رابعا- تحليل الأحماض الأمينية في المنتجات الغذائية

٤-١- تحليل الأحماض الأمينية الحرة

يلزم تحليل الأحماض الأمينية الحرة فى نواتج التصنيع النهائية وأيضا فى العينات تحت التصنيع المعقدة نسبيا. وفى جميع الأحوال فانه يلزم تحضير العينة لتقدير محتواها من الأحماض الأمينية الحرة.

وبصفة عامة يجب أن تكون العينة فى صورة قابلة للاستخلاص، ففى حالة العينات السائلة وأغلب المساحيق فانه يمكن استخلاص الأحماض الأمينية منها بكفاءة قبل التحضير، وفى حالة المواد الصلبة (منتجات اللحوم... الخ) فانه يلزم تجنيس العينة أو تحويلها إلى صورة مسحوق (المواد الصلبة الجافة) للحصول على كفاءة استخلاص عالية.

فى حالة العينة الجاهزة للاستخلاص فانه يجرى رجها مع مذيب مناسب وهو القادر على ذوبان الأحماض الأمينية الحرة. ومع ذلك يظهر الليوسين والسيستئين مشاكل فى الذوبان حيث يحتاجا إلى ظروف حمضية نسبيا. وهناك بعض الأحماض الأمينية مثل التربتوفان ترتبط بقوة مع البروتينات فى سيرم الدم ولبن الإنسان فيلزم فى هذه الحالة فترات رج طويلة لذوبانها بالكامل. وتظهر هذه المشكلة فى حالة المعامل الطبية حيث يجرى تحليل الأحماض الأمينية الحرة للأغراض التشخيصية. ويستخدم بصفة خاصة مذيب واحد وهو حامض الهيدروكلوريك المخفف، حيث ترج العينة مع ١,٥ عيارى HCI لمدة لا تقل عن ١٥ دقيقة على درجة المعمل. يتبع ذلك ضبط درجة حموضة الوسط ثم تخفيف العينة قبل تحليل الأحماض الأمينية. ويجب منع تسخين العينة نظرا لوجود العديد من الأحماض الأمينية التى يتغير تركيبها فى الظروف الحمضية عند درجات الحرارة العالية.

٤-٢- تحليل الأحماض الأمينية المرتبطة

يلزم عند تحليل الأطعمة معرفة التركيب العام للأحماض الأمينية الشائعة، وهذا يتطلب تحليل البروتينات والببتيدات تحليلا مائيا كاملا لتكسير الروابط الببتيدية التى تربط الأحماض الأمينية كما فى الشكل التالى

A-A-B-D-A-C-A-D-C-A

تحليل مائى ↓

5A+ lB+2C+2D

حيث A,B,C,D عبارة عن أحماض أمينية

وهناك العديد من المشاكل تحدث أثناء عملية التحليل المائى والتى تتضمن ما يلى:-

١- مشاكل الأحماض الأمينية التربتوفان السيستئين والسستين، حيث ينكسر التربتوفان فى وجود حمض قوى ساخن (خاصة فى وجود الكربوهيدرات) وأيضاً يتأكسد كبريت السيستئين والسستين.

٢- يحدث تكسير للسيرين والثريونين، حيث يحدث غالبا نزع الماء منهما.

٣- يحدث أثناء التحليل المائى تحليل الأميدات «الجلوتامين والأسباراجين» حيث تتحول إلى الأحماض المقابلة. وعلى ذلك، يقدر الجلوتامين والجلوتاميك على أساس جلوتامين كلى (GLX) والأسباراجين والأسبارتيك على أساس حمض اسبارتيك كلى (ASX)، أى الأحماض مع بعض.

٤- يوجد اختلاف فى الثبات الكيميائى Chemical stability لعديد من الأحماض الأمينية مثل التربتوفان.

obeikandl.com

٥- يلاحظ أن الرابطة الببتيدية للحمضين الأمينين الليوسين والأيزوليوسين ثابتة وتحتاج الى فترة تحليل مائى طويلة.

