

## سنجش اسیدهای آمینه آزاد در سیب زمینی و پیسته

نوشته‌ی :

محمدجعفر الفت

(بقیه از شماره پیش)

### ۳ - سنجش کیفی اسیدهای آمینه آزاد در سیب زمینی

سیب زمینی برای ساکنین کشورهای اروپائی جزو غذای اصلی محسوب میشود و گرچه مقدار اسید آمینه آن کم است ولی از نظر غذائی حائز اهمیت است. برای شناسائی اسیدهای آمینه در سیب زمینی بایستی سه عمل زیر را انجام داد:

۱ - تهیه سیب زمینی

۲ - جدا کردن پروتئین و پپتید

۳ - استفاده از کروماتوگرافی

۱ - طرز تهیه - خورد کردن آن یا در هاون محتوی ماسه و یا در دستگاه مخلوط کننده مخصوصی انجام میگردد لیکن محققینی مانند: H. Kaspers; J. Raths; Herman Loeschke بروش دیگری عمل کرده اند باین ترتیب که سیب زمینی را در اثر سرما خرد نموده، از آن تحت فشار زیاد عصاره گیری مینمایند و چون گرمای ناشی از فشار زیاد عامل تجزیه اسیدهای آمینه است لذا این عمل در سرما انجام میشود. متأسفانه سرما در سیب زمینی تغییرات شیمیائی ایجاد میکند و بهمین علت عمل عصاره گیری از سیب زمینی برای تعیین اسیدهای آمینه چندان مناسب نمیباشد.

در هر حال آنچه که توسط فشار و یا خرد کردن سیب زمینی بدست میآید کدر بوده و لازمست آنرا

بوسیله سانتریفوژر (با سرعت . . . ۳ دور در دقیقه) صاف کرد.<sup>۱</sup>

۲ - جدا کردن پروتئین و پپتید - بعضی از محققین از جدا کردن پروتئین و پپتید سیب زمینی از

اسیدهای آمینه آن صرف نظر مینمایند و اسیدهای آمینه آنرا در روی همان عصاره بطریقه کروماتوگرافی می سنجند آواپارا (Awapara) پیشنهاد کرده است که برای جدا کردن مواد پروتئینی حلال الکل بکار برده و آنرا صاف

نمایند این طریقه از این جهت مناسب است که مواد مزاحم در صفحه کروماتوگرام تا حدودی از محول خارج شده ولی مقدار کمی از اسیدهای آمینه آزاد در الکل حل میشود و بهمین جهت این طریقه از لحاظ کمی مورد استعمال ندارد. جدا نمودن پروتئین بوسیله اسیدتری کلراستیک (T.C.A.) هم بعلت آنکه بر مقدار  $R_F$  اثر مینماید مناسب نمیشد. در زیر درجه حلالیت اسیدهای آمینه را بحسب ملکول در لیتر در انواع حلالها میآوریم.

اسید اسپاراژین	گلوکوسین	حلال
۰.۰۳۷۵	۲۸۸۶	آب
۰.۰۱۴۹	۱۳۴۳	اتانل ۲۰٪
۰.۰۰۰۷	۰.۰۲۷۸	اتانل ۸۰٪
	۰.۰۰۴۲۶	الکل متیلیک
	۰.۰۰۰۹۵۹	الکل بوتیلیک
	۰.۰۰۰۳۰۵	استن

صاف کردن ژله ای (Gel Filtration) در صنعت صاف کردن محلول محتوی سیب زمینی با استفاده از خاصیت غربال شدن ملکولی انجام میگردد. ذرات ژل تشکیل شده است از شبکه های سه بعدی با خانه های خالی کوچک که از عبور ملکولهای بزرگ جلوگیری مینماید.

طریقه عمل - در یک ستون شیشه ای بورت مانند مواد ژله ای مورد بحث را با محلول محتوی اسیدهای آمینه مخلوط نموده و پس از باز نمودن شیر ذرات کوچکتر از ژله عبور نموده و ذرات بزرگتر در ژله باقی مینمانند. ژله های هیدروفیل مانند دانه های نشاسته و پلی اکرول امید، پلی ونول و پیرولیدین برای جدا کردن پروتئین پپتید و اسیدهای آمینه بکار میرود.

