مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هشتم، شماره 1، بهار 1392، صفحات 175-167

بررسی میزان لیزینوآلانین در برخی شیرهای پاستوریزه و استریلیزه‌ی مصرفی شهر تهران در سال 1390

نسیم خورشیدیان[1]، اقدس تسلیمی[2]، مرتضی مشایخ[3]، ابراهیم آزاد نیا[4]

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

2- نویسنده مسئول: مربی گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. پست الکترونیکی: Taslimifeyzipour@yahoo.com

3- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

4- کارشناس آزمایشگاه شیمی مواد غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 91/8/30 تاریخ پذیرش: 91/12/21

چکیده

سابقه و هدف: فرایندهای حرارتی پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون در شیر به منظور افزایش ماندگاری آن مهم هستند، ولی به دلیل ایجاد ترکیبات شیمیایی با ایجاد اتصالات ثانویه اثرات نامطلوبی بر کیفیت تغذیه‌ای این فراورده‌ها می‌گذارند. به گونه‌ای که قابلیت دسترسی به اسیدهای آمینه ضروری کاهش می‌یابد ترکیب حاصل اثرات نفروتوکسیسیتی روی کلیه‌های انسان دارد. هدف این پژوهش، بررسی میزان لیزینوآلانین در شیرهای پاستوریزه و استریلیزه‌ی مصرفی شهر تهران در سال 1390بود.

مواد و روش‌ها: مقدار پروتئین در شیر خام، پاستوریزه و استریل با روش کلدال اندازه‌گیری شد. هیدرولیز پروتئین شیر، توسط اسید کلریدریک 6 N در دمای $110^{\circ}C$ به مدت 22 ساعت انجام شد. پروتئین هیدرولیز شده در آب مقطر حل و pH آن به وسیله‌ی محلول هیدروکسید سدیم 12N به 9 رسانده شد. به منظور مشتق‌سازی لیزینوآلانین آزاد شده، به 0/5ml از محلول صاف شده، 0/5ml بافر بورات با pH=9 و 1ml محلول دانسیل کلراید اضافه شد. سپس در بن ماری $40^{0}C$ به مدت 60 دقیقه قرار داده شد و میزان لیزینوآلانین در نمونه‌ها با HPLC اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: مقدار لیزینوآلانین اندازه‌گیری شده در نمونه‌ی شیر خام تهیه شده از یکی از کارخانه‌های لبنی و نمونه‌های شیر خام تهیه شده از مراکز فروش لبنیات به ترتیب صفر و 5 mg/kg بود. مقدار لیزینوآلانین اندازه‌گیری شده در شیرهای پاستوریزه در محدوده‌ی 34-86mg/kg و در نمونه‌های شیر استریل در محدوده‌ی 112-233 mg/kg بود. در بررسی اثر دوره‌ی نگهداری بر تغییرات لیزینوآلانین در شیر استریل در دمای $25^{\circ}C$ و در روزهای 1، 7، 15، 30 و 60 مقدار لیزینوآلانین به تدریج افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: لیزینوآلانین در شیرهای پاستوریزه و استریلیزه‌ی مصرفی در شهر تهران وجود دارد و مقدار آن در شیرهای استریلیزه بیشتر از پاستوریزه است. علاوه بر این، مقایسه‌ی مقادیر لیزینوآلانین در شیرهای پاستوریزه و استریلیزه‌ی داخلی با سایر کشورها نشان می‌دهد که مقدار لیزینوآلانین در شیرهای مصرفی شهر تهران بیشتر است. با توجه به اثرات سوء این ترکیب و مصرف روزانه‌ی شیر توسط کودکان و افراد بزرگسال، کنترل ترکیب لیزینوآلانین در شیرهای پاستوریزه و استریل و کنترل دما و زمان در فرایندهای حرارتی ضروری است.

واژگان کلیدی: شیر، پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون، لیزینوآلانین، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

• مقدمه

فرایند حرارتی از نظر افزایش ایمنی غذا، بهبود کیفیت حسی و از بین بردن ریزسازواره‌ها و افزایش عمر نگهداری مواد غذایی اهمیت بسیاری دارد، ولی ممکن است اثرات نامطلوبی بر کیفیت تغذیه‌ای مواد غذایی پروتئینی به دلیل ایجاد تغییرات شیمیایی و تولید برخی ترکیبات داشته باشد.

لیزینوآلانین LAL (2-آمینو2-کربوکسی لیزین) یک ترکیب غیرطبیعی است که از تیمار حرارتی یا قلیایی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

غذاهای حاوی پروتئین تشکیل می‌شود. واکنش تشکیل لیزینوآلانین با حذف بتای گروه هیدروکسیل سرین، O-فسفوریل سرین ،O- گلیکوزیل سرین یا گروه دی سولفید سیستئین آغاز می‌شود. محصول نهایی حذف بتا، دهیدروآلانین DHA (2- آمینواکریلیک اسید) است. این ترکیبِ بسیار واکنش‌پذیر، محصول واسطه در تشکیل لیزینوآلانین و سایر اسیدهای آمینه زنوبیوتیک است و می‌تواند با ترکیبات گوناگون آمین‌دار، مانند اسیدهای آمینه و آمین‌های بیوژن واکنش دهد. از واکنش DHA با اسید آمینه‌ی لیزین، LAL تشکیل می‌شود (8-1).

