تحضير مستخلصات الأمينات الحيوية من اللحم البقري ودراسة تأثير المعاملة الحرارية عليها

أم البشر حميد جابر آلاء محمد سدخان

قسم علوم الأغذية ، كلية الزراعة ، جامعة البصرة

البصرة ، العراق

الخلاصة:

تضمنت الدراسة تحضير مستخلصات الأمينات الحيوية من لحم البقر ودراسة تأثير المعاملة الحرارية بدرجتي الحرارة 60 م و 80 م ولمدة 20 دقيقة، حفظت العينات لمدة 7 أيام وتوبع قياس تراكيز الأمينات خلال مدد الخزن (1 ، 4 ،7) أيام باستخدام جهاز High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) وبوجود الأمينات الحيوية القياسية التي شملت الهستامين والكادافيرين والسبرمين والسبرميدين والبيوترسين والتايرامين. أظهرت النتائج حصول انخفاض في تراكيز الأمينات الحيوية المستخلصة من اللحم المعامل بدرجة حرارة 80 م مقارنة بدرجة حرارة 60م طوال مدة الخزن، إذ بلغت تراكيزها 0.798 و 0.766 و 0.267 و 0.199 و 0.001 ملغم / كغم للسبرميدين والسبرمين والبيوترسين والهستامين والكادافيرين على التوالي في اليوم الأول ، وفي اليوم السابع كانت التراكيز للسبرميدين والبيوترسين والسبرمين والهستامين والتايرامين 1.570 و 1.096 و 0.871 و 0.199 و 0.001 ملغم/كغم على التوالي أما الكادافيرين لوحظ عدم وجوده في اليوم الأول والسابع عند المعاملة بدرجة حرارة 80 م. أما عند المعاملة بدرجة حرارة 60 م كانت تراكيز الأمينات الحيوية المدروسة في اليوم الأول السبرميدين والسبرمين والبيوترسين والهستامين والتايرامين 0.798 و 0.766 و 0.267 و 0.199 و 0.001 ملغم / كغم على التوالي ، أما في اليوم السابع فقد لوحظ ارتفاع بتراكيز الأمينات الحيوية إذ كانت تراكيزها للهستامين والسبرميدين والسبرمين والبيوترسين والتايرامين 1.941 و 1.812 و 1.508 و 1.181 و 0.012 ملغم / كغم على التوالي ، أما الكادافيرين فلوحظ عدم وجوده في اليوم الأول ولكن ظهر في اليوم السابع وكان تركيزه 0.004 ملغم / كغم. وعند دراسة تأثير هذه المعاملات الحرارية على درجة حرارة 60 م و 80 م في الأمينات الحيوية المتكونة وذلك بعد خزن اللحم لمدة 7 أيام بالتبريد لوحظ أن هذه المعاملات لم تؤثر في تراكيز الأمينات الحيوية بالرغم من حدوث زيادة يسيره في تراكيزها خلال مدة الخزن.

المقدمة :

تعد سلامة الأغذية وخاصة اللحوم والحفاظ على قيمتها الغذائية وإطالة عمرها الخزني والحد من التلف في أثناء تداولها وخزنها من الأمور التي أثارت اهتمام المنتج والمستهلك وتماشياً مع التطور والتقنيات الحديثة في التصنيع الغذائي لمواجهة المتطلبات الغذائية المتزايدة وتلبية رغبة المستهلك (4).

إن الاتجاهات الحديثة في مجال الأمن الغذائي هو تعزيز عملية البحث عن المركبات التي يمكن أن تؤثر في صحة الإنسان ومن هذه المركبات الأمينات الحيوية التي تزداد نتيجة عدم السيطرة على الجانب المايكروبي أو تلوث اللحوم إذ إن الاهتمام بجودتها يشمل الجوانب الغذائية والميكروبيولوجية والجوانب البيوكيميائية والفيزيائية (2 و5).

الأمينات الحيوية هي مركبات نتروجينية ذات أوزان جزيئية واطئة تتكون بصورة أساسية من نزع مجموعة كربوكسيل الأحماض الامينية (Decarboxylation) أو عن طريق إضافة مجموعة أمين (Amination) أو انتقال مجموعة الأمين (Transamination) للالديهايدات والكيتونات(5)تتكون نتيجة الفعالية الأيضية الطبيعية في الحيوانات والنباتات والميكروبات وتشمل لأمينات الحيوية الهستامين(Histamine) والتايرامين(Tyramine) والبيوترسين (Putresciene) والكادافيرين(Cadaverine) والدوبامين (Dopamine) والسبيرمين (Spermine) والسبيرميدين (Spermidine) (14 و8).

