

Antifiriz Proteinler ve Gıda Teknolojisinde Kullanımı

Ayşe Aşçı, Emine Mine Çomak Göçer, Ahmet Küçükçetin*

Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

Geliş Tarihi (Received): 03.11.2011, Kabul Tarihi (Accepted): 24.12.2011

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): kucukcetin@akdeniz.edu.tr (A. Küçükçetin)

☎ 0 242 310 65 69 📠 0 242 227 45 65

ÖZET

İlk kez Antarktika sularında yaşayan Notothenioid'lerde varlığı gösterilen antifiriz proteinler alanin-alanin-threonin-galaktozil-N-asetilgalaktozamin birimlerinin tekrarlanması ile meydana gelen glikopeptit bir yapıdır. Bu proteinler hidroksil ve karbonil grupları ile buz kristallerine bağlanarak donma olayını engellemekte ve buz kristallerinin gelişimini modifiye etmektedir. Antifiriz proteinler yapısal olarak belirgin farklılıklar göstermekte olup, bakterilerde, böceklerde, bitkilerde ve balıklarda olmak üzere çeşitli organizmalarda bulunmaktadır. Bununla beraber, antifiriz proteinlerin buldukları çözümlerin donma noktalarını baskılama, donma ve erime sırasında rekristalizasyonu inhibe etme, buz nükleatörlerinin etkilerini nötralize etme gibi özellikleri bu proteinlerin gıdaların soğukta depolanmasında doğal buz modülatörleri olarak kullanımına olanak sağlamaktadır. Antifiriz proteinlerin bu özellikleri dondurulmuş et, balık, meyve ve sebze kalitesinin korunmasına ve depolama ve dağıtım süresince dondurmada düzgün yapının muhafaza edilmesine yardımcı olabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antifiriz proteinler, Termal histerizis, Rekristalizasyon inhibisyonu, Buz nükleasyonu, Dondurulmuş gıdalar

Antifreeze Proteins and Their Use in Food Technology

ABSTRACT

The antifreeze proteins were first identified in the Notothenioid in the Antarctic Ocean, and consist of a repeated glycopeptide, Ala-Ala-Thr-galactosyl-N-acetyl galactosamine units. Hydroxyl and carbonly groups of these proteins can bind to ice crystals, which in turn can prevent freezing and modify the growth of ice crystals. Antifreeze proteins show a great diversity in their structure, and they are identified in a variety of organisms including bacteria, insects, plants and fish. In addition to the ability of antifreeze proteins to depress freezing points of solutions, they can inhibit recrystallization during freezing and thawing, and neutralize the effects of ice nucleators. Therefore, antifreeze proteins can be potentially used as natural ice modulators in the cold storage of foods. These properties of antifreeze proteins could help to preserve the quality of frozen meat, fish, fruit and vegetables and smooth textures in ice cream during storage and distribution.

Key Words: Antifreeze proteins, Thermal hysteresis, Recrystallization inhibition, Ice nucleation, Frozen foods

GİRİŞ

Sıfırın altındaki sıcaklık derecelerinde yaşayan pek çok canlı, vücut sıvılarının donması ile hücrelerinde meydana gelebilecek dönüşümü olmayan zararlı etkileri önlemek amacıyla buz kristallerinin oluşumunu ve gelişimini kontrol edebilen mekanizmalar geliştirmiştir.

Bu mekanizmalar, uyum sağlanmadığı takdirde kendileri için ölümcül hale gelebilecek çevre koşullarındaki canlıların yaşamasına olanak sağlamaktadır. Buz kristallerinin gelişimini kontrol edebilmek amacı ile canlılar tarafından belirli proteinlerin sentezlenmesi, söz konusu mekanizmalardan biridir. Balıklar, böcekler, yosunlar ve bakteriler gibi 200'den