مطالعات نشان داده است که LAL اثرات نفروتوکسیک در برخی حیوانات داشته و می‌تواند موجب نفروسیتومگالی، جراحت میکروسکپی سلول‌های کلیه، افزایش میزان نوکلئوپروتئین و در نتیجه اختلال در سنتز DNA و تقسیم میتوز شود. LAL به علت قدرت شلاته کردن می‌تواند آنزیم‌های حاوی یون‌های فلزی عمدتا یون‌های مس دو ظرفیتی و روی را که به متالوآنزیم‌ها (متالوپروتئین) معروفند، غیرفعال کند. از طرف دیگر، تشکیل ترکیب LAL موجب کاهش دسترسی به اسید آمینه ضروری لیزین و در نتیجه، کاهش کیفیت تغذیه‌ای منبع پروتئینی می‌شود (12-9).

D'Agostino و همکاران در سال 2003 مقدار LAL را در برخی فرمول‌های غذای کودک بررسی کردند. در آن مطالعه 23 نمونه پودر غذای کودک یا نمونه مایع(adapted) مورد آزمون قرار گرفتند. آن‌ها به منظور شناسایی LAL از دستگاه HPLC و مشتق‌سازی به وسیله‌ی FMOC (9- فلوئورونیل متیل کلروفرمات) استفاده کردند. در نمونه‌های پودری، مقدار لیزینوآلانین کمتر از حد تشخیص روش بود، در حالی که در نمونه‌های مایع میزان لیزینوآلانین به 86 µg/g، در فرمول‌های follow-on تا 390 µg/g و در نمونه‌های growing به 514µg/g می‌رسید (13).

Boschin و همکاران در سال 2003 میزان لیزینوآلانین در فرمول‌های تغذیه‌ی وریدی (مختص بیماران) را اندازه‌گیری کردند. کازئین و کازئینات‌ها اجزای اصلی تشکیل‌دهنده‌ی فرمول‌های تغذیه وریدی هستند. در فرایند تولید این محصولات، انجام تیمار حرارتی (استریلیزاسیون) به منظور اطمینان از ایمنی از لحاظ میکروبی و زمان ماندگاری ضروری است و این فرایند حرارتی منجر به تشکیل LAL می‌شود (14).

Montilla و همکاران در سال 2007، میزان لیزینوآلانین در نمونه‌های تخم‌مرغ پخته ،کازئینات تجاری، پنیر تازه، پنیر تازه تهیه شده از شیر غنی شده با کازئینات به کمک GC-FID (گاز کروماتوگرافی- آشکارساز شعله‌ای یونی) را اندازه‌گیری کردند. آن‌ها گزارش کردند که لیزینوآلانین در تخم‌مرغ خام وجود نداشت، ولی با انجام فرایند حرارتی و افزایش مدت زمان فرآیند ، به تدریج میزان لیزینوآلانین افزایش یافت و تشکیل آن در سفیده بیشتر از زرده‌ی تخم‌مرغ بود. میزان لیزینوآلانین در کازئینات تجاری به 605 mg/kg می‌رسید. در پنیر تازه (تهیه شده از شیر پاستوریزه) لیزینوآلانین وجود نداشت. مقدار LAL در شیر پاستوریزه 69 mg/kg و در پنیر تهیه شده از شیر غنی شده با کازئینات در حدود 142-207/6 mg/kg اندازه‌گیری شد (15).

با در نظر گرفتن این نکات، این تحقیق برای اولین بار در کشور و به منظور بررسی میزان لیزینوآلانین در شیرهای مصرفی در شهر تهران در سال 1390 انجام شد.

• مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: هیدروکلریک اسید (37%)، سدیم هیدروکسید، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، اسید فسفریک، بوراکس، ایزوپروپیل الکل و استونیتریل با درجه‌ی HPLC از شرکت Merck (آلمان) استاندارد لیزینوآلانین از شرکت Bachem (سوئیس) و دانسیل کلراید از شرکت Sigma (آمریکا) تهیه شد.

نمونه‌های شیر : روش انجام این تحقیق از نوع توصیفی بود. به منظور نمونه‌برداری، از شیرهای پاستوریزه و استریلیزه‌ی مصرفی در شهر تهران که در فروشگاه‌های زنجیره‌ای بزرگ مانند *رفاه* و *شهروند* و سوپرمارکت های محلی عرضه می‌شوند، در دو نوبت نمونه‌برداری صورت گرفت. تعداد نمونه‌های شیر پاستوریزه 28 و تعداد نمونه‌های شیر استریلیزه 24 بود. برای اطمینان از عدم وجود لیزینوآلانین در شیر خام 6 نمونه‌ی شیر خام (1 نمونه از کارخانه و 5 نمونه از مراکز فروش محصولات لبنی) تهیه و مقدار لیزینوآلانین در آن‌ها اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها در شرایط مناسب به آزمایشگاه انتقال یافتند و حداکثر یک روز پس از نمونه برداری آزمایش‌ها انجام شد.

