

## تعديل البروتينات النباتية Modification of Plant Proteins

الأستاذ الدكتور / السيد حلمى عبد السلام رحمه  
قسم علوم وتكنولوجيا الأغذية - كلية الزراعة  
جامعة المنوفية - شبين الكوم

يتم تحضير وإنتاج البروتينات النباتية أساسا من البقول أو البذور الزيتية بعد إنتاج الزيت وكذلك من جنين القمح والذرة والأخيرة لها استخدامات صناعية أكثر منها غذائية Non Food Applications . هذا ويتم إنتاج أكثر من مركب بروتينى من المادة الخام الواحدة وهى :

- 1- الدقيق Flour وهو الناتج الذى يحتوى على نسبة من البروتين بين ٥٠-٦٥٪ .
- 2- البروتين المركز Protein concentrate وهو الناتج الذى يحتوى على نسبة من البروتين بين ٦٥-٩٠٪
- 3- البروتين المعزول Protein Isolate وهو الناتج الذى يحتوى على أكثر من ٩٠٪ بروتين .

وهذه المركبات يطلق عليها Food products مقارنا بـ Cake meal وهى Non food products

وتستخدم هذه البروتينات فى التغذية البشرية لغرضين :

- أ- Functional Application وهنا تضاف عادة بتركيز منخفض لا يتجاوز ٥٪ من وزن الناتج النهائى بهدف إكساب الناتج الغذائى خاصية وظيفية معينة أو أكثر من خاصية .
- ب- Nutritional Application وهنا معدل إضافتها أو إحلالها لبعض المصادر البروتينية الحيوانية فى الغذاء يكون أعلى نسبيا مقارنا بالغرض السابق .

ولكن من الصعب عمليا التفرقة بين الغرضين السابقين من استخدام هذه البروتينات وظهر مصطلح يجمع بين الغرضين وهو Nutrifunctionality ويرجع ذلك الى جمعية البروتينات النباتية الفرنسية .

وبالإضافة الى تنوع جودة البروتينات النباتية وارتفاع محتواها من البروتين فإن أهميتها زادت بدرجة كبيرة خلال السنوات الحالية بعد تقدم الأبحاث فى مجال التغذية حيث لها المزايا الصحية التالية :

- 1- إنخفاض معدل الإصابة بالسرطان بزيادة استهلاك البروتينات النباتية .

٢- وجود بعض المركبات المصاحبة للبروتين ثبتت من الدراسات السابقة أن لها تأثير مانع لسرطنة خلايا الأنسجة الحيوانية والبشرية و Anticancer Effects in Animal and Human Cell Tissues .

٣- لها تأثير خافض واضح على دهون الدم وبذلك تخفض الكوليسترول و LDL وتفيد مرضى القلب .

٤- إنخفاض محتواها من الدهون والطاقة Low Fat and Calory .

٥- إزدياد الأفراد النباتيين على مستوى العالم Vegeterian Sector .

٦- الحساسية الغذائية لبعض البروتينات الحيوانية (مثل اللبن) يزيد من استخدام البروتينات النباتية .

هذا ومن المعروف أن البروتينات النباتية فى حالتها الطبيعية Original or Native تعاني من نقص واضح فى كثير من الخواص الوظيفية Functional Properties ومن الصعب أن يكون هناك مادة خام واحدة جميع خواصها الوظيفية مرضية (جيدة) ولكن يتم تحسين أو تعديل هذه الخواص Functionality Improvement or Modification وهذه الطرق تقع تحت الأقسام التالية :

١- التعديل بالطرق الطبيعية Physical Modification .

٢- التعديل بالطرق الإنزيمية Enzymatic Modification .

٣- التعديل بالطرق الكيماوية Chemical Modification .

ويقع تحت كل قسم من الأقسام السابقة العديد من الطرق المستخدمة بالإضافة الى المزايا والعيوب وكذلك الإستخدام النهائى للبروتين المعدل Modified Final Protein Products وسوف نقتصر فى هذا اللقاء على مجموعة القسم الثالث (الطرق الكيماوية لتعديل البروتين) وذلك يودى الى إنتاج مايسمى بـ Tailored Protein .

وعادة يتم متابعة درجة التعديل Modification Rate or Degree ببعض التقديرات الكيماوية مثل تقدير مجموعة الأمين-الأيدروكسيل وبعض الطرق المسماه بـ Physicochemical Methods مثل Viscosity, Ultracentrifugation (S-Value), RP & Se-HPLC, PAGE وغيرها من الطرق التى سوف يتم التعرض لها بإيجاز .

تعتبر البروتينات النباتية Vegetable or Plant Proteins ذات أهمية خاصة فى مجال تغذية الإنسان حيث تعتبر المصدر الرئيسى للبروتين فى الوجبات الغذائية اليومية للإنسان فى جميع أنحاء العالم ويتم الحصول عليها من مصادر نباتية عديدة وتعتبر من

الناحية الغذائية أقل قليلا في قيمتها الغذائية من البروتينات النباتية ولكن التنوع الكبير بين مصادرهما المختلفة يمكن الحصول على خلطه متوازنة غذائيا تماثل في ذلك البروتينات الحيوانية الناتجة من اللحوم والأسماك والألبان والدواجن ومنتجاتها .

والمصادر الأساسية لإنتاج البروتين النباتي تتمثل في الآتي :

### ١- الحبوب Cereals

مثل القمح والشعير والأرز وهي عادة تستهلك مباشرة دون الحاجة الى تصنيع لإنتاج مركبات بروتينية ذات مواصفات معينة تكنولوجيا و غذائيا وتدخل في منتجات عديدة أهمها الخبز ومنتجات الحبوب المختلفة .

### ٢- البقول Legumes

وهي مصدر هام يحتوى على العديد من المواد الخام ذات البروتين الجيد ومن أمثلتها اللوبيا - الفاصوليا - الترمس - الحمص - فول الصويا .... وهي أيضا مثل أفراد المجموعة الأولى تستخدم مباشرة في إعداد وجبات مطهية جيدة وإن كانت طريقة الإعداد تختلف من مكان الى آخر في العالم وذلك حسب العادات الغذائية والتقاليد الدينية التي تلعب دورا أساسيا في كيفية إعداد الأغذية وأيضا تستخدم في إنتاج بعض المركبات البروتينية مثل الدقيق والبروتين المركز وفي بعض الأحيان البروتين المعزول .

### ٣- البذور الزيتية Oil Seeds

وهذا القسم من المواد الخام يعتبر ثنائي أو ثلاثي الغرض حيث يكون إنتاج الزيت هو الغرض الأساسي أما بقايا عملية التصنيع فإنها إما تستخدم في إنتاج مركبات بروتينية عالية القيمة الغذائية High Protein Components يستخدم بعضها في التغذية البشرية بصورة مباشرة أما المتبقى فإنه عادة ما يستخدم كمادة خام في تغذية الحيوان أو في تسميد الأرض الزراعية أو يجد استخداما صناعيا جديدا فيما يسمى بالإستخدامات الصناعية أو الغير غذائية Industrial or non Food Application .

من ذلك نجد أن هذا القسم من المواد الخام لا بد من التصنيع أولا حتى يتم الحصول على المواد البروتينية الصالحة للإستخدام البشرى وعموما يمكن إنتاج المركبات التالية منها وهي ما يطلق عليها (Vegetable Protein Products (VPPs) وهي :

### ١- الكسب Meal :

وهو المتبقى من معاملة البذور الزيتية بالعصر أو المذيب بغرض إنتاج الزيت وهي تمتاز بأنها ذات نسبة عالية من البروتين مقارنة بالمادة الخام الناتجة منها (عادة لا تقل عن

٤٥٪ بروتين) وأيضاً ترتفع بها نسبة الألياف الخام خاصة إذا لم تجرى عملية التقشير على البذور قبل إنتاج الزيت وفى بعض الحالات يستخدم الكسب مباشرة فى تغذية الحيوان كما هو الحال بالنسبة لكسب بذرة القطن . وعادة ما تكون استخدامات الكسب الغذائية تكون محدودة للغاية وبدرجة كبيرة خاصة فى حالة استخلاص الزيت بالعصر Expeller .

