

الباب الثامن
المركبات النيتروجينية البروتينية
وغير البروتينية

أ.د/ إبراهيم محمد حسن
أستاذ علوم وتكنولوجيا الأغذية
كلية الزراعة جامعة عين شمس

الباب الثامن
8. المركبات النيتروجينية البروتينية وغير البروتينية

Nitrogenous Compounds

1.8. مقدمة:

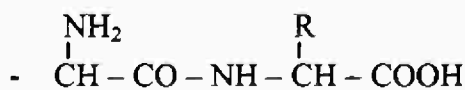
يعانى عالمنا منذ فترة ، ولا يزال ، من مشاكل نقص الغذاء وخاصة فى الدول النامية *developing countries* ، وقد كانت الزيادة الرهيبة فى أعداد السكان العامل الرئيسى فى تلك الفجوة الغذائية التى أدت إلى إنتشار المجاعات فى مناطق متفرقة من العالم . وتأتى مشكلة نقص المصادر البروتينية فى المرتبة الثانية بعد مشكلة نقص موارد الغذاء بوجه عام . ويلخص جدول (1.8) محتوى بعض الأغذية من البروتين .

جدول (1.8): محتوى بعض الأغذية من البروتين (على أساس الوزن الرطب)*

نوع الغذاء	% للبروتين	نوع الغذاء	% للبروتين
• منتجات الحبوب والمكرونة <i>Cereals & Pasta</i> - الأرز ، الأرز البنى ، الأرز طويل الحبة - الأرز ، الأرز الأبيض ، طويل الحبة للملح ، - الخام ، الأرز المقوى - القمح ، دقيق القمح - حبوب الذرة ، الذرة الصفراء ، دقيق الذرة - المكرونة الإسباجيتى ، الجافة ، المدعمة - نشا الذرة	7.9 7.1 13.7 6.9 12.8 0.3	- اللحوم والدواجن والأسماك <i>Meats, poultry & Fish:</i> - اللحم البقرى الخام ، أجزاء - مختلفة حمراء ذات نسب دهن منخفضة - اللحم البقرى المقدد ، المجفف - الدواجن ، للشى ، وللتحمير ، - وصدور الدواجن الخام - لحم الخنزير ، شرائح ، عاى - بيض كامل خام - أسماك كالكود ، البلطى ، - البياض ، البورى ، الخنيس ، - القاروص - أسماك التونة ، اللحم الأبيض ، - المعلب فى الزيت والمصفى .	18.5 29.1 23.1 17.6 12.5 17.9 26.5
• منتجات الألبان <i>Dairy products</i>: - اللبن ، كامل الدسم ، والمائل - اللبن الفرز المجفف - الجبن الشيدر - الزبادى ، المائدة ، ومنخفضي الدهن	3.3 36.2 24.9 5.3	• الفواكه والخضروات <i>Fruits & vegetables</i>: - التفاح ، الخام ، بالقشرة - الأسباراجس الخام - الفراولة الخام - الخس ، المبرد ، الخام - البطاطس الكاملة ، بالقشر وبدونه	0.2 2.3 0.6 1.0 2.1
• البقوليات <i>Legumes</i>: - فول الصويا ، البذور الناضجة ، الخام - الفول ، اللوبيا ، كالة - الأنصاف ، البذور الناضجة - والخام - التوفو ، الخام ، الصلب - التوفو الخام والمعدى	36.5 23.6 15.8 8.1		

* US. Department of Agriculture, Agricultural Research service, 1997. USDA Nutrient Database for Standard References, Release 11.1. Nutrient Data Laboratory Home page. <http://www.hai.usda.gov/fnic/food comp>

وتعتبر البروتينات من المركبات السائدة في جميع خلايا الكائنات الحية ولجميع البروتينات وظائفها البيولوجية الهامة كما أن لها دورها الأساسي في تركيب الخلية . وبروتينات الأغذية غاية في التعقيد ، ورغم ذلك فقد تم تنقية ووصف أنواع عديدة منها. وتتباين البروتينات في كتلتها الجزيئية والتي تتراوح بين 5000 دالتون أو أكثر إلى مايقرب من مليون دالتون. وتتكون البروتينات من خمسة عناصر أساسية تشمل الهيدروجين ، والكربون ، والنيتروجين ، والأكسجين ، والكبريت. وتتكون وحدات بناء البروتينات من عشرين ألفا (α) حامض أميني (جدول 2.8) ، وترتبط الأحماض الأمينية مع بعضها البعض في جزيئ البروتين بروابط ببتيدية ويعتبر عنصر النيتروجين هو العنصر المميز لجزيئ البروتين .

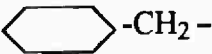
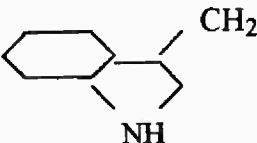
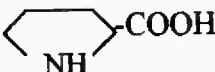
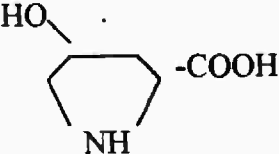


الرابطة الببتيدية

جدول (2.8): التركيب البنائي للأحماض الأمينية الأساسية* وغير الأساسية الداخلة في

تركيب جزيئ البروتين

مجموعة الـ R	إختصار الاسم	الاسم
R - C - COOH NH ₂	الرمز العام	
H	Gly.	1- الجليسين <i>Glycine</i>
CH ₃ -	Ala.	2- الألانين <i>Alanine</i>
(CH ₃) ₂ - CH-	Val.	3- الفالين <i>Valine</i> (أساسي 1)
(CH ₃) ₂ - CH - CH ₂	Leu.	4- الليوسين <i>Leucine</i> (أساسي 2)
CH ₃ - CH ₂ - CH- CH ₃	Ileu.	5- الأيزوليوسين <i>Isoleucine</i> (أساسي 3)
CH ₂ OH -	Ser.	6- السيرين <i>Serine</i>
CH ₃ - CHOH-	Thr.	7- الثريونين <i>Threonine</i> (أساسي 4)
HOOC-CH ₂ -	Asp.	8- الأسبارتيك <i>Aspartic</i>
HOOC-CH ₂ -CH ₂ -	Glu.	9- الجلوتاميك <i>Glutamic</i>

$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4 -$	<i>Lys.</i>	10- الليسين <i>Lysine</i> (أساسي 5)
$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3$	<i>Orn.</i>	11- الأورنثين <i>Ornithine</i>
H_2 $\text{HN} = \text{C} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 -$	<i>Arg.</i>	12- الأرجينين <i>Arginine</i> (أساسي 9)
$\text{NH} - \text{C} - \text{CH}_2 -$ $\text{CH} \quad \text{CH}$ $\quad \quad \text{N}$	<i>His.</i>	13- الهستيدين <i>Histidine</i> (أساسي 10)
	<i>Phe.</i>	14- الفينيل آلانين <i>Phenylalanine</i> (أساسي 6)
$\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 -$	<i>Tyr.</i>	15- التيروسين <i>Tyrosine</i>
	<i>Trp.</i>	16- التربتوفان <i>Tryptophane</i> (أساسي 7)
$\text{HS} - \text{CH}_2 -$	<i>Cys.</i>	17- السيستين <i>Cysteine</i>
$\text{CH}_3 - \text{S} - (\text{CH}_2)_2 -$	<i>Met.</i>	18- الميثيونين <i>Methionine</i> (أساسي 8)
	<i>Pro.</i>	19- البرولين <i>Proline</i>
	<i>Hyp.</i>	20- الهيدروكسي برولين <i>Hydroxy proline</i>

* الأحماض الأمينية الأساسية: *Essential amino acids* : هي الأحماض الأمينية التي لا تتخلق في جسم الإنسان بعملات التمثيل الغذائي ولذلك يجب أن تحتويها الوجبة الغذائية.

** الأرجينين : أساسي للأطفال

المصدر: تم تجميعه بواسطة المؤلف من مصادر متعددة .

يتراوح محتوى بروتين الأعذية من النيتروجين ما بين 13.4 إلى 19.1 % ويتأى ذلك بسبب تباين تركيب الأحماض الأمينية فى جزئ بروتين غذاء ما (جدول 3.8) . ويفترض عادة أن مخلوط البروتين النقى يحتوى على 16 % نيتروجين. ولذلك يقدر عادة محتوى العينة من البروتين بضرب النيتروجين فى معامل $6.25 = 16/100$. وبطبيعة الحال ، يختلف تركيز النيتروجين فى البروتينات المختلفة وبالتالي تتباين معاملات تحويل النيتروجين إلى بروتين (جدول 3.8) .

وفى كثير من الأحيان ، يفضل ذكر نسبة النيتروجين بدلا من نسبة البروتين . وبوجه عام تتميز البروتينات بغناها من الأحماض الأمينية القاعدية والتي تحتوى على نسبة أعلى من النيتروجين .

جدول (3.8) : معاملات تحويل النيتروجين إلى بروتين الأغذية

نوع الغذاء	% للنيتروجين فى العينة	معامل تحويل	نوع الغذاء	% للنيتروجين فى العينة	معامل تحويل
بيض أو لحم	16.0	6.25	ذرة	17.7	5.65
لبن	15.7	6.37	الشوفان	18.66	5.36
الجيلاتين	•18.00	•5.55	فول الصويا	18.12	5.52
القمح	18.76	5.33	الأرز	19.34	5.17
الوجبة الغذائية	•17.60	•5.68			

المصدر :

- Moss, 1990. Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*. 38: 18-24.
- Hohres, D.B. 1931. Factors of converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. U.S. Dept. Agric. Circular No. 183. August. USDA, Washington, DC.
- C.F. Suzanne Nielsen, S. 1998. *Food Analysis*, 2nd ed., Aspen Pub., Inc. Gaithersburg, Maryland.

• مصادر مختلفة تم تجميعها بمعرفة المؤلف .

ويمكن تقسيم البروتينات طبقاً لتركيبها ، أو لشكلها البنائى ، أو لوظائفها البيولوجية أو لصفات ذوبانها . فعلى سبيل المثال ، تتكون البروتينات البسيطة من أحماض أمينية فقط ، عند تحليلها مائياً ، أما البروتينات المرتبطة *conjugated proteins* فتحتوى بالإضافة للأحماض الأمينية ، على مكونات أخرى غير الأحماض الأمينية .

وللبروتينات أهمية غذائية عالية ، كما تلعب دوراً كبيراً وأساسياً فى الصفات الحسية للأغذية ، فعلى سبيل المثال ، فالبروتينات الدور الرئيسى فى تشكيل قوام المنتجات الغذائية ، فمحتوى القمح وبقية من البروتين ونوعياته من أحد أهم دلالات جودة الخبز ، وكذلك تحدد الاختيار المناسب لنوع معين من الدقيق لإنتاج منتج معين من منتجات المخازن وغالباً ما توجد البروتينات فى الأغذية مرتبطة ارتباطاً طبيعياً أو كيميائياً مع الكربوهيدرات والليبيدات ، فالجليكوبروتينات والليبوبروتينات تؤثران على الصفات الريولوجية لمحاليل الأغذية ، ولهما إستخداماتهما التكنولوجية كمستحلبات غذائية . وتساهم التغيرات الكيميائية للبروتينات ، لحد كبير ، فى عملية إنضاج وتعتيق اللحوم *aging of meat* . وللبروتينات الطبيعية نكهة ضعيفة ، وأثناء التسخين (كالطبخ ، الغليان ، الخبز ، الشى) تتحطم بعض السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية أو تتفاعل مع مكونات الغذاء الأخرى (كتفاعل الليسين مع السكريات المختزلة) وينتج عن ذلك نكهات مرغوبة ، إلا أن عملية التسخين الشديد للأغذية تفقدها جزءاً من قيمتها الغذائية .

وتشكل الأحماض الأمينية المصدر الرئيسى للقيمة الغذائية للبروتين . وبعض الأحماض الأمينية تعتبر أساسية حيث لا يستطيع جسم الإنسان أن يخلقها أثناء عمليات التمثيل الغذائى ولذلك فلا بد أن يحصل عليها الإنسان من غذائه لما لها من أهمية قصوى لصحة الإنسان وسلامة عقله . ويوضح جدول (4.8) محتوى بعض البروتينات الغذائية من الأحماض الأمينية الأساسية . وهناك بعض البروتينات ، خاصة ، ذات المصادر النباتية (كالحبوب) تنقصها بعض الأحماض الأساسية (كالإيسين) . والبروتينات التى تنقصها بعض الأحماض الأمينية الأساسية يمكن خلطها مع بروتينات من مصادر أخرى لإعادة الإتران وإستكمال النقص فى تركيب الخلطة من حيث محتواها من الأحماض الأمينية الأساسية وبالتالي ترفع من القيمة الغذائية لمخلوط البروتينات . فعلى سبيل المثال يمكن بخلط دقيق القمح باللبن الفرز أو بدقيق الصويا بنسب معينة إنتاج مخلوط بروتينى

جدول (4.8): نسب الأحماض الأمينية الأساسية في بعض الأغذية البروتينية
(جم/100 جم بروتين)

الحامض الأميني	التركيب المرجعي طبقاً لمنظمة الأغذية والزراعة FAO	لبن فزر	فول صويا	لحم بقرى	بيض	سمك	خميرة
الليسين	4.2	8.6	6.8	8.3	6.3	6.6	6.8
التربتوفان	1.4	1.5	1.4	*1.0	1.5	1.6	*0.8
الفينيل آلانين	2.8	5.5	5.3	3.5	5.7	4.1	4.5
الميثيونين	2.2	3.2	*1.7	2.8	3.2	3.0	2.6
الثريونين	2.8	4.7	3.9	4.5	4.9	4.8	5.0
الليوسين	4.8	11.0	8.0	7.2	9.0	10.5	8.3
الأيزوليوسين	4.2	7.5	.6	4.7	6.2	7.7	5.5
الفالين	4.2	7.0	5.3	5.1	7.0	5.3	5.9

* *1st limiting amino acid* الحامض الأميني الأول المحدد للقيمة الغذائية للبروتين

المصدر:

Lichtfield, J.H. and Sachel, G.F.1965. Technology and protein malnutrition. Cereal Sci. Today, 10, 458, 460-462, 464.

القيمة الغذائية من حيث محتواه من الأحماض الأمينية الأساسية . ولدرء الشك باليقين أصدرت منظمة الأغذية والزراعة FAO التابعة للأمم المتحدة جداول توضح تركيب الأغذية المختلفة من الأحماض الأمينية الأساسية حتى يسهل التعرف على مشاكل نقص القيمة الغذائية في بعض دول العالم خاصة تلك التي تركز في إستهلاكها من البروتين على غذاء رئيسي (كمصر وإستهلاكها من الحبوب ، وبعض دول أفريقيا وإستهلاكها من الذرة ... إلخ) .

ويعتبر تحليل البروتين عملية معقدة وتعتبرها بعض الصعوبات لأن هناك بعض المكونات الغذائية تتشابه في صفاتها الفيزيوكيميائية *physicochemical* مع البروتينات.

ولا تعتبر البروتينات هي المصدر الوحيد للنيتروجين في المواد الغذائية فهناك أيضا المركبات النيتروجينية اللابروتينية التي يمكن أن تأتي من الأحماض الأمينية ، والبيبتيدات الصغيرة ، والأحماض النووية والفوسفوليبيدات ، والسكريات الأمينية ، واليوريا ، واليوريا ، والقلويدات ، وحامض اليوريك ، واليوريا ، وأيونات الأمونيوم . وعلى هذا الأساس ، فالنيتروجين العضوي الكلي في الأغذية يمثل بصفة أساسية النيتروجين البروتيني ، ولمدى أقل النيتروجين المكون لكافة أنواع مواد النيتروجين العضوي اللابروتيني .

وهناك طرقا عديدة تم تطويرها لقياس محتوى الأغذية من البروتينات بدقة عالية ، وتشمل المبادئ الأساسية لتلك الطرق تقديرات النيتروجين ، الروابط الببتيدية ، والأحماض الأمينية العطرية *aromatic* ، وإمتصاص البروتينات للأشعة فوق البنفسجية ، المجاميع الأمينية الحرة ، صفات تشتت (بعثرة) الضوء ، القدرة على الإرتباط بالصبغات . وبالإضافة لعوامل الدقة ، والحساسية ، واليقين من صحة النتائج ، والسرعة ، وتكاليف التحليل ، يجب على القائم بالتحليل معرفة ماهية المكونات التي يتم تقديرها بالفعل عند إختيار الطريقة المناسبة لتقدير ما .

2.8. أهمية التحليل *Importance of analysis* :

تتأتى أهمية تحليل البروتين من الآتى :

1.2.8. تقدير النشاط البيولوجي : فبعض البروتينات كإنزيمات والمثبطات لها أهميتها الكبيرة في علوم الأغذية والتغذية منها على سبيل المثال لا الحصر ، إنزيمات تحليل البروتين التي تستخدم في تطرية اللحوم ، الإنزيمات البكتينية ودورها الحيوي في نضج الفواكه ، وكذلك مثبطات التريسين في البقوليات ودورها كمواد مضادة للتغذية

Antinutritional factors .

2.2.8. تحديد الصفات الوظيفية : لبروتينات أنواع الأغذية المختلفة صفات وظيفية فالجليادين والجلوتينين لهما دورهما الأساسى في صناعة الخبز ، كازين اللبن وتكوينه للخرقة في صناعة الجبن ، وكذلك بياض البيض وإنتاجه للرغوة في المنتجات الغذائية التي تمتاز بصفة الهشاشة.

البطاطة التغوية : ودورها الأساسى في رفع درجة الوعي الغذائى ومعرفة المستهلك بما يتناوله وقيمته الغذائية ومدى تغطية إحتياجاته الغذائية .

هذا ويكون تحليل البروتين مطلوباً عند الرغبة في معرفة :

- محتوى الغذاء من البروتين .
- تركيبه من الأحماض الأمينية .
- نسبة بروتين معين من غذاء ما .
- محتوى بروتين ما أثناء عملية عزل وتنقية البروتينات .
- تقييم المركبات النيتروجينية اللابروتينية .
- القيمة الغذائية للبروتين (كالقيمة الهضمية ، كفاءة تحويل البروتين ، الميراث النيتروجيني) .

3.8. تقدير البروتين :

تعتمد الطرق المختلفة لتقدير المحتوى الكلى من البروتين في غذاء ما على تقدير عنصر ما أو مجموعة معينة من البروتين ثم حساب نسبة البروتين باستخدام معامل تحويل ثبتت صحته بالتجربة . وتشمل طرق تحليل مكونات البروتين والتي سبق ذكرها ، تقدير الكربون أو النيتروجين ، أو بعض الأحماض الأمينية أو الروابط الببتيدية ، وفي بعض البروتينات يدل على تركيزها أو نسبتها بعض العناصر مثل الحديد في بروتين الهيموجلوبين أو اليود في الثيروجلوبين ، ... إلخ. ويمكن استخدام أى من تلك التقديرات في تقدير البروتين وفي كل تلك الطرق وغيرها نفترض أن يكون المكون المقدر للتعبير عن محتوى الغذاء من البروتين ، موجود كلية في شق البروتين فقط . ولذلك فالتقدير الصحيح للبروتين يجب إزالة أى مكون آخر نيتروجيني وغير بروتيني حتى لا يتداخل هذا النيتروجين في تقدير قيمة البروتين في المواد الغذائية .

1.3.8. طريقة كداهل Kjeldahl Method :

قام العالم الدنماركي كداهل عام 1883م بإبتكار طريقة لتقدير النيتروجين العضوى في دراساته على تغيرات البروتين في بعض الحبوب المستخدمة في صناعة البيرة . هذا وقد أجريت تعديلات عديدة على هذه الطريقة بعد نشرها . ويمكن تلخيص طريقة كداهل لتقدير النيتروجين العضوى فيما يلى :

- تسخن العينة في حامض كبريتيك وتهضم حتى تتم أكسدة الكربون والهيدروجين ويختزل النيتروجين العضوى ويتحول إلى كبريتات أمونيوم طبقا للمعادلة الآتية :



- تضاف بعد ذلك صودا كاوية إلى مخلوط الهضم ويسخن المخلوط فتتحرر الأمونيا وتتبعث فيتم إستقبالها في حجم معلوم من حامض قياسي .

