

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

عاطفه امیری ریگی^۱، مهرداد محمدی^۲، زهرا امام جمعه^۳، محمد امین محمدی^۴

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

نتیجه‌گیری: از میان شرایط هیدرولیز به کار رفته، بهترین شرایط برای حذف فنیل آلانین 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٪ فنیل آلانین شد.

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

• مقدمه

فقدان یا نقص در فعالیت آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز (PAH) به بیماری فنیل کتونوری منجر می‌شود. این آنزیم عامل تبدیل اسیدآمینه فنیل آلانین به اسیدآمینه تیروزین در بدن است (۱، ۲) و فقدان یا نقص در فعالیت آن به تجمع فنیل پیروویک 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 فنیل آلانین کم زیر نظر کارشناس تغذیه، تنها راه درمان موجود این بیماری ارثی است. آغاز به موقع برنامه غذایی، انجام منظم آزمایش تعیین سطح فنیل آلانین خون به همراه بررسی وضعیت بالینی، تغذیه و تأثیر درمان به صورت دوره‌ای، به رشد طبیعی و

زندگی همراه با سلامت کودک دارای این نقص کمک می‌کند (۴).

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

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 محصولات با کیفیت تغذیه‌ای پایین می‌شود. لازم به ذکر است که هیدرولیز شیمیایی می‌تواند 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 سمی 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 فنیل کتونوری، 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 فنیل کتونوری یا تیروزینمیا

(Tyrosinemia) استفاده شود (۱۲). Soares و همکاران (۲۰۰۶) برای هیدرولیز آنزیمی شیر بدون چربی از پاپاین (PA) و پیپسین (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 فنیل کتونوری از کربن فعال برای حذف فنیل‌آلانین استفاده شد. در حالتی که پاپاین و پیپسین به تنهایی استفاده شدند و نیز استفاده از پاپاین 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 پاپاین 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 پاپاین به دست آمده از شیر پاپایا (P4762) از شرکت Sigma (آمریکا) خریداری شد. کربن فعال گرانولی با اندازه ذرات ۱ تا ۳ میلی‌متر 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) هر کدام به حجم ۱۰۰ ml بعد از تنظیم pH با بافر فسفات

$$\text{ER (\%)} = 100 - [(B/A) \times 100] \quad \text{معادله ۱}$$

A: میزان در معرض گذاری فنیل آلانین در شیر هیدرولیز شده آنزیمی قبل از تیمار با کربن فعال
B: میزان در معرض گذاری فنیل آلانین در شیر هیدرولیز شده آنزیمی بعد از تیمار با کربن فعال

غلظت کربن فعال که باعث ER بالاتری می شود، تعیین و از آن برای همه تیمارهای آنزیمی باقی مانده استفاده شد. **تعیین کارایی حذف فنیل آلانین:** میزان کربن فعال که بالاترین درصد ER را نتیجه می دهد، در مرحله قبل تعیین و از آن برای حذف فنیل آلانین از تمامی نمونه های هیدرولیز شده آنزیمی استفاده شد. بعد از سانتریفوژ و عبور دادن محلول رویی از کاغذ صافی ۱۰ ml از مایع زیر صافی روی بن ماری تبخیر و به وسیله اسید کلریدریک ۵/۷ مول بر لیتر در دمای ۱۱۰°C به مدت ۲۴ ساعت هیدرولیز شد. باقی مانده در ۱۰ ml 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 طیف سنج در ۲۵۰ تا ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. طیف مشتق ثانویه رسم و از ارتفاع پیک های منفی برای محاسبه مقدار اسید آمینه فنیل آلانین در نمونه های شیر هیدرولیز شده آنزیمی با به کارگیری منحنی استاندارد فنیل آلانین استفاده شد. برای شیر چربی گرفته شده اولیه از روش مشابهی استفاده شد و کارایی حذف فنیل آلانین با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد.

$$\text{Phe Removal \%} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad \text{معادله ۲}$$

A: مقدار اولیه فنیل آلانین در شیر قبل از هیدرولیز آنزیمی
B: مقدار نهایی فنیل آلانین در شیر بعد از تیمار با کربن فعال (۱۸).

