مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هفتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحات ۱۶-۹

استخراج و خالص‌سازی گلیکوماکروپپتید (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، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای 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: فنیل‌کتونوری یک بیماری ارثی است که افراد مبتلا به آن در طول زندگی باید یک رژیم غذایی با فنیل‌آلانین کم داشته باشند. گلیکوماکروپپتید می‌تواند به عنوان یک منبع غذایی یکتا برای بیماران مبتلا به فنیل‌کتونوری به کار رود؛ زیرا این پپتید فاقد اسید آمینه فنیل‌آلانین است. این پژوهش با هدف استخراج و خالص‌سازی پپتیدِ با ارزش گلیکوماکروپپتید از آب‌پنیر با خلوص بالا و با حداقل مقدار اسید آمینه فنیل‌آلانین انجام شد. فناوری غشاهای فراپالایش به منظور جداسازی گلیکوماکروپپتید از محلول کنسانتره پروتئین آب پنیر در مقادیر مختلف pH به کارگرفته شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از دو غشای مدوّر فراپالایش ۵۰ و ۱۰ کیلودالتونی برای استخراج گلیکوماکروپپتید از محلول ۱۰٪ (وزنی/حجمی) کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر استفاده شد. آزمایش‌ها در دمای محیط (۲°C ± ۲۵) و در سه سطح pH (۳/۵، ۴ و ۴/۵) با سه تکرار انجام شد. برای خالص‌سازی گلیکوماکروپپتید در هر دو مرحله از فراپالایش از فرایند دیافیلتراسیون استفاده شد. در پایان، مقدار پروتئین، اسیدآمینه فنیل‌آلانین و نیتروژن غیرپروتئینی اندازه‌گیری شد.

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

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

واژگان کلیدی: استخراج، گلیکوماکروپپتید (GMP)، فنیل‌کتونوریا، آب‌پنیر، خالص‌سازی

• مقدمه

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 جدید به 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. آب پنیر یکی از فراورده‌های 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 باکتری‌های لاکتیکی یا هر دو از لخته جدا می‌شود. لخته شامل کازئین‌ها، چربی‌ها، برخی مواد معدنی و بعضی ویتامین‌ها است، اما آب پنیر حاوی لاکتوز، پروتئین‌های محلول (Whey proteins)، مواد معدنی محلول، اسیدهای آلی، ویتامین‌ها و آنزیم‌ها است. پروتئین‌های آب‌پنیر ارزش بیولوژیک بالایی دارند. این پروتئین‌ها نسبت به پروتئین شاخص اسیدهای آمینه ضروری بیشتر و نسبت به پروتئین تخم‌مرغ کامل تریپتوفان،

Archive of SID
www.SID.ir

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 مهّمی از ترکیبات پُرارزش آب پنیر را بازیابی نماییم. به دلیل نقش آلایندگی آب‌پنیر 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 آب‌پنیر ضروری به نظر می‌رسد (۲). امروزه، برخی از ترکیباتی که به مقدار کم در آب‌پنیر وجود دارند، به دلیل اهمیت فوق العاده مورد توجه قرار گرفته و استخراج می‌شوند. 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 شاخه‌دار والین، ترئونین و ایزولوسین، لیزین است و از لحاظ اسیدهای آمینه آروماتیک فنیل‌آلانین، تریپتوفان و تیروزین فقیر است (۳).