تتوافق أسماء العديد من الأمينات الحيوية مع أسماء الأحماض الامينية المشتقة منها، على سبيل المثال عند نزع مجموعة الكاربوكسيل (decarboxylated) من الحامض الاميني الهستدين ينتج الهستامين، التربتوفان يتحول إلى تربتامين، التيروسين يتحول الى التايرامين، اللايسين يتحول الى الكادفيرين (12). ان التركيب الكيميائي للأمينات الحيوية أما أن يكون اليفاتياً Elefati او اروماتياً Aromatic او تركيباً حلقياً Cyclic (5) ، وقد صنفها العديد من الباحثين إلى أمينات أحادية الأمين Monoamine وثنائية الأمين Diamines ومتعدد الأمين Polyamines (11). وأكثر الأمينات الحيوية وجوداً في الأغذية والمشروبات هي الهستامين والفينيل اثيل امين والتايرامين والتربتامين والبيوترسين والكادافيرين والسبرمين والسبرميدين(10 و13) .

ويتميز الهستامين بأنه مركب ثابت حرارياً خلال عملية الطبخ وعندما يتكون فمن الصعب تحطيمه ويبقى في المنتجات الغذائية (3). ومن جانب آخر وجد (6) أن المعاملة الحرارية ليس لها تأثير كبير في اختزال التايرامين عند إنتاج النقانق، في حين إن معاملة هذا المنتج بتراكيز مختلفة من الثوم أو القرنفل ، وكذلك عملية التجميد تقلل من مستوى هذا الأمين أكثر من معاملتها بالقرفة .

ذكر (10) أن المعاملة الحرارية لا تختزل الأمينات الحيوية بشكل ملحوظ. وان من الضروري فهم الآليات التي تنتج من خلالها الأمينات الحيوية لمنع تكونها إذ يمكن التحكم بتكوين الأمينات الحيوية في الأغذية عن طريق أتباع وسائل النظافة وبشكل خاص للمواد الخام ومراحل التصنيع لمنع الفساد الذي يتكون بسبب الكائنات الحية الدقيقة ، وفي حالة الأغذية المخمرة يفضل أن تكون مدة التخمير قصيرة إذ يستعمل التخمير مع طريقة التصنيع التي اختبرت بدلاً من التخمير لمدة طويلة وبذلك سوف يساعد على منع تكوين الأمينات الحيوية السامة.

المواد وطرائق العمل :

اللحم :

تم شراء لحم البقر الطازج (منطقة الفخذ) من السوق المحلية في مدينة البصرة، حيث تم تقطيع اللحم الى قطع صغيرة الحجم وقسم الى اربعة اقسام وكما يلي:-

- القسم الاول : تم معاملته بدرجة حرارة 60 م .
- القسم الثاني : تم معاملته بدرجة حرارة 80 م .
- القسم الثالث : تم خزنه بالتبريد لمدة 7 ايام ثم معاملته بدرجة حرارة 60 م .

•القسم الرابع : تم خزنه بالتبريد لمدة 7 ايام ثم معاملته بدرجة حرارة 80 م .

حيث تم متابعة محتوى اللحم المخزن من الامينات الحيوية بعد مرور 1 و 4 و 7 ايام من الخزن .

تقدير وتشخيص الأمينات الحيوية :

استعملت تقنية الكروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة High-performance liquid chromatography HPLC) في تشخيص الأمينات الحيوية (الهستامين ،الكادافيرين ، البيوترسين ، التايرامين ، االسبيرمين والسبيرميدين) وتقديرها إذ اتبعت في عملية الفصل والتقدير الظروف المذكورة في (7). إذ تم استعمال الحجم 10ميكرولتر من الأمينات الحيوية القياسية فضلاً عن 10 ميكرولتر للعينات المدروسة. وقد استعمل جهاز الكروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC والتابع للشركة العامة للزيوت النباتية / وزارة الصناعة و المعادن / بغداد لتقدير نوع الأمينات الحيوية وتركيزها وذلك باستعمال عمود الطور المعكوس C18 ODS2 ذي الأبعاد (250 × 4.6) ملم نوع العمود المستعمل Hi-Plex H وعلى طول موجي 245 نانومتر. وقد اجري الفصل باستعمال الطور المتحرك المتكون من خليط من(5:5 Acetonitril:H2O) (حجم:حجم) وتم أجراء الفصل عند درجة حرارة 40 م وسرعة جريان 1 مل/دقيقة . وقدرت كمية الأمينات الحيوية حسب المعادلة التالية (1) :

