

استخراج و خالص سازی گلیکوماکروپپتید (GMP) از آب پنیر به عنوان منبع پروتئینی غذای بیماران مبتلا به فنیل کتونوری

مجید جوانمرد^۱، حسام لبقوانی^۲، بابک غیائی طرزی^۳، آرش رشیدی^۴

۱- نویسنده مسئول: استادیار گروه صنایع غذایی و تبدیلی، پژوهشکده فناوری های شیمیایی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
پست الکترونیکی: mjavanir@irost.ir

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

۳- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

۴- استادیار گروه تحقیقات تغذیه، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۱۹

چکیده

سابقه و هدف: فنیل کتونوری یک بیماری ارثی است که افراد مبتلا به آن در طول زندگی باید یک رژیم غذایی با فنیل آلانین کم داشته باشند. گلیکوماکروپپتید می تواند به عنوان یک منبع غذایی یکتا برای بیماران مبتلا به فنیل کتونوری به کار رود؛ زیرا این پپتید فاقد اسید آمینه فنیل آلانین است. این پژوهش با هدف استخراج و خالص سازی پپتید با ارزش گلیکوماکروپپتید از آب پنیر با خلوص بالا و با حداقل مقدار اسید آمینه فنیل آلانین انجام شد. فناوری غشاهای فرایالایش به منظور جداسازی گلیکوماکروپپتید از محلول کنسانتره پروتئین آب پنیر در مقادیر مختلف pH به کار گرفته شد.

مواد و روش ها: در این تحقیق از دو غشای مدور فرایالایش ۵۰ و ۱۰ کیلودالتونی برای استخراج گلیکوماکروپپتید از محلول ۱۰٪ (وزنی/حجمی) کنسانتره پروتئینی آب پنیر استفاده شد. آزمایش ها در دمای محیط ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) و در سه سطح pH (۳/۵، ۴ و ۴/۵) با سه تکرار انجام شد. برای خالص سازی گلیکوماکروپپتید در هر دو مرحله از فرایالایش از فرایند دیافیلتراسیون استفاده شد. در پایان، مقدار پروتئین، اسید آمینه فنیل آلانین و نیتروژن غیر پروتئینی اندازه گیری شد.

یافته ها: در pH=۴ مقدار اسید آمینه فنیل آلانین محلول آب پنیر فرایالایش شده در پایین ترین سطح و مقدار نیتروژن غیر پروتئینی در بالاترین سطح ممکن قرار داشت که خلوص و درصد بازیافت بالای گلیکوماکروپپتید را نشان می دهد.

نتیجه گیری: در راستای هدف تولید یک منبع غذایی جدید برای بیماران مبتلا به فنیل کتونوریا، آب پنیر شیرین که بخش اعظم آب پنیر تولیدی کشور را به خود اختصاص می دهد، بهترین گزینه موجود است.

واژگان کلیدی: استخراج، گلیکوماکروپپتید (GMP)، فنیل کتونوریا، آب پنیر، خالص سازی

• مقدمه

جانبی صنایع لبنی است که پتانسیل افزایش ارزش افزوده در این صنعت را دارد (۱).

آب پنیر فاز محلول شیر است که بعد از انعقاد کازئین در اثر عمل رنت (Rennet) یا باکتری های لاکتیکی یا هر دو از لخته جدا می شود. لخته شامل کازئین ها، چربی ها، برخی مواد معدنی و بعضی ویتامین ها است، اما آب پنیر حاوی لاکتوز، پروتئین های محلول (Whey proteins)، مواد معدنی محلول، اسیدهای آلی، ویتامین ها و آنزیم ها است. پروتئین های آب پنیر ارزش بیولوژیک بالایی دارند. این پروتئین ها نسبت به پروتئین شاخص اسیدهای آمینه ضروری بیشتر و نسبت به پروتئین تخم مرغ کامل تریپتوفان،

در تولید بیشتر مواد غذایی، ایجاد فراورده های جانبی اجتناب ناپذیر است. از دید سنتی، فراورده های جانبی، زائد تلقی شده و به عنوان فاضلاب دفع می شوند، اما در سال های اخیر با توجه به پیامدهای زیست محیطی فراورده های جانبی، پیشرفت هایی در زمینه فرایند این گونه فراورده ها انجام شده است. این پیشرفت ها هم باعث جذب صاحبان صنایع به سمت فراورده محصولات جانبی شده و هم این که بازاری برای محصولات جدید به وجود آورده است. امروزه، در صنایع لبنی نه تنها فرایندهای تولید محصولات جدید از فراورده های جانبی رایج شده، بلکه به عنوان روش های سودآور به کار گرفته می شوند. آب پنیر یکی از فراورده های

