



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ALFA-LAKTALBUMİN NANOTÜPLERİNİN ELDESİ
VE MODEL SİNDİRİM SİSTEMİNDEKİ DAVRANIŞI**

Nihan BAŞ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.01.00.

Sunuş Tarihi : 14/09/2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sibel KARAKAYA



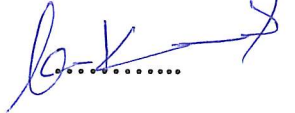
Bornova-İZMİR

2009

Nihan BAŞ tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “Alfa-laktalbumin Nanotüplerinin Eldesi ve Model Sindirim Sistemindeki Davranışı” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 14/09/2009 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oy birliği / oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Sibel KARAKAYA 
Raportör Üye : Prof. Dr. Sedef Nehir EL 
Üye : Yrd. Doç. Dr. Cem KARAGÖZÜ 

ÖZET**ALFA-LAKTALBUMİN NANOTÜPLERİNİN ELDESİ VE MODEL SİNDİRİM SİSTEMİNDEKİ DAVRANIŞI**

BAŞ, NİHAN

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Sibel Karakaya
Eylül 2009, 57 sayfa

Bu çalışmada, peynir altı suyundan nanotüp oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla peynir altı suyundan serum proteinlerini elde etmek amacıyla en uygun protein çöktürme yönteminin seçilmesi, çöktürülen peynir altı suyu proteininden alfa-laktalbuminin izolasyonu, izole edilen alfa-laktalbumin fraksiyonunun saflaştırılması ve daha sonra nanotüp oluşturulması planlanmıştır. Ayrıca izole edilen alfa-laktalbumin fraksiyonundan nanopartikül oluşturulması ve model molekül Brilliant Blue kullanarak nanopartiküllerin enkapsülasyon kapasitesinin saptanması ile enkapsüle Brilliant Blue molekülünün model sindirim sisteminde geri salınımının belirlenmesi amaçlanmıştır. Protein çöktürme yöntemleri arasında, en etkin olan yöntemin izoelektrik noktada iyonik şiddeti artırarak çöktürme (% 80 doyumlukta) olduğu saptanmıştır. Alfa-laktalbuminden nanotüp eldesi için gerekli protein konsantrasyonuna ulaşmak amacıyla, peynir altı suyu ultrafiltrasyon yöntemiyle 10.49 kat konsantre edilmiştir. SDS-Page analiziyle alfa-laktalbumin proteininin saf olarak elde edildiği belirlenmiş ve alfa-laktalbumin proteininden uygun katyon (Ca^{+2}) varlığında oluşturulan nanotüpler, Transmisyon Elektron Mikroskobu'nda görüntülenmiştir.

Alfa-laktalbumin nanopartiküllerinin enkapsülasyon kapasitesi % 86.076 ± 2.87 olarak saptanmıştır. Nanoenkapsüle Brilliant Blue molekülüne *in vitro* sindirim uygulanmış ve molekülün % 42.49 ± 10.18 'nin sindirim enzimlerinin aktivitesi sonucu ortama geri salındığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Alfa-laktalbumin, peynir altı suyu, protein izolasyonu, nanotüp, nanoenkapsülasyon.

ABSTRACT**FORMATION OF SELF-ASSEMBLED ALFA-LACTALBUMIN
NANOTUBES AND BEHAVIOUR OF NANOTUBES IN MODEL
GASTROINTESTINAL SYSTEM**

BAŞ, NİHAN

Master Thesis in Food Engineering Department

Supervisor: Prof. Dr. Sibel Karakaya
September 2009, 57 pages

In this thesis, to form self-assembled nanotubes using whey protein is aimed. In this respect, selection of the most appropriate protein precipitation method, isolation of alfa-lactalbumin from precipitated whey protein, purification of alfa-lactalbumin fraction and then forming nanotubes are planned. Furthermore, to form nanoparticles from alfa-lactalbumin fraction, determination of encapsulation capacity of nanoparticles by using model molecule Brilliant Blue and release of nanoencapsulated Brilliant Blue in model gastro-intestinal system are investigated. Self-assembled nanotubes of alfa-lactalbumin, which are formed by the presence of suitable cation (Ca^{+2}), are imaged by using Transmission Electron Microscopy (TEM).

The most appropriate protein precipitation method was salting out at isoelectric point procedure by using 80% saturated salt solution. In order to reach appropriate protein concentration to form nanotubes from alfa-lactalbumin, whey was concentrated 10.49 times by ultrafiltration. SDS-Page analysis showed that pure alfa-lactalbumin could be obtained by protein precipitation method and alfa-lactalbumin isolation method used. Encapsulation capacity of alfa-lactalbumin was calculated as $86.076 \% \pm 2.87$. *In vitro* release of nanoencapsulated Brilliant Blue molecule after model gastro-intestinal digestion was $42.49 \% \pm 10.18$.

Key words: Alfa-lactalbumin, whey, protein isolation, nanotube, nanoencapsulation.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca her aşamada benden yardımını esirgemeyen, gülyüzüyle çalışmaya teşvik eden değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sibel KARAKAYA'ya,

Çalışmalarım sırasında destek olan, Sayın Prof. Dr. Sedef Nehir EL'e,

Tez çalışmalarımın önemli bir bölümünde yardımını esirgemeyen Sayın Dr. Şevket KARAÇANCI'ya ve Biyomühendislik Bölümü çalışanlarına,

Bilgi, deneyim ve önerilerini paylaştan Sayın Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU'na ve Biyokimya Bölümü Sayın Ar. Gör. Ali ZEYTÜNLÜOĞLU'na,

Çalışmamda, kendi yaptıkları çalışmalarla ve deneyimleriyle bana destek veren Sayın Prof. Dr. Kees de Kruiff'e,

Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (AUBİBAM)'dan Sayın Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU'ya,

Yüksek lisansa başlayıp bitirdiğim ana kadar, maddi ve manevi desteğiyle beni teşvik eden canım aileme,

Tez çalışmamda bana destek veren, sevgili arkadaşlarıma yürekten teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1 Peynir Altı Suyu	4
2.1.1 Alfa-laktalbumin	5
2.2 Nanotüp Oluşum Mekanizması	8
2.3 Alfa-laktalbumin Nanotüplerinin Avantajları	10
2.4 Alfa-laktalbumin İzolasyonu	13
2.5 Nanoteknoloji ile Üretilen Gıdaların Güvenilirliği	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1 Materyal	17
3.1.1 Hammadde	17

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.2 Kimyasal Malzemeler	17
3.1.3 Kullanılan Cihazlar	18
3.2 Yöntem.....	19
3.2.1 Alfa-laktalbumin İzolasyonu İçin Uygulanacak Protein Çöktürme Yönteminin Seçilmesi	19
3.2.1.1 Protein Tayini.....	21
3.2.1.2 Yağın Ayrılması.....	21
3.2.1.3 Proteinin Çöktürülmesi	22
3.2.1.4 SDS-Page Analizi	23
3.2.2 Peynir Altı Suyundan Alfa-laktalbumin İzolasyonu.....	26
3.2.2.1 Proteinin Çöktürülmesi	26
3.2.2.2 Alfa-laktalbumin Fraksiyonunun Eldesi	26
3.2.2.3 Jel Filtrasyon Kromatografisi	29
3.2.2.4 Alfa-laktalbumin Saflık Derecesinin Saptanması.....	29
3.2.2.5 $A_{260\text{ nm}}/A_{290\text{ nm}}$ değeri ≥ 1.35 olan fraksiyonların protein miktarının saptaması.....	29

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.3 Konsantre Peynir altı Suyundan Alfa-laktalbumin İzolasyonu.....	30
3.2.4 Nanotüp Eldesi.....	30
3.2.4.1 Nanotüp Görüntülemesi.....	32
3.2.5 Nanopartikül Oluşturulması ve Enkapsülasyon Kapasitesinin Saptanması.....	32
3.2.6 Enkapsüle Brilliant Blue Molekülünün <i>İn vitro</i> Koşullarda Geri Salınımının (release) Saptanması	33
3.2.7 İstatistiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
4.1 Alfa-laktalbumin İzolasyonu İçin Uygulanacak Çöktürme Yönteminin Seçilmesi.....	34
4.2 Peynir Suyundan Alfa-laktalbumin İzolasyonu.....	35
4.2.1 Proteinin Çöktürülmesi	35
4.2.2 Alfa-laktalbumin Fraksiyonunun Eldesi.....	37
4.2.3 Jel Filtrasyon (Sephadeks) Kromatografisi.....	37
4.2.4 Fraksiyonların Protein Konsantrasyonu ve Alfa-laktalbumin Saflık Derecesi	38
4.2.5. Konsantre Peynir Altı Suyundan Alfa-laktalbumin İzolasyonu.....	40
4.2.6. Nanotüp Eldesi	42

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.2.7. Nanopartikül Oluşumu, Enkapsülasyon Kapasitesi ve Enkapsüle

Brilliant Blue (BB) Molekülünün *In vitro* Koşullarda Geri Salınımı 47**5. SONUÇ**..... 49**6. ÖNERİLER** 51**KAYNAKLAR DİZİNİ** 52**EKLER**..... 56

Ek 1 0°C doygunluk için gerekli amonyum sülfat miktarı..... 56

ÖZGEÇMİŞ..... 57

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.2.1 Peptitlerin kendiliğinden bir araya gelmesi ile nanotüp oluşumu	10
2.3.1 Alfa-laktalbuminden nanotüp eldesi	12
3.2.1. Alfa-laktalbumin izolasyonu için uygulanacak çöktürme yönteminin seçilmesi	20
3.2.2.1. Peynir altı suyundan alfa-laktalbumin izolasyonu.....	27
3.2.2.2.1. Peynir altı suyundan alfa-laktalbumin fraksiyonunun eldesi.....	28
3.2.4.1 Nanotüp eldesi	31
4.1.1. Peynir altı suyunun SDS-Page jel elektroforezi ile saptanan protein fraksiyonları	34
4.2.1.1. Peynir altı suyuna uygulanan farklı çöktürme yöntemleri ile elde edilen protein fraksiyonları.....	36
4.2.5.1. Ultrafiltrasyon sonrasında elde edilen 10 kDa<MA<30 kDa fraksiyonuna uygulanan İİAÇ (% 80 doygunlukta) yöntemi ile elde edilen diyalizatın protein fraksiyonu	42
4.2.6.1. İnkübasyon süresi 20 saat, mol kalsiyum / mol alfa-laktalbumin oranı 2.263 koşullarında elde edilen ve -40 °C'de depolanan örneklerdeki alfa-laktalbumin nanotüpleri	43
4.2.6.2. İnkübasyon süresi 20 saat, mol kalsiyum / mol alfa-laktalbumin oranı 2.263 koşullarında elde edilen ve liyofilize olarak depolanan örneklerdeki alfa-laktalbumin nanotüpleri	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

- 4.2.6.3. İnkübasyon süresi 48 saat, mol kalsiyum / mol alfa-laktalbumin oranı 3
ve liyofilize olarak depolanan örneklerdeki protein agregatları 45
- 4.2.6.4. İnkübasyon süresi 48 saat, mol kalsiyum / mol alfa-laktalbumin oranı 4
ve -40 °C’de depolanan örneklerdeki protein agregatları 46

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.1.1. Sütün azotlu maddeleri	5
2.5.1. Gıda üretim zincirinde nanoteknoloji uygulamaları	15
4.1.1. Değişik çöktürme yöntemlerinin protein verimine etkisi	35
4.2.1.1. Alfa-laktalbumin izolasyonu aşamasında farklı protein çöktürme yöntemlerinin protein verimine etkisi.....	36
4.2.3.1. Jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların 280 nm dalga boyundaki absorpsiyon (A) değerleri.....	37
4.2.4.1. 280 nm dalga boyunda $A > 0.2$ olan fraksiyonların protein konsantrasyonu (PK) ve alfa-laktalbumin (α -L) saflık derecesi	39
4.2.5.1. Ultrafiltrasyon öncesi ve sonrası protein konsantrasyonları.....	40
4.2.5.2. Peynir altı suyunun 10 kDa < MA < 30 kDa fraksiyonuna uygulanan İİAÇ (% 80 doygunlukta) yöntemi ile elde edilen FrA-pH fraksiyonunun protein konsantrasyonu (PK) ve alfa-laktalbumin (α -L) saflık derecesi	41
4.2.7.1. Alfa-laktalbumin nanopartiküllerin model molekül Brilliant Blue için elde edilen enkapsülasyon kapasiteleri ve <i>in vitro</i> koşullarda geri salınımı	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
A	Absorbans
ASP-X	Aspartik asit
FrA	Alfa-laktalbumin fraksiyonu (pH ayarlanmamış)
FrA-pH	Alfa-laktalbumin fraksiyonu (pH'ı ayarlanmış)
Glu-X	Glutamik asit
MA	Molekül ağırlığı
α_s -Kazein	Alfa-kazein
α -Laktalbumin	Alfa-laktalbumin
β -Kazein	Beta-kazein
K-Kazein	Kapa-kazein
3_{10} heliks	Tanıyıcı heliks

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar**

AUBİBAM	Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi
BB	Brilliant blue
BLP	<i>Bacillus licheniformis</i> proteaz
DPT	Devlet Planlama Teşkilatı
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Regarded As Safe
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
İAÇ	İyonik şiddeti arttırarak çöktürme
İÇ	İzoelektrik noktada çöktürme
İİAÇ	İzoelektrik noktada iyonik şiddeti arttırarak çöktürme
OÇ	Organik çözgen kullanarak çöktürme
SDS-Page	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji son yıllarda küresel boyutta önem kazanan yeni bir teknoloji alanıdır. AB ülkeleri, Japonya, A.B.D ve diğer ülkeler 1995'lerden sonra nanoteknoloji çalışmalarına kaynak ayırmaya başlamışlardır. 1997'de nanoteknolojiye devlet yatırımları 100 milyon \$/yıl iken, 2005'lerde 1 milyar \$/yıl civarına çıkmıştır. 6. Çerçeve programı, 2004 değerlendirme raporunda ise, nanoteknoloji planı olmayan iki ülke olarak yalnızca Malta ve Türkiye belirlenmiştir. Bunun sonucunda DPT desteğiyle Bilkent Üniversitesi'ne bağlı olarak Ekim 2005'te başlayan nanoteknoloji çalışmalarına ilk etapta 11 milyon TL ayrılmıştır. Uzmanlar, 2025 yılına kadar gelişimini tamamlanması düşünülen nanoteknoloji araştırmalarına ayrılan fonun ve bu yöndeki araştırmaları yapacak uzmanların artırılması gerektiği düşüncesindedirler. Ülkemizde kurulan Ulusal Nanoteknoloji Merkezi, bu konudaki çalışmaların gerçekleştiği ana merkezdir. Ancak burada henüz gıda alanında çalışmalar yapılmamaktadır (<http://www.nano.org.tr/history.html>, 03.09.2009).

Gıda alanında yapılan çalışmalar incelendiğinde, interaktif gıda ve içeceklere eklenen nanokapsüllerde, farklı mikrodalga boylarında, gıdada arzu edilen renk ve tatlar oluşturulduğu belirtilmiştir. Ulusal İsrail Nanoteknoloji Merkezi ve Birleşmiş Milletler Nanoteknoloji Merkezi, su saflaştırma, kirlilik uzaklaştırma gibi membranlarla yapılan işlemleri içeren uygulamalar yapmışlardır. Başka bir çalışmada, baharatları nanoboyutta toz veya emülsiyonlar halinde kullanarak nanoformülasyonlar oluşturmuşlardır. Kızartma yağının nonoseramik materyalle termal polimerizasyonu önlenmiş ve istenmeyen kokuları azaltılmıştır. Süt proteininden kendiliğinden montaj yöntemiyle oluşturulan nanotüplerin, viskoziteyi artırıcı, jelleşme, nanokapsülleme ve kontrollü salınım potansiyeli ortaya konmuştur (Chau et al., 2007).

Nanoteknoloji kullanılarak, ambalajlama alanında çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Nanokompozit veya nanopartiküllerin (gümüş, titanyum dioksit, silikon dioksit ve nano-kil) ambalaj materyallerine eklenmesiyle gıdaları çevresel etkilerden daha iyi bir koruma ve antimikrobiyal yüzey gelişimi sağlanmaktadır (Chau et al., 2007).

Nütrosötik taşınım ile, fonksiyonel bileşenlerin, su ve içeceklerde kullanımıyla biyoyararlılığının artması sağlanmaktadır. Likopen nanopartikülleri geliştirilmiş ve FDA (Food and Drug Administration) tarafından GRAS

(Generally Regarded As Safe) statüsünde kabul edilmiştir. Esansiyel yağlar, tatlandırıcılar, antioksidanlar, Koenzim Q10, vitamin, mineral ve fitokimyasallar nanokapsüller halinde kullanılarak, biyoyararlılığı geliştirilmiştir. Aktif ingredientleri içeren nanopartikülleri kapsülleme ile oksidasyon, istenmeyen tatların oluşumu engellenmiştir. Peynir suyu protein nanopartikülleri de nütrosötik ajanların ağızdan alımıyla, biyoyararlılığını arttırmışlardır (Chau et al., 2007).

Gıda güvenliğini sağlama ve algılama amaçlı, patojen, kimyasal ve toksinleri belirlemede nonosensör olarak da nanodestekler, nanobarkod cihazları, mikrobiyodedektörler ve nanopartiküller kullanılmıştır (Chau et al., 2007).

Alfa-laktalbumin nanotüplerinin, viskozite arttırıcı, jelleşme sağlayıcı ve enkapsülasyon ajanı olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Ipsen and Otte., 2007).

Alfa-laktalbumin triptofanca zengin, bakterisidal etki, antitümör aktivitesi, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibisyonu (hipertansiyonu düşürücü) ve opioid (rahatlatıcı) etkileri olan ve peynir suyunun %20'sini oluşturan bir süt proteindir (Chatterton et al., 2006). Gıda proteini olması nedeniyle, gelecekte ilaç ve gıda sanayinde potansiyel kullanımı söz konusudur (Graveland-Bikker and de Kruijff, 2006).

