

α -Lactalbumin Nanotubes and Their Potential Applications in Food Industry

^{*1}Filiz Yıldız and ²Yeliz Parlak

^{*1}Faculty of Agriculture, Department of Dairy Technology Adnan Menderes University, Turkey

²Pamukova Vocational School, Sakarya University, Turkey

Abstract

Food nanotechnology is promising approach for novel developments in the areas of food science and engineering, due to the fact that the nanoscale control over food molecules may lead to modification of many macroscale characteristic, such as the texture, taste and other sensory attributes. The ability of the milk protein α -lactalbumin to self-assemble into nanotubes could offer the food industry a novel and important ingredient for gelling. The α -lactalbumin nanotubes will be effective as viscosifying agent, because of the high aspect ratio and their stiffness. Using the α -lactalbumin nanotubes would provide an alternative thickener, with a high protein density. In this article will be tried to give information about to the structure and formation of α -lactalbumin and potential applications of α -lactalbumin nanotubes in food industry.

Key words: α -lactalbumin nanotubes, food nanotechnology, potential applications

α -Laktalbumin Nanotüpleri ve Gıda Endüstrisinde Potansiyel Uygulamaları

Özet

Gıda nanoteknolojisi gıda bilimi ve mühendislik alanlarında yeni gelişmeler için umut verici bir yaklaşımdır, çünkü gıda moleküllerinin nano boyutlu kontrolü, doku, tat ve diğer duyuşal nitelikler gibi birçok makro düzeyde özelliklerin değişimine yol açabilmektedir. Süt proteini α -laktalbuminin kendiliğinden dizilim yoluyla nanotüp oluşturabilme yeteneği gıda endüstrisine jelleştirici madde olarak yeni ve önemli bir bileşeni sunmaktadır. α -laktalbumin nanotüpleri, yüksek boy oranı ve sert jel oluşturma özelliğine sahip olduğu için viskozifier madde olarak kullanılmaktadır. α -laktalbumin nanotüplerinin kullanımı yüksek protein yoğunluğuna sahip kıvam artırıcı bileşenlere alternatif olacaktır. Bu makalede α -laktalbumin nanotüplerinin oluşumu ve yapısı hakkında bilgi verilmeye çalışılacaktır, ayrıca gıda endüstrisinde α -laktalbumin nanotüplerinin potansiyel uygulamaları konusuna da değinilecektir.

Anahtar Kelimeler: α -laktalbumin nanotüpleri, gıda nanoteknolojisi, potansiyel uygulamaları

1. Giriş

Amerikan Ulusal Nanoteknoloji Kuruluşu tarafından [1] kendine has yeni uygulamalara imkan veren ve yaklaşık olarak 1-100 nm boyutunda olan maddenin nitelendirilmesi ve kontrolü olarak

*Corresponding author: Address: Faculty of Agriculture, Department of Dairy Technology Adnan Menderes University, Aydın TURKEY. E-mail address: filiz.yildiz@adu.edu.tr, Phone: +902567727022 Fax: +902567727233

tanımlanan nanoteknoloji, günümüzde en önemli araştırma ve uygulama alanlarından birini oluşturmaktadır. Nano yapılar, gıda endüstrisinde, nanotıpta ve nanoteknoloji de çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır [2, 3].

Gıda işleme, yeni fonksiyonel ürünlerin geliştirilmesi, biyoaktif maddelerin taşınması ve kontrollü salınımı, patojenlerin tespiti, yeni paketleme ürünlerinin geliştirilerek raf ömrünün uzatılması gibi uygulamalar nanoteknolojinin potansiyel gıda uygulamaları arasında yer almaktadır [4]. Diğer alanlarla karşılaştırıldığında biyonanoteknoloji ve özellikle nanoteknolojinin gıda alanındaki uygulamalarının, günümüzde daha sınırlı olduğu ifade edilebilir. Bununla birlikte, gelişmelere paralel olarak hızla ilerlemekte ve yeni fonksiyonel gıda ürünlerinin üretimi kapsamında gelecek için büyük önem taşıdığı öngörülmektedir [4].

Gıda endüstrisinde nanoteknoloji uygulamalarına α -laktalbuminden üretilen nanotüpler de örnek olarak verilebilir [3]. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda bazı proteinlerin özellikle de süt proteini α -laktalbuminin kısmi hidrolizinin ardından kendiliğinden dizilimle (self-assembly) tüp şeklinde nano yapılar oluşturduğu rapor edilmiştir [5, 6]. Bu nanotüplerin enkapsülasyon, jelleşme ve vizkozite artırma amaçlı kullanımlarının olabileceği ifade edilmiştir. α -laktalbumin nanotüplerinin kullanımında önemli kriterler, nanotüp oluşum koşulları ve stabilitesidir [3].

