

Konfokal Mikroskop ve Gıda Mühendisliği Uygulamalarında Kullanımı

Osman Sağdıç*, İsmet Öztürk, Nurdan Yapar, Hasan Yetim

Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayseri

*osagdic@erciyes.edu.tr

Özet

Lazer taramalı konfokal mikroskop (LTKM), günümüzde cisimleri üç boyutlu olarak izlemesinde kullanılan en önemli cihazdır. LTKM, fluoresan mikroskop esaslarına benzer şekilde çalışan bir mikroskop olup, burada aydınlatma kaynağı olarak pankromatik görünür ışık kaynağı yerine monokromatik karakterdeki lazer ışınları kullanılmaktadır. LTKM'un kullanım alanı canlı hücrelerin görüntülenmesi yanında, gıda ile ilgili araştırmalarda da giderek yaygınlaşmaktadır. Gıda mühendisliği alanında ise, mikrobiyolojik özelliklerin belirlenmesinde ve gıdaların yapılarının görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, mikroorganizmaların antimikrobiyal maddelere karşı gösterdikleri reaksiyonlarda, biyofilm oluşumunun gözlenmesinde, fermente süt ürünlerinde süt jeli-mikroorganizma kompleksinin yapısının gözlenmesinde, diğer süt ve ürünlerinin yapılarının incelenmesinde, buğday proteinlerinden gluten'in hamur içerisinde meydana getirdiği ağ yapısının görüntülenmesinde ve et ürünlerin bazı fiziksel özelliklerinin belirlenmesinde LTKM başarıyla kullanılabilir. Sonuç olarak, bu mikroskop ile çeşitli nedenlerle gıdalarda meydana gelen değişikliklerin hücresel boyutta izlenebilmesi, bu konuda çalışan araştırmacıların işini kolaylaştırmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Lazer taramalı konfokal mikroskop, Gıda mühendisliği uygulamaları

Giriş

Mikroskoplarla ilgili son gelişmeler, gıda bilimi ve teknolojisi alanındaki araştırmalarda, yeni mikroskopik tekniklerin kullanımını yaygınlaştırmıştır. Bu araştırmalar, gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında meydana gelen değişimler üzerine birçok yenilik getirmektedir (1). Son yıllarda bu amaçlarla sıkça kullanılan mikroskoplardan birisi de LTKM'tur. Konfokal mikroskop, ilk olarak 1957 yılında ilk Harvard Üniversitesi'nde araştırmacı olan Marwin Minsky tarafından temeli atılarak 1987 yılında da Brod Amos ve John White sayesinde standart bir analiz cihazı haline dönüşmüştür (2, 3, 4). LTKM tekniği ile numuneyi bozmadan yüksek çözünürlükte üç boyutlu optik görüntüler elde edilebilmektedir (5). LTKM, fluoresan mikroskop prensiplerine benzer şekilde çalışmakta olup, burada aydınlatma kaynağı olarak pankromatik görünür ışık kaynağı yerine monokromatik karakterdeki lazer ışınlarını kullanılmaktadır (3, 6, 7).

LTKM 'un Çalışma Prensipleri

LTKM 'ta, objektifteki optiklerin optimal kullanımı için bir lazer ışını gönderilir. X-Y yansıtma mekanizması ile bu ışın, tarama ışımına çevrilir ve objektif lensi yardımıyla floresan işaretlenmiş örnek üzerindeki tek bir küçük noktaya odaklanır. Optik kesit alma XY düzleminde veya XZ, YZ dikey düzlemlerinde gerçekleştirilebilir ve gerçek üç boyutlu veri setleri toplanabilir. Fokal düzlemlerden elde edilen optik kesit katmanları tekrar üst üste yapılandırılarak üç boyutlu görüntü üretilir (2, 6, 8).