- يتم معايرة الجزء من الحامض الذى لم يتفاعل مع الأمونيا . وتحسب % للنيتروجين ثم تحول إلى % للبروتين في عينة المادة الغذائية .
وفيما يلى بعض أهم الملاحظات ذات العلاقة بتلك الطريقة :

1- مما هو جدير بالذكر أن كداهل كان قد إستخدم برمنجنات البوتاسيوم لعملية الأكسدة إلا أن النتائج المتحصل عليها لم تكن مرضية .

2- إكتشف *Wilforth* عام 1885م أنه يمكن إسراع هضم العينة (بحامض الكبريتيك) بإضافة بعض العوامل اللمسية *catalysts* وإقترح العالم *Gunning* عام 1889م إضافة كبريتات البوتاسيوم لرفع نقطة غليان مخلوط الهضم لخفض زمن التفاعل، وأصبح إسم الطريقة المعطلة *Kjeldahl-Wilforth-Gunning* .

3- تحتاج البروتينات التى تحتوى على الحامضين الأمينيين الهيستيديين ، التربتوفان لظروف قصى وأطول لإتمام عملية الهضم .

4- تؤدي إضافة كمية أكبر من كبريتات البوتاسيوم أو الصوديوم (لرفع نقطة الغليان) للحامض لحدوث تحلل حرارى وفقد فى الأمونيا . وبوجه عام يعتبر المدى من درجات الحرارة بين 370 إلى 410°م هو الأنسب لعملية الهضم .

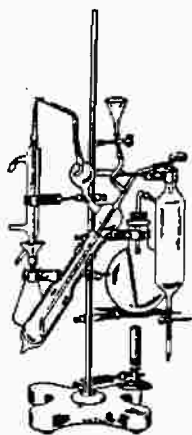
5- أجريت تجارب مكثفة على معظم عناصر الجدول الدورى لإستخدامها كعوامل لمسية عند هضم عينات المواد الغذائية بطريقة كداهل . وكانت عناصر النحاس ، والزنبق ، والسلينيوم هى الأكثر جدوى وإستخداما ، إلا أن عنصر الزنبق كان أفضلها ، وعندئذ ، تضاف خطوة إضافية ، وهى ترسيبه بإستخدام ثيوكبريتات الصوديوم وذلك لتحليل مقد الزنبق مع الأمونيا المتكون أثناء عملية الهضم . وفى الأونة الأخيرة قل إستخدام الزنبق

لسميته العالية ، وأصبح إستخدام السلينيوم هو الأكثر شيوعا على أن يضاف بالكمية المناسبة .

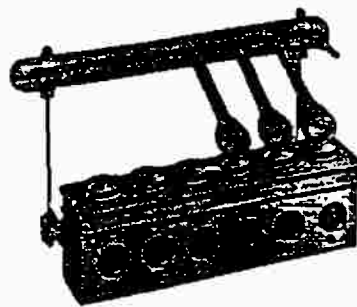
6- فى التطبيقات التجارية ، حيث يجرى تحليل عدد كبير من العينات يوميا ، تجرى تعديلات على الطريقة تسمح بسرعة إنجاز التحليل ، ففي القمح والدقيق يتم تقدير البروتين بهضم 1 جم من العينة بإستخدام كمية معلومة من حامض الكبريتيك 0.1253 ع ثم يعاير الجزء من الحامض المتبقى بعد الهضم بمحلول قياسى من الصودا الكاوية له نفس عيارية محلول حامض الكبريتيك (0.1253 ع) ، وبذلك يمكن حساب % للبروتين فى العينة مباشرة بعد قراءة حجم الصودا الكاوية .

7- يمكن إستخدام حامض البوريك لإستقبال الأمونيا المتحررة أثناء التقطير بعد إضافة الصودا الكاوية المركزة بدلا من إستقبال الأمونيا فى محلول الصودا الكاوية القياسى . وفى تلك الحالة تكون كمية حامض البوريك فى ورق الإستقبال تقريبية (فى حدود 50 مل) وكذلك تركيزه (فى حدود 4 %).

ويوضح شكل (1.8) جهاز ميكروكلداهل للهضم والتقطير .

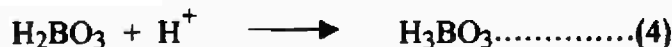


تقطير



هضم

شكل (1.8): جهاز ميكروكلداهل للهضم والتقطير



5.1.3.8 الحسابات : Calculations

عدد مولات حامض الهيدروكلوريك = عدد مولات الأمونيا = عدد مولات النيتروجين في العينة... (5) .
ويتم إجراء تجربة بلانك وتطرح المليلترات المستهلكة في هذه التجربة من مليلترات
حامض الهيدروكلوريك الناتجة من معايرة أنيون البورات .

$$\% \text{ للنيتروجين} = \frac{\text{معايرة حمض الهيدروكلوريك} \times \text{حجم الحامض بعد طرح البلاك} \times 14 \text{ جم}}{\text{وزن العينة بالجرام}} \times 100 \dots (6)$$

حيث :

معايرة حامض الهيدروكلوريك = معايرة حامض الهيدروكلوريك في المول / 1000 لتر
حجم الحامض بعد طرح البلاك = عدد مليلترات حامض الهيدروكلوريك المعادل للعينة - عدد مليلترات حامض
الهيدروكلوريك المستهلكة للبلاك .

14 = الوزن الذري للنيتروجين .

ثم يستخدم معامل تحويل النيتروجين إلى بروتين كما هو موضح في جدول (3.8) ،
وكما سبق الإشارة إلى أن معظم البروتينات تحتوى على 16 % نيتروجين ، وعندئذ
يكون معامل التحويل 6.25

% للنيتروجين / 0.16 = % للبروتين أو

% للنيتروجين $\times 6.25$ = % للبروتين (7)

2.3.8. طريقة نسلر *Nessler method* :

وقد جرى تقدير النيتروجين في عينات المواد الغذائية بالطرق اللونية . ومن أكثر
الطرق اللونية شيوعا طريقة نسلر *Nessler* والتي يتم إجراؤها على مخلوط هضم
كداهل طبقا للمعادلة الآتية :



Nessler reagent

لون يتراوح بين الأصفر

إلى البنى-المحمر

وتمتاز طريقة نسلر لتقدير النيتروجين بسرعتها وحساسيتها العالية وبساطتها . وتؤدي
إضافة سيانيد البوتاسيوم إلى محلول نسلر *Nessler reagent* لتجنب بعض مشاكل هذا
التقدير والتي تحدث بسبب عدم ثبات لون مركب أيوريد الأمونيوم ثنائي الزئبق

ammonium dimercuric iodide بما له من صفات غروية *colloidal* . ومن الطرق اللونية التي يمكن إستخدامها أيضا طريقة فان سلايك وهيلر *Van Slyke & Hiller (1933)* ، وتعتمد هذه الطريقة على تفاعل المحلول المحتوى على أيونات الأمونيوم مع الفينول القلوى والهيبوكلوريت ، وبتسخين هذا المحلول يتكون لون أزرق كثيف يرتبط بشدة مع الإندوفينول طبقا للمعادلة الآتية :



(أزرق اللون ، القصى امتصاص للضوء على طول موجى 630 نانوميتر)

كما يمكن إستخدام هيبوبروميت الثيمول *Thymol hypobromite* لتقدير النيتروجين فى صورة أمونيا . هذا وقد أدى تطوير جهاز الهضم المستمر لإمكانية تقدير النيتروجين فى السوائل البيولوجية أو المعلمات خلال بضع دقائق ، حيث تعقب عملية الهضم إضافة كلا من الفينول القلوى وهيبوكلوريت الصوديوم . وتتلخص أهم مميزات طريقة كداهل فيما يلى :

- يمكن إجراؤها على كافة أنواع الأغذية .
 - بسيطة نسبيا .
 - غير مكلفة .
 - دقيقة وتعتبر طريقة رسمية معتمدة لتقدير البروتين الخام .
 - أمكن تعديلها وزيادة حساسيتها لقياس كميات ضئيلة من البروتين تقدر بميكروجرامات .
- أما أهم عيوب طريقة كداهل فتتلخص فى الآتى :
- 1- تقيس كل النيتروجين العضوى بمختلف أنواعه ، ولا تقيس نيتروجين البروتين فقط .
 - 2- تستغرق وقت طويل للإنتهاء منها (حوالى ساعتين) .
 - 3- أقل فى درجة تأكيد النتائج عما هو الحال عند إستخدام طريقة البيوريت .
 - 4- تستخدم فيها مواد آكلة *corrosive reagent* .

3.3.8. طريقة البيوريت *Biuret Method* :

يعتمد الأساس العلمى لطريقة البيوريت التى إقترحها العالم ريجار (*Riegler, 1914*) على تفاعل المواد التى تحتوى على رابطتين بهتيديتين أو أكثر مع أملاح النحاس فى المحاليل القلوية وتكون معقد بنفسجى اللون يقاس إمتصاصه للضوء على طول موجى 540 نانومتر . وتكون كثافة اللون متناسبة طرديا مع المحتوى من البروتين . وتمتاز طريقة البيوريت ببساطتها وسرعتها ودقتها ، وإنخفاض تكلفتها ، هذا بالإضافة إلى الأهمية الكبرى لهذه الطريقة بإعتمادها على التفاعل مع الروابط الببتيدية ولذلك فهى تعبر بدقة عن كمية البروتين عكس ما هو الحال فى طريقة تحليل كطريقة كداهل والتى تقيس النيتروجين الكلى فى العينة بغض النظر عن مصدره هل هو بروتينى أم لا بروتينى.

وفيما يلى وصف لطريقة البيوريت لتقدير البروتين :

- 1- يخلط 5 مل من محلول البيوريت مع 1 مل من محلول البروتين (يحتوى على حوالى 10-1 مجم بروتين/مل). ويحتوى محلول البيوريت على كبريتات النحاس ، هيدروكسيد الصوديوم ، طرطرات الصوديوم والبيوتاسيوم (والتي تستخدم لضمان ثبات أيون النحاسيك فى المحلول القلوى) .
- 2- بعد ترك مخلوط التفاعل على درجة حرارة الغرفة لمدة 15 أو 30 دقيقة يقرأ إمتصاصه للضوء على طول موجى 540 نانومتر أمام البلاك .

ويؤخذ على طريقة البيوريت عدة إنتقادات أهمها :

- أ- تختلف كثافة اللون الناتج من تفاعل البيوريت مع البروتينات المختلفة حتى لو كانت بنفس التركيز ولذلك تحتاج عملية التقدير الكمية بمقارنة اللون الناتج من تفاعل البيوريت مع العينة موضع التحليل ، باللون الناتج من تفاعل البيوريت مع وزن معلوم من بروتين معين معروف.
- ب- يحتاج تقدير البروتين بطريقة البيوريت لكمية أكبر من عينة المادة الغذائية (لأن كل كمية البروتين فيها عن 2-4 مجم بروتين) عما هو الحال فى الطرق اللونية الأخرى.
- ج- قد يحدث تداخل لبعض مكونات المادة الغذائية الأخرى فى تكوين اللون الناتج بتفاعل البيوريت مع البروتينات ، وعادة ماتكون هذه المكونات الليبيدات أو الكربوهيدرات ، أو المواد ذات البريق *Opalescence* .

- د- تتداخل التركيزات العالية من أملاح الأمونيوم في التفاعل .
- هـ- لا تعطى هذه الطريقة نتائج مطلقة مباشرة ، بل يجب معايرة اللون الناتج مع لون بروتين معلوم الوزن (مثل سيرم البيومين البقر) أو مع طريقة كلداهل .

4.3.8. طريقة لورى *Lowry Method* :

تعتمد طريقة لورى على تفاعل البروتين مع دليل الفينول والنحاس تحت الظروف القلوية في وجود البولي فوسفات غير المتجانسة (وتتكون من الفوسفوتجستيك والفوسفوموليبيديك) حيث يحدث التفاعل بأكسدة الأحماض الأمينية العطرية كالتيروزين والفينيل ألانين (وبعض المجموعات الأخرى) بصفة أساسية ويتكون لون نهائى أزرق تعبر كثافته الضوئية عن تركيز البروتين في العينة . وتقاس كثافة اللون الأزرق على 750 نانوميتر عندما يكون تركيز البروتين ضئيلا أو 500 نانوميتر عندما يكون تركيز البروتين في العينة كبيرا .

وتتميز طريقة لورى بما يلى :

- 1- حساسيتها العالية والتي تبلغ من 10-20 مرة قدر حساسية طرق إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية ، وتصل إلى 100 مرة قدر حساسية طريقة البيوريت .
- 2- كما تعتبر طريقة لورى من الطرق المتخصصة نسبيا برغم إمكانية حدوث تداخل في التفاعل لعدد قليل من المركبات البيولوجية في العينة موضع التحليل .
- 3- أقل تأثرا بحدوث عكارة في العينة .
- 4- أكثر تخصصا من أغلب الطرق الأخرى .
- 5- أكثر بساطة وسرعة حيث لا تستغرق أكثر من 1-1.5 ساعة .

ويعيب تلك الطريقة : (1) تباين حساسيتها مع تركيب الأحماض الأمينية في بروتين ما ، وظروف التحليل ، (2) كما لا تتناسب كثافة اللون الناتج من التفاعل تماما مع تركيز البروتين في العينة . (3) بالإضافة إلى ذلك أنها تستهلك وقتا أطول عن طرق قياس إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية على طول موجى 280 نانوميتر ، (4) كما أن العينة تتحطم أثناء التفاعل ، وتحتاج كل عينة لظروف تشغيل خاصة ، (5) بالإضافة لحساسية طريقة لورى للتركيزات العالية من السكر مثل تلك التركيزات المستخدمة في فصل

البروتينات عن طريق تدرج تركيز محاليل السكر مع الطرد المركزي الفائق
Ultracentrifugation .

ويمكن أن نوجز طريقة لورى لتقدير البروتين في عينة مادة غذائية فيما يلي :

- 1- يتم تجفيف عينة البروتين بحيث تكون كمية البروتين فيها من 20-100 ميكروجرام .
- 2- يضاف محلول طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم مع كربونات الصوديوم بعد تبريده وتركه على درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق .
- 3- يضاف محلول (كبريتات النحاس- طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم- هيدروكسيد الصوديوم) بعد التبريد والتحصين على درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق .
- 4- يضاف محلول *Folin* المحضر حديثا ، ويخلط مخلوط التفاعل ويحضن على 50°م لمدة 10 دقائق .
- 5- يقرأ الإمتصاص الضوئى على 650 نانوميتر .
- 6- يرسم منحنى قياسي *standard curve* بإستخدام البيومين سيرم البقر ومن هذا المنحنى والكثافة الضوئية الناتجة عن العينة موضع التحليل يمكن تقدير البروتين فيها .

4.8. طرق قياس الطيف المباشرة

Direct spectrophotometric methods

تعتبر طريقة تقدير تركيز البروتينات بإمتصاصها للأشعة فوق البنفسجية من الطرق السريعة الإجراء ، والسهلة نسبيا ، كما تتميز بعدم تحطم البروتين حتى عند تقديره في السوائل البيولوجية أى أنها لا تستهلك أى كمية من العينة . ويمكن أيضا إجراء تقدير إمتصاص البروتين للأشعة فوق البنفسجية تحت الظروف التى تغشل فيها طرق التقدير الأخرى فى إعطاء نتائج سليمة وواقعية (مثل وجود الأملاح وإيونات الأمونيوم مع محلول البروتين) . وفى كافة الأحوال يجب تفسير النتائج المتحصل عليها للتقدير بعناية بالغة . وتعتمد تلك الطريقة على إمتصاص معظم البروتينات للأشعة فوق البنفسجية إمتصاصا قويا عند طول موجى 280 نانوميتر ويكون السبب الرئيسى لهذا الإمتصاص وجود الأحماض الأمينية التيروزين ، والفينيل آلانين ، والتربتوفان (الأحماض الأمينية العطرية) فى جزئ البروتين . وطالما أن نسبة هذه الأحماض الأمينية الثلاثة تتباين من

بروتين لآخر ، فإن هذه الطريقة فى التقدير تعتبر طريقة نسبية ، حيث قد يتباين الإمتصاص للأشعة فوق البنفسجية بين نفس التركيزات من البروتينات المختلفة بمعامل يتراوح بين 5 لأكثر ويفضل للحصول على نتائج واقعية وسليمة بهذه الطريقة ، إجراؤها على البروتينات النقية .

وتتميز الأحماض النووية أيضا بأن لها منحنى إمتصاص عند 280 نانوميتر إلا أن أقصى إمتصاص للأشعة فوق بنفسجية من الأحماض النووية يكون عند طول موجى 260 نانوميتر .

وقد أمكن إستخدام طريقة قياس إمتصاص البروتين للأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجى 280 نانوميتر فى تقدير البروتين فى اللبن الكامل ، ومنزوع الدهن ، والمبستر والمعقم وكذلك فى القشدة إلا أن هذه الطريقة لم تعطى نتائج دقيقة عند إستخدامها فى تقدير بروتينات الشرش أو محاليل الكازين .

وللرابطة الببتيدية منحنى إمتصاص قوى عند حوالى 180 نانوميتر إلا أنه عادة ما تحدث صعوبات فنية خاصة فى أجهزة القياس عند القياس على هذا الطول الموجى المنخفض .

كما أمكن قياس تركيز البروتين بقياس درجة إمتصاصه للأشعة فوق البنفسجية عند طول موجى بين 210 إلى 220 نانوميتر ، بل وكانت حساسية القياس عند هذا الطول الموجى أعلى من مثيلتها بحوالى 20 مرة عند القياس على طول موجى 280 نانوميتر . إلا أنه يعيب التقدير عند الأطوال الموجية المنخفضة (180 - 220 نانوميتر) ، بوجه عام حدوث تداخل فى إمتصاص البروتين مع بعض المحاليل المنظمة خاصة تلك المحتوية على مجاميع الكربوكسيل . ولذلك فإنه يجب إختيار المحاليل المنظمة بعناية بالغة عند الرغبة فى قياس تركيز البروتين عند الأطوال الموجية المنخفضة حتى لا تتداخل فى عملية إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية . وتجدر الإشارة إلى ضرورة أن يكون محلول البروتين موضع التقدير رائق تماما وعدم اللون حيث يؤدى وجود أية عكارة لزيادة زائفة فى إمتصاص محلول البروتين للأشعة فوق البنفسجية .

وتتلخص طريقة قياس تركيز البروتين بإستخدام صفة إمتصاصه للأشعة فوق البنفسجية فيما يلى :

1- تذاب البروتينات فى محلول منظم أو محلول قلوئى .

2- يقرأ الإمتصاص الضوئى لمحلول البروتين على طول موجى 280 نانومتر أمام البلاتنك .

3- بحسب تركيز البروتين من المعادلة التالية :

$$abc = A$$

حيث : A = الإمتصاص *absorbance*

a = الإمتصاصية *absorptivity* لتركيز محدد من بروتين قياسى

b = مسافة مرور الأشعة فى أنبوبة القياس

c = التركيز

إستخدمت قياسات الوميض *Fluorescence* أيضا فى التقدير الكمى لبعض البروتينات دون أن تسبب تحطيما لها كما يمكن بهذه الطريقة تقدير المستويات المنخفضة جدا من البروتينات . وتعزى صفة الوميض بصفة أساسية لشق التربتوفان ودرجة أقل النثروزين والالانين . وبإستخدام محلول اليوريا المحتوى على سترات وفوسفات لا يحدث تجمع للبروتين وتحسن دقة التقدير وصفة التكرارية *reproducibility* . هذا وقد وجد أن الطريقة الفلورومترية ليست مؤكدة النتائج بحسب بل وتمتاز بسرعة الإجراء إلا أنه يجب إستخدام تخفيفات عالية (تركيزات منخفضة) وأن يتم ضبط درجة الحرارة بدقة مع تنقية العينة موضع التقدير من الشوائب.