Biyomoleküllerin kendiliğinden dizilimi çeşitli alanlardan bilim adamlarının fazlasıyla ilgisini çekmektedir. Aslında, kendiliğinden dizilim doğada hemen hemen her yerde meydana gelmektedir: İnorganik ve organik moleküllerin karmaşık yapıları içinde kendiliğinden düzenlenmesi buna örnek olarak gösterilmekle beraber hemoglobin, fosfolipid membranı, hücre iskeleti (mikrotübüller, aktin), membran kanalları, kollajen ve kazein miselleri de verilebilir [3].

Bu derlemede α -laktalbumin kendiliğinden dizilim ile nanotüp oluşturma, nanotüp stabilitesi ve gıda endüstrisinde kullanılabileceği alanlar belirtildi.

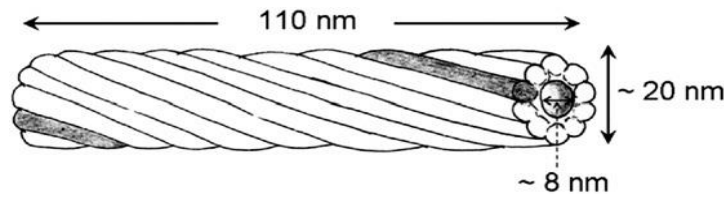
2. Kendiliğinden dizilim ve agregasyon

α -laktalbumin nanotüplerinin yapısına geçmeden önce kendiliğinden dizilim ve agregasyon arasındaki ayrımı bilmek önemlidir. Agregasyon kendiliğinden oluşan bir birleşme reaksiyonudur, genellikle geri dönüşümsüz yapıda heterojen amorf ve yığın (flokülan) agregatların oluşumuna yol açmaktadır [7]. Kendiliğinden dizilim ise agregasyonun özel bir çeşididir. Van der Waals etkileşimleri, hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ve hidrofobik etkileşimler gibi kovalent olmayan moleküller arası kuvvetler yoluyla minimum serbest enerjiye doğru oluşmaktadır [3].

3. α -laktalbumin nanotüplerinin yapısı

Bacillus licheniformis (BLP veya SP-446 olarak da bilinir)'den elde edilen serin proteazı kullanılarak, peynir altı suyu protein izolatlarının hidrolizi ile jel olduğu görülmüştür [8]. Saflaştırılmış protein kullanılarak yapılan sonraki çalışmalarda [9, 10] en fazla bulunan iki serum

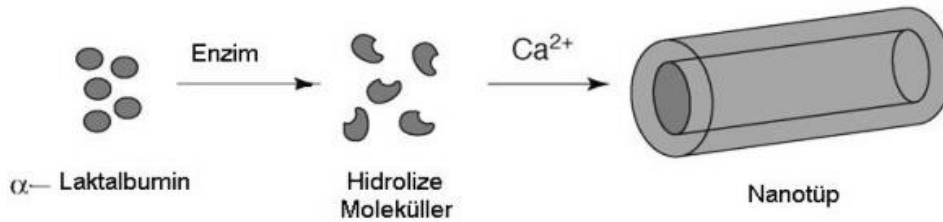
proteini olan β -laktoglobülin ve α -laktalbuminin BLP hidrolizi ile elde edilen jellerinin görünümü ve makroskopik özellikleri arasında önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir. β -laktoglobülin hidrolizi sonucunda oldukça düşük bir jel gücü ve rastgele agregat (boyutu ~ 100 nm) oluşumu gözlemlenmiştir. Diğer taraftan α -laktalbumin hidrolizi ile saydam jeller elde edilmiş ve bu jeller β -laktoglobülin jellerine göre on kat daha güçlü olmuştur. Transmisyon elektron mikroskobu ile, 20 nm ve birkaç mikron arasında değişen uzunlukları ile sabit bir çapa sahip çok düzenli, tüp şeklinli yapıların oluşumu görüntülenmiştir. Bu nanotüplerin ayrıntılı yapısı yapılan bir dizi çalışma içinde aydınlatılmıştır [11]. Elde edilen sonuçlar, ~ 8 nm iç çapa ve ~ 20 nm dış çapa sahip bir nanotüpünün 10 tane sarmal helix yapının bir araya gelmesiyle oluştuğunu göstermektedir (Şekil 1).