LTKM'un Mikroorganizmaların Görüntülenmesinde Kullanılması

Gelişmiş bir mikroskop olan LTKM ile mikroorganizmaların yüzeye yerleşmesini, dağılımını ve aktivitesini üç boyutlu bir şekilde görmek mümkündür (9). LTKM uygulamalarından birisi, süt ve meyve suyu gibi gıda üreten fabrikalar için büyük önem arz eden ve önemli bir sorun olan biyofilm oluşumunu gözleyebilmektir (10, 11). Bir çalışmada da 13 *Listeria monocytogenes* suşu, statik/durağan şartlarda cam yüzeyler üzerinde biyofilm üretmek üzere kullanılmış ve biyofilmlerin üç boyutlu yapısı LTKM ile görüntülenmiştir (12). Yine LTKM, mumlanmamış elmaların yüzeyine ve içyapıları arasına yeşil floresan bir plazmid ile taşınan *Escherichia coli* O157:H7'nin tutunmasını göstermek üzere kullanılmıştır ve patojenin yüzeyde mumlu kütiküladaki boşluklarda ve 40 mm' nin üstündeki derinliklerde bulunabileceği gözlenmiştir (13). Başka bir araştırmada ise elma yüzeylerine *E. coli* O157:H7 aşılansak LTKM 'ta incelenmiş ve SYTOX Green - Alexa Fluor594-Ab floresan boyası ile daha iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir (14). Pinto ve ark. (14), üzümlere *E. coli* aşılansak, su ve %50 'lik etanol içerisine 3 dakika daldırılmışlar ve LTKM'ta incelemeleri sonucunda, etanole daldırılan örneklerde çok az canlı bakteri hücresi tespit etmişlerdir (15). Son yıllarda, antimikrobiyal etkiye sahip olan bitkilerin içerdikleri eugenol, karvakrol ve sinnamaldehitin, *E. coli*, *L. monocytogenes* ve *Lactobacillus sake* hücrelerinin canlılığı ve ATP değerleri üzerine etkisi LTKM kullanılarak gözlemlenmiştir (16).

LTKM'nun Süt ve Ürünleri ve Diğer Gıdaların Görüntülenmesinde Kullanımı

LTKM, başta süt ürünleri olmak üzere birçok gıdanın mikroskobik yapısını inceleyebilen çok kullanışlı bir mikroskop tekniğidir (17). Peyniraltı suyu proteinine jelleşme özelliklerinin gelişmesi için %0.01 ksantan gamı ilavesinin bile peyniraltı suyu proteinin jel yapısını önemli derecede etkilediği LTKM ile saptanmıştır (18). Süt tozu, yağda çözülebilir floresan boya içeren bir gliserol içerisine dağıtılmış ve süt tozunun yüzeyindeki yağ globülleri ve laktoz kristalleri LTKM görüntülenmiştir (19). Lopez ve ark. (20), Emmental peynirinin üretimi ve olgunlaştırılması sırasında yağ globüllerinin fizikokimyasal özelliklerini ve mikro yapısı LTKM ile incelemişlerdir. LTKM kullanılarak rop oluşturan ve

oluşturmayan laktik asit bakteri (LAB) türlerinin süt içerisinde glukoz, galaktoz, laktoz ve sukroz şekerleri kullanılarak kapsül oluşturması ve kapsülün boyutu tespit edilmiş, sonuçta rop oluşturmayan LAB'ların kapsül boyutunun daha büyük olduğu görüntülenmiştir (21). Aynı şekilde Feta peynirinde kullanılan farklı starter kültür tiplerinin, protein ağ yapısını ve yağ globüllerini etkilediği yine LTKM ile belirlenmiştir (22). Cheddar peynirinin hızlı olgunlaştırılması için yüksek basınç uygulanmış ve LTKM ile proteoliz izlenmiş, atmosfer şartları altında 25 °C de 70 saat olgunlaştırmaya nazaran 350 MPa basınç uygulaması sonucunda 25 °C de 70 saatte olgunlaştırma işlemi arasında önemli farklar olduğu saptanmıştır (23). Ekmek hamurunun ağ yapısının gözlenmesinde, ekmekte nişasta granüllerinin izlenmesinde, bir protein olan glutenin hem hamurda hem de ekmekte ağ yapısının izlenmesinde LTKM kullanılabilir (7). Son yıllarda ekşi hamur (24) ile bisküvi hamurlarında meydana gelen yapısal değişimlerin görüntülenmesinde de LTKM' dan yararlanılmaktadır (25). Patates cipslerinin kızartılması süresince meydana gelen değişimleri LTKM ile görüntülemek mümkün olabilmektedir (26). Konfokal mikroskopun kullanıldığı alanlardan birisi de et ve et ürünleridir. Emülsiyon et ürünlerinde miyofibril proteinlerin ve yağ damlacıklarının gözlenmesinde LTKM kullanılabilir (27). Sonuç olarak, son yıllarda gıda mühendisliği alanında, LTKM ile yukarıda bahsedilen konular çerçevesinde araştırma yapmak ve üç boyutlu yapısal görüntüler almak mümkündür.

