بهینه سازی هیدرولیز آنزیمی پروتئین های آب پنیر با هدف کاهش میزان فنیل آلانین با استفاده از فیلتراسیون غشائی

فروغ حسیبی[1*]، علی نصیرپور[2]، جواد کرامت[3]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۸)

چکیده

مطالعات انجام گرفته در زمینه تولید مکملهای پروتئینی مخصوص بیماران فنیل کتونوری نشان می دهد که پروتئینهای آب پنیر یکی از مهمترین منابع پروتئینی برای تولید این ترکیبات به دلیل ترکیب خاص اسیدهای آمینه آن می باشد. آب پنیر یکی از مهمترین آلوده کننده های محیط زیست به شمار می رود، از طرفی منبع غنی از پروتئینهای کاربردی است که در پزشکی و رژیمهای غذایی خاص استفاده می شود. در این تحقیق از کنسانتره پروتئین آب پنیر در سه غلظت متفاوت به عنوان سوبسترای آنزیم‌های فلاورزایم، نئوتراز و پروتامکس استفاده شد و تأثیر دو پارامتر غلظت سوبسترا و زمان هیدرولیز بر راندمان جداسازی فنیل آلانین با استفاده از طرح سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. به منظور جداسازی فنیل آلانین آزاد شده و اندازه گیری آن به ترتیب از روش اولترافیلتراسیون و کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا استفاده گردید. نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که نمونه هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم حاوی کمترین میزان فنیل آلانین می‌باشد. همچنین به منظور پیش بینی بهترین شرایط هیدرولیز بهینه سازی انجام گرفت. بهترین شرایط به منظور حذف بیشترین میزان فنیل آلانین از پروتئینهای آب پنیر با هر سه آنزیم در کمترین زمان هیدرولیز و کمترین غلظت سوبسترا حاصل شد.

کلید واژگان: پروتئین‌های آب پنیر، هیدرولیز آنزیمی، اولترافیلتراسیون، فنیل کتونوری.

* مسئول مکاتبات: f.hasibi@ag.iut.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-17]

۱- مقدمه

تحقیقات نشان داده است که پروتئینهای آب پنیر مهمترین منبع پروتئینی برای تولید مکملهای رژیمی بیماران مبتلا به فنیل کتونوری است. مهمترین مزیت آب پنیر ترکیب اسیدهای آمینه پروتئینهای آن می‌باشد. پروتئین آب پنیر منبع غنی از اسیدهای آمینه ضروری مانند اسیدهای آمینه گوگرددار، در مقایسه با دیگر منابع پروتئینی نظیر تخم مرغ، گوشت، کازئین و سویا است[۱، ۲ و ۳]. فنیل کتونوری یکی از شایع ترین اختلالات ارثی متابولیک است که به علت فقدان یا کاهش فعالیت آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز در کبد رخ می‌دهد که این نقص از تبدیل فنیل آلانین به تیروزین ممانعت می‌کند. این بیماری به طور کلینیکی به صورت عقب ماندگی ذهنی شدید، دائمی و برگشت ناپذیر بروز می‌نماید [۴ و ۵]. در ایران نیز مانند سایر کشورهای در حال توسعه تشخیص و مهار این بیماری بسیار دیر اتفاق می‌افتد و به همین دلیل میزان شیوع این بیماری در ایران نسبتاً بالاست [۶]. درمان این بیماری شامل تحت تأثیر قرار دادن مسیر متابولیکی ناقص از طریق محدود کردن سوبسترا (تکمیل کردن مقدار محصول با غذاهای فرموله آماده، به طریقی که سایر اسیدهای آمینه و مواد مغذی مورد نیاز را تأمین کند)، تکمیل کوفاکتور آنزیم و یا تلفیقی از همه این روشهاست [۷ و ۸]. برای درمان مبتلایان به فنیل کتونوری پیروی از رژیم کم فنیل آلانین تا پایان عمر، البته نه با محدودیت شدید دوران کودکی توصیه می‌شود [۹ و ۱۰]. پروتئینهای هیدرولیز شده مورد استفاده در فرمولاسیون مخصوص، از اسیدهای آمینه آزاد، پپتیدهای کوچک (دی یا تری پپتیدها) تشکیل شده اند. برای تولید پروتئینهای هیدرولیز شده واکنشهای متوالی اندوپپتیدازها و اگزوپپتیدازها ترجیح داده می‌شود. روشهای آنزیمی بهترین روش برای تولید پپتیدهای هیدرولیز شده به سبب قابلیت تولید انبوه، قیمت متوسط و کیفیت زیاد این محصولات می‌باشد. تاریخچه استفاده از پروتئین‌های هیدرولیز شده به عنوان یک جزء غذایی به اواخر قرن ۱۹ برمی‌گردد. در دهه ۱۹۵۰ مشخص شد که تیمار کازئین هیدرولیز شده با کربن فعال می‌تواند اغلب اسیدآمینه‌های آروماتیک (فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان) را خارج کند [۱۱]. میزان فنیل آلانین در آب پنیر در حدود ٪۹-۲/۴ وزنی پروتئین می‌باشد. اما همین مقدار را می‌توان با کمک سیستمهای مختلف نظیر فیلترهای ژلی، جذب با کربن فعال ، رزینهای پلی استر و نیز استفاده از سیستمهای غشایی، به راحتی حذف نمود [۱و ۲]. درصد جداسازی این اسید آمینه از پروتئینهای شیر تا ۹۹٪ هم امکان پذیر است [۱۲]. کاپوبیانگو و همکاران (۲۰۰۷) تحقیقاتی را در زمینه بهینه سازی استخراج و هیدرولیز پروتئین‌های ذرت با استفاده از آنزیم پروتئاز *باسیلوس لیچنی فرمیز* و پانکراتین انجام دادند. جهت جداسازی فنیل آلانین نیز از کربن فعال استفاده کردند. در این پژوهش تأثیر غلظت عصاره پروتئینی، نسبت آنزیم به سوبسترا، میزان و نوع کربن فعال مورد بررسی قرار گرفت. روش آنزیمی مورد استفاده در این پژوهش شامل (دمای $55^{\circ}C$، پس از ۵، ۱۵ و ۲۴ ساعت) منجر به استخراج پروتئین‌ها با راندمان ٪۸۵/۳ گردید [۱۳]. لوپز و همکاران (۲۰۰۷) از رزین و کربن فعال به منظور حذف فنیل آلانین از آب پنیر هیدرولیز شده استفاده کردند. همچنین برای جداسازی بیشتر این اسید آمینه آنها از سیستم اولترافیلتراسیون استفاده کردند. به منظور هیدرولیز آب پنیر هم آنزیم پانکراتین به کاربرده شد. در این پژوهش بهترین راندمان جداسازی (حذف فنیل آلانین به میزان ٪۹۸-۹۵) با استفاده از کربن فعال به دست آمد [۱۴]. در تحقیقی مشابه نیز به منظور تأمین مواد مغذی مورد نیاز بیماران مبتلا به فنیل کتونوری از هیدرولیز پودر شیر پس چرخ توسط *آسپرژیلوس اوریزا* و پاپایین استفاده نمودند و برای جداسازی فنیل آلانین از کربن فعال استفاده کردند. نتایج نشان داد، این روش در دمای $30^{\circ}C$ و نسبت کربن فعال به کازئین برابر ۱۱۸، قادر به حذف ۹۹-۹۶٪ فنیل آلانین از شیر پس چرخ می‌باشد [۱۵]. فرآیندهای غشایی مانند اولترافیلتراسیون عملیات واحدی هستند که طی آن آب و برخی اجزاء محلول به صورت انتخابی توسط یک غشاء نیمه تراوا جدا گردیده و موجب جداسازی، تغلیظ و یا تفکیک اجزاء محلول می‌گردد. مکانیسم جداسازی اصولاً بر مبنای نوع فرآیند غشایی و جنس غشاء متفاوت است. اولترافیلتراسیون را می توان در اندازه و سیستم‌های متفاوتی بکار گرفت، قابلیت انعطا ف پذیری فرآیند UF این امر را امکان پذیر می سازد که از آن در حد آزمایشگاهی تا مقیاس‌های بزرگتر صنعتی در سیستم‌های مداوم و غیر مداوم استفاده نمود [۱۶]. گالوائو و همکاران (۲۰۰۹) از ۳ آنزیم تریپسین، کیموتریپسین و کربوکسی پپتیداز A تثبیت شده به منظور هیدرولیز آب پنیر و سیستم UF به منظور جداسازی فنیل آلانین آزاد شده برای تولید منبع پروتئینی مورد مصرف