۳ - برای جدا کردن اسیدهای آمینه از یکدیگر در بعضی مواقع از طریقه یک فازی ولی در اکثر اوقات از طریقه دو فازی استفاده میشود. شناسائی اسیدهای آمینه همانطور که قبلاً بیان شد از روش کروماتوگرام استفاده گردید.

اسیدهای آمینه آزاد در سیب زمینی بنا بر تحقیقاتی که از طریقه کروماتوگرافی حاصل شده است (شکل ضمیمه) بقرار زیر میباشد: الانین، اسید امینوبوتیریک، آرژنین، اسپاراژین، سیترولین، ستئین، هیستدین، گلوکوسین، گلوت آمین، متیونین، اورنیتین، فنول الانین، پرولین، سرین، ترانین، ترویتوفان، توروزین و والین.

توضیح: پس از انجام آزمایشهای مکرر این نتیجه حاصل گردید که اسیدهای آمینه موجود در سیب زمینی را میتوان بدون جدا کردن پروتئین و پپتید شناخت.

مقدار کمی اسیدهای آمینه آزاد بر حسب mg در ۱۰۰ سانتی متر مکعب عصاره سیب زمینی بشرح جدول زیر است.

اسیدهای آمینه	ناحیه پوست	بخش مغز
اسید گلوتامین	۵۸	۵۶
اسید اسپاراژین	۵۵۰	۶۶
سرین	۹۹	۱۴۵
گلوکوکول	۵۶	۷۶
تراونین	۹۸	۱۴۶
الانین	۱۰۳	۱۲۶
لوسین	۳۳	۱۱۹
ایزولوسین	—	۲۶۱
فنول الانین	۱۶۸	۲۹۷

بعنوان حلال اسیدهای آمینه از استات امونیم استفاده نمیشود چه نمک امونیم با معرف نین هیدرین

رنگ مثبتی میدهد.

تبصره - شناسائی پروتئین و پپتید.

الف با معرف GIES (محلول ۱٪ پتاس ۳٪ سولفات مس) رنگ آبی ضعیفی ایجاد میکنند.

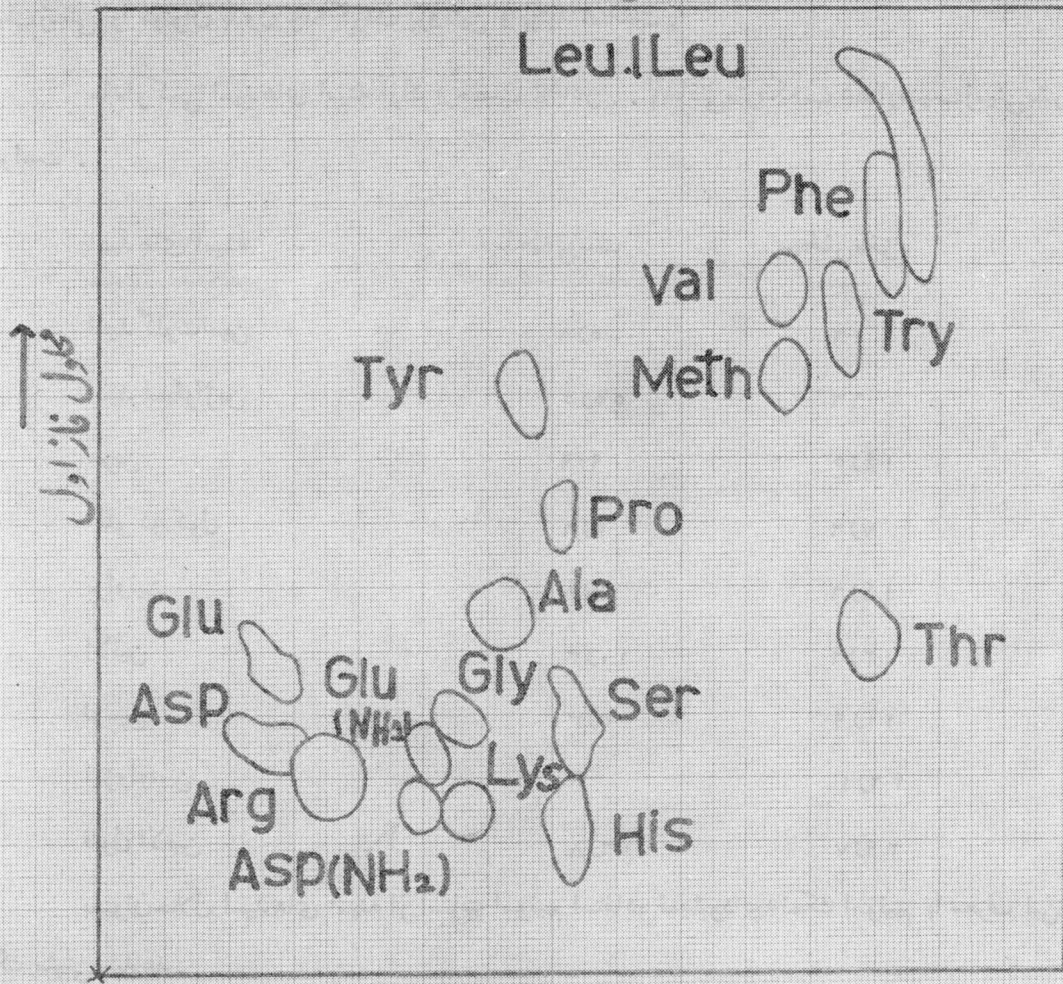
ب- در حال بهم زدن با مقداری از محلول شامل ۲۰ میلی لیتر از  $\text{SO}_2\text{Cu}_5\text{H}_2\text{O}$  (۳ درصد) و ۱۰۰ میلی لیتر

