

Hidrolisado enzimático para dietoterapia de Fenilcetonúricos

Estratégia de Produção e Avaliação

Marise Fonseca dos Santos, MSc
Professora Assistente Campus Palotina da UFPR
marise@ufpr.br

Ana Lúcia Coutinho Santos Neto
Professora Assistente do Departamento de
Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ

Ana Maria de Hollanda e Vasconcelos, Dra.
Professora Adjunta da UFRJ - Instituto de Química
Departamento de Bioquímica
anmaria@iq.ufrj.br

Hiperfenilalaninemias e suas características

A Fenilalanina (Phe) é um aminoácido essencial à alimentação humana (Knox, 1972). Os distúrbios na sua hidroxilação constituem um grupo de erros inatos do metabolismo denominado hiperfenilalaninemias.

As hiperfenilalaninemias podem ser divididas em três grandes grupos: o 1º está relacionado à deficiência na atividade da enzima Fenilalanina Hidroxilase (PAH), que catalisa a 1ª etapa da catabolização de Phe, isto é, sua conversão a tirosina (Tyr) (**Figura 1**). Esta enzima tem como substratos, além de Phe, o Oxigênio e como co-fator tetrahydropterina (BH₄) (**Figura 1**). Este primeiro grupo é subdividido em três sub-grupos em função do nível de atividade de PAH presente.

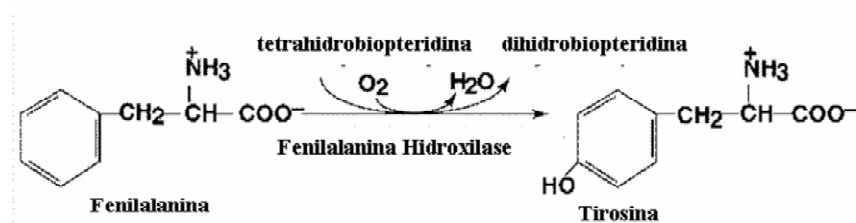
A Fenilcetonúria Clássica (PKU), primeira hiperfenilalaninemia identificada e caracterizada como uma doença transmitida geneticamente, pertence a este grupo, sendo uma disfunção relacionada com muta-

ções no cromossoma 12 (locus PAH) que acarretam ausência total da atividade da enzima (PAH) ou residual de até 5%; associada com altas concentrações plasmáticas de Phe ($\geq 1.200 \mu\text{mol/L}$) (Mira & Marquez, 2000).

O 2º e 3º grupo estão relacionados à deficiência na atividade das enzimas que catalisam a regeneração e a biossíntese do co-fator, respectivamente. Conhecida com PKU atípica ou hiperfenilalaninemia não fenilcetonúrica (Mira & Marquez, 2000).

O alto nível plasmático de Phe causa a inibição do transporte de Tyr e Triptofano (Trp) para o cérebro e inibe a atividade das enzimas Tirosina e Triptofano Hidroxilases, diminuindo a síntese de neurotransmissores no sistema nervoso central e periférico.

A Phe pode ser convertida em outros derivados, a partir da reação de transaminação, levando à formação do ácido fenilpirúvico (**Figura 2**), metabólito presente na urina poucas semanas após o nascimento nos casos de fenilcetonúricos.



Transcrito de Thomas M. Devlin, em *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*, Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Figura 1: Esquema de reação da conversão de Phe em Tyr por ação da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), coenzima tetrahydropterina (ou tetrahydrofolato) e co-substrato O₂