لوسین، ترئونین و لیزین بیشتری دارند. با توجه به این که حداقل ۵۰ واحد صنعتی فعال تولید پنیر در کشور وجود دارد، قادر خواهیم بود که با صرف سرمایه گذاری ناچیزی، قسمت مهمی از ترکیبات پُرارزش آب پنیر را بازیابی نماییم. به دلیل نقش آلایندهی آب پنیر بر محیط زیست، جلوگیری از اسراف منابع غذایی، افزایش درآمد واحدهای تولیدی و نیاز بعضی از سایر بخش های تولیدی و صنعتی به محصولات آب پنیر، بازیافت آب پنیر ضروری به نظر می رسد (۲). امروزه، برخی از ترکیباتی که به مقدار کم در آب پنیر وجود دارند، به دلیل اهمیت فوق العاده مورد توجه قرار گرفته و استخراج می شوند. یکی از این ترکیبات گلیکوماکروپپتید است. گلیکوماکروپپتید یک پپتید هتروژن با وزن ملکولی ۶۷۵۵ دالتون و مرکب از ۶۴ اسید آمینه است. گلیکوماکروپپتید غنی از اسیدهای آمینه شاخه دار والین، ترئونین و ایزولوسین، لیزین است و از لحاظ اسیدهای آمینه آروماتیک فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین فقیر است (۳).

بیماری فنیل کتونوریا شایع ترین شکل یک بیماری اتوزومی مغلوب به نام بیش- فنیل آلانینمی (Hyperphenylalaninemia) است. در این بیماری، به علت کمبود یا عدم فعالیت آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز در کبد، اسید آمینه ضروری فنیل آلانین به تیروزین تبدیل نمی شود و سبب افزایش مزمن فنیل آلانین خون و پیدایش عوارضی از جمله آسیب مغزی غیر قابل برگشت می شود. کودکان مبتلا به فنیل کتونوریا در اثر تجمع فنیل آلانین هر ماه حدود ۴ نمره از بهره هوشی خود را از دست می دهند. نتیجه اختلال فنیل کتونوریا عقب ماندگی شدید ذهنی و برخی ناهنجاری های دیگر مانند بیش فعالی، اختلالات گفتاری، تشنج و... است که با بالا رفتن سن کودک آشکارتر می شوند (۴). گلیکوماکروپپتید می تواند نقشی کلیدی در تغذیه بیماران مبتلا به فنیل کتونوریا داشته باشد.

تحقیقات چندی در زمینه جداسازی و کاربرد گلیکوماکروپپتید در دنیا صورت گرفته است. Kawasaki و همکاران (۱۹۹۴) در ژاپن از روش تلفیقی کروماتوگرافی تعویض یونی با فراپالایش جهت جداسازی گلیکوماکروپپتید از آب پنیر استفاده کردند. Neilsen و Tromholtz (۱۹۹۴) از روش رسوب دهی حرارتی در تلفیق با روش فراپالایش برای جداسازی گلیکوماکروپپتید استفاده کردند. Erdman و Neuman (۱۹۹۹) برای جداسازی گلیکوماکروپپتید از آب پنیری که اسیدی شده از یک رزین تبادل کننده آنیونی

ضعیف پلی استایرن در شکل قلیایی کمک گرفتند. Nakano و Ozimek (۱۹۹۹) گلیکوماکروپپتید را از جزء غیر قابل تجزیه آب پنیر شیرین با رزین تبادل کننده آنیونی DEAE-Sephacel در pH های ۳ و ۴/۶ جدا کردند. Nakano و Ozimek (۲۰۰۰) اظهار داشتند که pH بهینه برای جداسازی گلیکوماکروپپتید روی رزین DEAE-Sephacel محدوده ۴-۲/۵ است. Xu و همکاران (۲۰۰۰) موفق شدند گلیکوماکروپپتید را به روش کروماتوگرافی تبادل یونی جدا کنند. Nakano و همکاران (۲۰۰۲) گلیکوماکروپپتید را از آب پنیر به روش کروماتوگرافی با استفاده از رزین Sephacryl S-200 خالص کردند. Doultani و همکاران (۲۰۰۳) روشی را بر پایه تبادل یونی برای جداسازی گلیکوماکروپپتید از ایزوله پروتئین آب پنیر WPI (Whey Protein Isolate) ارائه کردند. Li و Mine (۲۰۰۴) نمایه کروماتوگرافی گلیکوماکروپپتید جدا شده از ایزوله پروتئین آب پنیر به سه روش رسوب دهی (با اسید تری کلرواستیک، اتانول و فراپالایش) را با هم مقایسه کردند. Ozimek و همکاران (۲۰۰۴) کیتوزان را به عنوان یک تبادل کننده یونی برای جداسازی گلیکوماکروپپتید به کار بردند. Etzel و همکاران (۲۰۰۵) تأثیر هدایت الکتریکی، pH و غلظت نمک بافر مورد استفاده جهت شست و شو بر بازیافت گلیکوماکروپپتید به روش کروماتوگرافی تعویض یونی بررسی کردند. Martín-dianna و همکاران (۲۰۰۶) به بررسی خواص ویسکوالاستیک گلیکوماکروپپتید استخراج شده از آب پنیر در مقادیر مختلف دما، pH، قدرت یونی و غلظت پروتئین پرداختند. Abd El-salam (۲۰۰۶) فیلتراسیون غشایی را به عنوان روشی ساده و کاربردی برای جداسازی گلیکوماکروپپتید در مقیاس صنعتی معرفی کرد. Kreuß و Kulozik (۲۰۰۹) فرایند جذب مستقیم غشایی را برای جداسازی گلیکوماکروپپتید خالص در مقیاس آزمایشگاهی انجام دادند.

