

Nanobiotechnologia – zastosowanie w przemyśle spożywczym

Cz. 1. Trendy nanotechnologii w białej biotechnologii

Dr. hab. Anna Sałek

International Bio-Consulting, Germany

1. Wstęp

Mikrodiagnostyka żywności w Polsce, w rankingu marketingowym jest stosunkowo nową dziedziną, wciąż na etapie rozwoju, m.in. z powodu niezdefiniowanego ostatecznie rynku odbiorców.

Oczekuje się, że analityka żywności w zakresie szybkich i zautomatyzowanych metod, jako szczególny obiekt zainteresowania biznesu, gwałtownie wzrośnie z chwilą egzekwowania (zgodnie z Rozporządzeniem 178/2002 Unii Europejskiej, Kodeksem Jakości oraz Białą Księgą) obligatoryjnych badań w kierunku sprawnego monitoringu higieny w przemyśle spożywczym, połączonych z *traceability* łańcucha produkcyjnego oraz kontroli bezpieczeństwa żywności i analizy ryzyka zagrożenia, tj. oceny ryzyka, zarządzanie ryzykiem oraz stworzenie systemu komunikacyjno-informacyjnego.

Najbardziej obiecujące w diagnostyce nauk biologicznych, w tym nauk rolniczych, technologii żywności i ochronie środowiska - są rewolucyjne niemalże rozwiązania techniczne w sferze nanobiotechnologii z mikro- i nanoanalityką oraz komputerową interpretacją wyników w tzw. *real time* [1g].

Nanobiotechnologia obejmuje dziedziny wiedzy badające i kontrolujące struktury, procesy oraz funkcje systemów biologicznych w nanoskali (obiekty poniżej 100 nm). W celu porównania, np. średnica włosa wynosi 8×10^4 nm, cząsteczki wody prawie 0.3 nm, a atomu ok. 0.2 nm.

Możliwości nanotechnologii w sferze rolnictwa, ochrony środowiska i technologii żywności, czyli w obszarze tzw. białej biotechnologii, są ogromne i obejmują przede wszystkim wykorzystanie nanobiosensorów i tzw. nanobiomaszyn przy:

- Monitorowaniu żywności i systemów dostawy wody, tj.:
 - podczas wykrywania obecności pozostałości związków szkodliwych dla zdrowia, np. metali ciężkich, antybiotyków, toksyn, gazów trujących, czy mikroorganizmów patogennych;

- do szybkiej identyfikacji różnych wariantów GMO, zafałszowań żywności obcym białkiem oraz badania ekspresji genów i sekwencjonowania określonego DNA;
- Przy monitorowaniu zdrowia ludzi i zwierząt, z użyciem np. biosensorów nowej generacji (nanobiosensorów i różnego rodzaju chipów) przeznaczonych do diagnostyki biologicznej;
- Przy monitorowaniu ochrony środowiska i rolnictwa (*down on the farm*) [8] oraz ich bezpieczeństwa, np. w wyniku zastosowania enzymów degradujących polisacharydy, czy poprzez wprowadzanie mikroorganizmów (w mikrocząstkach) [7], korzystnych dla molekularnej ekologii, jak również podczas kontroli przepływu metali ciężkich w roślinach.

Powyższe zadania mogą być realizowane w wyniku zastosowania różnego typu konstrukcji i procesów nanotechnologicznych, deklarowanych jako techniki przyszłościowe. Należą do nich np.:

- współdziałające ze sobą na poziomie molekularnym sensory i markery, które zbudowane z biologicznych elementów, zwane są biosensorami i biomarkerami [3, 4, 7];
- bioinżynieria DNA (tzw. genomika), tj. hybrydyzacja komplementarnego DNA oraz segregacja, reperowanie i sekwencjonowanie genów na lab-on-a-chip [1e, 1g, 7];
- nanomateriały, jako kompozycje biopolimerowe, stosowane w rolnictwie i technologii żywności oraz nanomembrany o nanoporach (*channels*) i bioselektywnej powierzchni, przewidziane do kontroli procesów w przemyśle fermentacyjnym oraz podczas produkcji napojów oraz do oznaczeń zanieczyszczeń środowiska, stężenia gazów trujących, obecności mikroflory patogennej (wirusy, bakterie, drożdże i pleśnie) oraz do identyfikacji toksyn pochodzenia mikrobiologicznego [3, 7];
- nanoprocesy regulowane na poziomie molekularnym za pomocą „nanobiorobotów” jako nanomaszyn (otrzymanych w wyniku manipulacji komórkowych, czy tkankowych), do konstrukcji których, m.in. wykorzystano nano-włókna / nano-cylindry, np. węglowe/grafitowe [3, 6, 7, 10];
- bioNEMS (bio-nano-elektro-mechaniczne systemy), stosowane w postaci nanopomp, rotorów, motorów wewnątrzkomórkowych, czyli ogólnie