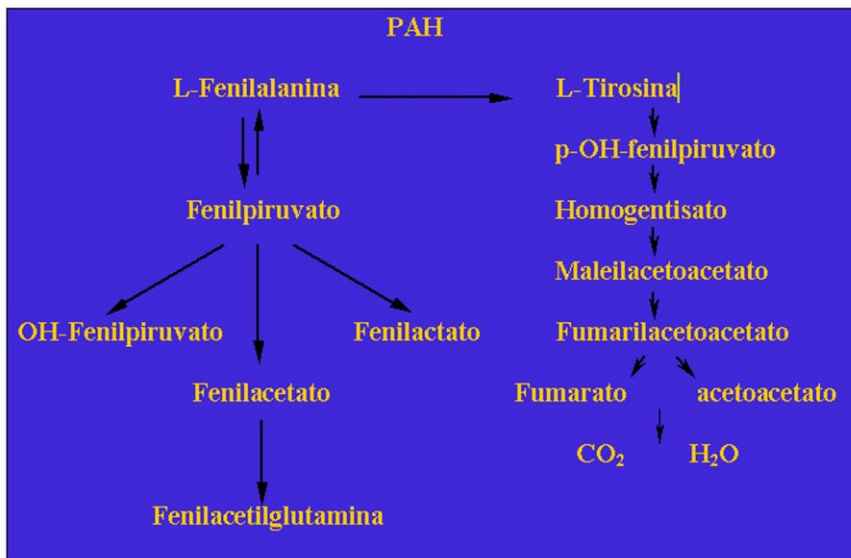


Figura 2: Principais Caminhos de Catabolização de Fenilalanina
 Transcrito de Scriver C.H., Kaufman S., Woo S.L.C. em *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, pág.499, Mc Graw-Hill

A alteração da homeostase metabólica traz sérias conseqüências neurológicas. De forma geral, observa-se um bloqueio no desenvolvimento do sistema nervoso central (Ionasescu & Zellweger, 1983). Além disso, a doença é acompanhada por diversos tipos de manifestações clínicas, convulsões e outros distúrbios neurológicos e menor pigmentação da pele e cabelos (Scriver *et al.*; 1989).

Dietoterapia

A PKU é um erro inato do metabolismo dos mais freqüentes. Sua incidência mundial é, em média, um caso para 10.000 recém nascidos, podendo atingir, em certos grupos étnicos, uma criança em cada 4400 nascimentos (Mira & Marquez, 2000).

Foi o primeiro erro genético tratado eficientemente por dietoterapia. O tratamento dietoterápico evita o retardo cerebral, se introduzido até o 3º mês de vida do recém-nascido (Smith, 1985 e Trefz *et al.*, 1993), e previne o estabelecimento do retardo em fetos de mães portadoras de hiperfenilalaninemias (Theile *et al.*, 1989 e Hashishe, 1992). Se a introdução da dietoterapia for tardia, observa-se apenas a melhoria de alguns dos sintomas

(Bickel *et al.*, 1953; Koch *et al.*, 1967 e Weglage *et al.*, 1993).

Este tipo de tratamento foi proposto por Bickel e colaboradores que relataram a utilização de hidrolisado ácido de caseína com baixo teor de Phe como dietoterapia para os portadores desta doença (Bickel *et al.*, 1953). Esta dieta permitiu não só a diminuição da concentração de Phe plasmática, como também a melhoria de distúrbios comportamentais que ocorrem em alguns pacientes.

Considerando a facilidade de diagnóstico, programas de rastreamento neonatal são recomendados porque possibilitam a detecção precoce da doença e seu tratamento imediato, prevenindo a lesão cerebral (Rylance, 1989; Slijper *et al.*, 1989; Berry *et al.*, 1967 e Smith & Wolff, 1974). A metodologia para rastreamento em grande escala foi desenvolvida e aperfeiçoada (Guthrie & Susi, 1963 e Efron *et al.*, 1964), possibilitando que, atualmente no Brasil, o “teste do pezinho” seja obrigatório para a prevenção da fenilcetonúria e de outras aminoacidopatias (Scriver *et al.*, 1964).

A dieta é restritiva apenas em relação a Phe, não afetando outros aminoácidos, especialmente os essenciais. Hoje, aceita-se que os ní-