سود ۱۰ درصد ایجاد رسوب میکنند.

معرف ایزاتین شامل:

ایزاتین	۱ گرم
استات روی	۱۰ گرم
اسید استیک	۱ میلی لیتر
الکل ایزوپروپول	۹۰ میلی لیتر
آب مقطر	۵ میلی لیتر

جدول فاز اول



نقطه شروع

محل فاز دوم

کروماتوگرام حاصل از اسیدهای آمینه در سیب زمینی

برای حل نمودن ایزاتین و استات روی از حمام ماری با درجه حرارت ۷ تا ۸ درجه استفاده میشود.

رنگهای حاصله از اسیدهای آمینه با معرف ایزاتین و نین هیدرین بصورت جدول زیر است:

ایزاتین	نین هیدرین	اسید آمینه
بنفش	بنفش	الانین
قرمز	»	اسید آمینو بوتیریک
رز	»	ارژنین
بنفش	سبز	اسپارژین
رز	بنفش	اسید اسپاراژین

رز	بنفش	گلوت امین
»	قهوه‌ای	اسید گلوت امین
»	بنفش	گلو سین
قرمز	بنفش	لوسین
رز	»	ایزولوسین
قرمز	خاکستری	هیستیدین
رز	بنفش	میتونین
قرمز	»	فنول الانین
آبی	زرد	پرولین
پرتقالی	بنفش	سرین
رز	»	تراونین
قرمز	»	تریپتوفان
قرمز	قهوه‌ای	تروزین
رز	بنفش	والین

#### ۴ - سنتز اسیدهای آمینه آزاد در پسته‌های ایران

پسته معمولی (*Pistacia Vera*) که بخصوص در نواحی مدیترانه و خاورمیانه (ایران) بعمل می‌آید جزو میوه‌های خشک و یک هسته‌ای می‌باشد. دانه سبز و روغن دار آن با طعم مخصوص بادام از نظر غذائی در موارد مختلف مورد استعمال دارد. دانه بسته بناً به تحقیقات (K. Herman) دارای ۲ تا ۲۲ درصد پروتئین بوده لیکن تا امروز بحثی درباره محتویات اسید آمینه آزاد آن در نشریات دیده نشده است.