در کشورمان تاکنون هیچ گونه تحقیقی در زمینه استخراج و خالص سازی پروتئین و هم چنین استفاده از آن در رژیم غذایی بیماران مبتلا به فنیل کتونوریا انجام نشده است. اهداف این پژوهش عبارت بود از استخراج و خالص سازی پپتید با ارزش گلیکوماکروپپتید از آب پنیر با خلوص بالا و با حداقل مقدار اسید آمینه فنیل آلانین و تعیین شرایط بهینه آن در بهترین pH از کنسانتره پروتئینی آب پنیر و با کمک غشاهای فراپالایش جهت تدوین دانش فنی تولید این ماده.

• مواد و روش‌ها

مواد: پودر کنسانتره پروتئینی آب پنیر از شرکت دانمارکی *Arla* خریداری شد. فسفات کلسیم هیدروژن، اسید کلریدریک ۳۷ درصد و هیدروکسید سدیم پرک از شرکت آلمانی Merck تهیه شد.

جدول ۱. مشخصات شیمیایی پودر کنسانتره

پروتئینی آب پنیر	
پروتئین	حداقل ۶۵ درصد
لاکتوز	حداکثر ۱۰ درصد
چربی	۱۱-۱۷ درصد
خاکستر	حداکثر ۵ درصد
رطوبت	حداکثر ۵/۵ درصد

از ۳ کاهش یابد؛ زیرا در pH کمتر از ۳ سیالیک اسید که جزء اصلی گلیکوماکروپپتید است، ناپایدار می‌شود و به دنبال آن، خاصیت بیولوژیکی گلیکوماکروپپتید به دست آمده کاهش می‌یابد. از طرفی pH محلول نباید بیشتر از ۴/۵ باشد؛ زیرا در pH بالاتر از ۴/۵ عبور گلیکوماکروپپتید از منافذ غشاء به دلیل تمایل آن به تجمع داشتن دشوار می‌شود. به این دلایل کنترل pH، اصلی ترین عامل در جداسازی گلیکوماکروپپتید از آب پنیر است.

در گام بعد محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر با pH پایین، تحت اولین مرحله از فرایالایش با غشای دارای محدوده عبور ۵۰۰۰۰ دالتون قرار گرفت. سپس غشاء با آب مقطر شسته و مایع به دست آمده دوباره تحت فرایالایش با همان غشاء قرار گرفت. این عمل به منظور افزایش راندمان استخراج گلیکوماکروپپتید انجام می‌شود. سپس pH مایع به دست آمده از اولین مرحله فرایالایش به ۶/۷ رسیده و دومین مرحله از فرایالایش با غشای دارای محدوده عبور ۱۰۰۰۰ دالتون انجام گرفت. لازم به ذکر است که در هر دو مرحله از فرایالایش، سطح غشاءها به منظور افزایش تراوایی گلیکوماکروپپتید، با سوسپانسیون فسفات کلسیم پوشیده شد. در گام آخر غشای دارای محدوده عبور ۱۰۰۰۰ دالتون با آب مقطر شسته داده و مایع به دست آمده دوباره فرایالایش شد. سرانجام، مایع به دست آمده جمع آوری شد تا آزمایش‌های بعدی روی آن صورت گیرد.

آزمون‌ها:

روش اندازه‌گیری مقدار اسید آمینه فنیل آلانین: در این تحقیق از دستگاه HPLC جهت اندازه‌گیری مقدار اسید آمینه فنیل آلانین استفاده شد. برای این منظور از ستون Hypersil ODS (C18) به ابعاد ۲۵۰×۴/۶ میلی‌متر که اندازه ذرات آن ۵μm بود، با نرخ جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و آشکارساز فلورسانس استفاده شد. طول موج مورد استفاده ۳۶۰ نانومتر بود. فاز متحرک دستگاه شامل محلول A محتوی مخلوط متانول و بافر تتراهیدروفوران (THF) به نسبت ۸۵ به ۱۵ و محلول B محتوی مخلوط متانول و بافر تتراهیدروفوران (THF) به نسبت ۵۵ به ۴۵ بود. محلول بافر شامل نمک سدیم هیدروژن فسفات بدون آب ۰/۱۸ مولار بود که pH آن روی ۷/۲ تنظیم شد.