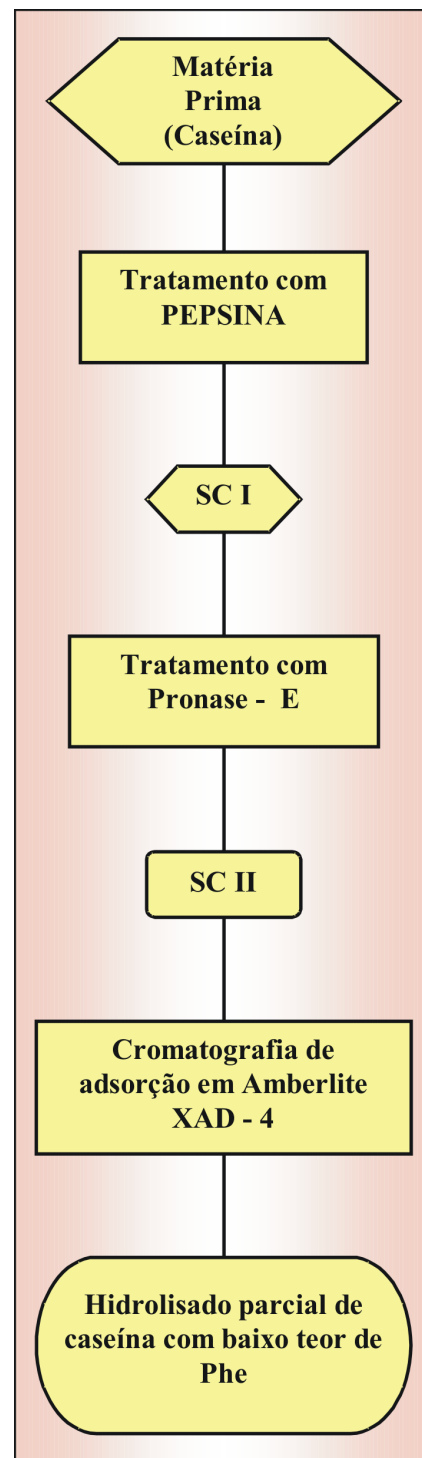


Figura 3: Etapas Sequenciais para a Obtenção de Hidrolisado Enzimático

veis plasmáticos de Phe sejam mantidos entre 2 a 10 mg/dL (Berry *et al.*, 1967; Caballero, 1985 e Gerdes *et al.*, 1990). No início da implantação dos programas de tratamento, os níveis aceitáveis

eram de 1 mg/dL.

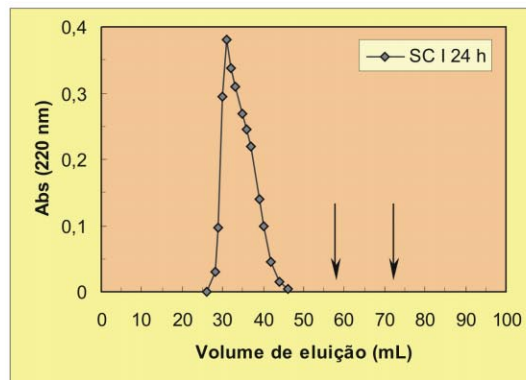
Na dieta prescrita na infância, 69 - 90% da proteína provêm de preparações com baixos teores de Phe. Os demais nutrientes necessários, como sais minerais e vitaminas podem ser fornecidos no produto, ou através de alimentos naturais (Hunt *et al.*, 1971). Uma revisão recente sobre as hiperfenilalaninemias pode ser encontrada em Mira & Marquez, 2000.

Apesar de existir diversas formulações disponíveis no mercado, na literatura encontram-se poucas referências sobre patentes para este tipo de produto (Schunichi *et al.*, 1992; Wachtel *et al.*, 1992 e Outinen *et al.*, 1993) e sobre pesquisas realizadas (Yamshita *et al.*, 1976 e Lopes-Bajonero *et al.*, 1991). Atualmente, existem dois tipos de produtos que são utilizados para a dietoterapia: mistura de aminoácidos e hidrolisados protéicos. As misturas de aminoácidos foram adotadas a partir da década de 80. Elas contêm todos os aminoácidos em proporções recomendadas pela FAO, mas são isentas de Phe. Os hidrolisados protéicos podem ser obtidos por hidrólise ácida ou por hidrólise enzimática. Alguns pesquisadores apontam os hidrolisados enzimáticos como os mais adequados para o tratamento porque são de mais fácil absorção (Silk *et al.*, 1973), não promovem aumento na tonicidade do meio (Adibi, 1991) e preservam as propriedades organolépticas (Mira & Marquez, 2000).

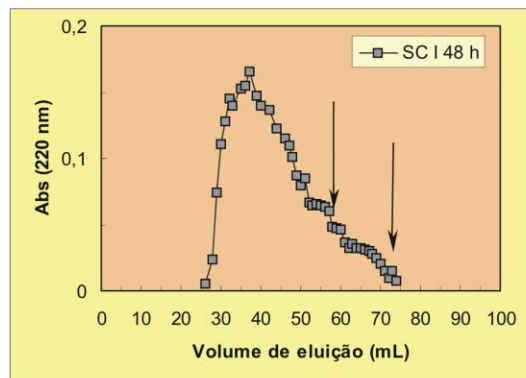
Foi desenvolvida, com sucesso, por nosso grupo uma metodologia para a produção de farinha dietoterápica, a partir de hidrolisado ácido (total) de caseína (Vasconcellos *et al.*, 1989 e 1992).

Neste trabalho objetivou-se o desenvolvimento de metodologia para estudo e preparação de hidrolisados, utilizando enzimas.