روش و مواد مورد استعمال - مقدار ۵ گرم مغز پسته را نرم نموده، بان ۳۵ میلی لیتر اتانل ۸۰٪ افزودیم و با استفاده از روش (Dent, Topy - 1966) جهت بدست آوردن اسیدهای آمینه آزاد آن محلول را در حرارت صفر درجه در محلی سرد بصورت فرار بدست آوردیم بعد بوسیله سانتریفوژور صاف کرده و باقیمانده را با الکل ۸۰٪ سستشو دادیم. محلول بدست آمده را در خلاء خشک کرده و مجدداً در آب حل نمودیم. برای از بین بردن لیپوئید بروش (Awapara 1948) با سه برابر حجم آن از کلروفرم در قیف جدا کننده‌ای وارد کردیم. محلول فوقانی دارای اسید آمینه آزاد همراه با مونوسا کارید نمکهای معدنی، آب و پروتئین بود. برای جدا کردن این مواد از یکدیگر آنرا در خلا تبخیر نموده و بروش (Macek و Hais) دسیکاتور محتوی اسید سولفوریک خشک کردیم. رسوب واجد اسیدهای آمینه آزاد (همراه با کمی پروتئین و ناخالصی‌های دیگر) را بمدت دو ساعت در محلول اسید کلریدریک ۸ میلی لیتر استن (غلظت اسیدیک حجم درصد مجموع حجم کلیمه محلول است) قرار دادیم باین ترتیب اسیدهای آمینه آزاد حل شده و پروتئین در رسوب باقی ماند. محلول را بوسیله سانتریفوژور صاف نموده و رسوب را با اسید کلریدریک که شامل استن است دو تا سه بار

شستشو دادیم. محلول بدست آمده را در درجه حرارت ۳۷ در جریان هوای خشک تبخیر کرده و بعداً آنرا در سه میلی لیتر آب مقطر حل نمودیم. برای خالص شدن محلول از لیبوئیدها آنرا دو تا سه بار با حجم مساوی با اتر شستشو داده مجدداً در دسیکاتور محتوی اسید سولفوریک خشک نموده، سپس در ۴-۶ میلی لیتر آب مقطر حل نمودیم.

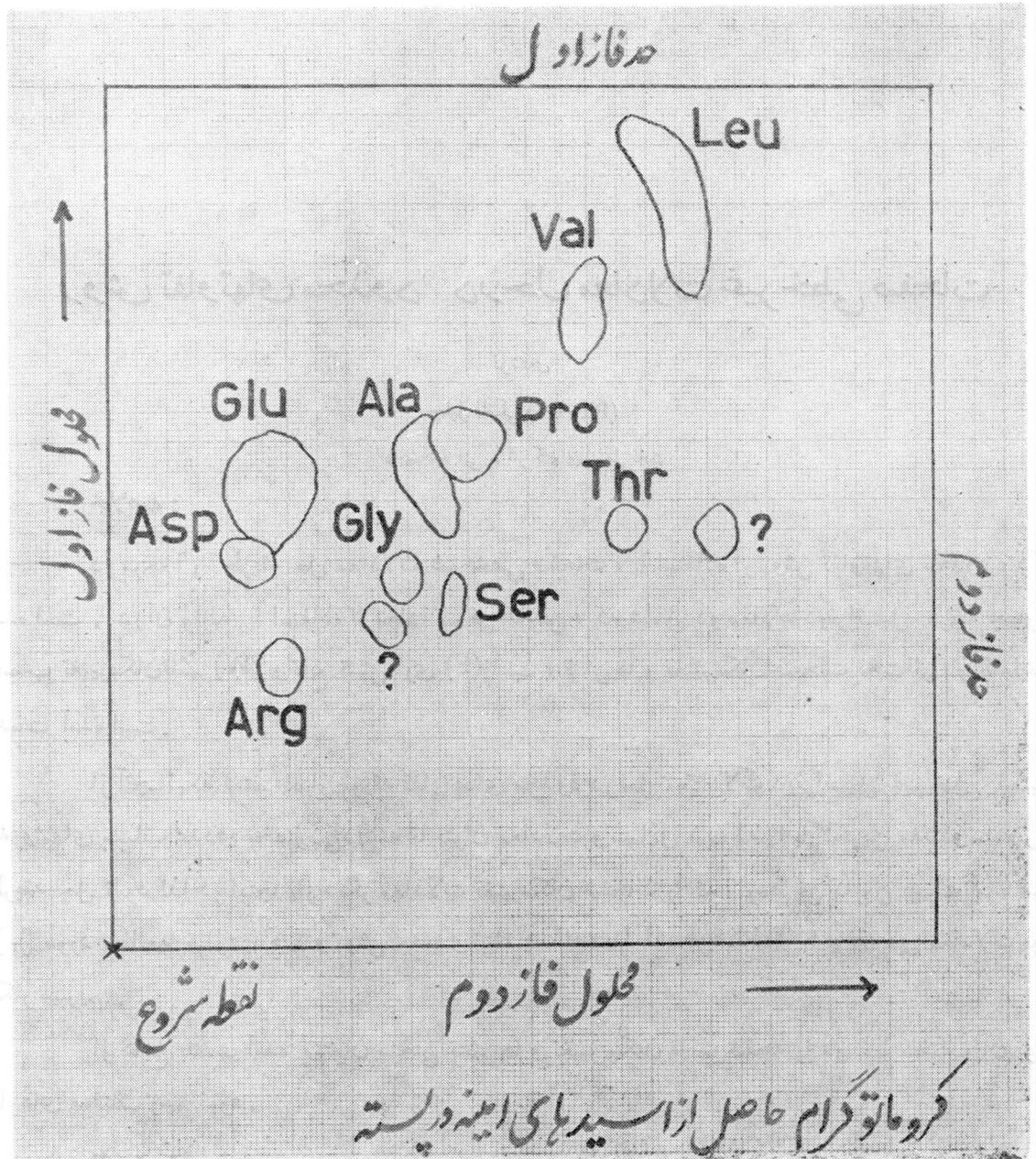
بخشی از این محلول مستقیماً از طریق کروماتوگرافی آزمایش شد. ماده پوششی روی صفحه کروماتوگرام همان سلولز Schulz و Schleicher بضخامت ۲۰ میلی متر بوده است. محلول بکاربرده شده همانگونه که شرح آن گذشت (نشریه شماره ۱۱ دانشکده فنی تهران) مورد آزمایش قرار گرفت ضمناً یک کروماتوگرام نمونه با محلول اسیدهای آمینه آزاد بصورت استاندارد و با غلظتهای مختلف در مقابل اسیدهای آمینه در پسته بکار برده شد که اولاً کنترلی برای شناسائی اسیدهای آمینه آزاد در پسته عملی گردد و ثانیاً محاسبه کمی آن دچار اشکال نشود. واضح است که جهت اندازه گیری کمی اسیدهای آمینه آزاد همانگونه که قبلاً نیز یادآور شدیم از روی اندازه سطوح لکه های حاصله و استفاده از منحنی های مربوطه با تعیین مقدار متوسط از ۵ آزمایش، غلظت اسیدهای آمینه آزاد در پسته ایرانی را محاسبه کریم.