معتبرسازی روش اندازه‌گیری لیزینوآلانین در شیر با HPLC: محلول استاندارد لیزینوآلانین با غلظت 1ppm و سپس غلظت‌های مورد نظر جهت کالیبراسیون و غنی‌سازی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

نمونه (spiking) در سطوح مختلف تهیه شد. به منظور بررسی خطی بودن، غلظت‌هایی از محلول استاندارد تهیه و مراحل مشتق سازی مانند نمونه روی آن‌ها صورت گرفت. نتایج حاصل بیانگر خطی بودن منحنی در محدوده‌ی غلظت‌های 75-5 نانوگرم / میلی‌لیتر و مدل برازش روش عبارت بود از :

$y = 367/26\ x + 430/64$ و $R^2 = 0/9944$

برای بررسی صحت روش 6 روز کاری در نظر گرفته شد. مقادیر 30 و 60 و100 نانوگرم در میلی‌لیتر از استاندارد لیزینوآلانین به یک نمونه‌ی شیرِ از قبل هیدرولیز شده اضافه و مشتق‌سازی شده و سپس به دستگاه تزریق شد. غلظت لیزینوآلانین در نمونه غنی شده (spike) با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه شد. مقدار لیزینوآلانین در نمونه‌ی شیر قبل از غنی کردن نیز محاسبه شده بود. درصد بازیابی برای هر مقدار، از تقسیم غلظت لیزینوآلانین در نمونه‌ی شیر غنی شده به مجموع غلظت این ترکیب در خود نمونه‌ی شیر و غلظت غنی شده محاسبه شد. درصد بازیابی به دست آمده 83 تا 92 درصد بود.

به منظور محاسبه دقت، لیزینوآلانین از یک نمونه‌ی شیر 5 بار در شرایط یکسان استخراج و به دستگاه تزریق شد و به صورت انحراف معیار نسبی (RSD) گزارش شد . دقت روش 4/5-7/2 به دست آمد.

به منظور محاسبه و نمایش حساسیت روش از دو کمّیت حد تشخیص (Limit of Detection) و حد تعیین مقدار (Limit of Quantification) استفاده شد.حد تشخیص با استفاده از معادله‌ی 1 محاسبه شد.

معادله‌ی 1)

$$LOD = \frac{3S_{y/x}}{m}$$

$S_{y/x}$ انحراف استاندارد شاهد برای هر پیک آنالیت در کروماتوگرافی معادل با یک‌پنجم مقدارتفاضل حد بالایی و پایینی نویزهای (noise) اطراف پیک آن آنالیت است. m شیب مربوط به معادله‌ی رگرسیون منحنی کالیبراسیون آنالیت مورد نظر است. حد تعیین مقدار با استفاده از معادله‌ی 2 محاسبه شد.

حد تشخیص و حد تعیین مقدار لیزینوآلانین توسط روش به کار رفته به ترتیب 0/25 و 0/83 ppm بود.

معادله‌ی 2)

$$LOD = \frac{3S_{y/x}}{m}$$

اندازه‌گیری مقدار لیزینوآلانین: ابتدا میزان پروتئین در نمونه‌های شیر مطابق روش (991/20) AOAC و با دستگاه کلدال Foss تعیین شد (N×6.38). اندازه‌گیری پروتئین فقط به منظور تعیین حجم اسید کلریدریک مورد نیاز در مرحله‌ی هیدرولیز انجام شد نسبت پروتئین به اسید به منظور هیدرولیز 1:200 بود (1). به منظور هیدرولیز پروتئین نمونه‌های شیر (به منظور آزاد کردن لیزینوآلانین متصل به پروتئین‌های شیر) 50ml اسید کلریدریک 6 N به نمونه‌های حاوی 0/25 گرم پروتئین (حدود 6/5 میلی‌لیتر شیر) در ویال‌های درپیچ دار اضافه شد. هر یک از ویال‌ها در حضور گاز نیتروژن جهت تخلیه‌ی اکسیژن از فضای بالای نمونه‌ها کاملا دربندی شد. سپس ویال‌ها به مدت 22 ساعت در آون 110°C قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها حرارت داده شد تا باقی‌مانده‌ی اسید کلریدریک تبخیر شود. ماده‌ی جامد باقی‌مانده در آب مقطر حل شد و pH آن به وسیله‌ی محلول سود 12N به 9 رسانده شد. پس از آن با اضافه کردن آب مقطر، نمونه‌ها تا حجم 25ml در بالن حجمی رقیق شدند و به وسیله‌ی غشای استات سلولز صاف شدند . بلافاصله عمل مشتق سازی با دانسیل کلراید انجام شد. به 0/5ml از محلول هیدرولیز شده‌ی هر نمونه 0/5ml بافر بورات (0/5 M ، pH=9) و 1ml محلول دانسیل کلراید (10 میلی‌گرم در 1 میلی‌لیتر ایزوپروپیل الکل) اضافه شد و به مدت 2 دقیقه به شدت به هم زده شد. پس از آن در شرایط دور از نور به مدت 60 دقیقه در بن ماری 40°C قرار داده شدند. نمونه‌های مشتق‌سازی شده به مدت 1 هفته در دمای 25°C- قابل نگهداری بودند. تشخیص و تعیین مقدار لیزینوآلانین با دستگاه HPLC (مدل Younglin مجهز به یک پمپ مدل SP930D با دو ورودی حلال با فاز معکوس phenomenex C_{18} به طول 250 mm و قطر داخلی 4/6mm که با ذراتی با ابعاد 5µm پر شده است) و تزریق 20 µl لیزینوآلانین استخراج شده و استفاده از آشکارساز فلورسانس (Marathon) در طول موج تهییج 330 و طول موج نشر 550 نانومتر) صورت گرفت.