بیماری فنیل‌کتونوریا شایع‌ترین شکل یک بیماری اتوزومی مغلوب به نام بیش– فنیل‌آلانینمی (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 نمی‌شود و سبب افزایش مزمن فنیل آلانین خون و پیدایش عوارضی از جمله آسیب مغزی غیر قابل برگشت می‌شود. کودکان مبتلا به فنیل‌کتونوریا در اثر تجّمع فنیل‌آلانین هر ماه حدود ۴ نمره از بهره هوشی خود را از دست می‌دهند. نتیجه اختلال فنیل‌کتونوریا عقب‌ماندگی شدید ذهنی و برخی ناهنجاری‌های دیگر مانند بیش فعالی، اختلالات گفتاری، تشنج و... است که با بالا رفتن سن کودک آشکارتر می‌شوند (۴). گلیکوماکروپپتید می‌تواند نقشی کلیدی در تغذیه بیماران مبتلا به فنیل کتنوریا 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 آب‌پنیر استفاده کردند. *Neilsen* و *Tromhholt* (۱۹۹۴) از روش رسوب‌دهی حرارتی در تلفیق با روش فراپالایش برای جداسازی گلیکوماکروپپتید استفاده کردند. *Erdman* و *Neuman*(۱۹۹۹) برای جداسازی گلیکوماکروپپتید از آب‌پنیری 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 غیرقابل تجزیهٔ آب‌پنیر شیرین با رزین تبادل‌کنندهٔ آنیونی DEAE-Sephacel در pH های ۳ و ۶/۴ 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 آب‌پنیر 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 آب‌پنیر به سه روش رسوب‌دهی (با اسید تری‌کلرواستیک، اتانول و فراپالایش) را با هم مقایسه کردند. *Ozimek* و همکاران (۲۰۰۴) کیتوزان را به عنوان یک تبادل‌کننده 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 آب‌پنیر 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 زمینهٔ 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 پپتیدِ با ارزش گلیکوماکروپپتید از آب‌پنیر با خلوص بالا و با حداقل مقدار اسید آمینه فنیل‌آلانین و تعیین شرایط بهینه آن در بهترین pH از کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر و با کمک غشاهای فراپالایش جهت تدوین دانش فنی تولید این ماده.

Archive of SID

www.SID.ir

• مواد و روش‌ها

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

جدول ۱. مشخصات شیمیایی پودر کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر

پروتئین	حداقل ۶۵ درصد
لاکتوز	حداکثر ۱۰ درصد
چربی	۱۷-۱۱ درصد
خاکستر	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 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 محدودهٔ 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 آب‌پنیر 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 آب‌پنیر با محلول اسید هیدروکلریک ۰/۱ نرمال کاهش داده شد. نکتهٔ مهم این که نباید pH محلول به کمتر 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 درpH بالاتر از۴/۵ عبورگلیکوماکروپپتید از منافذ غشاء به دلیل تمایل آن به تجمع داشتن دشوار می‌شود. به این دلایل کنترل pH، اصلی ترین عامل در جداسازی گلیکوماکروپپتید از آب‌پنیر است.

در گام بعد محلول کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر 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 گلیکوماکروپپتید 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 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 فراپالایش شد. سرانجام، مایع به دست آمده جمع آوری شد تا آزمایش‌های بعدی روی آن صورت گیرد.

آزمون ها:

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 Hypersil ODS (C18) به ابعاد ۴/۶×۲۵۰ میلی‌متر که اندازه ذرات آن ۵µm بود، با نرخ جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و آشکارسازِ 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 ۰/۰۱۸ 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

Archive of SID

www.SID.ir

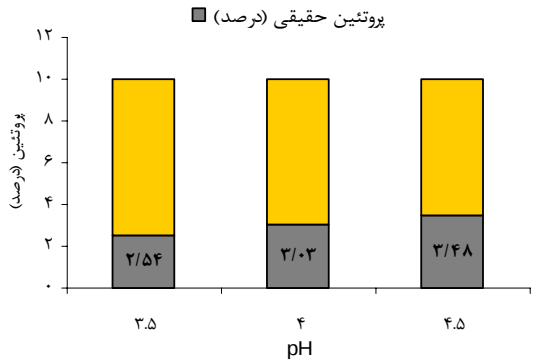
کردن نیتروژن پروتئینی از نیتروژن کل، مقدار نیتروژن غیرپروتئینی محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: در این تحقیق pH محلول کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر به عنوان متغیر مستقل تعیین شد. مقدار پروتئین، نیتروژن غیرپروتئینی و مقدار اسید آمینه فنیل‌آلانین به عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شدند. این تحقیق در سه سطح pH (۳/۵، ۴ و ۴/۵) یک سطح ۱۰٪ پروتئین محلول کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر و در دمای محیط (۲°C ± ۲۵) انجام شد.

یافته‌های این تحقیق با استفاده از طرح فاکتوریل در قالب کاملا تصادفی با سه تکرار در هر تیمار (سطح pH) ارزیابی شدند. برای تشخیص وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد. بررسی تأثیر تیمارها (سه سطح pH) بر مقدار اسید آمینه فنیل‌آلانین، نیتروژن غیر پروتئینی و مقدار پروتئین با آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن و نرم افزار $SPSS_{18}$ صورت گرفت.