روش اندازه‌گیری مقدار نیتروژن غیر پروتئینی (NPN): پس از محاسبه درصد پروتئین به روش کج‌لدال و با کم

غشاهای فرایالایش مدور از جنس پلیمر پلی‌اتر سولفون (PES) با محدوده عبور وزن ملکولی ۵۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ دالتون از شرکت آلمانی *Sartorius Stedim Biotech* خریداری شد. دلایل استفاده از غشاهای فرایالایش مدور جنس پلیمر پلی اتر سولفون (PES) به این شرح است:

۱. سرعت عبور جریان بالا و توان عملیاتی زیاد به دلیل ساختار بسیار نامتقارن منافذ
۲. آب دوست بودن و کم بودن ظرفیت اتصال پروتئین‌ها به آن
۳. سازگاری خوب با مواد شیمیایی و پایداری حرارتی ممتاز
۴. گستردگی محدوده pH مورد استفاده آن

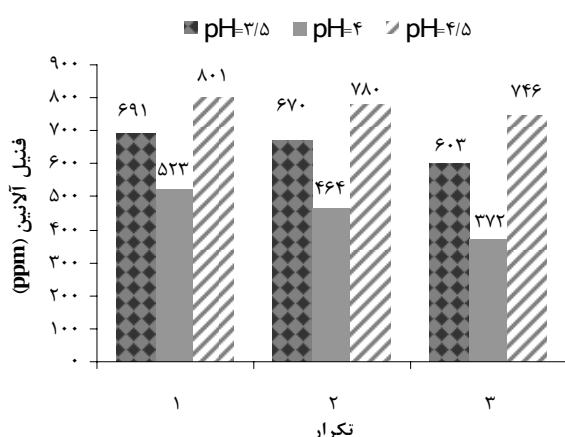
آب مقطر دو بار تقطیر استریل در آزمایشگاه تهیه شد.

تجهیزات: تجهیزات مورد نیاز برای انجام این تحقیق شامل

موارد زیر بودند:

۱. پمپ خلأ
۲. سیستم پالایش تحت خلأ شامل ارلن مایر، رابط، لیوان حجمی دردار، گیره و شیلنگ
۳. دستگاه کج‌لدال FOSS مدل ۲۳۰۰
۴. دستگاه HPLC

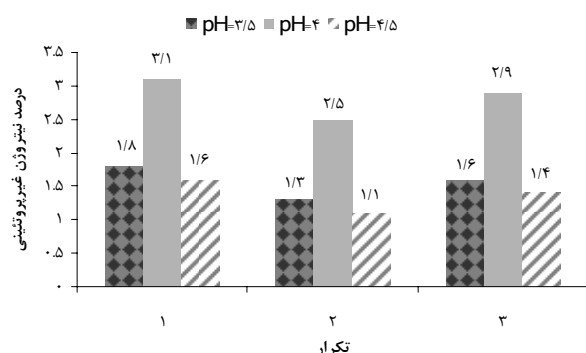
روش انجام تحقیق: محلولی از کنسانتره پروتئینی آب پنیر حاوی ۱۰٪ پروتئین (وزنی/حجمی) با آب مقطر استریل تهیه شد. سپس سوسپانسیونی از فسفات کلسیم تهیه و سطح غشاء با آن پوشانده شد. با این کار، تراوایی گلیکوماکروپپتید از غشاء بهبود می‌یابد. در گام بعدی pH محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر با محلول اسید هیدروکلریک ۰/۱ نرمال کاهش داده شد. نکته مهم این که نباید pH محلول به کمتر



شکل ۲. میزان اسید آمینه فنیل آلانین محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر پس از عمل فراپالایش

همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود، مقدار اسید آمینه فنیل آلانین محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر پس از انجام ۳ تکرار از فراپالایش در pH=4 دارای کمترین مقدار و در pH=3/5 دارای بیشترین مقدار است.

مقدار نیتروژن غیر پروتئینی محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر فراپالایش شده مشخص شد (شکل ۳).



شکل ۳. درصد نیتروژن غیر پروتئینی محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر پس از عمل فراپالایش

مقدار پروتئینی محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر پس از انجام عمل فراپالایش تعیین شد (جدول ۲). مشخص شد بیشترین مقدار پروتئین در pH=4/5 و کمترین مقدار آن در pH=3/5 به دست آمد.

مقدار اسید آمینه فنیل آلانین محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر فراپالایش شده پس از سه تکرار در جدول ۳ آمده است.

بیشترین درصد خلوص گلیکوماکروپپتید در pH=4 و کمترین خلوص در pH=4/5 تعیین شد (جدول ۴).

کردن نیتروژن پروتئینی از نیتروژن کل، مقدار نیتروژن غیر پروتئینی محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: در این تحقیق pH محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر به عنوان متغیر مستقل تعیین شد. مقدار پروتئین، نیتروژن غیر پروتئینی و مقدار اسید آمینه فنیل آلانین به عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شدند. این تحقیق در سه سطح pH (3/5، 4 و 4/5) یک سطح ۱۰٪ پروتئین محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر و در دمای محیط ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) انجام شد.