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-17]

بیماران PKU استفاده کردند.در این تحقیق بهترین نتیجه در هیدرولیز با آنزیمهای کیموتریپسین و کربوکسی پپتیداز A حاصل شد که در نهایت منجر به حذف فنیل آلانین تا میزان ۹۸/۳٪ گردید [۱۷]. پادیلا و همکاران (۲۰۰۹) در تحقیقی مشابه از دو آنزیم کیموتریپسین و کربوکسی پپتیداز A تثبیت شده، برای هیدرولیز استفاده کردند. در این تحقیق برای اولین بار از راکتور غشایی-آنزیمی استفاده شد. کارایی و راندمان جداسازی فنیل آلانین در سیستم غشایی-آنزیم ۸۵٪ و راندمان جداسازی در سیستم بچ ۸۳٪ گزارش شد [۱۸]. تحقیقاتی نیز در زمینه بررسی نیاز تغذیه ای و ارائه محصولات غذایی برای بیماران مبتلا به فنیل کتونوری صورت گرفته است [۲۲- ۱۹].

در این تحقیق، امکان تولید منبع پروتئینی با میزان فنیل آلانین کاهش یافته با استفاده از هیدرولیز آنزیمی پودر کنسانتره پروتئینی آب پنیر و جداسازی فنیل آلانین به روش اولترافیلتراسیون مورد بررسی قرار گرفت. شرایط مورد استفاده در حین جداسازی (مانند دما، فشار، زمان اولترافیلتراسیون و نوع غشاء) برای تمامی نمونه‌ها یکسان در نظر گرفته شد. در نهایت بهینه سازی شرایط هیدرولیز بر اساس زمان هیدرولیز و غلظت سوبسترا با استفاده از طرح سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش ها

پودر کنسانتره پروتئینی آب پنیر از شرکت میلای (آلمان) و آنزیم های فلاورزایم[1] (۱۰۰۰ LApu/g)، نئوتراز[2] (Au-۰/۸ NH/g) و پروتامکس[3] (۱/۵ Au-NH/g) از شرکت Novozyme (دانمارک) تهیه شدند. اسید کلریدریک، اورتوفتال دی آلدهید، سدیم دو دسیل سولفات، ، فنیل آلانین، متانول مخصوص HPLC، اسید فسفریک، استات روی، فروسیانور پتاسیم و دی سدیم تترابورات دکاهیدرات از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. سرین و β- مرکاپتواتانول نیز از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شدند.

۲-۱- روش آماده سازی نمونه‌ها

به منظور تهیه محلول‌های مورد نیاز از پودر کنسانتره آب پنیر ۸۰٪ استفاده و محلول‌هایی با ۳ غلظت ۰/۵، ۲ و ۳/۵٪ (بر اساس وزن کل سوبسترا) آماده گردید. با توجه به جدول ۱ نمونه‌ها با استفاده از طرح سطح پاسخ در ۳ زمان ۱۰، ۳۰ و ۵۰ ساعت هیدرولیز شدند. هر ۱۲ تیمار با استفاده از آنزیم فلاورزایم با غلظت آنزیم ۰/۱٪ و نیز ترکیبی از دو آنزیم نئوتراز و پروتامکس با مجموع غلظت ۰/۱٪ انجام گرفت. در هر تیمار نمونه مورد نظر با غلظت مشخص در شرایط کاملاً استریل آماده شد و pH نمونه به کمک بافر فسفات بر روی pH ۷ تنظیم گردید. سپس آنزیم به نسبت ۰/۱٪ حجم کل سوبسترا به نمونه افزوده شده و نمونه‌ها به بیدون‌های دستگاه ویسکوباتر منتقل و دمای دستگاه بر روی ۵۵°C تنظیم گردید. شرایط اعمال شده برای هیدرولیز شامل استفاده از دمای ۵۵ °C و pH ۷ به منظور بهترین شرایط هیدرولیز انتخاب شد (غلظت آنزیم، دما و pH مورد نیاز برای هیدرولیز در تمامی نمونه‌ها یکسان انتخاب شد) [۲۳، ۲۴ و ۲۵]. پس از غیر فعال کردن آنزیم در دمای ۸۰° C، دمای نمونه کاهش داده شده و مقداری از نمونه هیدرولیز شده به منظور انجام آزمایشات مربوطه بر روی فاز ماندگار[4] اولیه در سردخانه ۱۸°C- تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شد. باقیمانده نمونه هیدرولیز شده به دستگاه اولترافیلتراسیون منتقل شد.