fazla canlı, antifiriz proteinler olarak adlandırılan proteinleri sentezleyebilmektedir. Kutuplarda yaşayan balıklar aşırı soğuk sulara vücutlarının donmasını önlemek ve canlılıklarını sürdürebilmek için, kanlarında oluşabilecek herhangi bir buz kristalinin gelişimini engelleyebilen antifiriz proteinleri sentezleyebilmektedir. Benzer şekilde, aşırı soğuk ortamlarda yaşayabilen böceklerde de bulunan antifiriz proteinlerin ana fonksiyonu, vücut sıvısının erime noktasını belirgin bir şekilde değiştirmeksizin donma noktasını düşürmektir. Bu nedenle söz konusu bu proteinler "termal histerizis proteinler" olarak adlandırılabilir. Sıfırın altındaki sıcaklık derecelerinde yaşayan bitkiler, donma olayının zararlı etkilerinden korunmak için antifiriz proteinleri sentezleyerek soğuğa karşı tolerans stratejisi geliştirmiştir. Antifiriz proteinlerin bitkilerdeki fonksiyonu, oluşan buz kristallerini olabildiğince küçük tutarak bitkinin hücresel yapısının bozulmasını önlemektir. Bu nedenle antifiriz proteinler, "buz kristallerinin gelişimini kontrol eden proteinler" ya da "buz gelişimi inhibisyon bileşenleri" olarak da adlandırılabilir [1]. Ancak antifiriz proteinlerin tümünün donma olayını değil de buz kristallerinin gelişimini engellediğinin belirlenmesi üzerine; görevlerinin hem daha doğru bir şekilde ifade edilebilmesi hem de otomotiv sektöründe kullanılan antifiriz (etilen glikol) ile aralarındaki farkın net bir şekilde ortaya konulabilmesi için bu proteinlerin "buz şekillendirici protein" olarak adlandırılması önerilmiştir [2].

Antifiriz proteinler ve glikoproteinler ilk olarak Antarktika sularında yaşayan balıklarda vücut sıvısının donma noktasını baskılayabilen ajanlar olarak tanımlanmıştır [3]. Bu proteinler, plazmanın ozmotik basıncını arttırmaksızın, balık kanının donma noktasının (buz kristallerinin oluşum sıcaklığı) deniz suyunun donma noktasının altına düşmesini sağlamaktadır. Kutuplarda yaşayan balıklar dışında sıfırın altındaki sıcaklık derecelerinde yaşayan böcekler, bitkiler, yosunlar ve bakterilerde de bulunan antifiriz proteinlerin ortak özelliği buz kristallerinin gelişimini modifiye veya inhibe etmektir [4]. Antifiriz proteinlerin buz kristallerinin gelişimini kontrol edebilme yeteneği bu proteinlerin tıp, gıda ve çeşitli ticari alanlarda kullanılmasına olanak sağlamıştır. Son yıllarda, antifiriz proteinlerin yapısı, fonksiyonel özellikleri ve kullanım alanları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Bu derlemede, antifiriz proteinlerin yapısı, fonksiyonel özellikleri, çeşitleri ve gıdalarda kullanımı üzerinde durulmuştur.

ANTİFİRİZ PROTEİNLERİN YAPISI ve FONKSİYONLARI

İlk kez Antarktika sularında yaşayan Notothenioid'lerde varlığı gösterilen antifiriz proteinler, her biri üç amino asitlik bir peptit zincirinin üçüncü amino asidine kovalent bağlarla bağlanmış bir disakkarit molekülünden oluşan birimlerin (alanin-alanin-threonin-galaktozil-N-asetilgalaktozamin) tekrarlanması ile meydana gelmektedir [2]. Glikopeptitler olarak bilinen antifiriz moleküller kendini tekrarlayan alt birimlerden oluşmakta ve molekül ağırlıklarına göre sınıflandırılmaktadır. Antifiriz proteinlerin molekül ağırlık aralığı oldukça geniş olup, 2.5 kDa ile 36 kDa arasında değişmektedir.

Antifiriz proteinlerin molekül ağırlıkları arttıkça antifiriz etkilerinin de arttığı bildirilmektedir [2, 4].

Antifiriz proteinler genel bir moleküler yapıya sahip olmamakla beraber balıklarda beş farklı antifiriz protein [antifiriz glikoprotein (AFGP), Tip I antifiriz protein (AFP), Tip II AFP, Tip III AFP ve Tip IV AFP] belirlenirken; böceklerde, yosunlarda ve bakterilerde de çeşitli antifiriz proteinler tanımlanmıştır. Antifiriz proteinler heliks, globüler ve barrel dizilimlere sahip yapılardır [1]. Bu proteinler yapısal olarak birbirlerinden farklı olmalarına rağmen, görevleri ve buz kristaline bağlanma özellikleri bakımından birbirine benzemektedir [5].