یافته های این تحقیق با استفاده از طرح فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی با سه تکرار در هر تیمار (سطح pH) ارزیابی شدند. برای تشخیص وجود اختلاف معنی دار بین میانگین ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد. بررسی تأثیر تیمارها (سه سطح pH) بر مقدار اسید آمینه فنیل آلانین، نیتروژن غیر پروتئینی و مقدار پروتئین با آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین داده ها با استفاده از آزمون دانکن و نرم افزار SPSS^{۱۸} صورت گرفت.

• یافته ها

مقدار پروتئین حقیقی پس از انجام فراپالایش محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر در pH های 3/5، 4 و 4/5 به ترتیب ۲/۵۴، ۳/۰۳ و ۳/۴۸ درصد تعیین شد (شکل ۱).



شکل ۱. میزان پروتئین حقیقی محلول آب پنیر فراپالایش شده

همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود، با افزایش سطح pH مقدار پروتئین محلول فراپالایش شده افزایش می یابد که به دلیل دنا توره نشدن پروتئین ها و حفظ شکل آن ها (ساختارهای دوم و سوم) در pH های بالاست.

میزان اسید آمینه فنیل آلانین در محلول آب پنیر فراپالایش شده نیز در pH های مختلف تعیین شد (شکل ۲).

جدول ۲. مقدار پروتئین حقیقی محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر

درصد پروتئین	pH
۲/۵۴	۳/۵
۳/۰۳	۴
۳/۴۸	۴/۵

جدول ۳. مقدار اسید آمینه فنیل آلانین محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر فرایالایش شده*

فنیل آلانین (ppm)	pH
^a ۶۹۱	۳/۵
^a ۶۷۰	۳/۵
^a ۶۰۳	۳/۵
^b ۵۲۳	۴
^b ۴۶۴	۴
^b ۳۷۲	۴
^c ۸۰۱	۴/۵
^c ۷۸۰	۴/۵
^c ۷۴۶	۴/۵

* اعدادی که با حروف غیرمشابه نشان داده شده‌اند دارای اختلاف آماری معنی‌داری هستند ($p < 0.05$)

جدول ۴. درصد خلوص گلیکوماکروپپتید استحصالی بر مبنای اسید آمینه فنیل آلانین

درصد خلوص گلیکوماکروپپتید	pH
^a ۹۵/۲۴	۳/۵
^a ۹۵/۳۹	۳/۵
^a ۹۵/۸۵	۳/۵
^b ۹۶/۴۰	۴
^b ۹۶/۸۰	۴
^b ۹۷/۲۵	۴
^c ۹۴/۴۹	۴/۵
^c ۹۴/۶۳	۴/۵
^c ۹۴/۸۶	۴/۵

• بحث

مقدار اسید آمینه فنیل آلانین: مقدار اسید آمینه فنیل آلانین در پودر کنسانتره پروتئین آب پنیر ۱۴۵۳۹ واحد در هر میلیون تعیین شد. مقدار این اسید آمینه پس از انجام فرایالایش به کمتر از ۴۰۰ واحد در هر میلیون کاهش یافت (شکل ۳).

بالا بودن مقدار اسید آمینه فنیل آلانین در محلول فرایالایش شده به خصوص در PHهای مختلف علاوه بر

گلیکوماکروپپتید، به دلیل پروتئین‌ها یا پپتیدهای دیگری نیز هست که دارای اسید آمینه فنیل آلانین به شکل غیرآزاد بودند (جدول ۳). بالا بودن مقدار اسید آمینه فنیل آلانین در pH=۴/۵ را می‌توان چنین توجیه کرد که اولاً بخش اعظم گلیکوماکروپپتید توسط فرایند فرایالایش بازیافت نشده است؛ زیرا چون نقطه ایزوالکتریک برای گلیکوماکروپپتید حدود ۴ است، ثانیاً در pH=۴/۵ احتمال حضور آلفا-لاکتالبومین در ترواویده (Permeate) آب پنیر فرایالایش شده وجود داشته که حاوی اسید آمینه فنیل آلانین است. اما در pH=۳/۵ چون ساختار همه پروتئین‌ها و گلیکوماکروپپتید تحت تأثیر قرار می‌گیرد، مقداری اسید آمینه فنیل آلانین به شکل آزاد ظاهر می‌شود. با توجه به این که هدف اصلی از این تحقیق، دستیابی به پایین‌ترین مقدار اسید آمینه فنیل آلانین بود، مناسب‌ترین pH برای این منظور pH=۴ است.

مقدار گلیکوماکروپپتید: گلیکوماکروپپتید پلی‌پپتیدی مشتق از کاپا-کازئین است که حاوی نیتروژن است. بنابراین، می‌توان فاکتور نیتروژن غیرپروتئینی را به عنوان شاخصی از مقدار گلیکوماکروپپتید برگزید.