5.8. طرق تقدير العكارة

Nephelometric or Turbidimetric Methods

عندما يخلط محلول البروتين بتركيز منخفض مع أى مادة مرسبة *precipitants* تحدث عكارة يمكن قياسها كدليل على تركيز البروتين . ومن المواد المرسبة شائعة الإستخدام ثلاثى كلورو حامض الخليك *TCA* ، وحديدوسيانيد البوتاسيوم *potassium ferricyanide* ، وحامض السلفوساليسيك . وتمتاز تلك الطريقة بسرعة إنجازها عندما تكون البروتينات فى محاليلها . ويعيب تلك الطريقة أنها ينتج عنها قيما مختلفة مع التركيزات المتماثلة من أنواع البروتينات المختلفة ولا يمكن بها التمييز بين البروتينات والمكونات الأخرى التى تترسب تحت نفس ظروف التجربة . هذا وقد تم وصف طريقة

تشتيت الضوء *light scattering* لتقدير البروتينات الذائبة حيث يتم التقدير أوتوماتيكيا بعد معاملة محلول عينة البروتين بمخلوط من حامض الخليك ، وحديدى سيانيد البوتاسيوم وفى بعض الحالات تنجستات الصوديوم ثم يقاس الضوء المشتت بفعل المادة المرسبة. وقد تم وصف طريقة لتقدير البروتين فى المستخلص القلوى للقمح أو لدقيقه تعتمد على ترسيب البروتين بواسطة حامض السالفوساليسيك وقياس العكارة .

6.8. طرق الارتباط بالصبغة *Dye-Binding Methods*

ترتبط البروتينات كيميا ، تحت ظروف خاصة ، مع بعض الصبغات العضوية ويمكن أيضا باستخدام طرق الارتباط بالصبغة تقدير المجموعات الحامضية الكلية والمجموعات القاعدية للبروتين . ومن أمثلة طرق تقدير البروتينات بإرتباطها بالصبغات استخدام الصبغة الأنيونية ثنائية السلفونيك *disulfonic anionic dye* "Orange G" والتي ترتبط مع البروتين على pH مقداره 2.2 ، خاصة مع المجاميع الأمينية الحرة ، والحامض الأميني لايسين ، ومجموعة الإيميدازول للهستيدين ومجموعة الجوانيديين للأرجنين . هذا وقد أمكن تحسين صفات تقدير البروتين بالصبغة باستخدام صبغة أخرى وهى الصبغة البرتقالية الحامضية رقم 12 "Dye acid orange 12" والتي يماثل تركيبها صبغة "orange G" عدا أنها تحتوى على مجموعة واحدة من حامض السلفونيك . ويعتمد تفاعل الصبغة مع البروتين على المعادلة الآتية :

بروتين + كمية زائدة من الصبغة ← معقد غير ذائب من البروتين مع الصبغة + الجزء من الصبغة غير المرتبط

فعند معاملة عينة غذاء ما بكمية زائدة من الصبغة ، تتفاعل كل من الصبغة وبروتين الغذاء كيميا لتكوين معقد غير ذائب يمكن فصله بالطرد المركزى أو الترشيح . ومن تركيز الجزء من الصبغة الذى لم يرتبط بالبروتين (يمكن قياسه لونيا) تحسب سعة الارتباط *the binding capacity* ، ومن العلاقة التى قدرت سابقا بين كمية الصبغة

المرتبطة ومحتوى الغذاء من البروتين يبني جدول تحويل لكل غذاء تقرأ منه مباشرة % للبروتين المقدرة في عينة الغذاء .

وهناك أجهزة متاحة تجاريا للقياس المباشر للبروتين بعد الارتباط بالصبغة. وفي هذه الأجهزة تخلط الصبغة مع العينة في وحدة تفاعل خاص أو في وحدة إهتزاز (رج وتقليب) لعملية " *Laboratory shaker* " وبعد تمام الخلط وحدث التفاعل ، تنقل العينة إلى وعاء خاص مثبت على قرص ترشيح من الألياف الزجاجية ، ثم يقدر الضوء المار في محلول الصبغة المترشح بجهاز قياس ألوان خاص . هذا وقد أمكن إستغلال طريقة ارتباط البروتين مع " الصبغة الحامضية البرتقالية رقم 12 " *acid orange 12* في تقدير البروتين في عينات من الحبوب ، والبذور الزيتية ، والبقوليات ، والمنتجات الحيوانية ، والمنتجات اللبنية . ومن أنواع الصبغات الأخرى التي يوصى بإستخدامها لتقدير البروتين في اللحوم ومنتجات الألبان " صبغة كوشينيل الحمراء " *(Cochineal red A)* ، وصبغة الـ *buffalo black* ، وصبغة الأميدوبلاك " *Amidoblack 10 B*) 10B . وفيما يلي وصف لطريقة تقدير تركيز البروتين بإستخدام الصبغات :

- 1- تطحن العينة لجزيئات دقيقة (بحيث تمر من غربال سعة تقوبه 60 مش أو أقل) ويضاف إليها كمية زائدة من محلول الصبغة .
 - 2- ترج المحتويات جيدا حتى يحدث تفاعل الصبغة كاملا ثم ترشح العينة أو تطرد مركزيا لإزالة المواد غير الذائبة .
 - 3- يقاس الإمتصاص الضوئي للجزء من الصبغة غير المرتبط مع البروتين ، ويقدر تركيز الصبغة من منحنى قياسى لها .
 - 4- يجرى عمل منحنى معايرة بتوقيع تركيز الجزء غير المرتبط من الصبغة مع النيتروجين الكلى (المقدر بطريقة كلداهل) لغذاء معين بحيث يعطى هذا المنحنى مدى واسع من تركيز البروتين .
 - 5- يقدر محتوى العينة المجهولة من البروتين من المنحنى القياسى أو بإستخدام معادلة إنحدارية يتم بناءها بإستخدام طريقة المربعات الصغرى *Least squares* الإحصائية .
- ومن أهم مميزات طرق تقدير البروتين بالصبغة ما يلي :
- أ- سريعة وتستغرق زمن إجراءها 10 دقائق أو أقل .

ب- غير مكلفة ، وتعتبر دقيقة نسبيا لتقدير محتوى البروتين في السلع الغذائية بوجه عام .

وقد تبين من الأبحاث المتعددة التي أجريت عن ارتباط البروتين بالصبغات أن صبغة الـ " *Amidoblack 10 B* " أكثر حساسية وتعطى تغير أكبر في الكثافة الضوئية لكل وحدة من بروتين اللبن عما هو الحال لو استخدمت في نفس التقدير صبغة " *orange G* " . ويتأثر ارتباط البروتين بصبغة الأميدوبلاك بوجود ثنائي كرومات البوتاسيوم والفورمالدهيد ولا تتأثر بوجود كلوريد الزئبقيك ولا تتأثر صفات ارتباط بروتين اللبن بالصبغة بعمليات التجنيس أو تكثيف اللبن لتركيزه أو التسخين على 32°م لمدة 15 دقيقة . أما حدوث تحلل مائي شديد للبروتينات فيؤدي لزيادة الارتباط بالصبغة ، على عكس الحال ، في اللبن المسخن بشدة حتى حدوث تلون بالبنى *browning* فيقل معدل ارتباطه بالصبغة . وقد بينت الأبحاث أن اختبار الارتباط بالصبغة يعطى نتائج غير مقبولة ومناسبة مع عينات اللبن العادي السليم ، ويكون هذا الاختبار غير مناسب مع اللبن غير العادي كلبن السرسوب *colostrum* ولبن الماشية المصابة بالتهاب الضرع *mastitis* وأيضا في المراحل المتأخرة من فترة الحليب *very late lactation milks*.

7.8. إطلالة على بعض الطرق الأخرى لتقدير البروتين الكلي

Other Methods for Assaying Total Protein

1- يمكن تقدير البروتين بأجهزة التاراجج النووي المغناطيسي *Nuclear magnetic resonance* .

2- وجد أن التحليل بتنشيط النيوترونات ، تنشيط البروتونات ، التحليل بالتحلل الحرارى *Thermal decomposition analysis* كلها اختبارات يعتمد عليها *reliable tests* لتحليل البروتين على أن تكون العينة ممثلة ، وتم تحضيرها بطريقة سليمة للتحليل ، وأن تكون الأجهزة معايرة بطريقة صحيحة .

3- استخدمت طريقة إنبعاث الضوء بالحرق الكيميائي *pyrochemiluminescent* في تقدير محتوى المواد البيولوجية من البروتين ، وتتلخص خطوات تلك الطريقة فيما يلي:

أ- يحول النيتروجين المرتبط كيميائيا في عينة المادة الغذائية إلى أكسيد النيتريك بواسطة الحرق الأكسیدی *oxidative pyrolysis* .

ب- يؤكسد أكسيد النيتريك بالأوزون فينتج ثنائي أكسيد النيتروجين شبه المستقر *metastable nitrogen dioxide* والذي يبعث بفوتونات ليتحول للصورة المستقرة. وتكون كمية الفوتونات المنبعثة طردية مع كمية النيتروجين في العينة ويمكن حينئذ قياسها كيميا . وتتميز هذه الطريقة بسرعة الإجراء حيث لا يستغرق التقدير أكثر من خمسة دقائق ، كما تكون تكلفة الجواهر الكشفية ضئيلة للغاية ، ولايستخدم فيها أية كيمائيات خطيرة .

4- هناك طرقا أخرى بالإضافة لطريقة " لورى " تعتمد على إحداث تفاعل كيميائي مع حامض أميني معين خاصة الأحماض الأمينية العطرية ، فعندما يسخن محلول البروتين مع حامض النيتريك المركز فينتج اللون الأصفر بحدوث نيترة *Nitration* للأحماض الأمينية العطرية ، وعند المعادلة يتحول اللون إلى البرتقالي . ويعرف هذا التفاعل بتفاعل حامض الزانتوبروتينيك *xantoproteic acid* ويتميز ببساطته ، ويعيبه قلة حساسيته ، ومن الصعوبة بماكان تحويله لطريقة قياسية .

5- يمكن باستخدام الصفات الطبيعية للبروتين تقدير محتوى البروتين في عينة مادة غذائية بسرعة ودقة ، ودرجة تكرارية *reproducibility* مناسبة.

ومن أهم الصفات الطبيعية التي إستخدمت في تقدير المحتوى البروتيني :

* معامل الإنكسار : حيث ثبت أن قياس معامل الإنكسار طريقة جيدة فمعامل إنكسار معظم البروتينات تقريبا متساوى.

* انعكاس طيف الأشعة تحت الحمراء *near infrared reflectance* : ويمكن بهذه اصفة قياس تركيز البروتين ومكونات أخرى أيضا من الغذاء.

* طريقة تصوير الطيف الضوئي *photoacoustic spectrophotometry* :

إستخدمت هذه الطريقة لتقدير محتوى منتجات الألبان من البروتين عام 1987م.

* من الاختبارات الطبيعية الأخرى المقترحة لتقدير البروتين ، تقدير الوزن النوعي ، اللزوجة ، الجذب السطحي ، التوصيل الكهربى ، الإستقطاب .

6- تتفاعل الأحماض الأمينية والبيبتيدات والبروتينات مع " الفورمالدهيد المتعادل " من خلال المجموعات الأمينية بها فتظهر الخواص الحامضية لمجاميع الكربوكسيل والتي

تعاادل بمحلول قلوى معلوم العيارية ، وعندئذ ، يقدر التركيز بدلالة حجم القلوى . هذا وقد استخدمت طريقة المعايرة بالفورفورال والتي قد يطلق عليها تسعير مجاميع الكربوكسيل فى تقدير البروتين فى اللبن الطبيعى والمصنع .

7- من الطرق البسيطة جدا لتقدير البروتين هى طريقة تسخين بروتين اللبن مع هيدروكسيد الصوديوم فتتطلق كمية من الأمونيا تتناسب طرديا مع تركيز البروتين . ويتميز تلك الطريقة بسهولة الإجراء وبساطتها كما أن نتائجها ترتبط ارتباطا وثيقا مع طريقة كداهل .

8- يمكن قياس تركيز بروتينات السيرم فى اللبن بقياس حجم راسب بروتينات السيرم الذى تم ترسيبه بواسطة حامض الفوسفوتنجستيك وذلك بعد أن تزال بروتينات الكازين (بالتجبن الحامضى) ، وسيرم اللبن المدنتر . وترتبط هذه الطريقة أيضا ارتباطا وثيقا مع طريقة كداهل.

8.8. حساسية طرق التقدير المختلفة

Sensitivity of various assay methods

قدرت حساسية بعض طرق تقدير تركيز البروتين فى المواد الغذائية وقسمت طرق التقدير المختلفة إلى :

- 1- الطرق التى تعتمد على قياس امتصاص الأشعة فوق البنفسجية .
- 2- الطرق التى تعتمد على التفاعلات الكيميائية (كطرق كداهل ، لورى ، البيوريت ،...الخ)
- 3- طرق ارتباط الصبغات بالبروتينات .
- 4- الطرق عالية الحساسية (كالطرق الفلورومتريية ، مقياس النشاط الإشعاعى ، ...الخ) .

ويلاحظ أن الطرق عالية الحساسية يمكن إستخدامها لتقدير كمية أقل من 0.1 ميكروجرام ، أما طرق الارتباط بالصبغة فتقيس الكميات التى تتراوح بين 1-100 ميكروجرام ، ويمكن قياس الكميات الأعلى من 10 ميكروجرام بالطرق الكيميائية كطريقة لورى أما طريقة البيوريت فتقاس بها الكميات الأعلى من 1000 ميكروجرام ، وتقاس

طرق الأشعة فوق البنفسجية كميات فوق 10 ميكروجرام (على طول موجى 215 نانوميتر) أو فوق 100 ميكروجرام (على الطول الموجى 280 نانوميتر) .

9.8. المركبات النيتروجينية اللابروتينية *Nonprotein Nitrogenous Substances*

تشمل المركبات النيتروجينية اللابروتينية ذات الأهمية فى الأغذية الأحماض الأمينية والأمينات والأميدات ، والمركبات رباعية النيتروجين *quaternary nitrogen compounds* ، والبيورينات ، والبيريميدينات ، ومركبات النيتروزأميدات *N-nitroso amides* . ولهذه المركبات أهمية كبيرة فى الأغذية فهي تساهم فى قيمتها الغذائية ، ولونها (خاصة فى منتجات المخازن) وكذلك صفات الأغذية الأخرى الهامة . وتعتبر تلك المركبات كذلك مصدرا للمغذيات وعوامل نمو هامة للأحياء الدقيقة المستخدمة فى التخمرات الصناعية . ومن ناحية أخرى تعتبر ناتجات تحطيم البروتينات الحيوانية وزيادة مستوى المركبات النيتروجينية اللابروتينية دليلا على تدهور جودة تلك المنتجات وإحتمالات حدوث الفساد . هذا وقد إكتشف منذ حوالى ثلاثين عاما أن مركبات *N-nitrosodimethylamine* يمكن أن تسبب أوراما بكبد حيوانات التجارب . وقد ثبت أيضا خلال الخمسة وعشرين سنة الأخيرة أن هناك حوالى 300 مركب من مركبات *N-nitroso* سامة وسرطانية كما أن لها القدرة على إحداث طفرات *mutagenic* . وإستخدم تقدير المركبات النيتروجينية اللابروتينية غير العضوية مثل الأمونيا والنيترات والنيتريت فى تقييم الشئون الصحية للأغذية *sanitary status of foods* . كما إستخدم تقدير المركبات النيتروجينية اللابروتينية فى تتبع مراحل تعتيق وإنضاج أصناف الجبن المسواه أو لتتبع تركيز مركبات النيتريت والنيترات فى صناعة اللحوم المعالجة (كالمسجق والبسطرمة ... إلخ) .

1.9.8. فصل المركبات النيتروجينية اللابروتينية

من الطرق الشائعة والسهلة لفصل المركبات النيتروجينية اللابروتينية عن البروتينات طريقتي الديليسة *Dialysis* ، والترشيح الفائق *ultrafiltration* باستخدام الغشاء المناسب. ويمكن كذلك فصل تلك المركبات بعد تجميع البروتينات بالحرارة *heat* *coagulation* فتحرر المركبات النيتروجينية اللابروتينية . كما إستخدمت بعض مرسبات البروتين مثل أحماض البكريك ، السلفوساليسيك ، ثلاثى كلورو الخليك ، ويفصل الراشح الذى يحتوى على المركبات النيتروجينية اللابروتينية . وتتميز عمليتى تجميع البروتينات بالحرارة وإستخدام المرسبات بأنها تثبط إنزيمات تحليل البروتين بسرعة وتمنع إستمرار تحلل البروتين . وتعانى معظم عمليات الفصل من خطأ تجريبى يتمثل فى إمكان إحتفاظ المركبات البروتينية أثناء فصلها بجزء من المركبات النيتروجينية اللابروتينية . وفى دراسة أجريت على تقدير المركبات النيتروجينية اللابروتينية بعد فصلها عن المركبات البروتينية فى اللبن الفرز ، والسيرم ، والمستخلص المائى للدقيق ، والمستخلص المائى للردة بإستخدام طرق عديدة مثل : الديليسة *dialysis* ، الحرارة ، حامض التتجستيك ، هيدروكسيد النحاس ، هيدرازول أكسيد الحديدك ، خلاص الرصاص ، حامض ثلاثى كلورو الخليك ، حامض الفوسفوتتجستك ، حامض الميتافوسفوريك ، حامض التانيك ، وحامض السلفوساليسيك ، الإيثانول ، كلوريد الزئبقك ، مخلوط الكلوروفورم مع كحول الأوكثيل (بنسبة 8 : 1) ، مخلوط الفينول : حامض الخليك : الماء (بنسبة 1:1:1) . وقد تبين من تلك التجربة حدوث تباين فى شقوق المركبات النيتروجينية اللابروتينية باختلاف طريقة إستخلاصها وقد وجد أن طرق الديليسة والطرق المشابهة لها كانت أكثر طرق فصل المركبات النيتروجينية اللابروتينية " *NPN* " نجاحا .

2.9.8. تقدير الأحماض الأمينية الحرة *Determination of free amino acids*

اُختبرت طرق عديدة لتقدير الأحماض الأمينية الحرة في المستخلصات الخالية من البروتين ، وبإيجاز شديد يمكن إلقاء الضوء على بعض هذه الطرق فيما يلي :

1- تستجيب طرق المعايرة *Titrimetric* لمجاميع الكربوكسيل من الأحماض الأمينية ولمجاميع الفينول من الجليكوزيدات ، فالمعايرة بالفورمول *Formol titration* تكون متخصصة للمجاميع الأمينية إلا أنها لا تميز بين الأحماض الأمينية والأمينات الأخرى.

2- تعتبر طرق تقدير الغاز *Gasometric* أكثر تخصصاً ويتحرر فيها النيتروجين بعد إضافة حامض النيتروز *Nitrous acid* ومن ثم يقاس الغاز بالمانوميتر ، ويعيب تلك الطريقة إعطاءها لنتائج سلبية مع البرولين والأمينات الثانوية الأخرى *secondary amines* ، كما يحدث تداخل بين مجموعات الأמיד في الجلوتاثيون والجلوتامين مما ينتج عنه نتائج غير منطقية .

3- تفيد الطرق التي يتكون فيها معقد من الأحماض الأمينية مع النحاس في التحليلات شبه الكمية *semi-quantitative* حيث يكون المركب المعقد الملون متخصص بدرجة بسيطة فقط للأحماض الأمينية الحرة .

4- يستخدم التفاعل اللوني للأحماض الأمينية مع الننهيدرين (سيشرح لاحقاً) بصورة كبيرة حتى إستخدام هذا التفاعل في التعرف على الأحماض الأمينية بجهاز تحليل الأحماض الأمينية *"AAA" Amino acid analyzer* ، إلا أن لهذا التفاعل اللوني عيبين رئيسيين : أولهما أن تلك الطريقة ليست متخصصة للأحماض الأمينية ، وثانيهما تباين اللون وكثافته بتفاعل الننهيدرين مع الأحماض الأمينية المختلفة .

5- تؤدي عملية فصل الأحماض الأمينية على الورق الكروماتوجرافي في إتجاهين *two dimensional paper chromatography* ، ثم غسلها وإزالتها من الورق وتجميعها في مجمع للشقوق *fraction collector* ثم تقدير الأحماض الأمينية الفردية بالطرق الإسبكتروفوتومترية المباشرة لتقدير مقبول بدرجة كبيرة كتقدير نصف كمي .

6- تستخدم بعض إنزيمات نزع مجاميع الكربوكسيل *decarboxylases* في تقدير بعض الأحماض الأمينية .

