مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هفتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات ۹-۱

بررسی اثر نوع آنزیم و غلظت کربن فعال بر کارایی حذف فنیل‌آلانین از شیر

عاطفه امیری ریگی[۱]، مهرداد محمدی[۲]، زهرا امام جمعه[۳]، محمد امین محمدی‌فر[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- محقق، گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- دانشیار، آزمایشگاه پدیده‌های انتقال، گروه علوم، فناوری و مهندسی غذایی، دانشکده مهندسی و تکنولوژی کشاورزی، پردیس کشاورزی دانشگاه تهران
۴- نویسنده مسئول: دانشیار گروه آموزشی علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. پست الکترونیکی: mohamdif@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۳

چکیده

سابقه و هدف: فنیل‌کتونوری یک بیماری ارثی است که به دلیل فقدان یا نقص در فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز پدید می‌آید. شدیدترین عارضه بالینی ناشی از آن، عقب‌ماندگی ذهنی غیر قابل برگشت است. امروزه، محدود کردن فنیل‌آلانین رژیم غذایی تنها راه مقابله با این بیماری محسوب می‌شود. هدف از این تحقیق، تولید شیر کم فنیل‌آلانین در مقیاس آزمایشگاهی به عنوان یک مکمل تغذیه‌ای برای بیماران فنیل‌کتونوری بود. به این ترتیب، می‌توان از شیر کم فنیل‌آلانین تهیه شده برای تولید انواع غذاها و نوشیدنی‌های مطلوب با محتوای فنیل‌آلانین کم استفاده کرد.

مواد و روش‌ها: سه نمونه شیر هیدرولیز شده آنزیمی با استفاده از پروتئاز *آسپرژیلوس اوریزا* (۱ گرم آنزیم به ازای ۱۰۰ گرم سوبسترا) و پاپایین (۱ گرم آنزیم به ازای ۱۰۰ گرم سوبسترا) به صورت جداگانه و در ترکیب با هم (۰/۵ گرم از هر آنزیم به ازای ۱۰۰ گرم سوبسترا) تهیه شد و کربن فعال در مقادیر مختلف (۰/۳، ۰/۹ و ۱/۵ گرم) برای حذف فنیل‌آلانین به کار رفت.

یافته‌ها: ترکیب *پروتئاز آسپرژیلوس اوریزا* با پاپایین (هرکدام به میزان ۰/۵ گرم به ازای ۱۰۰ گرم سوبسترا) و در مرحله بعد از هیدرولیز آنزیمی، استفاده از ۰/۹ گرم کربن فعال، کمترین میزان نهایی فنیل‌آلانین را در برداشت.

نتیجه‌گیری: از میان شرایط هیدرولیز به کار رفته، بهترین شرایط برای حذف فنیل‌آلانین استفاده از *پروتئاز آسپرژیلوس اوریزا* (۰/۵ گرم آنزیم به ازای ۱۰۰ گرم سوبسترا) به همراه پاپایین (۰/۵ گرم آنزیم به ازای ۱۰۰ گرم سوبسترا) و ۰/۹ گرم کربن فعال در مرحله بعد از هیدرولیز بود که باعث حذف ۹۹٪ فنیل‌آلانین شد.

واژگان کلیدی: شیر کم فنیل‌آلانین، کربن فعال، هیدرولیز آنزیمی، طیف سنجی مشتق ثانویه

• مقدمه

فقدان و یا نقص در فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز (PAH) به بیماری فنیل‌کتونوری منجر می‌شود. این آنزیم عامل تبدیل اسیدآمینه فنیل‌آلانین به اسیدآمینه تیروزین در بدن است (۲، ۱) و فقدان یا نقص در فعالیت آن به تجمع فنیل‌پیرووِیک اسید در خون منجر می‌شود. شدیدترین عارضه بالینی ناشی از این بیماری، عقب‌ماندگی ذهنی غیرقابل برگشت است (۳، ۲). مصرف شیر و مواد غذایی با محتوای فنیل‌آلانین کم زیر نظر کارشناس تغذیه، تنها راه درمان موجود این بیماری ارثی است. آغاز به موقع برنامه غذایی، انجام منظم آزمایش تعیین سطح فنیل‌آلانین خون به همراه بررسی وضعیت بالینی، تغذیه و تأثیر درمان به صورت دوره‌ای، به رشد طبیعی و زندگی همراه با سلامت کودکِ دارای این نقص کمک می‌کند (۴).

Folling اولین شخصی بود که فنیل‌کتونوری را در سال ۱۹۳۴ توضیح داد و این بیماری را به علت عقب‌ماندگی ذهنی و ظهور فنیل‌پیرووِیک در ادرار "کند ذهنی فنیل-پیرووِیک" نامید (۳). *Lionel Penrose* متخصص ژنتیک از انگلستان، به دلیل ویژگی ظهور فنیل‌کتون (فنیل‌پیرووِیک - اسید) در ادرار، واژه "فنیل‌کتونوری" را برای توصیف این بیماری به کار برد (۵). *Bickel* برای اولین بار رژیم با فنیل-آلانین محدود را برای درمان بیماران فنیل‌کتونوری پیشنهاد و اجرا کرد (۶). *Woo* در سال ۱۹۸۳ برای اولین بار ژن فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز را توضیح داد و جهش ژن کد-

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-06]

کننده این آنزیم را دلیل نقص در فعالیت آنزیم PHA معرفی کرد (۳).