• یافته‌ها

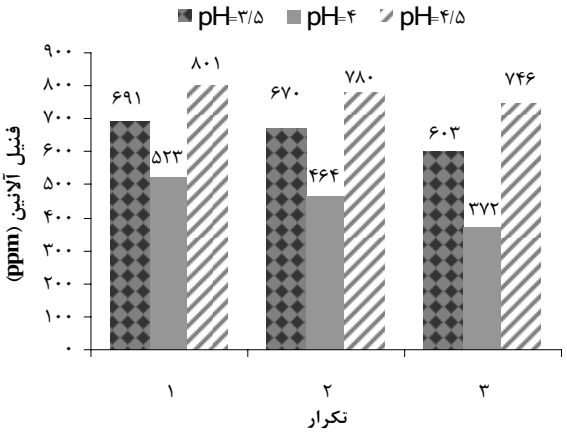
مقدار پروتئین حقیقی پس از انجام فراپالیش محلول کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر در pHهای ۳/۵، ۴ و ۴/۵ به ترتیب ۲/۵۴، ۳/۰۳ و ۳/۴۸ درصد تعیین شد (شکل ۱).



شکل ۱. میزان پروتئین حقیقی محلول آب‌پنیر فراپالایش شده

همان طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش سطح pH مقدار پروتئین محلول فراپالایش شده افزایش می‌یابد که به دلیل دناتوره نشدن پروتئین‌ها و حفظ شکل آن‌ها (ساختارهای دوم و سوم) در pHهای بالاست.

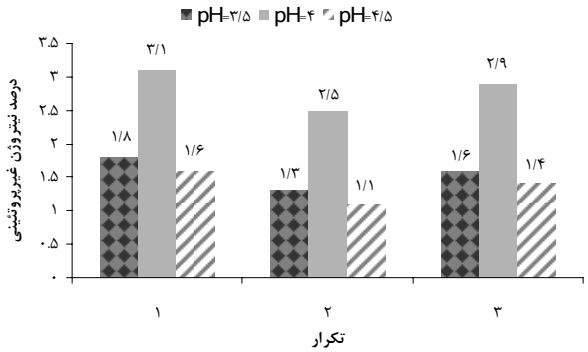
میزان اسید آمینه فنیل‌آلانین در محلول آب‌پنیر فراپالایش شده نیز در pHهای مختلف تعیین شد (شکل ۲).



شکل ۲. میزان اسید آمینه فنیل‌آلانین محلول کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر پس از عمل فراپالایش

همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، مقدار اسید آمینه فنیل‌آلانین محلول کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر پس از انجام ۳ تکرار از فراپالیش در pH=۴ دارای کمترین مقدار و در pH=۳/۵ دارای بیشترین مقدار است.

مقدار نیتروژن غیرپروتئینی محلول کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر فراپالایش شده مشخص شد (شکل ۳).



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

مقدار پروتئینی محلول کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر پس از انجام عمل فراپالیش تعیین شد (جدول ۲). مشخص شد بیشترین مقدار پروتئین در pH=۴/۵ و کمترین مقدار آن در pH=۳/۵ به دست آمد.

مقدار اسید آمینه فنیل‌آلانین محلول کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر فراپالایش شده پس از سه تکرار در جدول ۳ آمده است.

بیشترین درصد خلوص گلیکوماکروپپتید در pH=۴ و کمترین خلوص در pH=۴/۵ تعیین شد (جدول ۴).

www.SID.ir

جدول ۲. مقدار پروتئین حقیقی محلول کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر

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

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

فنیل‌آلانین (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 ($p<۰/۰۵$)

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

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 فنیل‌آلانین: مقدار اسید آمینه فنیل‌آلانین در پودر کنسانتره پروتئین آب‌پنیر ۱۴۵۳۹ واحد در هر میلیون تعیین شد. مقدار این اسید آمینه پس از انجام فراپالیش 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 گلیکوماکروپپتید، 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 گلیکوماکروپپتید توسط فرایند فراپالایش بازیافت نشده است؛ زیرا چون نقطهٔ ایزوالکتریک برای گلیکوماکروپپتید حدود ۴ است، ثانیاً در pH=۴/۵ احتمال حضور آلفا-لاکتالبومین در تراویده (Permeate) آب‌پنیر فراپالایش شده وجود داشته که حاوی اسید آمینه فنیل‌آلانین است. اما در pH=۳/۵ چون ساختار همه پروتئین‌ها و گلیکوماکروپپتید 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 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 آب‌پنیر 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 دیمر یا تریمر وجود دارد.