Çalışmada, alfa-laktalbumin nanotüplerinin elde edilmesi ana hedef olarak belirlenmiştir. Alfa-laktalbumin nanotüpleri, proteince zengin olan, ancak ülkemizde ya atık olarak işletmeye mali yük olan ya da peynir altı suyu tozu olarak bazı firmalarca değerlendirilmeye çalışılan, peynir altı suyundan elde edilmesi planlanmıştır. Ayrıca alfa-laktalbumin nanopartiküllerinin enkapsülasyon kapasitesi ve nanoenkapsüle molekülün model sindirim sistemindeki davranışının araştırılması da amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bugün nanoteknoloji ile üretilmiş çeşitli temizlik malzemeleri, duvar boyaları ve tekstil ürünleri evlerde ve işyerlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca elektrik-elektronik ve bilgisayar alanlarında nanoteknoloji ile üretilen parçacıkların kullanımı çok daha eskiye dayanmaktadır. Gıda sanayinde ise nanoteknoloji uygulamaları henüz çok yenidir ve ticari olarak üretilen ürünlerin başında likopen ve karoten gelmektedir. Gıda endüstrisindeki nanoteknoloji uygulamaları, taşıma sistemleri (miseller, nanoemülsiyonlar, liposomlar, biyopolimerik nanoparçacıklar vb.) gıda güvenliği ve biyogüvenlik (nanosensörler vb.) ve nanotoksizite gibi uygulamaları kapsamaktadır. Dünyada gıda ve meyve suyu ambalaj sektöründeki nanoteknoloji ürünlerinin satışı 2002 yılında 150 milyon \$ iken, 2004 yılında 860 milyon \$'a yükselmiştir. Uzmanlar gıda endüstrisinde nanoteknoloji uygulamaları ile üretilen ürünlerin 2010 yılında pazarda 20 milyar dolar değerinde bir paya sahip olacağını tahmin etmektedirler. Gıdalarda potansiyel nanoteknoloji uygulamalarının, gıdadaki besin öğeleri ve antioksidanlar gibi biyomoleküllerin insan vücudunda etkin ve efektif olarak salınımları üzerinde yoğunlaşacağı öngörülmektedir. Nanoteknoloji uygulamalarının yaygın olarak kullanılabileceği diğer bir alan ise, fonksiyonel gıda endüstrisi olarak belirtilmektedir. Fonksiyonel gıda endüstrisinde karşılaşılan en önemli güçlük, fonksiyonel gıda bileşeninin sağlık üzerine etkisini sağlayacak biyoyararlılıkta eklenen bileşenin, gıdanın duyuşal özelliklerini olumsuz yönde etkilemesidir. Gıdanın duyuşal özelliklerini bozmadan fonksiyonel bileşen eklemenin başlıca yolu ise mikroenkapsülasyon uygulamasıdır. Ancak gıdalarda mikroenkapsülasyon için kullanılabilecek bileşenler (proteinler, yağlar, karbonhidratlar vb.) oldukça sınırlıdır. Ek olarak gıdalarda kullanılabilecek enkapsülasyon ajanları ile hedef salınım özelliğini sağlamak pek mümkün olmamaktadır. Enkapsülasyon sistemlerinin kontrolünün, ara yüzeylerde veya kolloidal sistemlerdeki moleküllerin bir araya getirilmelerini sağlayacak mühendislik uygulamaları ile elde edilmiş nanoparçacıklar ile sağlanabileceği belirtilmektedir (Karakaya., 2007).

Doğada inorganik ve organik moleküller, biyomoleküllerin bir araya gelerek kompleks yapılar meydana getirmesiyle oluşmaktadır. Bu şekildeki doğal oluşumlara hemoglobin, aktin ve kollajen örnek olarak verilebilir (Graveland-Bikker and de Kruif, 2006).

Nanoteknoloji ve nanobilimler doğal oluşu taklit etmeye yönelik olarak, materyali parçalamaktan ziyade (top-down /yukarıdan aşağıya); moleküler ölçüde senteze (aşağıdan yukarıya /bottom-up) yaklaşımına yönelmiştir. Bu amaçla örneğin ilaç, gıda ve kozmetikte yeni kullanım alanları için, yeni ve farklı yapılar oluşturulmaya çalışılmaktadır. Nanoteknolojik uygulamalarda, boyutları kontrol edilebilir olan içi boş tübüler nanoyapıların sentezi için, genellikle kısa peptitler dizayn edilmektedir. Peptit zinciri, spesifik aminoasitlerin (örneğin; beta-tabaka, aromatik yüzeyler arası bağlanma, halka şeklindeki siklik peptit alt birimlerinin) istiflenmesi gibi mekanizmalar, nanotüp oluşumuna olanak sağlamaktadır. Nanotüpün iç boşluğu yapıya giren peptit alt birimlerinin halka boyutlarının ayarlanmasıyla sağlanabilir. Peptitlerin nanotüp oluşturması için muhakkak siklik yapıda olması gerekmemektedir. Yedi aminoasit içeren amiloid beta-peptitinin kendililiğinden montajı, bir beta tabakasının diğer tabakaya tutunup dönerek heliks yapıda, 50 nm çapındaki kurdele şeklinde homojen tübüler yapı oluşumu şeklinde gerçekleşmektedir. Çok kısa bir dipeptit olan difenilalanin farklı ve dayanıklı nanotüplerin yapımında kullanılmıştır (Graveland-Bikker and de Kruijff, 2006).

Son yıllarda ise, alfa-laktalbuminin nanotüp uygulamaları için oldukça elverişli bir materyal olduğu belirlenmiştir. Özellikle hedef organlara ulaşması istenen biyoaktif bileşenlerin nanoenkapsülasyonu için kullanımı gelecek vaat etmektedir.

2.1 Peynir Altı Suyu:

Peynir altı suyunun tarihçesi yaklaşık 3000 yıl öncesine dayanmaktadır. 17. ve 18. yy.'larda ilaç etkeni olarak değerlendirilmeden önce, peynir altı suyu süt endüstrisinin bir atığı ve "en ucuz akıp giden" olarak bilinirdi, 20. yy.'ın sonlarında yasalar artırılmamış peynir altı suyunun çevreye atımını yasaklamış, yine aynı zamanlarda, peynir altı suyu bileşenlerinin değeri anlaşılmıştır. Modern bilim, peynir altı suyu proteinleri ve bileşenlerinin özelliklerini ortaya çıkarmış, ana prensipte besleyici ve fonksiyonel değerini belirlemiştir. Peynir altı suyu proteininin kalitesinin et, soya, kazein ve balık proteinleri ile benzer veya yüksek olduğu belirtilmiştir (Smithers, 2008).

86-123) oluşturmaktadır. α -heliks yapısı 4 ana α - heliks (amino asit uçları 5-11, 23-34, 86-98 ve 105-110) ve 2 kısa 3_{10} heliks' den (amino asit uçları 18-20 ve 115-118) oluşmaktadır. β -tabaka yapısı ise polipeptid zincirinin orta bölgesini oluşturmakta (amino asit ucu 35-85) ve paralel olmayan β -tabaka yapıları (amino asit uçları 41-44, 47-50, 55-56), küçük 3_{10} heliks (amino asit ucu 77-80) ve bazı düzensiz yapıları kapsamaktadır. Ca^{+2} afinitesi yüksek olan bölge ise bu alt grupların birleşme noktasında yer almaktadır (Graveland-Bikker, 2005).

α -laktalbumin oval yapıda ve boyutları $2.5 \times 3.7 \times 3.2$ nm olan bir globüler proteindir. Doğal holo- α -laktalbuminin dönüş yarıçapı 1.57 nm, fakat asitte çözülmüş globülün yarıçapı 1.72 nm'dir (Graveland-Bikker, 2005).

α -laktalbuminin kararlılığı incelendiğinde, karboksilatlarla düşük pH'da titrasyonun Ca^{+2} iyonlarının protonlarla yer değiştirmesine neden olduğu saptanmıştır (Graveland-Bikker, 2005).

Peynir altı suyu proteinleri, jel oluşumu için hidrolizlendiğinde beta laktoglobulinin düşük jel oluşturma kuvvetine sahip ve içinde 100 nm civarında agregatlar bulunduran beyaz tanecikli yapıda jel oluşturduğu görülmüş, alfa-laktalbuminin ise, şeffaf jel oluşturduğu ve jel oluşturma kuvvetinin beta-laktoglobuline nazaran 10 kat daha güçlü olduğu belirlenmiştir (Ipsen and Otte, 2007).

Alfa-laktalbuminin, antikarsinojenik etki, antimikrobiyal etki, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibisyonu, büyümeyi destekleyici ve opioid (rahatlatıcı) etki gibi etkilere sahip olduğu belirtilmiştir. Yüksek miktarda triptofan içerdiği için, stresle başetmede de fonksiyonel gıda bileşeni olarak kullanım potansiyeline sahiptir (Chatterton et al., 2006).

Proteinler kendiliğinden montaj (self –assembly) yöntemi ile elde edildiklerinde, elde edilen ürününün özelliklerinin onu oluşturan monomerik yapılardan farklı olmadığı ve bu durumun, morfolojileri ve fonksiyonları uyarlanmış, kendiliğinden-molekül bilimiyle hazırlanan yeni maddelerin/ürünlerin oluşumuna imkan sağladığı belirtilmiştir. Bu durum, maddelerin dizaynını, ortam koşullarını, morfolojilerini ve fonksiyonlarını etkileyebileceğinden önemli bir özellik olarak değerlendirilmektedir. Beta-tabaka yapısınca zengin materyallerin genelde termodinamik olarak stabil olduğu ve çevre koşullarından çok az etkilendiği bildirilmiştir (Rajagopal and Schneider, 2004).

Biyomoleküllerin kendiliğinden montaj (self-assembly) mekanizması, bilim adamlarının ilgisini çekmektedir. Kendiliğinden montaj, doğal hayatın içinde aynı anda farklı yerlerde meydana gelmektedir. İnorganik ve organik moleküller kompleks yapıları meydana getirecek şekilde kendiliğinden bir araya gelerek daha büyük ve kompleks yapıları oluşturmaktadır. Bu oluşumların yapılarının belirlenmesi, biyolojik fonksiyonlarının belirlenmesi için bir gerekliliktir. Doğal oluşumlara örnek olarak, hemoglobin, fosfolipit membranları, sitoskelet (mikrotübül, aktin), membran kanalları, kollajen ve kazein miselleri verilebilir. Doğada olduğu gibi nanoboyuttaki bilim ve nanoteknoloji aşağıdan yukarı (bottom-up) yaklaşımıyla sentezi, yukarıdan aşağıya (top-down) yaklaşıma tercih etmektedir. Çalışmalar, doğadaki aşağıdan yukarı (bottom-up) yaklaşımını taklit ederek, farklı kullanım alanları için, yeni ve farklı yapıların oluşturulmasını amaçlamaktadır (Graveland-Bikker and de Kruif, 2006).

Alfa-laktalbumin süt proteini *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen Glu-X ve ASP-X bağlarına spesifik, serin proteazla proteolizi sonucu kendiliğinden montaja eğilimli hale geldiği bildirilmiştir (Ipsen et al., 2001). Mikrometre uzunluğunda tübüler yapılar, nötral pH'da uygun katyonla muamele sonucu oluşturulmaktadır (Graveland-Bikker et al., 2004). Alfa-laktalbumin nanotüplerinin 323 K de *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen serin proteazla hidrolizi ile oluşabileceği bildirilmiş ve katyon olarak kalsiyum eklenmesinin üzerinde durulmuştur (Graveland-Bikker et al., 2006).

Kalsiyum konsantrasyonu arttıkça kendiliğinden montaj kinetiğinin arttığı ancak, jelleşme süresinin azaldığı görülmüştür. R=1.5 mol Ca/ mol alfa-laktalbumin'de gelişigüzel yapıda, bulanık jeller oluşmakta, R=1.5-6 mol Ca/mol alfa-laktalbumin arasında ince lifli ağısı yapıdaki tüplerden oluşan yarı saydam jel yapı ortaya çıkmaktadır. Daha yüksek kalsiyum konsantrasyonlarının ise, tübüler yapının oluşumunda olumsuz etki gösterdiği, şekilsiz (amorfor) yapının ortaya çıktığı saptanmıştır. 50 °C'de 20 saat inkübasyon ve 30 dakika oda sıcaklığında dengeye getirilen %4 BLP (*Bacillus licheniformis* proteaz) içeren R=3 mol Ca/mol alfa-laktalbumin'deki % 3 (w/w) alfa-laktalbuminin şeffaf yapıda jel oluşturduğu jelin şeffaflığını ortaya çıkaran lifsi yapının Transmisyon Elektron Mikroskobu'nda gözlemlendiği bildirilmiştir (Graveland-Bikker et al., 2004). Statik ışık dağılımı ve dar açılı X-ışınları dağılımı ile nanotüp oluşumu kinetiği zamana bağlı olarak ölçülmüştür. Nanotüpün dış çapın 20 nm ve iç çapın dış çapının 1/3'ü kadar olduğu bulunmuştur (Graveland- Bikker et al., 2004). Bu ölçümler Dar açılı

X-ışınları dağılımı (Small-angle X-ray scattering) ve Statik ışık dağılımıyla (Static light scattering) desteklenmiştir (Graveland-Bikker et al., 2006).

Farklı iyonların nanotüp oluşumuna etkisi incelendiğinde, yüksek alfa-laktalbumin konsantrasyonunda (30 g/l) oluşan agregasyonun jelleşmeye neden olduğu saptanmıştır. Al^{+3} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} varlığında sağlam şeffaf jel yapısının, Ba^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} varlığında ise zayıf bulanık jellerin oluştuğu belirlenmiştir. Ca^{+2} varlığında çapı 20 nm, iç boşluğu 8 nm olan nanotüplerin oluştuğu, Mn^{+2} varlığında ise benzer yapıların oluştuğu ancak nanotüplerin biraz daha düz ve daha fazla kesişme noktasına (kinks) sahip olduğu saptanmıştır. Zn^{+2} varlığında 3 noktadan bağlantı oluşmuştur. Nanotüpün duvar kısmında ise deliklerin bulunduğu, nanotüp duvarlarının kıvrıldığı ve nanotüp çapında farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Al^{+3} ile oluşturulan nanotüplerin ise, Ca^{+2} ile oluşturulanlara benzediği, Cu^{+2} varlığında ise oluşan tübüler yapıların yoğun bir şekilde kümelenildiği belirlenmiştir. Mg^{+2} ise nanotüp oluşumunu indüklemeyip, rasgele agregasyon oluşumuna neden olmuştur. Bu rasgele agregasyonlar, 5 nm kalınlığında fibril benzeri yapılardan oluşmuştur. Ba^{+2} 'de de benzer sonuçlar elde edilmiş, muhtemelen fibril benzeri yapılardan oluşan, rasgele agregatlar oluşmuştur (Graveland-Bikker, 2005).

2.2 Nanotüp Oluşum Mekanizması:

Nanotüp oluşum mekanizması aşağıdaki basamaklarla açıklanabilmektedir (Ipsen and Otte, 2007).

1.basamak- konformasyon (biçimin) kararsız hale gelmesi:

Manomerik peptidler tahminen beta-tabakalarındaki yığılmalarla dimerleri oluşturmaktadır. Muhtemelen spesifik olmayan hidroliz sonucu, alfa-laktalbuminin doğal yapısı değişerek, peptidlerde konformasyonel (biçim) değişiklikler olmakta, bu da monomerler arasındaki beta-tabaka oluşumlarına imkan tanımaktadır.

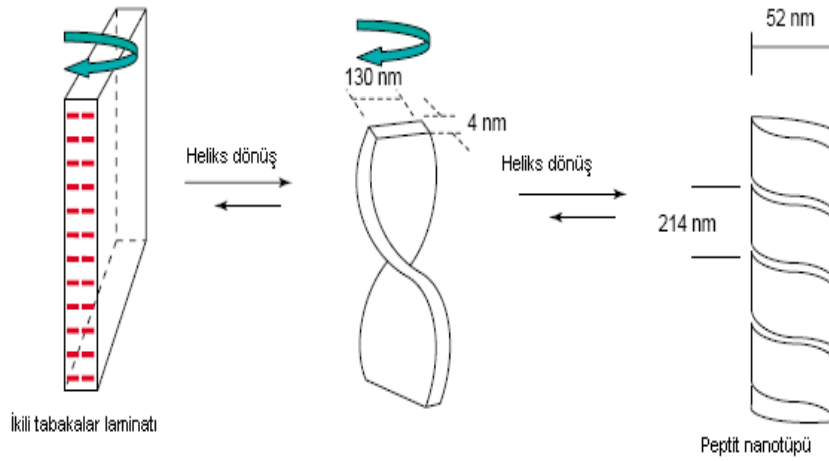
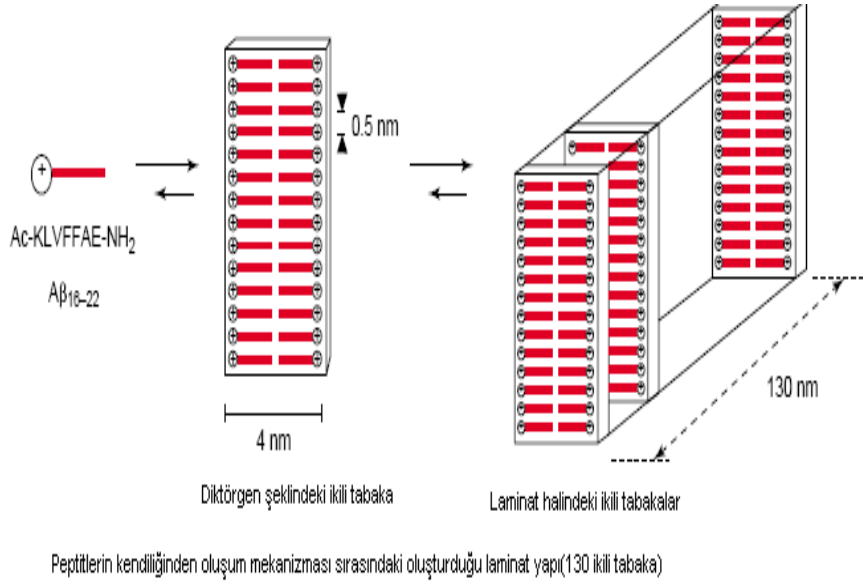
2.basamak-çekirdek oluşumu:

Dimer blokları doygunluk konsantrasyonuna ulaştığında, 5 blok içeren kritik çekirdek oluşmaktadır. Zamanla bu çekirdek dar ve uzun hale gelmektedir. Stabil bir çekirdek oluşumu için, Ca^{+2} gibi uygun bir katyon varlığına ihtiyaç vardır. Ca^{+2} katyonunun, büyük ihtimalle farklı bloklardaki karboksilatlar arasında, moleküller arası (inter moleküler) tuz köprülerinin oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir.

3.basamak-nanotüplerin dar ve uzun hale gelmesi:

Nanotüplerdeki çekirdeğin uzaması, dimerlerin büyüyen tüplere ardarda bağlanmasıyla sağlanmaktadır. Ca^{+2} 2. basamaktaki gibi bir davranış biçimi göstererek, dimerler arasında moleküller arası tuz köprüleri oluşumuna katılmaktadır.