تركيز الأمين في العينة = تركيز الأمين القياسي× مساحة حزمة الأمين / مساحة حزمة العينة

تجهيز محاليل الأمينات الحيوية القياسية

حُضرت الأمينات الحيوية القياسية بتركيز0.5 ملغم/1مل في 5% TCA من كل مركب قياسي وسحب حجم 200 ميكرولتر (لكل من الأمين القياسي والعينة) ونقل إلى أنبوبة زجاجية ذات غطاء معقمة وأضيف اليه 0.5 مل من $NaHCO_3$ المشبع وتم الخلط ثم أضيف 1 مل من الكاشف Dansyl Chloride (0.1 ملغم في 10 مل أسيتون) مع الخلط الجيد باستعمال خلاط قوي ، وضع الخليط في حمام مائي في درجة حرارة 70 م لمدة 10 دقائق وتم استخلاص الخليط 3 مرات بإضافة 5 مل من Diethylether وجمعت طبقة المذيب العليا في كل مرة في أنبوبة زجاجية أخرى ذات غطاء، بعد ذلك ركزت طبقة الداي اثيل ايثر بمساعدة تيار هوائي وفي حمام مائي على درجة حرارة 35 م بالتبخير ثم خففت العينة بحجم 1 مل من Methanol، بعدها حقنت الأمينات القياسية بحجم 10 مايكرولتر في جهاز HPLC (7).

استخلاص الأمينات الحيوية :

تم استخلاص الامينات الحيوية باستعمال طريقة (7) حيث تم وزن 25 غم من اللحم المفروم المعامل بدرجة حرارة 60 م و80 م ولكل المدد الزمنية وكذلك للحم المخزن لمدة 7 ايام بالتبريد ثم معاملته بدرجة حرارة 60 م و80 م و لمدة 1 و 4 و7 أيام، اذ تم وضع اللحم في بيكر وجنس مع 125مل من 5% TCA لمدة 3 دقائق باستعمال خلاط كهربائي، ثم رشح المزيج باستخدام ورقة ترشيح Whatman رقم (1) ، تم نقل 10 مل من المستخلص إلى أنبوبة زجاجية ذات غطاء وأضيف اليها 4 مل من NaCl 1 مل من NaOH 50% وتمت عملية الاستخلاص باستعمال 5 مل n- butanol:chloroform(1:1) وخلط جيداً وبقوة لمدة دقيقتين تلتها عملية النبذ المركزي للمزيج على سرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق ثم ترك المزيج ليستقر حتى الحصول على طبقتين ، طبقة عليا رائقة سحبت بمحقنة معقمة إلى قمع فصل سعة 50 مل ، وأهملت الطبقى السفلى. أضيف إلى قمع الفصل 15 مل من n-heptane ومزجت محتوياته ثم اجري استخلاص ثلاث مرات بحجم 1 مل من 0.2 N HCl ومزجت محتويات قمع الفصل حتى الحصول على طبقتين طبقة سفلى شفافة أنزلت في أنبوبة زجاجية ذات غطاء الحاوية على الأمينات الحيوية وأهملت الطبقى العليا. وقد وضعت الأنبوبة الزجاجية في حمام مائي درجة حرارته 95 م ثم تركت لتجف بمساعدة تيار هوائي . بعد ذلك أجريت عملية تكوين المشتقات المدنسلة بإضافة 0.5 مل من محلول $NaHCO_3$ المشبع تلتها مباشرة إضافة 1 مل من الكاشف Dansyl Chloride بالتدريج وخلط جيداً باستعمال خلاط قوي ووضع الخليط في حمام مائي في درجة حرارة 70 م لمدة 10 دقائق . ثم تم استخلاص الخليط ثلاث مرات بإضافة 5 مل من Diethylether وجمعت طبقة المذيب العليا في كل مرة في أنبوبة زجاجية أخرى ذات غطاء ، بعد ذلك ركزت طبقة الداي اثيل ايثر بمساعدة تيار هوائي وفي حمام مائي على درجة حرارة 35 م بالتبخير ثم خففت العينة بحجم 1 مل من Methanol ، ثم تم الحقن بحجم 10 ميكرولتر في HPLC .

