٣-كيمياء البروتينات

Chemistry of Proteins

الأستاذ الدكتور/محمد محمود يوسف

مقدمة :

البروتينات عبارة عن مركبات عضوية معقدة تحتوى على النتروجين، وتنتشر فى جميع الخلايا الحيوانية والنباتية حيث تكون البروتينات جزءا أ ساسيا من تركيب أنوية وبروتوبلازم هذه الخلايا، ويرجع اسم بروتين الى العالم Mulder عام ١٩٤٠، وكلمة بروتين مشتقة من اللغة اللاتينية وتعنى الأول first .

وتجدر الاشارة الى أن كيمياء البروتينات ترجع الى عام ١٨٢٠ عندما تمكن Braconnot آنذاك وبمحض الصدفة من عزل الحمض الأمينى جليسين من الجيلاتين ، ومنذ ذلك الحين فقد تتابعت عمليات عزل الأحماض الأمينية الأخرى عن طريق التحليل المائى بالأحماض المعدنية المركزة، ولقد كانت المعلومات المتحصل عليها بمثابة نقطة البدء لتفهم تركيب وكيمياء البروتينات أو مايطلق عليه كيمياء البروتين الحديثة modern protein chemistry .

والبروتينات مركبات أساسية لبناء الجسم اذ أنه بدون البروتينات تستحيل الحياة ، وللبروتينات دور أ ساسى فى عمليات تكوين العظام والجلد والغضاريف والشعر، كما أن البروتينات هامة لتكوين بعض الهورمونات وبعض المركبات الأخرى الهامة فسيولوجيا أضف الى ذلك أن الغالبية العظمى من الأنزيمات عبارة عن بروتينات من حيث التركيب.

والنباتات بما فيها البكتريا يكون فى مقدورها تخليق synthesizing البروتينات من مركبات عضوية أو غير عضوية بسيطة بعكس الحال بالنسبة للكائنات الحية الأعلى والتى يجب مدها بالبروتينات أو نواتج تحللها كى تستمر حياة تلك الكائنات .

ومن الناحية التركيبية فأن جميع البروتينات تحتوى على الكربون والهيدروجين والأكسجين والنتروجين بصفة أ ساسية، فى حين تحتوى بعض البروتينات بالأضافة الى ذلك على الكبريت والفوسفور والحديد واليود .

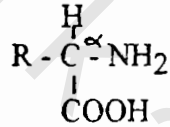
وتتفاوت نسبة النتروجين فى البروتين تبعا لمصدر البروتين ، وتعتبر ١٦٪ أكثر النسب شيوعا، ولذا فانه عند تقدير البروتين كنتروجين (بطريق كلداهل Kjeldahl) فان قيمة النتروجين المقدر تضرب فى ١٦/١٠٠ أى ٦،٢٥ للحصول على البروتين، وتسمى هذه القيمة بمعامل التحويل conversion factor ومما لاشك فيه أن هذا المعامل يتباين تبعا للمادة

موضع التقدير فالمعامل المستخدم للحبوب يختلف عن نظيره للبقول وهذا يختلف عن المعامل المستخدم للبن .... وهكذا .

والبروتينات ماهى الا بوليمرات حيوية biopolymers تتكون من وحدات أصغر أى monomers أو وحدات بنـــــاء building blocks يطلق عليها الأحماض الأمينية amino acids .

أولا : الأحماض الأمينية Amino acids

تحتوى الأحماض الأمينية على مجموعتين وظيفيتين functional groups هما المجموعة الأمينية والمجموعة الكربوكسيلية، وتتصل هاتان المجموعتان بنفس ذرة الكربون وهى ذرة ألفا كما يلى:



ويوجد فى الطبيعة نحو ثلاثمائة حمض أمينى غير أن عدد الأحماض الأمينية التى تدخل فى تركيب البروتين هو ٢٠ حمض أمينى فقط، ومن ثم فان الأحماض الأمينية تقسم من هذه الوجهة الى أحماض أمينية بروتينيـــــة protein amino acids وأحماض أمينية لا بروتينية non-protein amino acids، بمعنى أن كل البروتينات تتكون من الأحماض الأمينية غير أنه ليس من الضرورة أن تدخل كل الأحماض الأمينية فى تركيب البروتينات.