## ٢- الدقيق Flour :

وينتج أساساً من الكسب وذلك بعد عملية الطحن والنخل لزيادة تعميم الجزيئات وفصل الألياف مما يؤدي الى تحسين القيمة الغذائية ورفع نسبة البروتين الخام به وعادة تصل فى الدقيق الى ما بين ٥٥-٦٥٪ ويلاقى استخدامات كثيرة فى مجال التغذية البشرية كمادة خام عالية البروتين ويضاف الى العديد من الأغذية بغرض رفع محتواها من البروتين وتحسين قيمتها الغذائية وأيضاً الخواص الوظيفية Functional Properties (ربط الماء أو الدهن - الإستحلاب - الرغوة - تكوين الجيل والقوام المرغوب) للنتائج الغذائى النهائى .

## ٣- البروتين المركز Protein Concentrate

وهنا يستخدم الدقيق كمادة خام لإنتاج مركز البروتين وذلك عن طريق التخلص من المواد الكربوهيدراتية المتواجدة فى الدقيق بإحدى الطرق المعروفة وخاصة استخدام النظام الهوائى Air Classification وبذلك يمكن الحصول على مركبات عالية فى البروتين وأخرى متوسطة فى كل من البروتين والنشا والثالثة عالية فى محتواها من النشا والكربوهيدرات ومنخفضة فى البروتين ولكل منها استخداماتها الغذائية المعروفة وعموماً فإن مركز البروتين يجب ألا يقل محتواه من البروتين عن ٦٠٪ وتصل فى بعض الأحيان الى أقل من ٩٠٪ .

## ٤- البروتين المعزول Protein Isolates

ويستخدم أيضاً الدقيق كمادة خام لإنتاجه عن طريق الذوبان فى الوسط القلوى ثم الحصول على البروتين الذائب وترسيبه عند نقطة التعادل الكهربائى Isoelectric Point ثم غسله وتجفيفه والنتائج فى هذه الحالة يسمى Isoelectric Precipitated Protein Isolate وهناك طريقة أخرى لإنتاج البروتين المعزول عن طريق الذوبان فى وسط ملحي متعادل ثم التخفيف والتبريد لإنتاج مايسمى Micell Protein Isolates ولكل ناتج منهما خواصه المميزة والمختلفة عن الآخر لنفس المادة الخام وكذلك الاستخدامات وعموماً فإن البروتين المعزول يجب ألا تقل نسبة البروتين به عن ٩٠٪ .

. وهناك طرق تكنولوجية عديدة وشركات صناعية كثيرة لإنتاج مثل هذه المركبات على نطاق تجارى والعديد من هذه المركبات متواجدة فى السوق العالمى وذلك كما هو موضح فى الجدول (١) .

### Texturized Proteins - ٥

وهذه المركبات تنتج إما من الدقيق - البروتين المركز أو المعزول وذلك بعد المعاملة بجهاز خاص يسمى بـ Extruder وتعتمد فكرته على تعريض المادة الخام المعدل محتواها الرطوبى لدرجة حرارة مرتفعة وضغط فى المرحلة الأولى ثم قبل الخروج وعند فتحة الـ Die يقل الضغط بصورة فجائية فيحدث للمادة الخام انتفاخ وزيادة فى الحجم ويكون الناتج ذات مسام عديدة وقوام هش Sponge ويمكن إنتاج مركبات غذائية عديدة عن طريق هذا الجهاز وخاصة مشابهات اللحوم Meat Like Products .

### استخدامات البروتينات النباتية Applications of VPPs

يجرى استخدام البروتينات النباتية فى مجال الأغذية بغرض تحقيق هدفين أساسيين هما:

#### أ- غرض وظيفى Functional Application

وفى هذه الحالة تضاف الى الناتج الغذائى بغرض تحسين خاصية وظيفية معينة مطلوبة فى الناتج النهائى مثل تحسين القوام - ربط الماء وزيادة خاصية Water Holding Capacity أو الدهن Oil Holding Capacity أو الخواص الإستحلابية Emulsification Properties أو تحسين خواص الرغو Foaming Properties أو تكوين جيل Gel Formation ذات خواص مناسبة من ذلك نجد أنه يمكن استخدامها مع العديد من الأغذية Solid, Semi-Solid or Liquid Foods وفى هذه الحالة من الإستخدام يكون معدل الإضافة منخفض ويصل الى أقصى حد وهو ٥% على مستوى الناتج النهائى .

#### ب- غرض تغذوى Nutritional Purposes

وهنا يكون معدل الإضافة أكبر وذلك بغرض رفع وتحسين القيمة الغذائية للناتج النهائى أو إحلال جزء من الناتج مثل البروتين الحيوانى بالبروتين النباتى وأيضاً من الإستخدامات الغذائية للبروتينات النباتية تحسين مستوى الناتج من الأحماض الأمينية كما هو معروف عن إرتفاع قيمتها الغذائية High Nutritional Value من حيث معامل الهضم Corrected Amino Acids Score وذلك معترف به من FAO وهناك غرض تغذوى آخر وذات أهمية فى مجال التغذية البشرية ألا وهو استخدام البروتينات النباتية بغرض إنتاج أغذية منخفضة الطاقة Low or Reduced Energy Food وهذا مهم جدا فى مجال تغذية الفئات ذوى الإحتياجات الغذائية الخاصة ومرضى السمنة .

**Table (1) Utilization of vegetable protein products foods.**

Type of Vegetable Protein Products	Function	Major Applications
(1) Flour:	1- Bulking Agent	1- Bakery Products
	2- Increase Protein Content	2- Infant Foods & Pet Foods
(2) Concentrate	1- Emulsification Agent	1- Meat Products
	2- Water Retention	2- Vegetarian Products
	3- Mouth Feel	3- Processed Foods
	4- Increase Protein	4- Dressings
(3) Isolate	1- High Protein	1- Specialty (Health)
	2- Dispersibility	2- Infant Formula
	3- Hypoallergenicity	3- Meat Products
	4- Low Fat	4- Foods
	5- Emulsifying	5- Non Dairy Drinks & sports Drinks
(4) Texturized Proteins	1- Structure	1- Meat Products
	2- Water Retention	2- Vegetarian Products
	3- Meat Replacement	3- Sauces
	4- Protein Content	4- Pet Foods

ولكن من الناحية العملية عند استخدام البروتينات النباتية في الأغذية يصعب التفرقة والفصل بين الغرضين التغذوي والوظيفي لها في الناتج النهائي ولذلك اصطلح على استخدام المصطلح العلمي الجديد Nutrifunctionality وهذا المصطلح تم إقتراحه وتقديمه بواسطة الجمعية الفرنسية للبروتينات النباتية The French VPPs Association .

ويجب ألا تغفل الحالة الاقتصادية لعملية الإنتاج حيث أنها تحدد أي نوع من البروتين النباتي يمكن إنتاجه واستخدامه كذلك المنافسه بين البروتينات النباتية والحيوانية مثل بروتينات اللبن والبيض .

والجدول رقم (١) السابق يوضح المنتجات البروتينية النباتية المختلفة ووظيفتها والإستخدامات المختلفة لكل منها في الأغذية .

العوامل التي تحد من استخدام البروتينات النباتية في الأغذية :

هناك العديد من العوامل التي تعوق أو تحد من استخدام البروتينات النباتية في مجال الأغذية وهذه المعوقات يمكن إيجازها في الآتي :

١. القوانين والتشريعات الغذائية Food Legislation والتي تختلف من بلد الى آخر تحد كثيرا من استخدام مثل هذه المصادر في الأغذية (سواء كانت تشريعات قومية أو محلية أو عالمية) ويجب إعادة النظر في هذه التشريعات على المستوى المحلي والدولي بما

يسمح باستخدام أوسع لهذه المنتجات حيث حتى الآن الاستخدام الأكبر لها فى مجال تغذية الأطفال Infant Foods .

٢. الإهتمام بالناحية الصحية خلال مراحل الإنتاج Hygiene وذلك من حيث مذيئات الإستخلاص المستخدمة لإزالة الزيت وكذلك المستخدمة فى ذوبان واستخلاص البروتين وخاصة من حيث الشوائب المتواجدة بها وتأثيرها على جودة الناتج النهائى وخاصة بالنسبة لصحة المستهلك .

٣. الإهتمام بالناحية الميكروبيولوجية للناتج النهائى بما يضمن الحصول على منتج آمن غذائيا من الناحية الميكروبيولوجية خاصة المرضية (كذلك نواتج نمو الفطريات Mycotoxins بالمادة الخام قبل الإنتاج) .

٤. ضرورة إظهار وجود البروتينات النباتية بوضوح على العبوات وضمن مكونات المادة الغذائية .