۲-۲- اندازه گیری درجه هیدرولیز نمونه‌های هیدرولیز شده

برای اندازه گیری درجه هیدرولیز از واکنشگر اورتوفتال دی آلدئید (OPA) استفاده شد. نمونه‌های هیدرولیز شده با واکنشگر OPA مخلوط و آنگاه میزان جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده شد. استاندارد مورد استفاده، اسیدآمینه سرین بود که میزان جذب آن بسیار نزدیک به جذب میانگین کلیه اسیدهای آمینه‌است [۲۶ و ۲۷].

۲-۳- اندازه گیری فنیل آلانین

به منظور استخراج فنیل آلانین از روش هیدرولیز پروتئین‌ها با استفاده از اسید استفاده شد: نمونه هیدرولیز شده توسط اسید کلریدریک ۶ مولار به مدت ۲۴ ساعت درون آون ۱۱۰°C هیدرولیز گردید. شفاف سازی محلول و رسوب پروتئین ها از نمونه های هیدرولیز شده به ترتیب با استفاده از محلول های کارز ۱ و ۲ و سانتریفیوژ انجام گرفت. نمونه ها در دمای ۱۸°C- نگهداری شدند [۲۸ و ۲۹].

1. Flavourzyme
2. Neutrase
3. Protamex
4. Retentate

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-17]

۲-۴- شرایط HPLC

برای اندازه گیری فنیل آلانین از ستون ODS C۱۸ به طول ۴/۶ × ۲۵۰ میلیمتر از جنس فولاد ضد زنگ استفاده شد. به عنوان فاز متحرک از محلولی حاوی متانول مخصوص HPLC که با اسید فسفریک ۱۵ میلی مولار به حجم رسانده شده بود، استفاده شد [۳۰ و ۳۱]. برای اندازه گیری فنیل آلانین از استاندارد خارجی استفاده گردید.

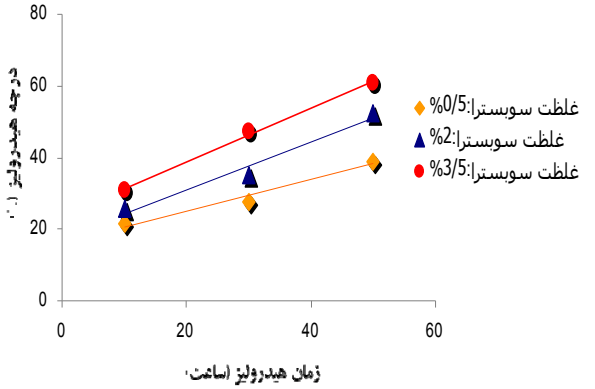
۲-۵- طرح آماری مورد استفاده

در بررسی تأثیر پارامترهای متغیر مورد نظر (غلظت سوبسترا و زمان هیدرولیز) و بهینه سازی شرایط هیدرولیز از طرح سطح پاسخ (RSM) و نرم افزار Design-Expert 6.0.6 استفاده شد.

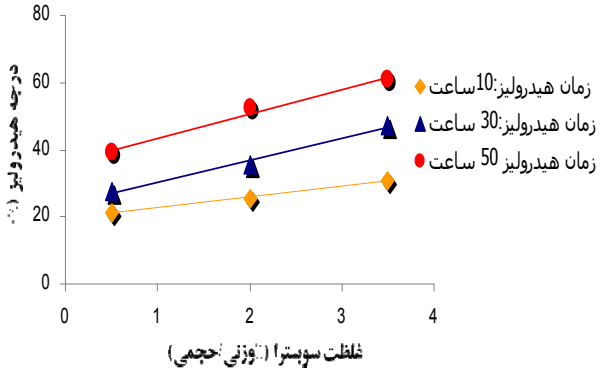
۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین درجه هیدرولیز

آنزیم فلاورزایم دارای فعالیت اگزوپپتیدازی و اندوپپتیدازی است. این آنزیم فعالیت اگزوپپتیدازی بسیار زیادی دارد، خصوصاً میزان فعالیت آمینوپپتیدازی آن بسیار زیاد است [۲۴]. نتایج این تحقیق (جدول ۲) نشان داد که در هیدرولیز با آنزیم فلاورزایم در تمامی زمان‌های هیدرولیز با افزایش غلظت سوبسترا شدت هیدرولیز و متعاقباً درصد درجه هیدرولیز افزایش پیدا می‌کند. در فرآیندهای هیدرولیز باید به این نکته توجه داشت که درجه هیدرولیز وابسته به مقدار آنزیم و میزان فعالیت اختصاصی آنزیم به کار برده شده است. در واکنش‌های پروتئولیزی که از آنزیم‌هایی با فعالیت آمینوپپتیدازی بالا استفاده شود، درجه هیدرولیز مقادیر بالایی داشته و با گذشت زمان میزان آن افزایش پیدا می‌کند. شکل (۱) نشان می‌دهد که با افزایش زمان هیدرولیز و در سوبستراهایی از کمترین تا بیشترین غلظت به دلیل فعالیت زیاد آنزیم فلاورزایم به عنوان آمینوپپتیداز بر شدت هیدرولیز افزوده می‌شود. اسمیت و همکاران (۱۹۹۸) نیز در شرایطی مشابه اعلام کردند که میزان فعالیت آمینوپپتیدازی آنزیم فلاورزایم بالا است و همین امر را یکی از دلایل افزایش درجه هیدرولیز طی هیدرولیز با آنزیم فلاورزایم گزارش کردند [۲۴]. با گذشت زمان به دلیل فعالیت هم زمان آنزیم فلاورزایم به عنوان اندوپپتیداز و اگزوپپتیداز، به طور مداوم پیوندهای پپتیدی بیشتری درون مولکول پروتئین شکسته شده و جایگاه‌های فعال بیشتری در اختیار آنزیم قرار داده می‌شود. بنابراین با گذشت زمان میزان درجه هیدرولیز افزایش پیدا می‌کند. با مقایسه نمودارهای شکل (۲) چنین برداشت می شود که حتی در غلظت‌های بالا و در مدت زمان طولانی هیدرولیز، آنزیم فلاورزایم از سوبسترا اشباع نشده و فعال است. افزایش درجه هیدرولیز نشان دهنده افزایش تولید پپتیدهایی با وزن مولکولی کم و نیز افزایش تولید اسیدهای آمینه آزاد است. وجود مقادیر زیادی اسیدهای آمینه آزاد منجر به مشکلات گوارشی شدید می شود. مناسبترین درجه هیدرولیز برای تولید مکمل‌های پروتئینی مورد مصرف بیماران خاص در محدوده ۵۰٪-۱۰ است [۲۴ و ۲۷].