هیدرولیز پروتئین‌ها و ترکیب اسیدهای آمینه سنتزی، دو روش عمده برای تهیه یک منبع پروتئینی به منظور تأمین نیاز پروتئینی بیماران فنیل کتونوری هستند (۷). در این میان، هیدرولیز پروتئین‌ها به دلیل قابلیت به کارگیری در مقیاس بزرگ، قیمت مناسب و کیفیت بالای محصول، مناسب‌ترین روش به نظر می‌رسد (۸). هیدرولیز پروتئین‌ها می‌تواند توسط آنزیم، اسید یا قلیا انجام شود. کنترل فرایند در هیدرولیز اسیدی و قلیایی مشکل است و به کارگیری این روش‌ها باعث تولید محصولاتی با کیفیت تغذیه‌ای پایین می‌شود. لازم به ذکر است که هیدرولیز شیمیایی می تواند فرم L اسیدهای آمینه را از بین ببرد و باعث تولید فرم D اسیدهای آمینه شود. هم‌چنین، مشخص شده است که این روش‌ها می‌توانند باعث ایجاد ترکیبات سمّی نظیر لیزینوآلانین گردند. در مقابل در روش هیدرولیز آنزیمی که تحت شرایط ملایم pH (۶ تا ۸) و دما (۴۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد) صورت می‌گیرد، واکنش‌های جانبی به حداقل می‌رسد و ترکیب کلی اسیدهای آمینه در این حالت شبیه ماده اولیه خواهد بود. از طرف دیگر، محصول به دست آمده در روش هیدرولیز آنزیمی از مزیت‌های تکنولوژیکی برخوردار است، مانند: حلالیت بیشتر، پایداری حرارتی و مقاومت نسبتاً بالا به بسیاری از عوامل نظیر pH و یون‌های فلزی (۹، ۷).

تاکنون، تلاش‌های فراوانی به منظور تولید مکمل‌های پروتئینی توسط روش هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های شیر و آب پنیر صورت گرفته است (۱۶-۱۰). *Delvivo* و همکاران (۲۰۰۶) به منظور تولید یک مکمل غذایی برای بیماران فنیل‌کتونوری، از پروتئین آب پنیر به عنوان منبع پروتئینی استفاده کرده و اثر نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و اولترافیلتراسیون را روی حذف فنیل‌آلانین بررسی کردند (۱۱). *Lara* و همکاران (۲۰۰۵) از دیاستاز شیره لوزالمعده، تریپسین و کیموتریپسین (۶/۳ وزنی/ وزنی پروتئین) برای هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های محلول در آب شیر و فیلتراسیون ژل در مرحله بعد از هیدرولیز استفاده کردند. به این ترتیب آن‌ها به محصولی دست یافتند که ترکیب عمومی اسیدهای آمینه آن شبیه پروتئین‌های محلول در آبی بود که از آن تهیه شده بود و می‌توانست بعد از اضافه کردن اسیدهای آمینه آروماتیک مناسب، به عنوان یک منبع نیتروژن برای بیماران فنیل‌کتونوری یا تیروزینمیا (Tyrosinemia) استفاده شود (۱۲). *Soares* و همکاران (۲۰۰۶) برای هیدرولیز آنزیمی شیر بدون چربی از پاپایین (PA) و پپسین (PE) به تنهایی و در ترکیب با پروتئاز *آسپرژیلوس اوریزا* (AO) استفاده کردند. سپس با هدف استفاده از محصول هیدرولیز آنزیمی برای تهیه مکمل تغذیه‌ای برای بیماران فنیل‌کتونوری از کربن فعال برای حذف فنیل‌آلانین استفاده شد. در حالتی که پاپایین و پپسین به تنهایی استفاده شدند و نیز استفاده از پاپایین و به دنبال آن پروتئاز *آسپرژیلوس اوریزا* بالاترین میزان حذف فنیل‌آلانین ۹۷ تا ۹۸ درصد بود (۱۵).

با این حال، متغیرها و سطوح متغیرهای مطالعه شده در تحقیق حاضر تاکنون بررسی نشده و در ایران تولید محصولات با محتوای فنیل‌آلانین کم جهت رفع نیاز تغذیه‌ای بیماران فنیل کتونوری مورد بررسی قرار نگرفته است.

هدف این پژوهش، استفاده از شیر چربی گرفته شده به عنوان منبع پروتئینی و بررسی اثر دو آنزیم پروتئولیتیک حاصل از *آسپرژیلوس اوریزا* و پاپایین به صورت جداگانه و در ترکیب با هم بر کارایی حذف فنیل‌آلانین و بررسی اثر مقادیر مختلف کربن فعال بر کاهش محتوای اسیدآمینه آزاد فنیل‌آلانین در مرحله بعد از هیدرولیز بود.

• مواد و روش‌ها

مواد: شیر خام چربی گرفته شده (حاوی ۳/۳٪ پروتئین) از کارگاه لبنیات پردیس *کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج)* تهیه شد. L-متیونین، L-تریپتوفان، L-تیروزین، L- فنیل‌آلانین، پروتئاز *آسپرژیلوس اوریزا* (P6110) و پاپایین به دست آمده از شیره پاپایا (P4762) از شرکت *Sigma* (آمریکا) خریداری شد. کربن فعال گرانولی با اندازه ذرات ۱ تا ۳میلی‌متر از شرکت *AppliChem* (آلمان) تهیه شد. بافر فسفات (pH=۶)، فسفات سدیم دی‌بازیک (pH=۶)،کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و تری‌کلرو استیک اسید از شرکت *Merck* (آلمان) خریداری شد.

روش‌ها

آزمون‌های شیمیایی: آزمایش‌های مربوط به ویژگی‌های کیفی نمونه شیر تازه مورد استفاده و شیر کم فنیل‌آلانین بعد از تیمار با کربن فعال شامل تعیین خاکستر، ماده خشک، pH، پروتئین و چربی طبق روش‌های AOAC انجام شد (۱۷).