النتائج والمناقشة :

تأثير المعاملة الحرارية في تكوين الأمينات الحيوية :

يبين الشكل (1) تراكيز الأمينات الحيوية التي تم فصلها من اللحم المعامل بدرجة حرارة 60 م إذ اتضح وجود تباين في تراكيز الأمينات الحيوية المدروسة . ففي اليوم الأول من الخزن ظهرت بعض الأمينات الحيوية بتركيز أعلى ومنها السبيرميدين والسبرمين 0.798 و 0.766 ملغم / كغم على التوالي يليهما البيوترسين والهستامين والتايرامين بتراكيز 0.267 و 0.199 و 0.001 ملغم / كغم على التوالي أما الكادافيرين فلوحظ عدم وجوده في اليوم الأول ، وفي اليوم الرابع من الخزن لوحظ زيادة قليلة في تراكيز السبرمين والسبيرميدين إذ بلغ تراكيزهما 0.871 و 0.798 ملغم / كغم على التوالي ، وقد كانت الزيادة واضحة للهستامين والبيوترسين إذ بلغ تركيزهما 0.686 و 1.084 ملغم / كغم على التوالي أما التايرامين فكان تركيزه 0.006 ملغم / كغم بينما الكادافيرين فلوحظ عدم وجوده أيضاً في اليوم الرابع ، واستمرت التراكيز بالارتفاع حتى اليوم السابع إذ وصل تركيز الهستامين إلى 1.941ملغم/كغم أما السبيرميدين والسبرمين والبيوترسين والتايرامين والكادافيرين فكانت تراكيزهم 1.812 و 1.508 و 1.181 و 0.012 و 0.004ملغم/ كغم على التوالي.

أما عند رفع درجة الحرارة إلى 80 م فتوضح النتائج في الشكل (2) أن هناك انخفاضاً واضحاً في تركيز معظم الأمينات الحيوية المدروسة ففي اليوم الأول كان أعلى تركيز للسبرميدين والسبرمين إذ بلغ تركيزهما 0.798 و 0.766 ملغم / كغم على التوالي تليها البيوترسين والهستامين والتايرامين وكانت تراكيزهم 0.267 و 0.199 و 0.001 ملغم / كغم على التوالي أما الكادافيرين فلوحظ عدم وجوده في اليوم الأول ، وفي اليوم الرابع كان تركيز الهستامين والسبرمين والسبيرميدين والبيوترسين والتايرامين 0.199 و 0.871 و 0.798 و 0.394 و 0.001 ملغم / كغم على التوالي أما الكادافيرين فلوحظ عدم وجوده في اليوم الرابع أيضاً ، وفي اليوم السابع يلاحظ هناك زيادة في تراكيز الأمينات الحيوية ولاسيما السبيرميدين إذ بلغ تركيزه 1.570 ملغم / كغم ، ثم يليه البيوترسين إذ بلغ تركيزه 1.096 ملغم / كغم أما السبرمين والهستامين والتايرامين فقد كانت تراكيزهم 0.871 و 0.199 و 0.001 ملغم / كغم على التوالي ، إما الكادافيرين فلوحظ أيضاً عدم وجوده في اليوم السابع، وقد يرجع سبب هذا الانخفاض عند درجة حرارة 80 م عما هو عليه عند درجة حرارة 60 م أن هذه الدرجة الحرارية قد أثرت على معظم أنواع البكتريا الحاوية على نازعات الكاربوكسيل وبالتالي ينخفض تكوين الأمينات الحيوية .

تأثير المعاملة الحرارية في الأمينات الحيوية المتكونة خلال الخزن بالتبريد :

يبين الشكل (3) تراكيز الأمينات الحيوية التي تم فصلها من اللحم غير المعامل ثم معاملته بدرجة حرارة 60 م، إذ يلاحظ أن تراكيز الأمينات الحيوية في اليوم الأول الهستامين و الكادافيرين و السبرمين و السبيرميدين و البيوترسين و التايرامين 5.822 و 0.001 و 4.470 و 4.400 و 5.213 و 0.020 ملغم / كغم على التوالي، أما في اليوم الرابع من الخزن فقد لوحظ زيادة في تراكيز الأمينات الحيوية ومنها الهستامين فكان تركيزه 7.681 ملغم / كغم والسبيرميدين 7.061 ملغم / كغم ، أما البيوترسين والسبرمين

والكادافيرين والتايرامين فكان تراكيزهم 0.501 و 4.135 و 0.396 و 0.023 ملغم / كغم على التوالي ، فلم يلاحظ زيادة واضحة بالتراكيز ، وعند استمرار بمُدَّة الخزن لمدة 7 أيام فقد ظهرت زيادة واضحة في تراكيز بعض الأمينات ومنها الهستامين والسبيرميدين فكانت تراكيزهما 10.201 و 8.660 ملغم / كغم على التوالي ، ثم يليهما البيوترسين والسبرمين والكادافيرين والتايرامين 6.656 و 4.928 و 0.799 و 0.052 ملغم / كغم على التوالي ويلاحظ من خلال النتائج أن معاملة اللحم بدرجة حرارة 60 م لم تؤثر بشكل واضح على تركيز الأمينات الحيوية المتكونة أصلاً في اللحم.