7- من أفضل طرق التقدير الكمي الطريقة التي تعتمد على فصل الأحماض الأمينية على أعمدة التبادل الأيوني *Ion Exchange column* قبل إختيار الطريقة الملائمة لتقديرها وتعطى هذه الطريقة نتائج دقيقة وتتميز بالحساسية العالية .

3.9.8. بعض الطرق الأخرى لتقدير المركبات النيتروجينية اللابروتينية

وصف مجموعة من العلماء (Varner et al, 1953) طريقة شاملة لتقدير الأمونيوم والأميد والنيترات والنيتريت في المستخلصات النباتية الخالية من البروتين نوجزها فيما يلي :

1- يضبط pH المستخلص النباتي الخالي من البروتين على 10 باستخدام محلول منظم البورات .

2- يوضع المخلوط السابق في وحدة تقطير كداهل متوسطة ويزال النيتروجين الأمونيومي بالتقطير تحت تفريغ على 40° م .

3- يضاف بعد ذلك محلول قلوي مركز إلى وحدة التقطير فيزال النيتروجين الأميدي بواسطة التقطير البخاري على 100° م .

4- تضاف كبريتات الحديدوز *Ferrous sulphate* كمادة مختزلة فيزال حينئذ ، نيتروجين النيتريت على صورة أمونيا .

5- يختزل نيتروجين النيترات إلى أمونيا بواسطة كبريتات الحديدوز وفي وجود كبريتات الفضة كعامل مساعد *catalyst* .

ويحتاج إجراء هذا التقدير حوالى 20 دقيقة ، إلا أنه قد يحدث تداخل من الجلوكوز في التفاعل ولذلك يستخدم مخلوط راتنجي للتبادل الأيوني *ion exchange resin* *mixture* لفصل الجلوكوز وعندئذ يستغرق زمن الإنتهاء من التقدير كله حوالى الساعتين. هذا وإذا ما كان تركيز النيترات ضئيلا جدا يفضل تقديرها باستخدام طريقة لونية .

وبالإضافة لما سبق ذكره هناك طرقا عديدة تستخدم للكشف عن الأمونيا وتقديرها في المستخلصات الخالية من البروتين *protein free extracts* قد تعتمد على الصفات القاعدية للأمونيا ، أو باكسدة الأمونيا إلى عنصر النيتروجين ، أو بتحويل أيونات

الأمونيوم بواسطة الفورمالدهيد إلى مركب الهكساميثيلين تترامين ، كما أن هناك طرقاً أخرى تعتمد في الأساس على تفاعل نسلر *Nessler reaction* وفي جميع الأحوال يجب تجنب تداخل المركبات العضوية المحتوية على النيتروجين والتي قد ينتج عنها تفاعلات ثانوية تؤدي لتكوين الأمونيا .

10.8. تحليل الأحماض الأمينية في جزئ البروتين

يعتبر تقدير تركيب الأحماض الأمينية في جزئ البروتين هي الخطوة الأولى في تعريف التركيب الكيميائي للجزئ . وتؤدي عملية تحليل الأحماض الأمينية في جزئ البروتين لمعرفة نوعين من المعلومات :

1- وصف تركيب البروتين من حيث نوعية وحدات الأحماض الأمينية الداخلة في تركيبه .

2- إعطاء وصف دقيق لكمية كل حامض أميني في جزئ البروتين . وتزداد دقة وصف جزئ البروتين عند معرفة عدد جزيئات الأحماض الأمينية في كل جزئ بروتين ويتطلب ذلك معرفة الوزن الجزيئي للبروتين كما سنوضح فيما بعد . وبطبيعة الحال تعطى هذه المعلومات مؤشراً هاماً جداً عن القيمة الغذائية للبروتين موضع الدراسة . هذا ويمكن إجراء تحليل كامل للأحماض الأمينية في جزئ البروتين عند توافر بضعة ميكروجرامات منه بدقة عالية (تصل إلى 95 % أو أعلى) ويتطلب ذلك بضعة ساعات فقط تجري خلالها عدد من العمليات المتتابعة كمايلي :

1- تحليل البروتين تحليلًا كاملاً إلى مخلوط من الأحماض الأمينية .

2- فصل مخلوط الأحماض الأمينية إلى وحدات فردية فيصبح كل حامض أميني على حدى ، وذلك باستخدام طريقة فصل ذات كفاءة عالية *high resolving power* .

3- تقدير كمية كل حامض أميني بعد عمليتي التحليل ، والفصل باستخدام طرق لونية مع نظام آخر للكشف ، ومن ثم ، يتم حساب التركيز بالمولر لكل حامض أميني.

وفيما يلي شرح مبسط وموجز للخطوات التجريبية اللازمة لتقدير تركيب الأحماض الأمينية الداخلة في تركيب جزئ البروتين .

1.10.8. التحليل المائي للبروتين *Hydrolysis of protein*

1.1.10.8. التحليل الحامضي *Acid hydrolysis* :

يتم تحليل البروتين ، عادة ، باستخدام أحماض معدنية على درجة حرارة عالية وعادة ما يستخدم حامض الهيدروكلوريك " 6 ع " والثابت في درجة حرارة الغليان على درجة حرارة تتراوح بين 105 - 110°م لمدة ما بين 20 - 96 ساعة ، وتتم عملية التحليل بمعزل عن الهواء لتجنب حدوث تحطيم لبعض الأحماض الأمينية . وفي هذه الطريقة يضاف الحامض إلى عينة المادة الغذائية (المراد تقدير تركيب بروتيناتها من الأحماض الأمينية) في أنابيب زجاجية ذات عنق ضيق ثم تسخن الأنابيب بما تحتويه من الحامض والمادة الغذائية لطرد الهواء منها ويقلل عنق الزجاجاة بلهب قوى . يلي ذلك وضع الأنابيب المغقلة في فرن على درجة حرارة ثابتة (105 - 110°م) للمدة المناسبة .

وتأتي أفضلية استخدام حامض الهيدروكلوريك مما يلي :

- درجة النقاء العالية .
- رخص ثمنه
- سهولة إزالته بعد خطوة التحليل .

وتتأثر دقة النتائج عند تحليل الأحماض الأمينية بسبب هاتين المشكلتين :

1- بطن تحليل الروابط الببتيدية في السلاسل الجانبية الملتهمة والمتكتلة *bulky side chain* ، فعلى سبيل المثال ، فإن معدل تحليل *isoleuc-yl* ، *val-yl* ، *Tryptophan-yl* تكون أبطأ من *glycyl* حيث تتم حمايتها ويعيق تحليلها وجودها في السلاسل الجانبية الملتهمة للروابط الببتيدية وتؤدي تلك الإعاقة لنقصان تركيز أيونات الهيدرونيوم *Hydronium* (التي تحطم وتفكك الروابط الببتيدية) فيصعب تحليل تلك الروابط الببتيدية. وفي المراحل الأولى لعملية التحليل (خلال 20 ساعة) تكون عملية تحليل وتفكك تلك الأحماض الأمينية بالذات منخفضة ولذلك فقد

يمتد زمن التحليل حتى يصل إلى 70 - 90 ساعة لحدوث تحلل كامل وإنفصال لكافة الأحماض الأمينية في جزئ البروتين.

2- تغير تركيب بل وتحطيم بعض الأحماض الأمينية بمعاملة التحليل (بإستخدام حامض HCl 6 ع على 105 - 110°م) فيتحول السيرين ، والثريونين ، والميثيونين والسيستين *cysteine* وبعض الأحماض الأخرى جزئيا إلى مركبات أخرى ، ولا يمكن تقديرها بالكامل بعد زمن قدره 20 ساعة من بدء التحليل . أما الحامض الأميني " التريوفان " فيتحطم بشدة بالتحليل الحامضي ولذلك تستخدم طريقة أخرى لتحليله (كما سنذكر لاحقا).

هذا ويمكن التغلب على المشكلة الأولى بتقدير محتوى البروتين من الأحماض الأمينية بعد فترات تحليل متتالية مثل 24 ، 48 ، 72 ، 96 ساعة فيعطى ذلك بيانات عن قيم مختلفة لمحتوى البروتين من الأحماض الأمينية ، وتحسب بعد ذلك متوسط نسبة الأحماض الأمينية والتي تظل بتركيز ثابت مع الزمن .

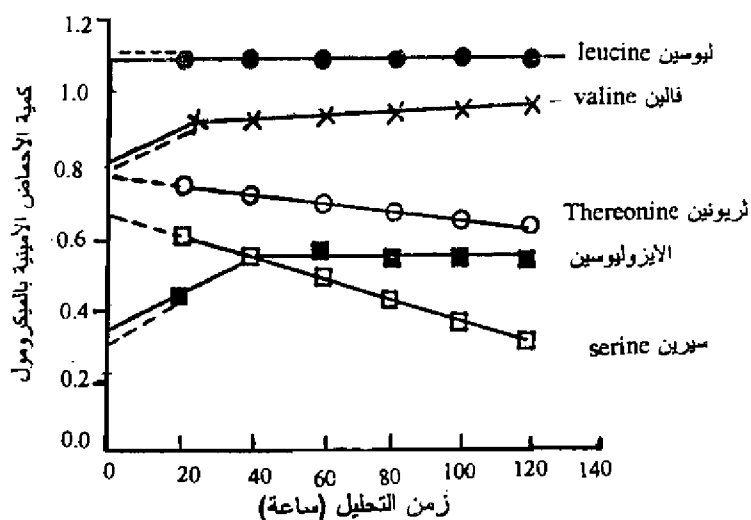
3- يتحلل الأيزوليوسين ، والفالين أكثر بطئا بواسطة حامض الهيدروكلوريك 6 ع عن الأحماض الأمينية الأخرى ولذلك يلزم إطالة فترة التحليل إلى ما يربو عن 48 ساعة للحصول على تركيزهم الحقيقي في البروتين .

4- يتأكسد التيروزين بمعاملة التحليل الحامضي .

5- يمكن تحويل السيستين ، والسيستين إلى مركب أكثر ثباتا وهو حامض السيستيك *cysteic acid* بإستخدام حامض فوق الفورميك *performic acid* ، وبعد ذلك يتم تحليل البروتين في حامض الهيدروكلوريك الـ 6 ع ، وتستكمل باقى خطوات التحليل .

6- يتحول الأسباراجين والجلوتامين كليا إلى حامضي الإسباراتيك والجلوتاميك على التوالي ، ولا يمكن تقديرهم على صورتهم الأصلية بالتحليل الحامضي .

ويظهر فى شكل (2.8) بوضوح أن الفالين ، والأيزوليوسين بعد التحليل لفترة طويلة تزداد كميتهم حيث يمكن الحصول على أقصى نسبة لكميتهم الموجودة فعلا فى البروتين بزيادة زمن التحليل . أما الأحماض التى تتأثر بالحامض *acid labile amino acids* والتى يقل تركيزها مع طول زمن التحليل مثل الثريونين والسيرين والميثيونين والسيستئين فيمكن تقدير نسبتهم عن طريق منحنيات خاصة أو رسم المنحنى الخاص بهم وتتبع النقص فى تركيزهم بطول فترة التحليل ، وإذا كان تفاعل التحليل ومعدل النقص يعبر عن تفاعل من الرتبة الأولى *1st order kinetics* يمكن مد خط المنحنى وإعادته لنقطة البداية لمعرفة تركيزهم الأصلي فى البروتين قبل بداية التحليل (أنظر شكل 2.8).



شكل (2.8): كمية الأحماض الأمينية المقدرة بعد أزمنة تحليل متزايدة للبروتين

ولتقدير الحامض الأميني التريتوفان لا يصلح إجراء التحليل بالحامض المعنى حيث يتحطم التريتوفان ، ولكن يستخدم *3N-P-toluenesulfonic acid* المحتوى على 0.2 % من مركب *3-(2-aminoethyl)-indole* على درجة 110°م فى أنابيب مفرغة ومقفلة . وإضافة مركبات الإندول فى مخلوط التحليل تمنع هدم التريتوفان وتعطى نسبة ثابتة وأعلى منه . ومن الضروري أيضا استخدام أوقات تحليل مختلفة مثل 24 ، 48 ،

72 ساعة وحساب نسبة الترتيفان عند زمن " صفر " بمد الخط أو المنحنى باعتبار تفاعل التحليل تفاعل من الرتبة الأولى *1st order kinetics* .

2.1.10.8. التحليل القاعدي *Base hydrolysis*

تتحطم معظم الأحماض الأمينية في جزئ البروتين عند تحليله مائيا بالقلوى ، ولذلك فلا يمكن تحليل الأحماض الأمينية كلها بتلك الطريقة ولكنها تستخدم فقط عندما يكون المطلوب تحليل الأحماض الأمينية التي لا تتحمل التحليل الحامضي كالتريتوفان وتجرى عملية التحليل باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم بعيارية " 4.2 " في أنابيب مفرغة ومقفلة على 110°م لمدة 16 ساعة . ويستخدم النشا في مخلوط التحليل كمضاد للأكسدة لحماية التريتوفان .

3.1.10.8. التحليل المائي الإنزيمي *Enzymic hydrolysis*

يمكن إجراء تحليلًا كاملاً للبروتينات باستخدام الإنزيمات كعامل لمسي في عملية التحليل . وقد لاقت عملية التحليل بالإنزيمات قبولا كبيرا وأعطت نتائج مرضية ، وكثيرا ما تستخدم هذه الطريقة أيضا في دراسات تقدير تتابع *sequence* الأحماض الأمينية في جزئ البروتين .

وفيما يلي بإيجاز شديد خطوات التحليل المائي الإنزيمي :

1- تجرى عملية دنثرة بالحرارة للبروتينات لفرد جزئ البروتين حتى يصبح قابلا للتحليل بالإنزيمات .

2- يتم تحليل البروتينات كمادة تفاعل "*substrate*" بواسطة واحد أو أكثر من إنزيمات الـ *Endopeptidases* (التي تعمل على الروابط الببتيدية الداخلية في جزئ البروتين) ، لإنتاج مخلوط من الببتيدات الصغيرة .

ويفضل استخدام الإنزيمات التي لها مدى تخصصي واسع *broad specificity* مثل الباباين *papain* ، والببسين *pepsin* ، والسيلين *subtilin* . وفي كثير من الأحيان

يفضل استخدام مخلوط إنزيمى من الكيموتريبسين *chemotrypsin* ، التربسين *trypsin* ويعتبر المخلوط المثالى لتلك المعاملة .

3- تستخدم بعد ذلك إنزيمات " *aminopeptidase M* " لإجراء التحليل الكامل للبتيدات إلى أحماض أمينية ، وقد يستخدم خليط من إنزيمات الـ *prolidase* ، *Leucine amino peptidase* .

وتتميز عملية التحليل المائى الإنزيمى بعدة مميزات تجعلها تأتى فى الأفضلية قبل طرق التحليل المائى الأخرى سواء بالحامض أو بالقلوى وأهم مميزات تلك الطريقة ما يلى :

- * يمكن تحليل البروتين إلى مكوناته من الأحماض الأمينية بتركيزها الحقيقى باستخدام الإنزيمات أما فى حالة الأحماض المعدنية (كما سبق بيانه) فقد يتغلل تركيب الأحماض الأمينية أو تتحطم . ولذلك يفضل دائما تقدير التربتوفان والإسباراجين والجلوتامين باستخدام التحليل المائى الإنزيمى .

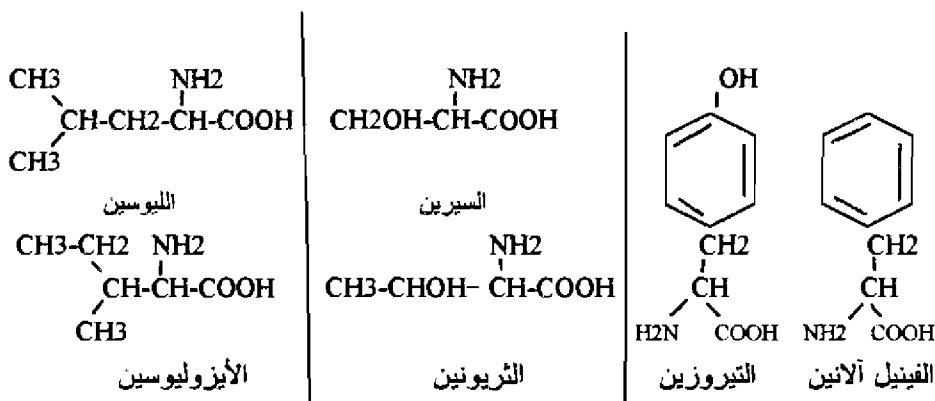
- * يمكن أيضا بالتحليل المائى الإنزيمى تقدير مشتقات الأحماض الأمينية الموجودة فى تركيب بعض البروتينات مثل الفوسفوسيرين *phosphoserine* ، سلفونات التيروزين *tyrosine sulfonate* ولا يمكن أبدا تقدير تلك المشتقات بالتحليل الحامضى .

- * يستخدم التحليل المائى الإنزيمى فى دراسات تقدير تتابع *sequence studies* الأحماض الأمينية فى البروتينات .

ومما يؤخذ على التحليل المائى الإنزيمى صعوبة إجراءه بزيادة حجم جزئى البروتين كما أن ناتجات التحليل قد تثبط الإنزيمات مما يمنع إستكمال تحليل البروتينات . وأكثر عيوب تلك الطريقة هى إحتمال حدوث هضم ذاتى *self digestion* لإنزيمات تحليل البروتين نفسها ، مما يغير بطبيعة الحال ، من أنواع وتركيزات الأحماض الأمينية الناتجة فى مخلوط التحليل بدخول أحماض أمينية من الإنزيمات ، ويمكن تجنب تلك المشكلة بإجراء التحليل باستخدام تركيزات ضئيلة من الإنزيمات على أن يكون لهذه الإنزيمات قدرة تحليل عالية .

2.10.8. فصل الأحماض الأمينية Separation of Amino Acids

يوجد في مخلوط تحليل البروتين حوالي 20 حامض أميني ، ولذلك يجب إختيار الطريقة المناسبة لفصل كل حامض أميني على حدى ، وذلك لأن فصل كل هذه الأحماض الأمينية عن بعضها البعض ليعد أمرا فى غاية الصعوبة بسبب تشابه تركيب عديد من الأحماض الأمينية مثل :

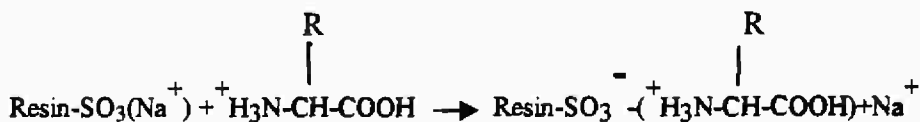


ولإجراء فصل لعشرين حامض أميني فى مخلوط يجب إستخدام طريقة للتحليل تتميز بقوة إزاحة عالية *high resolving power* ، وقد وجد أن أنسب طرق الفصل لمخلوط الأحماض الأمينية هى طريقة التبادل الأيونى *ion Exchange* ، وبعد عملية الفصل يسهل تقدير الأحماض الأمينية بعملية أوتوماتيكية على جانب كبير من الدقة بإستخدام جهاز تحليل الأحماض الأمينية . كما يمكن أن تستخدم أيضا فى فصل الأحماض الأمينية عن بعضها البعض طريقتى كروماتوجرافيا السائل ذات الطور العاكس *reversed-phase liquid chromatography* أو كروماتوجرافيا الغاز السائل " *GLC* " .

ويستخدم فى فصل الأحماض الأمينية عن بعضها البعض عادة عمود به مادة تتبادل أيونى راتنجية *ion exchange resin* من نوع حامض السلفونيك . ومادة التبادل الأيونى عبارة عن مركبات ذات وزن جزيئ عالى تتكون من بوليمرات ذائبة *soluble*

polymers يتم تحضيرها بإجراء بلمرة مشتركة للستيرين *styrene* مع البنزين ثنائي الفينيل *divinyl benzene* يعقبها عملية كبرته *sulfonation* للمركب المبلر من الستيرين-بنزين ثنائي الفينيل *styrene-divenyl benzene* فتتكون مادة التبادل الأيوني ويكون تركيبها عندئذ ثلاثى الإتجاهات من الهيدروكربون الخامل (ستيرين - بنزين ثنائي الفينيل) مع عدد كبير من مجاميع حامض السلفونيك والتي تعمل كمجاميع دالة . ويتتج هذا المركب تجاريا بدرجات مختلفة من الروابط المتقاطعة *Cross-linking* ، وبأحجام جسيمات مختلفة *variable particle sizes* ، كما قد يكون بشكل سبقيات كروية *spherical beads* أو جسيمات مطحونة *crushed particles* .