شکل ۱ تغییرات درجه هیدرولیز در نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم با غلظت سوبسترای ۰/۵، ۲ و ۳/۵ (وزنی/حجمی٪) در طی زمان هیدرولیز



شکل ۲ تغییرات درجه هیدرولیز در نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم با زمان هیدرولیز ۱۰، ۳۰ و ۵۰ ساعت نسبت به غلظت سوبسترا

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-17]

جدول ۱ سطوح کدگذاری شده و مقادیر واقعی فاکتورهای متغیر فرآیند پروتئولیز در طرح مورد استفاده

تیمار	فاکتور A (زمان هیدرولیز)		فاکتور B (غلظت سوبسترا)	
	کد	مقدار واقعی(ساعت)	کد	مقدار واقعی(٪وزنی/حجمی)
۱	۱	۵۰	۰	۲
۲	۱	۵۰	۱	۳/۵
۳	-۱	۱۰	۱	۳/۵
۴	۰	۳۰	-۱	۰/۵
۵	-۱	۱۰	-۱	۰/۵
۶	۰	۳۰	۱	۳/۵
۷	۱	۵۰	۱	۳/۵
۸	-۱	۱۰	۱	۳/۵
۹	۰	۳۰	۰	۲
۱۰	۱	۵۰	-۱	۰/۵
۱۱	-۱	۱۰	۰	۲
۱۲	-۱	۱۰	-۱	۰/۵

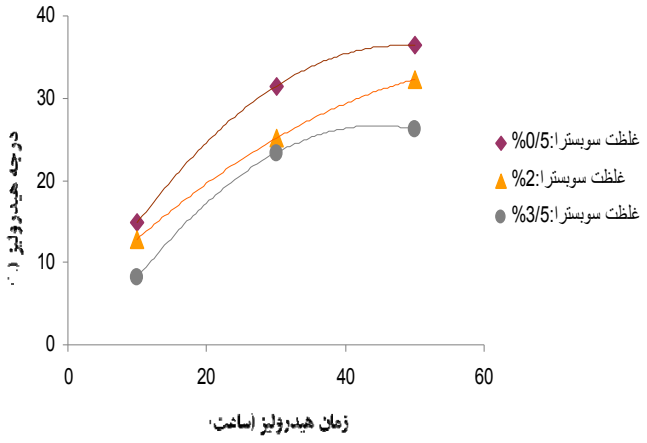
جدول ۲ درجه هیدرولیز نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم و آنزیم‌های نئوتراز- پروتامکس در ۵۵°C و به نسبت ۰/۱٪حجم کل سوبسترا

تیمار	درجه هیدرولیز در هیدرولیز با آنزیم فلاورزایم (درصد)	درجه هیدرولیز در هیدرولیز با آنزیمهای نئوتراز و پروتامکس(درصد)
۱	۵۲/۳۶	۳۲/۳۳
۲	۶۱/۲۰	۲۵/۵۴
۳	۳۱/۱۱	۸/۰۲
۴	۲۷/۶۱	۳۱/۴۷
۵	۲۰/۸۹	۱۴/۷۰
۶	۴۷/۲۱	۲۳/۳۱
۷	۶۰/۶۳	۲۶/۹۲
۸	۳۰/۴۵	۸/۱۷
۹	۳۵/۲۶	۲۵/۱۰
۱۰	۳۹/۰۰	۳۶/۳۷
۱۱	۲۵/۶۳	۱۲/۸۵
۱۲	۲۱/۹۹	۱۴/۸۸

بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که در هیدرولیزهای ۱۰ و ۳۰ ساعته با آنزیم فلاورزایم درصد درجه هیدرولیز به دست آمده در محدوده درجه هیدرولیز در نظر گرفته شده برای مکمل‌های پروتئینی است، اما در زمان هیدرولیز ۵۰ ساعت با غلظت سوبسترای ۲ و ٪۳/۵ میزان درجه هیدرولیز تولید شده بیشتر از ۵۰٪ است. در هیدرولیزهای طولانی به دلیل افزایش

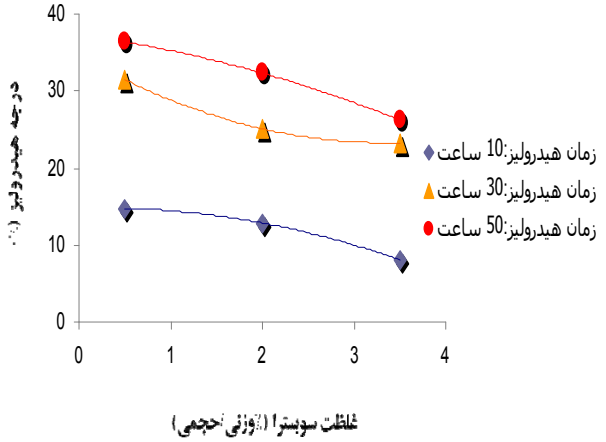
[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-17]

میزان اسیدهای آمینه آزاد و حضور قند احیا کننده ای مانند لاکتوز، شدت واکنش میلارد افزایش یافته، که منجر به قهوه ای شدن رنگ نمونه و کاهش میزان اسیدهای آمینه ضروری در محصول تولید شده می‌گردد. همچنین میزان آلودگی میکروبی در زمانهای طولانی هیدرولیز افزایش می‌یابد. نکته مهم دیگر آنکه در انتخاب پذیرفتن بهترین زمان هیدرولیز میزان جداسازی فنیل آلانین از پروتئین هیدرولیز شده را باید در نظر گرفت. در جداسازی با دستگاه UF به کار برده شده در این تحقیق، غلظت سوبسترا فاکتور بسیار مهمی است. درجه هیدرولیز نمونه های هیدرولیز شده با دو آنزیم نئوتراز و پروتامکس در جدول ۳ ارائه شده است. دو آنزیم فوق پروتئازهایی با منشأ باکتریایی می‌باشند. نئوتراز متالوپروتئازی است که فقط دارای فعالیت اندوپپتیدازی می‌باشد. پروتامکس به عنوان آنزیم ترکیبی شناخته می‌شود، زیرا دارای فعالیت اندو و اگزوپپتیدازی است. میزان فعالیت اگزوپپتیدازی در آنزیم پروتامکس محدود است [۲۳، ۲۴ و ۲۵]. شکل ۳ نشان می دهد که میزان هیدرولیز با گذشت زمان افزایش پیدا کرده است.