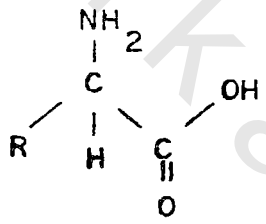
ولما كانت ذرة كربون ألفا فى تركيب الحمض الأمينى ذرة غير متناظرة asymmertric لذا فان جزئ الحمض الأمينى يكون نشطا ضوئيا optically active بمعنى أنه توجد صورتان L and D (احداهما مرآة للأخرى) للحمض الأمينى كما هو مبين بالشكل رقم ٣-١ .

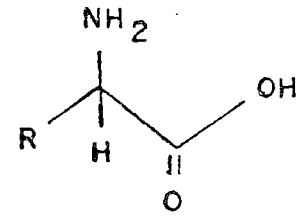
المشابه L المشابه D

شكل ٣-١ : المشابهان الضوئيان للأحماض الأمينية .

وعلى الرغم من وجود بعض الأحمـــاض الأمينية يمينية الدوران dextrorotatory (أى تدير مستوى الضوء المستقطب جهة اليمين) وأخرى يسارية الدوران laevorotatory (أى تدير مستوى الضوء المستقطب جهة اليسار) عند pH ٧ فان الأحماض الأمينية السائد وجودها فى

الطبيعة يكون لها التوزيع الفضائى L- ∝ . وكما سبق القول فى سياق حديثنا عن التشابه الضوئى فى الكربوهيدرات فان الحرفين L & D يعبران عن التوزيع الفضائى فقط لذرة الكربون غير المتماثلة (الذرة فى حالة الأحماض الأمينية). أما قدرة الجزئ على أن يكون يمينى الدوران فيرمز لها بالعلامة زائد (+) فى حين يرمز لقدرة الجزئ على ادارة الضوء المستقطب جهة اليسار بالعلامة ناقص (-) وتجدر الاشارة الى أن بعض الأحماض الأمينية تحتوى على موضعين غير متناظرين ومن ثم فتوجد لمثل هذه الأحماض أربعة مشابهات ضوئية بيد أنه يوجد مشابه واحد فقط من بين هذه المشابهات يدخل فى تركيب البروتينات ونظرا لأن زوايا روابط الكربون تأخذ شكل الهرم الرباعى المنتظم (فى حالة المزج SP_3) فانه من الأصوب كتابة الحمض الأمينى بالطريقة التالية :





غير أنه للتسهيل فاننا سنكتب السلاسل مستقيمة على ألا تغيب عن أذهاننا الحقيقة السابقة .

تقسيم الأحماض الأمينية البروتينية Classification of proteinamino acids

يمكن من الوجهة الكيماوية تقسيم الأحماض الأمينية البروتينية الى ثلاث مجموعات :

١-الأحماض الأمينية الأليفاتية .

٢-الأحماض الأمينية المحتوية على حلقة بنزين .

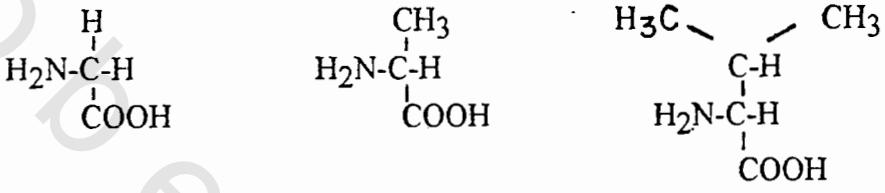
٣-الأحماض الأمينية المحتوية على حلقات مختلطة .

١-الأحماض الأمينية الأليفاتية Aliphatle amino acids

يوضح الشكل رقم ٣-٢ الصيغ البنائية للأحماض الأمينية الأليفاتية أحادية الكربوكسيل والأمين التى تدخل فى تركيب البروتينات وهى أحماض الجليسين glycine والألانين alanine والفالين valine والليوسين leucine والأيزوليوسين isoleucine .

وهناك أحماض أمينية اليفاتية ثنائية الكربوكسيل (تسمى بالأحماض الأمينية الحامضية acidic amino acids) وهى حمض الأسبارتيك aspartic acid وحمض الجلوتاميك glutamic acid (شكل ٣-٣) . كذلك فهناك أحماض أمينية اليفاتية ثنائية الأمين (تسمى بالأحماض الأمينية القاعدية basic amino acids) وتشتمل على الليسين lysine والذى

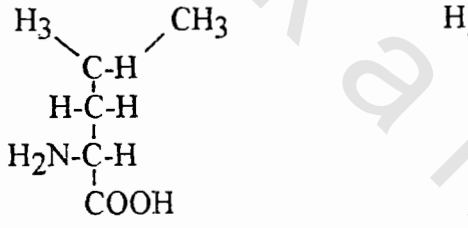
يحتوى على مجموعتى أمين فى الوضعين الفا ∝ وأبسلون ε وحمض هيدروكسى ليسين hydroxy lysine والحمض الأمينى أرجنين argenine والذى يحتوى على مجموعة جوانيدو guanido group . كذلك فتوجد أحماض أمينية أليفاتية تحتوى على مجموعة الهيدروكسيل وهى السيرين serine والثريونين threonine كما هو موضح بشكل رقم ٣-٥.