„nanomaszyn” (nanobiobotów = nanobiorobotów) na poziomie komórkowym [1f, 4, 7];

- technika mikrofluidyzacyjna oraz fotolitografii wykorzystana do konstrukcji biochipów oraz zespołu zwanego lab-on-a-chip z różnego typu rozwiązaniami mikro- i nanomacierzy (jak cDNA, homologiczne na pewnym odcinku do DNA badanej próbki, polipeptydy lub białka oraz antyciała znakowane markerem świetlnym, np. fluorescencyjnym, czy też z wykorzystaniem magnetycznych cząstek) [1a, 7];
- systemy „dostawy” różnych związków do komórek organizmu (*drug delivery*), np. w postaci nanokapsulek czy nanoliposomów, z „uwięzionymi” lekami, bądź polimerami specyficznego, hybrydowego DNA, jak również w formie antywirusowych lub antybakteryjnych nanocząstek (*nanoparticles*) [5, 7].

2. Integracja nauk biologicznych z systemami i materiałami w skali nano

Można sądzić, że rewolucja w biotechnologii zaczęła się od chwili wydania w 1997 roku książki „*Nanosystems*”, noblisty z 1960 roku, Richarda Feynman’a.

Świat naukowy został wówczas „oślepiiony” i zaintrygowany nagłym przeskokiem do tajemniczego obszaru miniaturyzacji, gdzie fantazja stopniowo przeistaczała się w rzeczywistość, a siły grawitacji straciły na ich klasycznym znaczeniu, wywołując potrzebę opracowania nowych zależności fizyko-matematycznych.

Realnym stało się np. zbudowanie z pojedynczych cząstek węgla prototypu tranzystora o średnicy mniejszej niż 50 nm, który potrafił zgromadzić ogromną ilość danych. Oczywiście, większość tych urządzeń wciąż jest w sferze badań laboratoryjnych. Najszybciej realizują się w praktyce prototypy nanobiosensorów i różnego rodzaju nanomateriały, służące do konstrukcji systemów pomiarowych oraz nanorobotów, zaangażowanych w funkcjonowanie układów biologicznych, np. tkanek [4, 7].

Obecnie, z ponad 180 praktycznych rozwiązań z zakresu nanobiotechnologii, o różnym stopniu zaawansowania pod względem wykonawczym, tylko kilka z nich zostało wprowadzone na rynek. To ostrożne „wkraczanie” do marketingu wiąże się

przede wszystkim z ogromnymi nakładami finansowymi na badania (laboratoryjne i prototypy), rzędu kilkudziesięciu tysięcy do kilku milionów dolarów na jeden projekt [8].

Jednakże wiele koncernów żywnościowych (np. Nestle, Kraft, PepsiCo, Cargill, czy Campbell Soup) jest świadoma potencjału aplikacyjnego i przyszłych korzyści finansowych z zastosowania elementów nanobiotechnologii w procesie produkcji żywności. Świadczy o tym także wzrastająca ilość firm (np. ok. 200 koncernów na przełomie 2004/2005 roku), partycypujących w badaniach naukowych, dotyczących nanobiotechnologicznych rozwiązań konstrukcyjnych, przeznaczonych dla technologii żywności oraz zainteresowanych w ich wdrożeniu (R & D).

Przewiduje się, że do 2010 roku w badaniach z zakresu nanobiotechnologii weźmie udział kilka tysięcy przedsiębiorstw, które szacują dochód ze sprzedaży wyprodukowanych nanomateriałów i nanobiobotów w przemyśle spożywczym na łączną kwotę sięgającą 20,4 bilionów dolarów, przy czym globalny rynek nanotechnologiczny osiągnie wysokość 1 trylion dolarów [5, 8]

Jednakże, jak dotąd, największym odbiorcą różnego rodzaju nowinek z dziedziny nanotechnologii o znaczeniu praktycznym - jest nanomedycyna [3]. Wynika to, m.in. z faktu, że konstruowane „nanomaszyny”, czy „nanobioboty” najefektywniej funkcjonują w środowisku żywych organizmów, w liczbie nawet do tysięcy na jedną komórkę. Wiąże się to również z faktem korzyści, jakie są w stanie przynieść nowe technologie w medycynie i farmacji.