شکل ۳ تغییرات درجه هیدرولیز در نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیمهای نئوتراز- پروتامکس با غلظت سوبسترای ۰/۵، ۲ و ۳/۵ (وزنی/حجمی٪) نسبت به زمان هیدرولیز

شدت هیدرولیز در نمونه‌های هیدرولیز شده با دو آنزیم نئوتراز و پروتامکس نسبت به نمونه‌های مشابه هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم کمتر است. در هیدرولیز سوبسترا با غلظتهای ۰/۵ و ۳/۵٪ شدت افزایش هیدرولیز در زمان‌های ۱۰ و ۳۰ ساعت بیشتر از ۵۰ ساعت است. مهمترین عامل کاهش درجه هیدرولیز را می‌توان با نوع فعالیت دو آنزیم مرتبط دانست. در ابتدای فرآیند هیدرولیز میزان فعالیت اندوپپتیدازها بیشتر از اگزوپپتیدازها است. با طولانی شدن زمان هیدرولیز از میزان فعالیت اندوپپتیدازها کاسته می‌شود. در این مرحله چنانچه آنزیمی با فعالیت اگزوپپتیدازی بالا وجود داشته باشد، شروع به فعالیت کرده و شدت هیدرولیز کاهش پیدا نمی‌کند. به عبارتی استفاده از اندوپپتیدازها در اولین مرحله، فعالیت اگزوپپتیدازها را در دومین مرحله برای حصول تجزیه کاملتر، تسهیل می‌کند. بنابراین به دلیل فعالیت ناچیز پروتامکس به عنوان اگزوپپتیداز از شدت هیدرولیز در زمانهای طولانی کاسته شده است [۱۱]. همچنین وجود و حضور پپتیدهای تولید شده که در مقابل فعالیت آنزیم نقش بازدارنده را ایفا می‌کنند، سبب کاهش فعالیت آنزیم و کاهش درجه هیدرولیز می‌شود [۸ و ۱۶]. با مقایسه شکل ۴ با شکل ۲ مشخص می شود که در هیدرولیز با آنزیمهای نئوتراز و پروتامکس، با افزایش زمان بر میزان هیدرولیز با شدت کمتری نسبت به آنزیم فلاورزایم افزوده می-شود، اما در نمونه‌هایی که از غلظت‌های زیاد سوبسترا (۲ و ۳/۵٪) استفاده شده، درجه هیدرولیز کمتر از نمونه‌هایی با غلظت سوبسترای کمتر (۰/۵٪) می‌باشد. دلیل این امر را می-توان به اشباع شدن این دو آنزیم از سوبسترا به دلیل غلظت زیاد سوبسترا مربوط دانست.



شکل ۴ تغییرات درجه هیدرولیز در نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیمهای نئوتراز- پروتامکس با زمان هیدرولیز ۱۰، ۳۰ و ۵۰ ساعت نسبت به غلظت سوبسترا

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-17]

۳-۲- تعیین مقدار فنیل آلانین

مائدا و همکاران (۱۹۸۶) گزارش کردند که استفاده از اگزوپپتیدازها نسبت به اندوپپتیدازها در هیدرولیز بتا لاکتوگلوبولین سبب آزاد سازی بیشتر فنیل آلانین می‌شود [۳۲]. محققان استفاده از اندوپپتیدازها در مرحله اول و اگزوپپتیدازها در مرحله دوم پروتئولیز را بهترین راه حل آزاد سازی فنیل آلانین و استفاده از سیستم‌های غشایی به منظور جداسازی فنیل آلانین را مؤثرین راه برای کاهش فنیل آلانین در آب پنیر دانسته اند [۱۷ و ۱۸]. اسمیت و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که با وجود شدت هیدرولیز بالای آنزیم فلاورزایم میزان تولید پپتیدهایی با وزن مولکولی کم در هیدرولیز با این آنزیم نسبت به دیگر آنزیم‌ها کمتر است. بنابراین در غلظت‌های بالای سوبسترا امکان تولید پپتیدهایی با وزن مولکولی بالا در مقایسه با غلظت‌های پائین بیشتر است. همچنین امکان وجود مقادیر کمی پروتئین هیدرولیز نشده نیز وجود خواهد داشت [۲۴]. بنابراین در غلظت‌های بالای سوبسترا امکان مسدود شدن منافذ غشاها با پپتیدهایی با وزن مولکولی بالا وجود خواهد داشت، خصوصاً آنکه تعداد کم غشاهای به کار برده شده در مدول دستگاه مورد استفاده راندمان جداسازی را کاهش می‌دهد. بیشترین فعالیت پروتامکس به عنوان اندوپپتیداز بوده که محل فعالیت آن باندهای پپتیدی مجاور اسیدهای آمینه هیدروفوب می‌باشد و پپتیدهایی با اندازه‌های متفاوت تولید می‌کند. با توجه به اینکه نئوتراز هم یک اندوپپتیداز است، بنابراین امکان آزاد سازی فنیل آلانین در نمونه‌های هیدرولیز شده با این دو آنزیم کمتر است. نتایج به دست آمده نشان می دهد که میزان آزادسازی فنیل آلانین با استفاده از دو آنزیم نئوتراز و پروتامکس در مقایسه با آنزیم فلاورزایم کمتر می باشد (جدول ۳). همچنین در جداسازی فنیل آلانین با استفاده از سیستم UF نتایج مشابهی با آنزیم فلاورزایم به دست آمد [۲۳ و ۲۵].