تعیین میزان فنیل آلانین با استفاده از طیف مشتق ثانویه: محلول های اولیه فنیل آلانین (10^{-4} mol/l $\times 5/0$)، تیروزین (10^{-4} mlo/l $\times 5/5$) و تربیتوفان (10^{-4} mol/l $\times 1/0$) در بافر فسفات ۰/۱ mol/l با pH=۶ تهیه شدند. ۱۰ ml از هر سه محلول را برداشته و با هم مخلوط شدند. از مخلوط حاصل رقت های متوالی تهیه شد؛ به صورتی که غلظت فنیل آلانین در آن ها از 10^{-4} mol/l $\times 0/13$ تا 10^{-4} mol/l $\times 1/0$ بود. طیف جذبی رقت های 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 پیک ها، بر اساس غلظت فنیل آلانین رسم شد. منحنی استاندارد فنیل آلانین با

(pH=۶)، تحت حرارت اولیه ۸۰°C به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفتند (۱۱)، سپس دمای نمونه ها 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 (پاپاین به دست آمده از شیر پاپایا) به نسبت ۱:۱۰۰ حجمی/حجمی و به سه نمونه سوم (H_3) آنزیم AO به همراه PA (هر کدام به نسبت ۵/۱۰۰:۱۰۰ حجمی/حجمی) اضافه شد. همه نمونه ها 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. پاپاین 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 تری کلرو استیک اسید ۱۲٪ رسوب داده شد. محتوای نیتروژن محلول رویی (نیتروژن غیرپروتئینی) با روش میکروکدال اندازه گیری شد و درجه هیدرولیز از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درجه هیدرولیز (\%)} = \frac{\text{نیتروژن غیرپروتئینی}}{\text{نیتروژن کل}} \times 100 \quad (۱۸)$$

جذب با کربن فعال: برای تعیین غلظت بهینه کربن فعال از شاخص در معرض گذاری ER (Exposure Rate) استفاده شد که غلظت اسید آمینه آزاد فنیل آلانین را در نمونه نشان می دهد. 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 نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵°C روی همزن قرار گرفتند. سپس نمونه ها 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 موج های ۲۵۰ تا ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. سپس طیف مشتق ثانویه رسم و محاسبه ER فنیل آلانین به کمک ارتفاع پیک های منفی و منحنی استاندارد فنیل آلانین و معادله زیر صورت گرفت (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 فنیل آلانین: جدول ۱ میزان در معرض‌گذاری فنیل آلانین 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 فنیل آلانین از شیر هیدرولیز شده آنزیمی، بهترین میزان کربن فعال ۰/۹ گرم به ازای گرم سوبسترا به دست آمد؛ زیرا بالاترین میزان در معرض‌گذاری فنیل آلانین را نتیجه داد.

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

محل رد شده از صافی (filtrates of hydrolysates)	میزان در معرض‌گذاری (ER)
F_1	$97/29^a \pm 0/16$
F_2	$98/21^b \pm 0/28$
F_3	$97/55^a \pm 0/24$

مقادیر دارای حروف متفاوت، با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند ($p < 0/05$).

اثر نوع آنزیم بر کارایی حذف فنیل آلانین: جدول ۲ کارایی حذف فنیل آلانین 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 فنیل آلانین از کلیه نمونه‌های هیدرولیز شده آنزیمی شیر کافی است و کاهش فنیل آلانین در این شرایط ۹۶ تا ۹۹ درصد بود.