Dzięki zastosowaniu odpowiednich biomarkerów, nanobioboty pozwalają bowiem na niezwykle precyzyjną i wczesną diagnostykę oraz na prognozowanie chorób, będąc ogromnie przydatnymi podczas przewidywania i oceny ewentualnego zagrożenia zdrowia (*risk analysis*) w tzw. theranostyce (*therapeutic + diagnostic = theranostic*). Jednocześnie nanodiagnostyka sprawia, iż pomiary są zdecydowanie szybsze, ukierunkowane, wymagające nano-ilości próbki do pomiaru, a tym samym bardziej praktyczne i ekonomiczne [3].

Medyczne badania funkcji mózgu (neurologia) oraz technologie i procesy bazujące na DNA, określają naszą „Molekularną Przyszłość”. DNA jest więc centralą informacyjno-instrukcyjną komórki, określaną w nanotechnologii bazą i prototypem, kompetentnym do interakcji RNA. Fakt ten otwiera nową dziedzinę wiedzy o funkcjonowaniu człowieka i o jego molekularnej naturze, a w dalszej kolejności o substancjach biologicznych (jak np. żywność), służących naszemu zdrowiu i bezpieczeństwu [5].

3. Trendy nanotechnologii w białej biotechnologii

Jakie trendy z zakresu nanobiotechnologii dominują aktualnie w badaniach na użytek technologii żywności?

Przede wszystkim, to poprawa bezpieczeństwa i jakości żywności, szczególnie pod względem mikrobiologicznym [1b, 1c, 1d]. W kilku światowych laboratoriach prowadzone są intensywne prace naukowo-badawcze oraz wdrożeniowe w zakresie zastosowania nanotechnologii do szybkiej identyfikacji mikroflory patogennej w żywności, wodzie pitnej oraz w otaczającym środowisku (naturalnym i produkcyjnym). Szczególny nacisk położono na wykrywanie w ciągu paru godzin bakterii *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp., czy *Legionella pneumophila*.

Następnym krokiem w przyszłość będzie:

- Wytwarzanie nowych produktów, zwanych „*nanofood*” pod kątem żywności funkcjonalnej i *neutraceuticals* oraz produktów „*smart*”, poprzez kształtowanie ich składników na poziomie atomowym i molekularnym [1c, 5];
- Kolejnym obiektem zainteresowań nanotechnologów stanie się szybka i precyzyjna analiza GMO (genetycznie zmodyfikowanych organizmów), celem prewencyjnej kontroli produkcji rolniczej [4],
- badanie procesów biologicznych (katabolicznych i anabolicznych) komórek, ich enzymów i tkanek użytecznych w białej biotechnologii [5],
- opracowanie nowej generacji opakowań, specyficznie przepuszczających związki lotne, tj. pozwalających na wydalanie gazów skracających trwałość produktu [8, 9] oraz
- tworzenie efektywnych i precyzyjnych systemów dostarczania substancji odżywczych do komórek mikroorganizmów, tkanek roślinnych, czy zwierzęcych (nanoliposomy) [3].

Przypuszcza się, że nanobiotechnologia może zmienić żywność konwencjonalną szybciej aniżeli jesteśmy sobie w stanie wyobrazić, bowiem produkcja „*nanofoods*” jest tańsza, skuteczniejsza, efektywniejsza, bezpieczniejsza, bardziej stabilna i wymagająca mniej substancji chemicznych oraz cechująca się mniejszym zużyciem wody, a więc obniżoną ilością ścieków [1d].