### لماذا الإهتمام بالبروتينات النباتية Advantages of VPPs

لقد زاد الإهتمام فى الفترة الأخيرة بإنتاج البروتينات النباتية على مستوى العالم ويرجع الفضل فى ذلك الى إنتشار الأبحاث العلمية القيمة فى المجالات الأكاديمية والتطبيقية وكذلك تطور طرق البحث والتحليل فى مجال كيمياء البروتين (مجالات أكاديمية – تكنولوجيا الإنتاج والتصنيع والتداول والتخزين - النواحي التغذوية - النواحي الصحية).

وأياها هناك بعض النقاط والعوامل التى أدت الى دخول البروتينات النباتية دائرة الإهتمام العالمى وهى ذات تأثير موجب لصالح البروتينات النباتية وهى :

١. إمكانية إنتاج أغذية منخفضة الطاقة والدهن باستخدام البروتينات النباتية Low Fat and Low Caloric Food Production .

٢. تحول جزء كبير من سكان العالم فى عاداتهم الغذائية نحو المذهب النباتى Vegetarian Sector وذلك بعد الإقتراع بمدى الحالة الصحية للأغذية النباتية مقارنة بالأغذية الغير نباتية Non-Vegetarian Foods .

٣. زيادة الإهتمام لدى الأفراد باستخدام مصادر بروتينية غير حيوانية فى الوجبات الغذائية بسبب زيادة الوعى الغذائى والصحى على مستوى العالم .

٤. الحساسية الغذائية لبعض الأغذية الحيوانية مثل اللبن لدى بعض الأفراد على مستوى العالم يجعل البديل لذلك هو الإقبال على البروتينات النباتية كحل لهذه المشكلة .

٥. الأبحاث العلمية فى مجال التغذية أظهرت النتائج الآتية بالنسبة لمركبات فول الصويا .

بحث منشور في مجلة إنجليزية عام ١٩٩٥ New England Journal of Medicine بعنوان "Meta Analysis of the Effects of Soy Protein Intake on Serum Lipids" والتي أوضحت أن استهلاك بروتينات فول الصويا في الغذاء كان مرتبط بانخفاض واضح وملحوظ في محتوى الدم من الكوليسترول وخاصة النوع منخفض الكثافة Low Density Lipoprotein (LDL) وهو المرتبط أساسا بأمراض القلب وتصلب الشرايين الدموية .

وعموما فإن موجز نتائج هذه الدراسة يمكن تحديده في النقاط الآتية :

١. نتائج الدراسات الوبائية تقترح بوجود علاقة بين استهلاك فول الصويا وانخفاض معدل خطر الإصابة بالسرطان Reduced Cancer Risk .
  ٢. إحتواء فول الصويا على عديد من المركبات التي لها تأثير مانع للسرطان وذلك من نتائج الدراسة على الأنسجة والخلايا الحيوانية والبشرية Anti-Cancer Effect .
  ٣. الدراسة تجرى الآن على عزل هذه المكونات وتحديد دورها المانع للسرطان بالنسبة للأنسجة الحيوانية والخلايا البشرية .
- كل ما سبق من عوامل ودراسات لا شك أنها سوف تؤدي الى زيادة فرص الإهتمام بالبروتينات النباتية من أجل استخدامها في أغذية صحية وأمنة Healthy and Safe Foods وذلك من أجل حياة صحية سعيدة للجميع .

### التركيب البروتينية Protein Structure

من المعروف أن جزيء البروتين يتكون من ارتباط الأحماض الأمينية مع بعضها البعض عن طريق ما يسمى بالرابطة الببتيدية Peptide Bond بين مجموعة الكربوكسيل -COOH من حمض أميني مع مجموعة -NH<sub>2</sub> من الحمض السابق له ويخرج بذلك جزيء واحد من الماء لكل رابطة ببتيدية واحدة وعموما فإن الأحماض الأمينية Amino Acids المتواجدة في الطبيعة لايزيد عددها عن ٢١ حمض أميني وتتكون البروتينات المختلفة من ارتباط هذه الأحماض معا وبترتيب الأحماض الأمينية في السلسلة الببتيدية Peptide Chain تختلف خواص البروتين الناتج ومن ذلك نجد أنه يمكن الحصول على أنواع عديدة جدا من البروتينات مختلفة الخواص .

### تقسيم الأحماض الأمينية Amino Acid Classification :

هناك عدة تقسيمات ومنها :

أ- التقسيم على أساس المجموعة الجاتبية والشحنة الكهربائية وذلك الى :

١- أحماض أمينية (ذات سلسلة جانبية R) قطبية لا تحمل شحنات كهربية ؛ Lysine, Serine, Theronine, Cysteine, Cystine, Tyrosine, Asparagine, and . Glutamine. (Hydrophilic (A.A).

٢- أحماض أمينية ذات سلسلة جانبية R غير قطبية لا تحمل شحنات كهربية مثل؛ Alanine, Valine, Leucine, Isoleucine, Phenylalanine, Tryptophan, and .Methionine. (Hydrophobic A.A)

٣- أحماض أمينية ذات شحنة سالبة مثل؛ Aspartic Acid, Glutamic Acid

٤- أحماض أمينية ذات شحنة موجبة مثل؛ Lysine, Arguinine, Histidine

٥- Amino Acids مثل؛ Proline and Hydroxyproline

ب- التقسيم على أساس المجاميع الفعالة سواء كانت -OH -SH .

ج- التقسيم على أساس وجود التراكيب الحلقية Aromatic and Aliphatic .

د- التقسيم على أساس الناحية الغذائية ومقدرة الجسم على تخليقها من المصادر البروتينية الداخلة اليه في الوجبات الغذائية المختلفة وذلك الى أحماض أمينية أساسية وأخرى غير أساسية .

والجدول التالي (٢ ، ٣) يوضح بعض الخواص الطبيعية والكيمائية للأحماض

الأمينية المختلفة لأن ذلك له تأثير مباشر وكبير على خواص البروتين .

### ١- التركيب الأولي للبروتين Primary Structure

يطلق ذلك على إرتباط الأحماض الأمينية مع بعضها البعض وتتابعها في صورة سلسلة خطية طويلة Sequence of Linear Amino Acids . وهناك بعض البروتينات تم معرفة ترتيب أحماضها الأمينية أى التركيب الأولي لها .

### ٢- التركيب الثانوي Secondary Structure

في حالة التركيب الأولي يزداد طول سلسلة جزىء البروتين بزيادة عدد الأحماض الأمينية الداخلة في تكوينها وكذلك يكون رفيع Long and Thin Molecule ولكن في الحقيقة يحدث ترتيب للسلاسل البيبتيدية في شكل ثلاثى الأبعاد Three Dimensional وأوضح مثال لهذا التركيب هو  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Structure وتلعب الروابط الهيدروجينية دورا أساسيا في ثبات هذه الصورة من تراكيب البروتين وهذا الشكل له أقل طاقة حرة دليل على زيادة الثبات مما يمنع أو يحد من تفاعل المجاميع الجانبية مع مكونات المحلول المحيط ويقلل بذلك الذاتية مع ملاحظة أن بعض الأحماض الأمينية مثل Leucine, Isoleucine

لاتدخل فى تكوين  $\alpha$ -Helix أما حمض Proline فإنه يودى الى ظهور التواء فى تركيب  $\alpha$ -Helix .

### ٣- التركيب الثالثى Tertiary Structure

وهذا يطلق على الترتيب والشكل الذى يأخذه أجزاء كبيرة من سلاسل البروتين وهذا يشمل لف أو طى Folding وحدات متناظرة من التركيب الثانوى Helix أو مناطق لا يوجد فيها مثل هذا التركيب وذلك حسب تتابع الأحماض الأمينية فى السلسلة البيبتيدية وعموما فإن طول الجزىء المحتوى على  $\alpha$ -Helical,  $\beta$ -Structure يودى الى ظهور تركيب ثالثى محدد ومميز وهناك العديد من الروابط المسنولة عن ثبات التركيب الثانوى والثالثى لجزىء البروتين موضحة فى الشكل (١، ٢) وهى :

- ١- الروابط الهيدروجينية Hydrogen bonds
- ٢- الشحنات الكهربائية Electrostatic interaction
- ٣- الروابط المحبة للسائل Hydrophobic interaction
- ٤- الروابط ثنائية القطب Dipole-dipole interaction
- ٥- الروابط ثنائية الكبريت Disulphide linkage

والبروتينات التى تم دراسة التركيب الثالثى لها أوضحت أن S-S تعتبر أهم الروابط المسنولة عن ثبات هذا التركيب أيضا فإن المجاميع الغير قطبية تميل عادة لأن تكون مدفونة فى داخل الجزىء Interior structure أما المجاميع القطبية فإنها تكون على السطح الخارجى المقابل للمذيب وذلك ينعكس على خواص البروتين وخاصة الذوبان .