بررسی اثر دوره‌ی نگهداری بر تغییرات لیزینوآلانین در شیر استریل: به منظور بررسی تغییرات لیزینوآلانین در طول دوره نگهداری شیر استریل در دمای 25°C یک نمونه‌ی شیر استریل تهیه شد و میزان لیزینوآلانین آن در روزهای 1، 7، 15، 30 و 60 روز پس از تولید اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

تجزیه و تحلیل آماری: ابتدا نرمال بودن مقادیر لیزینوآلانینِ اندازه‌گیری شده در 2 بار نمونه‌برداری با آزمون شاپیروویلکز بررسی و پس از آن، اختلاف معنی‌داری بین مقادیر اندازه‌گیری شده بار اول و دوم با استفاده از آزمون تی‌زوجی تعیین شد و به دلیل معنی‌دار نبودن تفاوت، از میانگین مقادیر در 2 بار اندازه‌گیری برای آزمون‌های بعدی استفاده شد. به منظور بررسی آماری و تعیین اختلاف معنی‌دار بین میانگین مقادیر لیزینوآلانین اندازه‌گیری شده در نمونه‌های پاستوریزه و استریلیزه از آزمون تی مستقل استفاده شد. سطح احتمال قابل پذیرش برای همه‌ی داده‌ها $P< 0/05$ در نظر گرفته شد.کلیه داده‌ها توسط نرم افزار آماری SPSS 16 تجزیه و تحلیل آماری شدند. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شد.

• یافته‌ها

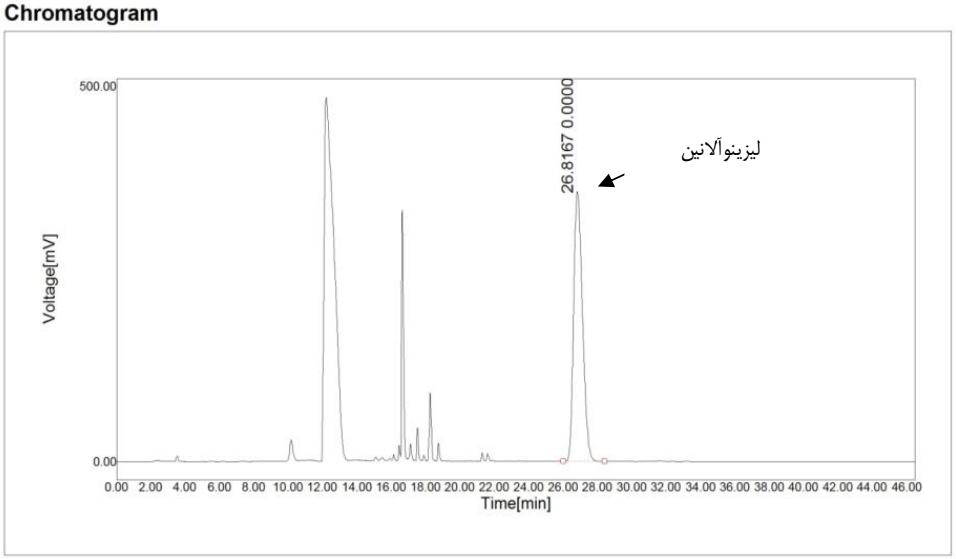
کروماتوگرام لیزینوآلانین موجود در یک نمونه شیر پاستوریزه در شکل 1 نشان داده شده است. میانگین غلظت لیزینوآلانین در نمونه‌های شیر پاستوریزه و استریلیزه در جدول 1 آورده شده است. مقدار لیزینوآلانین در شیرهای استریلیزه بسیار بالاتر از شیرهای پاستوریزه بود. نمودار مربوط به تغییرات لیزینوآلانین در شیرهای استریلیزه در روزهای مختلف نگهداری در دمای 25°C در شکل 2 نشان داده شده است. با افزایش مدت زمان نگهداری، مقدار لیزینوآلانین به تدریج افزایش یافت.

