١٠

تقدير البروتين
Protein Determination

هناك العديد من الطرق لتقدير البروتين في الأغذية، طريقة كلداهل هي أحد هذه الطرق والتي تعتمد على قياس النيتروجين والتي مازالت من أهم الطرق الرسمية لقياس البروتين.

(١٠,١) تقدير البروتين الخام – بطريقة كلداهل

مقدمة

تشتمل طريقة كلداهل على أكسدة المواد العضوية وهضمها بواسطة الحمض بوجود عامل مساعد (Catalyst) وتحويل النيتروجين إلى أمونيا. تتفاعل الأمونيا مع الزائد من الحمض لتكون كبريتات الأمونيوم. يحول الوسط إلى قلوي بإضافة هيدروكسيد الصوديوم وتجمع الأمونيا المتحررة في حمض ضعيف مثل حمض بوريك أو محلول قلوي مخفف وتعاير مع حمض الهيدروكلوريك القياسي.

obeikandi.com

١- خطوة الهضم:

$$H_2SO_4 + H_2O + K_2SO_4 + \text{Organic Carbon} \xrightarrow{heat} CO_2 + NH_3 + H_2O$$

$$NH_3 \xrightarrow{H^+} NH_4 \xrightarrow{H_2SO_4} (NH_4)_2SO_4 \longrightarrow$$

٢- التقطير:

$$(NH_4)_2SO_4 \xrightarrow{NaOH} NH_3\uparrow$$

$$NH_3\uparrow + H_3BO_3 \longrightarrow NH_4^+ + H2BO_3^-$$

٣- المعايرة:

$$H_2BO_3^- + H^+ \longrightarrow H3BO_3$$

الهدف: تقدير البروتين بطريقة كلداهل.

المعدات

- وحدة هضم وتقطير كلداهل.
- دوارق كلداهل.
- سحاحه.

المحاليل

- كبريتات الصوديوم أو البوتاسيوم اللامائية.
- كبريتات النحاس.
- مخلوط الهضم المؤكسد =١٠جم من كبريتات الصوديوم أو البوتاسيوم اللامائية + ٥جم من كبريتات النحاس + ثاني أكسيد التينيوم (ملاحظة: هناك العديد من مخاليط الهضم لكلداهل والتي تحتوي على كيماويات مختلفة).
- حمض الكبريتيك المركز.
- محلول هيدروكسيد الصوديوم (٥٠٪) (أذب ٢٠٠٠جرام من هيدروكسيد الصوديوم NaOH في ٣,٥ لتر من الماء الخالي من العناصر المعادن (dd) برد ثم اكمل الحجم إلى ٤ لترات).
- محلول حمض البوريك (٢٪):

obeikandl.com

١- في دورق سعة ٤لتر أذب ٨٠جرام من حمض البوريك في ٢لتر من الماء الخالي من العناصر المعدنية المغلي وهو لا يزال حاراً جداً.

٢- حرك المزيج ثم أضف زيادة ١,٥ لتر من الماء (dd).

٣- برد تحت صنبور الماء حتى يصل إلى درجة حرارة الغرفة أو اتركه لفترة حتى يبرد.

٤- حرك الدورق باستمرار حتى تمنع تكون البلورات من حمض البوريك.

٥- أضف ٤٠ مل من محلول بروموكريسول الأخضر bromocresol green (١٠٠ملجرام من بروموكريسول الأخضر/١٠٠مل إيثانول) و٢٨مل محلول أحمر الميثايل (١٠٠ملجرام من أحمر الميثايل/١٠٠مل إيثانول).

٦- خفف إلى ٤لتر مع الماء واخلط بحرص.

٧- انقل ٢٥مل من محلول حمض البوريك إلى دورق الاستقبال ثم أعمل التقطير بدون العينة كتجربة ضابطة Blank، مكونات الدورق من المفترض أن تعطي اللون الأخضر المتعادل، إذا لم تكن كذلك سحح مع محلول 0.1N NaOH حتى تحصل على اللون.

٨- احسب كمية محلول NaOH والتي تحتاج لضبط محلول حمض البوريك في ٤لترات بالمعادلة التالية:

$$\text{ml } 0.1\text{N NaOH}=\frac{(\text{m1 liter})\times(4000\text{ml})}{(25\text{ml})}$$

٩- أضف الكمية المحسوبة من محلول 0.1N NaOH إلى محلول حمض البوريك.

١٠- اخلط جيداً.

١١- حمض الهيدروكلوريك القياسي (٠,١ع).