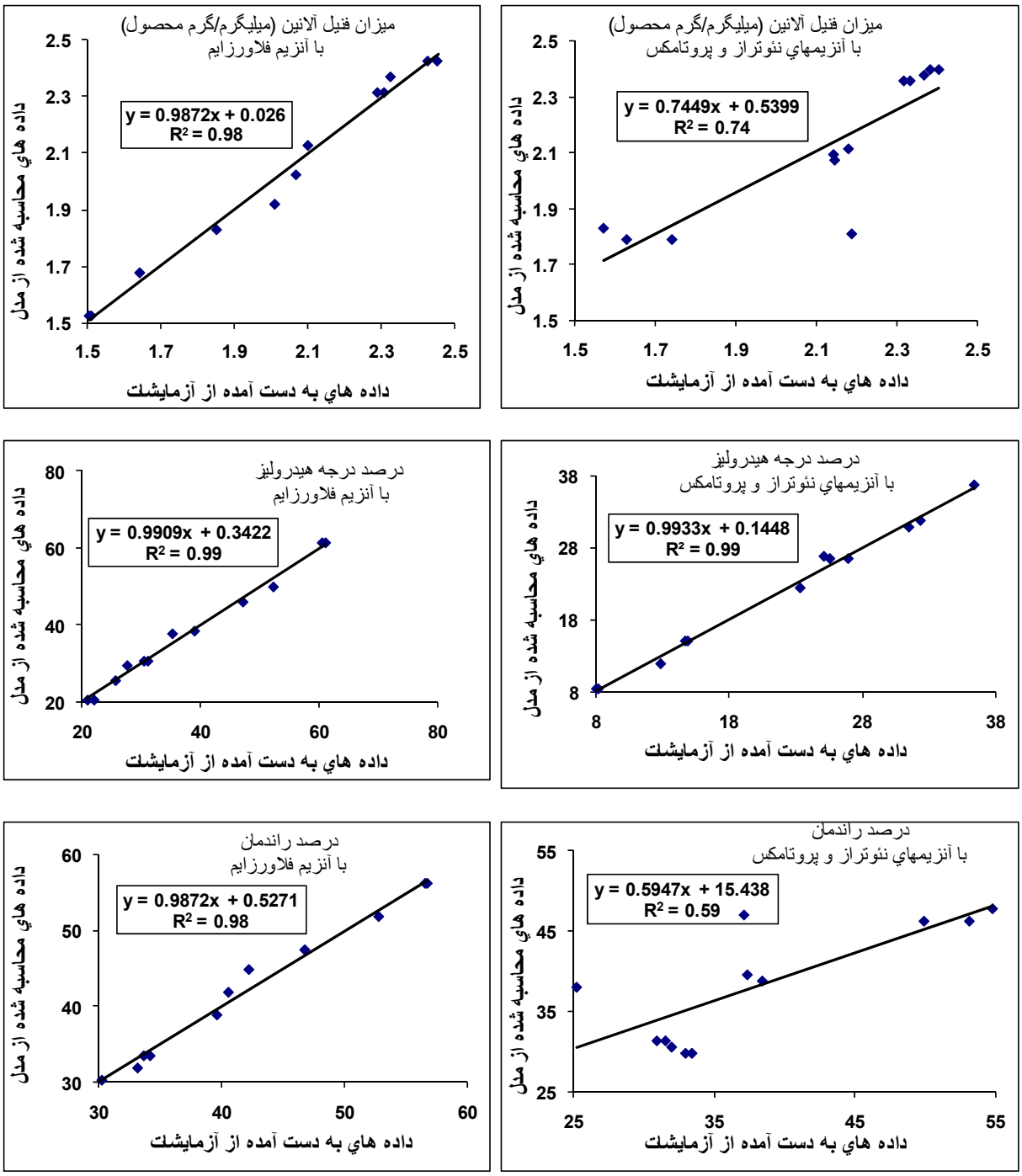
۳-۳- بهینه کردن شرایط هیدرولیز با هدف به حداقل رساندن میزان فنیل آلانین در فاز ماندگار[1] ثانویه

در این تحقیق فاز ماندگار ثانویه، محصول نهایی است که می‌تواند به عنوان مکمل پروتئینی مورد مصرف بیماران مبتلا به فنیل کتونوری مورد استفاده قرار گیرد، بنابراین میزان فنیل آلانین موجود در آن اهمیت زیادی دارد. با توجه به جدول ۴، در هیدرولیز با آنزیم فلاورزایم کمترین میزان فنیل آلانین در هیدرولیز ۱۰ ساعته و غلظت سوبسترای ۰/۵٪ حاصل شده است. بیشترین راندمان جداسازی فنیل آلانین نیز در همین شرایط حاصل می‌شود. درجه هیدرولیز به دست آمده در این شرایط در محدوده DH مناسب برای تولید مکملهای پروتئینی مورد مصرف بیماران خاص (۵۰-۱۰٪) می‌باشد. نتایج مشابهی نیز توسط پینتو و همکاران (۲۰۰۹) گزارش شده است [۱۸]. در صورتی که از آنزیم‌های نئوتراز و پروتامکس برای هیدرولیز نمونه‌های آب پنیر استفاده شود، بیشترین میزان جداسازی فنیل آلانین و در نتیجه بیشترین راندمان در دو زمان هیدرولیز ۱۰ و ۵۰ ساعته با غلظت سوبسترای ۰/۵٪ حاصل می‌شود. از دو زمان هیدرولیز تعیین شده، هیدرولیز ۱۰ ساعته مناسبتر است. زیرا در صورتی که از زمان‌های طولانی استفاده شود، امکان آلودگی میکروبی نمونه‌ها وجود خواهد داشت. تنها تفاوتی که در این دو شرایط ایجاد می‌شود، تفاوت در درصد درجه هیدرولیز نمونه‌های هیدرولیز شده می‌باشد هر چند در هر دو شرایط، درجه هیدرولیز حاصل شده در محدوده DH مشخص برای تولید مکمل‌های رژیمی می‌باشد، اما باید به این نکته نیز توجه داشت که در هیدرولیزهای طولانی مدت امکان تولید اسیدهای آمینه آزاد بیشتر می‌شود. در فرآیندهای هیدرولیز تا حد ممکن باید از افزایش نامطلوب درجه هیدرولیز جلوگیری شود (شکل ۵).