Tip I antifiriz proteinleri, pisi balıklarından *Pseudopleuronectes americanus* ile *Limanda ferruginea* ve iskorpit balıklarından *Myoxocephalus scorpius* ile *Myoxocephalus aeneus*'ta bulunmaktadır. Tip I antifiriz proteinlerinin birincil yapısı kararlı sarmal yapıda olup, alanince zengin birbirini tekrarlayan toplam 11 amino asitten meydana gelmiştir. Bu proteinlerin ikincil yapısı; basit, uzun ampifatik (bir molekülün yapısında hem hidrofobik hem de hidrofilik grubun bulunması) alfa sarmaldır. Tip I antifiriz proteinler yaklaşık olarak 3.3-4.5 kDa molekül ağırlığındadır. Tip I antifiriz proteinlerin üçüncül yapısının tamamı sarmaldır. Balıklarda bulunan antifiriz proteinlerinin büyük bir bölümü Tip II antifiriz proteinler grubuna girmekte olup, iskorpit balıklarından *Hemirapterus americanus*, gümüş balıklarından *Osmerus mordax* ve Ringa balıklarından *Clupea harengus harengus*'ta bulunmaktadır. Baskın amino asidi alanin olan bu tip proteinler, sistein bakımından da zengin globüler yapıdaki proteinlerdir. Tip II antifiriz proteinlerin molekül ağırlıkları 11-24 kDa arasında değişmektedir. Hem kuzey kutbunda hem de Antarktika'da yaşayan ve bir kaya balığı olan *Macrozoarces americanus* ve bir kurt balığı olan *Anarhichas lupus*'ta bulunan Tip III antifiriz proteinlerinin molekül ağırlıkları yaklaşık 6 kDa'dur. Globüler yapıdaki bu proteinler herhangi bir amino asit tarafından baskılanmamaktadır. Tip III antifiriz proteinlerin birincil yapısı genel antifiriz protein yapısında olup Tip I antifiriz proteine benzer özelliktedir. Bu antifiriz proteinlerin ikincil yapısı ise β -sandviç modelde olup, üçüncül yapısı bilinmemektedir [2, 6]. Tip IV antifiriz proteini; uzun boynuzlu iskorpit plazmasında tespit edilmiş, alfa sarmal yapıda ve glutamat ile glutamin amino asitleri bakımından zengin bir glikoproteindir [7]. Bu proteinlerin diğer yapıları ise tam olarak bilinmemektedir [5]. Böcek antifiriz proteini yüksek termal histerizis aktivitesine sahip olup, bu protein Tip V antifiriz proteini olarak da adlandırılabilir [2]. Bitki antifiriz proteinleri; acitattı tilki üzümü (*Solanum dulcamara*), kış çavdarı (*Secale cereale*) ve havuç (*Daucus carota*) gibi bitkilerden izole edilmiştir [8]. Bitki antifiriz proteinleri böceklerde ve balıklarda bulunan antifiriz proteinlere göre daha zayıf termal histerizis aktivitesine sahip olma, ana fonksiyonları buz oluşumunu önleme yerine buz rekristalizasyonunu inhibe etme ve patogenez (bir hastalığın esası ve gelişimi) ilişkili proteinler olma gibi özellikleri ile böcek ve balıklarda bulunan antifiriz proteinlerden farklılık göstermektedir. Bitki antifiriz proteinleri antifungal aktiviteye de sahip olabilmektedir. Ayrıca, patogenez ilişkili proteinler olma özellikleri ile

bitkinin psikrofilik patojenlere karşı korunmasını da sağlamaktadır [9].

Antifiriz proteinlerin ortak özelliği buz kristallerini direkt olarak bağlamalarıdır. Buza bağlanma mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, buz kristali kafesine bağlandıkları yüzeylerin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar olduğu bildirilmektedir [10]. Antifiriz proteinler, sıfırın altındaki sıcaklık derecelerinde yaşayan organizmaların yaşamsal mekanizmalarına katkıda bulunan üç önemli fonksiyona sahiptir. Bu fonksiyonlar; "termal histerizis", "buz rekristalizasyonunun inhibisyonu" ve "buz nükleatörleri ile etkileşim"dir [11].