Glycine : (∝ -amino acetic acid).

Alanine : (∝ -amino propionic).

Valine : (∝ -amino iso - valeric acid).



Leucine : (∝ -amino iso caproic acid)

Isoleucine : (∝ -amino β methyl β ethyl propionic acid)

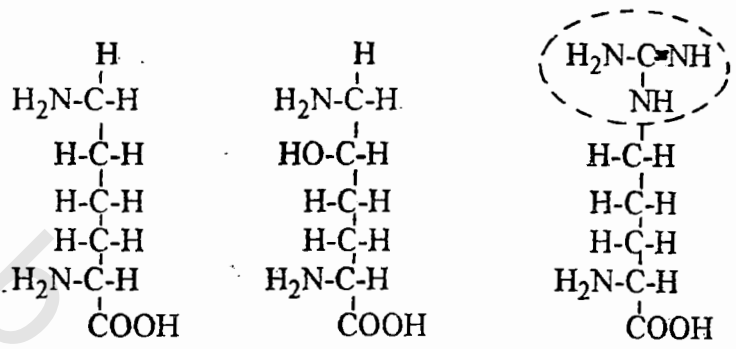
شكل ٣-٢: الصيغ البنائية للأحماض الأمينية الأليفاتية أحادية الكربوكسيل والأمين والتى تدخل فى تركيب البروتين .

Aspartic acid : (∝ -amino succinic acid)

Glutamic acid : (∝ -amino glutaric acid)

شكل ٣-٣: الصيغ البنائيه للأحماض الأمينية الأليفاتية الحامضية التى تدخل فى تركيب البروتين .

obeikan.com

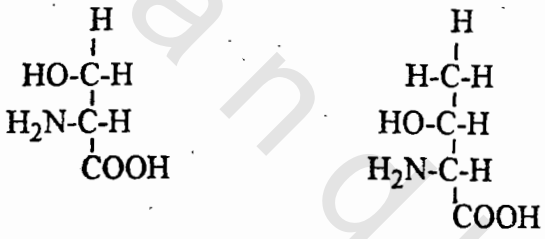


Lysine : (α - ε diamino caproic acid)

Hydroxy : Lysine

Arginine : (δ - guanido amino valeric acid)

شكل٣-٤: الصيغ البنائية للأحماض الأمينية ثنائية الأمين والتى تدخل فى تركيب البروتين

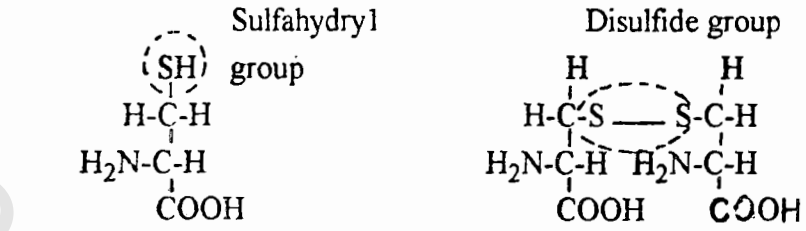


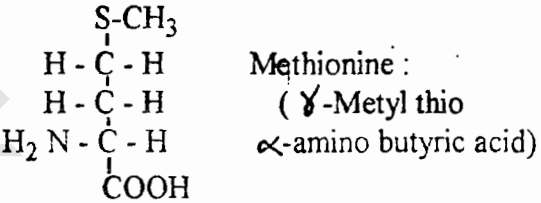
Serine : (β - hydroxy α - amino propionic acid)

Threonine : (β - hydroxy α - amino butyric acid)

شكل ٣-٥ الصيغ البنائية للأحماض الأمينية الأليفاتية المحتوية على مجموعة هيدروكسيل والتى تدخل فى تركيب البروتين .

وتوجد أيضا أحماض أمينية اليفاتية تحتوى على الكبريت وهى السستئين cysteine والسستين cystine والميثيونين methoinine (شكل ٣-٦) .