مقایسه‌ی مقدار لیزینوآلانین در نمونه های پاستوریزه

Pa2>pa9>pa11>pa4>pa7>pa5>pa12>pa13>pa5>pa1>pa14>pa8>pa10>pa3>pa6

مقایسه‌ی مقدار لیزینوآلانین در نمونه های استریلیزه

St7>St6>St9>St10>St11>St8>St2>St5>St3>St4>St1>st12



شکل1. کروماتوگرام مربوط به اندازه‌گیری لیزینوآلانین در یک نمونه‌ی شیر پاستوریزه

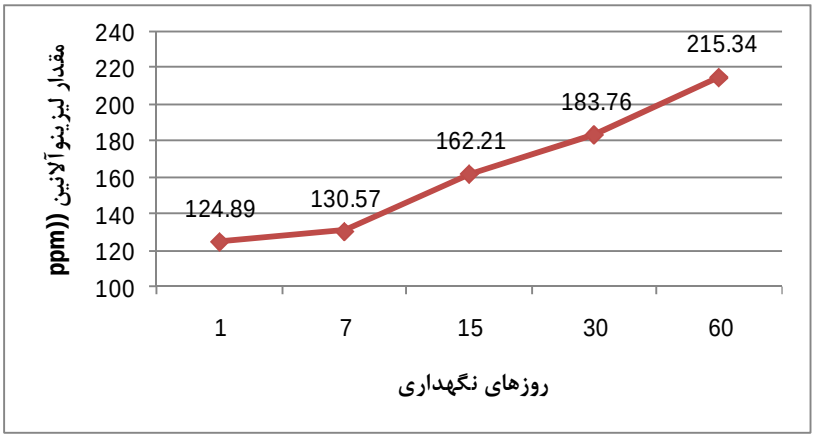
فاز متحرک به صورت مخلوطی از بافر فسفات با pH=7 و فاز آلی استونیتریل، . جداسازی در ستون phenomenex C_{18} به طول 250 mm و قطر درونی 4/6mm با ذراتی به ابعاد 5µm، طول موج‌های تهییج و نشر به ترتیب 330 و 550 نانومتر.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

جدول1. میانگین مقادیر لیزینوآلانین اندازه‌گیری شده در نمونه‌های شیر پاستوریزه و استریلیزه در دو بار نمونه‌برداری

نمونه‌ی شیر	میانگین مقدار لیزینوآلانین(mg/kg)	نمونه‌ی شیر	میانگین مقدار لیزینوآلانین(mg/kg)
Pa1	45/35	St1	110/28
Pa2	86/46	St2	146/03
Pa3	35/75	St3	132/41
Pa4	64/60	St4	118/96
Pa5	49/39	St5	140/28
Pa6	35/52	St6	224/59
Pa7	58/55	St7	232/54
Pa8	41/03	St8	155/11
Pa9	73/3	St9	213/52
Pa10	40/15	St10	197/21
Pa11	64/94	St11	159/02
Pa12	54/13	St12	97/35
Pa13	49/85		
Pa14	43/33		

Pa: پاستوریزه St: استریلیزه



شکل2. تغییرات لیزینوآلانین طی دوره‌ی نگهداری در دمای 25°C

• بحث

اندازه‌گیری لیزینوآلانین با دستگاه HPLC : اندازه‌گیری لیزینوآلانین در مواد غذایی مستلزم آزادسازی لیزینوآلانین متصل به پروتئین است. روش‌های مختلفی برای جداسازی لیزینوآلانین وجود دارد: آبکافت آنزیمی، قلیایی و اسیدی . آبکافت آنزیمی ، لیزینوآلانین را به طور کامل آزاد نمی کند و روش آبکافت قلیایی موجب تخریب لیزینوآلانین می گردد.

با توجه به این که لیزینوآلانین در شرایط اسیدی پایدار است، آبکافت اسیدی روش مناسب‌تری نسبت به دو روش دیگر است (16) و همین روش برای آزادسازی لیزینوآلانین در نمونه‌های شیر به کار گرفته شد. *D'Agostino* (2003)، *Bosch* (2007) و *Corpert* (2008) نیز از روش آبکافت اسیدی برای استخراج لیزینوآلانین از غذاهای حاوی پروتئین

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

استفاده کردند (13، 11، 3). برای اندازه‌گیری لیزینوآلانین روش‌هایی مانند کروماتوگرافی لایه نازک و تعویض یونی هم مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با توجه به این که دو روش ذکر شده دقت و حساسیت کمتری برای شناسایی و تعیین مقدار لیزینوآلانین در شیرهای حرارت دیده دارند، در این پژوهش به کار نرفتند. روش HPLC دقت و حد تشخیص بالاتری دارد و به همین دلیل، این روش در تحقیق حاضر به کار رفت (17). به منظور ایجاد خاصیت فلوئورسانس بالا در لیزینوآلانین جدا شده از پروتئین‌ها و افزایش امکان تشخیص و بالا بردن حساسیت آشکارساز فلوئورسانس، مشتق سازی با ترکیب دانسیل کلراید و ترکیب FMOC (9- فلوئورونیل متیل کلروفرمات) انجام شد. اما برای خالص‌سازی و جداسازی مشتقات حاصل از ترکیب FMOC به یک روش جداسازی (استخراج با فاز جامد) نیاز است که موجب طولانی شدن زمان جداسازی می‌شود. با توجه به موارد ذکر شده و ایجاد مشتقات لیزینوآلانین با خاصیت فلوئورسانس بالا از دانسیل کلراید استفاده شد (14، 4).

اندازه‌گیری لیزینوآلانین در نمونه‌های شیر خام، پاستوریزه و استریلیزه : در نمونه‌ی شیر خامِ تهیه شده از کارخانه لبنیات قبل از فرایند (پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون)، لیزینوآلانین وجود نداشت و در 5 نمونه‌ی شیر تهیه شده از مراکز فروش محصولات لبنی، مقادیر لیزینوآلانین به ترتیب صفر و 5 mg/kg بود. اساساً لیزینوآلانین ترکیبی است که در اثر فرایندهای حرارتی یا قلیایی در پروتئین‌ها تشکیل می‌شود و چون شیر خام قبل از تحویل به کارخانه لبنیات تحت هیچ گونه فرایند حرارتی یا شیمیایی قرار نمی‌گیرد، لیزینوآلانین ندارد. در یکی از نمونه‌های شیر خام مراکز فروش لبنیات لیزینوآلانین وجود داشت که احتمالا به دلیل حرارت دادن شیر خام به منظور افزایش زمان ماندگاری آن تا هنگام فروش بوده است. *Faist* در سال 2000 مقدار لیزینوآلانین را در 6 نمونه از شیرهای خام در محدوده‌ی 24-4 mg/kg گزارش کرد (17).