Şekil 1. α -laktalbumin nanotüpünün şematik gösterimi [11]

4. α -laktalbumin Nanotüplerinin Oluşumu

Nötr pH ve uygun bir katyon varlığında α -laktalbuminin hidrolizi sonucu açığa çıkan bu yapılar, kendiliğinden bir araya gelerek çapı 20-50 nm arasında değişen nanotüpleri oluşturmaktadır [3]. Ca^{+2} varlığında α -laktalbuminden üretilen 50 nm çapındaki bir nanotüpün görünüşü Şekil 2'de verilmektedir.



Şekil 2. Ca^{+2} varlığında α -laktalbuminden üretilen bir nanotüpün görünüşü [3]

Tübüler yapılar sadece spesifik koşullarda α -laktalbumin hidroliz ürünlerinin kendiliğinden dizilimiyle elde edilmektedir. α -laktalbumin nanotüpünün oluşması için minimum konsantrasyon 20 g/l (50 °C de 75 mM tris buffer, pH 7,5 ve 2 mol Ca^{+2} /mol α -laktalbumin) dir. 20 g/l den daha az konsantrasyonda fibril veya rastgele agregatlar elde edilmektedir [12]. Monomerlerin önemli

miktarı (yaklaşık % 40) nanotüp içine kendiliğinden dizilmezler, fakat monomer (veya dimer/oligomer) içinde kalıntılar, jelleşmeden dolayı sistem dondurulduğunda solüsyonda oluşmaktadır [6]. Ayrıca β -laktoglobulin gibi diğer proteinlerin düşük konsantrasyonlarda varlığı, nanotüp içinde kendiliğinden dizilimi engellemektedir. Zaten β -laktoglobulinin % 2 protein fraksiyonu (30 g/l protein içeriğinde) rastgele agregasyonda bir artış oluşturmaktadır [3].

Tübüler yapıların oluşması için diğer bir ön şart ise uygun iyon varlığıdır. Çeşitli iki ve üç değerli iyonların nanotüp içinde kendiliğinden dizilimi tetiklediği görülmüştür. Bu iyonların başlıcaları Ca^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} ve Al^{+3} dir. Ba^{+2} ve Mg^{+2} varlığında nanotüp oluşmamaktadır, fakat rastgele veya fibril agregatlar elde edilmektedir. Nanotüp oluşumunda iyon tipinin yanı sıra iyon konsantrasyonu da önemlidir. 30 g/l de α -laktalbumin nanotüpleri iyon/ α -laktalbumin oranı 1 ve 3 arasında oluşabilmektedir. Bu oranın aşağısında, yeterli çekirdeği üretmek için iyon konsantrasyonu çok düşük olduğundan sonuçta rastgele agregatlar meydana gelmektedir. Oran 3'ün üzerine çıktığında ise artırılmış iyonik güç bazı önemli elektrostatik reaksiyonların azalmasına neden olmaktadır [3].

α -laktalbumin nanotüplerinin oluşumu için minimum düzeyde kalsiyum konsantrasyonu (1.5 mol kalsiyum/mol α -laktalbumin) gereklidir [13]. Düşük konsantrasyonlarda rastgele agregatlar oluşmaktadır. 2 mol kalsiyum/mol α -laktalbumin konsantrasyonuna kadar artan miktarlarda kalsiyum varlığında nanotüp oluşmaktadır, fakat daha da artması durumunda olumsuz etkilenmektedir. Kalsiyumun yüksek konsantrasyonlarında (9 mol kalsiyum / mol α -laktalbumin) rastgele agregat oluşumu tekrar hakim olmaktadır [11].

5. α -laktalbumin nanotüp stabilitesi

Çeşitli koşullar altında α -laktalbumin nanotüpünün stabilitesi, kullanım alanları için önemli bir konudur. Nanotüpler ekstrem koşullara örneğin otoklav (121 °C, 1.2 atm) koşullarına dayanıklıdır. Pastörizasyon normu olan 72 °C'de 40 s tutulduğunda bozulmazken, 200 °C de bozulma görülmektedir [3]. Nanotüpler dimetilformamid (DMF) ve dimetil sülfoksit (DMSO) dahil olmak üzere, en yaygın organik çözücüler içinde kayda değer bir kimyasal kararlılık göstermektedirler. α -laktalbumin nanotüplerin stabilitesi, püskürterek kurutma ve dondurarak-kurutma gibi endüstriyel üretim işlemlerinde kullanımı mümkün hale getirmektedir [14].