Termal Histerizis

Şeker, tuz ve etilen glikol gibi çözeltiler, çözünen madde türü dikkate alınmaksızın çözeltide bulunan mevcut moleküllerin sayısına bağlı olarak çözeltinin erime ve donma noktalarını koligatif olarak düşürmektedir. Buna karşın, antifiriz protein çözeltilerinde farklı bir davranış gözlemlenmiştir. %0.1'den yüksek konsantrasyonlarda, buz kristallerinin oluşmaya başladığı donma noktası düşerken, erime noktasında belirgin bir değişiklik olmadığı belirtilmektedir. Termal histerizis olarak bilinen bu etki, molar bazda koligatif mekanizmadan 500 kat daha etkili olmaktadır [1,12]. Donma ve erime noktaları arasında oluşan histerizisin mevcudiyeti ise bu mekanizmanın koligatif olmadığını göstermektedir. Çünkü bu mekanizma koligatif özellikte olan bir mekanizma olsaydı, donma ve erime noktaları arasında herhangi bir fark olmaması gerekmekeydi [6]. Erime ve donma noktaları arasındaki fark histerizis boşluğu, buzun oluşmaya başladığı sıcaklık derecesi histerizis donma noktası, erime noktası ve histerizis donma noktası arasındaki sayısal fark ise histerizis aktivitesi olarak ifade edilmektedir [13]. Antifiriz proteinlerin termal histerizis aktivite ve histerizis değerleri arasında belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Bazı böcek antifiriz proteinlerinin, molar bazda balık antifiriz proteinlerinden 100 kat daha aktif olduğu bildirilmektedir [11]. Kutup balıklarında ve bitkilerde maksimum histerizis değeri sırasıyla 0.7-1.5°C ve 0.2-0.5°C aralığında değişir iken, böcekler 6°C'den daha yüksek histerizis değerine sahiptir [14, 15].

Buz Rekristalizasyonunun İnhibisyonu

Rekristalizasyon; sürekli buz fazı hacminde büyük buz kristallerinin oluştuğu, küçük buz kristallerinin ise kaybolduğu bir süreçtir. Büyük buz kristallerinin oluşumu, dokularda ve hücrelerde dönüşümü olmayan fiziksel zararlara yol açabilmektedir. Rekristalizasyon olayı donma noktasının altındaki sıcaklık derecelerinde daha hızlı meydana gelmektedir. Ortam sıcaklığı, sıfırın altındaki sıcaklık derecelerinde dalgalandığında buz rekristalize olmaktadır [16]. Antifiriz proteinler, küçük buz kristallerine bağlanarak buzun gelişimini ve rekristalizasyonunu inhibe etmektedir [17]. Antifiriz proteinlerin aşırı düşük konsantrasyonları (100 µg/L) buz rekristalizasyonu için etkili olurken, söz konusu konsantrasyonlar termal histerizise neden olmak için oldukça düşüktür. Rekristalizasyon inhibisyonunun; antifiriz glikoproteinlerinin, Tip I antifiriz proteinlerinin,

böcek ve bitki antifiriz proteinlerinin mevcudiyetinde meydana geldiği bildirilmektedir [16]. Böcek antifiriz proteinleri buz kristallerinin inhibisyonunda, balık ve bitki antifiriz proteinlerinden daha yüksek aktivite göstermektedir [18].

Buz Nükleatörleri ile Etkileşim

Buz nükleasyon proteinleri, donma sıcaklıklarında buz kristal yüzey yapısını taklit ederek ve buz kristal çekirdeği gibi ya da heterojen buz çekirdeği gibi davranarak buz oluşumunu teşvik etmektedir. Buz nükleasyon proteinlerinin antifiriz proteinler ile interaksyonu, donma tolerans mekanizmalarından biridir. Antifiriz proteinlerin buz nükleatörlerine bağlanarak onları inaktive ettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Parody Morraela ve ark. [19] yaptıkları bir çalışmada antifiriz proteinlerin bakteriyel buz nükleasyon proteinlerini inaktive ettiğini tespit etmişlerdir. Antifiriz proteinlerin ve buz nükleasyon proteinlerinin varsayılan antagonistik aktivitelere rağmen, bu proteinlerin etkileşimlerinin antifiriz aktiviteyi artırıcı yönde etki gösterdiği bildirilmektedir [11].