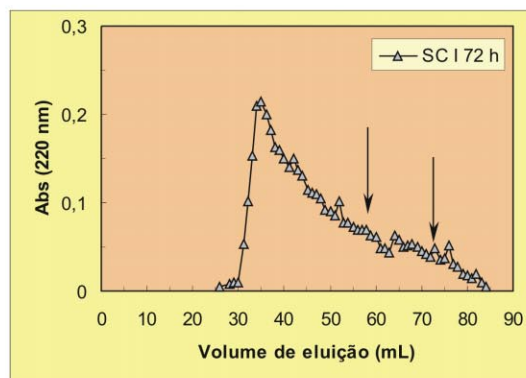
A



B



C



D

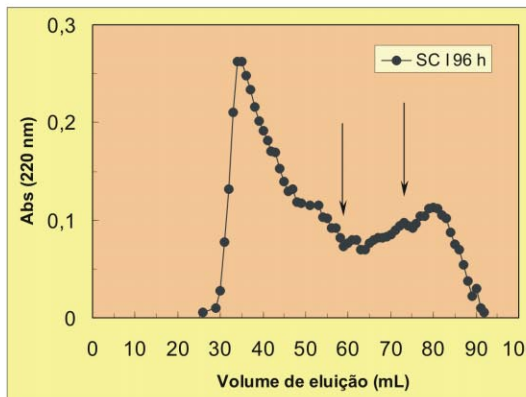


Figura 4: Perfis de fracionamento em Sephadex G-25 de SCI nos vários tempos de hidrólise: (a) 24 horas; (b) 48 horas; (c) 72 horas e (d) 96 horas. Coluna: 100 x 1 cm. Eluente: Tampão TRIS 0,1M pH 8,1 contendo NaCl 0,1M; Fluxo: 25 ml/h. Entre as setas está indicada o limite inicial e final da fração 3

Metodologia aplicada para confecção do hidrolisado parcial de Caseína.

A caseína para a confecção do hidrolisado enzimático foi gentilmente cedida pelo Laboratório Rodolfo Albino da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense. As resinas, Sephadex G-25 e G-15, e as enzimas Pepsina e Pronase-E foram adquiridas de Sigma Chemical Co. Os demais reagentes foram de grau analítico.

A abordagem experimental adotada está esquematizada na **Figura 3**.

Hidrólise péptica da Caseína:

A uma suspensão de caseína 1% (p/v) em HCl 0,01N foi adicionada pepsina até concentração final de 1 mg%. A digestão ocorreu a 37°C e foi acompanhada durante 144 horas. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.*, 1951 e o de grau de hidrólise, de acordo com Yamashita *et al.*, 1976.

Os resultados demonstram que não houve alteração significativa no grau de hidrólise após 24 h. O valor médio alcançado foi de 72% e é semelhante ao obtido por Yamashita *et al.*, 1976, tanto para concentrado protéico de peixe quanto para proteína de soja. Entretanto, não se pôde assegurar, apenas através desta técnica, que não haja mais reação após 24 h. Para verificar o prosseguimento da hidrólise em tempos superiores a 24 horas, os hidrolisados foram submetidos a filtração em gel. Os produtos provenientes dos diferentes tempos de hidrólise (SCI) foram centrifugados a 2000 g por 15 min. e os precipitados lavados com 15 mL de HCl 0,01N. Os sobrenadantes, incluindo as águas de lavagem, foram liofilizados, re-suspensos em tampão TRIS 0,1M pH 8,1 contendo sacarose 10% (p/v).

Uma alíquota, correspondente à cerca de 2 mg, foi aplicada em coluna contendo Sephadex G-25. Os perfis obtidos foram divididos em frações: Fração 1 - Zona de exclusão, Fração 2 - Zona de fracionamento, Fração 3 - Zona de retenção máxima e, por fim, Fração 4 - Zona de adsorção. Esta última foi determinada pela aplicação e posterior eluição de uma solução contendo Phe (100 mM), Tyr (75 mM) e Trp (75mM). E mostraram que a hidrólise de fato ocorre além de 72 horas. (Figuras 4 a, b, c e d). Estes resultados revelam também que SCI-72h e SCI-96h são somente distintos na relação de conteúdo de massa das frações correspondente a peptídeos com PMs menores que 1,5 kDa (volume de eluição superior a 60 mL) e à correspondente a aminoácidos aromáticos e peptídeos que são adsorvidos pela resina (volume de eluição superior a 73 mL).