## Structures of the Most Abundant Species of L-Amino Acids at pH 6-7.

Polar-uncharged R groups		Nonpolar R groups	
Name	Structure	Name	Structure
Glycine	$\begin{array}{c} +\text{NH}_3 \\   \\ \text{H}-\text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$	Alanine	$\begin{array}{c} +\text{NH}_3 \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$
Serine	$\begin{array}{c} +\text{NH}_3 \\   \\ \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$	Valine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad +\text{NH}_3 \\ \diagdown \quad   \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Threonine	$\begin{array}{c} +\text{NH}_3 \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COO}^- \\   \\ \text{OH} \end{array}$	Leucine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad +\text{NH}_3 \\ \diagdown \quad   \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Cysteine	$\begin{array}{c} +\text{NH}_3 \\   \\ \text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$	Isoleucine	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad +\text{NH}_3 \\   \quad   \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$
Cystine	$\begin{array}{c} +\text{NH}_3 \\   \\ \text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\   \quad +\text{NH}_3 \\ \text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$	Phenylalanine	$\begin{array}{c} +\text{NH}_3 \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$
Tyrosine	$\begin{array}{c} +\text{NH}_3 \\   \\ \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$	Tryptophan	$\begin{array}{c} +\text{NH}_3 \\   \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\   \\ \text{H} \end{array}$
Asparagine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad +\text{NH}_3 \\   \quad   \\ \text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$	Methionine	$\begin{array}{c} +\text{NH}_3 \\   \\ \text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$
Glutamine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad +\text{NH}_3 \\   \quad   \\ \text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$		





## : Reactive Groups in Protein Molecule المجاميع الفعالة فى جزىء البروتين

نظرا لإختلاف التركيب الكيماوى للأحماض الأمينية وخاصة تركيب وخواص المجموعة الجانبية وهى ماتعرف بـ R-group وكذلك إختلاف ترتيب وتتابع هذه الأحماض فى جزىء البروتين كل ذلك يؤدى الى وجود العديد من المراكز النشطة والمجاميع الفعالة والتي يدخل بها جزىء البروتين فى كثير من التفاعلات الكيماوية والبيولوجية المختلفة ويمكن حصرها فى الآتى :

### ١- مجموعة الأمين $\text{NH}_2$

وهى متواجدة فى جميع الأحماض الأمينية واليها يرجع تسميتها وهى فى معظم الأحوال تحمل شحنة كهربية موجبة ولها تأثير قلوئى؛  $\text{P}_k \text{NH}_2 = 9.5$   $\text{P}_k \text{NH}_2 = 8$  ، وتلعب دورا كبيرا فى تفاعلات التعديل الكيماوى للبروتين **Chemical modification of protein** .

### ٢- مجموعة الكربوكسيل $\text{COOH}$ :

بالنسبة لحمضى **Aspartic & Glutamic** فإنهما يحتويان على مجموعتى كربوكسيل وهى تحمل شحنة كهربية سالبة ، وهى تعتبر مراكز ومصدر الشحنات السالبة فى جزىء البروتين وتفاعلها حامضى  $\text{P}_k = 4.5-5.0$  وهى تدخل فى التعديل الكيماوى من خلال تفاعلات الأسترة **Esterification** تحت ظروف تفاعل معتدلة **Mild reaction conditions** ويمكن أن تتحول الى مجموعة **Amides** عن طريق التفاعل مع الأمينات .

### ٣- مجموعة Guanidine group :

وتتواجد فى الحمض الأمينى **Arginine** ولها تأثير قلوئى قوى  $\text{P}_k = 12.0$  وتظل محملة بشحنة كهربية موجبة فى الصورة الـ **Protonated form** ماعدا الوسط شديد القلوية وتمتاز بمقاومتها لمعظم المعاملات الكيماوية .

### ٤- مجموعة الفينول **Phenolic group** :

تتواجد فى حمض التيروسين ولها أهمية خاصة فى تحديد وظيفة وتركيب وبناء جزىء البروتين وتقبل الكثير من المعاملات الكيماوية المتبعة فى تعديل البروتين سواء كان ذلك بالنسبة لمجموعة الأيدروكسيل **OH** والتي تدخل فى تفاعلات **Acylating & Alkylating** أما بالنسبة لحلقة البنزين فإنها تكون قابلة للإحلال بواسطة **Electrophilic reagents** وتزداد قوة كلا التفاعلين فى الوسط القلوئى وعادة ما يصاحب تعديل هذه المجموعة أو اشتراكها فى التفاعلات الكيماوية تغير واضح وملحوظ فى معدل إمتصاص

البروتين للأشعة الضوئية في المنطقة فوق بنفسجية (Ultraviolet region) وتستغل هذه الظاهرة في بعض التقديرات الكمية للبروتين أو متابعة Monitoring معدل اشتراك هذه المجموعة في تعديل البروتين كيمائياً.

#### ٥- مجموعة Imidazol group :

وهي متواجدة في حمض الـ Histidine ولها تأثير مباشر ودور كبير في الفعل المساعد لجزء البروتين Catalytic function تأثيرها قلوئى خفيف أو ضعيف  $Pk = 6.5$  وتدخل في تفاعلات كثيرة مثل Electrophilic Reagents & Acylation-Alkylating .

#### ٦- مجموعة الإندول Indol group :

تتواجد أساساً في تركيب المجموعة الجانبية R لحمض Tryptophan ولها خاصية الإمتصاص الضوئى أيضاً مثل مجموعة الفينول المتواجدة في التيروسين وهي تمتص الأشعة فوق بنفسجية بشدة عند طول موجه مقداره 280 nm وهي متفاعلة نسبياً ولكن وجودها في التركيب الداخلى لجزء البروتين يجعلها محمية Protected من التعرض والتفاعل مع مكونات الوسط المحيط بها أى أنها تكون مدفونة Buried مع المجاميع الغير قطبية الأخرى داخل الجزيء .

#### ٧- مجموعة السلفاهيدريل Sulfhydryl group :

وهي مجموعة كيميائية قوية وشديدة النشاط وتتفاعل مع العديد من المواد الكيميائية مثل؛ Alkylating reagents وترتبط أيضاً مع العديد من أيونات المعادن الثقيلة ويسهل أكسدتها باستخدام العوامل المؤكسدة البسيطة حيث تتحول الى ثنائى الكبريت S-S وتتواجد أساساً في حمض Systeine .

#### ٨- مجموعة ثنائى الكبريت Disulfide group :

وهي تتواجد في حمض Systeine ويسهل كسرها Cleavage واختزالها بواسطة المواد المختزلة متوسطة القوة مثل؛ Thioglycolate &  $\beta$ -mercaptoethanol ، وتتحول الى مجموعة السلفاهيدريل السابقة ويتم تقديرها باستخدام Ellmans reagent ((5,5-Dithiobis (2-Nitrobenzoic acid)). ويشترط توفر تركيز عالى من اليوريا (8M) في وسط التفاعل أو Guanidine-HCl وذلك حتى يتم الإختزال الكامل لها وأيضاً يمكن كسر هذه الرابطة باستخدام مركبات السلفيت ( $SO_3$ ) .

## ٩- مجموعة Thioether

وتتشابه في كثير من خواصها مع المجاميع Methionine وهي متواجدة في المجموعة الجانبية لحمض 1-14 pH حيث تبقى غير متأينة على مدى كبير من درجات الحموضة Hydrophobic الغير قطبية الأخرى لجزء البروتين وتظهر Unfolding ويزداد قابليتها للتفاعل في الوسط الحامض القوي حيث يحدث ١٤ في حالة Partial unfolding بعده على السطح الخارجى ويستخدم فوق أكسيد الأيدروجين لعمل ذلك عند تعديل حمض الميثونين اختياريًا SH. البروتينات الغير محتوية على مجاميع السلفاهيدريل .

### البروتينات النباتية التخزينية :

عادة يتم تراكم وتخزين البروتين المتكون خلال مراحل النمو المختلفة للمصادر النباتية مثل الحبوب والبقول والبذور الزيتية في صورة يطلق عليها البروتين المخزن Storage Protein حيث تعتبر المادة الأساسية لإنتاج الصور المختلفة للمركبات البروتينية دقيق مركز البروتين .