أما عند معاملة اللحم بدرجة حرارة 80 م فتوضح النتائج في الشكل (4) أن تركيز الأمينات الحيوية المتكونة في اللحم لم تتأثر بالمعاملة الحرارية طول مُدَّة الخزن . ففي اليوم الأول من الخزن كانت تراكيز الأمينات الحيوية الهستامين الكادافيرين والسبرمين والسبيرميدين والبيوترسين والتايرامين(5.822 و0.001 و 4.470 و 4.400 و 5.213 و 0.020) ملغم / كغم على التوالي، كما لم تكن هناك زيادة واضحة في تراكيز الأمينات في اليوم الرابع والسابع مقارنة مع اللحم المعامل حرارياً بدرجة 60 م، إذ كان تركيز الهستامين والكادافيرين والسبرمين والسبيرميدين والبيوترسين والتايرامين في اليوم الرابع 5.822 و 0.072 و 4.470 و 5.199 و 5.213 و 0.023 ملغم/كغم على التوالي ، وفي اليوم السابع كانت تراكيز الهستامين والكادافيرين والسبرمين والسبيرميدين والبيوترسين والتايرامين 5.822 و 0.222 و 4.470 و 6.376 و 6.066 و 0.052 ملغم / كغم على التوالي، حيث لم يحدث انخفاض في تركيز الأمينات الحيوية بسبب المعاملة بالحرارة ، وقد يرجع السبب في ذلك إلى إن المعاملة الحرارية لم تؤثر على محتوى اللحم من الأمينات الحيوية وإنما أثرت فقط على البكتريا الحاوية على أنزيمات نازعات الكاربوكسيل كما أدت إلى تثبيط فعل الإنزيمات ، إذ ذكرت (9) أن الأمينات الحيوية ولاسيما الهستامين ثابتة خلال عمليات الطبخ وتبقى سليمة ومن الصعب تحطيمها .

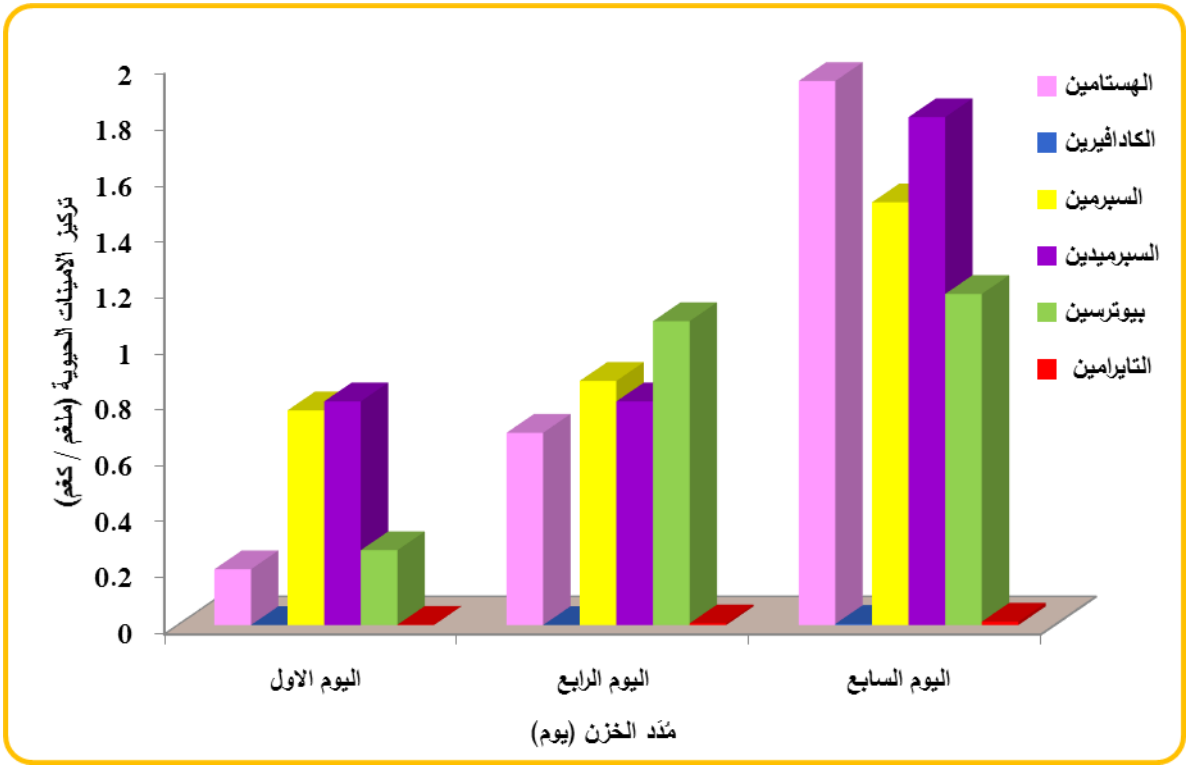
الاستنتاجات والتوصيات :