ويمكن تمثيل عملية التبادل الأيوني المستخدمة فى فصل مخلوط الأحماض الأمينية بعد معاملة التحليل (والتعادل) بواسطة المعادلة الآتية :



وتتلخص عملية فصل الأحماض الأمينية فى عمود التبادل الأيوني فى الخطوات التالية :

1- يتم ضبط pH مخلوط الأحماض الأمينية على 2.20 ويوضع على سطح مادة التبادل الأيوني *ion exchange resin* فى العمود المعبأ بها والتي سبق إجراء إتران لها بواسطة محلول منظم من سترات الصوديوم عياريته 0.2 ع حتى يضبط رقم pH مادة التبادل الأيوني عند 3.25 . وهكذا فعندما تكون الأحماض الأمينية عند pH أقل وقوة أيونية منخفضة تحل الأحماض الأمينية محل أيونات الصوديوم وترتبط بمجاميع حامض السلفونيك بواسطة التجاذب الإلكتروستاتيكي .

2- تتوقف قوة إرتباط الأحماض الأمينية بمادة التبادل الأيوني على الـ pH ، والقوة الأيونية للمحلول المنظم . حيث ترتبط الأحماض الأمينية بمادة التبادل الأيوني بقوة إرتباط معينة تعتمد على قابلية كل حامض أميني للإرتباط بمادة التبادل الأيوني *the affinity of each amino acid for the resin* . وبالتالي فبإجراء إزاحة *elution* مناسبة لتلك الأحماض الأمينية يمكن دفعها خارج العمود بترتيب معين حسب قوى إرتباطها (بمادة

التبادل الأيوني) فيخرج من عمود الفصل الحامض الأميني الأقل قوة في إرتباطه أولا ، ثم الأكثر ، فالأكثر ... وهكذا .

3- بزيادة رقم pH محلول الإزاحة تصبح مجموعة α - كربوكسيل متأينة وتكون محصلة الشحنة على الأحماض الأمينية المتعادلة *neutral amino acids* تساوى صفرا ... أى تكون قوى الإرتباط الإلكتروستاتيكية بين الأحماض الأمينية المتعادلة ومادة التبادل الأيوني منعدمة ، أما الأحماض الأمينية الحامضية *acidic amino acids* فتكون سالبة الشحنة ، وتصبح الأحماض الأمينية القاعدية *basic amino acids* موجبة الشحنة ، وحينئذ ينتج تفاعل التبادل الأيوني لجهة اليسار حيث تحدث إزاحة *elution* أولا للأحماض الأمينية الحامضية (لتنافرها مع مجموعة السلفونات في مادة التبادل الأيوني) ، ويعقبها مجموعة الأحماض الأمينية المتعادلة ، وأخيرا القاعدية .

4- تؤدي زيادة القوة الأيونية لمحلول الإزاحة لتوجيه التفاعل جهة اليسار أيضا حيث تؤدي زيادة تركيز أيونات الصوديوم لتنافسها على المراكز النشطة (مجاميع السلفونات) بمادة التبادل الأيوني فيسهل انفصال الأحماض الأمينية .

وفيما يلي بعض أهم الاعتبارات الواجب مراعاتها عند فصل الأحماض الأمينية بالتبادل الأيوني :

أ- يتم إختيار الظروف المناسبة من تركيب المحلول المنظم المستخدم في عملية الإزاحة *elution* ، وقيمة الـ pH والقوة الأيونية له وكذلك درجة الحرارة ، بحيث يمكن فصل الأحماض الأمينية المرتبطة بمادة التبادل الأيوني بترتيب متتابع ، دون حدوث تداخل حسب قوة إرتباطها بمادة التبادل الأيوني .

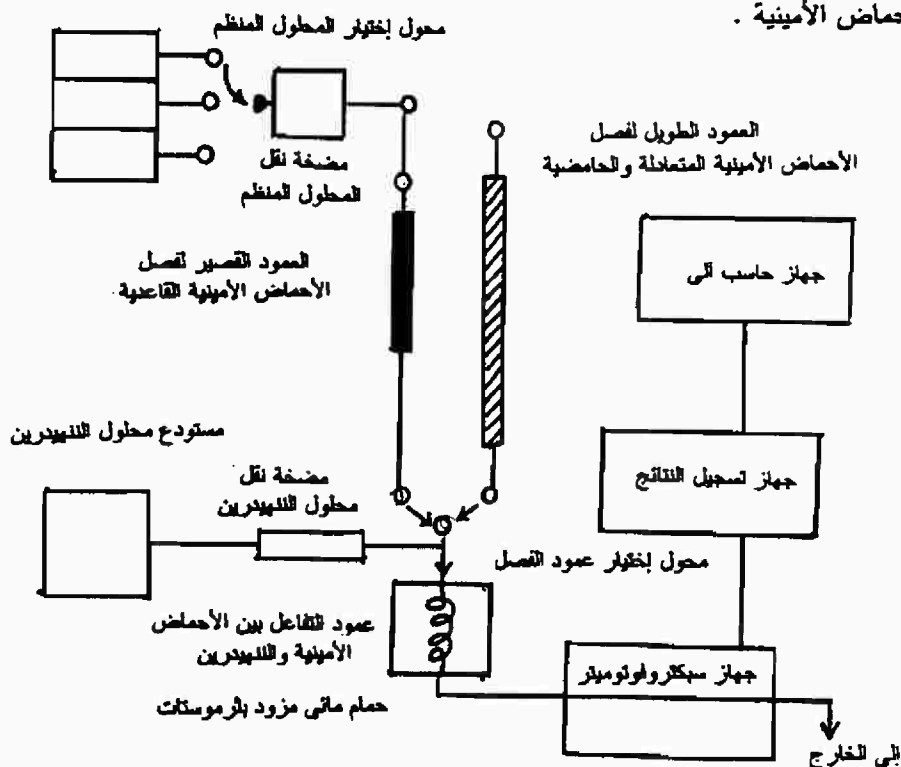
ب- يعتمد فصل الأحماض الأمينية على مادة التبادل الأيوني بصفة أساسية على عملية التبادل الأيوني والقوة الإلكتروستاتيكية لإرتباط الأحماض الأمينية بمادة التبادل الأيوني . وفى بعض الحالات تدمص بعض الأحماض الأمينية على مادة التبادل الأيوني بسبب وجود جزء غير قطبي في تركيبها فيرتبطا بواسطة قوى الإرتباط الهيدروفوبية *Hydrophobic interaction* . ويعنى ذلك أن تلك الأحماض الأمينية ترتبط بقوتين (الإلكتروستاتيكية ، والهيدروفوبية) مما يزيد من قوة الإرتباط خاصة بالنسبة

للأحماض الأمينية التي تحتوى على جزء هيدروكربونى أكبر وبذلك يخرج من العمود الجليسين قبل الألانين والسيرين قبل الثريونين ، ... وهكذا .

ج- عادة تجرى عملية فصل الأحماض الأمينية بإستخدام أكثر من عمود لزيادة كفاءة الفصل وزيادة الحساسية ، وتقليص الزمن اللازم للتحليل .

1.2.10.8. جهاز تحليل الأحماض الأمينية :

يوضح شكل (3.8) رسم تخطيطى لجهاز تحليل الأحماض الأمينية *amino acid analyzer (AAA)* الذى يعتمد نظام الفصل فيه على إستخدام عمودين لفصل الأحماض الأمينية أحدهما قصير تفصل فيه الأحماض الأمينية القاعدية عن بعضها البعض أما العمود الآخر الطويل فيستخدم لفصل باقى الأحماض الأمينية سواء المتعادلة أو الحامضية ويعمل كل عمود بنظم مختلفة للمحاليل المنظمة للحصول على أقصى كفاءة لفصل الأحماض الأمينية .

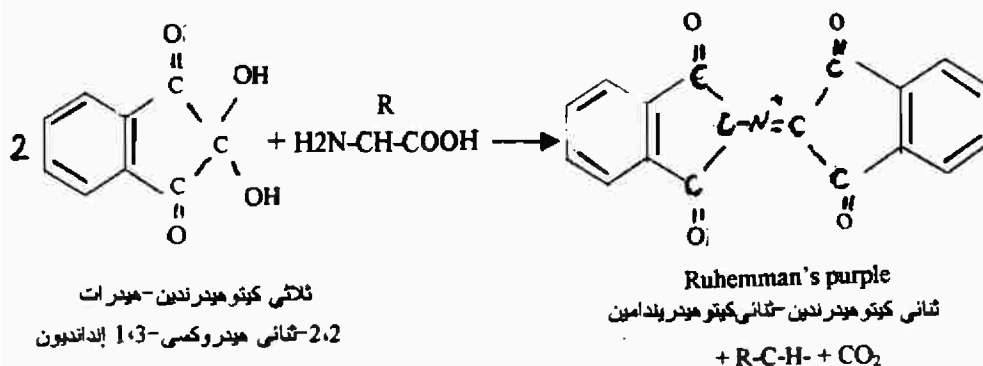


شكل (3.8) : رسم تخطيطى لجهاز تحليل الأحماض الأمينية (AAA)

2.2.10.8. فصل وتقدير الأحماض الأمينية :

- عند بداية التحليل يوضع فى العمود القصير محلول سترات الصوديوم بعبارية 0.35 ورقم pH = 5.28 ، أما العمود الطويل فيوضع فيه محلول سترات الصوديوم بعبارية 0.2 ، ورقم pH = 3.25 .
- يتم وضع مخلوط الأحماض الأمينية بعد ضبط رقم الـ pH له عند 2.2 فى كلا العمودين ، وطالما كان رقم pH محلول الأحماض الأمينية أقل من رقم pH المحلول المنظم فى كلا العمودين " *starting buffer* " فإن الأحماض الأمينية المختلفة ترتبط بقوة بمادة التبادل الأيوني (معادلة) .
- يمرر المحلول المنظم خلال العمود فتزاح *displaced* الأحماض الأمينية من على مادة التبادل الأيوني وتخرج من العمود الأحماض الأمينية الأقل فى قوة إرتباطها ثم الأقوى ، فالأقوى ... وهكذا . حيث يحدث إزاحة *elution* أولا فى العمود القصير بواسطة محلول سترات صوديوم بعباريته 0.35 ، رقم الـ pH له يساوى 5.28 ، وعند إكمال خروج الأحماض الأمينية القاعدية من العمود القصير بعد إزاحة كل حامض أميني على حدى بكمية معينة من المحلول المنظم ، نبدأ فى فصل الأحماض الأمينية الحامضية والمتعادلة باستخدام العمود الطويل .
- يبدأ تشغيل العمود الطويل باستخدام المحلول المنظم الأول المكون من سترات صوديوم بعبارية مقدارها 0.2 ، ورقم pH = 3.25 (لفصل الأحماض الأمينية الحامضية) ، وبعد خروج كل الأحماض الأمينية الحامضية تباعا من العمود الطويل فى أزمنة محددة بدقة وكمية من محلول الإزاحة تكفى لخروج كل كمية الحامض الأميني ، يستكمل الفصل فى نفس العمود باستخدام محلول سترات الصوديوم له رقم pH = 4.28 وتجدر الإشارة إلى أن المحلول المنظم المستخدم فى الفصل يدخل إلى العمودين بواسطة معدل إنسياب محدد بدقة عالية باستخدام مضخة لدفع المحلول .
- تخرج الأحماض الأمينية تباعا كل فترة زمنية وحجم محلول الإزاحة محددان بدقة وتتدخل فى عمود التفاعل حيث تقابل تيار من محلول النيهيدرين وينفع مخلوط الحامض الأميني والننيهيدرين خلال أنبوبة لولبية (لزيادة مساحة سطح التفاعل) مغمورة فى حمام

مائي مزود بثرموستات لضبط درجة حرارة التفاعل عند 100°م يكون كافيا لحدوث تفاعل كامل بين الحامض الأميني والنهيدرين كما توضحه المعادلة التالية :

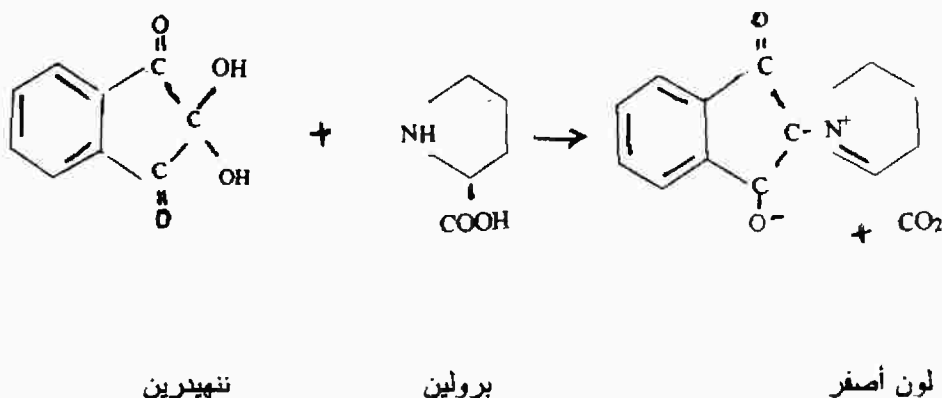


حيث تتفاعل الأحماض الأمينية مع النهيدرين ويتكون مركب معقد ناتج من الأمونيا و 2 " مول من النهيدرين يعرف باسم *Ruhemman's purple* (ذا لون بنفسجي مزرق) ناتج عن أكسدة الأحماض الأمينية بنزع مجاميع الأمين (الأمونيا) والتي ترتبط بدورها مع الـ 2 مول من مركب النهيدرين وتنتج مركبا كيميائيا يعرف باسم *diketohydrindine-diketohydrindamine* ، كما ينتج في التفاعل ألدهيد الحامض الأميني منزوع الأمين ، وثنائي أكسيد الكربون . وتفضل أن تكون درجة حرارة التفاعل 100°م ورقم الـ pH = 5 لزمن يقدر بحوالى 15 دقيقة وذلك للحصول على أقصى كمية من المعقد .

وتجدر الإشارة إلى أن كمية المعقد المتحصل عليها ترتبط بدرجة ثبات النهيدرين أثناء التفاعل ولذلك تتم حماية المحلول ، عادة ، بإضافة كلوريد الستانوس *stannous chloride* والهيدرانديناتين *hydrindantin* (الصورة المختزلة للنهيدرين) أو بواسطة السيانيد *cyanide* كذلك يدفع في كثير من الأحيان ، غاز النيتروجين الخامل في المحلول بالإضافة لذلك يحتوى محلول النهيدرين على محلول منظم قوى *strong buffer* كافى لحفظ التيار الخارج من العمود على pH = 5 .

يتميز ناتج تفاعل الأحماض الأمينية مع الننهيدرين بثباته (*Rehemman's purple*) لعدة ساعات وتقدر كميته بقياس الكثافة الضوئية عند طول موجى 570 نانوميتر.

ملحوظة : يتفاعل الننهيدرين مع الأحماض الإيمينية *Imino acids* مثل البرولين والهيدروكسى برولين ويتكون مركب مختلف كالتالى :



ويقدر تركيز المعقد الأصفر اللون عند أقصى امتصاص ضوئى للون الأصفر لطول موجى 440 نانوميتر ، لذلك يتم تغيير الطول الموجى فى جهاز الإسبكتروفوتوميتر لتقدير البرولين .

• نقرأ الكثافة الضوئية لتيار السائل الخارج من عمود التفاعل ، ويتكون جهاز الإسبكتروفوتوميتر من ثلاث أنابيب قياس *3-cuvettes* لكل منها مصدر ضوئى مستقل وخليية ضوئية ومرشح للضوء حيث :

- تضبط الأنبوبة الأولى على طول موجى 570 نانوميتر والتي تعطى أقصى امتصاص للون القرنفلى الناتج من تفاعل معظم الأحماض الأمينية مع محلول الننهيدرين.

- أما أنبوبة القياس الثانية *2nd cuvette* فتضبط على طول موجى 440 نانوميتر وهو أقصى امتصاص للون الأصفر الناتج من تفاعل البرولين مع الننهيدرين .

- وتستخدم الأنبوبة الثالثة عندما يكون حجم الـ *peak* المعبر عن تركيز ناتج تفاعل الأحماض الأمينية مع الننهيدرين والمسجل على ورق *chart* (جهاز التسجيل)

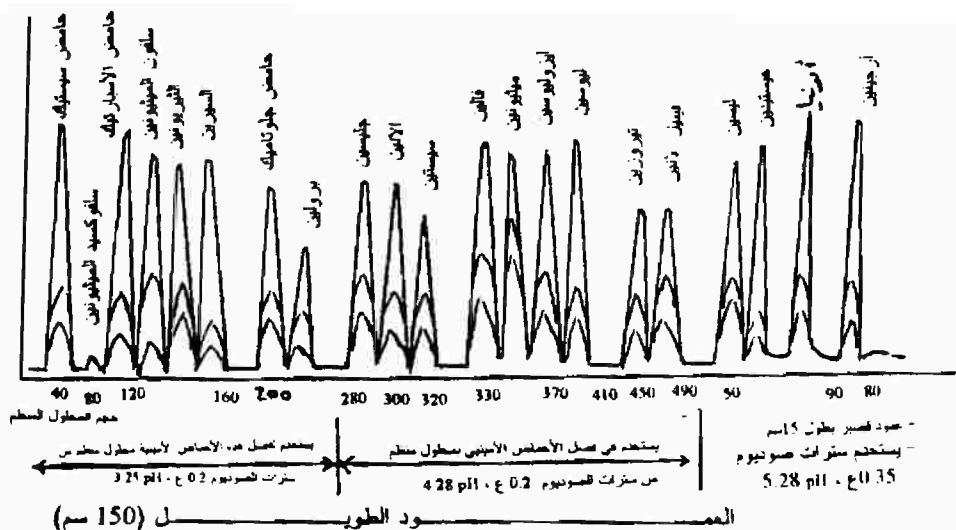
كبيراً ويزيد على مدى قراءة الكثافة الضوئية في أنبوبة القياس الأولى ، فيعطى الشكل الجديد للـ *peak* بعد تخفيض حساسية الجهاز إلى النصف أو أقل .

• تدخل البيانات التي تعبر عن ناتج تفاعل الأحماض الأمينية مع النبهيرين في جهاز كشف *detector* يعطى إستجابة لكل الأحماض الأمينية محسوبة كشق من البروتين وتعطى مدى واسع من تركيز العينات وتسجل النتائج بواسطة وحدة تسجيل *Recorder* على ورق خاص بالجهاز *chart* ، ويعطى ثلاث منحنيات " *peaks* " ، كل منحنى منها يعبر عن تركيز اللون في كل أنبوبة قياس على حدى .

• تعرف الأحماض الأمينية من منحنيات قياسية لمخاليط معلومة من الأحماض الأمينية ثم تقدر كمية كل حامض أميني بمساحة الـ *peak* المعبرة عنها (وتساوى حاصل ضرب الإرتفاع x طول القاعدة عند منتصف الإرتفاع) ، وحديثاً تتم هذه الخطوة بإستخدام أجهزة الكمبيوتر . ويعبر عن النتائج عادة بمول % وذلك بعد قسمة كمية كل حامض أميني (مقدر من الكروماتوجرام) على وزنه الجزيئى ، ثم جمع كل قيم مساحات الأحماض الأمينية لحساب مساحتها الكلية *total area* ، ثم قسمة كل منها على عدد المولات الكلى ، وضرب ناتج القسمة $\times 100$.

• وعادة ما يجرى عمل معايرة داخلية للجهاز *Internal standard* ، وعادة مايستخدم حامض أميني لا يوجد فى المنتجات الغذائية مثل النورليوسين *norleucine* .