جدول ۲. نتایج تعیین کارایی حذف فنیل آلانین

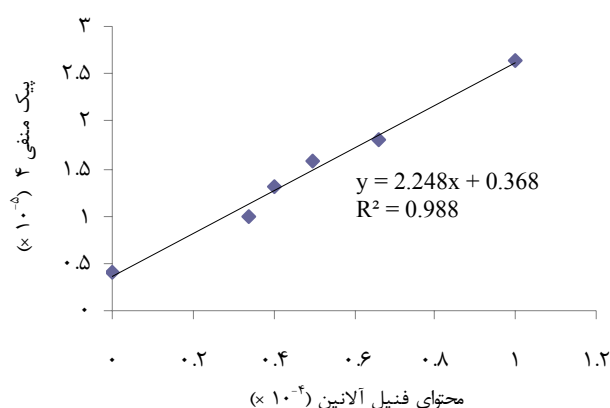
درصد حذف	مقدار نهایی فنیل آلانین* ۱۰۰ mg پروتئین / $mg \times 10^{-4}$	هیدرولیز آنزیمی
$97^a \pm 0$	$0/183^a \pm 0/025$	H_1
$96^a \pm 1$	$0/283^a \pm 0/087$	H_2
$99^b \pm 0$	$0/073^b \pm 0/015$	H_3

مقادیر دارای حروف متفاوت، با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند ($p < 0/05$).

*مقدار فنیل آلانین 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 فنیل آلانین، 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

بالاترین ضریب همبستگی با استفاده از ارتفاع پیک منفی چهارم به دست آمد (شکل ۱). ضریب همبستگی و معادله منحنی به ترتیب $R^2 = 0/988$ و $y = 2/248x + 0/368$ بودند. این نتایج شبیه نتایج به دست آمده توسط سایر محققان بود که در حضور تیروزین و تریپتوفان یک منحنی استاندارد خطی برای فنیل آلانین به دست آوردند (۲۰).



شکل ۱. منحنی استاندارد فنیل آلانین

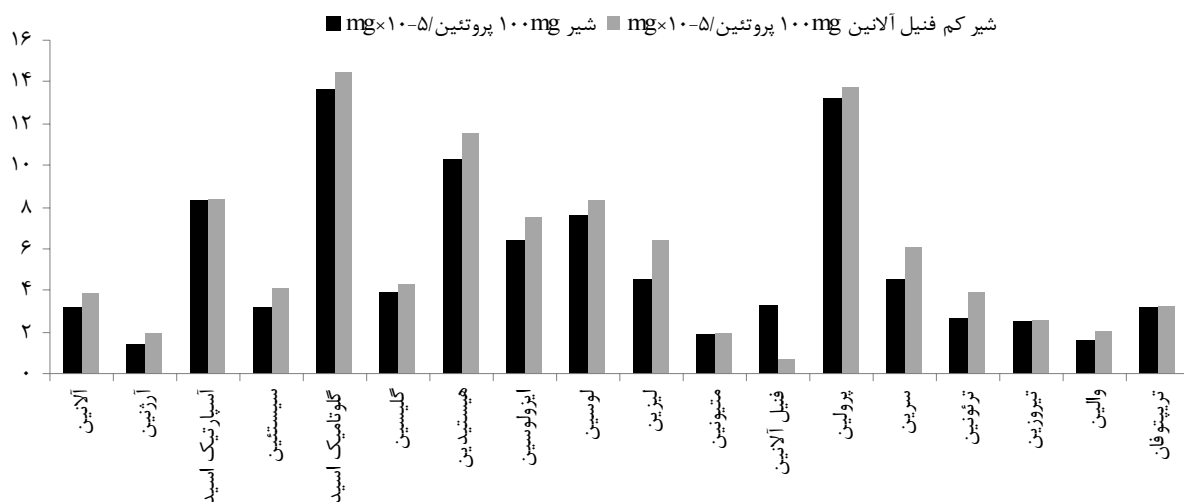
پیک ۴: پیک منفی در طیف مشتق ثانویه فنیل آلانین

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 فنیل ایزوتیوسیانات (PITC) به منظور تولید اسیدهای آمینه فنیل تیوکاربامیل (PTC) مشتق‌سازی می‌شوند سپس، مشتق اسیدهای آمینه با HPLC آنالیز می‌شود (۲۱).