وعموما معظم هذه البروتينات يكون السائد فيها هو 11 S Fraction حسب معامل الترسيب المقدر بواسطة طريقة الطرد المركزي العالى Ultracentrifugation وهي تتبع قسم الـ Globulins وأكثرها يتبع مجموعة Globular proteins ويكون معامل الترسيب لها متراوح بين 11-13 S والوزن الجزيئى أو ما يسمى Molar mass فى المدى من 300-360 kD وعموما فإن هذه البروتينات عادة ما تشترك فى الخواص والصفات التالية :

١. تتكون من وحدات بيبتيدي Peptide Units فى حدود 50-60 kD وكل منها يحتوى على حوالى 30-40 (α) acidic kD ، حوالى 20(β) basic kD .

٢. عادة ما يكون لها التركيب Oligomeric structure .

٣. يكون الإرتباط بين وحدات الببتيد عادة من خلال روابط S-S Bridges .

٤. يوجد تشابه كبير بينها فى تتابع وتوالى الأحماض الأمينية المكونة لوحداتها Amino Sequence Acids بين المصادر المختلفة .

٥. وجود تشابهه وتقارب كبير بينها فى كثير من الخواص الطبيعية الكيماوية Physicochemical Properties .

٦. أيضا هناك تقارب وتشابهه فى كل من Secondary and Quaternary Structure .

٧. يمكن بدرجة كبيرة تحسين كثير من خواصها الوظيفية من خلال عمليات التعديل الكيماوى  
Chemical Modification Treat. وهى التى تشترك أو تدخل بصورة أساسية فى  
المعاملات المختلفة لتعديل البروتين .

### تعديل البروتين Protein Modification

هناك أغراض كثيرة يجرى تعديل البروتين من أجلها بعضها يتعلق بالدراسة  
الأكاديمية أو التغذية والطبية وكذلك الأغراض الصناعية وعموما يمكن إيجاز تلك الفوائد  
فيما يلي :

١. دراسة ومعرفة التركيب الكيماوى والفراغى للبروتين and Chemical Conformation Structure .
  ٢. دراسة ومعرفة النشاط البيولوجى لأنواع معينة من البروتين مثل الإنزيمات وكذلك  
الهرمونات Bioactive Proteins .
  ٣. إدخال مجاميع كيماوية جديدة الى جزيء البروتين أو إزالة مجاميع أخرى بمعنى زيادة أو  
نقص جزء Hydrophilic or Hydrophobic region .
  ٤. زيادة معدل الـ Immunogenicity وذلك بإدخال مجموعات كيماوية ترتبط مع البروتين  
Conjugated proteins حيث تزيد معدل إفراز وتكوين الأجسام المضادة عند حقنها  
داخل جسم الكائن الحى وتسمى هذه المجموعة باسم Hapten وهذه المركبات تزيد من  
القوة المناعية للجسم (زيادة كفاءة الـ Antigen) .
  ٥. تستخدم البروتينات المعدلة فى نقل وحمل المواد النشطة للأدوية والمستحضرات الطبية  
فى صورة أدوية علاجية .
  ٦. إزالة المرارة والمواد المسئولة عن الحساسية الغذائية فى بعض المصادر البروتينية .
  ٧. تستخدم فى مجال الصناعات الغذائية لإنتاج بروتينات ذات خواص وظيفية محددة تتناسب  
مع الغذاء والإستخدام النهائى Tailored Proteins .
  ٨. لإنتاج مواد Biodegradable تستخدم فى مجالات صناعية عديدة منها على سبيل المثال  
مواد التعبئة والتغليف وأفلام التصوير وذلك لإيجاد استخدام لبعض المصادر البروتينية  
عديمة الإستفادة مثل بروتينات القمح والذرة وهى لها مستقبل كبير فى الأعوام القادمة .
- وعموما فإن الشكل التالى (٣) يوضح المجاميع الفعالة المختلفة والتى تدخل فى  
تعديل البروتين كيماويا .

وهناك عدة طرق تستخدم فى تعديل البروتين ويمكن تقسيمها الى ثلاثة أقسام رئيسية وهى:

١. التعديل بالطرق الطبيعية Physical Modification Methods .

٢. التعديل بالطرق الإنزيمية Enzymatic Modification Methods  
 ٣. التعديل بالطريقة الكيماوية Chemical Modification Methods

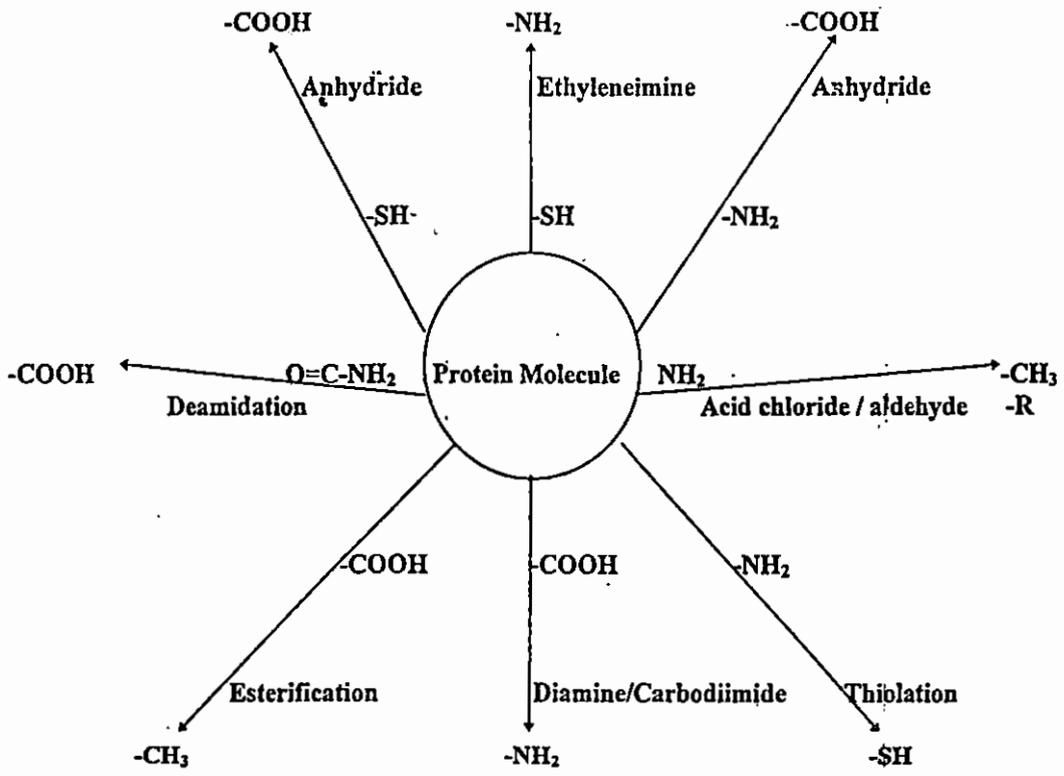


Fig.(3) Active groups in protein molecule involved in chemical modification.

هذا ويقع تحت هذه الأقسام الرئيسية العديد من الطرق :

• الطرق الطبيعية :

١. المعاملات الحرارية البسيطة Simple Heat Treatments
٢. الضغط العالي High Pressure
٣. المعاملات الميكانيكية مثل Ball Milling

وهي تشمل تغيرات في الشكل الفراغي ويجب تحديد أنسب العوامل للحصول على بروتين معدل بخواص معينة مرغوبة وهي تستخدم بكثرة في مجال تكنولوجيا الأغذية والتغذية وهي عادة لا تعدو عملية دنثرة للبروتين .

### \* الطرق الإنزيمية

وهي تشمل استخدام الإنزيمات المحللة للبروتين مثل Pepsin, Trypsin ويجب التحكم في معدل التحلل للحصول على Polypeptide Fragments ذات خواص محددة مرغوبة تناسب الغرض من إنتاجها وهي مثل الطرق الطبيعية تعتبر أكثر أماناً في إنتاج بروتينات معدلة تستخدم في مجال التغذية والصناعات الغذائية .