ولذلك فمن الضرورى استخدام طرق أخرى بديله لتقدير هذه النوعية من الأحماض الأمينية. وتوجد طرق مباشرة لتقدير هذه الأحماض الأمينية فمنها:-

التحليل بالفلورة للتربتوفان وكذلك تفاعل الجوهر الكشاف

5,5 -dithiobis (2-nitrobenzoic acid (DTNB) مع السستين والسستئين. وهذه الطرق تقدر هذه الأحماض فى البروتين مباشرة بدون إجراء التحليل المائى.

والجدول فى صفحة (٤٢) يبين الطرق المتخصصة للتحليل المائى باستخدام حمض HCI 7 عيار على درجة ١٠٥- ١٢٠° م لمدة ١٨-٢٤ ساعة.

وهذه الطريقة مناسبة لتقدير الأحماض الأمينية ألفا. وطرق التحليل المائى القاعدى (صودا كاوية، هيدروكسيد الليثيوم، هيدروكسيد الباريوم) على درجة ١٠٥- ١٢٠°م لمدة ١٨- ٢٤ ساعة للتربتوفان، والأكسدة بواسطة حمض بيرفورميك ثم يتبعه تحليل مائى لتقدير السستئين والسستين (على أساس حمض السستيك). ويلاحظ أن ظروف التفاعل مثل رفع درجة الحرارة، استخدام الميكروويف وإضافة مادة مضادة للأكسدة تؤثر فى عملية التحليل المائى.

وفيما يلى أسماء الأحماض الأمينية التى تنكسر أثناء التحليل المائى

جلوتامين
أسباراجين
تربتوفان
ثريونين

سيرين

سستين

ميثونين

بالإضافة الى الأحماض الأمينية سالفة الذكر يحدث أيضا فقد لبعض الأحماض الأمينية إذا أجريت أكسدة للعينة مع التحليل المائى وهى:

تيروزين

فينايل آلانين

هستدين

أرجنين

اختيار طريقة التحليل المائي

تختار أحد الطرق التالية:

- تحليل مائى بواسطة حمض معدنى.
- تحليل مائى بواسطة حمض عضوى.
- تحليل مائى بواسطة قلوى.

مع ملاحظة هل المطلوب:

أ - أكسدة العينة أثناء التحليل المائى.

ب- تقدير التربتوفان كميا.

جـ - إحتواء العينة على المركبات الكربوهيدراتية.

تجرى عمليه التحليل المائى باستخدام انبوبة إختبار مغلقة Sealed أو تجرى عملية التسخين تحت مكثف عاكس Reflux فى الجو العادى.

ويجب ملاحظة أنه لا توجد طريقة تحليل مائى واحدة تعطى استرجاع كامل لكل الأحماض الأمينية فى العينة.

obeikandl.com

٤-٣- تحضير العينات والمعاملات التي تجري عليها

تشمل هذه المعاملات على الترشيح، والتركيز معتمدا على خصائص العينة وفى الترشيح يمكن استخدام ورق الترشيح ذو مسام ٠,٢ ميكرومتر أو المرشحات الزجاجية لمنع مرور المركبات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة ثم تترك لتترشح بواسطة الجاذبية الأرضية، ولاسراع عملية الترشيح يجرى لها طرد مركزى. وفى تقديرات الأحماض الأمينية الحرة فانه يلزم التخلص من البروتين قبل التحليل المائى باستخدام حمض سلفوساليسيليك أو حمض بيركلوريك أو حمض ثلاثى كلوروخليك أو تنجستات صوديوم أو يرانيل حمض خليك أو استخدام مذيبات عضوية مثل أسيتو نتريل ثم يعقب ذلك الترشيح للتخلص من البروتين الراسب وأفضل جوهر كشاف هو حمض سلفوساليسيليك (SSA). وفيما يلى الخطوات المتبعة لترسيب البروتين هى:

١ مل عينة + ٥٠ مجم SSA فى أنبوبة اختبار

↓ رج

تترك لمدة ساعة على درجة ٤° م

↓

طرد مركزى لمدة ١٥ دقيقة على ٥٠٠٠ لفة/ دقيقة

↓

ترشيح الجزء الرائق من خلال ورق ترشيح ذو مسام ٠,٢ ميكرومتر

والطرق الأخرى التى تعمل على التركيز وإزالة الشوائب Concentration & clean up تشمل استخدام أعمدة قصيرة (Sep-pak) والمواد المعبأة تشمل Rexyn 101 (H), Amberlite IR 120، وتعمل هذه المواد على ارتباط الأحماض الأمينية بمتبادل كاتيونى قوى ثم الاستخلاص بواسطة قاعدة متطايرة

(أمونيا) . ويجرى تبخير المذيب للحصول على الأحماض الأمينية الحرة . وفى حالة العينات الغنية بالدهون، فانه يلزم استخلاصها باستخدام هكسان أو أسيتون/كلوروفورم (١:٣) . وبصفة عامة يجب التأكد من تمام استعادة وثبات الأحماض الأمينية . ولهذا يجب إجراء معايرة داخلية أو خارجية لمعرفة مدى الاستعادة Recovery ، يلاحظ أنه كلما زادت الخطوات المعملية زاد الخطأ التجريبى . وفيما يلى ملخص للخطوات اللازم إجرائها قبل التقدير الكمى للأحماض الأمينية .

أولا- الأحماض الأمينية الحرة Free amino acids

١) السوائل Liquids

تجرى عملية تخفيف السوائل بالمحلول المنظم Loading or injection buffer ويعقبها ترسيب البروتينات ثم الترشيح من خلال مرشح ذو مسام ٠,٢ ميكرومتر باستخدام جهاز الطرد المركزى الفوقى Ultracentrifugation

٢) المواد الصلبة والمساحيق Solid and powder materials

تجرى الخطوات التالية :- تجفيف- تجانس- استخلاص بواسطة ٠,١ مولر HCl أو ميثانول (٧٠٪)- التركيز باستخدام جهاز Rotar evaporator على درجة حرارة لا تتعدى ٤٠° م- الذوبان فى محلول منظم (Injection or load-ing) يعقبه الترشيح الفوقى Ultrafiltration

ثانيا- الأحماض الأمينية الكلية Total amino acids

تشمل الأحماض الأمينية الحرة والمرتبطة بعد تحليلها مائيا، حيث يجرى التحليل المائى إما باستخدام حمض عضوى أو غير عضوى أو قلوى- ويجب

الأخذ فى الاعتبار عند إختيار الطريقة المناسبة للتحليل المائى هل يلزم أكسدة للعينة قبل التحليل المائى- هل المطلوب تقدير التربتوفان كميا- هل العينة تحتوى على كربوهيدرات. ويجرى التحليل المائى للعينة إما فى أنبوبة مغلقة sealed ومفرغة باستخدام ٦ مولر حمض HC1 والتسخين على درجة ١١٥°م. وفيما يلى بعض الطرق المستخدمة فى التحليل المائى للبروتين:

١- التحليل المائي القلوي Alkaline hydrolysis

تؤخذ وزنة (١-٥ مجم) بروتين وتحلل مائيا بواسطة ٠,٥ سم٣ NaOH (٥ع) أو $Ba(OH)_2$ يحتوى على ٢٥ مجم نشا (مادة مضادة للأكسدة)- يلاحظ أن نسبة استرجاع التربتوفان هى ١٠٠٪ ولكنها غير مناسبة لأغلب الأحماض الأمينية.

٢- حمض ثيوجليكوليك Thioglycolic acid

تؤخذ وزنة (٠,١- ٠,٢ مجم) بروتين ويحلل مائيا بواسطة ٣ مل حمض HC1 (٦ع) يحتوى على ٢٪ حمض ثيوجليكوليك- يلاحظ أن نسبة إسترجاع التربتوفان هى ٨٥٪.