Şekil 2.2.1'de peptitlerin kendiliğinden bir araya gelerek oluşturduğu laminant yapı ve daha sonra nanotüp oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 2.2.1. Peptitlerin kendiliğinden bir araya gelmesi ile nanotüp oluşumu (Rajagopal and Schneider, 2004).

2.3 Alfa-laktalbumin Nanotüplerinin Avantajları

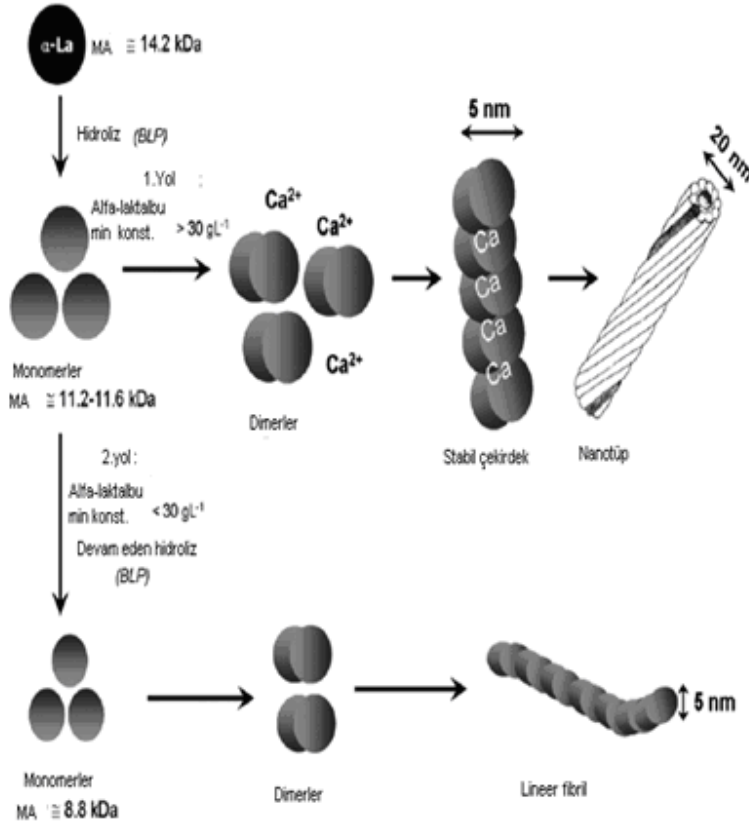
Öncelikle alfa-laktalbumin nanotüpleri, yüksek görünüş özelliği ve dayanıklılığından dolayı viskozite artırıcı ajan olarak etkilidir. Genel olarak linear yapılar, ürünün viskozitesini artırmada randımanlı ingredientlerdir. Bundan dolayı, ürünün viskozitesini artırma sadece tübüler yapılarla sınırlı kalmayıp, diğer uzun ve dayanıklı-sert linear agregatlarda da görülmektedir. Alfa-

laktalbumin nanotüplerinin yüksek protein yoğunluğundan dolayı, viskoziteyi arttırmada alternatif olarak görev yapabileceği üzerinde durulmaktadır. Alfa-laktalbumin nanotüplerinden oluşan jellerin, eş konsantrasyonda diğer proteinlerden oluşan jellere göre, daha dayanıklı olduğu saptanmıştır. Bundan dolayı alfa-laktalbumin nanotüpleri, jelleşme ajanı olarak görev yapabilmektedir. Özel uygulamalarda istenen bir özellik olan jel formasyonunun geri dönüşümlü olması, jelin şeffaf olması, kontrollü olarak (örneğin pH değerini asidiğe kaydırarak, jel yapısı kırılabilir) jelin parçalanması alfa-laktalbumin nanotüpleri ile sağlanabilmektedir (Graveland-Bikker and de Kruif, 2006).

İç boşluğa sahip alfa-laktalbumin nanotüpleri, ilaçlar veya vitamin, enzim veya enkapsüle bileşikleri koruma veya maskeleyerek için bir araç olarak kullanılabilirler. Son yıllarda enkapsüle ingredientlerin, doğru yere doğru zamanda salınımı ilaç ve gıda endüstrisinin ilgisini çekmektedir. Son 10 yılda birçok mikroenkapsülasyon tekniği geliştirilmiştir. Gelişen nanoteknoloji uygulamalarıyla, enkapsülasyon da nanoboyuta inmekte, nanoenkapsülasyona doğru kaymaktadır. Nanoboyuttaki örnekler olarak, lipit bazlı kapsüller veya lipozomlar, virüs-protein kapsülleri veya siklodekstrinler verilebilir. Alfa-laktalbuminin iç boşluğa sahip olması ve kontrollü olarak parçalanabilmesinden dolayı, enkapsüle ajanı olarak kullanım potansiyeli bulunmaktadır (Graveland-Bikker and de Kruif, 2006).

Son zamanlarda, katyonik lipozom-mikrotübül kompleksinden açık veya kapalı uçlu nanotüpler yapılmaktadır. Kontrollü salınım uygulamaları için, nanotüplerin lipidlerle başlıkları açılıp, kapatılabileceği ortaya konmuştur. Nanotüpün tanımlanmış yapısı, nanotüpün dışındaki özellikleri değiştirmeye, spesifik bir moleküle tutunmaya veya iç boşluk koşullarını ayarlamaya, örneğin enkapsüle materyalin bağlanacağı yükü değiştirerek bağlanmasına olanak sağlamaktadır (Graveland-Bikker and de Kruif, 2006).

Şekil 2.3.1.'de alfa-laktalbumin nanotüp oluşumu görülmektedir (Ipsen et al., 2007).



Bacillus licheniformis'ten elde edilen proteazla kısmi hidrolizinden sonra alfa-laktalbuminin kendiliğinden montaj mekanizmasının şematik gösterimi.

Proses sonucu, alfa-laktalbuminin ilk konsantrasyonu ve kalsiyum varlığına bağlıdır.

alfa-laktalbuminin ≥ 30 g/L olduğu konsantrasyon ve kalsiyum / alfa-laktalbumin oranı > 1.5 'ta 1. yolla nanotüpler oluşur. Alfa-laktalbumin konsantrasyonu < 30 g/L olduğunda ise, 2. yolla lineer fibriller oluşur.

Şekil 2.3.1. Alfa-laktalbumin'den nanotüp eldesi (Ipsen et al., 2007)

Alfa-laktalbumin süt proteini olduğundan, gıda ve ilaç uygulamalarında kullanımı kolaydır. Önceki çalışmalarda, alfa-laktalbumin inek sütünden %99.8 saflıkta ya ultrafiltrasyon ve kromatografi ile elde edilerek (Graveland-Bikker et al., 2006) ya da peynir altı suyu proteini izolatı olarak temin edilerek (Ipsen et al., 2001) kullanılmıştır. Alfa-laktalbumin nanopartikülleri ile enkapsülasyonun yöneme göre değişmekle birlikte yaklaşık % 70-80 verimle elde edilen mikroenkapsüle materyallere alternatif oluşturacağı öngörülmektedir (Chen et al., 2006).

Alfa-laktalbumin süt proteinininin 100 °C'de 5 dakika ısıya maruz kaldığında denature olabileceği bilinmektedir (Metin,1999). Alfa-laktalbumin nanotüplerinin ise, farklı koşullarda stabil olduğu bildirilmiştir. Örneğin pastörizasyon işlemi (72 °C- 40 saniye) sırasında alfa-laktalbumin nanotüplerinin stabil kaldığı,

transmisyon elektron mikroskopuyla yapılan gözlemlerde de ısı uygulanmayan örneklerle hiçbir fark ortaya çıkmadığı görülmüştür. Liyofilizasyon sırasında da alfa-laktalbumin nanotüplerinin dayanıklı olduğu belirtilmiştir (Graveland-Bikker and de Kruif, 2006) Bu veriler, genelde tahrip edici olarak bilinen gıda işleme koşullarına karşı alfa-laktalbumin nanotüplerinin dayanıklı ve kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

2.4 Alfa-laktalbumin İzolasyonu:

Alfa-laktalbumin izolasyonu işlemlerinde, çeşitli materyallerden yararlanılmaktadır. Süt, peynir altı suyu, peynir altı suyu izolatu, peynir altı suyu konsantratu kullanılan materyallerdir.

Sütten alfa-laktalbumin izolasyonu işleminde, kazein ve yağ önışlemlerle uzaklaştırılmaktadır. Peynir altı suyuna amonyum sülfat ekleyerek, yapılan protein çöktürmesinden sonra elde edilen sıvı kısım, anyon değiştirici kromotografiden geçirilerek, beta-laktoglobulin uzaklaştırılmış, alfa-laktalbumin ve sığır serum albuminin de birbirinden jel filtrasyon kromotografisi (Sephadeks G-50) ile ayrılması sağlanmıştır (Neyestani et al., 2003).

Hahn et al., (1998) yaptıkları çalışmada, sütte yağ ve kazeini ayırdıktan sonra, pH'ı 4.7'e ayarlamış S-Sepharose FF, S-Hyper D-F ve Fractogel EMD SO3-650(S) kolonlarıyla katyon değiştirici kromotografi yöntemini uygulayarak, peynir altı suyu proteinlerinin birbirinden ayrılmasını sağlanmıştır.

Muller et al., (1999) peynir suyunda yaptıkları çalışmada, alfa-laktalbumini efektif bir şekilde izole etmek için sürekli, kesikli ultrafiltrasyon veya diyafiltrasyon yöntemlerini farklı çalışma koşullarında uygulamışlardır.

Konrad and Kleinschmidt, (2008) peynir altı suyundan alfa-laktalbumin izolasyonunu gerçekleştirmek için, 150 kDa cut-off membran kullanarak ultrafiltrasyon, tripsin hidrolizini takiben 10 kDa cut-off membran kullanarak ultrafiltrasyon uygulamışlardır. Diyafiltrasyon işleminin sonrası ısı işlem uygulamışlar ve sprey kurutucuda kurutarak %90-95 saflıkta alfa-laktalbumin elde etmişlerdir.

Alomirah and Alli, (2003) alfa-laktalbumini izole etmek için, peynir altı suyu, peynir altı suyu protein izolatu ve peynir altı suyu protein konsantratu kullanmışlardır. İşlem alfa-laktalbuminin pH 3.9'un altında zayıf kalsiyum bağlama kapasitesine, ortamdaki tuz konsantrasyonuna, düşük pH'da beta-laktoglobulin çözünürlüğüne ve kalsiyumun şelatlama ajanı olma etkilerine bağlı olarak ortaya çıkan destabilizasyon ve kalsiyum içermeyen alfa-laktalbumin fraksiyonunun çöktürülmesine dayanmaktadır. Bu yöntemle alfa-laktalbumin saflığı pH ayarlaması yapılmadan %83-90, pH ayarlaması yapıldığında ise, %68-73 olarak saptanmıştır.

2.5 Nanoteknoloji İle Üretilen Gıdaların Güvenilirliği:

Bugüne kadar nanoteknolojinin yararlı etkilerinden bahsedilirken, (eko)toksikolojik etkilerinden bahsedilmemiştir. Nanopartikül bazlı ürünlerin tüketiciye ulaşımı, nanopartiküllerin biyolojik sistemlere potansiyel reaktif etkilerinin araştırılmasını gerektirmektedir. Son çalışmalar, nanopartiküllerin biyolojik sistemler üzerine toksikolojik etkileri olabileceğini riskini ortaya koymuştur. Nanogıdaların potansiyel risk oranı yüksekken ve market raflarında yerlerini almışken, bilimsel temele dayalı düzenleyici yasaların ortaya konmasının büyük bir gereklilik olduğu belirtilmektedir (Bouwmeester et al., 2009).

Çizelge 2.5.1'de gıda üretim zincirinde nanoteknoloji uygulamaları özetlenmiştir.

Çizelge 2.5.1. Gıda üretim zincirinde nanoteknoloji uygulamaları (Bouwmeester et al., 2009)

Gıda üretimi basamağı	Uygulama	Nanoteknoloji	Fonksiyon	Serbest nanopartiküllerin tüketiciye ulaşma olasılığı	
Zirai üretim	Nanosensörler	Gıdalar üzerine nanosprey	Mikroorganizmaları bağlar ve renk farklılığı ile belirlenmesi	+	
	Nanosensörler	Elle tutulan cihazlar	Bulaşanların, mikotoksinlerin ve mikroorganizmaların belirlenmesi	-	
	Pestisitler	Nanoemülsiyonlar, enkapsülasyonlar	Artan etki ve suda çözünürlük	++	
	Pestisitler	Nanoenkapsüllerin salınımı	Lokal salınım	++	
	Su saflaştırma	Nanoporlarla filtrasyon	Patojen / bulaşanın ayrılması	-	
	Toprak temizleme	Nanopartiküller	Bulaşanların ayrılması katalizleme /oksidasyonu	- / +	
Üretim / Gıda İşleme	Gıda üretimi	Nanoseramik cihazlar	Büyük reaktif yüzey alan	- / +	
	Buzdolabı, depolama tankları, gıda hazırlama ekipmanları	Çoğunlukla gümüş, bazen çinko oksitinin olduğu nanoboyuttaki partiküllerin birleştirilmesiyle	Antibakteriyel kaplama	- / +	
	Saklama	Gıda ürünleri	Nanoboyutta gümüş spreyleyler	Antibakteriyel etki	++
	Ambalaj materyalleri	Birleşik sensörler	Gıdada istenmeyen kokunun belirlenmesi	- / +	
	Ambalaj materyalleri	Birleşik nanopartiküller	Bariyer özelliklerinin ve materyallerinin dayanıklılığının artırılması	- / +	
	Ambalaj materyalleri	Birleşik aktif nanopartiküller	Serbest oksijen bağlama ve patojenlerin gelişimini önleme	- / +	
Fonksiyonel gıda tüketimi	Besin destekleri / katkıları	Kolloidal metal nanopartiküller	Metalin yüksek oranda alınması gerekliliğinde	+ / +	
	Besin destekleri / katkıları	Nanokümler halinde taşıma	Koruma ve içeriği taşıma	+ / +	
	Besin destekleri / katkıları	Nanoboyutta / kümelenmiş gıda / içecekler (besin öğeleri)	Yüksek oranda alınması gerekliliğinde	+ / +	

“-“ : Nanoteknolojinin gıdayla teması bulunmamaktadır.

“- / +” : Üretim sırasında gıdayla teması bulunmakta ancak nanopartiküllerin tüketiciye direk teması beklenmemektedir.

“+ / ++” : Nanopartikül tüketiciye ulaşan ürüne direk eklenmektedir.

Mühendislik bilimiyle oluşturulan nanopartiküllerin, küçük boyutları, fizikokimyasal özellikleri, kimyasal kompozisyonları ve yüzey yapıları nedeniyle farklı yeni özelliklere sahip olduklarından, beklenmeyen toksikolojik etkilere sahip olabilecekleri belirtilmiştir. Risk belirleme metodolojisini geliştirmek için, nanoteknolojinin gıdalarda uygulanmasında, yasal düzenlemelerin uygulamaya konması gerekliliği üzerinde önemle durulmaktadır. Bu noktadan hareketle risk yönetimi, gıda matriksinde nanopartikülleri saptayacak analitik cihazların geliştirilmesi, doz-yanıt ilişkisinin belirlenmesi, nanopartiküllerin kinetik ve toksikolojik özelliklerinin araştırılması, satışa sunulmuş nanopartikül içeren ürünlerin tahmini tüketim miktarlarının belirlenmesi yolunda çalışmaların hız kazanmasının önemi vurgulanmaktadır (Bouwmeester et al., 2009).

Bu çalışmada, peynir altı suyundan nanotüp oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla peynir altı suyundan serum proteinlerini elde etmek amacıyla en uygun protein çöktürme yönteminin seçilmesi, çöktürülen peynir altı suyu proteininden alfa-laktalbuminin izolasyonu, izole edilen alfa-laktalbumin fraksiyonunun saflaştırılması ve daha sonra nanotüp oluşturulması planlanmıştır. Ayrıca izole edilen alfa-laktalbumin fraksiyonundan nanopartikül oluşturulması ve model molekül Brilliant Blue kullanarak nanopartiküllerin enkapsülasyon kapasitesinin saptanması ile enkapsüle Brilliant Blue molekülünün model sindirim sisteminde geri salınımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Hammadde

Araştırmanın materyalini oluşturan tatlı peynir suyu, Pınar Süt Ürünleri San. ve Tic. A.Ş'den temin edilmiştir.

3.1.2 Kimyasal Malzemeler

Sodyum sitrat S-1804, Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, alpha, alpha, alpha-Tris(hydroxymethyl)-methylamin \geq % 99.8 (Cat:25,285-9) pepsin P7000, pankreatin P-1750, lipofilik Sephadex LH-20, bromfenol mavisi B5525 ve elektroforez markerı M3913 (Low range mw 6500-66000 Da) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Sodyum klorür 71378, Coomassie Brilliant Blue R-250 27816 ve elektroforez markerı 69810 (Molecular weight marker for proteins) Fluka firmasından temin edilmiştir.

Kalsiyum klorür—dihidrat, 1.02382.1000, Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat 6345.1000, amonyum sülfat Art 1216 Merck firmasından temin edilmiştir.

Alcalaz 2.4 L FG Novozyme firmasından temin edilmiştir.

Disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat Iso (10039-32-4) Carlo Erba Reagent firmasından temin edilmiştir.

Etanol (8462), Sitrik asit monohidrat (2064) ve hidroklorik asit 6081 J.T.Baker firmasından temin edilmiştir.

3.1.3 Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre: Bradford Tayini'yle alfa-laktalbuminin saflaştırılması, enkapsülasyon kapasitesi ve *in vitro* sindirim aşamalarının kontrolünde Varian Cary 50 UV-Vis spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

Çalkalamalı Su Banyosu: Alfa-laktalbuminin saflaştırılması aşamasında, insan sindirim sisteminin modellenmesinde ve nanotüp yapımında Clifton ve Memmert WN 37-45 marka çalkalamalı su banyoları kullanılmıştır.

pH metre: Alfa-laktalbuminin saflaştırılması aşamalarında, sindirim sisteminin modellenmesinde, çözelti hazırlama sırasında pH ayarlaması için Sartorius PB-U marka pH metre kullanılmıştır.

Tüp Karıştırıcı: Alfa-laktalbuminin saflaştırılması aşamalarında homojen karışım sağlanması amacıyla Nüve NM110 marka tüp karıştırıcı kullanılmıştır.

Santrifüj: Alfa-laktalbumin saflaştırılması aşamalarında Thermo Scientific IEC CL31R Multispeed cihazı kullanılmıştır.

Manyetik Karıştırıcı: Diyaliz, *in vitro* sindirim, enkapsülasyon kapasitesi aşamalarında Stuart CC162 cihazı kullanılmıştır.