مقادیر لیزینوآلانینِ اندازه‌گیری شده در شیرهای پاستوریزه‌ی مصرفی در شهر تهران در محدوده‌ی 86-35/5mg/kg قرار داشت (جدول 1). در بین نمونه‌های شیر پاستوریزه، بالاترین غلظت لیزینوآلانین مربوط به نمونه pa2 بود که معادل 86/46 mg/kg است. کمترین غلظت لیزینوآلانین در نمونه pa6 با مقدار 35/52 mg/kg مشاهده شد.

در بین نمونه‌های شیر پاستوریزه، مقادیر لیزینوآلانین موجود در نمونه‌های pa1، pa5، pa8، pa10 و pa13 نزدیک به یکدیگر بود که نسبت به نمونه‌های pa4، pa7، pa9 و pa11 در حد پایین‌تری است.

Faist و همکاران در آلمان در سال 2000 مقادیر لیزینوآلانین شیر پاستوریزه را در محدوده‌ی 47-17mg/kg گزارش کردند که حدود 2 برابر کمتر از مقادیر گزارش شده در نمونه‌های شیر پاستوریزه مصرفی در شهر تهران است (17).

در نمونه‌های شیر استریلیزه، مقادیر اندازه‌گیری شده‌ی LAL در محدوده‌ی 232-97/35 mg/kg است. بالاترین مقدار لیزینوآلانین در نمونه‌ی St7 (232/54 mg/kg) و کمترین مقدار در نمونه‌ی St12 (97/35 mg/kg) به دست آمد.

در نمونه‌های شیر استریلیزه، مقدار لیزینوآلانین در نمونه‌های St12 و St1 مشابه یکدیگر و کمتر از سایر نمونه‌های استریلیزه بود و در نمونه‌های St6، St7 و St9 نیز تقریباً مشابه و بیشتر از سایر نمونه‌ها بود.

مقادیر LAL شیرهای استریلیزه در آلمان در سال‌های 1983، 1991 و 2000 به ترتیب 60-0mg/kg (17)، 186-49mg/kg (18)، 75-15mg/kg (19) بوده است. در کشور هلند در سال 1982 مقدار لیزینوآلانین در شیر استریلیزه 50-10 mg/kg (20) و *Antilla* در سال 1987 در کشور فنلاند 83-50mg/kg بود (21).

مقایسه‌ی بین مقادیر لیزینوآلانین موجود در نمونه‌های شیر خام و شیرهای پاستوریزه و استریلیزه نشان می‌دهد که اختلاف مقدار لیزینوآلانین بین این سه نوع شیر معنی‌دار است($P<0/05$). اختلاف معنی‌دار بین مقدار لیزینوآلانین در نمونه‌های شیر پاستوریزه با شیرهای استریلیزه، نشان‌دهنده‌ی تشکیل میزان بیشتر لیزینوآلانین در نمونه‌های شیر استریلیزه است. در فرایند پاستوریزاسیون شیر طبق استاندارد، دمای 72°C به مدت 15 ثانیه اعمال می‌شود، در حالی که در فرایند استریلیزاسیون دمای بالاتر (150-135°C) به مدت 5-2 ثانیه) اعمال می‌شود و پروتئین‌ها شیر در فرایند استریلیزاسیون در معرض دمای بالاتری قرار می‌گیرند و لیزینوآلانین بیشتری نیز در این نمونه‌ها تشکیل می‌شود. در کازئین شیر، قطعات مختلف پروتئینی وجود دارند که حامل گروه‌های فسفات هستند و با باقی‌مانده‌ی اسید آمینه‌ی سرین اتصال استری دارند. تعداد

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

باقیمانده‌های فسفوسرین موجود در هر مول از قطعات پروتئینی αs_0،αs_1، αs_2، β ، κ- کازئین در کازئین شیر به ترتیب 9، 8، 13-10، 5 و 1 است. از شکستن باقی‌مانده فسفوسرین در ملکول‌های کازئین، باقی‌مانده‌ی دهیدروآلانین ایجاد می‌شود که بسیار واکنش‌پذیر بوده و موجب ایجاد اتصالات عرضی با گروه آمین اپسیلون اسید آمینه لیزین موجود در همان زنجیر پروتئینی یا زنجیر دیگری می‌شوند و لیزینوآلانین به وجود می‌آید. در فرایند استریلیزاسیون به دلیل دمای بالا، فسفوسرین‌های بیشتری شکسته شده و میزان دهیدروآلانین تشکیل شده افزایش یافته و لیزینوآلانین بیشتری در شیرهای استریلیزه ایجاد می‌شود. وجود ترکیبات بتالاکتوگلوبولین و آلفالاکتالبومین در شیر نیز موجب تشکیل اتصالات عرضی شده و لیزینوآلانین تشکیل می‌شود (23، 22).