تهیه هیدرولیز آنزیمی: ۹ نمونه (سه تکرار برای هر تیمار) هرکدام به حجم ۱۰۰ ml بعد از تنظیم pH با بافر فسفات

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-06]

(pH=۶)، تحت حرارت اولیه ۸۰°C به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفتند (۱۱)، سپس دمای نمونه‌ها تا ۵۰°C کاهش داده شد. به سه نمونه اول (H_1) آنزیم AO (*آسپرژیلوس اوریزا*) به نسبت ۱:۱۰۰ حجمی/ حجمی (آنزیم: سوبسترا)، به سه نمونه دوم (H_2) آنزیم PA (پاپایین به دست آمده از شیره پاپایا) به نسبت ۱:۱۰۰ حجمی/ حجمی و به سه نمونه سوم (H_3) آنزیم AO به همراه PA (هر کدام به نسبت ۰/۵: ۱۰۰ حجمی/حجمی) اضافه شد. همه نمونه‌ها به مدت ۶ ساعت تحت هیدرولیز آنزیمی در دمای ۵۰°C قرار گرفتند. بعد از اتمام زمان هیدرولیز، واکنش هیدرولیز آنزیمی با حرارت دادن در حمام آب گرم ۹۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه و سپس کاهش دما تا ۲۰°C- (به منظور اطمینان از توقف واکنش هیدرولیز) متوقف شد (۱۸). نمونه اولیه آنزیم پروتئاز آسپرژیلوس اوریزا به صورت مایع و خلوص آن ۹۸٪ و یا بیشتر بود. پاپایین به صورت پودر لیوفیلیزه با درجه خلوص ۹۸٪ و یا بیشتر بود و دقیقاً قبل از استفاده طبق دستورالعمل شرکت سازنده، محلول ۱۰ mg/ml با استفاده از بافر شامل ۵ میلی مول L- سیستئین تهیه شد.

تعیین درجه هیدرولیز: نیتروژن پروتئینی نمونه هیدرولیز شده آنزیمی با استفاده از تری‌کلرو استیک اسید ۱۲٪ رسوب داده شد. محتوای نیتروژن محلول رویی (نیتروژن غیرپروتئینی) با روش میکروکلدال اندازه‌گیری شد و درجه هیدرولیز از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

درجه هیدرولیز (٪)= نیتروژن غیرپروتئینی/ نیتروژن کل × ۱۰۰۱۴ (۱۸).

جذب با کربن فعال: برای تعیین غلظت بهینه کربن فعال از شاخص در معرض گذاری ER (Exposure Rate) استفاده شد که غلظت اسیدآمینه آزاد فنیل‌آلانین را در نمونه نشان می‌دهد. مقادیر مختلف کربن فعال (۰/۳، ۰/۹ و ۱/۵ گرم به ازای گرم سوبسترا) به سه نمونه هیدرولیز شده آنزیمی H_1 اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵°C روی همزن قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها با دور ۹۵۰۰ g در ۲۵°C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و محلول رویی هر نمونه از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد (۱۸). جذب محلول رد شده از صافی در طول موج‌های ۲۵۰ تا ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس طیف مشتق ثانویه رسم و محاسبه ER فنیل‌آلانین به کمک ارتفاع پیک‌های منفی و منحنی استاندارد فنیل‌آلانین و معادله زیر صورت گرفت (۱۸).

معادله ۱ $$ER\ (\%) = ۱۰۰ - [(B / A) \times ۱۰۰]$$

A: میزان در معرض‌گذاری فنیل‌آلانین در شیر هیدرولیز شده آنزیمی قبل از تیمار با کربن فعال

B: میزان در معرض‌گذاری فنیل‌آلانین در شیر هیدرولیز شده آنزیمی بعد از تیمار با کربن فعال

غلظت کربن فعال که باعث ER بالاتری می‌شود، تعیین و از آن برای همه تیمارهای آنزیمی باقی‌مانده استفاده شد.

تعیین کارایی حذف فنیل‌آلانین: میزان کربن فعال که بالاترین درصد ER را نتیجه می‌دهد، در مرحله قبل تعیین و از آن برای حذف فنیل‌آلانین از تمامی نمونه‌های هیدرولیز شده آنزیمی استفاده شد. بعد از سانتریفوژ و عبور دادن محلول رویی از کاغذ صافی ۱۰ml از مایع زیر صافی روی بن‌ماری تبخیر و به وسیله اسید کلریدریک ۵/۷ مول بر لیتر در دمای ۱۱۰°C به مدت ۲۴ ساعت هیدرولیز شد. باقی‌مانده در ۱۰ml آب مقطر حل شد. pH با استفاده از محلول فسفات سدیم دی بازیک ۱ مول بر لیتر روی ۶ تنظیم شد و جذب محلول حاصل با استفاده از طیف‌سنج در ۲۵۰ تا ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. طیف مشتق ثانویه رسم و از ارتفاع پیک‌های منفی برای محاسبه مقدار اسیدآمینه فنیل‌آلانین در نمونه‌های شیر هیدرولیز شده آنزیمی با به کارگیری منحنی استاندارد فنیل‌آلانین استفاده شد. برای شیر چربی گرفته شده اولیه از روش مشابهی استفاده شد و کارایی حذف فنیل‌آلانین با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد.

معادله ۲ $$\text{Phe Removal}\ \% = \frac{A-B}{A} \times ۱۰۰$$

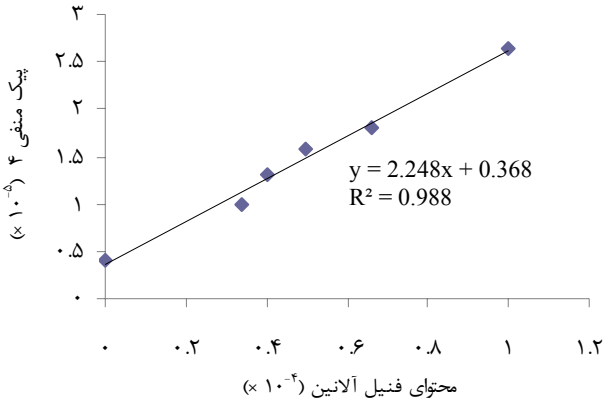
A: مقدار اولیه فنیل‌آلانین در شیر قبل از هیدرولیز آنزیمی

B: مقدار نهایی فنیل‌آلانین در شیر بعد از تیمار با کربن فعال (۱۸).