با نگاهی به شکل ۳ درمی‌یابیم که در pH=۴ درصد نیتروژن غیرپروتئینی محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر در بالاترین حد و در pH=۴/۵ در پایین‌ترین حد خود قرار دارد. با تعمیم دادن درصد نیتروژن غیر پروتئینی به مقدار گلیکوماکروپپتید، به این نکته می‌رسیم که بالاترین درصد بازیافت گلیکوماکروپپتید در pH=۴ حاصل می‌شود. با استناد به این موضوع که وزن ملکولی گلیکوماکروپپتید به شدت به pH وابسته است؛ زیرا در pH=۴/۵ گلیکوماکروپپتید پلیمریزه می‌شود و وزن ملکولی آن به حدود ۴۵۰۰۰ دالتون می‌رسد، درصد بازیافت آن کمترین مقدار است. اما در pH=۴ چون وزن ملکولی گلیکوماکروپپتید کمتر از ۱۰۰۰۰ دالتون است، درصد بازیافت آن بیشترین مقدار است (۸). در pH=۳/۵ درصد بازیافت گلیکوماکروپپتید حالتی بین pH=۴ و pH=۴/۵ دارد که احتمالاً گلیکوماکروپپتید به شکل دایمر یا تریمر وجود دارد.

محتوای پروتئینی: با کاهش pH، محتوای پروتئینی محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر کاهش نیز می‌یابد. دلیل این تغییر، تأثیر pH روی شکل طبیعی پروتئین‌های آب پنیر به ویژه ساختمان‌های دوم و سوم و خارج شدن آن‌ها از شکل طبیعی است. از روی میانگین محتوای پروتئین حقیقی

فنیل آلانین پودر کنسانتره پروتئینی آب پنیر ۱۴۵۳۹ گرم در هر ۱۰۰ گرم و به عبارتی ۱۴۵۳۹ واحد در هر میلیون به دست آمد. برای محاسبه خلوص گلیکوماکروپپتید بر مبنای میزان اسید آمینه فنیل آلانین، میزان اسید آمینه فنیل آلانین محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر فرایالایش شده از کل میزان اسید آمینه فنیل آلانین پودر کنسانتره پروتئینی آب پنیر کم شده و حاصل بر کل میزان اسید آمینه فنیل آلانین پودر کنسانتره پروتئینی آب پنیر تقسیم شد. خلوص گلیکوماکروپپتید به دست آمده بر مبنای اسید آمینه فنیل آلانین را بعد از انجام سه تکرار فرایالایش در جدول ۴ نشان داده شده است.

بین خلوص گلیکوماکروپپتید استحصالی در سه pH متفاوت اختلاف معنی داری مشاهده شد (جدول ۴). *Neeser* و *Berrocal* فرایند تولید تجاری کازئینو گلیکوماکروپپتید بر پایه ترسیب حرارتی را از کنسانتره پروتئین آب پنیر که مقداری از لاکتوز آن گرفته شده است، ارائه کردند. آن‌ها محلول ۱۰٪ آب پنیر با pH=۶ حاوی ۰/۱۵ درصد کلرید کلسیم را به مدت ۱ ساعت با دمای ۹۰ °C حرارت دادند، سپس برای تغلیظ فاز آبی به دست آمده از شیوه فرایالایش استفاده کردند. برای خالص سازی گلیکوماکروپپتید pH را با استفاده از اتانول به ۴/۵ رساندند. خلوص گلیکوماکروپپتید تولیدی توسط آن‌ها ۸۴٪ گزارش شد.

در سال ۱۹۹۱ *Tanimoto* و همکاران روشی را برای بازیابی گلیکوماکروپپتید از آب پنیر بر پایه فرایالایش در مقادیر مختلف pH ارائه کردند. آن‌ها این عمل را در pH=۳/۵ ± ۰/۲ و دمای ۵۰ °C با استفاده از غشای ۲۰۰۰۰ دالتونی انجام دادند. آن‌ها تولید گلیکوماکروپپتید با ۸۰٪ خلوص را گزارش کردند. در سال ۱۹۹۵ *Outinen* و همکاران روش ساده‌ای را بر پایه میکروفیلتراسیون با ستون رزین تبادل یونی بر پایه پلی استایرن را برای جداسازی پپتیدها از آب پنیر امنتال (*Emmental*) پیشنهاد کردند. در این روش ۷۰٪ گلیکوماکروپپتید آب پنیر جدا شده و خلوص آن ۷۰ تا ۸۰ درصد به دست آمد. در سال ۲۰۰۳ *Doultani* و همکاران روشی را بر پایه تبادل یونی برای جداسازی گلیکوماکروپپتید از ایزوله پروتئین آب پنیر ارائه کردند. آن‌ها با استفاده از ستونی که با رزین تبادلگر آنیونی دانه درشت Q-Sepharose پُر شده بود، توانستند ۹۶٪ گلیکوماکروپپتید را بازیافت کنند.

محلول فرایالایش شده می‌توان استنباط کرد که محتوای پروتئینی آن در حد مناسبی قرار دارد و با وجود نداشتن اسید آمینه فنیل آلانین، از این نظر برای بیماران مبتلا به فنیل کتونوریا ارزشمند است.