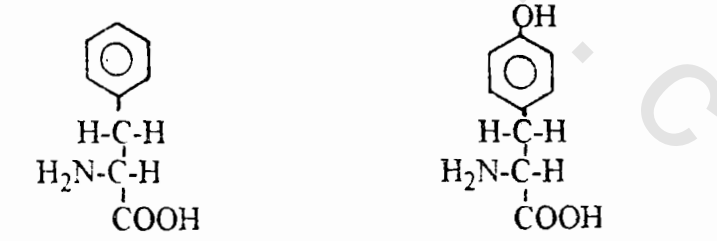


شكل ٣-٦ الصيغ البنائية للأحماض الأمينية الأليفاتية المحتوية على الكبريت والتى تدخل فى تركيب البروتين .

٢- الأحماض الأمينية التى تحتوى علىحلقة البنزين

Amino acid containing benzene ring

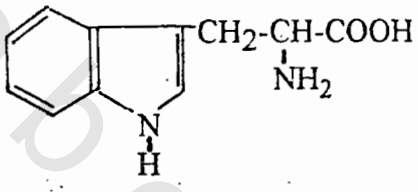
وتشتمل هذه المجموعة على الأحماض الأمينية التى تحتوى على حلقة بنزين (الفينايل آلانين phenyl alanine والتيروسين tyrosine) وصيغهما البنائية موضحة بشكل ٣-٧ .



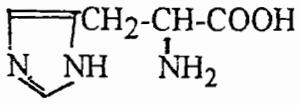
شكل ٣-٧ الصيغ البنائية للأحماض الأمينية الحلقية المحتوية على حلقة بنزين ، والتى تدخل فى تركيب البروتين.

كذلك فيندرج تحت الأحماض الأمينية العطرية أو الحلقية تلك الأحماض المحتوية على حلقات غير متجانسة وتتضمن الحمض الأمينى تربتوفان treptophan (ويحتوى على حلقة

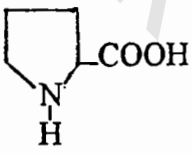
أندول indol) والحمض الأمينى هستدين histidine (ويحتوىعلى حلقة ايميدازول imidazole) والحمض الأمينى برولين proline ويحتوى على حلقة pyrrolidine وبه مجموعة ايمينية imino group بدلا من المجموعة الأمينية amino group، وكذلك الحمض الأمينى هيدروكسى برولين (شكل ٣-٨) .



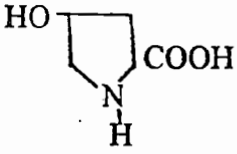
Tryptophan
(β - indol ∝ - amino propionic acid) .



Histidine
(β - imidazol ∝ - amino propionic acid) .



مجموعة ايمينية
Proline
(∝- pyrrolidine carboxylic acid)



مجموعة ايمينية
Hydroxy proline

شكل ٣-٨ : الصيغ البنائية للأحماض الأمينية الحلقية التى تحتوى على حلقات غير متجانسة والتى تدخل فى تركيب البروتين.

خواص الأحماض الأمينية Properties of amino acids

١-الخواص الفيزيقية Physical properties

جميع الأحماض الأمينية يمكن بلورتها ولكل حمض أمينى الشكل البلورى المميز له أما بالنسبة للذوبان فأن جميع الأحماض الأمينية (فيماعدا التيروسين والسيستين) تذوب فى الماء فى حين أنها لاتذوب فى الأيثير أما فى الوسط الحامضى المخف أو القلوى المخفف فان جميع الأحماض الأمينية تكون ذائبة .

وتتفاوت طعوم الأحماض الأمينية من الطعم الحلو (كما فى حالة الجلبسين، آلانين، السيرين، والبرولين) الى الطعم المر (كما فى حالة الأرجنين) الى عديمة الطعم (كما فى التربتوفان والليوسين).

٢-الخواص التركيبية Structural properties

(أ) النشاط الضوئى Optical activity

سبق أن أوضحنا أن ذرة الكربون ألفا ∝ الموجودة فى تركيب الحمض الأمينى عبارة عن ذرة كربون غير متناظرة asymmetric ومن ثم فان جميع الأحماض الأمينية (فيما عدا الجليسين) تعتبر مركبات نشطة ضوئيا optically active أى أن الجزئ يوجد فى مشابهين ضوئيين كل منهما صورة مرآة للآخر mirror image حيث يكون أحد المشابهين يمينى الدوران dextrorotatory بينما يكون المشابه الآخر يسارى الدوران laevorotatory .