تعیین میزان فنیل‌آلانین با استفاده از طیف مشتق ثانویه: محلول‌های اولیه فنیل‌آلانین (۶/۰۵×۱۰$^{-۴}$ mol/l)، تیروزین (۵/۵۲ × ۱۰$^{-۴}$ mlo/l) و تریپتوفان (۴/۹۰ × ۱۰$^{-۴}$ mol/l) در بافر فسفات ۰/۰۱ mol/l با pH=۶ تهیه شدند. ۱۰ml از هر سه محلول را برداشته و با هم مخلوط شدند. از مخلوط حاصل رقت‌های متوالی تهیه شد؛ به صورتی که غلظت فنیل‌آلانین در آن‌ها از ۰/۱۳ × ۱۰$^{-۴}$ mol/l تا ۱/۰۱ × ۱۰$^{-۴}$ mol/l بود. طیف جذبی رقت‌های حاصل در ۲۵۰ تا ۲۸۰ نانومتر ثبت و طیف مشتق ثانویه به عنوان تابعی از طول موج رسم شد. ۸ منحنی استاندارد شامل ۲ منحنی برای هر پیک منفی، با استفاده از ارتفاع پیک‌ها، بر اساس غلظت فنیل‌آلانین رسم شد. منحنی استاندارد فنیل‌آلانین با

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-06]

بالاترین ضریب همبستگی با استفاده از ارتفاع پیک منفی چهارم به دست آمد (شکل ۱). ضریب همبستگی و معادله منحنی به ترتیب R^2=۰/۹۸۸ و y= ۲/۲۴۸x + ۰/۳۶۸ بودند. این نتایج شبیه نتایج به دست آمده توسط سایر محققان بود که درحضور تیروزین و تریپتوفان یک منحنی استاندارد خطی برای فنیل‌آلانین به دست آوردند (۲۰).



شکل ۱. منحنی استاندارد فنیل‌آلانین
پیک ۴: پیک منفی در طیف مشتق ثانویه فنیل‌آلانین

تعیین پروفایل اسیدهای آمینه: برای تعیین پروفایل اسیدهای آمینه از دستگاه HPLC و روش PICO.TAG استفاده شد. در روش PICO.TAG از ستون PICO.TAG استفاده شد که یک ستون C-18 انتخاب شده و آزمایش شده برای آنالیز اسیدهای آمینه فنیل تیوکاربامیل است. این روش شامل سه مرحله هیدرولیز نمونه پروتئین یا پپتید به منظور تولید اسیدهای آمینه آزاد، مشتق‌سازی نمونه و آنالیز نمونه با HPLC فاز معکوس بود. قبل از تزریق نمونه به ستون، نمونه‌های پروتئین و پپتید در ابتدا با اسید کلریدریک هیدرولیز و سپس با فنیل‌ایزوتیوسیانات (PITC) به منظور تولید اسیدهای آمینه فنیل‌تیوکاربامیل (PTC) مشتق‌سازی می‌شوند سپس، مشتق اسیدهای آمینه با HPLC آنالیز می‌شود (۲۱).

اضافه کردن اسیدهای آمینه متیونین، تیروزین و تریپتوفان: پروفایل اسیدهای آمینه فقط در تیماری تعیین شد که بالاترین کارایی حذف فنیل‌آلانین را داشت. به دلیل کاهش مقدار اسیدهای آمینه متیونین، تیروزین و تریپتوفان، این اسیدهای آمینه بر اساس الگوی FAO/WHO به نمونه شیر کم فنیل‌آلانین بعد از تعیین پروفایل اسیدهای آمینه افزوده شدند (۱۸).

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: آنالیز آماری یافته‌ها با استفاده از روش تجزیه آنالیز واریانس (ANOVA) و به کمک نرم افزار SPSS انجام شد.

• یافته‌ها

اثر میزان کربن فعال بر حذف فنیل‌آلانین: جدول ۱ میزان در معرض‌گذاری فنیل‌آلانین را در محلول‌های رد شده از صافی (F_1، F_2 و F_3) بعد از تیمار با کربن فعال نشان می‌دهد. از بین سه مقدار کربن فعال مورد آزمون برای حذف فنیل‌آلانین از شیر هیدرولیز شده آنزیمی، بهترین میزان کربن فعال ۰/۹ گرم به ازای گرم سوبسترا به دست آمد؛ زیرا بالاترین میزان در معرض‌گذاری فنیل‌آلانین را نتیجه داد.

جدول ۱. میزان در معرض‌گذاری فنیل‌آلانین در محلول‌های رد شده از صافی بعد از تیمار با کربن فعال

میزان در معرض‌گذاری (ER)	محلول رد شده از صافی (filtrates of hydrolysates)
۹۷/۲۹^a±۰/۱۶	F_1
۹۸/۲۱^b±۰/۲۸	F_2
۹۷/۵۵^a±۰/۲۴	F_3

مقادیر دارای حروف متفاوت، با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند (p<۰/۰۵).

اثر نوع آنزیم بر کارایی حذف فنیل‌آلانین: جدول ۲ کارایی حذف فنیل‌آلانین را در نمونه‌های هیدرولیز شده آنزیمی ۱، ۲ و ۳ نشان می‌دهد. با مطالعه داده‌های جدول ۲ می‌توان نتیجه گرفت که شرایط ذکر شده در بخش تیمار با کربن فعال برای حذف فنیل‌آلانین از کلیه نمونه‌های هیدرولیز شده آنزیمی شیر کافی است و کاهش فنیل‌آلانین در این شرایط ۹۶ تا ۹۹ درصد بود.