Kaynaklar

1. Yang H., Wang Y., Lai S., An H., Li Y., Chen F. 2007. Application of Atomic Force Microscopy as a Nanotechnology Tool in Food Science. *J Food Science*, 72(4) 65-75.
2. Ünal R., Fenerci E. 2006. Konfokal Mikroskop ve Uygulama Alanları. 2. Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi ve 5. Tıbbi Biyolojik Bilimler Öğrenci Sempozyumu, S 6-4, 26-27 Mayıs 2006, İstanbul.
3. Can A. 2007. Yaşam Bilimlerinde Konfokal Mikroskopu ve Uygulama Alanları.14. Farmakoloji Eğitim Sempozyumu, S: 50-53, 17 Mayıs 2007, Diyarbakır.
4. Anon. 2007a. Reshaping Food Analysis. www.ift.org. Food Tech., April 2007.
5. Ko S., Gunasekaran S. 2007. Error correction of confocal microscopy images for in situ food microstructure evaluation. *J Food Eng.*, 79: 935-944.
6. Anon. 2007b. Theory of Confocal Microscopy. www.olympusconfocal.com 20.10.2007.
7. Dürrenberger M.B., Handschin S., Conde-Petit B., Escher F. 2001. Visualization of Food Structure by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). *Lebens-Wiss Tech.*, 34, 11-17.
8. Fung D.C., Theriot J.A. 1998. Imaging techniques in microbiology. *Cur. Opinion Micr.*, 1:346-351.
9. Verran J., Boyd R.D., Hall K.E., West R. 2002. The detection of microorganisms and organic material on stainless steel food contact surfaces. *Biofouling* 18(3) 167 – 176.
10. Ahmed K., Gribbon P., Jones M.N. 2002. The Application of Confocal Microscopy to the Study of Liposome Adsorption onto Bacterial Biofilms. *J Liposome Res.*, 12 (4) 285–300.

Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum

11. Trachoo N. 2003. Biyofilms and the food industry (Review). *Song. J Sci. Tech.* 25 (6) 807-815.
12. Chae S.M., Schraft H. 2000. Comparative evaluation of adhesion and biyofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *Int. J Food Mic.*, 62:103-111.
13. Burnett S.L., Chen J., Beuchat L.R. 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *App. Env. Mic.*, 66 (11) 4679-4687.
14. Burnett S.L., Beuchat L.R. 2002. Comparison of methods for fluorescent detection of viable, dead, and total *Escherichia coli* O157:H7 cells in suspensions and on apples using confocal scanning laser microscopy following treatment with sanitizers. *Int. J Food Mic.* 74: 37- 45.
15. Pinto R., Lichter A., Danshin A., Sela S. 2006. The effects of an ethanol dip of table grapes on populations of *Escherichia coli* Post harvest. *Biology and Tech.* 39:308-313.
16. Gill A.O., Holley R.A. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sake* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int. J Food Mic.* 108: 1-9.
17. Auty M.A.E., Twomey M., Guinee T.P., Mulvihill D.M. 2001. Development and application of confocal scanning laser microscopy methods for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products. *J Dairy Res.* 68 (3) 417-427.
18. Bertrand M.E., Turgeon L.S. 2007. Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum. *Food Hyd.* 21:159-166.
19. McKenna A. 1997. Examination of whole milk powder by confocal laser scanning microscopy. *J Dairy Res.* 64: 423-432.
20. Lopez C., Camier B., Gassi J.Y. 2007. Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. *Int. Dairy J.* 17:235-247.
21. Hassan A.N., Frank J.F., Shalabi S.I. 2001. Factors affecting capsule size and production by lactic acid bacteria used as dairy starter cultures. *Int. J Food Mic.* 64:199-203.
22. Hassan A.N., Frank J.F., Corredig M. 2002. Microstructure of Feta Cheese Made Using Different Cultures as Determined by Confocal Scanning Laser Microscopy. *J Food Sci.* 67 (7) 2750-2753.
23. O'Reilly E.C., Kelly L.A., Oliveira C.J., Murphy M.P., Auty M.A.E., Beresford P.T. 2003. Effect of varying high-pressure treatment conditions on acceleration of ripening of cheddar cheese. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* 4: 277-284.
24. Schober J.T., Dockery P., Arendt K.E. 2003. Model studies for wheat sourdough systems using gluten, lactate buffer and sodium chloride. *Eur. Food Res. Tech.* 217:235-243.
25. Gallagher E., Kenny S., Arendt K.E. 2005. Impact of dairy protein powders on biscuit quality. *Eur. Food Res. Tech.* 221:237-243.
26. Pedreschi F., Aguilera M.J. 2002. Some Changes in Potato Chips During Frying Observed by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). *Food Sci. Tech. Int.* 8(4) 197-201.
27. Leica 1999. Application Catalogue. Leica Microsystems Heidelberg GmbH.