Considerando que SCI, seria submetido à outra etapa de hidrólise, o tempo de 72 horas foi escolhido como condição ideal de digestão com pepsina.

Hidrólise com Pronase-E:

A Pronase-E consiste de uma mistura de 11 diferentes proteases, incluindo exopeptidases. Yamashita *et al.*, em 1976, mostraram que a Pronase obtida de Kagem Kagaku Co (Japão) exibe maior atividade exopeptidásica em condição levemente ácida (pH 6-7). Experimentos foram realizados para testar se a pronase-E (Sigma Chemical Co.) apresentava o mesmo tipo de comportamento. A hidrólise foi realizada em pHs diferentes, visando o aumento das atividades exopeptidásicas.

O hidrolisado SCI-72, na concentração de 0,65% (p/v), foi solubilizado em tampão fosfato 0,05 M

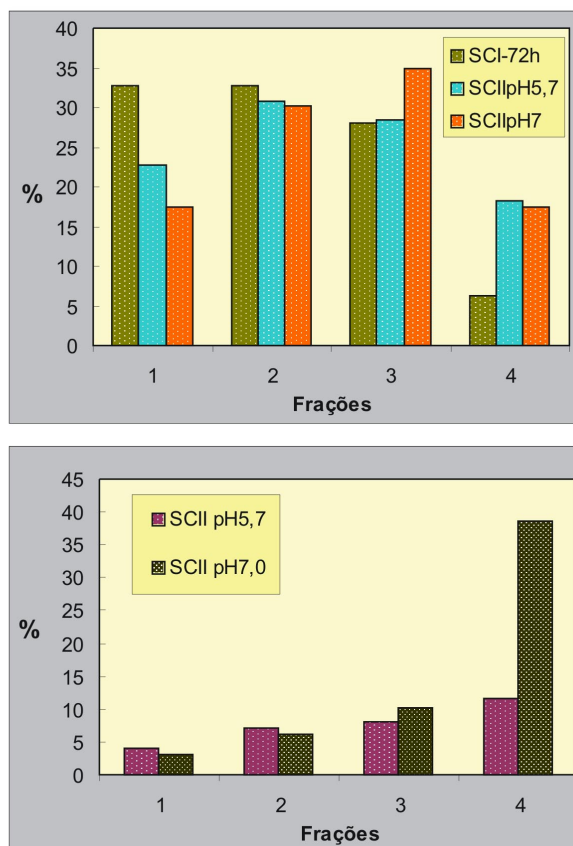


Figura 5: (a) Percentuais de aminoácidos presentes em cada fração de SCII 5,7 e 7,0. Determinados através da reação com ninidrina. Em (a) o valor de 100% foi assumido como total recuperado do fracionamento. Em (b) percentual de Phe presente em cada fração de SC II 5,7 e 7,0; o valor de 100% foi assumido como presente em SC I

em pH 5,7 e 7,0 e incubado com pronase-E, na concentração final de 3,34 % (p/v) por 5 horas a 37° C. A hidrólise foi interrompida e os produtos, denominados SCII, foram liofilizados, ressuspensos em uma solução de ácido acético 1% (v/v) e aplicados em coluna Sephadex G-15, previamente calibrada. Os perfis do fracionamento de SCII-5,7 e SCII-7,0 em Sephadex G-15, foram divididos em quatro regiões (1: Exclusão; 2: Fracionamento; 3: Retenção máxima e 4: Retenção de aromáticos – conforme o fracionamento em Sephadex G-25). O percentual de aminoácidos presente em amostras de cada uma destas frações e também em SCI-72h foi determinado pelo método da ninidrina (Spackman, *et al*, 1958). A Phe presente em cada uma das

frações foi quantificada por método fluorométrico (McCaman & Robbins, 1962) (Figura 5 a e b). A análise indica que a Pronase - E tem maior atividade proteolítica em pH 7,0 como se pode notar pela diminuição do teor de aminoácidos da Fração I. Neste pH parece haver uma atuação mais efetiva da atividade exopeptidásica como se pode constatar pelo enriquecimento da Fração IV (zona de adsorção).

Análises das composições em aminoácidos livres e totais das diferentes regiões foram realizadas em amostras não hidrolisadas e hidrolisadas com HCl 6N a 110°C por 24 horas. Estas amostras foram analisadas por análise diferencial, em analisador de aminoácidos no Centro Interdepartamental de Química de Proteínas (USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

A Figura 6 mostra que em pH 7,0, 7,67% dos aminoácidos totais estão livres, enquanto que, em pH 5,7, apenas 1,39% deles estão livres. A Phe total presente,

quantificada por método fluorométrico, foi 28,85% em pH 7,0 e apenas 8,52% em pH 5,7.