الطريقة

• زن العينة (١-٢جم) على ورقة ترشيح (واطمان) صغيرة وتلف وتنقل إلى دورق الهضم. أضف حجر الخفاف و ١٠جم من مخلوط الهضم المؤكسد ثم أضف ٢٥مل من حمض الكبريتيك المركز واخلط جيداً.

obeikandl.com

• أجرِ التسخين ببطء في البداية حتى يقف الفوران ثم يجرى الغليان حتى يتم الهضم — تمام الهضم هو تحول المحلول إلى عديم اللون أو أزرق مخضر، ثم يوقف التسخين ويبرد المحلول (أحذر من تكون بلورات الملح).

• يضاف حوالي ٢٠٠مل ماء إلى دورق الهضم.

• تنقل حوالي ٤٠–٥٠مل من حمض البوريك (٢٪) إلى دورق مخروطي لاستقبال الأمونيا وتضاف له ٤–٥ نقط من الدليل.

• تنقل حوالي ٦٠–٩٠مل من محلول الصودا NaOH (٥٠٪) وتصب برفق واحتراس على جدار دورق الهضم لتتجمع في القاع.

• يثبت دورق الهضم على جهاز التقطير ويوصل بالمكثف عن طريق الوصلة الزجاجية ذات المصيدة (Trap).

• يقلب دورق الهضم بهدوء لخلط محتوياته ثم يبدأ التسخين إلى الغليان (بهدوء في البداية).

• تجمع حوالي ١٥٠مل في دورق الاستقبال.

• تعادل محتويات دورق الاستقبال بمعايرتها بمحلول حمض الهيدروكلوريك (٠,١ع) القياسي المحتوي على ٣ نقط دليل كلداهل ويحسب الحجم بالضبط من السحاحة.

• تجرى تجربة ضابطة (Blank) وذلك بوضع ورقة ترشيح فارغة في دورق الهضم بدل الورقة المحتوية على العينة.

• تحسب نسبة النتروجين ومن ثم نسبة البروتين.

عامل البروتين

يوفر تقدير البروتين العضوي الأساس لحسابات نسبة البروتين في المواد الغذائية، فبضرب كمية النتروجين في عامل معين Protein Factor نحصل على كمية

obeikandi.com

البروتين. وتعتمد هذه العوامل على محتوى البروتينات المختلفة من النتروجين. والعامل ٦,٢٥ يستخدم لحساب البروتين لمعظم المواد الغذائية (لحوم، فاكهة، خضر)؛ وذلك لأن معظم البروتينات في هذه المواد تحتوي على ١٦٪ نتروجين (١٠٠÷١٦=٦,٢٥). وتستثنى بعض المواد الأخرى مثل الألبان (العامل = ٦,٣٨) والحبوب (٥,٧) والجيلاتين (٥,٥٥).

الحسابات

$$\text{نسبة النتروجين} = \text{عيارية } HCl^{*} \times \frac{\text{حجم الحمض المصحح}^{**}\text{ (مل)}}{\text{وزن العينة (جم)}} \times \frac{\text{١٤جم } N}{mol} \times ١٠٠$$

* العيارية هي في مول/١٠٠٠مل

** حجم الحمض المصحح = (مل قياسي حمض للعينة) – (مل قياسي حمض للضابطة)

كمية البروتين = كمية النتروجين(٪) × معامل البروتين للغذاء

التجربة		وزن العينة	حجم Hcl المعاير (مل)	٪النيتروجين	٪ البروتين على أساس الوزن الرطب	٪ البروتين على أساس الوزن الجاف
الضابطة	١					
	٢					
العينة	١					
	٢					
	٣					
				X'= SD=		X'= SD=

opeikandi.com

(١٠,٢) تقدير البروتين بطريقة لونية (طريقة برادفورد)
Determination of Protein by Colorometric Method

مقدمة

تعتمد هذه الطريقة على حقيقة أن صبغة الكوماسي بريلينت بلو Coomassie Brilliant Blue 250 توجد بلون أحمر ولكن عند ارتباطها بجزيء البروتين تتحول إلى اللون الأزرق.

الهدف: تقدير البروتين بطريقة لونية (طريقة برادفورد).

المحاليل

١- الصبغة :

- أذب ٠,١جم من صبغة الكوماس بريلينت بلو في ٥٠ مل كحول
- أضف ١٠٠ مل من حمض الفوسفوريك (H_3PO_4) (تركيز ٨٥٪)

٢- حلول البروتين القياسي (BSA) بتركيز ١٠٠ملجم/ ١٠٠ مل ماء مقطر.