• ويعتبر جهاز تحليل الأحماض الأمينية *AAA* من الأجهزة المرغوبة جداً ويعتبر وحدة أساسية فى معامل التحليل الكبيرة وقد إنتشر فى العالم ، وأدخلت عليه تعديلات كثيرة حسنت من حساسية ودقة القياس ، وزادت درجة الأوتوماتيكية حتى أصبحت عملية التقدير أوتوماتيكية بالكامل فى أواخر السبعينات . ويوضح شكل (4.8) ترتيب خروج الأحماض الأمينية فى جهاز تحليل الأحماض الأمينية ونوعية الأحماض الأمينية المفصولة بالعمود القصير ، وتلك المفصولة بالعمود الطويل .

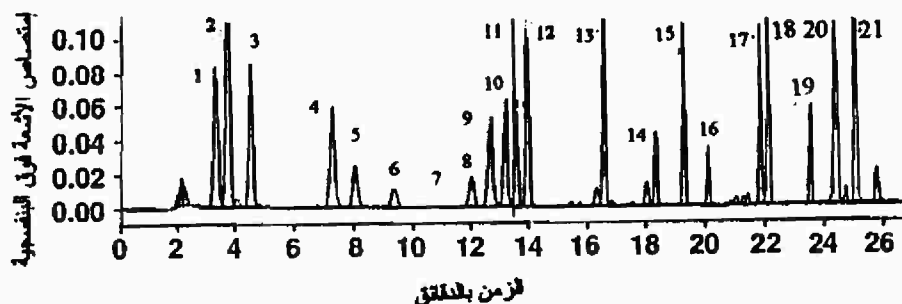


شكل (4.8): ترتيب خروج الأحماض الأمينية بعد فصلها في العمودين القصير والطويل في جهاز تحليل الأحماض الأمينية "AAA"

• استخدمت في أعمدة الفصل بالجهاز أنواع جديدة من مواد التبادل الأيوني *resins* والتي تتكون من حجم جزيئات متماثل فتزيد من سرعة الإزاحة ومعدل السريان مما يقلل الوقت اللازم للتحليل ليصبح حوالي ساعتين فقط بعد أن كان يستغرق 24 ساعة من ذي قبل .

• تم تعديل طريقة تحليل الأحماض الأمينية لتصبح صالحة للإستخدام مع كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالي *HPLC* في عام 1980 وذلك بعد إنتاج أنواع جديدة من البوليمرات *resins* تتحمل الضغط العالي ومدى واسع من تباينات درجات الحرارة ، pHs والقوى الأيونية . وفي تلك الطريقة يتم أولا تكوين شقوق للأحماض الأمينية باستخدام ثيوكرياميل الفينيل *phenylthiocarbamyl* ، ثم تتم عملية فصل مشتقات الأحماض الأمينية باستخدام كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالي والطور العاكس *reversed phase LC* ، وتقدر الأحماض الأمينية المفصولة تباعا باستخدام طريقة إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية *UV* . ويمكن بطرق كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء

العالي *HPLC* الكشف حتى عن الكميات ضئيلة جدا من الأحماض الأمينية تقدر بالبيكومول *picomole* ، وتحتاج طول فترة إجراء التقدير حينئذ 30 دقيقة أو أقل فقط . ويوضح شكل (5.8) كروماتوجرام لفصل الأحماض الأمينية في غذاء أطفال .



شكل (5.8): تحليل مشتقات ثيوكرياميل الفينيل للأحماض الأمينية في غذاء أطفال باستخدام طريقة كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالي *HPLC* ، وتم فصل الأحماض الأمينية باستخدام عمود يعمل بنظام الطور العاكس *reversed-phase column* ، وحقن مع العينة حامض التورين *Taurine* للمعايرة الداخلية للجهاز ، وكان ترتيب خروج الأحماض الأمينية كالآتي :

1- أسبارتوك ، 2- جلوتاموك ، 3- حامض للمعايرة الداخلية ، 4- سيرين ، 5- جليسين ، 6- هستيدين ، 7- ثورين ، 8- أرجينين ، 9- ثريونين ، 10- ألانين ، 11- أمونيا ، 12- بروتين ، 13- حامض للمعايرة الداخلية ، 14- تيروزين ، 15- فالين ، 16- ميثيونين ، 17- أيزو ليوسين ، 18- ليوسين ، 19- فينيل ألانين ، 20- جوه كشاف ، 21- ليسين .

11.8. طرق الفصل والتعرف على البروتينات

Protein Separation and Characterization Procedure

لايتكون بروتين أى غذاء عادة من بروتين واحد فحسب ، بل يتكون من مجموعة بروتينات متبلغة الصفات . وللتعرف على مخلوط البروتينات المكون لأى مادة غذائية يتم فصلها عن بعضها البعض إلى كل شق على حدى باستغلال الفروقات في صفاتها من حيث الذوبان ، الحجم ، كثافة ونوعية الشحنات التى تحملها ، صفات الإمتصاص ، الإستجابات

البيولوجية *biological affinities* مع جزيئات أخرى . وتستخدم تلك الصفات الطبيعية للحصول على بروتين نقي . وسنتناول في هذا الجزء بعض طرق فصل البروتينات .

وتستخدم عادة طرق الفصل في خطوات متتالية لتنقية البروتين في مخلوط الغذاء وبطبيعة الحال ، تؤدي زيادة عدد خطوات الفصل المستخدمة لزيادة درجة نقاء البروتين المفصول . وبعض المكونات الغذائية كالمركبات البروتينية *protein concentrates* يمكن إعدادها في خطوة فصل فقط واحدة ريثما أن النقاوة العالية لتلك المركبات غير مطلوبة . أما عند إعداد بروتين نقي للدراسات المعملية فغالبا ما يتم تحضيره بثلاث خطوات فصل وتنقية أو أكثر تجرى بتتابع معين حتى يتم إنتاج مستحضر بروتيني نقي . وقبل الحديث ، والخوض في غمار عمليات الفصل المختلفة ، فإنه من الأهمية بما كان للباحث أو للقائم بالعمل أن يكون على دراية كافية وإلمام بمعلومات دقيقة عن الصفات البيولوجية للبروتينات مثل الوزن الجزيئي (*MW*) ، نقطة التعادل الكهربى (*PI*) ، صفاً الذوبان ، ودرجة حرارة الذئرة ، ... إلخ. ويؤدي تميز شق البروتين بأى صفة بيوكيميائية غير عادية لسهولة فصله باستغلال تلك الصفة في الخطوات الإبتدائية لعملية الفصل . وفيما يلي إستعراض موجز لبعض طرق الفصل والتعرف على البروتينات .

1.11.8. فصل البروتينات بتباين درجات ذوبانها

Separation by differential solubility characteristics

تعتبر البروتينات إلكتروليات عديدة *polyelectrolytes* ولذلك يقدر صفات ذوبانها نوع وشحنة الأحماض الأمينية في جزيئاتها . ويمكن ترسيب البروتينات إختياريا بتغيير رقم pH المحلول المنظم ، أو قوته الأيونية ، أو الثابت ثنائى القطبية *dielectric constant* ، أو درجة الحرارة . وتتميز عملية فصل البروتينات بالترسيب بسرعة الإجراء ، كما أنها لا تتأثر بباقي مكونات المادة الغذائية (مثل الكربوهيدرات ، الليبيدات ، ... إلخ) ، وتفضل دائما عمليات الترسيب عندما نتعامل في التحليل مع كمية كبيرة من المادة موضع الفصل ، وعادة ما تستخدم عملية الترسيب في المراحل الأولى لعمليات التنقية .

1.1.11.8 طرق الترسيب :

الترسيب بالأملاح *Salting out* : للبروتينات صفات فريدة لذوبانها في محاليل الأملاح المتعادلة . فعادة ما تزداد درجة ذوبان البروتينات في التركيزات المنخفضة من المحاليل الملحية بسبب زيادة المراكز الهيدروفيلية (المحبة للماء) في البروتينات ، ثم تترسب البروتينات من محاليلها بزيادة القوة الأيونية للمحلول الملحي . وتستخدم تلك الصفة لترسيب البروتينات بالتتابع في مخلوط معقد منها بتغيير تدريجي في تركيز المحلول الملحي .

ومن الشائع استخدام كبريتات الأمونيوم $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ لسهولة ذوبانها وتستخدم الأملاح المتعادلة الأخرى مثل كلوريد الصوديوم ، وكلوريد البوتاسيوم لترسيب البروتينات .

وعادة تجرى عملية الفصل على خطوتين لزيادة كفاءة الفصل ، ففي الخطوة الأولى تضاف كبريتات الأمونيوم بتركيز أقل قليلا من التركيز اللازم لترسيب شق البروتين المزمع فصله ، وعند إجراء طرد مركزي لهذا المحلول تترسب البروتينات الأقل ذوبانا بينما تظل البروتينات المطلوب فصلها ذائبة في المحلول . ثم تجرى الخطوة الثانية بزيادة تركيز كبريتات الأمونيوم بحيث يكون أعلى قليلا من التركيز اللازم لترسيب البروتين المطلوب . وعند الطرد المركزي لهذا المحلول ، يترسب البروتين موضع الدراسة ، بينما تظل البروتينات الأكثر ذوبانا في الجزء الطافي غير المترسب *supernatant* . ومن أهم عيوب تلك الطريقة أن البروتين المترسب يعلق به كمية من البروتين غير المترسب . ويفضل دائما إزالة الأملاح قبل إعادة إذابة راسب البروتين المفصول في محلول منظم . وهناك جداول ومعادلات متاحة في مراجع الكيمياء الحيوية لحساب الكمية بالضبط من كبريتات الأمونيوم اللازمة لتحضير تركيز معين لإجراء هذه العملية بدقة وكفاءة عالية .

2.1.11.8 الترسيب عند نقطة التعادل الكهربى *Isoelectric precepitation (PI)* :

نقطة التعادل الكهربى للبروتين *(PI)* هي رقم الـ pH الذى تصل عنده محصلة الشحنة الصافية على البروتين إلى الصفر . وعندئذ يتجمع البروتين ويترسب لأنه لا توجد قوى تنافر بين جزيئاته تسبب إنتشاره في المحلول . وللبروتينات المختلفة نقطة تعادل كهربى تختلف ، ولذلك فيمكن فصلها عن بعضها بضبط رقم pH محلولها عند قيمة نقطة

التعادل الكهربى الخاصة بكل بروتين . فعند ضبط رقم pH المحلول المكون من مخلوط بروتينات عند نقطة التعادل الكهربى لبروتين ما من هذه البروتينات يترسب هذا البروتين بينما لا يترسب البروتينات الأخرى ذات نقط التعادل الكهربى المغايرة لهذا البروتين . وبعد فصل البروتينات المترسبة عند نقطة تعادلها الكهربى يمكن إعادة إذابتها مرة أخرى بتغيير رقم الـ pH لمحلولها سواء لأقل أو لأعلى من نقطة التعادل الكهربى.

3.1.11.8. فصل البروتينات بالمذيبات

Solvent fractionation

يحدد ثابت قطبية *dielectric constant* البروتين فى محلول ما رقم الـ pH ، والقوة الأيونية لهذا المحلول . وبذلك يمكن فصل البروتينات اعتمادا على تباين درجة ذوبانها فى مخاليط المذيبات العضوية والماء . فبإضافة مذيب عضوى يختلط بالماء مثل الأسيتون أو الإيثانول يقل ثابت قطبية المحلول الناتج وتقل درجة ذوبان معظم البروتينات فيه نتيجة خفض درجة تأين الأحماض الأمينية ذات الشحنات الكهربائية ، فتميل البروتينات للتجمع والذئثرة . وتتباين الكمية اللازمة من المذيبات العضوية التى تسبب ترسبا للبروتينات من 5 إلى 60 % . وعادة ما تجرى عملية الفصل للبروتينات بالمذيبات على صفر°م أو أقل تجنباً لذئثرة تلك البروتينات بسبب الزيادة الناجمة فى درجة الحرارة عند خلط المذيبات العضوية بالماء .

4.1.11.8. ذئثرة البروتينات الملوثة للبروتين المفصول

Denaturation of contaminating proteins

عند فصل بروتين معين من مخلوط بروتينات فى محلول يفضل ترسيب بعض البروتينات الأخرى سواء بالحرارة أو بتغيير أرقام الـ pH لتجنب ترسيب تلك البروتينات مع البروتين موضع الدراسة .

ويوضح جدول (5.8) الذوبان النسبى لبعض البروتينات فى كبريتات الأمونيوم والأسيتون ، ودرجة الثبات الحرارى لتلك البروتينات على 55°م ويمكن إستخدام تلك

الطرق الثلاثة لفصل مخلوط البروتينات إلى شقوق بروتينات كل ، شق بمفرده وذلك لتحضير بروتينات عضلات بدرجة نقاء عالية .

جدول (5.8): الظروف المثالية لفصل بروتينات العضلات الذائبة في الماء باستخدام طرق إذابة مختلفة

الإنزيم	كبريتات أمونيوم على pH = 5.5 ، درجة حرارة 10° م	كبريتات أمونيوم على pH = 6.5 ، درجة حرارة 5° م	كبريتات أمونيوم على pH = 5.5 ، درجة حرارة 55° م
	% للنشيع	% (ج / ج)	
الفوسفوريلاز <i>Phosphorylase</i>	40 - 30	30 - 18	غير ثابت
البيروفات كينيز <i>Pyruvate kinase</i>	65 - 55	40 - 25	ثابت
الألدوليز <i>Aldolase</i>	55 - 45	40 - 30	ثابت
لاكتات ديهيدروجينيز <i>Lactate dehydrogenase</i>	60 - 50	35 - 25	ثابت
الإنوليز <i>Enolase</i>	75 - 60	45 - 35	غير ثابت
كرياتين كينيز <i>Creatine-kinase</i>	80 - 60	45 - 35	غير ثابت
الفوسفوجليسرات كينيز <i>Phosphoglycerate kinase</i>	75 - 60	60 - 45	ثابت
الميوجلوبيين <i>Myoglobin</i>	90 - 70	60 - 45	غير ثابت

المصدر:

Briskey, E.J., Cassens, R.G. and Marsh, B.B. 1970. *The physiology and Biochemistry of Muscle as a Food*. Univ. of Wisconsin press.

وتستخدم طريقة فصل البروتينات بصفات ذوبانها وترسيبها إستخداما تجاريا وصناعيا في إنتاج مركبات البروتين . حيث يمكن إنتاج مركبات الصويا من رقائق الصويا منزوعة الدهن ودقيق الصويا باستخدام الطرق التي أوجزناها سابقا . فعلى سبيل المثال ، يمكن ترسيب بروتينات الصويا من المكونات الأخرى الذائبة في رقائقه أو دقيقه باستخدام محلول تركيزه من 60 إلى 80 % ثم الترسيب عند نقطة التعادل الكهربى على pH = 4.5 (نقطة التعادل الكهربى لعدد من بروتينات الصويا) ، أو الترسيب بواسطة الننترة بالحرارة الرطبة . وتستخدم تلك الطرق لإنتاج مركبات بروتينية تزيد فيها نسبة

البروتين عن 65 % . ويمكن بدمج طريقتين أو ثلاث طرق للفصل سويا وإجراءهم بالتتابع إنتاج معزول بروتين *protein isolate* الصويا والذي تصل نسبة البروتين فيه إلى 90 % .

5.1.11.8. فصل البروتينات بالإمصاص

Separation of proteins by adsorption

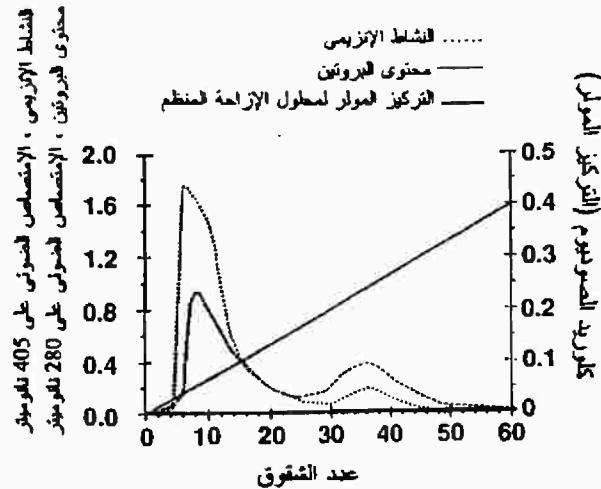
تعرف كروماتوجرافيا الإصاص بأنها طريقة لفصل المركبات بإمصاصها على سطح مادة صلبة ثم نزعها *desorption* من على سطح المادة المدمصة الصلبة بواسطة مذيب يذيب تلك المركبات طبقا لقوة إرتباطها بالإمصاص . فتنفصل المركبات (البروتينات) الأقل إرتباطا بكمية أقل من محلول الإزاحة ، وهكذا . وسنتناول بإيجاز نوعين من نوعيات كروماتوجرافيا الإصاص ، وهما كروماتوجرافيا التبادل الأيوني ، وكروماتوجرافيا الإستجابة *affinity* .

* كروماتوجرافيا التبادل الأيوني *Ion exchange chromatography* :

تعرف كروماتوجرافيا التبادل الأيوني كعملية تبادل الإصاص بين جزيئات البروتينات المشحونة ، والأيونات بالمحلول المنظم ويتم ذلك على سطح المادة الحاملة الصلبة الراتنجية . وتعرف المادة الصلبة *matrix* التي تحمل شحنات موجبة بالمبادل الأنيوني *anion exchanger* ويرتبط هذا المبادل الأنيوني بالأيونات أو الجزيئات سالبة الشحنة . ويطلق على المادة الصلبة الحاملة للشحنات المعاكسة بالمبادل الكاتيوني *cation exchanger* ويرتبط بالأيونات أو الجزيئات موجبة الشحنة . ومن أكثر أنواع المبادلات الأنيونية شيوعا مشتق ثنائي إيثيل أمينو إيثيل *diethylaminoethyl* ويليه شيوعا مائتي الكربوكسى ميثيل ، والفوسفوكاتيون .

وعند فصل البروتينات باستخدام المبادلات الأيونية تدمص بعد ضبط رقم pH والقوة الأيونية للمحلول المنظم لمعظمه درجة إستجابة البروتين للمادة المدمصة . ثم تراح *are eluted* البروتينات موضع الإعتبار إختياريا من عمود الفصل بتغيير القوة الأيونية والـ pH تدريجيا لمحلول الإزاحة ، حيث يؤدي تغيير تركيب محلول الإزاحة المنظم

eluting buffer لتغيير كثافة شحنات البروتين ، فتقل قابليتها للإمصاص على مادة التبادل الأيوني ، فتخرج من العمود البروتينات الأقل قوة ارتباطاً ثم الأكثر ، فالأكثر... وقد يحتاج الأمر لفصل مزيد من البروتينات أو لتحسين كفاءة الفصل بتغيير تركيب محلول الإزاحة المنظم . ويوضح شكل (6.8) عملية إزاحة لأيزوزيمي ألفا جلاكتوزيداز *α-galactosidase* على عمود تبادل أيوني معبأ بالكربوكسي ميثيل سليولوز .



شكل (6.8): الإزاحة لأيزوزيمين من الـ β -جلاكتوزيدان على عمود تبادل أيوني من الكربوكسي ميثيل سليولوز.

* كروماتوجرافيا الإستجابة (المؤلفة) *Affinity chromatography* :

كروماتوجرافيا الإستجابة أو المؤلفة هي أحد أنواع كروماتوجرافيا الإدمصاص ، وفيها يفصل البروتين بواسطة مادة صلبة حاملة تحتوي على مادة ارتباط تعاوني *ligand* *covalently* عبارة عن جزئ له صفات ارتباط عكسية ومتخصصة وفريدة للبروتين المراد فصله . ومن أهم أنواع مواد الإرتباط مثبتات الإنزيمات ، والمواد المتفاعلة مع الإنزيمات *Enzyme substrate* ومرافقات الإنزيمات *Coenzymes* ، الأجسام المضادة *antibodies* وبعض الصبغات الخاصة . ويمكن إعداد تلك المواد في المعمل أو شراؤها من متاجر الكيماويات .

وفصل البروتينات بتلك الطريقة يمرر مخلوط البروتين الذائب فى محلول منظم خلال عمود يحتوى على مادة الارتباط التعاونى المرتبطة بمادة صلبة حاملة لها . ونتيجة لتركيب المحلول المنظم من قوة أيونية ورقم pH ، وتركيز البروتين وكذلك درجة حرارته يرتبط البروتين مع مادة الارتباط على سطح المادة الحاملة لها . أما البروتينات الأخرى غير ذات العلاقة والتي لا تستجيب لمادة الارتباط فإنها تخرج من العمود *are eluted* دون ارتباط به . يتم بعد ذلك تفكيك إدمصاص أو ارتباط البروتين موضع الدراسة من مادة الارتباط بالعمود باستخدام محلول إزاحة مغاير من حيث رقم الـ pH ، درجة الحرارة أو تركيز الملح وقوته الأيونية فينفصل البروتين أو شقوق البروتينات تباعا من العمود طبقا لقوى ارتباطها .