Os experimentos de hidrólise foram realizados em pH 5,7, 6,0, 6,4, 7,0 e 7,5 e quantificados por análise diferencial que demonstraram que em pH 7,0 há maior liberação de Phe livre (na Figura 6 constam apenas os resultados obtidos em pHs 5,7 e 7,0). Os resultados indicam que a pronase-E da Sigma apresenta maior atividade endopeptidásica (diminuição do teor de aminoácidos da Fração I) e exopeptidásica (enriquecimento da Fração IV) em pH 7,0.

Na caseína, alguns dos resíduos de Phe estão ligados a prolina (Pro). Este tipo de ligação é resistente à hidrólise catalisada pela maioria das proteases (Heinrikson,

1977). Se esta seqüência Phe-Pro estiver presente em um peptídeo de alto PM, este provavelmente não será retido por adsorção, por outro lado, haverá adsorção se esta seqüência estiver presente em peptídeo de baixo PM. Portanto, um procedimento para obter peptídeos com menor PM seria mais apropriado ao objetivo do trabalho.

Cromatografia de adsorção em Amberlite XAD – 4:

Um volume de 10 mL do produto da dupla hidrólise (Fração 1), contendo cerca de 450 mg, foi aplicado à coluna contendo a resina XAD-4. O procedimento ocorreu, como descrito por Vasconcellos *et al.*, 1992. A análise, feita a partir do fracionamento obtido, permitiu que o eluato fosse dividido em três regiões. Estas, foram liofilizadas, re-suspensas em água destilada e submetidas à análise de aminoácidos. A análise demonstrou que as regiões “A”, “B”, “C” continham 88%, 12% e 54%, respectivamente, do total de massa recuperado. Na região “A”, o teor de Phe correspondeu a 0,9% do total de aminoácidos. A eficiência de adsorção da coluna em relação a Phe foi de 62,5%. Entretanto, o teor de Phe nesta região é ainda elevado para o propósito dietoterápico (dados não mostrados). A aplicação de uma recromatografia é necessária.

Considerações finais:

A incubação por 72 h com pepsina foi suficiente para que 50% da massa de caseína utilizada apresentasse peptídeos com PM entre 5 e 10 kDa e 20% apresentasse PM < 1 kDa.

A enzima pronase-E apresentou maior atividade exopeptidásica em pH 7,0, como pode ser verificado pelo enriquecimento na região de adsorção. Neste pH, 29% da Phe presente foi liberada como aminoácido livre.