الاستنتاجات :

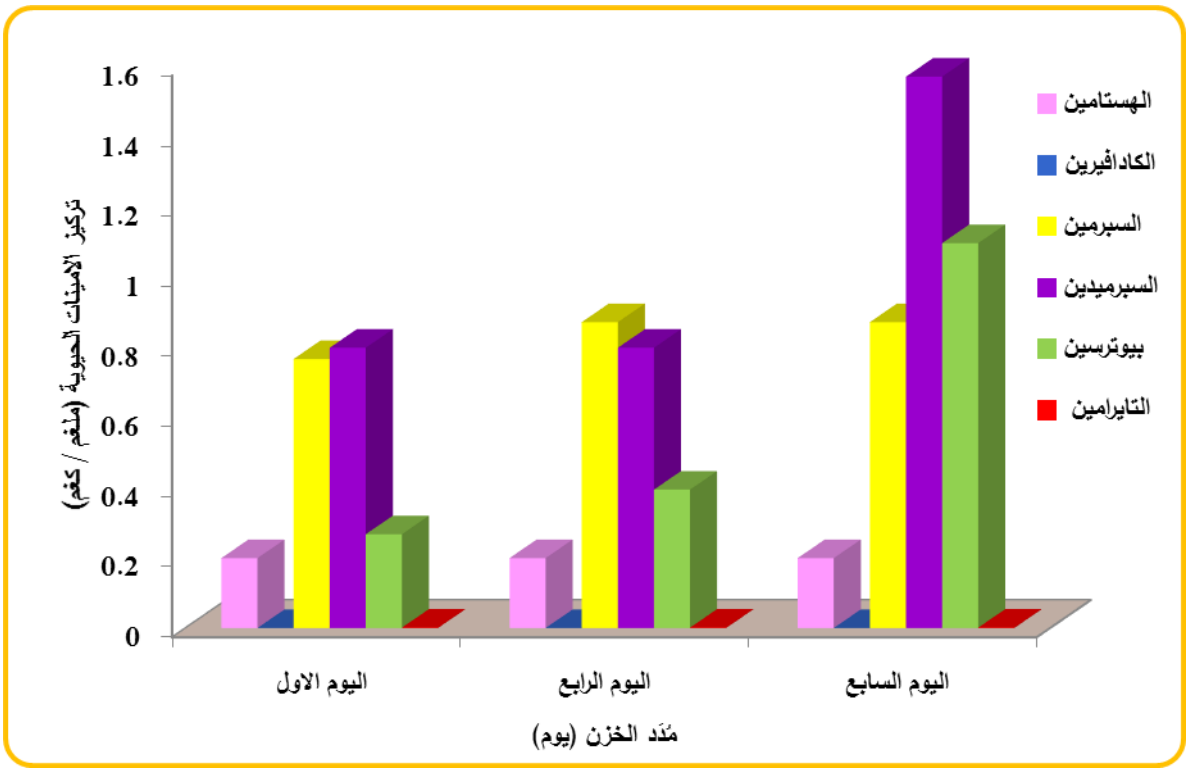
- انخفاض تراكيز الامينات الحيوية عند معاملة اللحم بدرجة حرارة 80 م مقارنة عند معاملته 60 م .
- لم تؤثر المعاملة التي اجريت على اللحم المخزن لمدة 7 ايام بالتبريد في تراكيز الامينات الحيوية المتكونة .

