

استخراج و خالص‌سازی گلیکوماکروپیتید (GMP) از آب‌پنیر به عنوان منبع پروتئینی غذای بیماران مبتلا به فنیل‌کتونوری

مجید جوانمرد^۱، حسام لیقوانی^۲، بابک غیاثی طرزی^۳، آرش رشیدی^۴

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

۲- دانشآموخته 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، انتستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۲۷

چکیده

سابقه و هدف: فنیل‌کتونوری یک بیماری ارثی است که افراد مبتلا به آن در طول زندگی باید یک رژیم غذایی با فنیل‌آلانین کم داشته باشند. گلیکوماکروپیتید می‌تواند به عنوان یک منبع غذایی یکتا برای بیماران مبتلا به فنیل‌کتونوری به کار رود؛ زیرا این پیتید فاقد اسید آمینه فنیل‌آلانین است. این پژوهش با هدف استخراج و خالص‌سازی پیتید با ارزش گلیکوماکروپیتید از آب‌پنیر با خلوص بالا و با حداقل مقدار اسید آمینه فنیل‌آلانین انجام شد. فناوری غشاها فرآپالایش به منظور جداسازی گلیکوماکروپیتید از محلول کنسانتره پروتئین آب‌پنیر در مقدار مختلف pH به کار گرفته شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از دو غشای مدور فرآپالایش ۵۰ و ۱۰ کیلودالتونی برای استخراج گلیکوماکروپیتید از محلول (وزنی/حجمی) کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر استفاده شد. آزمایش‌ها در دمای محیط ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) و در سه سطح pH (۴/۵، ۴/۵ و ۴/۵) با سه تکرار انجام شد. برای خالص‌سازی گلیکوماکروپیتید در هر دو مرحله از فرآپالایش از فرایند دیافیلتراسیون استفاده شد. در پایان، مقدار پروتئین، اسید آمینه فنیل‌آلانین و نیتروژن غیرپروتئینی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: در pH=۴ مقدار اسید آمینه فنیل‌آلانین محلول آب‌پنیر فرآپالایش شده در پایین‌ترین سطح و مقدار نیتروژن غیرپروتئینی در بالاترین سطح ممکن قرار داشت که خلوص و درصد بازیافت بالای گلیکوماکروپیتید را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: در راستای هدف تولید یک منبع غذایی جدید برای بیماران مبتلا به فنیل‌کتونوری، آب‌پنیر شیرین که بخش اعظم آب‌پنیر تولیدی کشور را به خود اختصاص می‌دهد، بهترین گزینه موجود است.

واژگان کلیدی: استخراج، گلیکوماکروپیتید (GMP)، فنیل‌کتونوری، آب‌پنیر، خالص‌سازی

• مقدمه

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

آب‌پنیر فاز محلول شیر است که بعد از انعقاد کازئین در اثر عمل رنت (Rennet) یا باکتری‌های لاکتیکی یا هر دو از لخته جدا می‌شود. لخته شامل کازئین‌ها، چربی‌ها، برخی مواد معدنی و بعضی ویتامین‌ها است، اما آب‌پنیر حاوی لاکتوز، پروتئین‌های محلول (Whey proteins)، مواد معدنی محلول، اسیدهای آلی، ویتامین‌ها و آنزیمهای آست. پروتئین‌های آب‌پنیر ارزش بیولوژیک بالایی دارند. این پروتئین‌ها نسبت به پروتئین شاخص اسیدهای آمینه ضروری بیشتر و نسبت به پروتئین تخم مرغ کامل تریپتوفان،