محتوای پروتئینی: با کاهش pH، محتوای پروتئینی محلول کنسانتره پروتئینی آب‌پنیر کاهش نیز می‌یابد. 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

Archive of SID
www.SID.ir

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 گلیکوماکروپپتید: 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 گلیکوماکروپپتید توسط فرایند فراپالایش بازیافت نمی‌شود و نقطهٔ ایزوالکتریک برای گلیکوماکروپپتید حدود ۳/۸ است، ثانیاً در pH=۴/۵ احتمال حضور پروتئین‌هایی مانند آلفا-لاکتالبومین و بتا-لاکتوگلوبولین 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 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 پایین‌تر از ۱۰ کیلودالتون می‌رسد. در این شرایط گلیکوماکروپپتید از غشای فراپالایش 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 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 گلیکوماکروپپتید با حداقل مقدار اسید آمینهٔ فنیل‌آلانین است، مبنای خلوص گلیکوماکروپپتید 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 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 گلیکوماکروپپتید 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 گلیکوماکروپپتید به دست آمده بر مبنای اسید آمینه فنیل‌آلانین را بعد از انجام سه تکرار فراپالایش در جدول ۴ نشان داده شده است.

بین خلوص گلیکوماکروپپتید استحصالی در سه pH متفاوت اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۴). *Berrocal* و *Neeser* فرایند تولید تجاری کازئینو گلیکوماکروپپتید بر پایه ترسیب حرارتی را از کنسانتره پروتئین آب‌پنیر که مقداری از لاکتوز آن گرفته شده است، ارائه کردند. آن‌ها محلول ۱۰٪ آب‌پنیر با pH=۶ حاوی ۰/۱۵ درصد کلرید کلسیم را به مدت ۱ ساعت با دمای $90\ ^{\circ}C$ حرارت دادند، سپس برای تغلیظ فاز آبی به دست آمده از شیوه فراپالایش استفاده کردند. برای خالص‌سازی 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 آب‌پنیر بر پایه فراپالایش در مقادیر مختلف pH ارائه کردند. آن‌ها این عمل را در pH=۳/۵ ±۰/۲ و دمای $50\ ^{\circ}C$ 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 آب‌پنیر امنتال (Emmental) پیشنهاد کردند. در این روش ٪۷۰ گلیکوماکروپپتید 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 گلیکوماکروپپتید از ایزولهٔ پروتئین آب‌پنیر ارائه کردند. آن‌ها با استفاده از ستونی که با رزین تبادلگر آنیونی دانه درشت Q-Sepharose پُرشده بود، توانستند ٪۹۶ گلیکوماکروپپتید را بازیافت کنند.

Archive of SID

www.SID.ir

در پژوهش حاضر با طراحی مناسب‌ترین روش فراپالایش و اِعمال 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 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، 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 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 بیمارن فنیل‌کتونوریایی متمرکز شود.

• References

1. Onwulata CI, Huth, PJ, editors. Whey processing, functionality and health benefits. Ames, IA: Blackwell Publishing and IFT Press; 2008.
2. Rashidi H. Production and application of whey in food industry. Parivar Press 1386 [in Persian].
3. Abd El-Salam MH. Separation of casein glycomacropeptide from whey: methods of potential industrial application. Int J Dairy Sci 2006; 1:93-9.
4. Farhood D, Shalileh M. Diet in phenylketonoria infected children. Iranian J Pedia Disea 1387; 18: 1-8, 88-98 [in Persian].
5. 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.
6. Furlanetti AM, Prata LF. Free and total glycomacropeptide contents of milk during bovine lactation. Ciênc Tech Alim Campinas 2003; 23:121-5.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Xu Y, Sleigh R, Hourigan J, Johnso R. Separation of bovine immunoglobulin G and glycomacropeptie from dairy whey. Proc Bioche 2000; 36: 393-9.
15. Berrocal R, Neeser JR. Inventors; Nestle SA. Process for the production of a κ- casein glycomacropeptide. Eur patent, 0453782. 1991-10-30.
16. Tanimoto M. Process for producing κ-casein glycomacropeptides US Patent, 5075424. 1991-12-24.

Archive of SID

www.SID.ir

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

*Javanmard M[*1], Lighvani H [2], Ghiasi Tarzi B[3], Rashidi A[4]*

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 ultrafilteration disc membranes with 50 and 10 kDa cut-off were used to extract glycomacropeptide from a solution of whey protein concentrtae (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 diafilteration technique was used for purification of glycomacropeptide in both ultrafilteration 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

Archive of SID

www.SID.ir