### \* الطرق الكيماوية

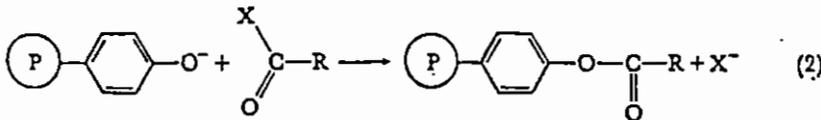
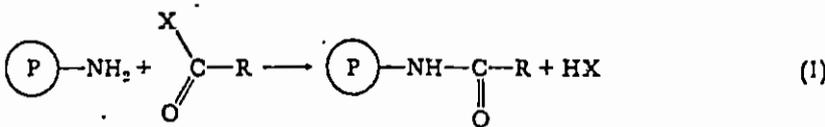
وهذه الطرق تستخدم بدرجة كبيرة في المجالات الصناعية ونواتجها عادة تستخدم في المجالات الغير غذائية Non Food Application وذلك راجع للتأثير الضار لبعض المواد الكيماوية المستخدمة على صحة الإنسان .

وسوف نتعرض لبعض هذه الطرق بشيء من التفصيل وهي :

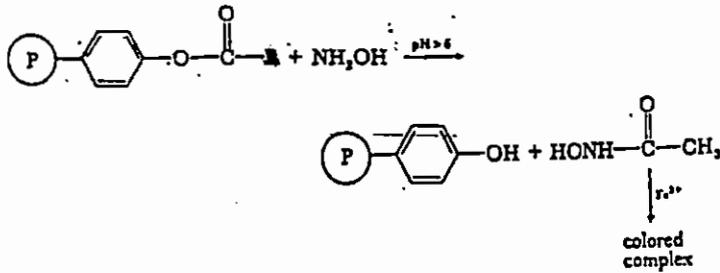
١. المعاملة مع حمض الخليك اللامائي Acetylation
٢. المعاملة مع حمض السكسينيك اللامائي Succinylation
٣. المعاملة مع حمض الفوسفوريك Phosphorylation
٤. التفاعل مع الدهون الغير مشبعة ومشتقات أكسدتها Reaction with unsaturated  
. lipid oxidized products

### التفاعل مع حمض الخليك اللامائي Acetic acid anhydride : Reaction with

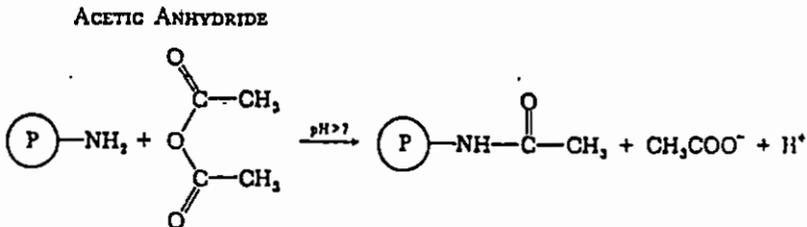
هذا التفاعل وغيره من الـ Acylation Reagent تؤدي الى إضافة مجموعة كربونيل الى جزيء البروتين وهو يتبع تفاعلات الإضافة كما هو موضح في المعادلة العامة التالية



ويلاحظ أن كل من مجموعتي الأمين وكذلك الفينول المتواجدة على حمض الثيروسين يدخلان في هذا التفاعل ولكن مجموعة الأمين تكون أسرع بكثير من مجموعة الفينول بالإضافة الى أن نواتج تفاعل مجموعة الفينول تكون سهلة وسريعة التحلل وعموماً يكون تعديل هذه المجموعة (الفينول) مصحوباً بانخفاض شديد في درجة الإمتصاص الضوئي عند طول موجه مقداره 278 nm حيث يستغل ذلك في تقدير نسبة مجاميع الفينول المعدلة كيميائياً باستخدام جهاز الـ Spectrophotometer وبذلك يمكن التفرقة بين تعديل مجموعة الفينول والأمين حيث أن تعديل مجموعة الفينول يكون عكسي في كثير من الأحوال Reversed Modification حيث ينحل المركب في وسط متوسط القلوية Moderately Alkaline Condition وأيضا يمكن كسره في الوسط المتعادل بالتعرض لمركب الهيدروكسيل أمين  $NH_2OH$  وهذه العملية يطلق عليها Deacylation حيث يصاحب ذلك ارتفاع ملحوظ في المقترنة على إمتصاص الضوء عند نفس طول الموجة 278 nm حيث يتكون مول واحد من مركب Acetylhydroxamate عند التفاعل مع Hydroxylamine والمركب الناتج عند تفاعله مع الحديد يعطى لون Purple يمكن قياسه كميًا على طول موجه مقداره 540 nm كما هو موضح في المعادلة التالية :



والتفاعل التالي يوضح تعديل مجموعة الأمين في جزيء البروتين عند تفاعلها مع حمض الخليك اللامائي Anhydride Acetic Acid .



ومن هذه المعادلة يمكن أن نستنتج ما يلي :

١. المعاملة مع حمض الخليك تؤدي الى تعادل شحنة مجموعة الأمين الموجبة معنى ذلك أن الشحنة الكهربائية النهائية لجزء البروتين تكون متعادلة (٠ → +١) .

٢. لا يحدث أى تغير فى الروابط الألكترولستاتيكية Electrostatic Relationship على جزىء البروتين .

٣. لا يصاحب تلك المعاملة أى تغير فى التركيب الفراغى Conformational Structure . Changes

٤. لا يحدث تكسير Dissociation للبروتين بعد التعديل بحمض الخليك الى وحدات أصغر .

٥. عادة لا يصاحب ذلك التعديل تغير واضح فى خواص البروتين المختلفة .

ومن ذلك يمكن القول بأن التعديل الذى يحافظ على الشحنة الموجبة أو لا يغير من توازن الشحنات الكهربائية أو الحالة الأيونية المسئولة عن ثبات البروتين لا يكون له تأثير واضح على تغير خواص البروتين بصفة عامة وذلك على عكس المعاملة بحمض Succinic الذى يصاحبه تغير الشحنة الموجبة الى السالبة واختلال فى التوازن الكهربى يصاحبه تغيرات كثيرة وواضحة فى معظم الخواص .

ويجب ملاحظة أن هناك بعض المواد الكيماوية الأخرى لها نفس الفعل مثل حمض الخليك Acetylation Reagent يصعب استخدامها مثل Acetylchloride وذلك للأسباب التالية :

١. بعضها يمتاز بانخفاض نقطة الغليان .

٢. شدتها التفاعلية Highly Reactive .

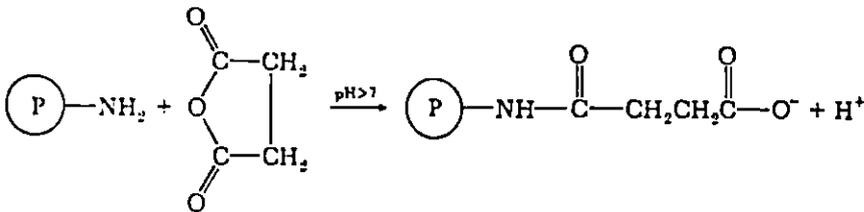
٣. ليس لها ميزة واضحة مقارنة بالأحماض اللامائية .

هذا ولا تستخدم الأحماض العضوية طويلة السلسلة فى مثل هذه التعديل لما يلي :

١. كفاءتها التفاعلية أقل Low Reactive .

٢. انخفاض ذائبيتها Low Solubility .

### المعاملة بحمض السكسينيك اللامائى Succinic Anhydride Treatment : SUCCINIC ANHYDRIDE



هذا التفاعل فى مجال تعديل البروتين يطلق عليه Succinylation وهى مثل المعادلة بحمض الخليك حيث تدخل فى هذه التفاعل مجموعة الأمين بالدرجة الأولى وكذلك مجموعة Tyrosyl فى حمض الثيروسين تحت ظروف معينة ولكن عادة بعد تعديل مجموعة الأمين أولا أما باقى المراكز الفعالة السابق ذكرها فى جزئى البروتين فإنها إما أن يكون معدل تفاعلها بسيط جدا وغير مؤثر أو فى بعض الأحيان يكون الناتج غير ثابت ويتم تحلله مثال على ذلك ما يلى :

١- عند تعديل بقايا Residue كل من Hestidine, Systeine يصعب ملاحظتها لأن الناتج يتحلل فى الوسط المائى للتفاعل .

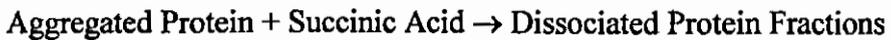
٢- مجاميع الأيدروكسيل فى كل من حمض Serine, Methionine من الصعب جدا أن تتفاعل أو يحدث لها تعديل بهذه الطريقة .