ANTİFİRİZ PROTEİNLERİN GIDALARDA KULLANIMI

Son yıllarda antifiriz proteinlerin biyoteknoloji, tıp ve dondurulmuş gıdalarda kullanımı üzerine yapılan çalışmalara büyük ilgi duyulmaktadır [20]. Bilimsel literatürde, antifiriz proteinlerin özellikle rekristalizasyon inhibisyon özelliğinin çeşitli alanlarda uygulanabilirliği üzerine araştırmalar bulunmaktadır [12, 16]. Bununla beraber antifiriz proteinlerin gıda işleme teknolojileri alanında ve özellikle dondurarak muhafaza teknolojisinde kullanılmasına yönelik uygulamalar bulunmaktadır. Bu uygulamalarda antifiriz proteinlerin en önemli etki mekanizması, buz rekristalizasyonunu inhibe etmesidir. Dondurma, depolama ve erime işlemleri sırasında buz kristallerinin boyutlarının artması hücre membranlarına zarar verebilmekte ve dondurulmuş ürünlere damlama kaybına sebep olabilmektedir. Bu yüzden rekristalizasyon, dondurulmuş gıdalar ile hücre ve dokuların dondurularak muhafaza edilmesinde gerçekleşmesi istenmeyen bir durumdur [21].

Buz rekristalizasyonu dondurulmuş gıdalarda depolama ve dağıtım aşamalarında ürün kalitesinin düşmesine neden olan en önemli faktörlerden biridir. Her geçen gün tüketimi artan bir ürün olan dondurmanın iyi bir buz kristal yapısına sahip olması, düzgün ve kremi yapısını koruması bakımından önemlidir. Ancak buz rekristalizasyonu, depolama ve taşıma işlemleri sırasında sıcaklık dalgalanmaları olduğu zaman üründe gerçekleşmesi kaçınılmaz bir olaydır. Buz kristalleri ağızda hissedilecek kadar büyüdüğünde dondurma, buzsu ve kumsu bir yapıya sahip olmaktadır. Antifiriz proteinler, dondurmada buz rekristalizasyonunu inhibe ederek dondurmanın düzgün yapısının devamlılığını sağlayabilmektedir [1, 22].

Clarke ve ark. [1] yapmış oldukları bir çalışmada Tip III antifiriz protein içeren ve içermeyen dondurma örneklerinin -10°C ve -20°C arasında 3 haftalık

depolama süresince taramalı elektron mikroskop (SEM) ile elde edilmiş yapı görüntülerini incelemişlerdir. Çalışmada, depolamadan önce örnekler arasındaki buz kristal boyutlarındaki farklılığın çok az; depolamadan sonra ise antifiriz protein içeren örnekteki buz kristallerinin boyutlarının antifiriz protein içermeyen örnekteki nazaran çok daha küçük olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak dondurmaya ait yapı görüntüleri ile antifiriz protein kullanımının dondurmanın depolama şartlarında kalitesinde meydana gelebilecek olumsuzluklara karşı engelleyici bir etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bazı stabilizatörler buz rekristalizasyonunu yavaşlatmalarına rağmen, buz kristalleri üzerindeki etkileri hiçbir şartta antifiriz proteinler kadar iyi değildir. Öte yandan buz rekristalizasyonunun yavaşlatılması stabilizatörlerin dondurmadaki fonksiyonlarından sadece biri olup stabilizatörlerin dondurmada işlenebilirlik ve dondurma viskozitesi üzerine de olumlu etkileri bulunmaktadır. Dolayısıyla antifiriz proteinlerin dondurma yapımında tamamen stabilizatörlerin yerini alması mümkün görülmemektedir [1].

Genelikle hamurun raf ömrünün kısa olması, yaklaşık olarak 1960'lı yıllardan bu yana dondurulmuş hamur üretim teknolojisine olan ilgiyi arttırmıştır. Ancak, bu üretim teknolojisi kullanılarak elde edilen hamurdan yapılan ekmeğin kalitesi ile ilgili çeşitli problemler ortaya çıkmaktadır. Dondurma işlemi hamurun yapısını zayıflatmakta ve ayrıca hamurun CO₂ tutma kapasitesini azaltmaktadır. Bu problemler güçlü buğday unu veya donma toleranslı mayalar kullanılarak çözülmeye çalışılmaktadır. Ayrıca, dondurulmuş hamur üretim teknolojisi ekmeğin fermantasyon süresini uzatmakta ve son ürünün tekstür özelliklerini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Dondurulmuş hamur üretiminde ortaya çıkan söz konusu bu olumsuzluklar, antifiriz proteinler gibi bazı katkı maddelerinin ilavesi ile en aza indirgenebilmektedir. Antifiriz proteinler donma sıcaklığını düşürebilmekte ve hamur içindeki buz rekristalizasyonunu engelleyebilmektedir. Hatta donma sırasında, antifiriz proteinler Ostwald olgunlaşmasını (monomer veya iyon halinde çözeltide bulunan parçacıkların daha büyük parçacık oluşturmak üzere bir araya gelmesi) inhibe edebilmektedir [23].