Głównymi obszarami zastosowania nanobiotechnologii w przemyśle spożywczym (o czym wspomniano już wyżej) będzie więc: żywność funkcjonalna i nutraceutyki, tj. dodatki do żywności, żywienie człowieka, dietetyka i produkcja napojów, np. piwa. W związku z tym nanobiotechnologia wpłynie na proces produkcji żywności (od farmy do talerza), na utrwalanie produktów, poprawę ich cech organoleptycznych, zachowanie jakości i bezpieczeństwa oraz na właściwe opakowania żywności. Zastosowane będą nowe rozwiązania nanobiotechnologii w zakresie [8, 9]:

- Konstrukcji nanobiotów przeznaczonych do funkcjonowania w tzw. mokrej nanotechnologii (tj. nanobiotechnologii, w odróżnieniu od „dry” nanotechnologii, na obszarze elektroniki), np. sztuczne hybrydowe „nanomotory” (12 nm) z enzymem ATP-azą, których siłą napędową jest ATP [4];
- Nanomateriałów, np. różnego rodzaju nanocząsteczek (*tagged nanoparticles*), biopolimerów, sztucznych receptorów (*artificial molecular receptors*), immunizowanych nanoporów w filtrach membranowych, zbudowanych z polikrystalicznych silikonów [7];
- Urządzeń pomiarowych, np. biosensorów, biochipów, *lab-on-a chip* [7];
- Procesu technologicznego, z użyciem np. emulsji, żeli, pian, liposomów (zawierających antybiotyki do leczenia zwierząt, etc.) [5];
- Systemów „dostawy” do organizmów leków lub substancji odżywczych za pomocą, np. nanokapsulek, nanokulek, różnego typu nanorobotów, czy nanocząstek (tzw. *drug delivery in smart drugs*) [3, 4, 7];
- Systemów membranowych, np. nanomembran jako aktywnych powierzchniowo bioreceptorów, nanofiltrów, przezroczystych, przemysłowych powłok opakowaniowych (o grubości do kilku nm), o określonej przepuszczalności, np. zastępujących butelki do lekkich napojów, m.in. piwa, wody pitnej [5];
- Konstrukcji nanobioreceptorów, np.:
 - z cDNA znakowanym fluorescencyjnie, przeznaczonym do identyfikacji nieznanego DNA [4, 7],
 - z kompatybilnym DNA do sekwencjonowania genów [4, 7] materiału pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego,

- nanopowierzchni ze sztucznymi receptorami do badania białek i peptydów [4], np. przeznaczonych do wykrywania zafałszowań żywności wegetariańskiej lub przetworów mięsnych z użyciem obcego białka zwierzęcego,
- powłok polimerowych dla włókien węglowych, itd. [6, 7].

Nanobiosensory mogą być użyte, np. w rolnictwie, czy w technologii żywności do monitoringu procesu chemicznego, bądź biologicznego (biochemicznego, mikrobiologicznego lub genetycznego) [1c, 1d] (Rys. 1).