در تولید بیشتر مواد غذایی، ایجاد فراورده‌های جانبی اجتناب‌ناپذیر است. از دید سنتی، فراورده‌های جانبی، زائد تلقی شده و به عنوان فاضلاب دفع می‌شوند، اما در سال‌های اخیر با توجه به پیامدهای زیست محیطی فراورده‌های جانبی، پیشرفت‌هایی در زمینه فرایند این گونه فراورده‌ها انجام شده است. این پیشرفت‌ها هم باعث جذب صاحبان صنایع به سمت فراورده محصولات جانبی شده و هم این که بازاری برای محصولات جانبی شده وجود آورده است. امروزه، در صنایع لبنی نه تنها فرایندهای تولید محصولات جدید از فراورده‌های جانبی رایج شده، بلکه به عنوان روش‌های سودآور به کار گرفته می‌شوند. آب‌پنیر یکی از فراورده‌های

ضعیف پلی استایرن در شکل قلیایی کمک گرفتند. Nakano و Ozimek (۱۹۹۹) گلیکوماکروپیپتید را از جزء غیرقابل DEAE-DEAE-Sephacel در pH های ۳ و ۶/۴ جدا کردند. Nakano و Ozimek (۲۰۰۰) اظهار داشتند که pH بهینه برای جداسازی گلیکوماکروپیپتید روی رزین DEAE-Sephacel محدوده ۴-۲/۵ است. Xu و همکاران (۲۰۰۰) موفق شدند آب پنیر به روشن کروماتوگرافی تبادل یونی جدا کنند. Nakano و همکاران (۲۰۰۲) گلیکوماکروپیپتید را از آب پنیر به روشن کروماتوگرافی با استفاده از رزین Sephadryl S-200 خالص کردند. Doulhani و همکاران (۲۰۰۳) روشنی را بر پایه تبادل یونی برای جداسازی گلیکوماکروپیپتید از ایزوله پروتئین آب پنیر (Whey Protein Isolate) ارائه کردند. Mine و Li (۲۰۰۴) نمایه کروماتوگرافی گلیکوماکروپیپتید جدا شده از ایزوله پروتئین آب پنیر به سه روش رسوبدهی (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 گلیکوماکروپیپتید به کار برند. Etzel و همکاران (۲۰۰۵) تأثیر هدایت الکتریکی pH و غلظت نمک بافر مورد استفاده جهت شست و شو بر بازیافت گلیکوماکروپیپتید به روش کروماتوگرافی تعویض یونی بررسی کردند. Martín و dianna و همکاران (۲۰۰۶) به بررسی خواص ویسکوالاستیک گلیکوماکروپیپتید 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 روشنی ساده و کاربردی برای جداسازی گلیکوماکروپیپتید در مقیاس صنعتی معرفی کرد. Kreuβ و Kulozik (۲۰۰۹) فرایند جذب مستقیم غشایی را برای جداسازی گلیکوماکروپیپتید خالص در مقیاس آزمایشگاهی انجام دادند.

در کشورمان تاکنون هیچ گونه تحقیقی در زمینه استخراج و خالص‌سازی پروتئین و همچنین استفاده از آن در رژیم غذایی بیماران مبتلا به فنیل کتونوریا انجام نشده است. اهداف این پژوهش عبارت بود از استخراج و خالص‌سازی پیپتید با ارزش گلیکوماکروپیپتید 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.