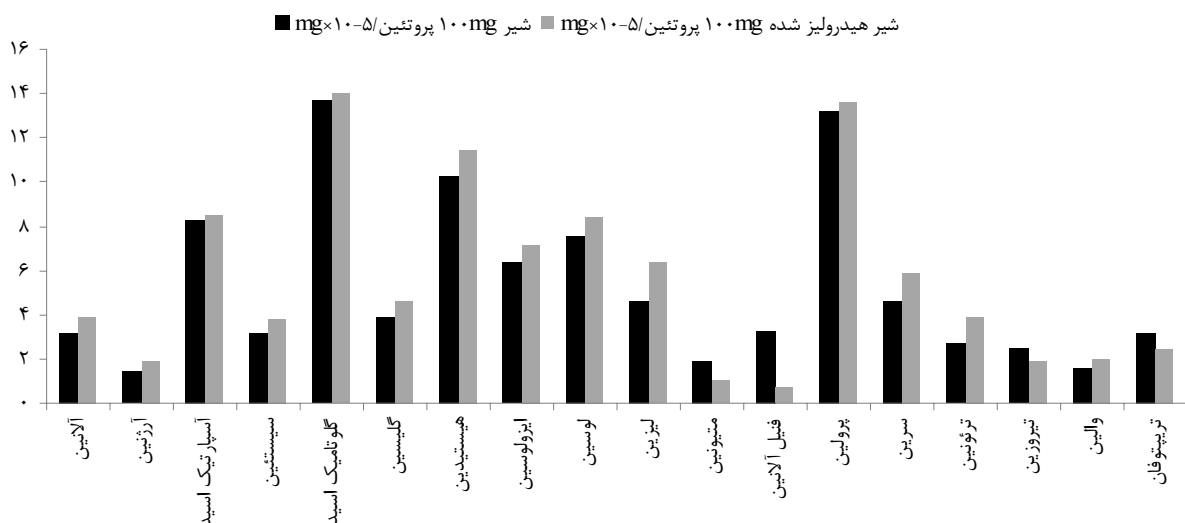
افزافه کردن اسیدهای آمینه متیونین، تیروزین و تریپتوفان: پروفایل اسیدهای آمینه فقط در تیماری تعیین شد که بالاترین کارایی حذف فنیل آلانین را داشت. به دلیل کاهش مقدار اسیدهای آمینه متیونین، تیروزین و تریپتوفان، این اسیدهای آمینه بر اساس الگوی FAO/WHO به نمونه شیر کم فنیل آلانین بعد از تعیین پروفایل اسیدهای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

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 فنیل آلانین حاصل توسط HPLC تعیین شد (شکل ۳).

H_۳ بعد از تیمار با کربن فعال در شکل ۲ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، مقدار فنیل آلانین در شیر هیدرولیز شده آنزیمی بعد از تیمار با کربن فعال $10^{-5} \times 0.69$ میلی گرم به ازای 10^{-5} میلی گرم پروتئین و در شیر قبل از هیدرولیز آنزیمی $10^{-5} \times 3/3$ میلی گرم به ازای 10^{-5} میلی گرم 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



شکل ۲. مقایسه پروفایل اسید آمینه در شیر و شیر کم فنیل آلانین حاصل از هیدرولیز آنزیمی ۳ (H_۳)
برای هر اسید آمینه، ستون‌های دارای حروف متفاوت، با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند ($p < 0.05$).



شکل ۳. مقایسه پروفایل اسید آمینه در شیر و شیر کم فنیل آلانین حاصل از هیدرولیز آنزیمی ۳ (H_۳) بعد از افزودن اسیدهای آمینه متیونین، تیروزین و تریپتوفان
برای هر اسید آمینه، ستون‌های دارای حروف متفاوت، با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند ($p < 0.05$).