A cromatografia de adsorção, realizada em coluna contendo a

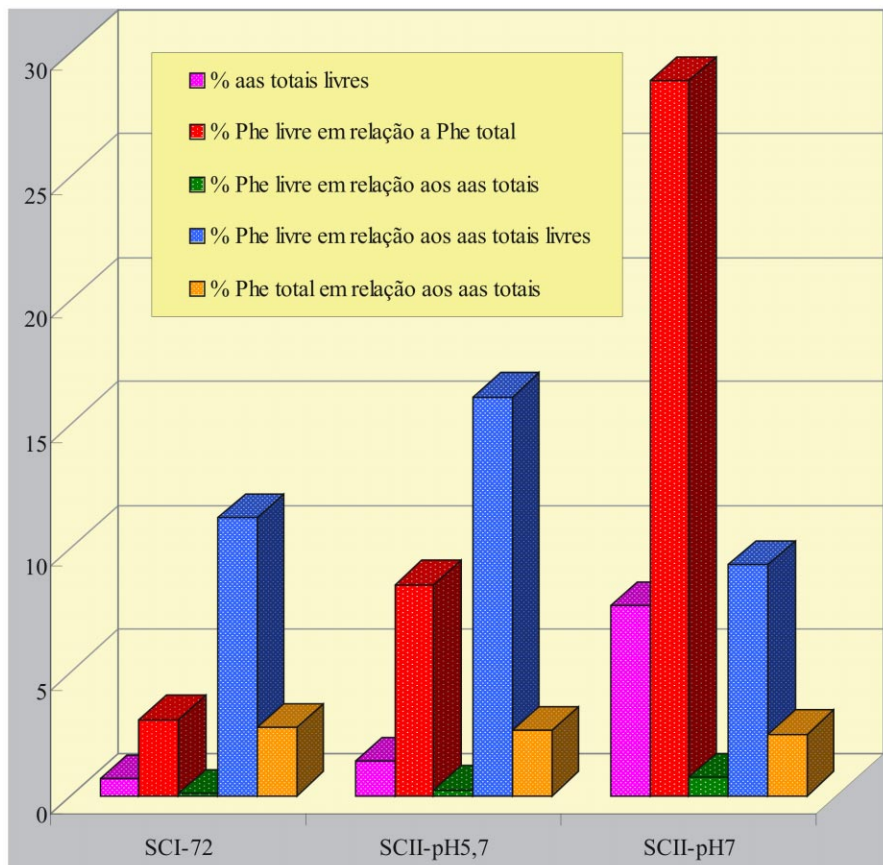


Figura 6: Análise Diferencial de aminoácidos em analisador de aminoácidos

resina Amberlite XAD-4, demonstrou uma eficiência de 62,5%. Este resultado é indicativo de que os peptídeos resultantes da dupla hidrólise atingiram um PM adequado para aplicação da metodologia. Pode-se verificar também que a eficiência de adsorção em relação a Phe foi semelhante àquela observada na adsorção de Phe presente em hidrolisados ácidos de caseína (Vasconcellos *et al.*, 1989 e 1992).

Referências bibliográficas

Adibi, S.A. Intestinal Transport of Dipeptides in Man: Relative Importance of Hydrolysis and Intact Absorption. *J. Clin. Invest.*, 50: 2266-2275 (1991).
 Berry, H.k., Sutherland, B.S., Umbarger, B., O'Grady, D. Treatment of Phenylketonuria, *Amer. J. Dis. Child.*, 113: 2-5 (1967)
 Berry, H.k.; Sutherland, B.S.; Umbarger, B. & O'Grady, D. Treat-

ment of Phenylketonuria. *Amer. J. Dis. Child.*, 113: 2-5 (1967).

Bickel, H., Gerrard, J. e Hickmans, E.M. Influence of Phenylalanine Intake on Phenylketonuria. *Lancet*, 2: 812-813 (1953).

Caballero, B. Dietary Management of Inborn Errors of Amino Acid Metabolism. *Clin. Nutr.*, 4: 85-94(1985).

Efron, M.L.; Young, D.; Moser, H.W. & MacCreedy, R.A. A Simple Chromatographic Screening Test for the Detection of Disorders of Amino Acid Metabolism: A Technique Using Whole Blood or Urine Collected on Filter Paper. *N. Engl. J. Med.*, 270: 1378-1383 (1964).

Gerdes, A.M.; Nielsen, J.B.; Lou, H. & Güttler, F. Plasma Amino Acids in Term Neonates and Infants with Phenylketonuria Before and After Institution of the Diet. *Acta Paediatr. Scand.*, 79: 64-68 (1990).