لوسین، ترئونین و لیزین بیشتری دارند. با توجه به این که حداقل ۵۰ واحد صنعتی فعال تولید پنیر در کشور وجود دارد، قادرخواهیم بود که با صرف سرمایه‌گذاری ناچیزی، قسمت مهمی از ترکیبات پُرارزش آب پنیر را بازیابی نماییم. به دلیل نقش آلایندگی آب پنیر بر محیط زیست، جلوگیری از اسراف منابع غذایی، افزایش درآمد واحدهای تولیدی و نیاز بعضی از سایر بخش‌های تولیدی و صنعتی به محصولات آب پنیر، بازیافت آب پنیر ضروری به نظر می‌رسد (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 می‌شوند. یکی از این ترکیبات گلیکوماکروپیپتید است. گلیکوماکروپیپتید یک پپتید هتروژن با وزن ملکولی ۶۷۵۵ دالتون و مرکب از ۶۴ اسید آمینه است. گلیکوماکروپیپتید غنی از اسیدهای آمینه شاخه‌دار والین، ترئونین و ایزولوسین، لیزین است و از لحاظ اسیدهای آمینه آромاتیک فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین فقیر است (۳). بیماری فنیل کتونوریا شایع‌ترین شکل یک بیماری اتوزومی مغلوب به نام بیش-فنیل آلانینمی (Hyperphenylalaninemia) است. در این بیماری، به علت کمبود یا عدم فعالیت آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلаз در کبد، اسید آمینه ضروری فنیل آلانین به تیروزین تبدیل نمی‌شود و سبب افزایش مزمن فنیل آلانین خون و پیدایش عوارضی از جمله آسیب مغزی غیر قابل برگشت می‌شود. کودکان مبتلا به فنیل کتونوریا در اثر تجمع فنیل آلانین هر ماه حدود ۴ نمره از بهره هوشی خود را از دست می‌دهند. نتیجه اختلال فنیل کتونوریا عقب‌ماندگی شدید ذهنی و برخی ناهنجاری‌های دیگر مانند بیش فعالی، اختلالات گفتاری، تشنج و... است که با بالا رفتن سن کودک آشکارتر می‌شوند (۴). گلیکوماکروپیپتید می‌تواند نقشی کلیدی در تغذیه بیماران مبتلا به فنیل کتونوریا داشته باشد.

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

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

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

آزمون‌ها:

روش اندازه‌گیری مقدار اسید آمینه فنیل‌آلانین: در این تحقیق از دستگاه HPLC جهت اندازه‌گیری مقدار اسید آمینه فنیل‌آلانین استفاده شد. برای این منظور از ستون (C18) Hypersil ODS به ابعاد ۴/۶ × ۲۵۰ میلی‌متر که اندازه ذرات آن ۵ μm بود، با نرخ جريان 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 ۸۵/۱۵ و محلول B محتوی مخلوط متانول و بافر تتراهیدروفوران (THF) به نسبت ۵۵/۴۵ 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 غیرپروتئینی (NPN): پس از محاسبه درصد پروتئین به روش کجلدال و با کم

• 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

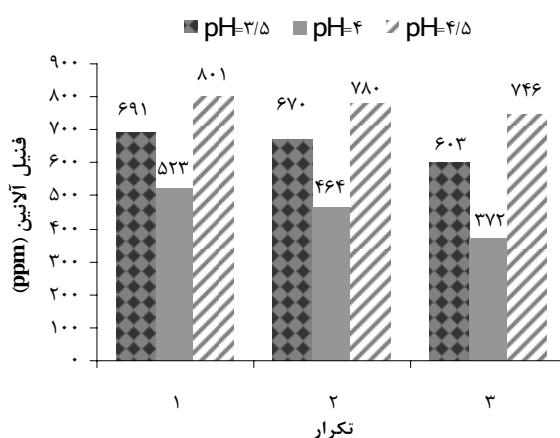
پروتئین	حداقل ۶۵ درصد
لاکتوز	حداکثر ۱۰ درصد
چربی	۱۱-۱۷ درصد
حاکستر	حداکثر ۵ درصد
رطوبت	حداکثر ۵/۵ درصد

غشاهای فراپالایش مدور از جنس پلیمر پلی‌اترسولفون (PES) با محدوده عبور وزن ملکولی ۵۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ دالتون از شرکت آلمانی Sartorius Stedim Biotech خریداری شد. دلایل استفاده از غشاهای فراپالایش مدور جنس پلیمر پلی‌اتر 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 آرمایشگاه تهیه شد.