نتیجه - سنجش کیفی اسیدهای آمینه آزاد در پسته ایرانی از روی کروماتوگرافی که (شکل ضمیمه) آزمایش نشان داده است معلوم میدارد که اسیدهای آمینه موجود در پسته ایرانی شامل الانین - پرولین اسید اسپاراژین - والین - ارژنین - اسید گلوت آمین - گلو سین - لوسین - ایزولوسین - تراونین و سرین بوده و متأسفانه دو نوع دیگر آن بعلت نداشتن ماده اولیه شناخته نشد. سنجش کمی - با توجه بمقدار عددی که از محاسبه سطوح لکه های اسیدهای آمینه آزاد از کروماتوگرام بدست آمده بشرح جدول زیر است.

### جدول شماره ۱

اسید آمینه	غلظت بر حسب میلی گرم در ۱۰۰ گرم پسته
۱ - الانین	۵۸
۲ - ارژنین	۲۵
۳ - اسید اسپاراژین	۱۴
۴ - اسید گلوت آمین	۵۹
۵ - گلو سین	۲۲
۶ - لوسین و ایزولوسین	۷۱
۷ - پرولین	۳۷
۸ - تراونین	۱۴
۹ - والین	۴۵
۱۰ - سرین	۱۴





محلول حاصل از پسته ایرانی با ۸٪ اتانل دارای مقدار زیادی از اسیدهای آمینه الانین - گلوٹ آمین - پرولین - والین - لوسین و ایزولوسین و مقدار کم ارژنین اسید اسپاراژین - گلوکوسین - تراونین و سرین میباشد. در خاتمه توجه علاقمندان محترم را باین نکته معطوف میدارد که متأسفانه برای از بین بردن ناخالصی‌های همراه اسیدهای آمینه آزمایشاتی که در مورد جایجا شدن یونها انجام شد نتیجه مثبت بدست نیامد.