Diyaliz Tüpü: Alfa-laktalbumin izolasyonunda Spectra/Por molecular porous membrane tubing MWCO:6-8,000 kullanılmıştır.

Ultrafiltrasyon cihazı: Sartoflow Slice 200 Benchtop Crossflow System cihazı kullanılmıştır.

Ultrafiltrasyon membranları: Ultrafiltrasyon işlemi sırasında Sartocoon Slice 200 polyether sulfone membranların 30MW, 10 MW cut off olanları kullanılmıştır.

Liyofilizatör: HETOSICC GF-765 marka liyofilizatör kullanılmıştır.

Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM): Nanotüplerin TEM ile görüntülenmesi Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi

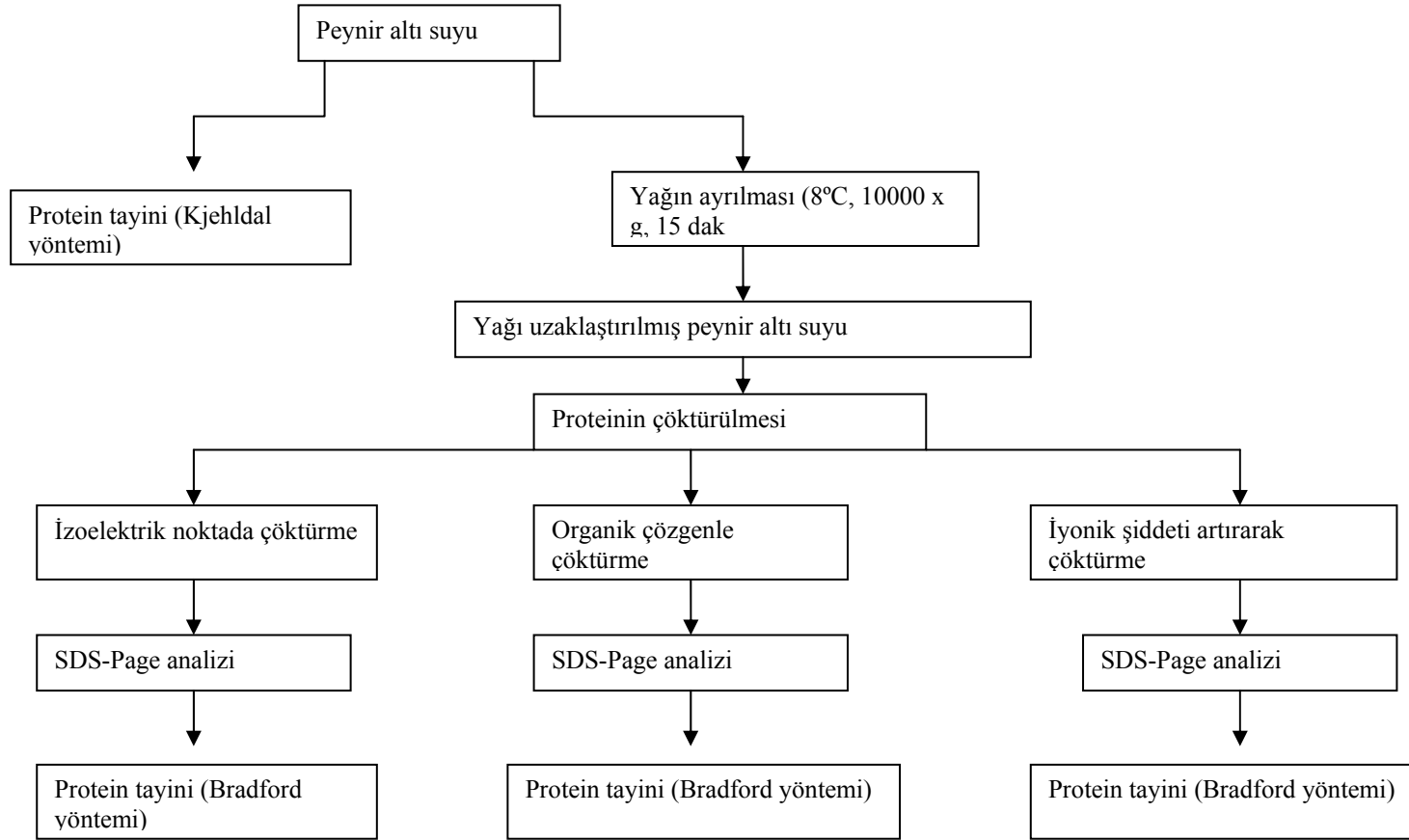
(AUBİBAM)'dan hizmet alımı ile FEI Tecnai Biotwin G2 sipirit 120 Kv cihaz ile gerçekleştirilmiştir.

3.2 Yöntem

Tüm denemeler 2 tekrar 2 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 Alfa laktalbumin izolasyonu için uygulanacak protein çöktürme yönteminin seçilmesi

Peynir altı suyundan alfa-laktalbumin izolasyonu için uygulanacak protein çöktürme yöntemine ait deneme planı Şekil 3.2.1'deki prosedüre göre oluşturulmuştur. Deneme planında yer alan analizler aşağıda açıklanmıştır.



Şekil 3.2.1. Alfa-laktalbumin izolasyonu için uygulanacak çöktürme yönteminin seçilmesi

3.2.1.1 Protein tayini

Kjehldahl Yöntemi: Başlangıçta alınan peynir altı suyunun protein içeriği Kjehldahl yöntemi ile saptanmıştır

Bu yöntem gıdadaki azotun büyük çoğunluğunun proteinlerde bulunduğu noktasından hareketle, azot miktarının belirlenmesine dayanmaktadır. Örnekteki azot katolizör ve sülfirik asit varlığında amonyum sülfat olarak tutulmakta ortama eklenen sodyum hidroksit ile açığa çıkan amonyak borik asitle reaksiyona girerek amonyum tetraborat olarak tutulmaktadır. Amonyum tetraboratın hidroklorik asit ile titrasyonunu takiben örnekteki protein miktarı, aşağıdaki formüle göre hesaplanır (Kamizake et al., 2003).

$$\% \text{ Protein} = [(S - S_{\text{Kör}}) \times F_{\text{HCl}} \times 0.0014 \times 6.25 \times 100] / \text{Örnek miktarı (g)}$$

S: Sarfiyat (ml)

$S_{\text{Kör}}$: Kör çözeltiye ait sarfiyat (ml)

F_{HCl} : Hidroklorik asidin faktörü

Bradford Yöntemi: SDS-Page analizini takiben elde edilen örneklerin protein miktarı Bradford yöntemine göre saptanmıştır (Haris and Angal, 1995).

Bu yöntem uygun koşullarda proteinlerin asidik ve bazik gruplarının organik boya ile birleşerek renkli çözelti oluşturması esasına dayanmaktadır. Boyanın bağlanması ile maksimum absorbands 465 nm' den 595 nm' ye kaymakta ve bu dalga boyunda boya ile proteinin oluşturduğu mavi renkli kompleksin absorbandsı ölçülmektedir. Analizde 100 µL örnek üzerine 2 ml Bradford reaktifi eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra deiyonize suyla hazırlanmış köre karşı 595 nm' de absorbandsı ölçülmüştür.

3.2.1.2 Yağın ayrılması

Peynir altı suyundan yağın uzaklaştırılması için peynir altı suyu 8 °C, 10000 × g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir (Schlatterer et al., 2004). Sütte bulunan kazeinin büyük bir kısmı peynir yapımı sırasında çökerek peynirin kuru maddesinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bununla birlikte az miktarda

kazein ve sığır serum albumini proteinlerinin peynir suyuna geçme olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır. Genelde kazein sütte yağ ile birlikte lipoprotein yapısında bulunduğu için uygulanan santrifüj işlemi ile peynir altı suyunda iz miktarda bulunan kazeininin de uzaklaştırılması hedeflenmiştir.

3.2.1.3 Proteinin çöktürülmesi

Peynir altı suyu proteininin çöktürülmesi amacıyla izoelektrik noktada çöktürme, iyonik şiddeti arttırarak (salting out) çöktürme, organik çözgen kullanarak çöktürme işlemleri denemiş ve en yüksek protein verimini sağlayan yöntem ve/veya yöntemler çalışmanın sonraki aşaması olan alfa-laktalbumin izolasyonunda protein çöktürme aşamasında kullanılmak üzere seçilmiştir.

İzoelektrik noktada çöktürme (İÇ): Protein molekülünün yüzeyi hem pozitif hem negatif yüklerle kaplıdır. Her proteinin kendisine özgü olan izoelektrik noktasının (pI) üzerindeki pH değerlerinde, yüzey baskın olarak negatif yükü yüküdür ve negatif yüklü gruplar birbirini iterler. pI'nın altındaki pH değerlerinde ise yüzey pozitif yüklenir ve yine yüklü gruplar birbirini iterler. pI civarında negatif ve pozitif yükler birbirine eşittir ve zıt yükler birbirini çeker. Bu noktada moleküllerin birbirine uyguladığı elektrostatik çekim sonucunda çökelti oluşur. Başlangıç pH'ı 5.76 olan peynir altı suyunun pH'sı glasiyer asetik asit ve 6 N sitrik asit ile 4.2'ye (alfa-laktalbuminin izoelektrik noktası) ayarlanmıştır. Daha sonra 10000 × g'de, + 4°C'de, 15 dakika süreyle santrifüj uygulanmış ve elde edilen çökelti 1 ml 50 mM fosfat tamponunda (pH 7.01) çözülmüş, vortekslenmiş ve farklı oranlarda seyreltikten sonra Bradford yöntemiyle protein tayini yapılmıştır (Haris and Angal, 1995).

İyonik şiddeti arttırarak çöktürme (Nötral tuzlarla çöktürme) (İAÇ): Bu yöntemde temel olarak proteinin yüzey hidrofobik özelliğinden yararlanır. Hidrofobik gruplar baskın olarak protein molekülünün iç kısmında, bir kısmı ise yüzeyde gruplar halinde yer almaktadır. Sisteme tuz eklendiğinde su moleküllerinin tuz iyonlarını çözmesine bağlı olarak su molekülleri protein molekülünden uzaklaşmakta ve hidrofobik bölgeler açığa çıkmaktadır. Bir protein molekülündeki hidrofobik bölge diğer moleküldeki hidrofobik bölge ile etkileşime girmekte ve bir araya gelerek topaklanma oluşmaktadır. En yaygın kullanılan tuz amonyum sülfattır. Amonyum sülfatın hangi konsantrasyonda kullanılacağı proteinin özelliklerine bağlıdır. İstenen doygunluğa ulaşmak için çözeltiye

eklenmesi gereken amonyum sülfat miktarı ilgili tablolardan (Ek 1) yararlanarak bulunmaktadır.

Proteaz gibi enzimlerin inaktivasyon riskini azaltmak için, işlem genelde + 4 °C'de yapılmıştır. Yağı uzaklaştırılmış peynir altı suyuna %35 ve %80 doygunluk konsantrasyonuna karşılık gelen (NH₄)₂SO₄ manyetik karıştırıcıyla karıştırma devam ederken yavaş yavaş eklenmiştir. Ekleme işlemi bittikten sonra 60 dakika daha karıştırma devam etmiştir. Daha sonra 10000 ×g'de, +4 °C'de, 20 dakika santrifüj uygulanmış ve oluşan çökelti 50 mM fosfat tamponuyla (pH 7.01) çözülüp, vortekslenmiştir. Tuzu uzaklaştırmak amacıyla +4 °C'de distile suya karşı diyaliz uygulanmış ve diyalizden sonra elde edilen örnek farklı oranlarda seyreltildikten sonra Bradford yöntemiyle protein tayini yapılmıştır (Haris and Angal, 1995).

Organik çözgenle çöktürme (OÇ): Protein çözeltilisine organik çözgen eklenmesi dielektrik sabitinin düşmesine ve çözünürlüğün azalmasına neden olmaktadır. Proteinin çözünürlüğünün azalmasına bağlı olarak elektrostatik çekimle protein molekülleri bir araya gelerek topaklanma oluşmakta ve izoelektrik pH'da protein çökmektedir. Büyük molekül ağırlığına sahip proteinler düşük konsantrasyondaki organik çözgenlerde küçük molekül ağırlığına sahip proteinlere göre daha kolay çökmektedirler (Haris and Angal, 1995).

Yağı uzaklaştırılmış peynir altı suyuna organik çözgen olarak aseton eklenmiş (1:1, w/w) ve +8 °C'de, 10000 × g'de, 5 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Çökelti 50 mM fosfat tamponuyla (pH 7.01) çözülüp, vortekslenmiş ve Bradford yöntemiyle protein tayini yapılmıştır (Haris and Angal, 1995).

3.2.1.4 SDS-Page analizi

Elektroforez, molekül yapısının analizi ve bileşiklerin ayırt edilmesi amacıyla kullanılan ve her bir bileşenin elektrik alandan etkileşim farklılıkları nedeniyle farklı hareket hızlarına sahip olmaları prensibine dayalı bir yöntemdir. Jel elektroforezi ise nükleik asit, proteinler gibi makromoleküllerin büyüklük, elektriksel yük ve diğer fiziksel özelliklerine göre ayrılmasını sağlayan bir yöntemdir. Amino asitler, peptitler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler izoelektrik pH'ları (pI) dışında bir pH'ya sahip çözeltilerde, iyonize olabilen

gruplar halinde bulunurlar. Bu gruplar net yüklerine göre katot veya anoda doğru geç ederler ve böylece tanımlama gerçekleştirilir. Elektroforetik ayırma molekül büyüklüğüyle alakalı olarak efektif molekül çapına bağlıdır. Proteinler molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar (Haris and Angal, 1995).

Çözeltiler

1.5 M Tris-HCl tamponu (pH.8.8): 18.15 g Tris baz, 50 ml deiyonize suda çözülüp, 6N HCl ile pH. 8.8'e ayarlanmış, deiyonize suyla 100 ml'e tamamlanmıştır.

0.5 M Tris-HCl tamponu (pH.6.8): 6 g Tris baz, 60 ml deiyonize suda çözülüp, 6N HCl ile pH. 6.8'e ayarlanmış, deiyonize suyla 100 ml'e tamamlanmıştır.

Akrilamid/bisakrilamid çözeltisi: 7.4 g akrilamid ve 0.2 g bisakrilamid toplam hacim 25 ml olacak şekilde deiyonize suda çözülmüş ve gaz giderme işlemi yapılmıştır.

% 10 (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi: 10 g SDS deiyonize suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır.

% 10 Amonyum persülfat (APS) çözeltisi: 100 mg APS 1 ml deiyonize suda çözülmüştür.

%15'lik ayırma jeli (Resolving gel): 2.4 ml deiyonize su, 5 ml akrilamid / bisakrilamid çözeltisi ve 2.5 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) kullanılmıştır. %15'lik jele yapılan gaz giderme işlemi (15 dakika) takiben, 100 µl %10'luk SDS, 50 µl %10'luk APS ve 5 µl TEMED (tetramethylethylenediamine) eklenmiştir.

%4'lük yükleme jeli (Stacking gel): 6.1 ml deiyonize su, 1.3 ml akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 2.5 ml 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 karışımına uygulanan gaz giderme işlemi (15 dakika) takiben, 100 µl %10'luk SDS, 50 µl %10'luk APS ve 10 µl TEMED eklenmiştir.

Elektrolitik yürütme tamponu: Bu tamponun hazırlanması için, 3.03 g Tris baz, 14.4 g glisin ve 1 g SDS tartılmış ve deiyonize suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Yürütme tamponu: 50 ml elektrolitik yürütme tamponu (pH 8.3) deiyonize suyla 500 ml 'ye tamamlanmıştır.

Coomasie Brilliant Blue R-250 çözeltisi: 0.625 g Coomasie Brilliant Blue R-250'e 112.5 ml metanol, 112.5 ml deiyonize su ve 25 ml glasiyer asetik asit eklenmiştir.

% 0.5 (w/v) bromfenol mavisi: 0.5 g Bromfenol mavisi deiyonize suyla 100 ml'e tamamlanmıştır.

Örnek tamponu: 3.55 ml deiyonize su, 1.25 ml 0.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2.5 ml gliserol, 2 ml %10'luk SDS ve 0.2 ml % 0.5'lik bromfenol mavisi bir araya getirilerek hazırlanmıştır.

Boya giderici çözelti(destain): 5 ml metanol üzerine 12.5 ml asetik asit eklenmiş ve hacim distile suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Örnek hazırlama

Örnek:tampon oranı 2:1 (50 µl örnek + 25 µl örnek tamponu) olacak şekilde hazırlanmıştır. Jele yüklenecek örneklerin protein konsantrasyonlarının birbirinden çok farklı olmamasına dikkat edilmiştir. Hazırlanan örnekler 2 dakika kaynayan su banyosunda tutulmuştur.

SDS-Page jel elektroforezi analizinin yapılışı:

2 tabaka arasına üst çizgiye 1 cm kalana kadar ayırma jeli dökülmüş ve üzerine saf su eklenmiştir. Mobil çizgisi oluşana kadar (yaklaşık 45 dakika) beklendikten sonra tabakalar arasındaki su süzölmüş, tarak yerleştirilmiş ve yükleme jeli eklenmiştir. Jelin donması için 1 saat kadar beklenmiş ve bu süre sonunda taraklar çıkarılmıştır. Örnekler ve protein markerı (Sigma M3913 veya Fluka 69810) jele yüklendikten sonra 100 V, 500 MW koşullarında elektroforez işlemi (Biorad veya Thermo elektrofez) gerçekleştirilmiştir. Elektroforeze zemine 0.5 cm kalana kadar (girişim olmaması için) devam edilmiştir. Daha sonra cihazdan alınan jel tabaka Coomasie R-250 çözeltisine batırılmıştır. Jel bu çözelti içerisinde 45 rpm çalkalama hızında 2 saat bekletilmiştir. Coomasie R-250 çözeltisinden çıkarılan jele, boya giderici çözelti eklenmiş ve 2-3 kere yıkanmıştır. Daha sonra jelin fotoğrafı çekilmiş ve Rf değerinden bantların moleköl ağırlıkları belirlenmiştir.

3.2.2 Peynir altı suyundan alfa-laktalbumin izolasyonu

Peynir altı suyundan alfa-laktalbuminin izolasyonu Şekil 3.2.2.1.'de verilen deneme planına göre gerçekleştirilmiştir.