خلوص گلیکوماکروپپتید: هدف از این تحقیق، یافتن پایین ترین سطح اسید آمینه فنیل آلانین بود و pH=۴ مناسب ترین pH محسوب می‌شود. به این دلیل که اولاً در pH=۴/۵ بخش اعظم گلیکوماکروپپتید توسط فرایند فرایالایش بازیافت نمی‌شود و نقطه ایزوالکتریک برای گلیکوماکروپپتید حدود ۳/۸ است، ثانیاً در pH=۴/۵ احتمال حضور پروتئین‌هایی مانند آلفا-لاکتالبومین و بتا-لاکتوگلوبولین در تراویده آب پنیر فرایالایش شده وجود دارد. این پروتئین‌ها حاوی اسید آمینه فنیل آلانین هستند.

محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر فرایالایش شده در pH=۴ بالاترین درصد نیتروژن غیر پروتئینی را دارد (شکل ۳). از آن‌جا که مقدار نیتروژن غیر پروتئینی محلول تازه کنسانتره پروتئینی آب پنیر فقط ۰/۴ درصد است، احتمالاً می‌توان افزایش مقدار نیتروژن غیر پروتئینی محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر را پس از انجام فرایالایش به گلیکوماکروپپتید نسبت داد. از آن‌جا که در pH=۴ ملکول گلیکوماکروپپتید بار اصلی خود و به دنبال آن، لایه‌ای از ملکول‌های آب را از دست داده، وزن ملکولی آن به پایین تر از ۱۰ کیلودالتون می‌رسد. در این شرایط گلیکوماکروپپتید از غشای فرایالایش ۱۰ کیلودالتون به راحتی عبور می‌کند و وارد تراویده می‌شود، اما در pH=۴/۵ که ملکول گلیکوماکروپپتید به صورت پلیمریزه است و وزن ملکولی آن حدود ۴۵۰۰۰ دالتون است، کمترین مقدار ممکن از آن به تراویده راه می‌یابد. در pH=۳/۵ شرایط متفاوت است. در این pH ملکول گلیکوماکروپپتید وزن ملکولی کمتر از ۱۰۰۰۰ دالتون دارد، ولی احتمالاً به شکل غیرگلیکوزیلی درمی‌آید و به همین دلیل، درصد بازیافت گلیکوماکروپپتید پایین تر از حالتی است که pH محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر روی ۴ تنظیم می‌شود.

با تکیه بر این مطلب که هدف کاربردی این تحقیق، به دست آوردن گلیکوماکروپپتید با حداقل مقدار اسید آمینه فنیل آلانین است، مبنای خلوص گلیکوماکروپپتید را میزان اسید آمینه فنیل آلانین در نظر می‌گیریم. به همین دلیل مقدار اسید آمینه فنیل آلانین پودر کنسانتره پروتئینی آب پنیر با دستگاه HPLC اندازه گیری شد. میزان اسید آمینه

ایزولوسین، والین، لیزین و لوسین، فاقد اسیدهای آمینه آروماتیک دیگر است. پیشنهاد می‌شود که به منظور استفاده از گلیکوماکروپپتیدها به عنوان منبع پروتئینی باید این نقص در نظر گرفته شود و لازم است اسیدهای آمینه‌ی سنتزی تریپتوفان و تیروزین به این منبع پروتئینی اضافه شوند تا نیاز بیماران به این اسیدهای آمینه تأمین شود.

علاوه بر این، ضمن رفع مشکل دفع آب‌پنیر که محصول جانبی فرایند پنیرسازی است، برای کارخانه‌های لبنی ارزش افزوده ایجاد می‌شود. آب‌پنیر فرایلاش شده طعم و مزه خوبی دارد و امکان تولید طیف وسیعی از فراورده‌های غذایی بر پایه آن مانند نوشیدنی، بیسکویت و کراکر وجود دارد. پیشنهاد می‌شود که پژوهش‌های آتی بر روی تولید محصولات داخلی از این ماده برای بیماران فنیل‌کتونوریایی متمرکز شود.

در پژوهش حاضر با طراحی مناسب‌ترین روش فرایلاش و اعمال pH بهینه، بیشترین درصد خلوص گلیکوماکروپپتید حاصل شد.