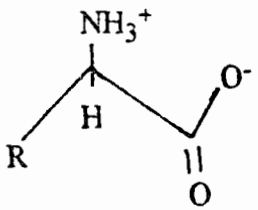
(ب) الخاصية الأمفوتيرية Amphoteric property

يحمل جزئ الحمض الأمينى على الأقل مجموعتين متأينتين ionizable وهما مجموعتا الكربوسيل COOH - والأمين $-NH_3^+$، وهاتان المجموعتان عبارة عن مجموعتين حامضيتين ضعيفتين وفى المحلول فانه توجد صورتان من هذه المجاميع احداهما مشحونه والأخرى غير مشحونة حيث تتواجدان فى توازن بروتونى protonic equilibrium كما يلى :

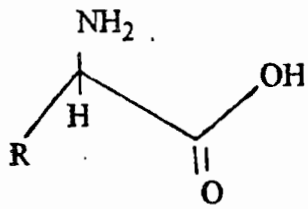
$$R\text{-}COOH \rightleftharpoons R\text{-}COO^- + H^+$$

$$R\text{-}NH_3^+ \rightleftharpoons R\text{-}NH_2 + H^+$$

وتمثل مجموعتا R-COOH و $R\text{-}NH_3^+$ المشاركات البروتونية أوالحامضية فى هذا التوازن أما $R\text{-}COO^-$ والـ $R\text{-}NH_2$ فتعملان كمستقبلات للبروتون proton acceptors وتسميان بالقواعد المشتقة conjugated bases للأحماض الضعيفة المقابلة، وعلى الرغم من أن كلا من مجموعتى R-COOH و $R\text{-}NH_3^+$ تعتبر بمثابة حمض ضعيف فان مجموعة R-COOH تعتبر أقوى عدة آلاف من المرات عن مجموعة $R\text{-}NH_3$ من هذه الوجهة. وعند pH بلازما الدم (٧ر٤) فان مجاميع الكربوكسيل توجد على صورة أنيون كربوكسيلات carboxylate أى $R\text{-}COO^-$، وعند هذه القيمة من الـ pH فان معظم المجاميع الأمينية توجد أساسا فى صورة مرتبطة associated أو معطية للبروتون proton donor أى $R\text{-}NH_3^+$.



[A]

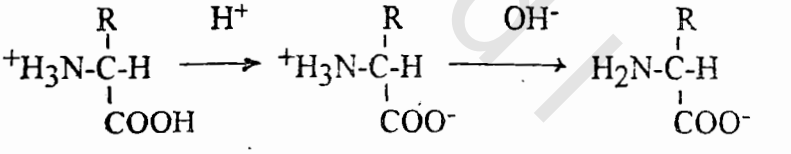


[B]

ولا يمكن تواجد الحمض الأمينى عند أى قيمة للـ pH فى الصورة B ، ولكن الحمض الأمينى يوجد فى صورة متأينة حيث تحدث عملية الـ protonation أى اعطاء البروتون من مجموعة COOH- فتتحول الى COO^-- وتستقبل مجموعة NH_2- البروتون فتتحول الى - NH_3 وتسمى الصورة A بالأيون المزدوج dipolar ion أو الـ zwitter ion أى الأيون ثنائى الشحنة. وتبلغ قيمة pKa التقريبية لمجموعة الألفا كربوكسيل تكون ٢ بينما تصل الى ١٠ لمجموعة الألفا أمين . وعند pH أقل من قيمة الـ pKa للمجموعة فان الحمض يمكنه اعطاء البروتون أى أنه يوجد أساسا فى صورة protonated . ومن المعروف أن القوة النسبية للأحماض الضعيفة يمكن التعبير عنها بواسطة ثابت انحلال الحامض acid dissociation constant (Ka) أو الـ pKa (وهو اللو غاريتم السالب لثابت انحلال الحامض) أى أن :

$$pKa = - \log Ka$$

وكنتيجة لوجود جزئ الحمض الأمينى على صورة ايون مزدوج الشحنة فان الأحماض الأمينية تعتبر أمفوليتات ampholytes او مركبات أمفوتيرية amphoteric او الكتروليتات electrolytes بمعنى أن الأحماض الأمينية يكون فى مقدورها التفاعل كأحماض وكذا يمكنها التفاعل كقلويات تبعا لـ pH الوسط كما يتضح من الشكل ٣-٩.