- Guthrie, R. & Susi, A. A Simple Phenylalanine Method for the Detection Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. *Pediatrics*, 32: 338-343 (1963).
- Hashishe, M.M. Genetic Study of Phenylketonuria. *J. Egypt Public Health Assoc.*, 67: 443-463 (1992).
- Heinrikson, R.L., Applications of thermolisin in protein structural analysis, in: *Methods in Enzymology*, v. LVII, Academic Press, New York. Hirs, C.H.W. & Timasheff, S.N. (eds); p.175-183 (1977).
- Hunt, M.M.: Sutherland, B. S. & Berry, H.K Nutritional Management in Phenylketonuria. *Amer. J. Dis. Child*, 122:1-6 (1971).
- Ionasescu, V. & Zellweger, H. Inborn Errors of Amino Acid Metabolism. In: *Genetics of Neurology*. Raven Press, Nova York. p. 227-281 (1983).
- Knox W.E. Phenylketonuria. Em: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. v. I, 3^a ed. McGraw-Hill, Nova York. Editado por Stanbury, J. B.; Wyngaarden, D.S.; Fredrickson, J.L.; Goldstein, J.L. & Brown, M.S. p. 266-295. (1972)
- Koch, R., Acosta, P., Fishler, K., Schaeffler, G., Wohlers, A. Clinical Observations on Phenylketonuria, *Amer. J. Dis. Child.*, 113: 6-15 (1967)
- Lopez-Bajonero, L.J.; 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.*, 56: 938-942 (1991).
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. Y., Farr, A.L. e Randal, R.J. Protein measurement with phenol reagent; *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275 (1951).
- McCaman, M.W. e Robbins, E. Fluorimetric Method for the determination of phenylalanine em serum. *J. Lab. & Clin. Med.*, 59: 885-890 (1962).
- Mira, N.V.M. e Márquez, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Pública*, 34(1): 86-96 (2000).
- Outinen, M.T.; Tossavainen, O.; Harju H. & Linko, P. Removal of Phenylalanine from Proteinaceous Compositions for Phenylketonurics, *PCT Int. Appl. WO 93 17, 581. Chem. Abstr.*, 119: 903 (1993).
- Rylance, B., Outcome of Early Detected and Early Treated Phenylketonuria Patients, *Postgrad. Med. J.*, 65: (Suppl 2) 87-89 (1989).
- Scriver, C.H.; kaufman, S. & Woo, S.L.C. The Hyperphenylalaninurias. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. v. I, 6^a ed. McGraw-Hill, Nova York. Editado por Stanbury, J. B.; Wyngaarden, D.S.; Fredrickson, J.L.; Goldstein, J.L. & Brown, M.S., p. 495-546, (1989).
- Scriver, C.R.; Davies, E. & Cullen, A.M. Application of a Simple Micromethod to the Screening of Plasma for a Variety of Aminoacidopathies. *Lancet*, 2: 230-232 (1964).
- Shunichi, D.; Nakajima, I. & Kameda, T. Nutrient Preparations Containing κ -casein Macropeptides for Phenylketonuria Patients, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 04, 126, 051 [92, 126, 051]. Chem. Abstr.*, 117: 740 (1992).
- Silk, D.B.A.; Marrs, T.C.; Addison, J.M.; Burston, D.; Clark, M.L. & Matthews, D.M. Absorption of Amino Acids from an Amino Acid Mixture Simulating Casein and a Tryptic Hydrolysate of Casein in Man. *Clin. Sci. & Mol. Med.*, 45: 715-719 (1973).
- Slijper, P.M., Husman, J., Hendriks, M.M., Kalverboer, A.F., van der Schot, I., *Monatsschr Kinderheilkd*, 137: 662-665 (1989)
- Smith, I. & Wolff, O.H. Natural History of Phenylketonuria and Influence of Early Treatment, *Lancet*, 22: 540-544 (1974)
- Smith, I. The Hyperphenylalaninurias. Em: *Genetics and Metabolic Disease in Pediatrics*. Butterworth & Co. (Publishers) Ltda, Londres. Editado por Lloyd, J. K. & Scriver, C. R., p. 166-233, (1985).
- Spackman, D. H.; Stein, W. H. & Moore, S. Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids. *Anal. Chem.*, 30: 1190-1206 (1958).
- Theile, H.; Wasser, S.; Buhrdel, P. & Graustein, I. Results, Problems and Consequences of Early Treatment of Phenylketonuria. *Z. Gesamte Inn. Med.*, 44: 317-320 (1989).
- Trefz, F.K.; Burgard, P.; König, T.; Goebel-Schreiner, B.; Lichter-Konecki, U.; Konecki, D.; Schmidt, E.; Schmidt, H. & Bickel, H. Genotype-phenotype Correlations in Phenylketonuria. *Clin. Chim. Acta.*, 217: 15-21 (1993).
- Vasconcellos, A.M.H., Oliveira, C.P.H, Grassiano, D.M. & Santos-Neto, A.L.C. Adsorption of Phenylalanine from Casein Hydrolysates *Appl. Biochem. Biot.* 37: 69-80 (1992)
- Vasconcellos, A.M.H., Santos-Neto, A.L.C., Grassiano, D.M. & Oliveira, C.P.H Adsorption Chromatography of Phenylalanine *Biot. Bioeng.*, 33: 1324-1329 (1989)
- Wachtel, U.; Schweikhardt, F. & Tesmer, E. Phenylalanine-free Dietetic Amino Acids Mixture for Phenylketonurics, *Ger. Offen. DE 4, 037, 447. Chem. Abstr.* 117: 657 (1992).
- Weglage, J.; Funders, B., Wilken, B.; Schubert, D. & Ullrich, K., School Performance and Intellectual Outcome in Adolescents with Phenylketonuria, *Acta Paediatr.*, 82: 582-586 (1993).
- Yamashita, M., Arai, S. & Fujimaki, M. A Low-phenylalanine, High Tyrosine Plastein as an Acceptable Dietetic Food: Method of Preparation by Use of Enzymatic Protein Hydrolysis and Resynthesis. *J. Food Sci.*, 41: 1029-1032, (1976).