نتایج نشان می‌دهد که مناسب‌ترین pH برای استخراج گلیکوماکروپپتید ۴ است زیرا هم از نظر درصد بازیافت گلیکوماکروپپتید از آب‌پنیر و هم از نظر مقدار اسید آمینه فنیل‌آلانین که در رژیم غذایی بیماران مبتلا به فنیل‌کتونوریا مهم است، بهترین نتیجه حاصل شده است. با انجام فرایند فرایلاش روی آب‌پنیر در مقیاس صنعتی در pH=۴ می‌توان یک منبع غذایی جدید که هم حاوی پروتئین است و هم مقدار کمی اسید آمینه فنیل‌آلانین دارد، برای بیماران مبتلا به فنیل‌کتونوریا تولید کرد. لازم به ذکر است که این منبع پروتئینی با وجود دارا بودن مزیت مقدار فنیل‌آلانین کم و غنی بودن از لحاظ اسیدهای آمینه ضروری ترئونین،

References

- Onwulata CI, Huth, PJ, editors. Whey processing, functionality and health benefits. Ames, IA: Blackwell Publishing and IFT Press; 2008.
- Rashidi H. Production and application of whey in food industry. Parivar Press 1386 [in Persian].
- Abd El-Salam MH. Separation of casein glycomacropeptide from whey: methods of potential industrial application. *Int J Dairy Sci* 2006; 1:93-9.
- Farhood D, Shalileh M. Diet in phenylketonuria infected children. *Iranian J Pedia Disea* 1387; 18: 1-8, 88-98 [in Persian].
- Doultani S, Turhan KN, Etzel MR. Whey protein isolate and glycomacropeptide recovery from whey using ion exchange chromatography. *J Food Sci* 2003; 68:1389-95.
- Furlanetti AM, Prata LF. Free and total glycomacropeptide contents of milk during bovine lactation. *Ciênc Tech Alim Campinas* 2003; 23:121-5.
- Kawasaki YK, Dosako SU, Idota TK. Inventors; Snow Brand Milk Products. Process for producing κ -casein glycomacropeptide. US patent 5,280,107, 1994-1-18.
- Kreu M, Kulozik U. Separation of glycosylated caseinomacropeptide at pilot scale using membrane adsorption in direct-capture mode. *J Chrom A* 2009; 1216: 8771-77.
- Li EWY, Mine Y. Technical note: comparison of chromatographic profile of glycomacropeptide from cheese whey isolated using different methods. *J Dairy Sci* 2004; 87: 174-7.
- Lira AR, Minim LA, Bonomo, RCF, Minim VPR, da Silva LHM, et al. Microcalorimetric study of adsorption of glycomacropeptide on anion-exchange chromatography adsorbent. *J Chrom A* 2009; 1216; 20: 4440-4.
- Nakano T, Ozimek L. Purification of glycomacropeptide from dialyzed and nondialyzed sweet whey by anion exchange chromatography at different pH values. *Biot Let* 2000; 22:1081-6.
- Nakano T, Ozimek L. Purification of glycomacropeptide from non-dialyzable fraction of sweet whey by hydrophobic interaction chromatography on phenyl-agarose. *Biot Let* 2000; 22:413-6.
- Silva-Hernandez E, Nakano T, Ozimek L. Isolation and analysis of κ -casein glycomacropeptide from goat sweet whey. *J Agri Food Chem* 2002; 50:2034-8.
- Xu Y, Sleight R, Hourigan J, Johnso R. Separation of bovine immunoglobulin G and glycomacropeptide from dairy whey. *Proc Bioche* 2000; 36: 393-9.
- Berrocal R, Neeser JR. Inventors; Nestle SA. Process for the production of a κ -casein glycomacropeptide. Eur patent, 0453782. 1991-10-30.
- Tanimoto M. Process for producing κ -casein glycomacropeptides US Patent, 5075424. 1991-12-24.

Extraction and purification of glycomacropeptide from whey to be used as a source of protein for phenylketonuria patients

Javanmard M^{*1}, Lighvani H², Ghiasi Tarzi B³, Rashidi A⁴

1-^{*}Corresponding author: Assistant prof, Dept. of Food Technologies, Institute of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran. E-mail: mjavanir@irost.ir

2- M.Sc. in Food Science & Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

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

Received 17 Sept, 2011

Accepted 4 Dec, 2011

Background and Objective: Phenylketonuria (PKU) is a genetic disease. Patients suffering from PKU must adhere to a lifelong low-phenylalanine diet. Glycomacropeptide (GMP) is a unique source of protein for PKU patients, because it contains no phenylalanine. The objective of this study was to extract GMP from whey and purify it in order to obtain a product with a minimum phenylalanine content. The ultrafiltration membrane technology was used to separate GMP from the whey protein concentrate solution at different pH values.

Materials and Methods: Two ultrafiltration disc membranes with 50 and 10 kDa cut-off were used to extract glycomacropeptide from a solution of whey protein concentrate (10% protein w/v). The experiments in triplicates were performed at the ambient temperature (25 ± 2 °C) and a pH of 3.5, 4 or 4.5. The diafiltration technique was used for purification of glycomacropeptide in both ultrafiltration phases; the protein, phenylalanine, and non-protein nitrogen (NPN) contents were measured.

Results: The phenylalanine and NPN contents of the ultrafiltered whey at a pH of 4 were at the lowest and highest level, respectively, indicating the high purity and recovery rate of glycomacropeptide.

Conclusion: Sweet whey, the major type of whey produced in the country, is the best alternative available for producing a new food source for phenylketonuria patients.

Keywords: Extraction, Glycomacropeptide (GMP), Phenylketonuria, Purification, Whey