

Şarap Kalitesini Belirlemede Hızlı Bir Yöntem: Plazma Polimerizasyonu Yöntemi ile Fenolik Bileşiklerin Tayinine Yönelik Lakkaz Elektrodunun Geliştirilmesi

Asuman Çetin*, Günşev Avcı, Mehmet Mutlu

Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Beytepe, Ankara

*gunsev23@gmail.com

Özet

Bu projenin amacı plazma polimerizasyonu ile modifiye edilmiş membranlara lakkaz enziminin tutuklanması ile şarapta bulunan fenolik maddelerin tayinine yönelik bir biyosensör geliştirmektir. Geliştirilen bu biyosensör ile daha hızlı ve ekonomik bir fenolik madde tayini yapılması amaçlanmaktadır. Bu proje kapsamında şaraptaki fenolik bileşikler üzerinde çalışılırken; fenolik madde içeren meyve suyu, zeytinyağı gibi diğer gıda ürünlerinde de aynı yöntemle daha hızlı ve ekonomik olarak fenolik madde tayinine zemin hazırlanması planlanmaktadır. Bu proje Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Plazma Destekli Biyomühendislik ve Teknoloji Araştırma Laboratuvarı 'nda gerçekleştirilecektir. Bu proje, 2209 Tübitak Üniversite Öğrencileri Yurt içi / Yurt dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı (2007) kapsamında yürütülmektedir.

Anahtar kelimeler: Biyosensör, Plazma polimerizasyonu, Fenolik madde, Lakkaz elektrodu

Giriş

Üzüm salkımında, çekirdeklerinde polifenol bulunur. Polifenollerin çok güçlü bir antioksidan etkisi var. Antioksidanlar düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL; kötü kolesterol) oksidasyonunu önler ve kalp damar sorunlarının temelindeki lezyonların oluşumunu azaltırlar. Polifenoller lipidlerin oksidasyonunu yasaklayıp kan plakalarının faaliyetini azaltarak serbest radikalleri tuzağa düşürür. Bu plakaların kan pıhtılaşmasında önemli bir rolü vardır. Bir araya toplanan bu plakalar, damarları tıkayabilecek pıhtının oluşumuna neden olur. Polifenollerin antioksidan etkileri şarabın uzun ömürlü olması, aynı zamanda rengi ve tadı açısından önemli bir rol oynar. Zamana dayanabilen kıymetli şaraplar genelde yüksek oranda polifenol konsantrasyonu içerir. Ancak yine de polifenoller zamanla polimerize oldukları için antioksidan etkilerini yitirebiliyorlar. Proses sonrasında yıllandırma basamağında seviyenin devamlı kontrolünün gerektiği durumlarda fenolik madde varlığı önem arz etmektedir. Fenolik bileşikler: Epikateşin, epikateşingallat, epigallokateşin, epigallokateşingallat, kateşin, gallokateşindir.

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

Lakkaz enzimi gıda endüstrisinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Atık suların fenolik madde içeriğinin düşürülmesinde, şarap üretiminde fenolik madde miktarının düzenlenmesinde, biosensörlerde tanımlayıcı ajan olarak fenolik madde miktarı tayininde kullanımı örnek olarak verilebilir (1). Lakkaz (benzediol: oksijen redüktaz, E.C:1.10.3.2), yüksek bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilen bakır içerikli oksideredüktazlardır.

İçecek endüstrisinde fenolik bileşik içeriği hem ürünün tat-koku acılık gibi organoleptik özellikleri hem de raf ömrünün belirlenmesi açısından önem taşımaktadır (2). Ayrıca şaraplarda bulunan quercetin ve rutin anti-kanserojen özelliği bulunmaktadır. Zamana dayanabilen kıymetli şaraplar genelde yüksek oranda polifenol konsantrasyonu içermektedir. Ancak yine de polifenoller zamanla polimerize oldukları için antioksidan etkilerini kaybetmektedir.

Biyosensör biyolojik örneklerdeki kimyasal maddelerin aktivite yada konsantrasyonuna seçici ve tersinir olarak cevap veren bir analitik cihaz olarak tanımlanmaktadır. Bu tanım cihazın bünyesinde biyolojik bir tanıyıcı ajanın gerekliliğini vurgulamakta böylece fiziksel ya da kimyasal olarak biyolojik örnekler üzerinde çalışabilen tüm cihazlar, biyosensör tanımına alınmaktadır. Çok geniş kullanım alanını kapsayan bu tanım ile örneğin beyin gibi hayvan dokularına yerleştirilmiş mikro elektrotlar da bu grubun içine dahil olmaktadır.

Biyolojik tanıyıcı ajan binlercesi arasından kendi spesifik olduğu ajanı tanır, onunla etkileşime girer ve çevirici sistemin algılayabileceği sinyali üretir. Enzimler bu amaçla kullanılan ilk afinite reseptörlerdir. Biyolojik tanımayı gerçekleştiren biyomolekül, tamamen tanıyıcı ajana özgüdür. Örneğin, substrat için enzim, antijen için antikor gibi.