وبالرغم من تشابه هذا التفاعل مع معاملة حمض الخليك إلا أن خواص البروتين بعد التعديل تختلف ومن معادلة التفاعل السابقة نجد أن المعاملة مع حمض الـ Succinic يؤدي الى ما يلى :

١. تحويل الشحنة الموجبة لمجموعة الأمين الى السالب كمحصلة نهائية ويكون صافى الشحنة السالبة بمعدل شحنة واحدة لكل مجموعة أمين (١- → ١+) معدلة .

٢. تغير الشحنات الكهربائية من الموجب الى السالب يؤدي الى تغير كبير فى توازن القوى الكهربىة المسؤولة عن ثبات البروتين Electrostatic Relationship .

٣. بسبب ذلك أيضا يحدث لجزئى البروتين تحلل Dissociation وخاصة إذا كان هناك حالة من Aggregation أيضا يحدث تحلل لـ Subunits ويمكن تبسيط ذلك فى المعادلة التالية :

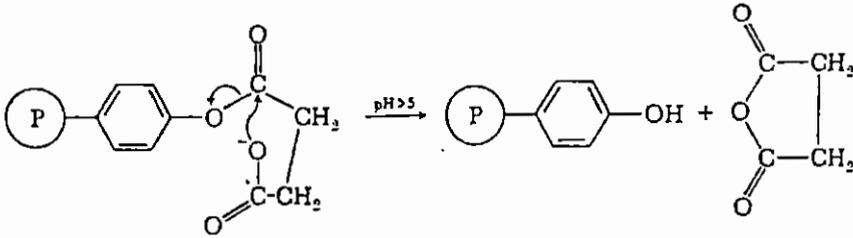


٤. بناء على ماسبق من تغير الشحنة النهائية بعد معاملة التعديل يحدث أيضا تغيرات فى التركيب الفراغى Conformational Change وهذا بدوره تتعكس على الخواص المختلفة للبروتين المعدل .

٥. عادة ما يكون الناتج المعدل أكثر ذاتية من المركب الأسمى ولذلك غالبا ما تفضل هذه المعاملة عن معاملة Acetic Anhydride .

أما O-Succinyltyrosine والمقصود بها هو التفاعل مع مجموعة الفينول لحمض الثيروسين والتي تحدث غالبا بعد تعديل جزء كبير من مجاميع الأمين أولا ولكن يحدث لها

عادة وبسرعة إعادة الى الوضع الأصلي قبل التعديل خاصة فى حالة إرتفاع رقم الحموضة عن 5 أى غير ثابتة كما هو موضح فى المعادلة التالية :



### التعديل بالفسفرة Phosphorylation

الغرض منها هو إدخال مجموعة البيروفوسفات فى التركيب الجزيئى للبروتين وتم التفكير فى ذلك بالنسبة للبروتينات النباتية وذلك بغرض محاكاة الكازين وهو البروتين الحيوانى المعروف بمحتواه العالى من الفوسفور وأيضا كثير من خواصه التغذوية والوظيفية على درجة عالية من الجودة ولكن وجد إختلاف كبير فى خواص البروتين النباتى المفسفر Phosphorylated Plant Protein وذلك حسب طريقة الفسفرة نفسها وهى :

#### ١- الفسفرة الأنزيمية Enzymatic Phosphorylation

ويستخدم فيها مادة ATP (Adinozinetriphosphate) كمصدر لمجموعة الفوسفات المطلوب إدخالها الى جزئى البروتين وإنزيم Catalytic Subunit of a AMP dependent Protein Kinase (cAMPdPK) والتحضيرين على درجة ٣٧م وتحسنت الخواص الوظيفية التالية بعد المعاملة الإنزيمية :

١. زيادة الذوبان Solubility خاصة على مدى pH 3-8 .
٢. تحسين خواص الخفق Whippability Properties .
٣. تحسين الخواص الإستحلابية Emulsification Properties .
٤. تحول فى نقطة التوازن الكهربى الى الوسط الحامضى .
٥. زيادة فى المقدرة على إمتصاص الماء Moisture Sorption .

ولكن هناك بعض العوامل التى تحد من استخدام الفسفرة الإنزيمية وهى :

\* إرتفاع سعر مادة التفاعل ATP وكذلك الإنزيم نفسه cAMPdPK يحد من استخدام هذه الطريقة على النطاق التجارى والتطبيقي.

\* وجد أن الإنزيم يكون نشط وفعال تجاه الحمض الأمينى Serine والذى يتواجد بعد حمض أمينى واحد أو اثنين على الأقل من حمض أمينى قاعدى -Arg-Arg-X-Ser, and Lys-

Arg-X-Serine حيث X تمثل أى حمض أميني معنى ذلك أن عملية الفسفرة تكون محدودة للغاية ولم تصل الى أكثر من ٢٥٪ من المواقع الممكن فسفرتها بالنسبة للبروتين الرئيسي فى فول الصويا Glycinin وهذا بالتالى يعنى أن معدل التحسن فى خواص الناتج تكون محدودة.

## ٢- الفسفرة الكيماوية Chemical Phosphorylation

ويطلق عليها أيضا الفسفرة باستخدام (Phosphorous oxychloride (POCl<sub>3</sub>) وتجري بالدرجة الأولى لاستخدام ناتجها فى مجالات صناعية غير غذائية Industrial non-food applications حيث يتم إضافة محلول الفوسفات الى البروتين نقطة Dropwise على درجة حرارة منخفضة أقل من ٥ مئوية فى حمام ثلجى Ice bath مع مراعاة أن يظل رقم الحموضة فوق ٩ pH وفى نهاية الإضافة يضبط رقم الحموضة الى ٧ قبل إجراء عملية الـ Dialysis والحصول على البروتين المعدل بواسطة Lyophilization ولقد أوضحت نتائج الفسفرة الكيماوية مايلى :

١. انخفاض فى خواص الذوبان خاصة على درجات الحموضة المنخفضة .
٢. تحول نقطة التوازن الكهربى ناحية الوسط الحامضى لارتباط مجموعة الفوسفات سالبة الشحنة بجزء البروتين .
٣. تحسن فى خواص الرغوة وكذلك الخواص الإستحلابية للبروتين المفسفر .
٤. ظهور Crosslinking وتجمع لجزينات البروتين مكونا Aggregates .
٥. ارتفاع لزوجة البروتين المعدل وذلك بسبب الـ Crosslinking أيضا .
٦. إمكانية إدخال مجموعات أكبر من الفوسفات لجزء البروتين مقارنة بالفسفرة الإنزيمية .

ولكن يعيب الفسفرة الكيماوية مايلى :

١. نقص أو ضعف التخصص فى التفاعل الكيماوى حيث يمكن ربط مجموعة الفوسفات مع مجموعة الأمين C-N-P أو مع مجموعة الكربوكسيل C-O-P وهى الصورة الأكثر ثباتا.
٢. التفاعل يتم بشدة وقوة Violently ويتكون غاز HCl الخائق والسام .
٣. ظهور التفاعلات الجانبية وتكون Crosslinking .

من ذلك نجد أن فسفرة البروتين لاتزال فى حاجة الى المزيد من الدراسة والبحث وذلك للوصول الى أفضل الطرق الآمنة والتي يمكن أن تستخدم على نطاق تجارى بدون أى مشاكل صحية أو تشريعية .

## التفاعل مع الدهون ونواتج أكسدتها Interaction with lipids

من المعروف أن ارتباط وتفاعل البروتين مع المكونات الدهنية ينتج عنه مركب جديد يعرف باسم البروتينات الدهنية أو Lipoproteins وهي ذات أهمية فسيولوجية كبيرة في داخل الأنظمة البيولوجية المختلفة حيث يتم نقل الدهون ومشتقاتها الى الأجزاء والأنسجة الحية المختلفة من خلال هذا المركب ويتم الإرتباط عن طريق المجاميع الوظيفية والفعالة ومراكز التفاعل المتواجدة في جزئى البروتين Functional groups & reactive centers .

وعموما فإن الدهون وخاصة الغير مشبعة منها Unsaturated lipids تلعب دورا هاما وحيويا في تعديل خواص البروتين وذلك لما تعانیه من تغيرات كيميائية مختلفة خلال مراحل الأكسدة ويتوقف معدل التغير في خواص البروتين على نوعية ودرجة الأكسدة وكذلك نواتج الأكسدة وأيضا درجة الحرارة ومدى توفر الرطوبة المناسبة والهواء .