التوصيات :

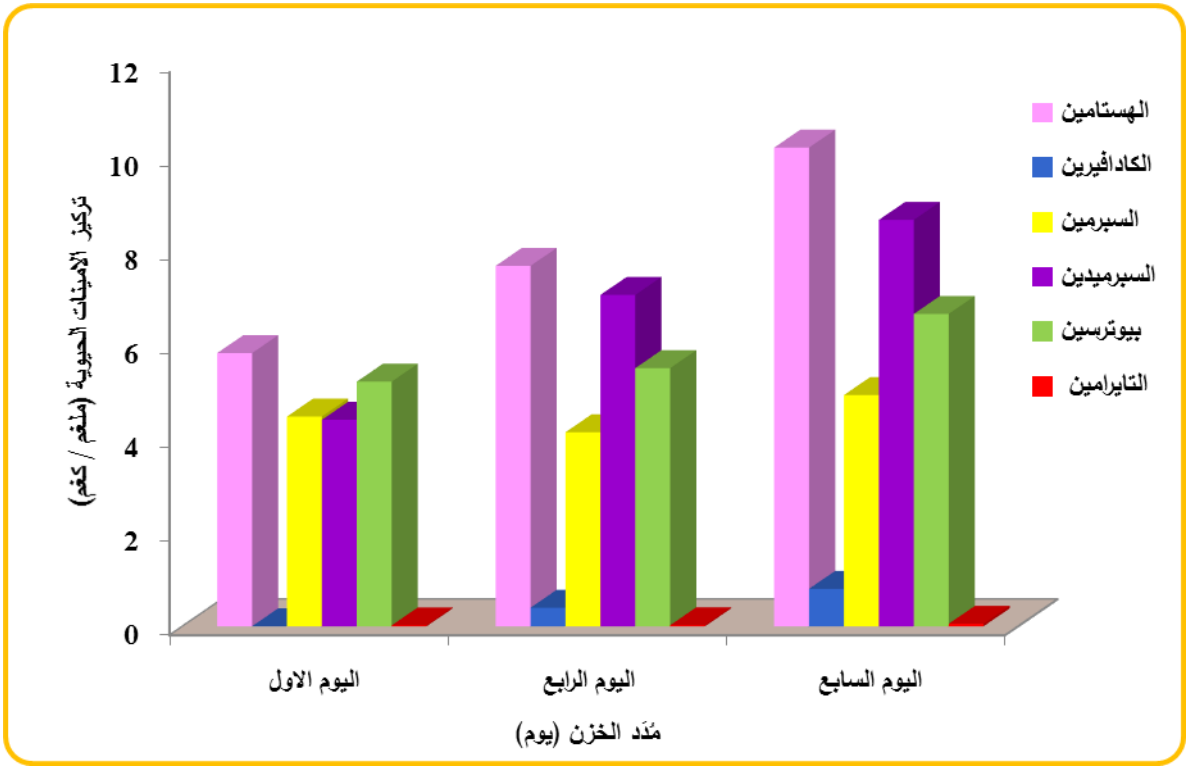
- أجراء دراسة توضح العلاقة بين المحتوى الميكروبي في الأغذية ومحتواها من الأمينات الحيوية وتشخيص البكتريا المنتجة لنازعات كاربوكسيل الأحماض الامينية وتكوين الأمينات الحيوية.



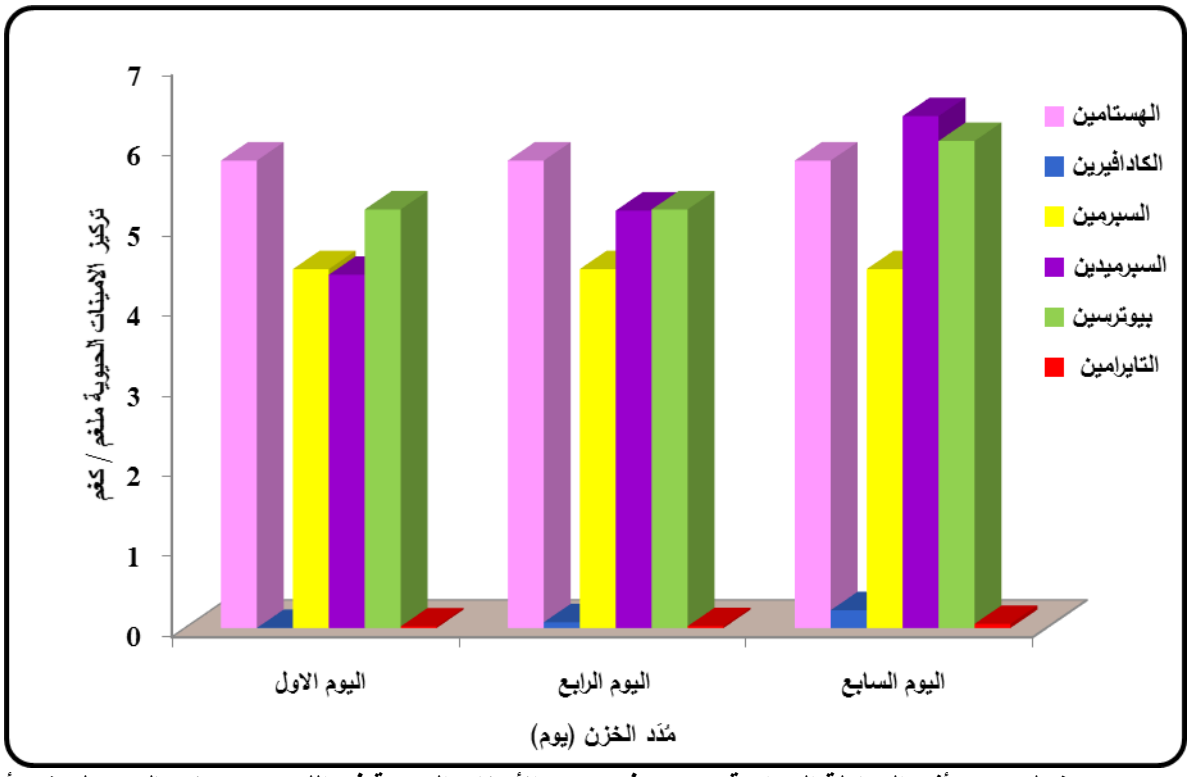
شكل (1): تركيز الأمينات الحيوية في اللحم المعامل بدرجة حرارة 60 م والمخزن بالتبريد