Eğer tanıyıcı tabakadaki biyoaktif molekül bir enzim ise, enzim+substrat tepkimesi sonucu, ortamda hem yan tepkenlerde azalma görülür hem de çeşitli ürünler açığa çıkar. Bu olay, kısa bir sürede dönüşüme bağlı olarak gerçekleşir. Bu projede kullanılacak yöntemin esası enzim+substrat tepkimesi sonucu ortamda görülen tepkenlerdeki azalmanın amperometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır.

Materyal ve Yöntem

Çalışma kapsamında öncelikle plazma polimerizasyonunda kullanılacak olan selüloz asetat membranlar çözücü döküm yöntemi ile hazırlanacaktır. Hazırlanan membranlar plazma polimerizasyonu yöntemi ile farklı güç, basınç ve sürede kaplanacaktır.

Plazma polimerizasyonu sonucu yüzeyde oluşan amin grupları glutraldehit ile aktive edilerek enzim tutuklanması için uygun yüzeyler hazırlanacaktır. Enzim immobilizasyonun, membranların enzim çözeltisi içinde bekletilmesi suretiyle gerçekleştirilecektir (3-6).

Şaraba ait fenolik bileşik içeriğinin modeli için kateşin, kafeik asit, gallik asit ve rutin kullanılacaktır. Bu bileşiklerden hazırlanan standartlar ayrı ayrı enzim elektrot ile ölçülerek her bir bileşik için biyosensörün performansı belirlenecektir. Biyosensör performansının belirlenmesinde hassasiyet, cevap süresi, ve doğrusallık sınırı belirlenecektir. Bu aşamadan sonra farklı oranlarda birden fazla fenolik bileşik içeren çözelti hazırlanarak, biyosensörün performansı şarap benzeri ortam için incelenecek ve elde edilen sonuçlar enzim elektrodun hazırlanmasında kullanılan parametrelerin (enzim immobilizasyon süresi, sıcaklığı gibi) kullanılacaktır. Son aşamada ise hazırlanan enzim elektrot, şarap örneği içinde denenecek ve hazırlanan biosensörün raf ömrü belirlenecektir.

Bulgular ve Tartışma

Şu an deney ve gözlem aşamasında olup, çalışmalarımız belirtilen metot doğrultusunda devam etmektedir. Çalışma kapsamında plazma polimerizasyonunda kullanılacak olan selüloz asetat membranlar çözücü döküm yöntemi ile hazırlanmıştır. Deney şartlarına ve çalışma koşullarına uygun nitelikte önceden hazırlanmış olan prob tayin edilmiştir. Membranlar plazma polimerizasyon işlemine tabi tutulduktan sonra ilgili çözeltilerle yüzey aktifleştirilecek ve lakkaz enzimi immobilizasyonu gerçekleştirilecektir. Fenolik madde tayinine yönelik ölçümlerin yapılmasına geçilecek, ardından bu ölçüm sonuçlarının, projenin amacına olan uygunluğu değerlendirmeye alınacaktır.

Sonuç

Şaraplarda fenolik madde tayini azlığında antioksidan etkinin kaybolmasına ve çokluğunda ise kanserojen etkinin ortaya çıkmasına neden olan polifenollerin miktarının belirlenmesi ve belli bir limitte tutulması açısından gerekmektedir. Bu tayinin hızlı bir yöntemle yapılması ise endüstriyel olarak avantaj sağlayacaktır.

Şaraptaki fenolik bileşikler üzerinde çalışılırken; fenolik madde içeren meyve suyu, zeytinyağı gibi diğer gıda ürünlerinde de aynı yöntemle daha hızlı ve ekonomik olarak fenolik madde tayinine zemin hazırlanmış olacaktır.

Kaynaklar

1. Rosana C, Minussi, Gláucia M, Pastore, Nelson Durán, June-July. 2002. Potential applications of laccase in the food industry, Trends in Food Science & Technology, Volume 13, Issues 6-7, , 205-216

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

2. Cuadrado MU, Perez-Juan PM, Luque de Castro MD, Gomez-Nieto MA. 2005. A fully automated method for in real time determination of laccase activity in wines, *Analytica Chimica Acta*, 553, 99-104.
3. Mutlu M, Mutlu S, Alp B, Boyacı İH, Pişkin E. 1917. Preperation of a single layer enzyme electrode by plasma polymerization technique, *Plasma Processing of Polymers, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, 477-485.
4. İnagaki N, Kishi A, Katsuura K. 1982. Surface properties of polymers prepared from trimethylsilyldimethyl-amine and hexamethyldisilazane by glow discharge polymerization, *Int. J. Adhesion and Adhesives*, 233-238.
5. Tusek L, Nitschke M, Werner C, Stana-Kleinschek K, Ribitsch V. 2001. Surface characterization of NH₃ plasma treated polyamide 6 foils, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 195, 81-95.
6. Bae B, Chun BH, Kim D. 2001. Surface characterization of microporous polypropylene membranes modified by plasma treatment, *Polymer*, 42, 7879-7885.