Havuç antifiriz proteinleri, güçlü anti-rekristalizasyon etkisi ile gıda sanayinde kullanıma potansiyeline sahiptir. Zhang ve ark. [23] yaptıkları bir çalışmada, %18.3 (w/w) oranında havuç antifiriz proteini içeren konsantre havuç proteini, sığır serum albumin ve soya proteini ilavesinin dondurulmuş hamurun fermantasyon kapasitesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, dondurulmuş hamura havuç antifiriz proteini içeren konsantre havuç proteini ilavesinin hamurun CO₂ tutma kapasitesini arttırdığını, mayanın ölüm oranını azalttığını, donma-erime döngüsünü sırasında termal histerizis olayına neden olduğunu ve kristal oluşumunu engellediğini belirlemişlerdir. Ayrıca havuç antifiriz proteini içeren dondurulmuş hamurun sığır serum albumin ve soya proteini ilave edilmiş dondurulmuş hamurlara göre daha güçlü fermantasyon kapasitesine ve daha yüksek CO₂ tutma özelliğine sahip olduğu belirtilmiş olup, havuç antifiriz proteini içeren

dondurulmuş hamurlardan elde edilen ekmeğin kalite bakımından diğer gruplar ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Zhang ve ark. [24] tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise %15.4 (w/w) oranında havuç antifiriz proteini içeren konsantre havuç proteini ilave edilmiş dondurulmuş hamurdan üretilen ekmeğin tekstürel özellikleri ve ekmeğin içi uçucu bileşenleri incelenmiştir. Havuç antifiriz proteini içeren ekmeğin duyu kalitesinin ve tekstür profil analiz sonuçlarının havuç antifiriz proteini içermeyen kontrol örneği ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Dondurulmuş olarak depolama sırasında havuç antifiriz proteini içeren hamur örneğinin dondurulabilir su içeriğinin daha düşük olmasından dolayı kontrol örneğine göre daha yumuşak ve stabil olduğu belirtilmiştir. Havuç antifiriz protein ilavesinin ekmeğin bileşimindeki uçucu bileşenler üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı ve hatta havuç antifiriz proteininin ekmeğe hoş bir aroma kazandırdığı saptanmıştır.

Yapılan farklı bir çalışmada, piyasada mevcut olan bazı gıdalara antifiriz proteini ilave edilip örnekler -80°C'de dondurulmuştur. Antifiriz protein içeren örnekler ve antifiriz protein içermeyen kontrol örnekleri -6°C ile -8°C sıcaklıkları arasında farklı sürelerde depolanmıştır. Depolama süresince ürünlerin rekristalizasyon değişimleri mikroskopik olarak incelenmiştir. 1 saatlik depolama sonucunda antifiriz protein içeren bir örnekte herhangi bir kristal oluşumu gözlemlenmemiş olup bu örneğe ait kontrol örneğinde ise büyük kristallerin oluştuğu belirlenmiştir. Antifiriz protein içeren bir diğer örnekte ise 1 saatlik depolama sonucunda çok az buz kristali oluşumu gözlenirken, bu örneğe ait kontrol örneğinde var olan buz kristalinin boyutunda belirgin bir artış olmadığı bildirilmiştir [12].

Ağızda hissedilebilen kumsuluğa neden olan büyük buz kristallerinin oluşumu dondurulmuş ürünlerde arzu edilmemektedir. Bu nedenle, dondurulmuş ürünlerin yapısında daha küçük buz kristalleri oluşumunu sağlamak için bu ürünlerin üretiminde sertleştirme aşaması olarak bilinen hızlı bir dondurma işlemine gereksinim duyulmaktadır. Yapılan bir çalışmada, dondurulmuş ürünlerin ya da dondurmanın üretiminde antifiriz proteinlerin kullanılmasıyla sertleştirme aşamasına ihtiyaç bulunmadığı tespit edilmiştir [21].