جدول ۲. نتایج تعیین کارایی حذف فنیل‌آلانین

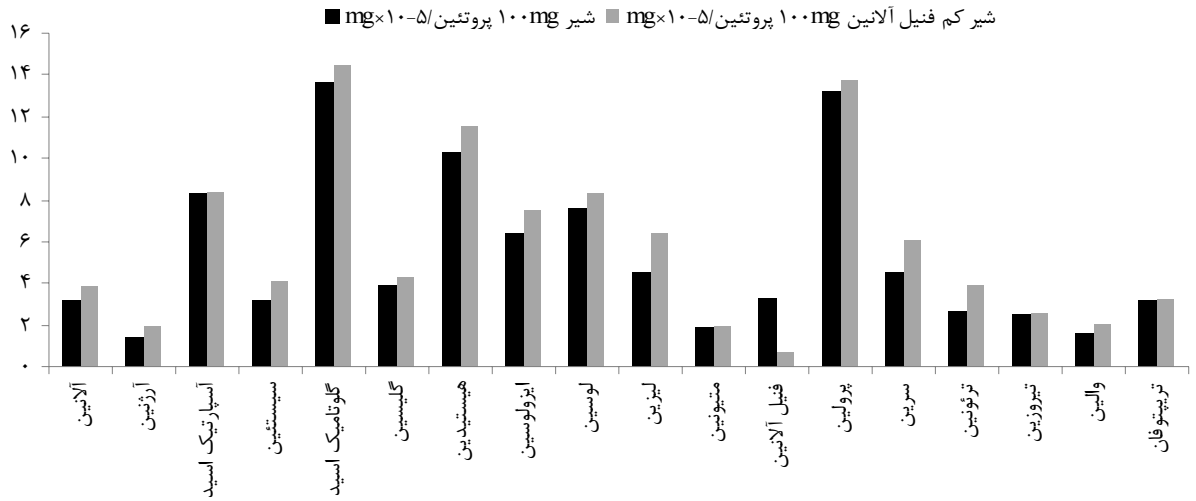
هیدرولیز آنزیمی	مقدار نهایی فنیل‌آلانین* mg ×۱۰$^{-۴}$ پروتئین/۱۰۰ mg	درصد حذف
H_1	۰/۱۸۳^a±۰/۰۲۵	۹۷^a±۰
H_2	۰/۲۸۳^a ±۰/۰۸۷	۹۶^a±۱
H_3	۰/۰۷۳^b±۰/۰۱۵	۹۹^b±۰

مقادیر دارای حروف متفاوت، با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند (p<۰/۰۵).
*مقدار فنیل‌آلانین بعد از تیمار با کربن فعال محاسبه شده با استفاده از معادله ۲

پروفایل اسیدهای آمینه: با توجه به این که بهترین تیمار از نظر کاهش مقدار فنیل‌آلانین، تیمار شماره ۳ (H_3) بود، پروفایل اسیدهای آمینه برای نمونه H_3 تعیین شد. پروفایل اسیدهای آمینه در شیر اولیه و شیر هیدرولیز شده آنزیمی

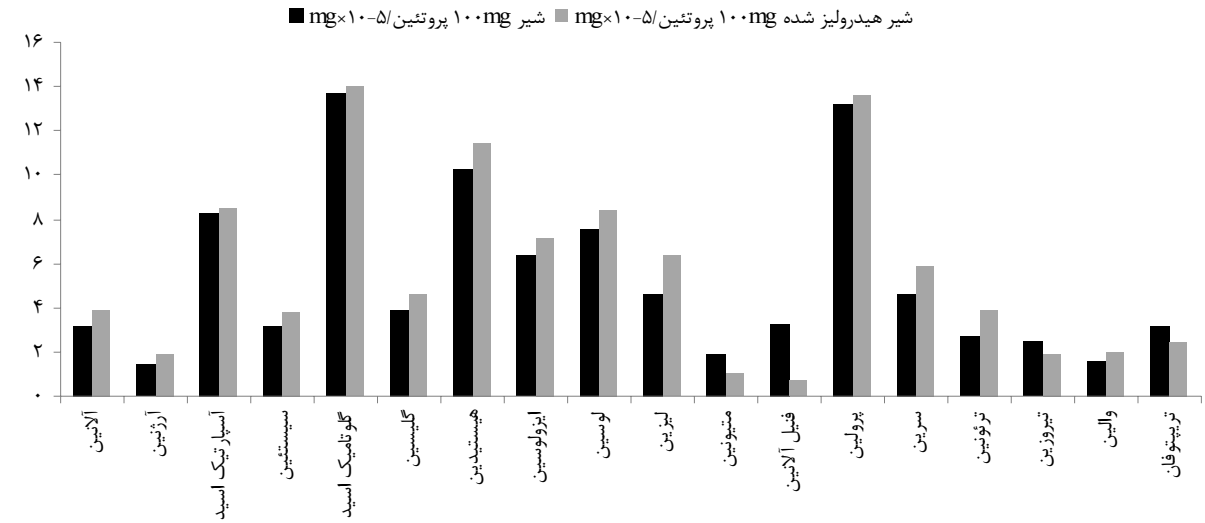
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-06]

H_3 بعد از تیمار با کربن فعال در شکل ۲ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، مقدار فنیل‌آلانین در شیر هیدرولیز شده آنزیمی بعد از تیمار با کربن فعال $۰/۶۹ \times ۱۰^{-۵}$ میلی‌گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌گرم پروتئین و در شیر قبل از هیدرولیز آ آنزیمی $۳/۳ \times ۱۰^{-۵}$ میلی‌گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌گرم پروتئین است. مقدار متیونین، تیروزین و تریپتوفان در شیر هیدرولیز شده آنزیمی بعد از تیمار با کربن فعال نسبت به شیر اولیه کمتر بود. نسبت اسیدهای آمینه دیگر در شیر هیدرولیز شده آنزیمی بعد از تیمار با کربن فعال نسبت به شیر اولیه بیشتر تشخیص داده شد. در نتیجه، به منظور رسیدن به مقدار اولیه اسیدهای آمینه، سه اسید آمینه متیونین، تیروزین و تریپتوفان بر اساس الگوی FAO/WHO به نمونه شیر هیدرولیز شده آنزیمی افزوده شدند (۱۸) و سپس پروفایل اسیدهای آمینه در شیر کم فنیل‌آلانین حاصل توسط HPLC تعیین شد (شکل ۳).