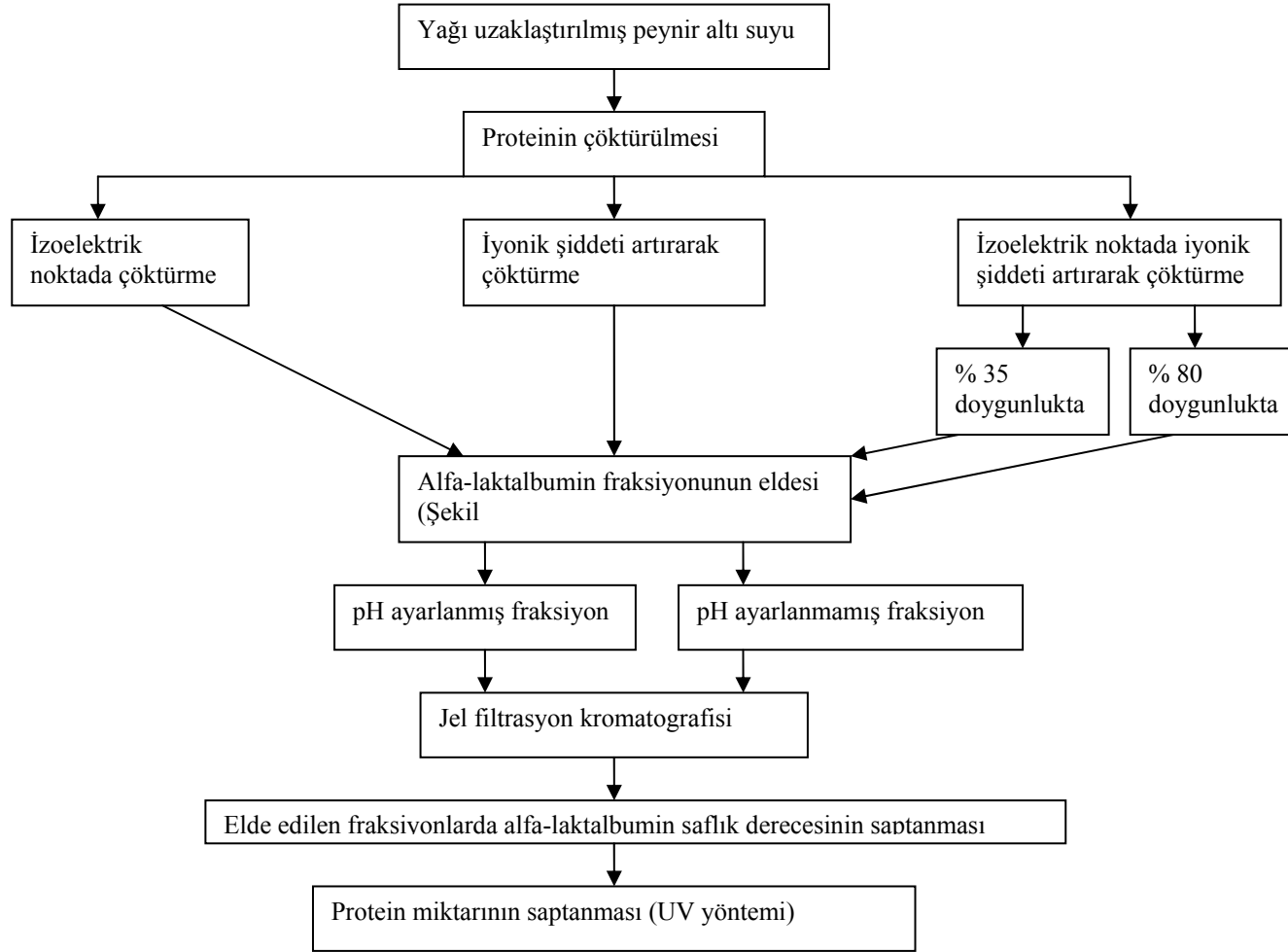
3.2.2.1 Proteinin çöktürülmesi

Alfa-laktalbumin izolasyonunda kullanılacak protein çöktürme yöntemleri, Şekil 3.2.1'de yer alan deneme planının uygulanmasını takiben elde edilen protein verimlerine göre belirlenmiştir. İÇ ve İAÇ (% 80 doygunlukta) yöntemlerine ek olarak izoelektrik noktada iyonik şiddeti artırarak çöktürme (İİAÇ) yöntemi kullanılmıştır.

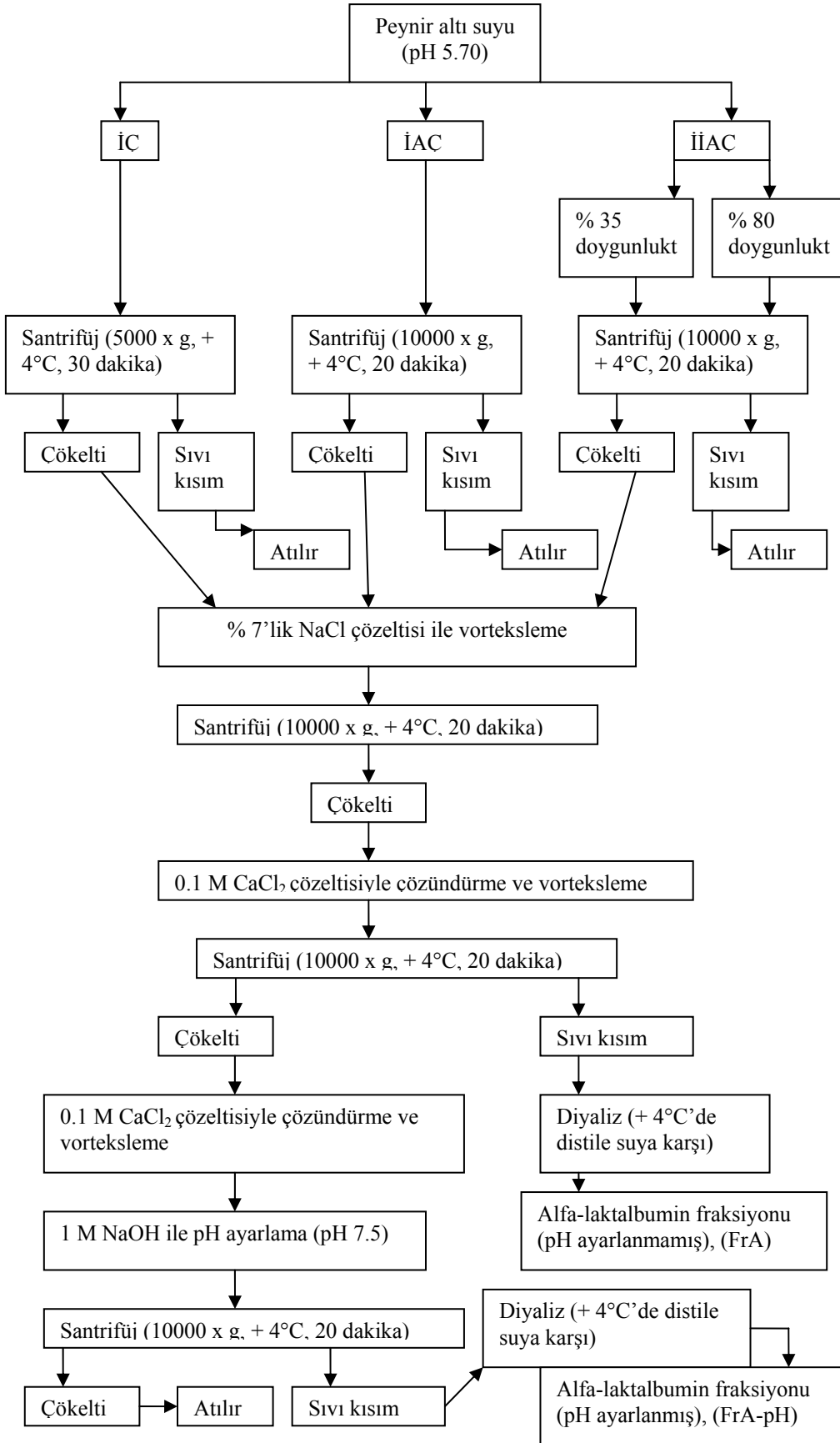
İzoelektrik noktada iyonik şiddeti artırarak çöktürme (İİAÇ): Yağı uzaklaştırılmış peynir altı suyunun pH'sı 6 N sitrik asitle 4.2'ye düşürülmüş ve 35°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlanınca % 35 veya % 80 doygunluğa ulaşacak konsantrasyonda (NH₄)₂SO₄ eklenmiş ve buzlu su banyosunda 45 veya 90 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır.

3.2.2.2 Alfa-laktalbumin fraksiyonunun eldesi

Alfa-laktalbumin fraksiyonu eldesinde Alomirah and Alli, (2004) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır (Şekil 3.2.2.2.1.). Ancak protein çöktürme yöntemleri olarak İÇ, İAÇ (% 80 doygunlukta) ve İİAÇ (% 35 ve % 80 doygunlukta) kullanılmıştır.



Şekil 3.2.2.1. Peynir altı suyundan alfa-laktalbumin izolasyonu



Şekil 3.2.2.2.1. Peynir altı suyundan alfa-laktalbumin fraksiyonunun eldesi

3.2.2.3 Jel filtrasyon kromatografisi

3.2.2.2.1.'de verilen yöntemle elde edilen alfa-laktalbumin fraksiyonundaki olası safsızlıkların giderilmesi amacıyla jel filtrasyon kromatografisi uygulanmıştır. Jel filtrasyon kromatografisi Boyer (2000) tarafından belirtilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir.

Kolonun hazırlanması: Kolon dolgu maddesi olarak lipofilik Sephadex L-20 kullanılmıştır. 2.5 x 30 cm boyutlarındaki cam kolon gece boyunca deiyonize suda (+ 4°C) bekletilerek şişmesi sağlanmış Sephadex L-20 ile doldurulmuş ve daha sonra kolondan 0.02 M Tris-HCl tamponu (pH 7.0) geçirilmiştir.

Örneğin kolona uygulanması: Şekil 3.2.2.2.1.'de elde edilen örnek (2-5 ml) kolondan geçiş hızı 0.085-0.17 ml/dak olacak şekilde kolona yüklenmiş ve 0.02 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponu (15-40 ml) ile elue edilmiştir. Eluat 2'şer ml'lik fraksiyonlar halinde ayrı ayrı toplanmıştır.

3.2.2.4 Alfa-laktalbuminin saflık derecesinin saptanması

Jel filtrasyon kromatografisini takiben elde edilen fraksiyonlardaki alfa-laktalbuminin saflık derecesini saptamak amacıyla her fraksiyonun 280 nm dalga boyundaki absorbansı belirlenmiştir. Kör çözelti olarak 0.02 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponu kullanılmıştır. 280 nm'deki absorbansı (A_{280nm}) > 0.2 büyük olan fraksiyonların 260 nm (A_{260nm}) ve 290 nm (A_{290nm}) dalga boylarındaki absorbansları tespit edilmiştir. A_{260nm} / A_{290nm} değerinin ≥ 1.35 olması alfa-laktalbuminin yeterli saflıkta olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (Boyer 2000).

3.2.2.5 A_{260nm} / A_{290nm} değeri ≥ 1.35 olan fraksiyonların protein miktarının saptanması

A_{260nm} / A_{290nm} değeri ≥ 1.35 olan fraksiyonların protein miktarlarının belirlenmesinde UV bölgede absorbans ölçülmesi prensibine dayalı spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır (Haris and Angal, 1995). Bu yöntem çoğu proteinin, tirozinin fenolik grubu ve triptofanın indol grubuna bağlı olarak 280 nm' de maksimum absorbans vermesine dayanmaktadır. Protein çözeltisinin

absorbansı 280 nm’de ve 260 nm’de ölçülmüş ve aşağıdaki denklemden yararlanılarak protein miktarı belirlenmiştir.

$$\text{Protein (mg/mL)} = (1.55 \times A_{280\text{nm}}) - (0.76 \times A_{260\text{nm}})$$

$A_{280\text{nm}}$: Örneğin 280 nm’de okunan absorbansı

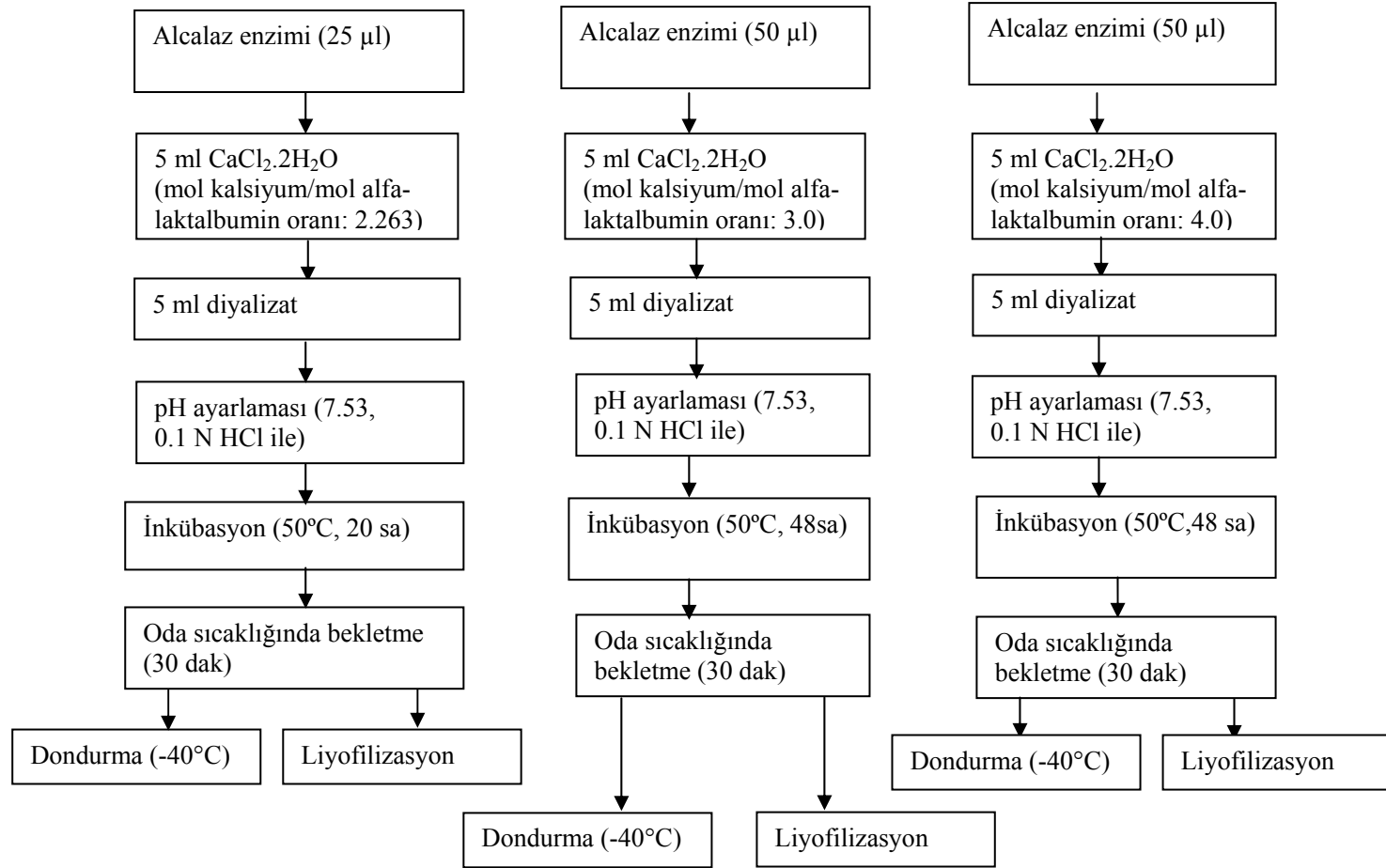
$A_{260\text{nm}}$: Örneğin 260 nm’de okunan absorbansı

3.2.3 Konsantre peynir altı suyundan alfa-laktalbumin izolasyonu

Peynir altı suyundan alfa-laktalbumin izolasyonu aşamasında elde edilen diyalizatların protein konsantrasyonunun 28g/l’nin altında olması (nanotüp elde etmede kullanılacak protein konsantrasyonundan düşük) nedeniyle peynir altı suyunun ultrafiltrasyonla konsantre edilmesi ve alfa-laktalbuminin konsantre peynir altı suyundan izole edilmesi planlanmıştır. Ultrafiltrasyonla konsantre etme işlemi Konrad et al., (2008) ve Almecija et al., (2007)’ye göre gerçekleştirilmiştir. Ultrafiltrasyon işleminde peynir altı suyu önce, 30 MW cut-off polyether sülfon membrandan geçirilerek 5 kat konsantre edilmiştir. Elde edilen fraksiyon (MA<30 kDa), 10 MW cut-off membrandan geçirilerek 5 kat daha konsantre edilmiştir. Elde edilen bu fraksiyon, peynir altı suyu proteinlerinden alfa-laktalbumin (MA=14.2 kDa) ve beta-laktoglobulini (MA=18.2 kDa) içeren fraksiyondur. Konsantre peynir altı suyundan alfa-laktalbumin izolasyonunda Şekil 3.2.2.1’de verilen deneme planı kullanılmıştır. Protein tayini UV bölgede absorbans alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 Nanotüp eldesi

Peynir altı suyundan izole edilen alfa-laktalbumin molekülünden nanotüp elde etmek için Graveland-Bikker (2005) tarafından önerilen prosedür izlenmiştir (Şekil 3.2.4.1.). Bu amaçla başlangıç materyali olarak konsantre edilmiş peynir altı suyu kullanılmıştır. Alfa-laktalbumin izolasyonunda protein çöktürme aşamasında izoelektrik noktada iyonik şiddeti artırarak (%80 doygunlukta) çöktürme ile en yüksek protein verimi elde edildiği için nanotüp eldesinde bu yöntemle elde edilen diyalizat kullanılmıştır. Kalsiyum molekülü, nanotüp oluşum mekanizmasında iki karboksil grubu arasında tuz köprülerinin oluşmasını sağlamaktadır. Bu nedenle üç farklı mol kalsiyum/mol alfa-laktalbumin oranının (2.263, 3.0 ve 4.0) nanotüp oluşumuna etkisi araştırılmıştır.