1. Retentate

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-17]

a b



شکل ۵ بررسی داده های به دست آمده و محاسبه شده با مدل در هیدرولیز با آنزیمهای (a) فلاورزایم و (b) نئوتراز- پروتامکس در بهینه سازی فرآیند پروتئولیز

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-17]

۴- نتیجه گیری

یافته های قبلی [۱، ۱۷ و ۱۸] نشان می دهد که آب پنیر منبع پروتئینی بسیار مناسبی برای تولید مکمل های پروتئینی مورد نیاز بیماران فنیل کتونوری است. هیدرولیز آنزیمی منجر به تولید محصولی با کیفت بیشتر در مقایسه با هیدرولیز به روش اسیدی و قلیائی می شود. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می دهد که در هیدرولیز با آنزیم فلاورزایم در مقایسه با هیدرولیز با دو آنزیم نئوتراز و پروتامکس، فاز باقیمانده ثانویه به دست آمده طی کمترین زمان هیدرولیز و با کمترین غلظت سوبسترا، حاوی کمترین میزان فنیل آلانین است. در این میان غلظت سوبسترا در جداسازی فنیل آلانین با توجه به نوع روش مورد استفاده (اولترافیلتراسیون) و نوع غشاء به کار برده شده، مؤثرتر از زمان هیدرولیز است، به گونه ای که با افزایش غلظت سوبسترا درصد مسدود شدن غشاها در اثر پدیده گرفتگی افزایش پیدا می‌کند. همچنین بهینه سازی با استفاده از روش سطح پاسخ نشان داد که بهترین شرایط هیدرولیز به منظور تولید مکمل پروتئینی برای بیماران فنیل کتونوری در کوتاهترین زمان هیدرولیز و کمترین غلظت سوبسترا حاصل می شود.

۵- سپاسگذاری

از آقای مهندس بهرامی کارشناس آزمایشگاه های صنایع غذایی دانشگاه صنعتی اصفهان جهت راهنمایی در انجام آزمایشات تشکر و قدردانی می‌گردد.

جدول ۳ مقدار فنیل آلانین در نمونه‌های حاصل از فعالیت آنزیم فلاورزایم و آنزیمهای نئوتراز- پروتامکس ($mg_{phe}/g_{product}$)

تیمار	مقدار فنیل آلانین در محصول نهایی در هیدرولیز با آنزیم فلاورزایم ($mg_{phe}/g_{product}$)	مقدار فنیل آلانین در محصول نهایی در هیدرولیز با آنزیمهای نئوتراز- پروتامکس ($mg_{phe}/g_{product}$)
۱	۳۷/۱۹۲±۰/۰۰۴	۳۱/۱۶۲±۰/۰۰۴
۲	۶۸/۶۸۰±۰/۰۰۴	۶۸/۹۷۴±۰/۰۳۰
۳	۴۸/۳۲۱±۰/۰۰۵	۶۲/۰۸۲±۰/۰۲۰
۴	۷/۵۶۵±۰/۰۲۰	۱۰/۰۶۶±۰/۰۰۵
۵	۷/۰۸۴±۰/۰۲۰	۹/۲۳۳±۰/۰۱۰
۶	۶۳/۲۶۲±۰/۰۱۰	۶۴/۱۴۱±۰/۰۱۰
۷	۷۱/۳۸۶±۰/۰۱۰	۶۶/۴۵۵±۰/۰۰۴
۸	۵۴/۷۱۷±۰/۰۲۰	۵۲/۲۴۴±۰/۰۳۰
۹	۳۳/۳۱۱±۰/۰۲۰	۳۷/۴۹۶±۰/۰۳۰
۱۰	۹/۴۵۳±۰/۰۲۰	۶/۹۲۳±۰/۰۰۳
۱۱	۳۵/۶۰۶±۰/۰۲۰	۵۶/۴۱۰±۰/۰۲۰
۱۲	۸/۳۲۱±/۰۰۴	۷/۵۰۴±۰/۰۰۴

جدول ۴ شرایط پیش بینی شده در بهینه سازی فرآیند پروتئولیز با هدف به حداقل رساندن میزان فنیل آلانین در فاز باقیمانده ثانویه

متغیر مورد بررسی	هیدرولیز با آنزیم فلاورزایم	هیدرولیز با آنزیم‌های نئوتراز و پروتامکس هیدرولیز ۵۰ ساعته هیدرولیز ۱۰ ساعته	
مقدار فنیل آلانین در فاز ماندگار اولیه ($g_{phe}/100g_{protein}$)	۲/۷۱	۲/۶۳	۲/۵۴
مقدار فنیل آلانین در فاز ماندگار ثانویه ($g_{phe}/100g_{protein}$)	۱/۵۳	۱/۸۳	۱/۷۹
مقدار فنیل آلانین در فاز عبوری[1] ($g_{phe}/100g_{protein}$)	۰/۹۹	۰/۶۹	۰/۶۹
درصد درجه هیدرولیز	۲۰/۶۲	۳۶/۶۳	۱۵/۰۰
درصد راندمان جداسازی	۵۶/۰۹	۴۷/۸۱	۴۶/۲۶

1. Permeate

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-17]

۶- منابع

[1] Lara, M. G., C. Izumi., L. J. Greene., L. Vilela & O. Freitas. 2005. Preparation and scaling up of a low phenylalanine enzymatic hydrolysate of bovine whey proteins. *Braz. J. Pharmaceutical Sci*. 41(4): 459-465.

[2] Ney. D. M., S. T. Gleason., S. C. Van Calcar., E. L. MacLeod., K. L. Nelson., M. R. Etzel., G. M. Rice & J. A. Wolff. 2009. Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey. *J. Inherit. Metab. Dis*. 32: 32-39.

[3] Smithers, G.W. 2008. Whey and whey proteins, from gutter to gold: a review. *Int. Dairy J*. 18: 695- 704.

[4] Koch, R. & F. Cruz. 1999. Historical aspects and overview of research on phenylketonuria. *Ment. Retard. Dev. D.* 5: 101-103.

[5] Van Calcar, S. 2009. Glycomacropeptide from cheese whey improves the nutritional management of phenylketonuria. Thesis. Nutritional Science. University of Wisconsin-Madison.

[6] Mokhtari, R. & A. Bagga. 2003. Cocsanguinity, genetic disorders and malformations in the Iranian population. *Acta Biologica Szegediensis*. 47(1-4): 47-50.

[7] Arai, S., A. Maeda & M. Watanabe. 1988. Physicochemical properties of a low-phenylalanine peptide substance as a foodstuff for patients with phenylketonuria. *Agric. Biol. Chem.* 52(1): 287-288.

[8] MacDonald, A., H. Gökmen-Özel & A. Daly. 2009. Changing dietary practices in phenylketonuria. *Turk. J. Pediatr*. 51:409-415.

[9] Sibinga, M. S. & C. J. Friedman. 1972. Diet therapy and other sources of influence on the outcome of children with phenylketonuria. *Develop. Med. Child Neurol.* 14: 445-456.