٣- محلول هيدروكسيد الصوديوم (٠,٥ع)

الطريقة

استخلاص البروتين

١- زن حوالي ١ جم من العينة بدقة على ورق جلاسين على ميزان حساس وانقل الوزنة إلى دورق مخروطي سعة ٥٠ مل.

٢- أضف ٢٠ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (٠,٥ع). اخلط العينة (استخدام قلاب مغناطيسي إن كان ذلك ضرورياً).

٣- سخن محتويات الدورق في حمام مائي يغلى لمدة ١٠ دقائق. إذا لم يتم ذوبان العينة (يجب أخذ الحذر حتى لا يتغير لون العينة إلى أسود أو داكن).

٤- برد محتويات الدورق في حمام ثلجي مباشر بعد التسخين.

obeikandl.com

٥- انقل محتويات الدورق كمياً إلى دورق معياري سعة ٥٠ مل، وأكمل إلى العلامة بالماء المقطر. رشح على ورقة واطمان رقم٢.

المنحنى القياسي

١- انقل صفر، ١٠، ٢٠، ٣٠، ٤٠، ٥٠، ٦٠ ميكرولتر من محلول البروتين القياسي إلى أنابيب اختبار.

٢- أكمل الحجم إلى ١ مل بالماء المقطر.

٣- أضف ٥ مل من محلول الصبغة واخلط جيداً وسريعاً بواسطة الفورتكس.

٤- دع الأنابيب لمدة ٢-٥دقيقة.

٥- اقرأ الامتصاصية على موجة ٥٩٥ نانومتر.

٦- ارسم المنحنى القياسي (رسم الامتصاصية على التركيز).

التقدير

١- انقل ٠,٢٥، ٠,٥ مل من العينة إلى أنابيب اختبار

٢- اتبع الخطوات ٢- ٥ كما في عمل المنحنى القياسي.

٣- احسب محتوى العينة من البروتين مستعيناً بالمنحى القياسي وامتصاصية العينة.

(١٠,٣) تعيين محتوى البروتين بالمعايرة بالفورمول

Determination of Protein Content by the Formol Titration

المقدمة

يمكن مع بعض الأغذية كالحليب تقدير البروتين فيها بصورة سريعة بالمعايرة بالفورمول.

لا يمكن معايرة البروتين مباشرة مع القلوي لضعف مجموعات الكربوكسيل فيه، وبإضافة الفورمالين (فورم ألدهيد) الذي يتفاعل مع مجموعات NH_2- ويشكل مجموعات متيلين- أمينو (-N=CH2)، تصبح مجموعات الكربوكسيل متاحة للمعايرة.

$$HOOC.CHR.NH_2 + HCHO \rightarrow HOOC\text{-}CHR\text{-}N{=}CH_2 + H2O$$

حمضي متعادل

المواد

- سحاحة.
- ماصات.
- دوارق حجمية.

المحاليل

- محلول مشبع من أوكسالات البوتاسيوم.
- فينول فثالين.
- ٤٠٪ محلول فورم ألدهيد.
- 0.1M محلول هيدروكسيد الصوديوم.

طريقة العمل

- خذ بالماصة ١٠ مل من العينة (الحليب) إلى دورق مخروطي صغير وأضف ١ مل فينول فثالين و٠,٤مل محلول مشبع من أوكسالات البوتاسيوم، اتركه لمدة دقيقتين، (تمنع الأوكسالات إعاقة أملاح الكالسيوم الذائبة).
- عدِّل الحليب إلى اللون الوردي الفاتح بمحلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1M الموضوع في السحاحة.
- أضف ٢مل من محلول فورم ألدهيد ٤٠٪ (الذي سبق تعديله بوجود الفينول فثالين بمحلول 0.1M محلول هيدروكسيد الصوديوم).
- تابع المعايرة إلى النقطة الوردية نفسها التي سبق الحصول عليها، ولا تسجل إلا حجم 0.1M محلول هيدروكسيد الصوديوم التي تحتاجها للمعايرة الثانية.

obeikandl.com

الحساب

يعطى حساب البروتين بالمعادلة التالية :

٪ البروتين= حجم الألدهيد × ٠,١٧

وتساوي حجم الألدهيد عدد ميللترات 0.1M محلول هيدروكسيد الصوديوم التي يحتاجها ١٠٠ مل من الحليب لتعديل الحموضة الناتجة بعد إضافة الفورم ألدهيد.

obeikandl.com