اثر دوره‌ی نگهداری بر تغییرات لیزینوآلانین در شیر استریل: در بررسی تغییرات لیزینوآلانین در طول دوره‌ی نگهداری شیر استریلیزه در دمای 25°C در روزهای مختلف (1، 7، 15، 30 و 60) مشخص شد که مقدار لیزینوآلانین به تدریج افزایش می‌یابد (شکل 2). در گزارش *Cattaneo* در سال 2008 در نمونه‌های شیر استریلیزه، میزان تغییرات لیزینوآلانین در نمونه‌های شیر در دمای 23 °C در دوره‌ی نگهداری بررسی شد. میزان LAL تا انتهای دوره‌ی نگهداری به تدریج افزایش پیدا کرد (24). علت این تغییرات فعالیت آنزیمی(آنزیم‌های پروتئولیتیک) و آزاد شدن لیزینوآلانین متصل به پروتئین‌های موجود در شیر ذکر شده است، ولی این مسئله به طور عملی مورد آزمایش و بررسی قرار نگرفته است و مطالعه بیشتری در این زمینه لازم است (25).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در شیرهای پاستوریزه و استریلیزه‌ی مصرفی در شهر تهران، لیزینوآلانین وجود دارد و روش HPLC و مشتق‌سازی با ترکیب دانسیل کلراید، روش مناسبی برای اندازه‌گیری ترکیب لیزینوآلانین در نمونه‌های شیر خام، پاستوریزه و استریلیزه است. مقدار لیزینوآلانین در شیرهای استریلیزه به دلیل فرایند در دمای بالا و زمان طولانی‌تر نسبت به شیرهای پاستوریزه بیشتر است. شیرهای خام چون تحت هیچ فرایند حرارتی قرار نمی‌گیرند، لیزینوآلانین وجود ندارند. در بسیاری از کارخانه‌ها ممکن است به دلیل بالا بودن آلودگی میکروبی شیرهای خام دریافتی و فرسوده بودن تجهیزات، کنترل دما و زمان به درستی صورت نگیرد و به منظور از بین بردن میکروارگانیسم‌ها، دما و مدت زمان حرارت دادن افزایش یابد که در نتیجه لیزینوآلانین بیشتری در شیر تشکیل می‌شود و اسید آمینه‌ی لیزین موجود در پروتئین شیر که یکی از اسیدهای آمینه ضروری است، در اثر تشکیل لیزینوآلانین غیر قابل دسترس شود. این کار به معنی کاهش ارزش تغذیه‌ای شیر است. هم‌چنین، مقایسه‌ی مقادیر لیزینوآلانین در نمونه‌های شیر پاستوریزه و استریلیزه در تحقیق حاضر با نتایج گزارش شده در کشورهای دیگر نشان می‌دهد که مقدار ترکیب لیزینوآلانین در شیرهای پاستوریزه و استریلیزه‌ی مصرفی در شهر تهران بیشتر است. با توجه به صدمات حرارتی فرایندها بر شیرهای مصرفی و ترکیبات ایجاد شده که اثرات زیانباری بر سلامت انسان دارند، کنترل دقیق فرایندهای حرارتی در تولید شیر پاستوریزه و استریلیزه ضروری است.

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل یک طرح پژوهشی است که بودجه‌ی آن توسط *انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور* تأمین شده است. بدین وسیله از مسئولان و کلیه‌ی همکاران محترم آن مرکز به ویژه معاونت محترم پژوهشی سپاسگزاری می‌شود.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

- **References**

1. Moret S, Cherubin S , Rodriguez-Estrada M T, Lercker G. Determination of lysinoalanine by high performance liquid chromatography. J High Resolut Chrom. 1994; 17:827-30.

2. Pellegrino L, Resmini P, Noni I.D, Masotti F. Sensitive determination of lysinoalanine for distinguishing natural from imitation Mozzarella cheese . J Dairy Sci 1996;79: 725-34.

3.Bosch L. Sanz ML, Montilla A, Alegría A, Farré R, del Castillo MD. Simultaneous analysis of lysine, N- carboxymethyllysine and lysinoalanine from proteins. J Chromatogr B 2007; 860:69-77.

4. Friedman M, Finle JW, Yeh LS. Reactions of proteins with dehydroalanines Adv Exp Med Biol 1977;86 : 213-24 .

5. Whitaker JR , Feeney RE. Behaviour of O-glycosyl and O-phosphoryl proteins in alkaline solution.In: Friedman M, editor. Protein cross linking, nutritional and medical consequences- advances in experimental medicine and Biology , vol 86B, New York: Plenum press; 1977.

6. Friedman M. Dietary significance of processing-induced lysinoalanine .In:Stadler,R. Line back, D. editor. Process-induced food toxicants. Canada, John Wiley& sons publication, 2009; 475-508.

7. Finot PA. Lysinoalanine in food proteins. Nutr Abs Reviews 1983; 53:67-80.

8. Hasegawa K , Okamoto N , Ozawa H , Kitajima S , Takado Y. Limits and sites of lysinoalanine formation in lysozyme, α - lactalbumin and αs_1 and β - caseins by alkali treatment . Agric Biol Chem 1981; 45: 1645-51.

9. Hayashi R. Lysinoalanine as a metal chelator. An implication for toxicity. J Biol Chem 1982; 257: 13896-8.

10. Friedman M , Grosjean O K , Zahnley JC. Carboxypeptidase inhibition by alkali - treated food proteins. J Agric Food Chem 1985; 33 : 208-13.