[10] Spronson, F. J. V. & Enns, G. M. 2010. Future treatment strategies in phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 99: S90-S95.

[11] Clemente, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends. Food Sci. Tech.* 11: 254-262.

[12] Amiri-Rigi A., M. Mohammadi., Z. Emam-Djomeh., & MA. Mohammadifar. 2012. The effect of type of enzyme and activated carbon concentration on phenylalanine removal from milk. *Iran J. Nutr. Sci. Food Technol.* 17(1): 1-9.

[13] Capobiango, M., D. C. F. Lopes., R. L. Crreira., W. D. O. Afonso., S. D. Segall & M. P. C. Silvestre. 2007. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *Int. J. Food Eng*. 3: 6-10.

[14] Lopes, D. C. F., F. M. Delvivo., J. N. Januário & M. J. B. Aguiar. 2007. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. *J. Food Technol.* 5: 191-197.

[15] Lopes, D. C. F., F. M. Delvivo & M. P. C. Silvestre. 2005. Use of activated carbon for removing phenylalanine from reconstituted skim milk powder hydrolysates. *J. Food Sci. Tech.* 38: 447-453.

[16] Pouliot, Y., M. C. Wijers., S. F. Gauthier & L. Nadeau. 1999. Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes. *J. Membrane Sci*. 158: 105-114.

[17] Galvão, C. M. A., G. A. Pinto., C. D. F. Jesus., R. C. Giordano & R. L. C. Giordano. 2009. Producing a phenylalanine-free pool of peptides after tailored enzymatic hydrolyses of cheese whey. *J. Food Eng.* 91: 109-117.

[18] Cabrera-Padilla, R.Y., G. A. Pinto., R. L. C. Giordano & R. C. Giordano. 2009. A new conception of enzymatic membrane reactor for the production of whey hydrolysates with low contents of phenylalanine. *Process Biochem*. 44: 269-276.

[19] Acosta, P. J. B., R. A. Grondalski., J. W. Liebrecht & P. A. Reynolds. 1996. Methods for preparing medical foods for nutritional support of infants/toddlers with metabolic diseases. United States Patent. 5587399.

[20] Robinson, M., F. J. Wbite., M. A. Cleary., E. Wbite., W. K. Lam & J. H. Walter. 2000. Increased risk of vitamin B_{12} deficiency in patients with phenylketonuria on an unrestricted or relaxed diet. *J. Pediatr*. 136: 545-547.

[21] Habibi-Moini, S. & A. P. Dmello. 2001. Evaluation of possible reasons for low phenylalanine ammonia lyase activity in cellulose nitrate membrane. *Int. J. Pharm*. 215: 185-196.

[22] Laclair, E., D. M. Ney., E. L. Macleod & M. R. Etzel. 2009. Purification and use of glycomacropeptide for nutritional management of phenylketonuria. *J. Food Sci*. 4:199-205.

[23] Séverin, S. & X. Wen-Shui. 2006. Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. *J. Zhejiang. Univ. Science B*. 7(2): 90-98.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-17]

[24] Smyth, M. & R. J. FitzGerald. 1998. Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. *Int. Dairy J.* 8: 819-827.

[25] Surówka, K. & D. Żmudziński. 2004. Functional properties modification of extruded soy protein concentrate using Neutrase. *Czech J. Food Sci*. 22(5): 163-174.

[26] Adler Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolyzates by TNBSA. *J. Agri. Food Chem*. 27: 1256-1262.

[27] Nielsen, P. M., D. Petersen & C. Dambmann. 2001. Improved method for determination food protein degree of hydrolysis. *J. Food Sci.* 66(5): 642-646.

[28] Kroll, J., H. Rawel & R. Kröck. 1998. Microwave digestion of proteins. *Z. Lebensm Unters Forsch A.* 207: 202-206.

[29] Piecyk, M., A. Śrama., A. Bzducha & M. Obiedziński. 2007. Application of HPLC and GC/MS to quantification of phenylalanine in chosen kinds of food for particular nutritional uses. *Acta Sci. Plo. Technol. Aliment.* 6(2): 5-18.

[30] Atherton, N. D. & A. Green. 1988. HPLC measurment of phenylalanine in plasma. *Clin. Chem.* 34 (11): 2241-2244.

[31] Hilton, M. A. 1982. Liquid-chromatographic direct determination of phenylalanine and tyrosine in serum or plasma, with application to patients with phenylketonuria. *Clin. Chem.* 28(5): 1215-1218.

[32] Maeda, A., K. Abe., M. Watanabe & S. Arai. 1987. Peptic hydrolysis of bovine β-lactoglobulin to produce a low phenylalanine peptide foodstuff for phenylketonuria. *Agric. Biol. Chem.* 51(6): 1501-1507.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-17]

Enzymatic hydrolysis optimization of whey proteins for reducing phenylalanine using membrane filtration

Hasibi, F. [1*], Nasirpour, A [2], Keramat, J. [3]

1. M.Sc Graduate Dept. of Food Science & Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology
2. Assistant Professor, Dept. of Food Science & Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology
3. Associate Professor, Dept. of Food Science & Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology

(Received: 90/9/23 Accepted: 90/12/8)

Studies on the production of protein supplements for phenylketonuria (PKU) patients indicate that whey protein is one of the most important protein sources for production of these compounds, owning to its specific combination of amino acids.Whey is considered as one of the most polluting by-product in environment, otherwise, it is an excellent source of functional proteins that can be used in medicine and special diet products. In this study, three different concentrations of whey protein concentrate (WPC) were used as a substrate for three enzymes Flavourzyme®, Neutrase®and Protamex®. Effect of substrate concentration and hydrolysis time were studied on the separation efficiency of phenylalanine using response surface methodology (RSM) design. Phenylalanine was removed from hydrolyzed samples using ultra filtration (UF) and its concentration was measured using HPLC technique. Results of this study showed that samples hydrolyzed by Flavourzyme® contain the lowest level of phenylalanine. Also, process optimization was done in order to predict the best conditions of hydrolyzing .The best condition in order to remove the maximum phenylalanine from whey proteins was found for the minimum hydrolyzing time and the lowest substrate concentration for all three enzymes.

Keywords: Whey Proteins, Enzymatic Hydrolysis, Ultra Filtration, Phenylketonuria.

*Corresponding Author E-Mail Address: f.hasibi@ag.iut.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-17]