Antifiriz proteinlerin rekristalizasyon inhibisyon özelliğinden dondurulmuş et teknolojisinde de yararlanılabilmektedir. Dondurulmuş et ürünlerinde erime sırasında hücre içinde büyük buz kristallerinin oluşması damlama ve besin kaybına neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada Antarktik morina balığından izole edilen antifiriz glikoproteini kuzulara kesimden önce farklı zaman aralıklarında damardan enjekte edilmiştir. Kesimden sonra et örnekleri vakum altında paketlenmiş ve -20°C'de 2 ile 16 hafta arasında depolanmıştır. Antifiriz glikoproteinler kuzulara kesimden 1 veya 24 saat önce enjekte edildiğinde et örneklerinde kontrol grubuna göre damlama kaybı ile buz kristal boyutunda belirgin bir azalma olduğu belirtilmiştir [22].

Antifiriz proteinlerin gıdalara ilave edilmesinden önce çeşitli ekonomik ve güvenlik faktörlerinin dikkate alınması gerekmektedir. Örneğin sadece 1 mg antifiriz proteini doğal kaynağından elde etmenin 10 Amerikan dolarına mal olduğu ve balık plazmasının her bir litresinden sadece 2 g antifiriz protein elde edilebildiği bildirilmiştir. Ayrıca mevcut dondurma üretiminin tamamında antifiriz proteinlerin kullanılabilmesi için antifiriz protein içeren yaklaşık 150 000 ton balığa ihtiyaç duyulduğu hesaplanmıştır. Konu bu anlamda irdelendiğinde antifiriz proteinlerin gıda endüstrisinde kullanımının ekonomik açıdan ciddi sorunları içerdiği ortadadır. Bununla birlikte antifiriz proteinler, yılın belirli dönemlerinde çevresel şartları sıfırın altındaki sıcaklık derecelerinin oluşturduğu ya da gıda zincirinde donma olayının yer aldığı çoğu kültürde doğal olarak diyetle birlikte alınmaktadır. Bu da protein miktarının çok yüksek olmaması ve gerekli güvenlik çalışmalarının yapılması şartıyla bu proteinlerin diğer gıdalara ilave edilmesinde herhangi bir sakınca bulunmadığı anlamına gelmektedir. Buz rekristalizasyon inhibisyonu dondurulmuş et, balık, meyve ve sebzelerin kalitesinin muhafazasına, kış mahsullerinin korunmasına, kırmızı kan hücreleri, sperm, ovosit, emriyo ve intakt (sağlam, işler halde) akciğerlerin kriyojenik depolanmasına yardımcı olabilmektedir [20].

SONUÇ

Doğal gıdalar ile gıda katkı maddelerinin tüketici sağlığı için önem taşıdığı günümüzde ekonomik ve fonksiyonel yeni kaynaklara olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Sıfırın altındaki sıcaklık derecelerinde yaşayan canlılarda doğal olarak bulunan çeşitli antifiriz proteinler; katkı maddesi olarak dondurulmuş gıdaların raf ömrünü uzatmada, kış mahsullerinin korunmasında, kışın sert geçtiği bölgelerdeki ekinlerin donma noktasının düşürülmesinde, sıcak su balıklarının daha soğuk sularda adaptasyonunu sağlayarak üretilmesinde ve kriyoterapinin gelişmesinde kullanılabilirliği ile ilgili çeşitli çalışmalarda araştırma konusu olmaktadır. Antifiriz proteinlerin üretim maliyetlerinin yüksekliği ve toksikolojik incelemelerin henüz bütün antifiriz proteinler için yapılmamış olması bu proteinlerin kullanımını kısıtlayıcı faktörlerdir. Bu nedenle günümüzde antifiriz proteinlerin üretimini optimize etmek ve üretim maliyetlerini düşürmek için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Konu ile ilgili çalışmaların artarak devam etmesi antifiriz proteinlerin gıda endüstrisinde kullanımının artmasına imkân sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Clarke, C.J., Buckley, S., Lindner, N., 2003. Ice-structuring proteins in ice cream. Proceedings of the Second IDF International Symposium on Ice Cream, May 14-16, 2003, Thessaloniki, Greece, 33-44p.
- [2] Bektaş, G.I., Altıntaş, A., 2007. Antifiriz proteinler. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 18: 27-32.
- [3] Ewart, K.V., Lin, Q., Hew, C.L., 1999. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 271-283.