Şekil 3.2.4.1. Nanotüp eldesi

3.2.4.1 Nanotüp görüntülemesi

Elde edilen nanotüplerin transmisyon elektron mikroskopu ile görüntülenmesi Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nde (AUBİBAM) hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 Nanopartikül oluşturulması ve enkapsülasyon kapasitesinin saptanması

Alfa-laktalbumin nanopartikülleri, nanoenkapsülasyonda kullanılmak üzere Dreis et al (2007) tarafından önerilen yönteme göre oluşturulmuştur. Ultrafiltrasyonla konsantre edilmiş peynir altı suyunun molekül ağırlığı 10 KDa < MA < 30 KDa olan fraksiyonundan izoelektrik noktada iyonik şiddeti artırarak çöktürme (% 80 doyumlukta) ile izole edilen alfa-laktalbumin fraksiyonu kullanılmıştır. Enkapsülasyon kapasitesinin saptanmasında, model molekül olarak Brilliant Blue (BB) kullanılmıştır. Diyaliz sonrasında elde edilen diyalizattan 3 ml alınmış, üzerine 1 ml Brilliant Blue çözeltisi (0.03 mg/ml) eklenmiş ve 2 saat süresince sabit karıştırma hızında (600 rpm) manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır. Karışıma 3 ml etanol eklenerek nanopartikül oluşumu sağlanmış ve çapraz bağlanmayı sağlamak amacıyla 153 µl glutaraldehit çözeltisi (%8'lik) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 24 saat karıştırmayı takiben 13000 x g' de 30 dakika (+4 °C) santrifüj işlemi uygulanmıştır. Elde edilen süpernatantın 570 nm dalga boyunda absorbansı saptanmıştır. Kör çözelti olarak Brilliant Blue haricinde diğer kimyasalların karışımı (glutaraldehit + su + etanol) kullanılmıştır. Süpernatant kısmındaki Brilliant Blue konsantrasyonu ile başlangıçta eklenen Brilliant Blue konsantrasyonu arasındaki farktan yola çıkarak enkapsülasyon kapasitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$EK = [(B - ES) / B] \times 100$$

EK= Enkapsülasyon Kapasitesi

B= Başlangıç BB konsantrasyonu

ES= Enkapsülasyon sonrası Brilliant blue konsantrasyonu

3.2.6 Enkapsüle Brilliant Blue molekülünün *in vitro* koşullarda geri salınımının (release) saptanması

Enkapsüle Brilliant Blue molekülünün mide ve ince bağırsak koşullarının modellendiği *in vitro* koşullarda geri salınımı Chen and Subirade (2005) tarafından önerilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Yöntem kısaca aşağıda özetlenmiştir.

3.2.5.'te elde edilen pelet (nanoenkapsüle BB) 4 ml 0.1 N HCl eklenerek bir beher alınmıştır. Beher içeriği, 37 °C' de 10 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra çalkalamalı su banyosuna (37 °C, 90 vuruş/dakika, vuruş uzunluğu 15 mm) alınmıştır. Hidrolizi başlatmak için 0.05 ml pepsin çözeltisi (1 mg pepsin/ml, 0.1 N HCl) eklenmiş ve hidroliz tamamlanmaya kadar 30 dakika çalkalamalı su banyosunda tutulmuştur. 30 dakikanın sonunda pH 1 M NaOH'le 7.5'e ayarlanarak mide sindirimi sona erdirilmiş ve 0.2 ml fosfat tamponu (0.5 M, pH 7.5) eklenmiştir. İnce bağırsak sindirimini başlatmak için, fosfat tamponu ile hazırlanmış (0.02 M, pH.7.5) 0.05 ml pankreatin çözeltisi (10 mg/ml) eklenmiş ve hacim saf su ile 5ml'ye tamamlanmıştır. Karışım çalkalamalı su banyosunda (37 °C, 90 vuruş/dakika, vuruş uzunluğu 15 mm) 6 saat inkübe edilmiştir. 6 saat sonunda elde edilen karışım 10.000 x g'de 30 dakika (4°C) santrifüj edilmiş ve sıvı kısmının 570 nm dalga boyunda absorbansı belirlenmiştir.

Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\% SA = (S / N) \times 100$$

$$\% SA = \text{Brillant Blue molekülünün \% salınımı}$$

S= *In vitro* sindirim sonrası elde edilen sıvı kısımdaki Brilliant Blue konsantrasyonu

N= Nanopartikül Brilliant Blue konsantrasyonu (B- ES)

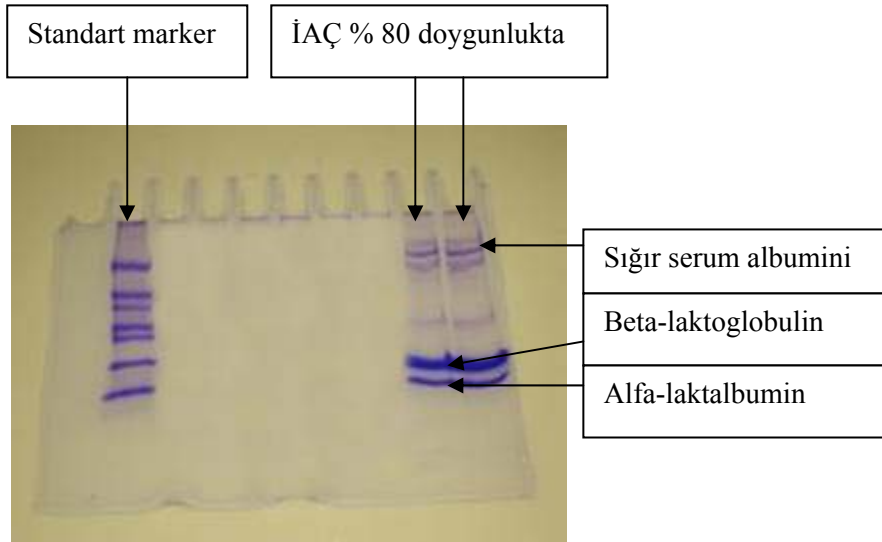
3.2.7 İstatistiksel analiz

Analizler sonucunda elde edilen veriler arasında farklılık olup olmadığı varyans analizi (ANOVA) ile saptanmış ve farklılık SPSS for Windows (Version 10.0) paket programı kullanılarak % 95 güven aralığında Tukey testi ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Alfa-laktalbumin İzolasyonu İçin Uygulanacak Çöktürme Yönteminin Seçilmesi

Peynir altı suyunun protein içeriği (Kjelhdal yöntemiyle) $8.9 \text{ g/l} \pm 0.01$ olarak saptanmıştır. Alomirah and Alli, (2004) yaptıkları çalışmada kullanılan peynir altı suyu protein içeriğini 8.6 g/l olarak saptamışlardır. Lucena et al., (2007) yaptıkları çalışmada kullandıkları peynir altı suyu toplam protein miktarını HPLC yöntemiyle, 4.8 g/l olarak saptamışlardır. Şekil 4.1.1’de peynir altı suyu proteininin iyonik şiddeti artırarak çöktürülmesi (% 80 doygunlukta) ile elde edilen protein fraksiyonları görülmektedir.



Şekil. 4.1.1. Peynir altı suyunun SDS-Page jel elektroforezi ile saptanan protein fraksiyonları

Peynir altı suyunun protein fraksiyonu standart protein markeri ile karşılaştırıldığında peynir altı suyunda sığır serum albumini, beta-laktoglobulin ve alfa-laktalbumin bulunduğu belirlenmiştir.

Alfa laktalbumin izolasyonunda uygulanacak protein çöktürme yönteminin belirlenmesi amacıyla peynir altı suyuna uygulanan farklı protein çöktürme yöntemlerinin protein verimine etkisi Çizelge 4.1.1’de gösterilmiştir

Çizelge 4.1.1. Değişik çöktürme yöntemlerinin protein verimine etkisi

Çöktürme Yöntemleri	Protein Miktarı (mg/ml) *
İzoelektrik noktada çöktürme (İÇ)	1.951 ± 0.12 ^a
Organik çözgenle çöktürme (OÇ)	8.880 ± 0.62 ^b
İyonik şiddeti arttırarak çöktürme (İAÇ) (%35 doygunlukta)	0.543 ± 0.08 ^c
İyonik şiddeti arttırarak çöktürme (İAÇ) (%80 doygunlukta)	8.163 ± 0.85 ^b

* : Ortalama ± SD

^{a,b,c} sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Çizelge 4.1.1.'den görüldüğü gibi OÇ ve İAÇ (%35 doygunlukta) yöntemleri diğer iki yönteme göre (İÇ ve İAÇ %80 doygunlukta) en yüksek protein verimini sağlamıştır (p<0.05).

4.2 Peynir Altı Suyundan Alfa-Laktalbumin İzolasyonu

4.2.1 Proteinin çöktürülmesi

Peynir altı suyundan alfa-laktalbumin izolasyonunda farklı protein çöktürme yöntemlerinin protein verimi üzerine etkisi Çizelge 4.2.1.1.'de gösterilmiştir. İÇ, İAÇ (%80 doygunlukta) ve İİAÇ (% 80 doygunlukta) yöntemleri ile elde edilen protein verimlerinin benzer olduğu saptanmıştır (p>0.05). Bu yöntemler arasında en yüksek protein verimi İİAÇ (%35 doygunlukta) yöntemiyle elde edilmiştir (p<0.05). Alomirah and Alli (2004), peynir suyundan izoelektrik çöktürme ile izole ettikleri pH ayarlaması yapılmamış alfa-laktalbumin fraksiyonunun protein içeriğini %28.8, pH'sı 7.5'e ayarlanmış alfa-laktalbumin fraksiyonunun protein içeriğini ise, %18.7 olarak saptamışlardır. Çalışmamızda, İİAÇ yöntemiyle (%35 ve %80 doygunlukta) elde edilen fraksiyonun protein içeriği ise sırasıyla %20.46 ve %14.07 olarak saptanmıştır.

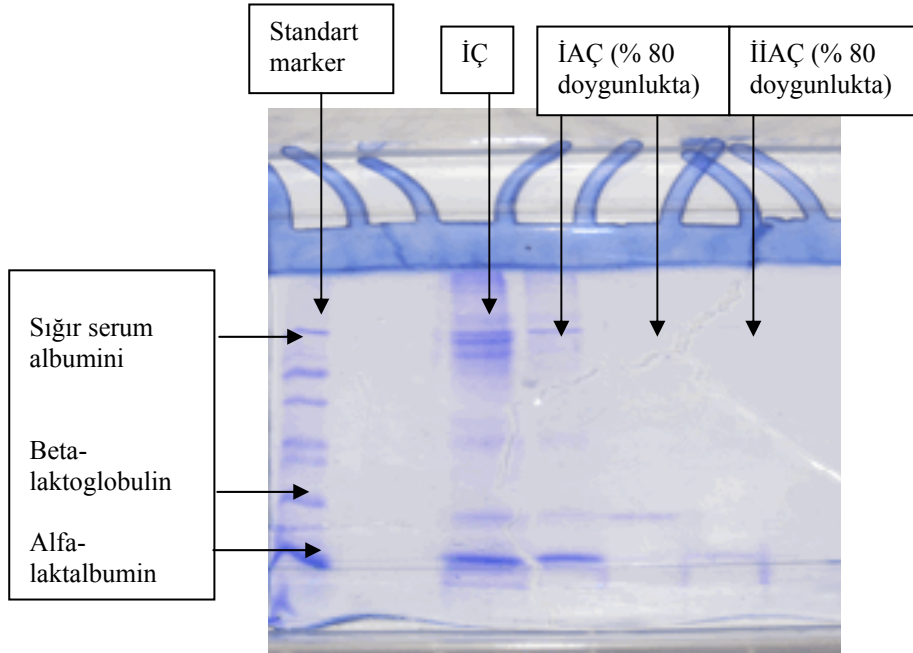
Çizelge 4.2.1.1. Alfa-laktalbumin izolasyonu aşamasında uygulanan farklı protein çöktürme yöntemlerinin protein verimine etkisi

Çöktürme Yöntemleri	Protein Miktarı (mg/ml) *
İzoelektrik noktada çöktürme	0.1022 ± 0.04 ^a
İyonik şiddeti arttırarak çöktürme (%80 doygunluk)	0.1311 ± 0.0009 ^a
İzoelektrik noktada iyonik şiddeti arttırarak çöktürme (%35 doygunlukta)	0.2046 ± 0.02 ^b
İzoelektrik noktada iyonik şiddeti arttırarak çöktürme (%80 doygunlukta)	0.1407 ± 0.002 ^a

* : Ortalama ± SD

^{a,b} sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Peynir altı suyundan alfa-laktalbumin izolasyonunda kullanılan farklı protein çöktürme yöntemleri ile elde edilen diyalizatların (alfa-laktalbumin içeren) protein fraksiyonları SDS-Page jel elektroforezi ile belirlenmiştir (Şekil 4.2.1.1).



Şekil. 4.2.1.1 Peynir altı suyuna uygulanan farklı çöktürme yöntemleri ile elde edilen protein fraksiyonları

Şekil 4.2.1.1'den görüldüğü gibi İÇ ve İAÇ yöntemi ile elde edilen diyalizatlarda sığır serum albumini, beta-laktoglobulin ve alfa-laktalbumin fraksiyonları, İİAÇ yöntemi ile elde edilen diyalizatta ise sadece alfa-laktalbumin fraksiyonu bulunmaktadır. SDS-Page jel elektroforez sonuçları nanotüp elde etmede en uygun protein çöktürme yönteminin İİAÇ (% 80 doygunlukta) olduğunu göstermiştir.

4.2.2 Alfa laktalbumin fraksiyonunun eldesi

Şekil 3.2.2.2.1'de verilen prosedür çerçevesinde protein çöktürme aşamasında İÇ ve İİAÇ (%35 ve %80 doygunlukta) yöntemleri kullanılarak alfa laktalbumin içeren diyalizatlar elde edilmiştir. Diyalizatlarda bulunan alfa-laktalbumin fraksiyonunun saflaştırılması amacıyla diyalizatlara jel filtrasyon kromatografisi uygulanmıştır.

4.2.3 Jel filtrasyon kromatografisi

İÇ ve İİAÇ protein çöktürme yöntemleri kullanarak elde edilen diyalizatlar jel filtrasyon kromatografisi ile, hacim 2 ml olacak şekilde fraksiyonlarına ayrılmıştır. Çizelge 4.2.3.1.'de fraksiyonların 280 nm'deki absorbansları görülmektedir. Fraksiyon numaraları kolondan çıkış sırasına göre verilmiştir.

Çizelge 4.2.3.1. Jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların 280 nm dalga boyundaki absorbans (A) değerleri

Örnek	Fraksiyon no	Ortalama (A_{280nm})
İÇ	1	0.1277 ± 0.0004^a
	2	0.1762 ± 0.0002
	3*	0.4442 ± 0.0002
	4*	0.3961 ± 0.0003
İİAÇ (%35 doygunlukta)	1*	0.7338 ± 0.0087
	2*	0.3013 ± 0.0004
	3*	0.3059 ± 0.0047
	4*	0.2252 ± 0.0007
	5	0.1751 ± 0.0005
	6	0.1158 ± 0.0003
İİAÇ (%80 doygunlukta)	1*	0.9544 ± 0.0078
	2	0.1643 ± 0.0001
	3	0.2469 ± 0.0001
	4	0.3709 ± 0.0004
	5	0.3985 ± 0.0001

^a Ortalama \pm SD, "*" işaretli fraksiyonlarda alfa-laktalbumin saflık derecesi saptanmıştır.

4.2.4 Fraksiyonların protein konsantrasyonu ve alfa-laktalbuminin saflık derecesi

Çizelge 4.2.3.1’de “*” ile işaretli fraksiyonların protein konsantrasyonları ve alfa-laktalbumin saflık dereceleri saptanmıştır (Çizelge 4.2.4.1). Jel kromatografisinden elde edilen fraksiyonların protein konsantrasyonları değerlendirildiğinde protein çöktürme yöntemi olarak İİAÇ (% 80 doygunlukta) kullanımı ile elde edilen diyalizatın kolondan geçirilmesini takiben alınan 2. fraksiyonunun en fazla protein konsantrasyonuna sahip olduğu görülmüştür. Ancak bu fraksiyondaki alfa laktalbuminin saflık değeri < 1.35 olduğu için (1.0796 ± 0.0618) nanotüp yapımında uygun başlangıç materyali olmayacağı belirlenmiştir. Kolondan geçen ve absorbans > 0.2 olan fraksiyonlar arasında sadece İİAÇ (% 35 doygunlukta) yöntemi kullanılarak elde edilen diyalizatın kolondan ilk olarak alınan fraksiyonunun alfa laktalbumin saflık değeri ≥ 1.35 olduğu için (1.3698 ± 0.0230) nanotüp eldesinde kullanılabilir en uygun fraksiyon olarak değerlendirilmiştir.

Nanotüp eldesinde etkili olan bir diğer faktör protein konsantrasyonudur. Elde edilen protein konsantrasyonu değerlerine göre, uygulanan tüm çöktürme yöntemleriyle nanotüp yapımı için gerekli 28 g/l protein konsantrasyonuna ulaşabilmek için, çok fazla miktarda peynir suyunun işleme tabi tutulması gerektiği belirlenmiştir. Bu nedenle peynir altı suyu ultrafiltrasyonla konsantre edilmiştir.

Çizelge 4.2.4.1. 280 nm dalga boyunda $A > 0.2$ olan fraksiyonların protein konsantrasyonu (PK) ve alfa-laktalbumin (α -L) saflık derecesi

Fraksiyon No	A_{280nm}	A_{260nm}	A_{290nm}	PK (mg/ml)	α -L saflık derecesi A_{260}/ A_{290}
İÇ Fraksiyon 3	0.4442 ± 0.0002^a	0.5038 ± 0.0009	0.3782 ± 0.0003	$0.3035 \pm 0,0032$	$1.3321 \pm 0,0035$
İÇ Fraksiyon 4	0.3961 ± 0.0002	0.4423 ± 0.0002	0.3332 ± 0.0004	$0.2778 \pm 0,0002$	1.3273 ± 0.0011
İİAÇ (%35 doygunlukta) Fraksiyon 1	0.7338 ± 0.0087	0.7000 ± 0.0194	0.5107 ± 0.0075	0.6057 ± 0.0026	1.3698 ± 0.0230
İİAÇ (%35 doygunlukta) Fraksiyon 2	0.3013 ± 0.0004	0.3500 ± 0.0027	0.2618 ± 0.0019	0.2011 ± 0.0025	1.3370 ± 0.0201
İİAÇ (%80 doygunlukta) Fraksiyon 1	0.9544 ± 0.0078	0.0387 ± 0.0027	0.0358 ± 0.0005	1.4499 ± 0.01	1.0796 ± 0.0618

^a Ortalama \pm SD

4.2.5 Konsantre peynir altı suyundan alfa-laktalbumin izolasyonu

Uygulanan izolasyon yönteminin peynir altı suyundan alfa-laktalbumin eldesinde etkili olduğu saptanmıştır. Ancak tüm fraksiyonlar için elde edilen protein konsantrasyonunun 28 g/l'nin altında olması nedeniyle peynir altı suyuna ultrafiltrasyon uygulanmış ve molekül ağırlığı MA < 10 kDa ile 10 kDa<MA< 30 kDa olan iki fraksiyondan alfa-laktalbumin izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. Çizelge 4.2.5.1.'de bu fraksiyonların protein konsantrasyonları görülmektedir.