• بحث

تعیین بهترین میزان کربن فعال: از بین سه مقدار کربن فعال مورد آزمون برای حذف فنیل آلانین از هیدرولیز آنزیمی شیر، بهترین میزان کربن فعال ۰/۹ گرم به ازای گرم پروتئین بود؛ زیرا بالاترین میزان در معرض گذاری فنیل آلانین را نشان داد (جدول ۱). با به کارگیری ۰/۹ گرم کربن فعال برای همه نمونه های هیدرولیز شده آنزیمی، کارایی حذف فنیل آلانین ۹۶ تا ۹۹ درصد به دست آمد (جدول ۲) که نشان می دهد، میزان کربن فعال مورد استفاده، سطح کافی برای جذب فنیل آلانین موجود در نمونه ها را فراهم می کند. یک توضیح احتمالی برای عدم وجود اختلاف معنی دار بین F_1 و F_2 حضور مقادیر بیشتر فنیل آلانین در زنجیره های پپتیدی بزرگ در نمونه های هیدرولیز شده آنزیمی حاصل از شیر است که می تواند از حذف آن مانعت کند. همان طور که Shimamura و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند، زمانی که فنیل آلانین به اندازه کافی توسط فرایند هیدرولیز آنزیمی آزاد نشده، تنها مقدار کمی از این اسید آمینه می تواند توسط فیلتراسیون ژل یا کربن فعال حذف شود (۲۲).

تعیین بهترین تیمار آنزیمی: با مطالعه داده های جدول ۲ می توان نتیجه گرفت که تأثیر پروتئاز/آسپرژیلوس/اوریزا (H_1) به تنهایی، نتایجی شبیه عمل پایایی (H_2) به تنهایی ارائه می دهد؛ زیرا تفاوت معنی داری بین H_1 و H_2 مشاهده نشد. با توجه به این که در پژوهش حاضر شرایط هیدرولیز مقایسه با حذف ۹۲٪ فنیل آلانین توسط این محققان، ما قادر به حذف ۹۶ تا ۹۹ درصد از این اسید آمینه شدید. این اختلاف می تواند در ارتباط با مقادیر بالاتر کربن فعال در تحقیق حاضر (بیش از ۳۰ برابر) یا 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 کرده اند که از پودر شیر چربی گرفته شده و کازئین به عنوان سوبسترای عمل آنزیم ها استفاده کرده اند، نتایج ارائه شده در مقالات آن ها تنها شامل کازئین است (۲).

با وجود استفاده از مقادیر بالاتر کربن فعال، مزیت تحقیق حاضر در ارتباط با زمان هیدرولیز کوتاه تر (تقریباً ۵ برابر کمتر) است که می تواند هزینه تولید را کاهش دهد. از طرف دیگر، زمان هیدرولیز کوتاه می تواند احتمال آلودگی

میکروبی را کاهش دهد. محققان دیگری نیز از کربن فعال برای حذف فنیل آلانین از پروتئین هیدرولیز شده استفاده کرده اند. Shehata و همکاران (۲۰۰۸) از کربن فعال و سولفات باریم برای حذف فنیل آلانین از شیر هیدرولیز شده آنزیمی، حاصل از عمل دو آنزیم پروتئولیتیک پاپائین و آسپرژیلوس/اوریزا، استفاده و مشاهده کردند که در مقایسه با سولفات باریم، کربن فعال اثر تلخی زدایی بیشتری دارد (۱۸). به هر حال، این محققان به شرایط تیمار با کربن فعال اشاره ای نکرده اند. Soares و همکاران (۲۰۰۶) برای تهیه محصولی کم فنیل آلانین از شیر چربی گرفته شده از پاپائین و پپسین به تنهایی و نیز همراه با پروتئاز/آسپرژیلوس/اوریزا و کربن فعال برای حذف فنیل آلانین استفاده کردند و موفق به حذف ۹۷ تا ۹۸ درصد فنیل آلانین شدند (۱۵). Moszczynski و Idziak (۱۹۹۳) موفق به کاهش ۹۵٪ فنیل آلانین از کازئین هیدرولیز شده شدند. شرایط تحقیق آن ها نسبت به تحقیق حاضر سخت تر بود؛ به عنوان مثال، زمان طولانی هیدرولیز آنزیمی (۷۲ ساعت) و تیمار با کربن فعال (۵/۵ ساعت) (۲۳).