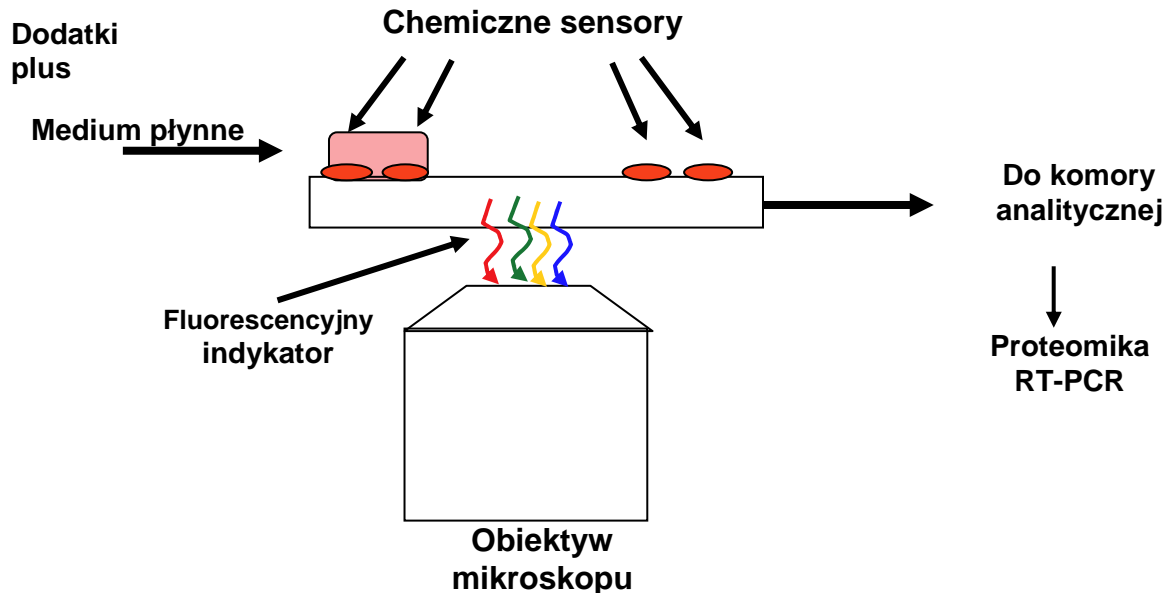


Rys. 1. Gene-Chip® i Nutri-Chips™, np. do GMO (identyfikacja obcego DNA), mikroorganizmów patogennych, czy analizy protein (firma Gene-Scan, Freiburg-Germany).

Kontrolę procesów biologicznych (np., metabolizmu) mikroorganizmów technologicznych można zrealizować w wyniku zastosowania:

- Nanobiosensorów (w tym optycznych, np. fluorescencyjnych) do identyfikacji biomarkerów (określonych metabolitów drożdży) w środowisku fermentacyjnym (Rys. 2),
- Chemicznych, bądź enzymatycznych nanobiosensorów do monitorowania „*in real-time*” dynamiki ubytku substratu (np. glukozy) oraz identyfikacji innych wybranych biomarkerów metabolicznych,
- Platynowo-porfirynowych elektrod (sensorów), o polimerowej bazie, do pomiaru dynamiki oraz kinetyki procesów oddechowych, przebiegających w pojedynczych komórkach (pochłanianie O₂), gdzie aktywność oddechowa charakteryzuje stan fizjologiczny drożdży,
- W przypadku badania bezpieczeństwa żywności, na pierwszy plan wysuwa się konieczność szybkiej i precyzyjnej identyfikacji oraz diagnozy

drobnoustrojów patogennych [1d, 3, 8]. W tym celu w chwili obecnej, oprócz *DNA-chip* i *immuno-chip*, możliwym jest monitorowanie biologicznych struktur bezpośrednio w płynnym podłożu, np. w brzeczce piwnej [1b],



Rys. 2. Mikrosystem do badania pojedynczych komórek drożdżowych.

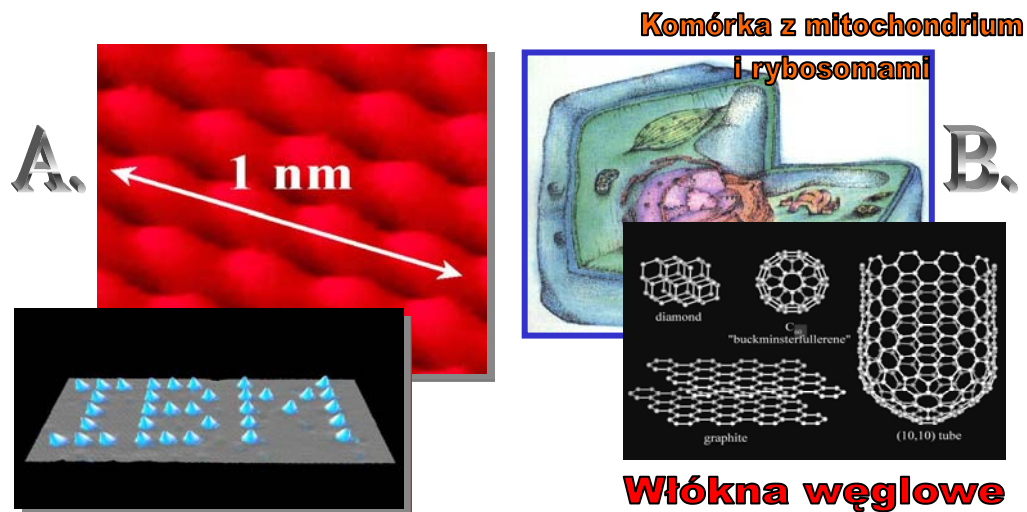
- Dzięki nanobiotechnologii, mikroskop o działaniu atomowym (AFM) zapewnia manipulowanie strukturami membranowymi mikroorganizmów w ich natywnym płynnym środowisku, np. dokonywanie zmian w pojedynczych białkach membranowych drożdży, albo obserwowanie w czasie rzeczywistym dynamiki zmian powierzchniowych w błonie komórkowej, dotyczących białek strukturalnych oraz identyfikacji pojedynczych receptorów. Ten sposób badań komórek drożdży w środowisku naturalnym, nie symulowanym, np. w brzeczce, pozwala nam na wyselekcjonowanie najaktywniejszych i najwłaściwszych szczepów.