شکل ۲. مقایسه پروفایل اسیدآمینه در شیر و شیر کم فنیل‌آلانین حاصل از هیدرولیز آنزیمی ۳ (H_3)

برای هر اسید آمینه، ستون‌های دارای حروف متفاوت، با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند($p<۰/۰۵$).



شکل ۳. مقایسه پروفایل اسیدآمینه در شیر و شیر کم فنیل‌آلانین حاصل از هیدرولیز آنزیمی ۳ (H_3) بعد از افزودن اسیدهای آمینه متیونین، تیروزین و تریپتوفان

برای هر اسید آمینه، ستون‌های دارای حروف متفاوت، با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند($p<۰/۰۵$).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-06]

• بحث

تعیین بهترین میزان کربن فعال: از بین سه مقدار کربن فعال مورد آزمون برای حذف فنیل‌آلانین از هیدرولیز آنزیمی شیر، بهترین میزان کربن فعال ۰/۹ گرم به ازای گرم پروتئین بود؛ زیرا بالاترین میزان در معرض‌گذاری فنیل‌آلانین را نشان داد (جدول ۱). با به کارگیری ۰/۹ گرم کربن فعال برای همه نمونه‌های هیدرولیز شده آنزیمی، کارایی حذف فنیل‌آلانین ۹۶ تا ۹۹ درصد به دست آمد (جدول ۲) که نشان می‌دهد، میزان کربن فعال مورد استفاده، سطح کافی برای جذب فنیل‌آلانین موجود در نمونه‌ها را فراهم می‌کند. یک توضیح احتمالی برای عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین F_1 و F_3 حضور مقادیر بیشتر فنیل‌آلانین در زنجیره‌های پپتیدی بزرگ در نمونه‌های هیدرولیز شده آنزیمی حاصل از شیر است که می‌تواند از حذف آن ممانعت کند. همان طور که *Shimamura* و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند، زمانی که فنیل‌آلانین به اندازه کافی توسط فرایند هیدرولیز آنزیمی آزاد نشده، تنها مقدار کمی از این اسیدآمینه می‌تواند توسط فیلتراسیون ژل یا کربن فعال حذف شود (۲۲).

تعیین بهترین تیمار آنزیمی: با مطالعه داده‌های جدول ۲ می‌توان نتیجه گرفت که تأثیر پروتئاز *آسپرژیلوس اوریزا* (H_1) به تنهایی، نتایجی شبیه عمل پاپایین (H_2) به تنهایی ارائه می‌دهد؛ زیرا تفاوت معنی‌داری بین H_1 و H_2 مشاهده نشد. با توجه به این که در پژوهش حاضر شرایط هیدرولیز Lopez-*Bajonero* و همکاران (۱۹۹۱) به کار گرفته شد، در مقایسه با حذف ۹۲٪ فنیل‌آلانین توسط این محققان، ما قادر به حذف ۹۶ تا ۹۹ درصد از این اسیدآمینه شدیم. این اختلاف می‌تواند در ارتباط با مقادیر بالاتر کربن فعال در تحقیق حاضر (بیش از ۳۰ برابر) با شرایط استفاده از کربن فعال مانند: زمان، سرعت و دمای هم زدن در مرحله جذب توسط کربن فعال باشد. به علاوه، گرچه این محققان عنوان کرده‌اند که از پودر شیر چربی گرفته شده و کازئین به عنوان سوبسترای عمل آنزیم‌ها استفاده کرده‌اند، نتایج ارائه شده در مقالات آن‌ها تنها شامل کازئین است (۲).

با وجود استفاده از مقادیر بالاتر کربن فعال، مزیت تحقیق حاضر در ارتباط با زمان هیدرولیز کوتاه‌تر (تقریباً ۵ برابر کمتر) است که می‌تواند هزینه تولید را کاهش دهد. از طرف دیگر، زمان هیدرولیز کوتاه می‌تواند احتمال آلودگی میکروبی را کاهش دهد. محققان دیگری نیز از کربن فعال برای حذف فنیل‌آلانین از پروتئین هیدرولیز شده استفاده کرده‌اند. *Shehata* و همکاران (۲۰۰۸) از کربن فعال و سولفات باریم برای حذف فنیل‌آلانین از شیر هیدرولیز شده آنزیمی، حاصل از عمل دو آنزیم پروتئولیتیک پاپایین و *آسپرژیلوس اوریزا*، استفاده و مشاهده کردند که در مقایسه با سولفات باریم، کربن فعال اثر تلخی‌زدایی بیشتری دارد (۱۸). به هر حال، این محققان به شرایط تیمار با کربن فعال اشاره‌ای نکرده‌اند. *Soares* و همکاران (۲۰۰۶) برای تهیه محصولی کم فنیل‌آلانین از شیر چربی گرفته شده از پاپایین و پپسین به تنهایی و نیز همراه با پروتئاز *آسپرژیلوس اوریزا* و کربن فعال برای حذف فنیل‌آلانین استفاده کردند و موفق به حذف ۹۷ تا ۹۸ درصد فنیل‌آلانین شدند (۱۵). *Moszczynski* و *Idziak* (۱۹۹۳) موفق به کاهش ۹۵٪ فنیل‌آلانین از کازئین هیدرولیز شده شدند. شرایط تحقیق آن‌ها نسبت به تحقیق حاضر سخت‌تر بود؛ به عنوان مثال، زمان طولانی هیدرولیز آنزیمی (۷۲ ساعت) و تیمار با کربن فعال (۵/۵ ساعت) (۲۳).