(حالة وسطية)

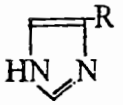
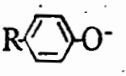
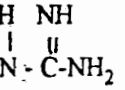
شكل ٣-٩: صور تأين الاحماض الأمينية فى الوسط الحامضى والوسط القلوى .

بمعنى أن الحمض الأمينى فى الوسط الحامضى يكون فى صورة كاتيون ويتفاعل كقاعدة فى حين أنه فى الوسط القلوى يكون الحمض الأمينى فى صورة الأنيون ويتفاعل كحامض .

ويعرف تركيز الهيدروجين الذى يتكون عنده الأيون مزدوج الشحنة zwitter ion (حالة تعادل الشحنات الكهربية على الجزئ أى أن محصلة الشحنة تساوى صفرا) باسم نقطة التعادل الكهربى isoelectric point (IEP)، ويرمز لها بالرمز pI. وهجرة البروتينات أو الأحماض الأمينية فى مجال كهربى يمكن التحكم فى اتجاهها (أى فى محصلة الشحنة على الجزئ) بالتحكم فى pH الوسط باستخدام محلول منظم(بفر) ذى pH محدد . وعند الـ pI

فان جزئ البروتين يكون متعادلا كهربيا ومن ثم فانه لايهاجر اذا ما وضع فى مجال كهربى الى أى من الأنود أو الكاثود، وكذلك يكون الضغط الأسموزى للبروتين فى أدنى قيمة عند الـ pI، وعند هذه النقطة أيضا يكون ذوبان البروتين أقل مايمكن ومن ثم فانه يمكن ترسيب البروتين اذا ماتم التحكم فى pH الوسط ليكون مساويا الـ pH عند نقطة التعادل الكهربى، ولكل حمض أمينى ولكل بروتين نقطة التعادل الكهربى isoelectric pH الخاصة به. ويوضح الجدول رقم ٣-١: المجاميع الحامضية الضعيفة للأحماض الأمينية الموجودة فى البروتينات .

جدول ٣-١: المجاميع الحامضية الضعيفة فى الأحماض الأمينية.

Approximate pKa	Conjugate acid	Conjugate base	قيمة pKa التقريبية
ألفا كربوكسيل ∝-carboxyl	R-COOH	$R\text{-}COO^-$	١ر٢+٥ر٠
مجموعة كربوكسيلية غير∝(حامض الأسيارتيك ،حامض الجلوتاميك).	R-COOH	$R\text{-}COO^-$	٠و٤+٣و٠
اميدازوليوم imidazolium (هستدين)			٠و٦
الألفا أمينو ∝ -amino	$R\text{-}NH_3^+$	$R\text{-}NH_2$	٨و٩+-و١
أبسلون أمينو ε -amino (ليسين)	$R\text{-}NH_3^+$	R-NH	٥و١٠
المجموعة الفينولية OH (تيروسين)			١و١٠
جوانيدنيوم guanidinium (أرجنين)			٥و١٢
سلفهيدريل sulfhydryl (سستئين)	R-SH	$R\text{-}S^-$	٣و٨

obeikandl.com

(ج) القطبية Polarity

يمكن تقسيم الأحماض الأمينية البروتينية الى مجموعتين رئيسيتين تبعا لقطبية Polarity المجاميع التى ترتبط بذرة كربون ، حيث يمكن تقسيم الأحماض الأمينية الى

١- الأحماض الأمينية القطبية Polar amino acids

أرجنين-اسباراجين (أميد حمض الاسبارتيك) -حمض الأسبارتيك-السستئين cysteine - حمض الجلوتاميك - الجليسين -الهستدين - الليسين -السيرين - الثريونين- التيروسين.

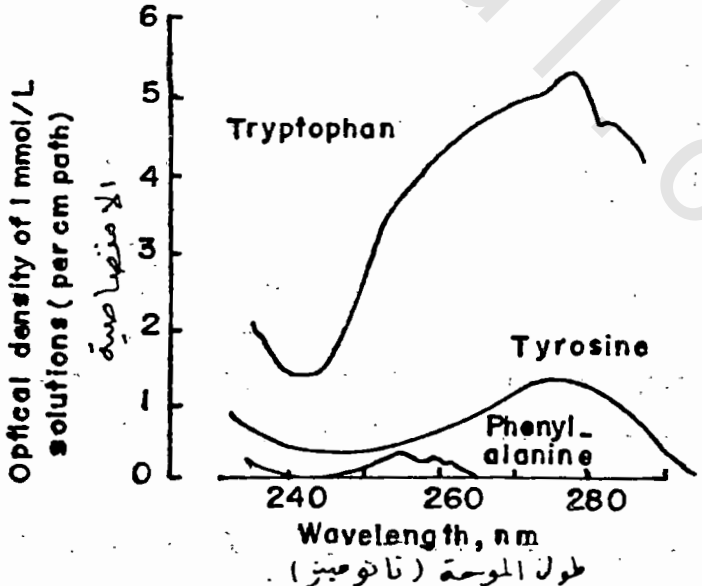
٢-الأحماض الأمينية اللاقطبية Nonpolar amino acids