ويجب أن يؤخذ في الإعتبار أيضا أن مثل هذه التغيرات تحدث تقريبا في جميع الأغذية المحتوية على الدهن ولو بكميات بسيطة وذلك خلال مراحل التصنيع المختلفة وأيضا أثناء التخزين ولكن المحصلة النهائية على تعديل البروتين تتوقف على الظروف المتبعة أثناء التصنيع وكذلك التخزين وخاصة في حالة توفر الظروف المناسبة والمشجعة على أكسدة الدهن أدى الى زيادة معدل التغير في خواص البروتين وفي المراحل المتقدمة من الأكسدة يكون لها تأثير غير مرغوب على خواص البروتين والتغذية والوظيفية Nutritional and Functional Properties وأيضا الخواص العضوية الحسية مما يؤدي الى رفض استخدامها في مجال الأغذية والتغذية لذلك فإن المركبات البروتينية تتحسن خواصها كثيرا وبصورة عامة كلما كانت نسبة الدهن منخفضة وأيضا تزداد فترة صلاحيتها Shelf life .

وعند أكسدة الدهون الغير مشبعة ينتج عنها المركبات الكيميائية التالية :

- |                                   |                        |              |
|-----------------------------------|------------------------|--------------|
| 3- Epoxides                       | 2- Hydroperoxides      | 1- Peroxides |
| 5- Various reactive free radicals | 4- Carbonyl components |              |

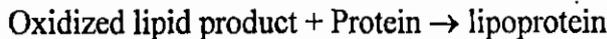
وهذه المركبات أو نواتج أكسدة الدهن الغير مشبع تتفاعل مع مايلى في جزئى البروتين:

١- مجاميع الأمين الحرة Free amino groups .

٢- المجاميع المحتوية على الكبريت Sulfur containing groups .

٣- المجاميع الحلقية المتواجدة فى أحماض Tyrosine & Tryptophan (Phenol & Indols).

وعموما فإن الجدول (٤) التالي يوضح معظم المركبات والمجاميع الكيماوية النشطة الناتجة من أكسدة الدهن الغير مشبع وكذلك مراكز التفاعل فى البروتين ويكون التفاعل عادة لتكوين الليوبروتين كالتالى:



ويلاحظ دائما أن جزيء البروتين يكون عادة أكبر من جزيء الدهن وهذا يؤدي الى انخفاض تركيز الدهن فى Lipoprotein المتكون فى صورة Dimers, Oligomers or Copolymers فى معظم الأحوال عن ١٪ من الناتج الكلى (Lipoprotein) . هذا يحدث التفاعل والإرتباط بين البروتين ونواتج أكسدة الدهن عن طريق العديد من الروابط المختلفة (إرتباط طبيعى - روابط تساهمية - روابط مركبة) كما هو موضح فى جدول (٥) .

وبعد حدوث مثل هذه التفاعلات نجد أن خواص البروتين تصبح كما يلى :

١. إنخفاض معدل الذوبان بعد تكوين Lipoprotein .
٢. أصبح أكثر حموضة ويحدث تغير فى نقطة التوازن الكهربى PI وذلك ناحية الوسط الحامضى .
٣. تتكون مركبات أكثر تعقيدا مثل Dimeric & Trimeric .
٤. يكون الليوبروتين المتكون أكثر ثباتا More stable من نظيره المتواجد طبيعيا فى الأغذية أو الأنسجة الحية الأخرى وذلك راجع الى الأنواع المختلفة من الروابط والتي تزيد من قوة الإرتباط بين كل من جزيء البروتين ونواتج أكسدة المواد الدهنية الغير مشبعة .

**Table (4) : The most reactive functional groups participating in lipid-protein interaction.**

Reactive Groups in Oxidized Lipids	Reactive Groups in Protein Molecules
-Hydroperoxides*	Primary Amines**
Cyclic Peroxides	Thiols (Mercaptans)**
Epoxides	Thioethers**
Aldehydes*	Disulphides**
Ketones	Phenols
Hydroxyketones	Indols

\*\* Particularly the free amino group of bound lysine.

\* Most reactive functional group in both lipids and proteins, respectively.

**Table (5): Bonds of lipoproteins produced by reactions of lipid oxidation products with protein.**

Type of Bonds	Examples
Physical	Single and multiple H-bonds. Hydrophobic interactions. Electrostatic bonds.
Covalent	Single and multiple aliphatic heterocyclic.
Combined	Hydrogen & covalent

أيضا فإن الأحماض الدهنية الغير مشبعة مثل Linoleic acid ونواتج أكسبتها تدخل بدرجة كبيرة في تكوين Lipoproteins وبالتالي تؤثر كثيرا على خواص البروتين الوظيفية والتغذية .

#### متابعة درجة تعديل البروتين : Extend of protein modification

هناك العديد من الطرق التحليلية المستخدمة في مجال متابعة معدل ودرجة تعديل البروتين Degree of modification وكلها تقريبا تقع تحت مجموعة Physico-chemical Techniques ويمكن توضيحها في الجدول رقم (٦) والذي يوضح كيفية الاستفادة والمعلومات المستنتجة من كل طريقة مع مراعاة أن طريقة واحدة لا تكفي لإعطاء فكرة كاملة وواضحة عن التغيرات التي حدثت في جزيء البروتين أثناء التعديل بل لابد من إجراء أكثر من تحليل ومقارنة النتائج المتحصل عليها وربطها ببعض ضمانا للوصول الى معرفة التغير الذي حدث وبصورة دقيقة وأيضا هناك بعض الطرق الأخرى تستخدم بغرض تقييم البروتين المعدل الناتج ومدى مطابقته للخواص المطلوبة والتي أجرى من أجلها التعديل الكيماوي ومن هذه الطرق الخواص الوظيفية Functional properties والتغذية الأخرى .

#### المراجع :

1. Gary E. Means and Robert E. Feeney (1976) Chemical modification of proteins. Pierce, Holen Day Inc, San Francisco.
2. Gueguen J. and Popineau, Y. (1998) Conference on Plant proteins from European crops. Food and non-food applications. Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York.
3. Schwenke, K. D. and Mothes, R. (1993) Food proteins-Structure and Functionality. Based on the 4<sup>th</sup> Symposium on Food Proteins

Structure-Functionality Relationship. Germany, 5-8 October 1992.  
VCH, Weinheim.

4. Rahma, E. H. and Narasinga Rao, M.s. (1983) Effect of Acetylation and Succinylation of cottonseed flour, on its functional properties. *J. Agric Food Chem.*, 31, 352.
5. Rahma, E. H. and Narasinga Rao, M.s. (1983) Effect of limited proteolysis on the functional properties of cottonseed flour. *J. Agric Food Chem.*, 31, 356.

**Table (6): Some physical techniques used to determined size, shape, and ionic charge of modified proteins.**

Techniques	Uses
(1) <i>Electrophoresis</i>	To determine homogeneity or purity and to detect changes in ionic state. To compare size (molecular weight) under nondissociating conditions compatible with biological activity. To detect and determine molecular weights of polypeptide components under dissociating (sodium dodecyl sulfate) and reducing ( $\beta$ -mercaptoethanol) conditions.
(2) <i>Gel filtration</i>	To determine molecular weight under conditions compatible with biological activity or in dissociating and / or reducing media (sodium dodecyl sulfate, urea, guanidine / HCl, or $\beta$ -mercaptoethanol); to determine the size and number of polypeptide chains. To desalt and to fractionate different sized components.
(3) <i>Ultracentrifugation</i>	To determine sedimentation coefficients or molecular weights and homogeneity in each respect. To measure small differences in sedimentation. To determine sedimentation coefficient or molecular weights under fully dissociating conditions.
(4) <i>Optical rotatory dispersion and circular dichroism</i>	To determine helical content of polypeptide chains and to detect changes in conformation.
(5) <i>Hydrogen exchange</i>	To determine the kinetics of proton exchange between peptide chains and solvent. To determine the number of slow-,medium-,and fast-exchanging hydrogens and, from changes in these, to detect changes in protein conformation.
(6) <i>Viscosimetry</i>	To determine relative, specific, and intrinsic viscosity and, from changes in these, to detect changes in size or shape.
(7) <i>X-ray diffraction</i>	To determine three-dimensional conformation in atomic detail.
(8) <i>Nuclear magnetic resonance</i>	To define conformations in solution, study mechanisms of folding and unfolding, and to follow changes in conformation or structure of individual residues and larger regions of polypeptide chains.
(9) <i>UV-spectra</i>	To determine conformational changes in hydrophobic region. To determine acylation rate of tyrosine phenolic group.
(10) <i>Fluorescence spectra</i>	To determine conformation changes and hydrophobic region content.
(11) <i>HPLC</i>	To determine number of fractions, purity or homogeneity dissociation or aggregation state and conformation changes.