٣- حمض باراتولين سلفونيك P-Toluene sulfonic acid

تؤخذ وزنة (٢-٣ مجم) بروتين ويحلل مائيا بواسطة ١ مل حمض باراتولوين سلفونيك (٣ع) يحتوى على ٠,٢٪ تربتامين Tryptamine- يلاحظ أن نسبة إسترجاع التربتوفان هى ٩٤٪ فى غياب المواد الكربوهيدراتية، ٧٢٪ فى وجود ٣٠٪ كربوهيدرات فى العينة.

٤- حمض مركابتوإيثان سلفونيك Mercapto ethane sulphonic acid

تؤخذ وزنة (٠,٥ – ٢ مجم) بروتين وتحلل مائيا بواسطة ١ مل حمض مركابتوإيثان سلفونيك (٣ع)– نسبة إسترجاع التريتوفان بهذه الطريقة هى ٩٥٪.

بالاضافة إلى ذلك يطبق التحليل المائى بالانزيمات لتقدير الجلوتامين والأسباراجين.

ويجب التنويه مرة أخرى الى أن الأحماض الأمينية التى يحدث لها تكسير أثناء عملية التحليل المائى هى: جلوتامين، أسباراجين، تريتوفان، ثريونين، سيرين، سستين، ميثيونين. ويحدث فقد فى كمية الأحماض الأمينية التالية عند أكسدة العينة قبل التحليل المائى: تيروزين، فينايل آلانين، هستدين، أرجنين.

والجدير بالذكر أنه لا توجد طريقة واحدة تعطى إسترجاع كامل لكل الأحماض الأمينية.

٤-٤- طرق التحليل المائي للأغذية ومواد العلف Food and feedstuff

١– تجرى عملية أكسدة قبل التحليل المائى للعينة– ويحضر مخلوط الأكسدة كما يلى:

٠,٥ مل فوق أكسيد الأيدروجين (٣٠٪) + ٤,٥ مل حمض فورميك (٨٨٪) + ٢٥ مجم فينول.

يحضن الخليط على درجة ٣٠°م لمدة نصف ساعة ثم يبرد على درجة الصفر المئوى لمدة ١٥ دقيقة.

٢– يجرى طحن للعينة (٠,١ – ١جم) طحنا دقيقا ثم تبرد الى درجة الصفر المئوى.

بعض الطرق القياسية الشائعة للتحليل المائى للبروتينات

	ظروف التحليل المائى	ظروف التحليل المائى	ملاحظـــــات
1	6 N HCl (with or without protectant, e.g., 2% thioglycolic acid)	16- 72 hrs, 110°C 4 hrs, 145-155°C microwave (minutes)	يجرى تحليل مائى لفترات مختلفة لتحديد الوقت الكافى لإتمام التحليل المائى- وأن وقت واحد فقط للتحليل المائى يكون غير مناسب- الهضم بأشعة الميكروويف يكون أسرع وهذه الطريقة غير مكلفة.
2	6N HC (with tryptamine)	22 hrs, 110°C	تجرى هذه الطريقة لتقدير مدى إسترجاع التربتوفان حساسة للكربوهيدرات- لابد من تنقية clean up الببتيدات
3	4 N methanesulfonic acid (with or without protectant, e.g., 3- (2- aminoethyl)indole	22- 24 hr, 115°C	والبروتينات قبل تطبيق هذه الطريقة على الأطعمة. يحدث فقد قليل فى الببتيدات والأحماض الأمينية الحرة عند التخلص من الكربوهيدرات فى العينة.
4	Propionic + hydrochloric acid	50/50/v/v	تستخدم فى تحليل البيتيدات المرتبطة مع الراتنجات resin لا تستخدم فى التحليل المائى للأطعمة.
5	3 Np-Toluenesulfonic acid	22hr, 110°C	طريقة أخرى للتحليل المائى بديلة عن استخدام حمض HCl محاولة للحصول على التربتوفان والسستين بعملية تحليل مائى واحدة- مرتفعة الثمن عند استخدامهافى التحليل المائى للأطعمة.
6	3 N mercaptoethanesulfonic acid	22hr, 110°C	مثل ملاحظات الطريقة الخامسة.