- تجهیزات: تجهیزات مورد نیاز برای انجام این تحقیق شامل موارد زیر بودند:
۱. پمپ خلا
 ۲. سیستم پالایش تحت خلا شامل ارلن مایر، رابط، لیوان حجمی دارد، گیره و شیلنگ
 ۳. دستگاه کجلدال FOSS مدل ۲۳۰۰
 ۴. دستگاه HPLC

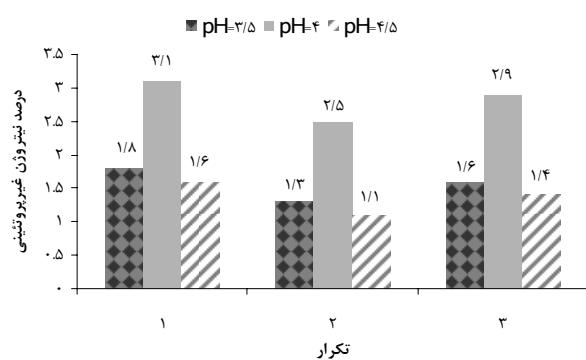
روش انجام تحقیق: محلولی از کنسانتره پروتئینی آب پنیر حاوی ۱۰٪ پروتئین (وزنی/حجمی) با آب مقطر استریل تهیه شد. سپس سوپسپانسیونی از فسفات کلسیم تهیه و سطح غشاء با آن پوشانده شد. با این کار، تراوایی گلیکوماکروپیتید از غشاء بهبود می‌یابد. در گام بعدی pH محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر با محلول اسید هیدروکلریک ۱/۰ 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 غیرپروتئینی 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 $pH=4/5$ تعیین شد (جدول ۲).

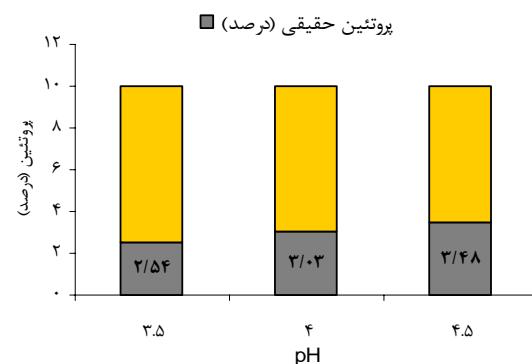
کردن نیتروژن پروتئینی از نیتروژن کل، مقدار نیتروژن غیرپروتئینی محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: در این تحقیق pH محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر به عنوان متغیر مستقل تعیین شد. مقدار پروتئین، نیتروژن غیرپروتئینی و مقدار اسید آمینه فنیل آلانین به عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شدند. این تحقیق در سه سطح pH (۳/۵، ۴، ۴/۵) 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 SPSS¹⁸ صورت گرفت.

۰ یافته ها

مقدار پروتئین حقیقی پس از انجام فراپالایش محلول کنسانتره پروتئینی آب پنیر در pH های ۳/۵، ۴ و ۴/۵ به ترتیب ۲/۵۴، ۲/۰۳ 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).

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

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

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

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

جدول ۲. مقدار پروتئین حقيقی محلول کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر

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

جدول ۳. مقدار اسید آمینه فنیلآلانین محلول کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر فراپالایش شده*

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

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

جدول ۴. درصد خلوص گلیکوماکروپیتید استحصالی بر مبنای اسید آمینه فنیلآلانین

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

• بحث

مقدار اسید آمینه فنیلآلانین: مقدار اسید آمینه فنیلآلانین در پودر کنسانتره پروتئین آب‌پنیر ۱۴۵۳۹ واحد در هر میلیون تعیین شد. مقدار این اسید آمینه پس از انجام فراپالایش به کمتر از ۴۰۰ واحد در هر میلیون کاهش یافت (شکل ۳).

