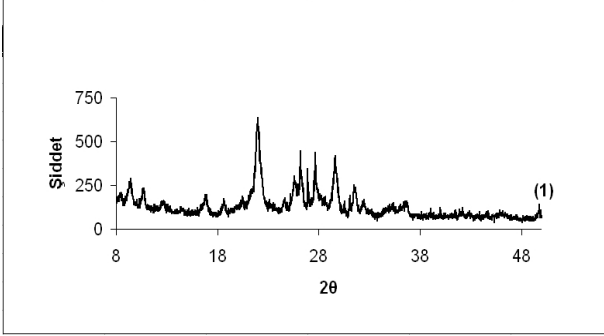
Yapay sindirime tabi tutulmuş örnekle, hiç muamele görmemiş örneklere ait karakteristik piklerde bir kayma bulunamamıştır. T-O asimetrik vibrasyonunda ait karakteristik pikin pozisyonundaki (1058 cm^{-1}) kaymalar zeolit in tabi tutulduğu işlemlere göre yapısal kısmi çökmeler veya dealuminasyonu işaret etmektedir [6]. Yapay sindirime tabi tutulmuş zeolit, kontrol örneğiyle kıyaslandığında bu durum gözlemlenmemiştir. Bulunan bu sonuçlar aynı zamanda taramalı elektron mikroskobu ve EDX analizi sonuçlarıyla da örtüşmektedir.

3.2.4. Olası madde adsorpsiyonlarının değerlendirilmesi

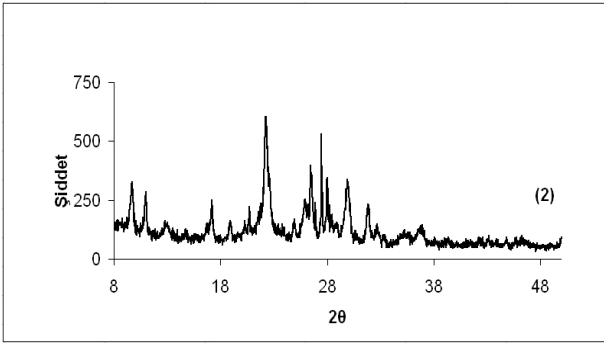
SEM analizi sonuçları incelendiğinde zeolit yüzeylerinde yapay sindirim ortamından gelebilecek protein (sindirim enzimleri) ve benzeri yapılar gözlemlenmemiştir. Bu durum için, yüzeyde tutunmada etkili olan ortam pH sı, enzimlerin izoelektrik noktaları ve buna bağlı olarak yüklerindeki değişimlerden kaynaklanan elektrostatik etkileşimlerin rol oynadığı tahmin edilmektedir. Ayrıca, FTIR sonuçlarında karakteristik zeolit piklerine ait bantlar dışında ekstra bantlar veya pikler gözlemlenmemiştir. Proteinlerin karakteristik FTIR spektrumlarının belirttiği Amide bölgelerine ait bağlanmalar tespit edilememiştir. Bu sebeple, zeolitlerin yapay sindirim ortamındaki özellikle önemli rol oynayan protein yapıdaki sindirim enzimleriyle kuvvetli bir etkileşimde olmadığı söylenebilmektedir.

3.2.5. XRD analizi sonuçları

X-ray analizi sonuçlarında örnekler klinoptilolit olarak tanımlanmış ve karakteristik klinoptilolit pikleri $2\theta=9.8$, 22.4 ve 30° için kontrol ve sindirilmiş zeolit örneklerinde belirlenmiştir. Yapay sindirim etkisiyle klinoptilolitin karakteristik piklerinin şiddetlerinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4 ve Şekil 5).



Şekil 4: Kontrol zeolit örneğine (1) ait X-ray analizi sonuçları



Şekil 5: Yapay sindirilmiş zeolit örneğine (2) ait X-ray analizi sonuçları

4. Sonuçlar

Çalışmada, antiasit malzeme olarak ülser tedavisinde, biyoaktif madde taşıyıcı olarak ilaç salınım deneylerinde veya hayvan sağlığını iyileştirici besin katkısı olarak kullanılan doğal zeolitlerin bu şekilde sağlık amaçlı kullanımlarında yapısal ve morfolojik değişimlerinin yapay sindirimle ne şekilde değiştiği incelenmiştir. Doğal zeolit klinoptilolitin sağlık için önemli bir etki olan antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiş 3g/100ml konsantrasyonundaki zeolitin % 45 radikal inhibisyonu gösterebileceği bulunmuştur. Bu özelliğin sindirim sırasında ortamda bulunan, vücuda dışarıdan alınmış veya yapıda oluşturulmuş serbest radikallerin eliminasyonunda pozitif rol oynayacağı düşünülmektedir. Yapay sindirime tabi tutulmuş zeolit örneklerinin elektron mikroskopu ile incelemesi sonucu yüzey morfolojilerinde yapısal bozunmaya ilişkin kontrol örneğiyle belirgin bir fark bulunmamıştır. Ayrıca EDX ve FTIR ve XRD sonuçları, elementlerde önemli bir miktarsal farklılık veya karakteristik piklerde kayma, şiddetlerinde önemli bir değişim gibi yapısal bozunmalara ilişkin veriler tespit edilmemiştir. Elektron mikroskopu ve FTIR verileri aynı

zamanda yapay sindirim ortamındaki maddelerin zeolit yüzeyinde tutunmadığını göstermektedir. Sonuç olarak doğal zeolitler, sindirim enzimlerinin etkin çalışması açısından onlarla adsorbant olarak etkileşmemekte ve yapay sindirim sırasında yapısal stabilitelerini korumaktadırlar.

5. Kaynakça

- [1] M. Ortatlı, H.Oğuz, "Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis", *Research in Veterinary Science* 71, pp. 59–66, 2001.
- [2] M.Trckova, L.Matlova, L.Dvorska, I.Pavlic, "Kaolin, bentonite, and zeolites as feed supplements for animals: health advantages and risks", *Vet. Med. – Czech*, 49-10, pp. 389–399, 2004
- [3] S. C. Kyriakis, D. S. Papaioannou, C. Alexopoulos, Z. Polizopoulou, E.D.Tzika, "Experimental studies in safety and efficacy of the dietary use of a clinoptilolite-rich tuff in sows:a review of recent research in Greece", *Microporous and Mesoporous Materials* 51, pp. 65-74, 2002.
- [4] A. Top, S. Ülkü, "Silver, zinc, and copper exchange in a Na-clinoptilolite and resulting effect on antibacterial activity" *Applied Clay Science*, Vol. 27 Issues 1-2, pp. 13–19, 2004.
- [5] F. Mumpton, "La roca magica: Uses of natural zeolites in agriculture and industry" Colloquium Paper, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, pp. 3463–3470, 1999.
- [6] F. Cakicioglu-Ozkan, S. Ülkü, "The effect of HCl treatment on water vapor adsorption characteristics of clinoptilolite rich natural zeolite" *Microporous and Mesoporous Materials*, 77, pp. 47-53, 2005.