تجرى هذه الطرق فى جو خامل أو مفرغ من الهواء

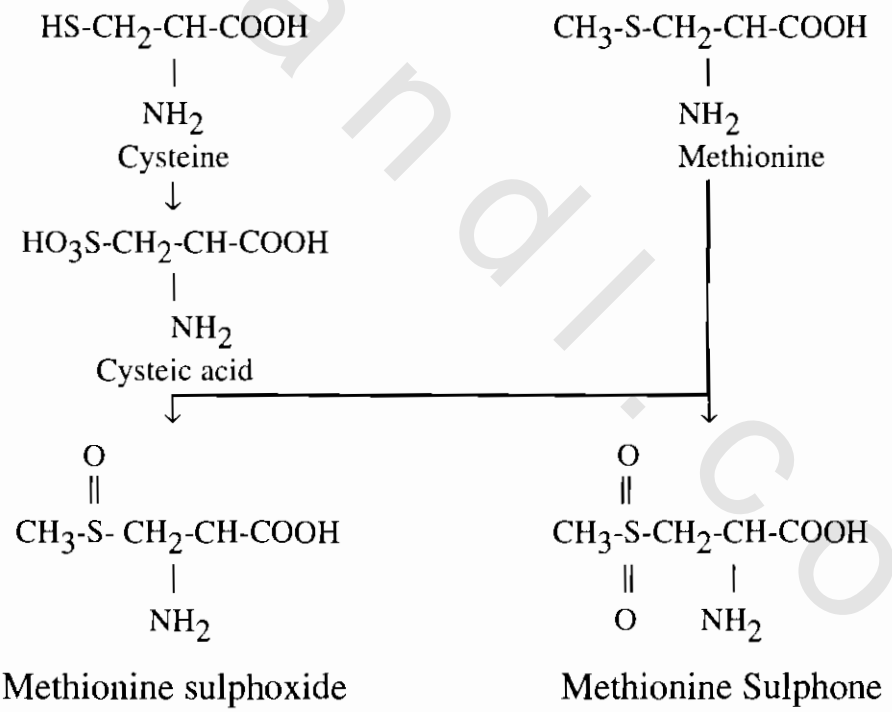
٣- يضاف مخلوط الأكسدة الى العينة مع الرج ثم يبرد الخليط الى درجة الصفر المئوى لمدة ١٦ ساعة.

٤- يضاف ٠,٨٥ جم ثنائى كبريتات الصوديوم Sodium disulfate ثم يرج.

٥- يجرى تحليل مائى للعينة باستخدام ٥٠ مل حمض HCl (٦ ع) يحتوى على ٥٠ مجم فينول تحت مكثف عاكس على درجة حرارة ١١٠°م لمدة ٢٤ ساعة.

٦- تضبط درجة حرارة حموضة الوسط الى ٢,٢ باستخدام محلول صودا كاوية (٧,٥ ع) ويرشح ناتج التحليل المائى من خلال مرشح ذو مسام ٠,٢ ميكرومتر.

يلاحظ : فى هذه الطريقة تحول الأحماض الأمينية سستئين- ميثيونين إلى حمض سستئيك Cysteic acid ومثيونين سلفون ومثيونين سلفواكسيد على التوالى:



والجدير بالذكر إن أنواع العينات التى يجرى لها تحليل مائى لمعرفة نوعية الأحماض الأمينية بصفة عامة تتضمن ما يلى:

أ- مصادر بروتينية نقية:

تشمل كل من الشعر (كيراتين)- الجلد (كولاجين- الإستين)- بروتينات محضرة بواسطة الهندسة الوراثية.

ب- الحبوب ومواد العلف:

وهى تحتوى على نسبة منخفضة نسبيا من البروتين ونسب مختلفة من المواد الكربوهيدراتية.

ج- النباتات والفطريات:

تحتوى على مدى واسع من الأحماض الأمينية مع كميات متفاوتة من البروتين.

د- الصخور والحفريات Fossils

حيث يظهر تحليل الأحماض الأمينية علاقة بعمر الصخور المتحولة Meta-morphic rocks