ويندرج تحت هذه المجموعة الأحماض الأمينية التالية :

ألانين - ايزوليوسين - ليوسين - ميثيونين - فينايل ألانين - برولين - تربتوفان - فالين.

(د) امتصاص الأشعة فوق البنفسجية UV absorption

الأحماض الأمينية لاتمتص الضوء المرئى visible light ولذا فانها غير ملونة colourless، والأحماض الأمينية (باستثناء الأحماض العطرية) لاتمتص الأشعة فوق البنفسجية UV بأطوال موجات أكبر من 240 nm ، وكما هو مبين بالشكل رقم ٣-١٠ فأنه عند أطوال موجات أعلى من 240 nm فان معظم امتصاص البروتينات للـUV يكون راجعا لمحتواها من التربتوفان.



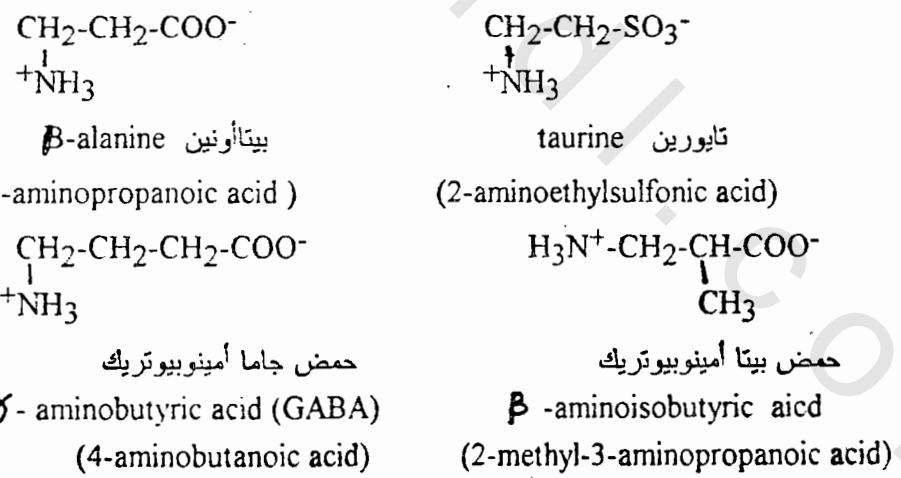
شكل ٣ -١٠: طيف امتصاص أشعة الـ UV للتربتوفان، التيروسين، والفينايل ألانين (تركيز المحلول ١ ملليمول/لتر).

الأحماض الأمينية اللابروتينية Non-protein amino acids

سبق القول أن هناك زهاء الثلاثمائة حمض أمينى توجد فى الطبيعة على الرغم من أن الأحماض الأمينية التى تدخل فى تكوين البروتين لايربوعددهاعن الثلاثة والعشرين حمضا.

وللأحماض الأمينية اللابروتينية أهمية قصوى للكثير من العمليات الحيوية فعلى سبيل المثال يلعب الحمض الأمينى بيتا الأنين β - alanine دورا حيويا هاما حيث يدخل فى تركيب مرافق الأنزيم أ Coenzyme A وكذا يدخل فى تركيب حمض البانتوثينك pantotheine (أحد فيتامينات B المركبة) أما الحمض الأمينى اللابروتينى المعروف باسم تايورين taurine فانه يوجد فى الصفراء مرتبطا مع أحماض الصفراء، وكذلك فان للحمض الأمينى جاما أمينوبيوتريك γ-aminobutyric acid (GABA) لها أهمية حيوية كبيرة اذ أنه يدخل فى تركيب الناقلات العصبية neurotransmitter الموجودة فى أنسجة المخ ، أما حمض بيتا أمينو أيزوبيوتريك β - aminoisobutyric acid فيعتبر الناتج النهائى لهدم البريميدينات فى بول بعض الأشخاص.

ويوضح الشكل رقم ٣-١١ الصيغ البنائية لبعض الأحماض الأمينية اللابروتينية.