برخی محققان برای حذف فنیل‌آلانین از پروتئین هیدرولیز شده، روش‌های دیگری نظیر فیلتراسیون ژل را به کار بردند (۲۲) که کارایی حذف فنیل‌آلانین توسط این محققان ذکر نشده است. *Lara* و همکاران (۲۰۰۵) برای حذف فنیل‌آلانین از هیدرولیز آنزیمی از شیره لوزالمعده، تریپسین و کیموتریپسین (۶/۳٪ وزنی/ وزنی پروتئین) به مدت ۲۷ ساعت و به دنبال آن فیلتراسیون ژل روی ستون Sephadex G-25 استفاده کردند (۱۲). *Outinen* و همکاران (۱۹۹۶) برای حذف فنیل‌آلانین از رزین‌های پلی استرن (XAD-4 e XAD-16) استفاده کردند که تقریباً باعث حذف کامل فنیل‌آلانین (۹۹/۹٪) شد. ایراد این روش، هزینه بسیار بالاتر رزین‌ها در مقایسه با کربن فعال است (۲۴).

بررسی پروفایل اسیدهای آمینه: کاهش اسیدهای آمینه آروماتیک در محلول رد شده از صافی بعد از تیمار با کربن فعال می‌تواند در اثر جذب غیر اختصاصی این اسیدهای آمینه توسط کربن فعال باشد. این موضوع توسط سایر محققان هم گزارش شده است (۱۸، ۲). *Lopez-Bajonero* و همکاران (۱۹۹۱) در تحقیقی درباره تولید یک منبع پروتئینی کم فنیل‌آلانین از پودر شیر چربی گرفته شده، با

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-06]

هدف رسیدن به محصولی ارزان برای بیماران فنیل‌کتونوری مشاهده کردند که میزان اسیدهای آمینه تریپتوفان، تیروزین، متیونین و هیستیدین در نمونه شیر هیدرولیز شده بعد از تیمار با کربن فعال نسبت به شیر اولیه قبل از هیدرولیز آنزیمی کاهش می‌یابد. آن‌ها علت این کاهش را جذب غیر اختصاصی اسیدهای آمینه ذکر شده بیان کردند. برای جبران این کاهش، این اسیدهای آمینه همراه با ویتامین‌ها، مواد معدنی و مالتودکسترین در مرحله فرمولاسیون به نمونه افزوده شدند (۲). *Shehata* و همکاران (۲۰۰۸) در تحقیقی در زمینه تولید فرمولاسیونی با محتوای فنیل‌آلانین کم برای بیماران فنیل‌کتونوری با استفاده از شیر چربی گرفته شده، مشاهده کردند که اسیدهای آمینه هیستیدین، گلیسین و اسید آسپارتیک در شیر هیدرولیز شده آنزیمی نسبت به شیر اولیه کاهش چشمگیری یافته است که علت آن را جذب غیراختصاصی توسط کربن فعال ذکر کردند و اسیدهای آمینه ذکر شده را طبق الگوی FAO/WHO به فرمولاسیون افزودند (۱۸).

با توجه به توصیه‌های دریافت روزانه فنیل‌آلانین توسط بیماران فنیل‌کتونوری- هرچند در مقالات اجماع نظر وجود ندارد- ولی بیشتر این گونه عنوان شده که غلظت فنیل‌آلانین خون باید در محدوده mg/dL ۶-۲ باشد (۲۵) و میزان فنیل‌آلانین رژیم غذایی باید بر اساس سطح فنیل‌آلانین خون فرد تغییر کند. در این راستا غلظت نهایی اسید آمینه فنیل‌آلانین در پروتئین هیدرولیز شده که برای تغذیه بیماران فنیل‌کتونوری تولید شده، باید اطلاع داده شود تا بتوان میزان دریافت این اسیدآمینه را بر اساس نیاز هر فرد تعیین کرد. بنابراین، از نظر جنبه‌های بالینی فنیل‌کتونوری می‌توان نتیجه گرفت هیدرولیز آنزیمی شماره ۳ (H_3) با توجه به دارا بودن کمترین مقدار فنیل‌آلانین ($۱۰ \times ۰/۰۷۳^{-۴}$ میلی‌گرم به ازای ۱۰۰ میلی‌گرم پروتئین) بهترین گزینه برای تهیه مکمل تغذیه‌ای برای بیماران فنیل-کتونوری است.

• References

1. Galvão CMA, Pinto GA, Jesus CDF, Giordano RC, Giordano RLC. Producing a phenylalanine-free pool of peptids after tailored enzymatic hydrolyses of cheese whey. J Food Eng 2009; 91: 109-17.
2. Lopez-Bajonero LJ, Lara-Calderon P, Galvez-Mariscal A, Velazques-Arellano A, Lopez-Munguia A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. J Food Sci 1991; 56: 938-42.
3. Gowda SS, McDonald JD. The effect of large neutral amino acids on maternal phenylketonuria offspring. [dissertation]. Wichita: Wichita State University; 2006 p. 1-9.
4. Lopes DCF, Delvivo FM, Silvestre MPC. Dietary supplements for phenylketonuria: removing Phe by activated carbon. J Nutr Food Sci 2006; 36: 96-104.
5. Centerwall SA, Centerwall WR. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children and a scientist. Pediatrics 2000; 105: 89-103.
6. Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. Lancet 1953; 265: 812-13.
7. Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. Trends Food Sci Tech 2000; 11: 254-62.
8. Clemente A, Vioque J, Sánchez-Vioque R, Pedroche J, Bautista J, Millán F. Protein quality of chickpea (Cicer arietinum L.) protein hydrolysates. Food Chem 1999; 67: 269-74.
9. Fox P, Morrisey P, Mulvihill D. Chemical and enzymatic modification of food proteins. Dev Food Proteins-1 London: Applied Science Publ; 1982; 1-60.
10. Cabrera-Padilla RY, Pinto GA, Giordano RLC, Giordano RC. A new conception of enzymatic membrane reactor for the production of whey hydrolysates with low contents of phenylalanine. Process Biochem 2009; 44: 269-76.
11. Delvivo FM, Vieira CR, Biasutti EAR, Capobiango M, Silva VDM, Afonso WO, et al. Effect of adsorption medium, hydrolytic parameters and ultrafiltration on the phenylalanine removal from pancreatic whey hydrolysates. Am J Food Technol 2006; 1: 94-104.
12. Lara MG, Izumi C, Greene LJ, Vilela L, De Freitas O. Preparation and scaling up of a low phenylalanine enzymatic hydrolysate of bovine whey proteins. Braz J Pharm Sci 2005; 41: 459-66.
13. Kitagawa T, Owada M, Aoki K, Arai S, Oura T, Matsuda I, et al. Treatment of phenylketonuria with a formula consisting of low-phenylalanine peptide: a collaborative study. Enzyme 1987; 38: 321-27.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-06]