α -laktalbumin nanotüplerinin, uygulamalar için bir diğer önemli özelliği ise kontrollü bozuludur. Kendiliğinden dizilimin bozulması, Ca^{+2} iyon konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bunun için çözelti içindeki Ca^{+2} iyon konsantrasyonu değiştirilerek dizilimin bozulma hızı kontrol edilebilir. Dizilimin bozulması EDTA (nanotüpten kalsiyumun ayrılması), üre ilavesiyle (yapıtaşlarını elverişsiz hale getirir ve yapısal değişikliklere neden olur) ve pH değerinin değiştirilmesiyle (3 den az ve 9 dan fazla) kontrollü bir şekilde gerçekleştirilebilir. Transglutaminaz veya glutaraldehit ile nanotüpe çapraz-bağlanma, α -laktalbumin nanotüplerinin stabilitesini arttırmaktadır [3].

6. α -laktalbumin nanotüplerinin kullanım alanları

α -laktalbumin nanotüplerinden gıda sektöründe viskozite ve kıvam artırıcı olarak yararlanılabilmektedir, aynı zamanda ilaç sanayinde (örneğin hedeflenen ilacın salınımı gibi) ve nanoteknolojide kullanım alanları bulunmaktadır [3,11].

α -laktalbuminden elde edilen kendiliğinden dizilim nanotüplerinden nasıl yararlanılacağı konusunda çeşitli öneriler mevcuttur [3]. Gıda ve ilaç endüstrisinde kullanım alanları ve bunların dışındaki uygulamaların kısa bir özeti, Çizelge 1 'de verilmektedir.

Çizelge 1. α -laktalbumin nanotüplerinin kullanım alanları [3]

Gıda ve İlaç Sanayinde Kullanım Alanları	Gıda Sanayisi Dışında Kullanım Alanları
Vizkosite • Yüksek boy oranı ve sıklık Jelleşme • Düşük konsantrasyonlarda yüksek sıklık • Şeffaf jel oluşumu • Geri dönüşümlü jel oluşumu • Kontrol edilebilir dizilim bozulumu Enkapsülasyon • Kontrol edilebilir aroma salınımı • Hedeflenen ilaç salınımı • Mümkün olan iç ve dış yüzeylerin modifikasyonu	Doku mühendisliğinde • Hücre kültürleri için iskele sağlaması Nano kalıp • Nano teller için belirli metal depositosu

Gıda endüstrisinde nanoteknolojik uygulamalar, tüm avantajları ve yeni açılımları nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmektedir. α -laktalbumin nanotüpleri yüksek boy oranına sahip olması ve sert jel oluşturması nedeniyle, viskozifiyer madde olarak kullanılmaktadır. α -laktalbumin bazı önemli fonksiyonel özelliklere sahiptir ve bu yüzden yüksek protein içeriği ile alternatif bir kalınlaştırıcı görevi yapmaktadır [3].

α -laktalbumin nanotüplerinden elde edilen jeller eşit konsantrasyonlardaki başka protein jelleri ile karşılaştırıldığında, güçlü jellerdir. Güçlü bir jel olmasının yanı sıra, bazı ilave özelliklere de sahiptir. İlk olarak, jel oluşumu geri dönüşümlüdür ki bu belirli uygulamalar için arzu edilen bir özelliktir. İkinci olarak, yine arzu edilen bir özellik, jelin saydam oluşudur. Son olarak α -laktalbumin nanotüplerinin dizilimi kontrol edilebilir bir şekilde bozulabilir, örneğin asidik pH değerini değiştirerek, jel yapısı kolayca kırılabilir. Jelin tüm bu özellikleri, yeni fonksiyonel özelliklere sahip bir jelleştirme ajanı üretimine olanak sağlamaktadır [3].