Çizelge 4.2.5.1. Ultrafiltrasyon öncesi ve sonrası protein konsantrasyonları

Fraksiyon Adı	Protein Konsantrasyonu* (mg/ml)
Orijinal peynir suyu	10.105 ± 0.07 ^a
MA<10 kDa	5.070 ± 0 ^b
10 kDa<MA<30 kDa	3.695 ± 0.07 ^c

* : Ortalama ± SD

^{a,b,c} farklı harfler istatistiksel farklılığı göstermektedir (p<0.05).

İşlem uygulanmamış peynir altı suyunun protein konsantrasyonu 10.105 mg/ml olarak saptanmıştır. Protein konsantrasyonu, MA < 10 kDa olan fraksiyonda 5.07 mg/ml ve 10 kDa<MA< 30 kDa olan fraksiyonda 3.695 mg/ml olarak saptanmıştır. Çizelge 4.2.3.1'den görüldüğü gibi başlangıçtaki peynir suyunun protein konsantrasyonu MA < 10 kDa ve 10 kDa<MA<30 kDa olan fraksiyonların protein konsantrasyonundan yüksek bulunmuştur (p<0.05). Bu farklılık peynir suyunda MA> 30 kDa olan protein fraksiyonunun varlığını göstermektedir. Bir diğer açıklama ise ultrafiltrasyon sırasında ayrılan yağ ile birlikte bir kısım proteinin (genellikle lipoprotein yapısında immunoglobulinler ve kazein yer almaktadır) uzaklaştırılmış olma olasılığıdır. İzole etmek istediğimiz alfa-laktalbuminin, 10 kDa<MA< 30 kDa olan fraksiyonda bulunduğu, daha sonra bu fraksiyondan alfa-laktalbumin izolasyonu ile elde edilen diyalizata SDS-Page analizinin uygulanması ile ortaya konmuştur. Ayrıca 10 kDa<MA< 30 kDa fraksiyonuna uygulanan alfa-laktalbumin izolasyonu aşaması sonrasında elde edilen diyalizatın protein konsantrasyonu (1.4759 ± 0.0056 mg/ml) olarak saptanmıştır. Bu değer ultrafiltrasyon uygulamadan elde edilen diyalizatın protein konsantrasyonundan (0.1407± 0.002) yaklaşık 10.49 kat yüksektir (p<0.05).

Ultrafiltrasyon sonrasında elde edilen 10 kDa<MA< 30 kDa fraksiyonuna peynir altı suyuna uygulanan protein çöktürme yöntemleri (İÇ, İİAÇ %35 ve %80

doygunlukta) uygulanmıştır. İÇ ve İİAÇ (%35 doygunlukta) yöntemleri ile elde edilen diyalizata uygulanan jel filtrasyon kromatografisi sonucunda alınan fraksiyonların hiçbirinde $A_{260nm} > 0.2$ saptanmamıştır. İİAÇ (% 80 doygunlukta) prosedürü ile FrA-pH (Şekil 3.2.3) fraksiyonu elde edilmiş ve bu fraksiyona uygulanan jel filtrasyon kromatografisi ile kolondan 11 fraksiyon alınmıştır. Her fraksiyonunun protein konsantrasyonları ile alfa-laktalbumin saflık dereceleri Çizelge 4.2.5.2’de verilmiştir.

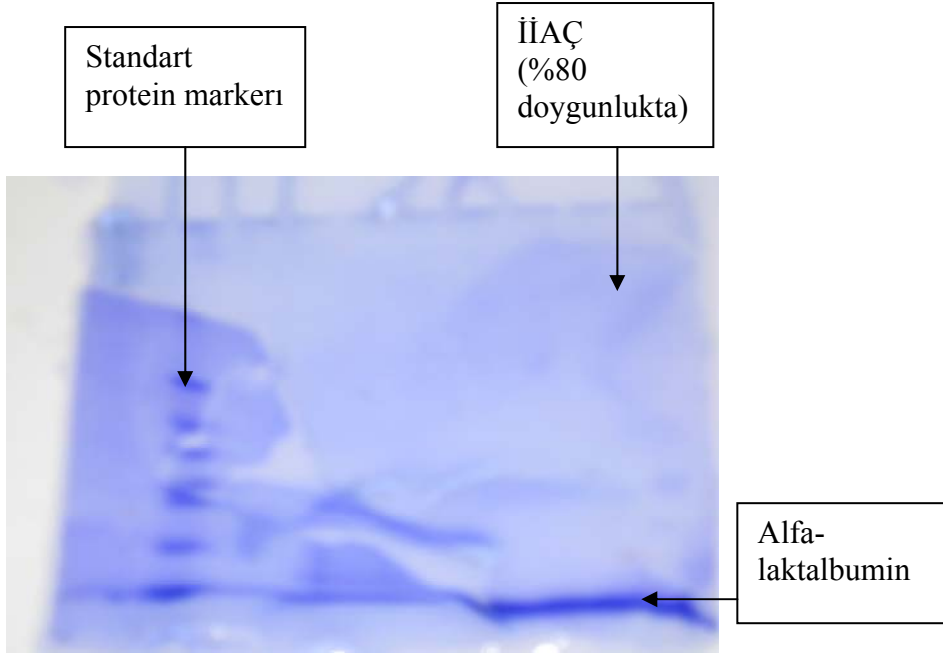
Çizelge 4.2.5.2. Peynir altı suyunun 10 kDa<MA< 30 kDa fraksiyonuna uygulanan İİAÇ (% 80 doygunlukta) yöntemi ile elde edilen FrA-pH fraksiyonunun protein konsantrasyonu (PK) ve alfa-laktalbumin (α -L) saflık derecesi

Fraksiyonlar	A_{280nm}^a	Protein konsantrasyonu ^a (g/l)	Alfa-laktalbumin saflık derecesi ^a A_{260nm}/A_{290nm}
Fraksiyon 1	0,0383 ± 0.0004	0,0260 ± 0.0004	1,4933 ± 0.001
Fraksiyon 2	0,0475 ± 0.0003	0,0325 ± 0.0002	1,4706 ± 0.017
Fraksiyon 3	0,0705 ± 0.0026	0,0464 ± 0.0018	1,4562 ± 0.007
Fraksiyon 4	0,0249 ± 0.0001	0,0174 ± 0.0001	1,3372 ± 0.023
Fraksiyon 5	0,0222 ± 0.0004	0,0165 ± 0.0002	1,4057 ± 0.008
Fraksiyon 6	0,0188 ± 0	0,0133 ± 0.0001	1,3825 ± 0.031
Fraksiyon 7	0,0464 ± 0.0002	0,0282 ± 0.0002	1,6183 ± 0.009
Fraksiyon 8	0,1799 ± 0.0003	0,0832 ± 0.0003	2,1314 ± 0.001
Fraksiyon 9	0,4507 ± 0.0001	0,1965 ± 0.0001	2,1801 ± 0.001
Fraksiyon 10	0,6384 ± 0.0013	0,2599 ± 0.0010	2,4485 ± 0.022
Fraksiyon 11	0,6779 ± 0.0013	0,2819 ± 0.0012	2,3360 ± 0.001

^a: Ortalama ±SD

4 No’lu fraksiyon dışında tüm fraksiyonlarda alfa-laktalbuminin yeterli saflıkta elde edildiği belirlenmiştir. Bu sonuç SDS-Page jel elektroforezi ile doğrulanmıştır. Ultrafiltrasyon sonrasında elde edilen 10 kDa<MA<30 kDa fraksiyonuna uygulanan İİAÇ (% 80 doygunlukta) yöntemi ile elde edilen diyalizatın SDS-Page analizinde sadece alfa-laktalbumin piki verdiği saptanmıştır (Şekil 4.2.5.1).

Alomirah and Alli, (2004) FrA fraksiyondaki alfa-laktalbumin saflığının %83-90, FrA-pH fraksiyondaki alfa-laktalbumin saflığının ise % 68-73 arasında değiştiğini saptamışlardır.



Şekil 4.2.5.1. Ultrafiltrasyon sonrasında elde edilen 10 kDa<MA<30 kDa fraksiyonuna uygulanan İİAÇ (% 80 doygunlukta) yöntemi ile elde edilen diyalizatın protein fraksiyonu

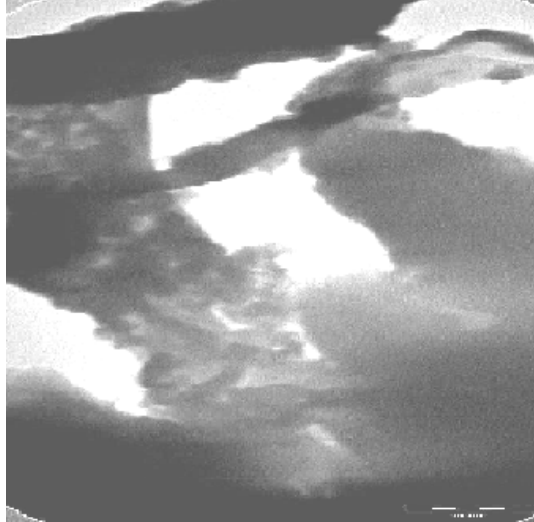
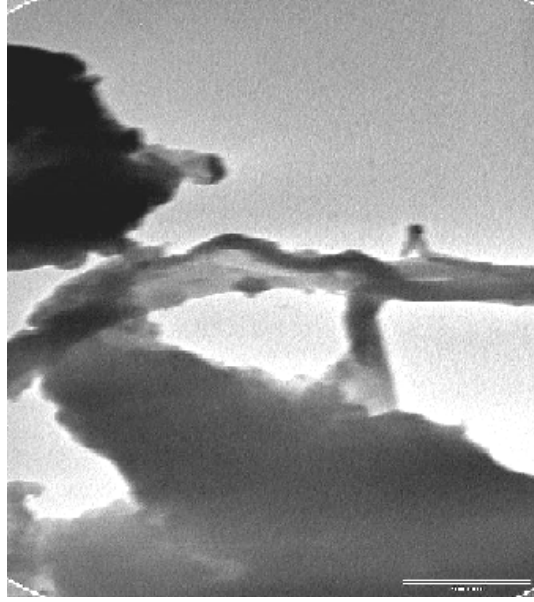
Konrad and Kleinschmidt, (2008) yaptıkları çalışmada, ultrafiltrasyon ile tatlı peynir suyundan elde ettikleri alfa-laktalbumin fraksiyonunun saflaştırılmasında triptik sindirimin (tripsin hidrolizi) etkisini araştırmışlardır. Bu yöntemle %93 saflıkta alfa-laktalbumin elde etmişlerdir.

4.2.6 Nanotüp eldesi

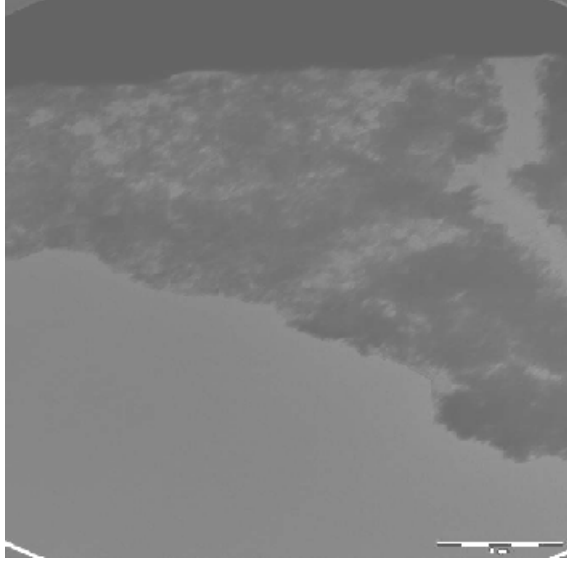
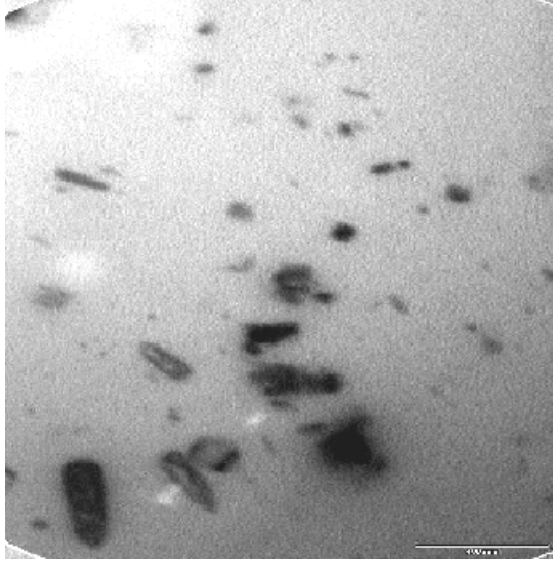
Konsantre peynir altı suyundan izole edilen alfa-laktalbumin molekülünden nanotüp eldesi Şekil 3.2.4.1'e göre gerçekleştirilmiştir. Nanotüp oluşumu üzerine inkübasyon süresi ve Ca^{+2} konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. Farklı işlem koşullarında elde edilen nanotüpler Şekil 4.2.6.1., 4.2.6.2., 4.2.6.3. ve 4.2.6.4.'de görülmektedir.

Nanotüp eldesi için, inkübasyon süresi 20 saat, mol kalsiyum/ mol alfa-laktalbumin oranı 2.263 olan denemede alfa-laktalbumin nanotüpleri gözlenmiştir (Şekil 4.2.6.1.). Mol kalsiyum/ mol alfa-laktalbumin oranı 3 ve inkübasyon süresi 48 saat olan örneklerde ve mol kalsiyum/ mol alfa-laktalbumin oranı 4 ve inkübasyon süresi 48 saat olan örneklerde, protein agregatlarının oluştuğu ve nanotüp oluşmadığı saptanmıştır. Bu sonucun, farklı Ca^{+2} konsantrasyonları ve inkübasyon süresinin, nanotüp oluşumunu etkilemesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Benzer olarak Graveland-Bikker, (2005) çalışmasında, farklı

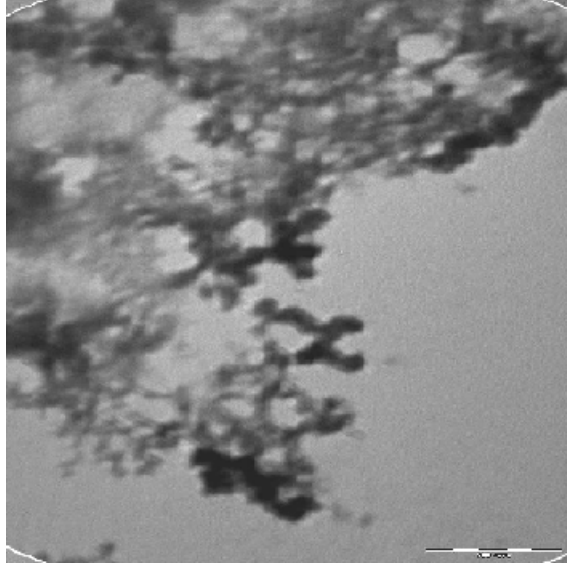
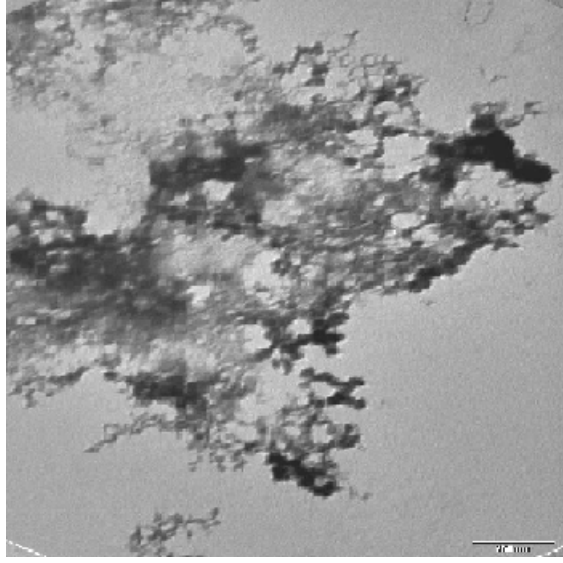
kalsiyum konsantrasyonlarının nanotüp oluşumuna etkisini incelemiştir. Kalsiyum konsantrasyonu arttıkça kendiliğinden montaj kinetiğinin arttığı ancak, jelleşme süresinin azaldığı görülmüştür. R=1.5 mol Ca/ mol alfa-laktalbumin’de gelişigüzel yapıda, bulanık jeller oluşurken, R=1.5-6 mol Ca/mol alfa-laktalbumin arasında ince lifli ağısı yapıdaki tüplerden oluşan yarı saydam jel yapı ortaya çıkmıştır. Daha yüksek kalsiyum konsantrasyonlarının ise, tübüler yapının oluşumunda olumsuz etki gösterdiği, amorf yapının oluştuğu saptanmıştır.