هذا وتعتبر طريقة كروماتوجرافيا الإستجابة من الطرق ذات الكفاءة العالية فى فصل شقوق البروتينات وتعتبر ثانى أهم طريقة من طرق تنقية البروتينات . ويصل مستوى متوسط عملية التنقية التى تصل إليها بإجراء كروماتوجرافيا الإستجابة حوالى 100 ، برغم أن هناك بعض الأبحاث أشارت إلى أنه يمكن أن يصل مستوى التنقية لقر 1000 مرة. ويؤخذ فقط على هذه الطريقة أنها تستهلك وقتا طويلا فى عملية الإعداد لإجراءها لأنه يجب ضبط عديد من المتغيرات للوصول للظروف المثلى للتنقية. كما أن مواد الارتباط أكثر تكلفة من وسائط الفصل الأخرى .

• كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى :

High performance liquid chromatography:

تعتبر كروماتوجرافيا السائل ذات الأداء العالى " *HPLC* " من الطرق الحديثة ، والتي يمكن إستخدامها لفصل البروتينات عن بعضها البعض . هذا وقد كان نجاح تلك الطريقة بسبب إستحداث مواد تعبئة فى أعمدة الفصل تتحمل الضغط العالى المستخدم فى هذه الطريقة ، ولها أحجام جسيمات ومسامية مناسبة .

6.1.11.8. فصل البروتينات متباينة الأحجام

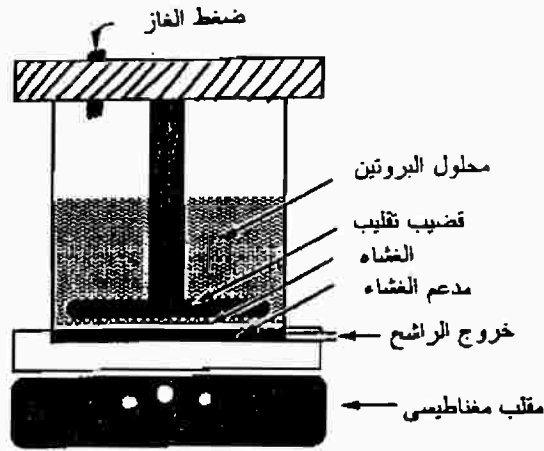
Separation by size

يتراوح الوزن الجزيئي للبروتينات من 10000 إلى ما يربو على المليون دالتون ، ويعنى ذلك أن حجم جزيئات البروتينات يعتبر أحد المعايير الهامة والصفات التي يجب إستغلالها في فصل البروتينات . وبذلك يمكن فصل البروتينات المتباينة في أنصاف أقطار جزيئاتها . وقد تتساوى البروتينات أو تقترب أوزانها الجزيئية من بعضها البعض ولكنها تختلف في متوسط أنصاف أقطارها ولذلك يمكن فصلها بسهولة برغم تماثل أوزانها الجزيئية .

2.11.8. بعض طرق الفصل *Procedures*

1.2.11.8. الديليسة *Dialysis*: من الطرق البسيطة لفصل البروتينات وتنقيتها عندما تكون في صورة محلول ويتم ذلك باستخدام أغشية شبه منفذة *semipermeable membranes* تسمح بالمرور من خلالها ، فقط ، للجزيئات الأصغر من سعة ثقب الغشاء . ولإجراء عملية ديلسة يوضع محلول البروتين في كيس يتكون من الغشاء شبه المنفذ حيث يقلل أحد طرفيه قفلا كاملا ويربط أو يشبك الطرف الآخر . ويوضع الكيس المحتوى على محلول البروتين في حجم كبير من الماء أو المحلول المنظم (يبلغ من 500 - 1000 مرة قدر حجم محلول البروتين بداخل كيس الغشاء شبه المنفذ) ، ويحرك الكيس ببطئ فتنتشر الجزيئات ذات الأحجام الصغيرة (أقل من ثقب الغشاء) من داخل الكيس إلى الخارج للماء أو المحلول المنظم بينما يدخل الماء أو المحلول المنظم لداخل الكيس . وتعتبر طريقة الديليسة من طرق الفصل البطيئة ويستغرق زمن إنجازها حوالي 12 ساعة، وعادة يتم تغيير المحلول المنظم لزيادة كفاءة الفصل . وعادة ما يخفف محلول البروتين أثناء عملية الديليسة بسبب اختلاف القوى الإسموزية بين المحلول المنظم (أو الماء) ومحلول البروتين داخل الكيس الغشائي . إلا أنه يمكن إستخدام نفس هذه الطريقة في تركيز البروتين بتغطية كيس الديليسة المحتوى على محلول البروتين بالبولي إثايلين جليكول فيمتص الماء أو المحلول المنظم ويزداد تركيز المحلول البروتيني داخل الكيس .

2.2.11.8. الترشيح الفائق *Ultrafiltration* : تعتبر طريقة الترشيح الفائق من الطرق التي يستخدم فيها غشاء شبه منفذ لفصل المركبات على أساس تباين أحجامها ، أيضا ، إلا أنها تتميز باستخدام الضغط أثناء الفصل للإسراع من عملية إخراج الجزيئات غير المرغوبة من خلال الغشاء شبه المنفذ . وتوجد أغشية شبه منفذة متوفرة لحجز الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية من 500 إلى 300000 . حيث تحتجز الجزيئات الأكبر من درجة نفذية الغشاء شبه المنفذ داخل الغشاء وتصبح جزء من المكونات المحتجزة *retentate* بينما تمر الجزيئات الأصغر من خلال الغشاء وتصبح جزءا من الراشح (انظر شكل 7.8) .



شكل (7.8) شكل تخطيطي لوحدة ترشيح فائق بمقلب *Stirred ultrafiltration*

ويستخدم الترشيح الفائق لتركيز محلول البروتين ، وإزالة الأملاح ، وتبديل المحلول المنظم ، أو لفصل شقوق البروتينات عن بعضها البعض اعتمادا على حجمها حيث تحتجز داخل الأغشية البروتينات الأكبر حجما من سعة ثقب الغشاء وتتدفق من خلالها إلى الراشح البروتينات الأقل حجما .

وهناك أنواع عديدة من أجهزة الترشيح الفائق المتاحة تجاريا سواء العملية أو المستخدمة في الإنتاج وخاصة الوحدات المستخدمة في الإنتاج المستمر للجبن . ويوضح شكل (7.8) رسما تخطيطيا لوحدة ترشيح فائق ، حيث يرشح محلول البروتين (في خلية بها مقلب) خلال غشاء شبه منفذ بواسطة ضغط غازي فيحتجز المحلول المركز للبروتينات والذي تكون أحجام جزيئاته أكبر من تقوَب الغشاء داخل الخلية .

3.2.11.8. كروماتوجرافيا الفصل بالإقصاء الحجمي:

Size exclusion chromatography:

وتعرف أيضا تلك الطريقة بإسم كروماتوجرافيا الترشيح بالجيل *Gel filtration* أو كروماتوجرافيا نفاذية الجيل *Gel permeation* . وهي طريقة من طرق الفصل في الأعمدة وتستخدم لفصل شقوق البروتينات اعتمادا على تباين أحجامها . حيث يعبا العمود بمواد متبلرة مثل الأجاروز أو الدكستران تكون أشكال جسيماتها عبارة عن كريات سبحية مسامية وعند مرور محلول بروتينات من خلال تلك المواد المتبلرة ، تخرج الجزيئات الكبيرة من تقوَب الكريات السبحية وتتحرك بسرعة في العمود وتزاح منه في وقت قصير ، أما الجزيئات الصغيرة الحجم فتتدخل في تقوَب الكريات السبحية *pores of the beads* وتتأخر في سرعة مرياتها ومن ثم تتحرك ببطئ شديد خلال العمود . أما الجزيئات متوسطة الحجم فتتحرك بسرعة متوسطة وتخرج من العمود بعد الجزيئات الكبيرة . ويعنى ذلك أن جزيئات شقوق البروتين تزاح من العمود بترتيب تنازلى الأكبر حجما ، فالمتوسطة الحجم ، وأخيرا الأقل حجما .

هذا ويتوفر في متاجر الكيماويات المواد المتبلرة السبحية ذات أحجام المسام المتباينة والتي تسمح بفصل البروتينات ذات الأوزان الجزيئية والأحجام المختلفة . وتوجد قائمة بحدود الأوزان الجزيئية لكل نوع من أنواع البروتينات ولأصناف الجيل (المواد المتبلرة) المنفذة له .

وتستخدم كروماتوجرافيا الإقصاء الحجمي *Size exclusion chromatography* لإزالة الأملاح ، وتغيير المحاليل المنظمة ، وفي فصل مخلوط من البروتينات إلى شقوقه كل على حدى ، وكذلك لتقديرات الأوزان الجزيئية للبروتينات . وعند إستخدام هذه الطريقة في تقدير الأوزان الجزيئية تكون نسبة الخطأ في حدود $\pm 10\%$. ويتم تقدير

الوزن الجزيئي برسم منحنى للعلاقة بين حجم الإزاحة للبروتين *elution volume* مقابل لوغاريتم الوزن الجزيئي لمجموعة بروتينات معروفة الوزن الجزيئي ، فينتج خط مستقيم ، وعند معرفة حجم إزاحة البروتين المجهول يمكن تقدير لوغاريتم وزنه الجزيئي ومن ثم الوزن الجزيئي للبروتين المجهول .

3.11.8. فصل البروتينات بالهجرة في المجال الكهربى (الإلكتروفوريسيس)

Separation by electrophoresis

1.3.11.8. إلكتروفوريسيس جيل البولى أكريلاميد :

Polyacrylamide Gel Electrophoresis :

يعرف الإلكترافوريسيس بعملية هجرة الجزيئات المشحونة فى محلول باستخدام مجال كهربائى يحرك تلك الجزيئات . ومن أشهر أنواع الإلكترافوريسيس ذلك المسمى إلكترافوريسيس المناطق *zonal electrophoresis* حيث يتم فصل البروتينات من مخلوطها المعقد إلى مناطق (حزم) بعد هجرتها فى محاليل منظمّة من خلال بوليمر يطلق عليه جيل ، حيث تتحرك البروتينات منفصلة عن بعضها البعض لتباين سرعة حركتها فى المجال الكهربى طبقا لكثافة شحناتها . ومن أكثر أنواع الجيل شيوعا جيل البولى أكريلاميد . وتوجد أنواع أخرى من الجيل كجيل النشا أو الأجاروز قد تستخدم فى بعض طرق فصل مخلوط البروتينات إلى الشقوق المختلفة . ويتم عادة تكوين مادة الجيل بشكل أنبوى فى أنابيب زجاجية أو على صورة شرائح يتم تشكيلها بين لوحين زجاجيين . ويعتمد الفصل وسرعة حركة الشق البروتينى على الجيل على عاملين أساسيين ألا وهما ، إحتكاك *friction* البروتين أثناء سريانه على الجيل ، وكذلك على الشحنة التى يحملها جزئ البروتين . وتعتبر المعادلة الآتية عن قابلية الجزيئات للحركة أو للانتقال :

$$\text{مقدار القوالت } \times \text{كسبة صافى الشحنة على الجزئ} = \text{قابلية الجزئ للحركة أو للانتقال } = \text{mobility}$$

مقاومة حركة الجزئ بالإحتكاك مع الجيل

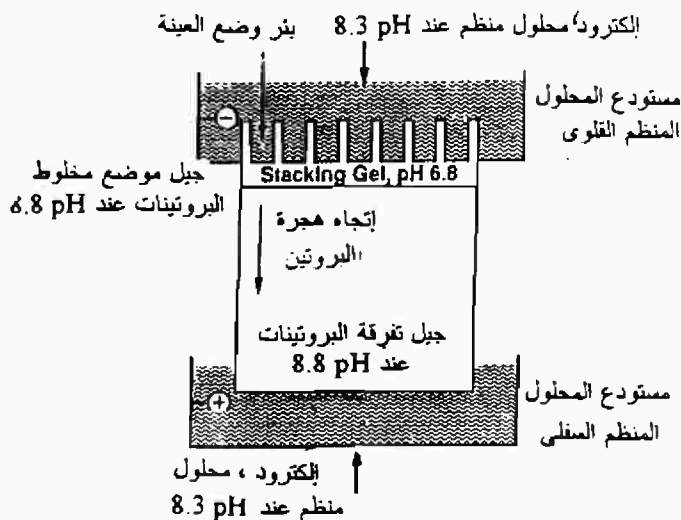
وتكون محصلة الشحنة على البروتينات إما موجبة أو سالبة ويعتمد ذلك على pH المحلول البروتين وعلى نقطة التعادل الكهربى للبروتين . ويحمل البروتين شحنة موجبة إذا كان pH المحلول المذاب فيه البروتين أقل من نقطة تعادلته الكهربى " PI " ، ويكون محملا بشحنة سالبة إذا كان pH المحلول أعلى من نقطة التعادل الكهربى للبروتين . وتعتمد المسافة التى يتحركها (يهاجرها) البروتين على الجيل على كثافة الشحنة ومقدار الفولت المضاف وذلك على نوع معين من الجيل . فكلما زادت كثافة الشحنة وزاد مقدار الفولت (فرق الجهد) المضاف زادت المسافة التى ستهاجرها البروتينات (تتحركها) فى المجال الكهربى. ويضاف أيضا للعاملين السابقين المؤثران على مقدار هجرة البروتينات فى المجال الكهربى عاملى حجم الجزيئ وشكله . وتقل درجة سريان *mobility* البروتينات على الجيل كلما زاد إحتكاك البروتينات بسبب زيادة نصف قطرها ، كما يؤدى النقص فى حجم الثغور والمسافات البينية فى مادة الجيل للنقص أيضا فى درجة نوبان البروتينات . وعلى العكس من ذلك كلما صغر حجم جزيئ البروتين زادت سرعة هجرته خلال مادة الجيل .

ومن الطرق الأخرى للإلكتروفوريسيس والمستخدمه فى فصل البروتينات " إلكتروفوريسيس الدنترة " . وفى تلك الطريقة يستخدم مع جيل البولى أكريلاميد ، منظم أنيونى وهو كبريتات دوديسيل الصوديوم *sodium dodecyl sulphate (SDS)* ويتم به فصل تحت وحدات *subunits* البروتينات طبقا لحجمها . وعادة يحتوى المحلول المنظم المستخدم فى الفصل على الـ *SDS* ومادة مختزلة . فتتفكك البروتينات إلى تحت وحداتها ومن أمثلة المواد المختزلة المستخدمة فى هذه الطريقة مواد الميركابتويثانول ، وثنائى الثيوريتول *dithioreitol* واللثان تختزلان الروابط ثنائية الكبريت *disulfide bonds* فى تحت وحدات البروتين أو ما بين تحت وحداته *between subunits* وتصبح البروتينات التى ترتبط بكبريتات دوديسيل الصوديوم *SDS* سالبة الشحنة وتفصل بالإلكتروفوريسيس اعتمادا على حجمها فقط .

2.3.11.8. الطرق : Procedures :

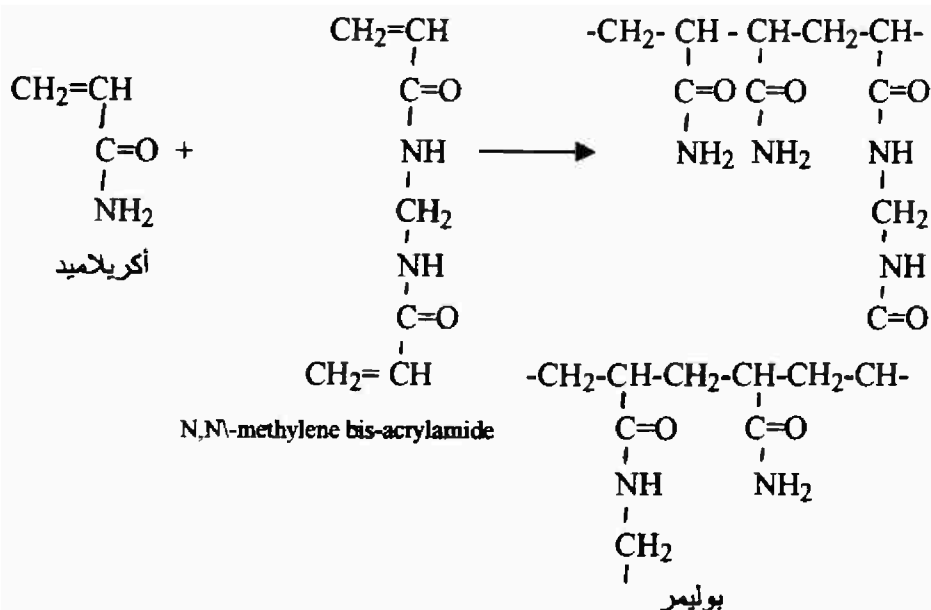
يتكون جهاز الإلكتروفوريسيس من مصدر التيار الكهربى *power supply* ، ومادة جيل البولى أكريلاميد ، ومستودعين للمحلول المنظم ويظهر فى شكل (8.8) وحدة تمثل

جهاز إلكتروفورييسيس يوضع فيه الجيل من نوع الشرائح *slab gel* ويستخدم المصدر الكهربى لإنتاج تيار ثابت بفرق جهد يمكن ضبطه بدقة . وينظم إلكتروود المحلول المنظم الـ pH للمحافظة على الشحنة المناسبة على البروتين ثم يوصل التيار الكهربى خلال جيل البولى أكريلاميد . وتشمل أنظمة المحاليل المنظمة ، محلول منظم أنيونى ألا وهو *tis-(hydroxymethyl)amino methane* مع الجيل الذى يتحرك عليه البروتين عند رقم $\text{pH} = 8.8$ ، وكذلك محلول خلات كاتيونى *cationic acetate buffer* عند $\text{pH} = 4.3$.



شكل (8.8): شكل تخطيطى لجهاز إلكتروفورييسيس لفصل البروتين على جيل من نوع الشرائح *slab gel*

ويتم تشكيل مادة جيل البولى أكريلاميد ببلمرة الأكريلاميد مع كمية قليلة (5 % أو أقل) من دليل الروابط المتقاطعة *N,N-methylenebisacrylamide* فى وجود عامل لمسى هو رباعى الميثيلين ثنائى الأمين *tetramethylenediamine* (TEMED) ، ومصدر للشقوق الحرة وهو مركب فوق كبريتات الأمونيوم *ammonium persulfate* كما هو مبين بالمعادلة الآتية (شكل 9.8) :



شكل (9.8) : تفاعل بلمرة الشقوق الحرة للبولي أكريلاميد

ويمكن إعداد الجيل في المعمل أو شرائه جاهزا .
وتستخدم عادة مادة جيل غير مستمر لتحسين مريان البروتين خلال هذا المخلوط المعقد . وتتكون مادة هذا الجيل من جزء متكسد *stacking gel* له مسام كبيرة (عادة من 3 - 4 % أكريلاميد) وجيل للسريان *resolving gel* ذي حجم مسام أصغر .
ويستخدم الجزء المتكسد من الجيل كم هو واضح من تسميته لتكديس أو لتركيز البروتين في مناطق ضيقة جدا *very narrow bands* قبل دخوله إلى جيل السريان .
وعند $\text{pH} = 6.8$ يحدث تدرج في الجهد بين الكلوريد (بشحنه السالبة العالية) والجليسين (ذا الشحنة السالبة المنخفضة) في المحلول المنظم للإلكترود . والذي يعمل على حجز وتكديس البروتينات في مناطق ضيقة جدا بين الأيونات . وتؤدي الهجرة في جيل السريان عند قيم pH مختلفة لقطع وظهور التدرج في فرق الجهد مما يسمح بفصل البروتينات إلى مناطق منفصلة ومحددة *discrete bands* .