بالا بودن مقدار اسید آمینه فنیلآلانین در محلول فراپالایش شده به خصوص در pH‌های مختلف علاوه بر

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

بین خلوص گلیکوماکروپیپتید استحصالی در سه pH متفاوت اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۴). *Neeser* و *Berrocal* گلیکوماکروپیپتید بر پایه ترسیب حرارتی را از کنسانتره پروتئین آب‌پنیر که مقداری از لاكتوز آن گرفته شده است، ارائه کردند. آن‌ها محلول pH=۱۰٪ آب‌پنیر با pH=۶٪ حاوی ۰/۱۵ درصد کلرید کلسیم را به مدت ۱ ساعت با دمای ۹۰ °C حرارت دادند، سپس برای تغییط فاز آبی به دست آمده از شیوه فراپالایش استفاده کردند. برای خالص‌سازی گلیکوماکروپیپتید pH را با استفاده از اتانول به ۴/۵ رساندند. خلوص گلیکوماکروپیپتید تولیدی توسط آن‌ها ۸۴٪ گزارش شد.

در سال ۱۹۹۱ *Tanimoto* و همکاران روشی را برای بازیابی گلیکوماکروپیپتید از آب‌پنیر بر پایه فراپالایش در مقادیر مختلف pH ارائه کردند. آن‌ها این عمل را در ۲۰۰۰۰ pH=۳/۵ ±۰/۲ و دمای ۵۰ °C با استفاده از غشای ۰/۸۰ دالتونی انجام دادند. آن‌ها تولید گلیکوماکروپیپتید با 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 پیتیدها از آب‌پنیر امنتال (Emmental) پیشنهاد کردند. در این روش ۷۰٪ گلیکوماکروپیپتید آب‌پنیر 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 گلیکوماکروپیپتید از ایزوله پروتئین آب‌پنیر ارائه کردند. آن‌ها با استفاده از ستونی که با رزین تبادلگر آئیونی دانه درشت Q-Sepharose پُرشده بود، توانستند ۹۶٪ گلیکوماکروپیپتید را بازیافت کنند.

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

خلوص گلیکوماکروپیپتید: هدف از این تحقیق، یافتن پایین‌ترین سطح اسید آمینه فنیل‌آلانین بود و pH=۴ مناسب‌ترین pH محسوب می‌شود. به این دلیل که اولاً در pH=۴/۵ بخش اعظم گلیکوماکروپیپتید توسط فرایند فراپالایش بازیافت نمی‌شود و نقطه ایزوکلریک برای گلیکوماکروپیپتید حدود ۳/۸ است، ثانیاً در pH=۴/۵ احتمال حضور پروتئین‌هایی مانند آلفا-لکتالبومین و بتا-لکتوگلوبولین در تراویده آب‌پنیر فراپالایش شده وجود دارد. این پروتئین‌ها حاوی اسید آمینه فنیل‌آلانین هستند.

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

با تکیه بر این مطلب که هدف کاربردی این تحقیق، به دست آوردن گلیکوماکروپیپتید با حداقل مقدار اسید آمینه فنیل‌آلانین است، مبنای خلوص گلیکوماکروپیپتید را میزان اسید آمینه فنیل‌آلانین درنظر می‌گیریم. به همین دلیل مقدار اسید آمینه فنیل‌آلانین پودر کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. میزان اسید آمینه

ایزولوسمین، والین، لیزین و لوسمین، فاقد اسیدهای آمینه آروماتیک دیگر است. پیشنهاد می‌شود که به منظور استفاده از گلیکوماکروپیتیدها به عنوان منبع پروتئینی باید این نقص در نظر گرفته شود و لازم است اسیدهای آمینه‌ی سنتزی تریپتوفالن 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 فراپالایش 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 متوجه شود.

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

نتایج نشان می‌دهد که مناسب‌ترین pH برای استخراج گلیکوماکروپیتید ۴ است زیرا هم از نظر درصد بازیافت گلیکوماکروپیتید 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 فراپالایش 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, Sleigh R, Hourigan J, Johnso R. Separation of bovine immunoglobulin G and glycomacropeptie 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