4. Funkcjonalne „nanomaszyn” w białej biotechnologii

Podczas opracowywania szybkich, czułych i powtarzalnych metod analitycznych, dostosowanych do różnych opcji badawczych, poza ulepszeniem i

walidacją już istniejących sprawnych mikrotechnik pomiarowych, sięga się do tzw. technik turbo-nano, wchodzących w obręb nanobiotechnologii.

Nanobiotechnologia obejmuje konstrukcję sztucznych „nanobioszyn” (porównywalnych do naturalnych organów, jak np. do rybosomu komórkowego, czy mitochondrium) oraz produkcję i wszelkie manipulacje ich kształtem na poziomie atomowym i molekularnym, tj. w skali rzędu nanometrów (10^{-9} m) (Rys. 3):



Rys. 3. Struktury atomowe (nanoarray) na płycie silikonowej (A.) oraz nanobioszyny, tzw. naturalne nanobioboty (mitochondrium i rybosomy w komórce) oraz włókna/cylindry węglowe (*carbon nanotubes*) [4, 6, 7, 10, 11].

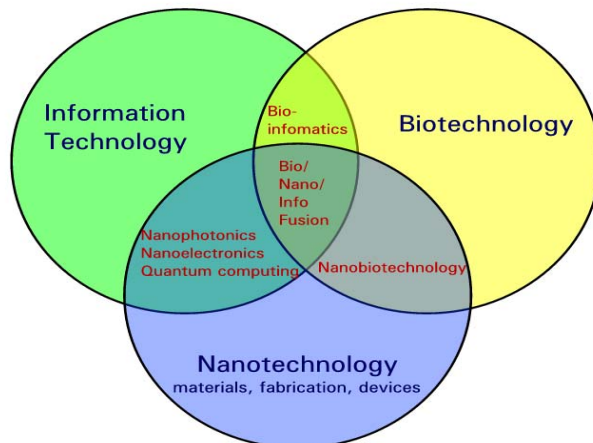
Z założenia, wiedza nanotechnologiczna skupia w sobie dwa fundamentalne kierunki badań, zw. „*top down*” i „*bottom up*”. Technika „*top down*” odnosi się do nanostruktur otrzymanych na drodze kształtowania mechanicznego i poprzez tzw. rytowanie, podczas gdy technika „*bottom up*” odnosi się do budowania organicznych i nieorganicznych struktur „atom-po-atomie” (*atom-by-atom*) lub „cząsteczka-po-cząsteczce” (*molecule-by-molecule*) [10].

Nanomaszyny (syn. nanobioroboty, nanobioboty, nanomotory, nanoparticles), jako innowacyjne rozwiązania techniczne umożliwiają kontrolę i regulację procesów biologicznych, konstrukcję nowych elementów „atom-po-atomie”, aż do cząsteczek, zgodnie z ustalonym planem [3, 4, 9]. I chociaż nanobiotechnologia ma niejedno oblicze, wspólna jest dla nich koncepcja racjonalnej manipulacji kształtem nanobiobotu (np. nano-cząsteczki) oraz wymiarami odpowiadającymi molekularnej, bądź atomowej precyzji. Z materiałów nowej generacji powstają nano-włókna, nano-

rurki, nano-druciki, nano-pierścienie, nano-cysty, itp. Budowy nanostruktur dokonuje się w specjalistycznych atomowych mikroskopach (np. skanningowy mikroskop tunelowy, zw. STM, czy mikroskop o działaniu atomowym, AFM *Atom Force Mikroskop*) [2, 7].

„Nanobioboty” są hybrydową kombinacją części biologicznej i nieorganicznej, np. sensora świetlnego lub immunologicznego, efektywnie połączonego ze szkłem, materiałem silikonowym lub innym polimerem, ukształtowanym metodą: albo mikrofluidyzacji, albo fotolitografii (w MEMS, tzn. w mikro-elektromechanicznym systemie i w NEMS, nano-elektromechaniczny systemie oraz do konstrukcji *array*) [1a, 4].