وعادة يجرى إختيار حجم ثقوب جيل السريان طبقا للوزن الجزيئى للبروتينات ويتباين كذلك بتبديل تركيز الأكريلاميد فى المحلول . وعادة ما تفصل البروتينات على جيل سريان يحتوى على 4 - 15 % من الأكريلاميد . وتستخدم تركيزات الأكريلاميد التى تصل حتى 15 % ، غالبا ، فى فصل البروتينات التى يقل وزنها الجزيئى عن 50000 دالتون . أما تلك البروتينات التى يزيد وزنها الجزيئى عن 500000 دالتون فيتم فصلها على تركيز جيل أكريلاميد أقل من 7 % . وقد يتم إستخدام جيل متدرج فى التركيز يزداد فيه تركيز الأكريلاميد من قمة الجيل إلى قاعدته وذلك لفصل مخلوط بروتينات على مدى واسع من الأوزان الجزيئية .

ولأداء عملية الفصل ، توضع البروتينات فى المحلول المنظم عند رقم الـ pH المناسب فى قمة الجيل المتكدس ، ثم تضاف صبغة البروموفينول الزرقاء لمحلول البروتين . وتلك الصبغة عبارة عن جزيئات صغيرة تهاجر أمام البروتينات وتستخدم لتبين تقدم عملية الهجرة والفصل . وعقب إنتهاء عملية السريان فى جهاز الإلكتروليسيس يتم إظهار مناطق (حزم) شقوق البروتينات على الجيل بإستخدام صبغة مناسبة للبروتين كصبغة كوماسى الزرقاء اللمعة *Coomassie brilliant blue* أو صبغة فضة *silver stain* . كما يمكن أيضا إستخدام صبغات إنزيمية متخصصة أو أجسام مضادة معينة للكشف عن نوع محدد من البروتين .

وبعد ذلك يتم حساب الحركة النسبية أو الإلكترولفوريتية (R_m) لكل حزمة بروتين انفصلت بهذا النظام كما يلى :

$$\text{الحركة النسبية } (R_m) = \frac{\text{المسافة التى قطعها البروتين المهاجر من بداية جيل السريان}}{\text{المسافة بين بداية جيل الفصل وطول مسار الصبغة}}$$

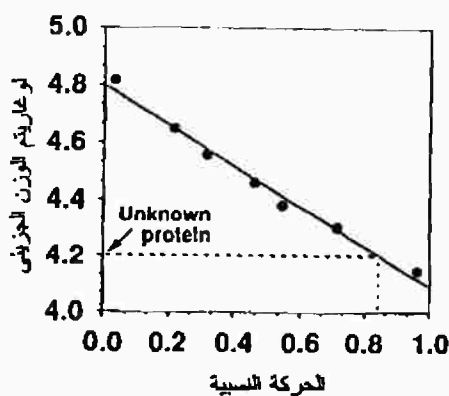
وفيما يلى بعض أهم الإعتبارات والتطبيقات أثناء فصل البروتينات بالإلكترولفوريسيس:

1- يستخدم الإلكترولفوريسيس غالبا لتقدير تركيب بروتين المواد الغذائية حيث يمكن التعرف على التباين الذى يحدث فى تركيب مركبات بروتينات الصويا أو شرش اللبن عند إنتاجهما بطرق فصل أو تركيز مختلفة .

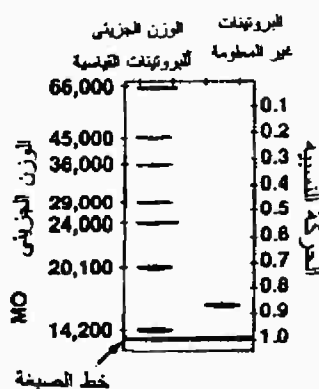
2- يستخدم كذلك الإلكترولفوريسيس فى تقدير درجة نقاء مستخلص البروتين .

3- كما يمكن باستخدام طريقة جيل بولي أكريلاميد مع كبريتات دوديسيل الصوديوم تقدير تركيب تحت وحدات البروتين *protein subunits* وكذلك الوزن الجزيئي لشقوق تلك البروتينات ، وعندئذ تكون نسبة الخطأ فى حدود 5 % .

4- يقدر الوزن الجزيئي للبروتينات بمقارنة الحركة النسبية (R_m) التى قطعتها تحت وحدة البروتين مع R_m بروتين قياسى ذا وزن جزيئى معلوم تحرك على الجيل تحت نفس الظروف التى تفصل فيها البروتينات مجهولة الوزن الجزيئى . ولإعداد المنحنى القياسى يتم توقيع لوغاريتم الوزن الجزيئى للبروتينات القياسية معلومة الوزن الجزيئى مع قيم الـ R_m المقابلة لها فينتج خط مستقيم كما فى شكل (10.8) . ثم يقدر بعد ذلك لوغاريتم الوزن الجزيئى للبروتين غير المعلوم بعد تقدير قيمة الـ R_m له من التجربة ، ومن ثم يحسب الوزن الجزيئى .



(ب)



(ا)

شكل (10.8): استخدام جيل بولي الأكريلاميد مع كبريتات دوديسيل الصوديوم فى تقدير

الوزن الجزيئى للبروتين

(ا) : فصل البروتينات القياسية معلومة الوزن الجزيئى ، وكذلك البروتينات غير معلومة الوزن الجزيئى

(ب) : ملحنى قياسى لتقدير الوزن الجزيئى للبروتين

3.3.11.8. فصل البروتينات عند نقطة تعادلها الكهربى *Isoelectric Focusing* :

تعتبر طريقة فصل البروتينات عند نقطة تعادلها الكهربى من طرق الإلكتروفوريسيس " المعدلة " حيث تفصل البروتينات المشحونة فى مجال كهربى على مادة جيل تتدرج فيها قيم الـ pH باستخدام مركبات أمفوليتية *ampholytes* ، وعندما تصل البروتينات المتحركة على الجيل إلى الموضع الذى يتساوى فيه قيمة pH الجيل مع نقطة تعادلها الكهربى ، حينئذ ، تثبت البروتينات عند هذا الموضع ولا تتحرك قيد أنملة . ويعتبر سريان البروتينات على جيل من هذا النوع من أكفا نظم فصل البروتينات ، ويمكن إستخدامه لفصل بروتينات ذات نقط تعادل كهربائية PI_0 تختلف عن بعضها البعض بمقدار قد يقل حتى عن 0.02 وحدة pH ، فقط .

* طريقة الفصل :

يتم تكوين الـ pH المتدرج على الجيل باستخدام المواد الأمفوليتية *ampholytes* والتي تكون عبارة عن بوليمرات صغيرة (كتلتها الجزيئية حوالى 5000 دالتون) تحتوى على مجموعات موجبة ومجموعات سالبة . ويتكون مخلوط الأمفوليتات من الآلاف من البوليمرات والتي تتباين قيم الـ pK لها . وتضاف الأمفوليتات إلى الجيل قبل البلمرة . بعد تكوين الجيل المضاف إليه الأمفوليتات وعند سريان التيار الكهربى تهاجر الأمفوليتات على الجيل لتكون على الجيل مناطق متدرجة فى قيم الـ pH . فالأمفوليتات ذات الشحنة السالبة تهاجر ناحية الأنود بينما تهاجر الأمفوليتات موجبة الشحنة تجاه الكاثود .

وهناك مخاليط من الأمفوليتات يمكنها أن تغطى نطاق محدود من قيم الـ pH (بحيث يكون الفرق بين الحدين الأدنى ، والأعلى من 2 - 3 وحدات pH) ، وهناك مخاليط أخرى من الأمفوليتات تغطى نطاق واسع من قيم الـ pH التى تفصل عندها البروتينات يتراوح بين 3 إلى حوالى 10 وحدات pH . ويتم إختيار مخلوط الأمفوليتات المناسب منها طبقا لصفات البروتينات التى يجرى فصلها .

4.11.8. بعض التطبيقات Applications

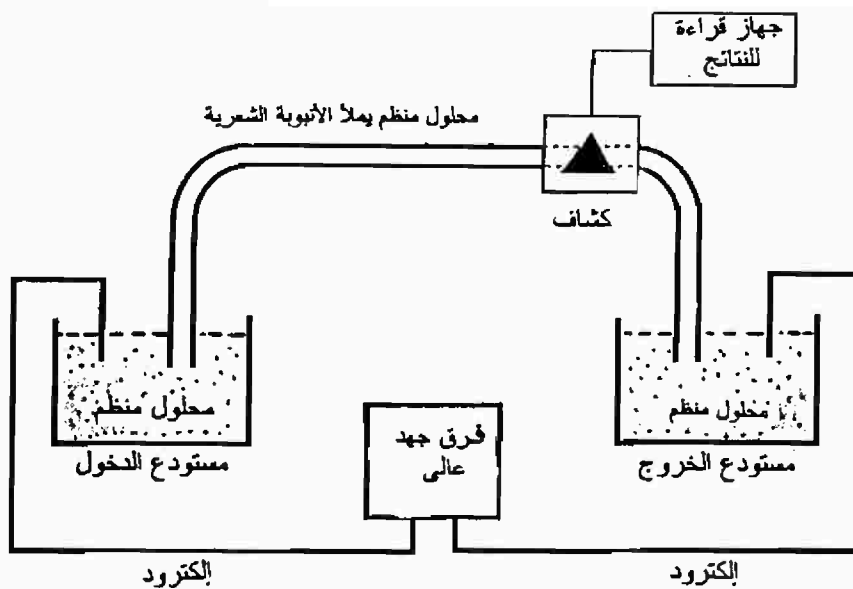
- * تعتبر طريقة فصل البروتينات عند نقط التعادل الكهربى *IEF* من الطرق الممتازة لتقدير نقاوة المستحضر البروتينى ، ويمكن التعرف على بعض البروتينات كأيزوزيم البولى فينول أكسيديز والبروتينات النباتية والحيوانية الأخرى .
- * يمكن باستخدام طريقة فصل البروتينات بالإلكتروفوريسيس عند نقط تعادلها الكهربى للتمييز بين أنواع الأسماك .
- * يمكن دمج طريقتى فصل البروتينات عند نقط تعادلها الكهربى ، وفصل البروتينات بجيل البولى أكريلاميد مع كبريتات دوديسيل الصوديوم فى فصل مخاليط البروتينات شديدة التعقيد ، ويضنق على هذه الطريقة الإلكتروفوريسيس فى إتجاهين .

5.11.8. الإلكتروفوريسيس بطريقة الأنابيب الشعرية

Capillary Electrophoresis

يوضح شكل (11.8) رسما تخطيطيا لنظام إلكتروفوريسيس الأنابيب الشعرية حيث يتكون هذا النظام من عمود شعري *capillary column* ، ومصدر للتيار ، وكشاف ، ومستودعين للمحلول المنظم . يتم إدخال العينة فى فتحة الدخول *inlet side* من الأنبوبة الشعرية حتى يتم إدخال الحجم المرغوب من العينة فى العمود الشعري . وتتكون الأنابيب الشعرية من سليكا مدمجة لها قطر داخلى يتراوح بين 25 - 100 ميكرومتر . ويمكن فى هذه الطريقة من طرق فصل البروتينات إستخدام تيار كهربى عالى (من 100 إلى 500 فولت/سم) ولا يخشى من الحرارة الناشئة عن هذا التيار العالى لأن العمود الضيق يشنت الحرارة بكفاءة عالية جدا . مما يسمح بتقليص زمن الفصل ليتراوح بين 10 - 30 دقيقة.

بعد الإنتهاء من سريان البروتينات فإن شقوق البروتين المنفصلة عن بعضها البعض يتم إظهارها باستخدام كشافات الأشعة فوق البنفسجية *UV* بدلا من عملية الصبغ ، كما هو الحال ، فى الطرق التقليدية للإلكتروفوريسيس .



شكل (11.8): شكل تخطيطي لنظام إلكتروفوريسيس الأنابيب الشعرية

وفيما يلي بعض تطبيقات هذه الطريقة :

- يشبه إلكتروفوريسيس الأنابيب الشعرية كثيرا إلكتروفوريسيس جيل البولي أكريلاميد الطبيعي عدا أن البروتينات تفصل في محاليل حرة داخل أنابيب شعرية مملوءة بالمحاليل المنظمة ذات الـ pH المرغوب . ولتجنب الإنتشار داخل القطر الضيق للأنابيب الشعرية لا يستخدم فيه مادة جيل .
- يحدث سريان شقوق البروتينات في إلكتروفوريسيس الأنابيب الشعرية نتيجة التيار الكهربى والضغط الإسموزى حيث يجذب الجدار الداخلى للأنبوبة الشعرية المحمل بشحنات سالبة (لإحتوائه على مجموعات سيلانول SiO^-) الأيونات موجبة الشحنة من

المحلول المنظم وتتكون طبقة ثنائية الأيونات ما بين جدار العمود الشعري والمحلول المنظم . وعندما يسرى التيار الكهربى تجذب الكاتيونات المكونة لطبقة مزدوجة تجاه الكاثود وتندفع الجزيئات الأخرى (بغض النظر عن شحنتها) معها فى نفس الإتجاه . وعلى هذا الأساس يحدث فصلا للكاتيونات والأنيونات والجزيئات غير المشحونة فى إزاحة واحدة *single run* . ويمكن التحكم فى السريان الكهربى الإسموزى بتغيير الـ pH أو القوة الأيونية للمحلول المنظم لتغيير الشحنة على سطح الأنبوبة الشعرية وتغير من معدل هجرة البروتينات .

• يستخدم إلكتروفوريسيس فصل البروتينات إلى مناطق *capillary zone electrophoresis* فى فصل بروتينات اللبن ، بروتينات الصويا ، بروتينات الحبوب .
• يمكن فصل البروتينات بهذه الطريقة على أساس نقط تعادلها الكهربى فى طريقة تعرف بطريقة الأتاييب الشعرية للفصل عند نقطة التعادل الكهربى *capillary isoelectric focusing* وتستخدم الأمفوليتات لإحداث ح فى رقم الـ pH عبر الأنبوبة الشعرية ولا يلزم فى تلك الطريقة وجود مادة جيلية .

12.8. أسئلة

- 1- ما هى أهم العوامل التى تحدد إختيار الطريقة المناسبة لتقدير البروتين ؟
- 2- تتكون طريقة كداهل لتقدير البروتين من ثلاث خطوات رئيسية . وضح هذه الخطوات بترتيب إجرائها
- 3- لماذا يختلف معامل تحويل النيتروجين إلى بروتين فى الأغذية المختلفة ؟ ، ثم وضح كيفية حساب المعامل 6.25 ؟
- 4- إشرح الأساس العلمى لطريقة نسلر لتقدير البروتين . ثم بين أهم مميزاتها وكذلك عيوبها .
- 5- وضح الأساس العلمى للطرق التالية لتقدير البروتين :
 - طريقة كداهل
 - طريقة البيوريت
 - طريقة لورى
 - طريقة الننهيدرين
 - طريقة دumas
 - إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية على طول موجى 280 نانوميتر

- 6- عند إستخدام طريقة الصبغ بصبغة أنيونية لتقدير البروتين ، فهل يكون الإمتصاص أعلى أو أقل عندما يكون مستوى البروتين فى العينة مرتفع . وضع إجابتك .
- 7- علل لما يأتى :
- 1.7 يمكن تقدير الأحماض الأمينية التى تتأثر بالتحليل الحامضى عن طريق منحنيات خاصة .
- 2.7 إضافة مركب *(2-aminoethyl)-indole-3* لمخلوط تحليل الأحماض الأمينية عند تقدير التريتوفان .
- 3.7 عند تقدير مشتقات الأحماض الأمينية فى جزئى البروتين يفضل إستخدام التحليل المائى الإنزيمى .
- 4.7 ضرورة تغيير الـ pH ، القوة الأيونية للمحلول المنظم المستخدم فى فصل الأحماض الأمينية على أعمدة التبادل الأيونى.
- 5.7 إختلاف الأحماض الأمينية المتعادلة فى معدل خروجها من عمود الفصل بالتبادل الأيونى.
- 6.7 يودى تفاعل الننهيدرين مع الأحماض الأمينية ليكون لون أزرق - قرنفلى بينما يودى تفاعل الننهيدرين مع البروتين لتكوين لون أصفر.
- 8- وضع الأساس العلمى للطرق التالية لفصل البروتين :
- * الديليسة *dialysis* * ضبط رقم الـ pH إلى نقطة التعادل الكهربى للبروتين
 - * إضافة فوسفات الأمونيوم * التسخين لدرجة حرارة مرتفعة * إضافة الإيثانول
 - * الترشيح الفائق * كروماتوجرافيا الإستجابة *affinity chromatography*
 - * كروماتوجرافيا الإقصاء الحجمى .
- 9- قارن بين طريقتى *SDS-PAGE* ، *Isoelectric focusing* لفصل البروتينات.
- 10- وضع لماذا يختلف إلكتروفوريسيس الأنابيب الشعرية عن الـ *SDS-PAGE* ؟
- 11- إشرح بإيجاز كيف يمكن تقدير الأحماض الأمينية فى جليادين القمح ؟

مسائل :

عند تحليل البروتين في أحد أنواع البقوليات تم الحصول على النتائج التالية :

- المحتوى الرطوبي = 8.0 %

- وزن العينة الأولى = 1.015 جم

- وزن العينة الثانية = 1.025 جم

وكانت عيارية حامض الهيدروكلوريك المستخدم للمعايرة = 0.1142 ع ،

حجم حامض الهيدروكلوريك المستخدم في العينة الأولى = 22.0 مل ،

حجم حامض الهيدروكلوريك المستخدم في العينة الثانية = 22.5 مل ،

حجم حامض الهيدروكلوريك المستخدم في البلاتك = 0.2 مل

إحسب محتوى هذا البقول من البروتين الخام على أساس الوزن الرطب ، الوزن الجاف

بفرض أن بروتين هذا النوع من البقوليات يحتوى على 17.5 % نيتروجين.

(الحل : محتوى البروتين 19.8 % على أساس الوزن الرطب ، 21.4 على أساس الوزن الجاف).

13.8. المراجع REFERENCES

- AOAC International . 1995. Official Methods of Analysis . 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.*
- Bell, P.M. 1963. A critical study of method for the determination of nonprotein nitrogen. Anal. Biochem. 5 :443 – 451 .*
- Bonnerjea, J., Oh, S., Hoare, M. and Dunnell, P. 1986. Protein purification : The right step at the right time. Biotechnology, 4 :954 – 958.*
- Chang, S.K.C. 1998. Protein Analysis chapter 15 in: Food Analysis 2nd ed. S.Suzanne Nielsen. An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.*
- Kosikowski, R.V. 1986 .In membrane separations in Biotechnology, W.C. Mc Gregor (Ed.). pp. 201 – 254. Marcel Dekker, New York.*
- Moore, S., Spackman, D.H. and Stein, W.H. 1958. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins: An improved system. Analytical Chemistry . 30 : 1185 - 1190.*
- O'Farrall, P.H. 1974. High resolution of two-dimensional electrophoresis of proteins . J. of Biological Chemistry 250 : 4007 – 4021 .*
- Pomeranz, Y. and Melon, C. 1994. Food analysis: theory and Practice. 3rd ed. Champan & Hall, New York and London.*
- Scopes, R.K. 1970. Characterization and study of sarcoplasmic proteins. Ch. 22 in : Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food , Vol. 2. E.J. Briskey, R.G. Cassens and B.B. Marshal*

(Eds.), pp. 471 – 492. *University of Wisconsin Press, Madison, WI.*

Swedberg, S. 1997. *Capillary Electrophoresis: Principles and applications*. Ch.9, in : *Instrumental Methods in Food Analysis*, J.R.J. Pare and J.M.R.Belanger (Eds.) pp. 367 – 394, Elsevier Science, New York.

US.Department of Agriculture , Agricultural Research Service, 1977. *USDA Nutrient Database for Standard References*, Release 11.1.

Vanrner, J.E., Bulen, W.A., Vanecko, S. and Burrel, R.C.,1953. *Determination of ammonium , amide, nitrite, and nitrate nitrogen in plant extracts*. *Anal. Chem.* 25, 1528 – 1529.

Wong, T.M., Carey, C.M. and Lin, S.H.C. 1994. *Rapid characterization of soy protein and hydrolysates by capillary electrophoresis*. *J. of Chromatography* 680 :413 – 417.