14. Pinto GA, Tardioli PW, Cabrera-Padilla RY, Galvão CMA, Giordano RC, Giordano RLC. Amino acids yields during proteolysis catalyzed by carboxypeptidase A are strongly dependent on substrate pre-hydrolysis. Biochem Eng J 2008; 39: 328-37.

15. Soares RDL, Biasutti EAR, Capobiango M, Vieira CR, Silva VDM, Morais HA, et al. Preparation of enzymatic skim hydrolysatas with low phenylalanine content. Acta Farm Bon 2006; 25: 325-32.

16. Tardioli PW, Sousa JR, Giordano RC, Giordano RLC. Kinetic model of the hydrolysis of polypeptides catalyzed by Alcalase immobilized on 10% glyoxyl-agarose. Enzyme Microb Tech 2005; 36: 555-64.

17. AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. 18th ed. Arlington, Virginia, United States, Association of Analytical Communities. AOAC International; 2005.

18. Shehata AE, El-Magdoub MNI, Kamal TM, Mohamed HA. Enzymatic preparation of low-phenylalanine formula derived from skim milk hydrolysate for phenylketonuric patients. Egypt J Med Hum Genet 2008; 9: 51-69.

19. Available at: URL: http://www.sigmaaldrich. com/life- science/ metabolomics/ enzyme-explorer/ analytical- enzymes/papain.html,01 August 2010.

20. Ichikawa T, Terada H. Second derivative spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. Biochim Biophys Acta 1977; 494: 267-70.

21. Bidlingmeyer BA, Cohen SA, Tarvin TL. Rapid analysis of amino acids using precolumn derivatization. J Chromatogr 1984; 336: 93-104.

22. Shimamura S, Tamura Y, Miyakawa H, Saito H, Kawaguchi Y, Isomura N, et al, inventors; Morinaga Milk Industry Co., Ltd. Peptide mixture and products thereof. US. Patents 5952193. 14 September 1999.

23. Moszczynski P, Idziac J. Preparation of enzymatic hydrolysates of casein depleted in phenylalanine. Appl Biochem Micro 1993; 29: 302-6.

24. Outinen MT, Tossavainen O, Harju M, Linko P, inventors; Valio Oy Co. Method for removing phenylalanine from proteinaceous compositions, a produt obtained and use thereof. Patents. US 5547687, 20 August 1996.

25. Wappner R, Cho S, Kronmal RA, Schuett V, Seashore MR. Management of phenylketonuria for optimal outcome: a review of guidelines for phenylketonuria management and a report of surveys of parents, patients, and clinic directors. Pediatrics 1999; 104: 4-9.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-06]

The effect of type of enzyme and activated carbon concenteration on phenylalanine removal from milk

*Amiri-Rigi A[1], Mohammadi M[2], Emam-Djomeh Z[3], Mohammadifar MA[*4]*

1- MSc in Food Science and Technology, National Nutrition & Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Researcher, Dept. of Food Technology Research, National Nutrition & Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Associate Prof, Transfer Phenomena Laboratory (TPL), Dept. of Food Science, Technology and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, Agricultural Campus of the University of Tehran, Iran.

4- [*]Corresponding author: Associate Prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition & Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
E-mail: mohamdif@ut.ac.ir

Received 11 Jul, 2011 **Accepted 25 Sept, 2011**

Background and Objective: Phenylketonuria is a hereditary disease caused by a lack or deficiency of the enzyme phenylalanine hydroxylase, its most severe clinical manifestation being irreversible mental retardation. Presently, the only therapy available is the dietary restriction of phenylalanine. The objective of this study was to produce laboratory-scale low-phenylalanine milk to be used as a dietary supplement by phenylketonurics. Low-phenylalanine milk can be used to make a variety of palatable, low-phenylalanine foods and beverages.

Materials and Methods: Three milk hydrolysates were prepared enzymatically (1g of enzyme/100 g of substrate), using a protease from *Aspergillus oryzae* and papain, separately and in combination (0.5 g of either enzyme/100 g of substrate), followed by adding different amounts of activated carbon (0.3, 0.9, and 1.5 g) to them to remove phenylalanine.

Results: The combination of *Aspergillus oryzae* protease and papain, along with the use of 0.9 g activated carbon in the post-hydrolysis process, resulted in the lowest final phenylalanine content.

Conclusion: The best condition for removing phenylalanine from milk was use of a combination of *Aspergillus oryzae* enzyme(0.5g of enzyme/100g of substrate) and papain (0.5 g of enzyme/100 g of substrate) with 0.9 g activated carbon in the post-hydrolysis process, resulting in removal of 99% of the phenylalanine.

Keywords: Low-phenylalanine milk, Activated carbon, Enzymatic hydrolysis, Second derivative spectrophotometry

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-06]

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-06]