برخی محققان برای حذف فنیل آلانین از پروتئین هیدرولیز شده، روش های دیگری نظیر فیلتراسیون ژل را به کار بردند (۲۲) که کارایی حذف فنیل آلانین توسط این محققان ذکر نشده است. Lara و همکاران (۲۰۰۵) برای حذف فنیل آلانین از هیدرولیز آنزیمی از شیر لوزالمعد، 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 فنیل آلانین از رزین های پلی استرن (XAD-4 e XAD-16) استفاده کردند که تقریباً باعث حذف کامل فنیل آلانین (۹۹/۹٪) شد. ایراد این روش، هزینه بسیار بالاتر رزین ها 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 می تواند 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 فنیل آلانین از پودر شیر چربی گرفته شده، با

ذکر کردند و اسیدهای آمینه ذکر شده را طبق الگوی FAO/WHO به فرمولاسیون افزودند (۱۸).

با توجه به توصیه‌های دریافت روزانه فنیل آلانین توسط بیماران فنیل کتونوری- هرچند در مقالات اجماع نظر وجود ندارد- ولی بیشتر این گونه عنوان شده که غلظت فنیل آلانین خون باید در محدوده ۲-۶ mg/dL باشد (۲۵) و میزان فنیل آلانین رژیم غذایی باید بر اساس سطح فنیل آلانین خون فرد تغییر کند. در این راستا غلظت نهایی اسید آمینه فنیل آلانین در پروتئین هیدرولیز شده که برای تغذیه بیماران فنیل کتونوری تولید شده، باید اطلاع داده شود تا بتوان میزان دریافت این اسید آمینه را بر اساس نیاز هر فرد تعیین کرد. بنابراین، از نظر جنبه‌های بالینی فنیل کتونوری می‌توان نتیجه گرفت هیدرولیز آنزیمی شماره ۳ (H₃) با توجه به دارا بودن کمترین مقدار فنیل آلانین^۴ (۱۰ × ۰/۷۳ میلی گرم به ازای ۱۰۰ میلی گرم پروتئین) بهترین گزینه برای تهیه مکمل تغذیه‌ای برای بیماران فنیل کتونوری است.

هدف رسیدن به محصولی ارزان برای بیماران فنیل کتونوری 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 فنیل آلانین کم برای بیماران فنیل کتونوری 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

• References

- Galvão CMA, Pinto GA, Jesus CDF, Giordano RC, Giordano RLC. Producing a phenylalanine-free pool of peptides after tailored enzymatic hydrolyses of cheese whey. *J Food Eng* 2009; 91: 109-17.
- 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.
- Gowda SS, McDonald JD. The effect of large neutral amino acids on maternal phenylketonuria offspring. [dissertation]. Wichita: Wichita State University; 2006 p. 1-9.
- Lopes DCF, Delvivo FM, Silvestre MPC. Dietary supplements for phenylketonuria: removing Phe by activated carbon. *J Nutr Food Sci* 2006; 36: 96-104.
- 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.
- Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 1953; 265: 812-13.
- Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci Tech* 2000; 11: 254-62.
- 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.
- Fox P, Morrissey P, Mulvihill D. Chemical and enzymatic modification of food proteins. *Dev Food Proteins-1* London: Applied Science Publ; 1982; 1-60.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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, Capobianco M, Vieira CR, Silva VDM, Morais HA, et al. Preparation of enzymatic skim hydrolysates 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 product 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.

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

Amiri-Rigi A¹, Mohammadi M², Emam-Djomeh Z³, 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