- [4] Crevel, R.W.R., Fedyk, J.K., Spurgeon, M.J., 2002. Antifreeze proteins: Characteristics, occurrence and human exposure. *Food and Chemical Toxicology* 40: 899-903.
- [5] Fletcher, G.L., Goddard, S.V., Wu, Y., 1999. Antifreeze proteins and their genes: From basic research to business opportunities. *Chemtech* 30: 17-28.
- [6] Barrett, J., 2001. Thermal hysteresis proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33: 105-117.
- [7] Deng, G., Andrews, D.W., Laursen, R.A., 1997. Amino acid sequence of a new type of antifreeze protein, from the longhorn sculpin *Myoxocephalus octodecimspinosus*. *Federation of European Biochemical Societies* 402: 17-20.
- [8] Kuiper, M.J., Davies, P.L., Walker, V.K., 2001. A theoretical model of a plant antifreeze protein from *Lolium perenne*. *Biophysical Journal* 81(6): 3560-3565.
- [9] Griffith, M., Yaish, M.W.F., 2004. Antifreeze proteins in overwintering plants: A tale of two activities. *Trends in Plant Science* 9(8): 399-405.
- [10] Antson, A.A., Smith, D.J., Roper, D.I., Lewis, S., Caves, L.S.D., Verma, C.S., Buckley, S.L., Lillford, P.J., Hubbard, R.E., 2001. Understanding the mechanism of ice binding by type III antifreeze proteins. *Journal of Molecular Biology* 305: 875-889.
- [11] Aleong, J.M., 2008. Novel ice recrystallization inhibition agents in ice cream, Master of Science Thesis, The University of Guelph, Canada, 113p.
- [12] Feeney, R.E., Yeh, Y., 1998. Antifreeze proteins: Current status and possible food uses. *Trends in Food Science & Technology* 9: 102-106.
- [13] Kristiansen, E., Zachariassen, K.E., 2005. The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis. *Cryobiology* 51: 262-280.
- [14] Wilson, P.W., 1994. A model for thermal hysteresis utilizing the anisotropic interfacial energy of ice crystals. *Cryobiology* 31: 406-412.
- [15] Duman, J.G., Serianni, A.S., 2002. The role of endogenous antifreeze protein enhancers in the hemolymph thermal hysteresis activity of the beetle *Dendroides canadensis*. *Journal of Insect Physiology* 48: 103-111.
- [16] Griffith, M., Ewart, K.V., 1995. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnology Advances* 13(3): 375-402.
- [17] Anonymous, 2009. Antifreeze protein, http://en.wikipedia.org/wiki/Antifreeze_protein.
- [18] Graether, S.P., Kulper, M.J., Gagné, S.M., Walker, V.K., Jia, Z., Sykes, B.D., Davies, P.L., 2000. β -Helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. *Nature* 406: 325-328.
- [19] Parody Morreale, A., Murpy, K.P., Di Cera, E., Fall, R., De Vries, A.L., Gill, J.L., 1988. Inhibition of bacterial ice nucleators by fish antifreeze glycoproteins. *Nature* 333: 782-783.
- [20] Buckley, S.L., Lillford, P.J., 2009. Antifreeze Proteins: Their Structure, Binding and Use. In *Modern Biopolymer Science*, Edited by S. Kasapis,

- I. Norton, J. Ubbink, Academic Press, USA, 93-128p.
- [21] Inada, T., 2004. Substitutes antifreeze proteins: Potential applications in ice slurry systems. 14th International Conference on the Properties of Water and Steam, August 29-September 3, 2004, Kyoto, Japan, 660-669p.
- [22] Li, B., Sun, D.W., 2002. Novel methods for rapid freezing and thawing of foods - a review. *Journal of Food Engineering* 54: 175-182.
- [23] Zhang, C., Zhang, H., Wang, L., 2007. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on the fermentation capacity of frozen dough. *Food Research International* 40: 763-769.
- [24] Zhang, C., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., 2008. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on texture properties of frozen dough and volatile compounds of crumb. *LWT- Food Science and Technology* 41: 1029-1036.
-