11. Corpet D, Tache S, Sylviane A, Michael C, Bruce WR. Dehydroalanine and lysinoalanine in thermolyzed casein do not promote colon cancer in the rat. Fd. Cosmet. Toxicol .2008;46:3037-42

12. Karayiannis NI , MacGregor JT. Lysinoalanine formation in alkali-treated proteins and model peptides. Fd. Cosmet. Toxicol 1979;17:585-90.

13. D'Agostina A, Boschin G, Rinaldi A, Arnoldi A. Updating on the lysinoalanine content of commercial infant formulae and beicost products. Food chem 2003;80:483-8.

14. Boschin G , D 'Agostina A. , Rinaldi A , Arnoldi A. Lysinoalanine content of formulas for enteral nutrition . J Dairy Sci 2003;86 : 2283-7.

15. Montilla A, Gomez-Ruiz JA, Olano A, del Castillo MD. A GC-FID method for analysis of lysinoalanine. Mol Nutr Food Res 2007;51:415-422

16. Provansal MP ,Cheftel JC. Chemical and nutritional modifications of sunflower proteins due to alkaline processing. J Agric Food Chem,1975;23:938-43.

17. Faist V, Drusch S, Kiesner C, Elmadfa I , Erbersdobler HF. Determination of lysinoalanine in foods containing milk protein by high-performance chromatography after derivatisation with dansyl chloride. Int dairy J. 2000;10:339-46.

18. Fritsch R J , Hofmann H, Klostermeyer H. Formation of lysinoalanine during heat treatment of milk. Z Lebensm Unters Forsch 1983; 176: 341-45.

19. Dehn-MuK ller B, Erbersdobler H F. Studies on protein damage in UHT Milk. Milchwissenschaft 1991; 46: 431-4.

20. De Koning, J P, Van Rooijen P J. Aspects of the formation of lysinoalanine in milk and milk products. J Dairy Res .1982;49: 725-36.

21. Antila P, Pullinen E, Antila V. The formation and determination of lysinoalanine in foods containing milk protein . Meijeritieteellinen Aikakauskirja 1987; 1: 1-18.

22. Friedman M. Lysinoalanine in food and in antimicrobial proteins . Adv Exp Med Biol 1999;459:145-59.

23. Annan W.D ,Manson,W.The production of lysinoalanine and related substances during processing of proteins. Food chem 1980;6:255-61.

24. Cattaneo S, Masotti F , Pellegrino L. Effect of over processing on heat damage of UHT milk. European food research and technology 2008; 226(5):1099-1106

25. Friedman M. Chemistry, biochemistry, nutrition and microbiology of lysinoalanin, lanthionine and histidoalanine in food and other proteins. J Agric Food Chem 1999 ;47:1295-19.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

Determination of lysinoalanine in pasteurized and sterilized milks consumed in the city of Tehran, 2011

Khorshidian N[1],Taslimi A[2], Mashayekh M[3], Azadniya E[4]*

1- M.Sc in Food Science and Technology, Students' Research Committee, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Tehran, Iran

*2-*Corresponding Author: Lecturer, Dept. of of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: Taslimifeyzipour@yahoo.com*

3- Assistant Prof, Dept. of of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- M.Sc in Analytical Chemistry, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received 20 Nov, 2012 **Accepted 11 Mar, 2013**

Background and objective: Milk pasteurization and sterilization processes prolong its shelf-life and also promote the safety of dairy products. On the other hand, these processes can also have adverse effects on the nutritional quality and safety of milk and dairy products. Formation of cross-linkages between amino acids in the protein molecules may produce undesirable compounds, e.g., *lysinoalanine* (LAL), resulting in reduced availability of some of the essential amino acids, as well as nephrotoxicity effects. The aim of this project was to determine the LAL content of pasteurized and sterilized milks consumed in the City of Tehran.

Materials and Methods: Determination of protein in milk samples was done by the Kjeldahl method. Hydrolysis of milk proteins was done using 6N hydrochloric acid and placing the samples in the oven at 110 0C for 22 hours. The hydrolyzed protein samples were then dissolved in distilled water and the pH was adjusted to 9 by addition of 12N sodium hydroxide. For derivitization of the liberated LAL, dansylation was done by adding dansyl chloride (10mg/ml isopropyl alcohol) at 40°C for 60 minutes. LAL then measured in the samples by high performance-liquid chromatography.

Results: The LAL content of raw milk samples obtained from a milk processing plant and dairy shops was zero and 5 mg/kg, respectively, while it was 35-86mg/kg in the pasteurized, and 110-233mg/kg in the sterilzed, samples. In addition, the data showed that the LAL content of sterile milk samples would increase gradually at days 1, 7, 15, 30 and 60 during storage at 25°C.

Conclusion: The findings of this study show that lysinoalanine is prsesent in both pasteurized and sterilized milks, it being higher in the latter. In addition, the lysinoalanine contents of pasteurized and sterilized milks consumed in Tehran are higher than those in other countries. Considering that both children and adults consume milk daily in Tehran, controlling lysinoalanine content in pasteurized and sterilized milks marketed (by contolling time amd temperature) is of utmost importance.

Keywords: Milk, Pasteurization, Sterilization, Lysinoalanine, HPLC

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]