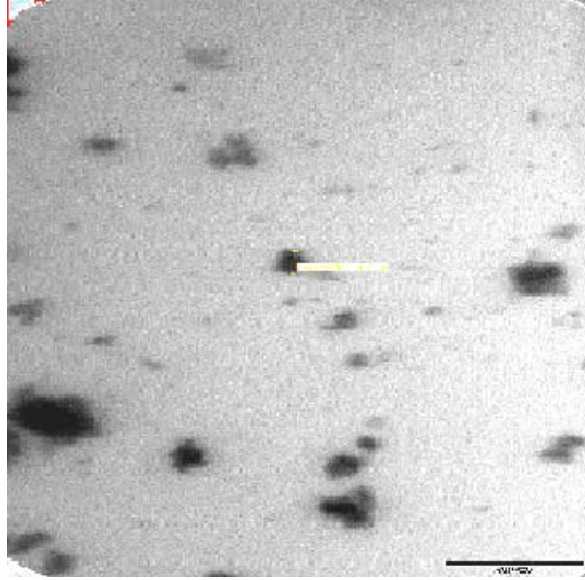
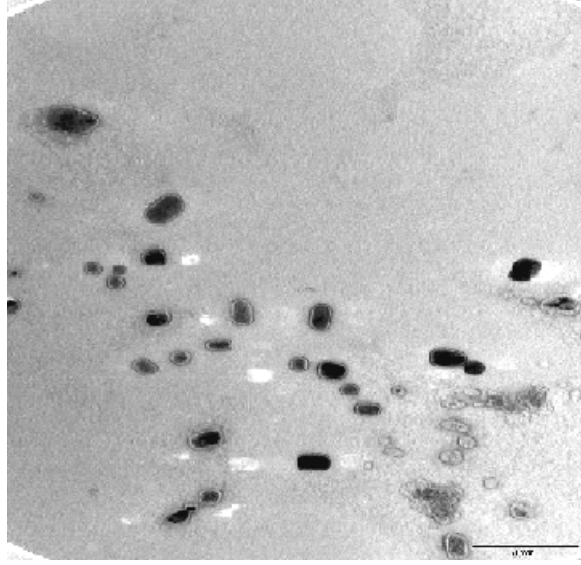
Şekil 4.2.6.1. İnkübasyon süresi 20 saat, mol kalsiyum / mol alfa-laktalbumin oranı 2.263 koşullarında elde edilen ve -40 °C’de depolanan örneklerdeki alfa-laktalbumin nanotüpleri



Şekil 4.2.6.2. İnkübasyon süresi 20 saat, mol kalsiyum / mol alfa-laktalbumin oranı 2.263 koşullarında elde edilen ve liyofilize olarak depolanan örneklerdeki alfa-laktalbumin nanotüpleri



Şekil 4.2.6.3. İnkübasyon süresi 48 saat, mol kalsiyum / mol alfa-laktalbumin oranı 3 ve liyofilize olarak depolanan örneklerdeki protein agregatları



Şekil. 4.2.6.4. İnkübasyon süresi 48 saat, mol kalsiyum / mol alfa-laktalbumin oranı 4 ve -40 °C’de depolanan örneklerdeki protein agregatları

4.2.7 Nanopartikül oluşumu, enkapsülasyon kapasitesi ve enkapsüle Brilliant Blue (BB) molekülünün *in vitro* koşullarda geri salınımı

Peynir altı suyundan ultrafiltrasyonla elde edilen 10 kDa<MA<30 kDa fraksiyonu alfa-laktalbumin nanopartiküllerinin oluşturulmasında kullanılmıştır. Alfa-laktalbumin nanopartiküllerinin enkapsülasyon kapasitesi ve model gastro-intestinal sistemdeki davranışı incelenmiştir. Nanopartiküllerin model molekül Brilliant Blue için elde edilen enkapsülasyon kapasiteleri ve BB molekülünün *in vitro* koşullarda geri salınımı Çizelge 4.2.7.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2.7.1. Alfa-laktalbumin nanopartiküllerin model molekül Brilliant Blue için elde edilen enkapsülasyon kapasiteleri ve *in vitro* koşullarda geri salınımı

Peynir altı suyu fraksiyonu	Enkapsülasyon kapasitesi (%)	<i>In vitro</i> salınım (%)
10 kDa <MA<30 kDa	86.076 ± 2.87 ^a	42.49 ± 10.18 ^a

^a : Ortalama ± SD

Alfa-laktalbumin nanopartiküllerinin enkapsülasyon kapasitesi %86.076 ± 2.87 olarak saptanmıştır. Model gastro- intestinal sistemde BB molekülünün % 42.49'unun ortama geri salındığı belirlenmiştir. Alfa-laktalbumin nanopartiküllerinin eldesi konusunda daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Çözündürülme işlemi (desolvation process) esas alınarak çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada insan serum albumini kullanarak nanopartikül oluşturma prosesinin optimizasyonu üzerine çalışılmıştır (Dreis et al., 2003). Başka bir çalışmada ise, insan serum albumininden (HSA) çözündürme işlemi ile nanopartikül hazırlanmış ve enzimatik degradasyon incelenmiştir (Langer et al., 2008). Langer et al., (2003) yaptıkları çalışmada, insan serum albumini (HSA) ile çözündürülme işlemi kullanılarak nanopartikül yapılmıştır. Bu çalışmada pH, ethanol ekleme hızı, HSA konsantrasyonu, glutraldehit konsantrasyonu, tampon konsantrasyonunun HSA zeta potansiyeli ve partikül çapı üzerine etkileri incelenmiştir. Chen et al., (2005) yaptıkları çalışmada, beta-laktoglobulin nanopartikülüne, model molekül olarak Brilliant Blue enkapsülasyonu ve *in vitro* sindirilirliği uygulamışlardır. Denature beta-laktoglobulinin enkapsülasyon kapasitesi % 22.3 olarak hesaplanmıştır. *In vitro* sindirilirliği incelendiğinde, Brilliant Blue molekülünün, sindirim enzimlerinin

bulunmadığı durumda, mide koşullarında % 25.6'sının, bağırsak koşullarında % 57.8'nin, ortama enzimler eklendikten 6 saat sonra ise; % 42.7'sinin geri salındığı saptanmıştır.

Alfa-laktalbuminle yaptığımız çalışmada ise, enkapsülasyon kapasitesi beta-laktoglobuline göre daha yüksek, *in vitro* sindirilirliğinin ise beta-laktoglobulin ile elde edilen verilere benzer olduğu görülmektedir.

Ankola et al., (2007) yaptıkları çalışmada, poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) emülsiyonu olarak hazırlanan nanopartikül içerisine, Koenzim Q10 enkapsüle etmiş ve verimi % 61-83 olarak saptanmıştır. Koenzim Q10'in karboksimetil selüloz (CMC) içerisinde süspansiyon halinde, bağırsak tarafından tutulması, erkek Sprague-Dawley (SD) sıçanlarında çalışılmış ve % 45, % 75, % 79 olarak hesaplanmıştır.

Dreis et al., (2007) yaptıkları çalışmada, insan serum albumini (HSA) nanopartiküllerine, doxorubicin yükleyerek, ilaç etkinliğini araştırmışlardır. Doxorubicin yükleme kapasitesi %70-95 arasında değişirken, doxorubicin yüklü nanopartiküllerin anti-kanser etkisinin, doxorubicinle karşılaştırıldığında arttığı saptanmıştır.

Literatürde alfa-laktalbumin nanopartiküllerinin sindirim sistemindeki davranışıyla ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Ancak, daha önce yapılan bir çalışmada, bir peynir altı suyu proteini olan beta-laktoglobulin nanopartikülleri ve kitozanla çalışılmış ve beta-laktoglobulinin mide koşullarında sindirimden etkilenmediği, ince bağırsağa geçtiği, degrade olduğu ve taşıdığı biyoaktif bileşenlerin biyoyararlılığının arttığı *in vitro* koşullarda belirlenmiştir (Chen et al., 2006).

5. SONUÇ

21. yüzyılın önemli üretim teknolojilerinden biri olan nanoteknolojinin uygulama alanları arasında gıda endüstrisi, en az yoğunluğa sahip alanı oluşturmaktadır. Nanoteknolojinin gıda alanındaki uygulamalarının henüz bebeklik döneminde olduğu vurgulanmaktadır. Bu nedenle gıda alanında nanoteknoloji uygulamalarına yönelik yapılacak bilimsel araştırmalara büyük ölçüde gereksinim duyulmaktadır.

Çalışmada, viskozite artırıcı, jelleşme sağlayıcı ve enkapsülasyon ajanı olarak kullanılabilecek olan alfa-laktalbumin nanotüplerinin peynir altı suyundan eldesi ve alfa-laktalbumin nanopartiküllerinin nanoenkapsülasyon kapasitesi ile *in vitro* sindirim sırasındaki davranışları incelenmiştir.

Bu amaçla, ilk olarak peynir altı suyunun protein miktarı ($8.9 \text{ g/l} \pm 0.01$) saptanmıştır. Peynir altı suyunun jel elektroforezi ile analizi sonucunda yapısında alfa-laktalbumin, beta-laktoglobulin ve sığır serum albumini proteinlerinin varlığı ortaya konmuştur.

En fazla protein verimi sağlayacak çöktürme yönteminin saptanması amacıyla 3 farklı çöktürme yöntemi uygulanmış ve izoelektrik noktada çöktürme, iyonik şiddeti artırarak çöktürme (%80 doyumlukta) ve izoelektrik noktada iyonik şiddeti artırarak çöktürme (% 80 doyumlukta) yöntemleri ile elde edilen protein verimlerinin benzer olduğu saptanmıştır ($p > 0.05$). Bu yöntemler arasında en yüksek protein verimi izoelektrik noktada %35 doyumlukta tuz konsantrasyonu ile iyonik şiddeti artırma yöntemiyle elde edilmiştir ($p < 0.05$). Çalışmada, izoelektrik noktada iyonik şiddeti artırarak yapılan çöktürme yöntemlerinde (%35 ve %80 doyumlukta) elde edilen fraksiyonun protein içeriği ise sırasıyla %20.46 ve %14.07 olarak saptanmıştır. İÇ ve İAÇ yöntemi ile elde edilen diyalizatlarda sığır serum albumini, beta-laktoglobulin ve alfa-laktalbumin fraksiyonları, İİAÇ yöntemi ile elde edilen diyalizatta ise sadece alfa-laktalbumin fraksiyonu belirlenmiştir. SDS-Page jel elektroforez sonuçları nanotüp elde etmede en uygun protein çöktürme yönteminin İİAÇ (% 80 doyumlukta) olduğunu göstermiştir.

İzoelektrik noktada çöktürme, izoelektrik noktada iyonik şiddeti artırarak çöktürme (%35 ve %80 doyumlukta) yöntemleri ile elde edilen diyalizatlardan alfa laktalbumini saflaştırmak amacıyla uygulanan jel filtrasyon kromatografisi ile

alınan fraksiyonların protein konsantrasyonlarının nanotüp yapımı için gerekli protein konsantrasyonunun 28 g/l 'nin altında olduğu belirlenmiştir. Protein konsantrasyonunu artırmak amacıyla peynir suyuna ultrafiltrasyon uygulanmış ve örneğin protein konsantrasyonu 10.49 kat arttırılmıştır. Molekül ağırlığı MA < 10 kDa ile 10 kDa<MA< 30 kDa olan iki fraksiyondan alfa-laktalbumin izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. Ultrafiltrasyon sonrasında elde edilen 10 kDa<MA< 30 kDa fraksiyonuna peynir altı suyuna uygulanan protein çöktürme yöntemleri uygulanmıştır. SDS-Page analizi sadece alfa laktalbumin piki veren çöktürme yönteminin izoelektrik noktada iyonik şiddeti arttırarak (% 80 doygunlukta) uygulanan yöntem olduğunu göstermiştir. Bu yöntemle elde edilen alfa-laktalbuminden nanotüp elde etmek için farklı inkübasyon süresi ve mol kalsiyum / mol alfa-laktalbumin oranı denenmiştir. İnkübasyon süresi 20 saat ve mol kalsiyum/ mol alfa-laktalbumin oranı 2.263 olan kombinasyonda alfa-laktalbumin nanotüplerinin oluştuğu gözlenmiştir.

Peynir altı suyundan ultrafiltrasyonla elde edilen 10 kDa <MA<30 kDa fraksiyonu kullanarak oluşturulan alfa-laktalbumin nanopartiküllerinin enkapsülasyon kapasitesi ve model gastrointestinal sistemdeki davranışı incelendiğinde, enkapsülasyon kapasitesinin % 86.076 ± 2.87 olduğu, *in vitro* sindirim sisteminde Brilliant Blue molekülünün % 42.49 ± 10.18 'nun sindirim enzimlerinin aktivitesi sonucu ortama geri salındığı saptanmıştır.

Bu çalışmanın sonucunda,

- Nanotüp yapımında jelleşme ajanı olarak kullanılan *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen proteaza (BLP) alternatif olarak, ticari Alkalaz enziminin kullanılabileceği belirlenmiştir.

- Elde edilen alfa-laktalbumin nanopartiküllerinin, fonksiyonel bileşenlerin enkapsülasyonunda kullanılabileceği belirlenmiştir.

- Alfa-laktalbumin nanopartikülleri ile gerçekleştirilen nanaoenkapsülasyonun, yöntemle göre değişmekle birlikte yaklaşık %80 verimle elde edilen mikroenkapsüle materyallere (Chen et al., 2006) alternatif oluşturacağı ortaya konmuştur.

- Elde edilen nanotüp ve nanopartiküllerin kaynağı, süt proteini olduğu için, toksik etki yaratma riskinin düşük olacağı öngörüsünden hareketle gıda endüstrisinde çeşitli amaçlar için (jelleşme ajanı, nanoenkapsülasyon, nanotüp vb.) kullanım potansiyeline sahip oldukları belirlenmiştir.

6. ÖNERİLER:

Bu sonuçlar ışığında, daha sonraki çalışmaların;

- Ticari enzimle üretilen alfa-laktalbumin nanotüplerinin jel özelliklerinin incelenmesi,
- Fonksiyonel bileşenlerin nanoenkapsülasyonunda, alfa-laktalbumin nanopartiküllerinin kullanım olanağı araştırılması,
- Alfa-laktalbuminden elde edilen nanopartikül ve nanotüplerin toksik etkilerinin araştırılması, üzerinde yoğunlaşması önerilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Almecija, M.C., Ibanez, R., Guadiv, A. And Guadix, E.M.,** 2007, Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane, *Journal of Membrane Science*, 288:28-35.
- Alomirah, H.F. and Alli, I.,** 2004, Separation and characterization of β -lactoglobulin and α -lactalbumin from whey and whey protein preparations, *International Dairy Journal*, 14:411-419.
- Ankola, D.D., Viswanad, B., Bhardwaj, V., Ramarao, P. And Kumar, M.N.V.R.,** 2007, Development of potent oral nanoparticle formulation of coenzyme Q10 for treatment of hypertension: Can the simple nutritional supplements be used as the first line therapeutic agents for prophylaxis/therapy?, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67:361-369.
- Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M.Y., Hagens, W.I., Bulder, A.S., de Heer, C., ten Voorde, E.C.G., Wijnhoven, S.W.P., Marvin, H.J.P. and Sips, A.J.A.M,** 2009, Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 53:52-62.
- Boyer, R.,** 2000, *Modern Experimental Biochemistry*, Longman, San Francisco, 257-277.
- Chatterton, D.E.W., Smithers, G., Roupas, P. and Bradkorb, A.,** 2006, Bioactivity of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin-Technological implications for processing, *International Dairy Journal*, 16:1229-1240.
- Chau, C-F., Wu, S-H., and Yen, G-C.,** 2007, The development of regulations for food nanotechnology, *Trends in Food Science & Technology*, 18:269-280.
- Chen L. And Subirade, M.,** 2005, Chitosan/ β -lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers, *Biomaterials*, 26:6041-6053.
- Chen L., Remondetto, G.E. and Subirade, M.,** 2006, Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems, *Trends in Food Science & Technology*, 17:272-283.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dreis, S., Rothweiler F., Michaelis, M., Cinatl Jr., J., Kreuter, J. and Langer, K. , 2007,** Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 341:207-214.
- Graveland-Bikker, J.F., Ipsen, R., Otte, J. and de Kruif, C.G., 2004,** Influence of calcium on the self-assembly of partially hydrolysed α -lactalbumin, *Langmuir*, 20:6841-6846.
- Graveland-Bikker, J.F,** 2005, Self-assembly of hydrolysed, α -lactalbumin into nanotubes, Doctorate Thesis, University of Utrecht, 160 p.(unpublished)
- Graveland-Bikker, J.F. and de Kruif, C.G., 2006,** Unique milk protein based nanotubes: Food and nanotechnology meet, *Trends in Food Science & Technology*, 17:196-203.
- Graveland-Bikker, J.F., Fritz, G., Glatter, O. and de Kruif, C.G., 2006,** Growth and structure of α -lactalbumin nanotubes, *Journal of Applied Crystallography*, 39:180-184.
- Hahn, R., Schulz, P.M., Schaupp, C. And Jungbauer, A., 1998,** bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography, *Journal of Chromatography A*, 795:277-287
- Haris, E.L.V. and Angal, S., 1995,** Protein purification methods, apractical approach, Oxford University Press, Oxford, 317 p.
- Ipsen, R. And Otte, J., 2007,** Self-assembly of partially hydrolysed α -lactalbumin, *Biotechnology Advances*, 25:602-605.
- Kamizake, N.K.K., Gonçalves, M.M., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M., 2003,** Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comperative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods, *Journal of Food Composition and Analysis*, 16:507-516.
- Karakaya, S., 2007,** Gıda endüstrisinde beslenme ve nanoteknoloji uygulamalar, *Hasad Gıda*, 270:6-8.
- Konrad, G. and Kleinschmidt, T., 2008,** A new method for isolation of native α -lactalbumin from sweet whey, *international Dairy Journal*, 18:47-54.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., von Briesen, H. And Schubert, D.**, 2003, optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 257:169-180.
- Langer, K., Anhorn, M.G., Steinhauser, I., Dreis, S., Celebi, D., Schrickel, N., Faust, S. and Vogel, V.**, 2008, Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation, *International Journal of Pharmaceutics*, 347:109-117.
- Lucena, M.E., Alvarez, S., Menedez, C., Riera, F.A. and Alvarez R.**, 2007, α -lactalbumin precipitation from commercial whey protein concentrates, *Separation and Purification Technology*, 52:446-453.
- Metin, M.**, 1999, Süt teknolojisi 1: Sütün bileşimi ve işlenmesi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, genişl. 3. baskı, İzmir, 793 s.
- Metin, M.**, 2008, Sütün Yapısı ve Özellikleri, Ege Üniversitesi Basımevi, 1.baskı, İzmir, 216 s.
- Muller, A., Daufin G. and Chaufer, B.**, 1999, Ultrafiltration modes of operation for the separation of α -lactalbumin from acid casein whey, *Journal of Membrane Science*, 153:9-21.
- Neyestani, T.R., Djalali, M. and Pezeshki, M.**, 2003, Isolation of α -lactalbumin, β -lactoglobulin, and bovine serum albumin from cow's milk using gel filtration and anion-exchange chromatography including evaluation of their antigenicity, *Protein Expression and Purification*, 29:202-208.
- Rajagopal, K. and Schneider, J.P.**, 2004, Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications, *Current Opinion in Structural Biology*, 14:480-486.
- Schlatterer, B., Baeker, R., and Schlatterer, K.**, 2004, Improved purification of β -lactoglobulin from acid whey by means of ceramic hydroxyapatite chromatography with sodium fluoride as a displacer, *Journal of Chromatography B*, 807:223-228.
- Smithers, G.W.**, 2008, Whey and whey proteins- From "gutter-to-gold", *International Dairy Journal*, 18:695-704.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Ulusal Nanoteknoloji Merkezi, [2009], Past and future of UNAM,
<http://www.nano.org.tr/history.html> (Erişim tarihi: 03.09.2009)

ÖZGEÇMİŞ

03.11.1981 tarihinde Karabük'te doğan Nihan BAŞ, ilköğrenimini İstanbul Erenköy İlkokulu'nda tamamladıktan sonra, öğrenimine Özel Doğuş Lisesi ve Bostancı Şenesenevler Lisesi'nde devam etmiştir. 1999 yılında, Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde okumaya hak kazanmış ve 2004 yılında lisans eğitimini başarıyla tamamlamıştır. Yaklaşık 3 yıl özel sektörde Kalite ve Üretim Departmanları'nda yönetici olarak çalıştıktan sonra, 2007 yılında Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda, yüksek lisans programına kayıt olmuştur.