Mikro- i nanotechnologia są w dniu dzisiejszym najbardziej fascynującymi obiektami wielodyscyplinarnych badań naukowych, z niekonwencjonalnymi rozwiązaniami technicznymi z kilku dziedzin nauki, m.in. fizyki, chemii, biologii molekularnej, czy inżynierii elektronicznej z organiczną elektroniką, fotoniką i komputeryzacją (Rys. 4).



Rys. 4. Integracja nauk tworzących nanobiotechnologię [4, 5, 7, 9, 10].

Za przykład wielodyscyplinarnego osiągnięcia może posłużyć tzw. *lab-on-a-chip* (LOP), charakteryzujący się dużym potencjałem aplikacyjnym przy automatyzacji, miniaturyzacji i mobilności urządzeń do szybkiej analizy w pracach naukowo-badawczych, czy rutynowych (systemy *portable*), zarówno w czerwonej biotechnologii (medycyna), zielonej (rolnictwo), jak i w białej biotechnologii (produkcja żywności i ochrona środowiska) [1b, 3, 7].

Ogólnie, nanostruktury mają unikalne optyczne, elektryczne, termiczne i mechaniczne właściwości, które czynią je użytecznymi narzędziami w biotechnologii. W dziedzinie nanotechnologii istnieje wiele gotowych prototypów, tzw. nanomaszyn / nanobiorobotów, wykorzystywanych, jak dotąd głównie w medycynie [3]. Tylko niektóre z nich służą do specjalnych zadań w rolnictwie i technologii żywności.

Zbieżność nanotechnologii z biotechnologią i z pewną dziedziną medycyny, neurologią, zapoczątkowała niemalże rewolucję w badaniach biologicznych 21 wieku. Otworzyły się bowiem nowe możliwości badawcze, a dzięki temu wzrosła ilość innowacyjnych rozwiązań, generalnie służących bezpieczeństwu i poprawie zdrowia ludzkiego [9].

LITERATURA

- [1] *Advantage Magazine February, 2004:*
- a. Quick, inexpensive method to prototype microchips.
www.azonano.com/details.asp?ArticleID=424
 - b. New DNA-Chip rapidly detects, identifies dangerous pathogens.
www.azonano.com/details.asp?ArticleID=485
 - c. Food Industry tuning in to nanotechnology.
www.azonano.com/details.asp?ArticleID=855
 - d. Nanotechnology to play important and prominent role in food safety.
www.azonano.com/details.asp?ArticleID=858
 - e. Lab-on-a-chip and the impact of nanotechnology.
www.azonano.com/details.asp?ArticleID=866
 - f. Biotechnology systems incorporating nanotechnology.
www.azonano.com/details.asp?ArticleID=959
 - g. Biochip and the use of Nanotechnology in imaging.
www.azonano.com/details.asp?ArticleID=969
- [2] Dufrene Y., F.: Using Nanotechniques to explore microbial surfaces. *Nature review. Microbiology*, **2**, (2004), 451-460.
- [3] Freitas Jr. R. A.: The future of nanofabrication and molecular scale devices in nanomedicine. *Studies in Health Technology and Informatics*, **80**, (2002), 45-59.
- [4] Goodsell D.S.: Bionanotechnology: Lessons from Nature. *Wiley-Liss*, (2004).
- [5] Kaiser H.: New Study: Nanotechnology in Food and Food Processing. Industry Worldwide 2003-2006-2010-2015. www.hke22.com/nanofood.html
- [6] Kang Y., Taton T.A.: Micelle-encapsulated carbon nanotubes: A general Route to nanotube composites. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, (2003), 5650-5651.
- [7] Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives. *Edited by Niemayer C.M., Mirkin C.A., Wiley-VCH*, (2004).
- [8] Report: Down on the Farm. The impact of nano-scale technologies on food and agriculture. *ETC Group*, November 2004, www.etcgroup.org
- [9] Report: Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties. *The Royal Society & The Royal Academy of Engineering*, (July 2004),
- [10] Taton T.A.: Bio-Nanotechnology: Two-Way traffic. *Nature Mater.*, **2**, (2003), 73-74.
- [11] Taton Group, University of Minnesota, Dept. Of Chemistry: Nanobiotechnology: Hybrid materials from nanoscale objects and biomolecules (Research Projects), (2005),
www.chem.umn.edu/groups/taton/researchcontent.htm