شكل (2): تركيز الأمينات الحيوية في اللحم المعامل بدرجة حرارة 80 م والمخزن بالتبريد



شكل (3): تأثير المعاملة الحرارية (60) م في تركيز الأمينات الحيوية في اللحم بعد خزنه بالتبريد لمدة 7أيام



شكل (4): تأثير المعاملة الحرارية (80) م في تركيز الأمينات الحيوية في اللحم بعد خزنه بالتبريد لمدة 7 أيام

References المصادر

1. **Barbas , C. ; Dams , A. and Majors , R. A. (2005) .** Separation of aflatoxin by HPLC aligent technologies . www.Aligent.com/chem..
2. **Bonilla , A. C. (2004) .** Development of quality index method (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and consumer acceptance of different cod products . Book Company Inc , New York , USA.
3. **Chen , H . C .; Kung , H . F .; Chen , W . C.; Lin , W . F .; Hwang , D . F .; Lee , Y. C . and Tsai , Y . H . (2008) .** Determination of histamine and histamine forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food borne poisoning . Food Chemistry . 106 : 612 – 618 .
4. **Cook , N. C. and Samman , C. (1996) .** Flavonides – Chemistry , metabolism , cardio protective effect and dietary sources . J. Nutr. Biochem . 75 : 66 – 76 .
5. **Karovičova , J. and Kohajdova, Z . (2005) .** Biogenic Amines in Food . (A review) . Chen . Pap . 59 (1) : 70 – 97 .
6. **Mohamed , G . G .; Abd El – Hameed , A . K .; Nezam El – Din , A . M . M . and El – Din , A . M . M . N . (2010) .** High performance liquid chromatoghraphy , thin layer chromatoghraphy and spectrophotometric studies on the removal of biogenic amines from some Egyptian foods using organic , inorganic and natural compounds . The Journal of Toxi- cological Sciences . (35) 2:175 – 187 .
7. **Moret , S. and Conte , L. S. (1996) .** Hidh – performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in food . Journal of Chromatography A. 729 : 363 – 369
8. **Önal , A . (2007).** Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods (A review) . Food Chemistry . 103 :1475-1486.

9. **Santos , M . H . S . (1996) .** Biogenic amines : their importance in foods . (A review) International Journal of Food Microbiology . 29 : 213 – 231 .

10. **Shalaby , A . R . (1996) .** Significance of biogenic amines to food safety and human health . Food Research International . 29 (7) : 675 – 690.

11. **Spano , G. ; Russo, P. ; Lonvaud-Funel, A. ; Lucas , P. ; Alexandre , H. and Grandvalet , C.(2010).** Biogenic amines in fermented foods . European Jounal of Clinical Natrition . 64 (53) : S 95 – S 100 .

12. **Stadnik , J. and Dolatowski , Z . J . (2010) .** Biogenic amines in meat and fermented meat products . Acta Sci. Pol. , Technol . Aliment . 9 (3): 251 – 263 .

13. **Suzzi , G. and Gardini , F . (2003) .** Biogenic amines in dry fermented sausages : A review . Int . J . Food Microbiol . 88 : 41 – 54 .

14. **Yan , G-C . and Hsieh , C-L . (1997) .** Antioxidant Effects of Dopamine and Related Compounds . Biosci. Biotech . Biochem . 61 (10): 1646 – 1649 .