α -laktalbumin nanotüpünün en önemli özelliği ise boşluğa sahip olmasıdır. Elde edilen nanotüpler α -laktalbuminin yapısındaki bu boşluktan dolayı vitamin ve enzimler gibi enkapsüle moleküller için bir araç olabilmekte veya enkapsüle edilen bileşiklerin korunması amacıyla kullanılabilmektedir. α -laktalbuminden yapılmış nanotüpün 8 nm'lik bir boşluğa sahip olması ve kontrollü ayrıştırılabilmesi gibi özellikleri onun enkapsülasyonda kullanılmasına olanak vermektedir [3]. α -laktalbumin nanotüplerinin gıda endüstrisinde tercih edilmelerinin en önemli

nedenlerinden biri de sağlık açısından önemli özelliklere sahip olmalarıdır. Bu zellikler kalsiyumu bağlayıcı bir süt proteini olması, tokluk hissi ve insan psikolojisi üzerinde olumlu etkisi olduğu bilinen triptofanın plazmadaki seviyesini arttırması ve bakterisidal veya antitümör aktivitesine sahip olması olarak sayılabilmektedir [1]. Gıda dışı kullanım alanı olarak birkaç uygulama [3] bildirilmiştir. α -laktalbumin nanotüpleri örneğin seçici metal birikimi ile nanotel sentezi için iskelet olarak ya da doku mühendisliğinde kalıp olarak hizmet vermektedir.

Hidrolize süt proteini α -laktalbuminin kendiliğinden dizilimi, ısıtma ve mekanik deformasyon gibi bazı önemli uygulamalara dayanıklı olması, uzun, düz nanotüpler oluşturması, nanometre çaplı boşluğa sahip olması ve kontrollü dizilimin bozulması gibi özellikleri nedeniyle, α -laktalbumin nanotüpleri hem gıda hem de gıda dışı uygulamalarda nanoteknolojik kullanım potansiyeline sahiptir. α -laktalbumin nanotüpleri gıda proteinine dayalı nanoyapıları oluşturmayı mümkün kılmaktadır. Bunlar gıda biliminde nanoteknolojik uygulamalar açısından umut verici durumlardır.

Kaynaklar

- [1] nal G. Süt proteinlerinin gıda endüstrisinde nanoteknolojik olarak uygulama alanları, Gıda 2012;37[3]:181-188.
- [2] Weiss J, Takhistov P, McClements DJ. Functional materials in food nanotechnology. J Food Sci 2006;71[9]:107-116.
- [3] Graveland-Bikkera JF, Kruifa CG. Unique milk protein based nanotubes: Food and nanotechnology meet. Trends in Food Science & Technology 2006;17:196–203.
- [4] Tarhan , Gkmen V, Harsa ř. Nanoteknolojinin gıda bilim ve teknolojisi alanındaki uygulamaları. Gıda 2010;35[3]:219-225.
- [5] Ipsen R, Otte J. Nano-structuring by means of proteolysis, rheology of novel gels from α -lactalbumin. Annual Transactions of the Nordic Rheology Society 2003;11:89-93.
- [6] Graveland-Bikker JF, Fritz G, Glatter O, de Kruif CG. Growth and structure of α -lactalbumin nanotubes. J Appl. Crystallography 2006;39:180–184.
- [7] Kentsis A, Borden KLB. Physical mechanisms and biological significance of supramolecular protein self-assembly. Current Protein and Peptide Science 2004;5[2]:125–134.
- [8] Otte J, Ju ZY, Frgemand M, Lomholt SB, Qvist KB. Protease-induced aggregation and gelation of whey proteins. J Food Sci 1996;61:911–5.
- [9] Ipsen R, Otte J, Qvist KB. Molecular self-assembly of partially hydrolysed alpha-lactalbumin resulting in strong gels with a novel microstructure. J Dairy Res 2001;68:277–286.
- [10] Ipsen R, Blow-Olsen K, Otte J, Qvist KB. Protease induced gelation of mixtures of alfa lactalbumin and beta-lactoglobulin. Milchwissenschaftliche 2001;56:492–495.
- [11] Ipsen R, Otte J. Self-assembly of partially hydrolysed α -lactalbumin. Biotechnology Advances 2007;25:602-605.
- [12] Otte J, Ipsen R, Bauer R, Bjerrum MJ, Waninge R. Formation of amyloidlike fibrils upon limited proteolysis of bovine α -lactalbumin. Int Dairy J 2005;15:219–229.
- [13] Graveland-Bikker JF, Ipsen R, Otte J, de Kruif CG. Influence of calcium on the self-assembly of partially hydrolyzed alphalactalbumin. Langmuir 2004;20:6841–6846.

- [14] Kamau SM, Cheison SC, ChennW, Liu XM, Lu RR. Alpha-Lactalbumin: Its production technologies and bioactive peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2010;9:197-212