شكل ٣-١١: الصيغ البنائية لبعض الأحماض الأمينية اللابروتينية .

الأهمية الحيوية للأحماض الأمينية Biological importance of amino acids

تتفاوت قدرة الكائن الحى على تخليق الأحماض الأمينية والأخيرة تقسم من هذه الوجهة الى ثلاثة أقسام وهى:

(أ) الأحماض الأمينية الضرورية Essential amino acids

ويندرج تحت هذا القسم الأحماض الأمينية التى لايستطيع الكائن الحى أن يخلقها بسرعة تواكب احتياجاته، ومن ثم فانه يجب امداد الجسم بها من مصدر خارجى، وتشتمل الأحماض الأمينية الأساسية للانسان على الأحماض التالية:

الليوسين - الأيزوليوسين - الميثيونين - الثربونين - الليسين - الفينايل ألانين - التربتوفان .

(ب) أحماض أمينية شبه ضرورية Semi essential amino acids

ويضم هذا القسم الأحماض الأمينية التى يكون فى مقدور الكائن الحى تخليقها شريطة توافر أحماض أمينية اخرى، وتشتمل الأحماض الأمينية شبه الضرورية على الأحماض الأمينية التالية:

أرجينين- تيروسين- جليسين- سيستين- سيرين- هستيدين .

(ج) أحماض أمينية غير ضرورية Non-essential amino acid

وهى تلك الأحماض التى يمكن لجسم الكائن الحى أن يخلقها، وتجدر الاشارة الىأن وصف هذه الأحماض بأنها غير ضرورية يعتبر وصفا غير دقيق اذأنه يمكن القول بأن هذه الأحماض ذات أهمية حيوية قصوى للكائن الحى لدرجة أن الكائن الحى يقوم بذاته بتخليقها، وتشتمل هذه الأحماض على:

الألانين- برولين - هيدروكسى برولين - حامض الأسبارتيك - حامض الجلوتاميك .

وعامة يعتبر احتواء البروتين على الأحماض الأمينية الأساسية مقياسا من المقاييس الهامة لجودة هذا البروتين من الوجهة التغذوية، ومن المعروف أن البروتينات النباتية يوجد بها نقص فى حامض أو أكثر من الأحماض الأمينية الأساسية (نقص الليسين فى الحبوب والأحماض الأمينية الكبريتية فى البقوليات مثلا) ، ومن ثم فان هذه البروتينات تعد بروتينات غير متكاملة أوغير متوازنة، ولذلك فغالبا ماينصح باجراء عملية تدعيم fortification للأغذية النباتية التى تؤكل بكميات كبيرة وبواسطة السواد الأعظم من الناس فى مجتمع ما (تسمى staple foods) كما هو الحال بالنسبة لأستهلاك الخبز فى مصر .

التفاعلات الكيماوية للأحماض الأمينية Chemical reactions of amino acids

يمكن تقسيم تفاعلات الأحماض الأمينية الى أقسام ثلاثة هى :

١- تفاعلات مجموعة الكربوكسيل -COOH

٢- تفاعلات مجموعة الأمين $-NH_2$

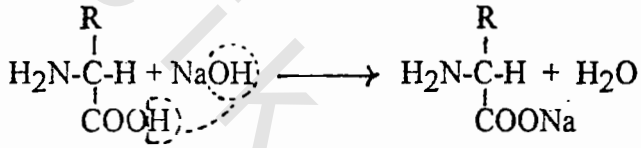
٣- تفاعلات الشق R

وتشترك الأحماض الأمينية فى تفاعلات القسمين الأول والثانى فى حين تعتبر تفاعلات القسم الثالث تفاعلات متخصصة لبعض الأحماض الأمينية التى تحتوى على مجاميع وظيفية معينة وسنحاول هنا اعطاء أمثلة توضح تفاعلات كل قسم من الأقسام الثلاثة سالفة الذكر:

أولا : تفاعلات مجموعة الكربوكسيل

١- تكوين الأملاح Salt formation

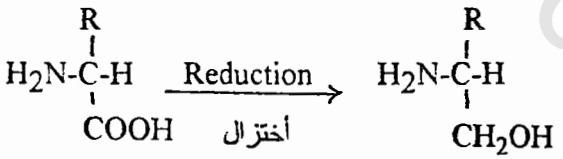
يمكن لمجموعة الكربوكسيل الموجودة بالأحماض الأمينية أن تعمل كمجموعة معطية للبروتون proton donor وبذا تتحول الى أيون سالب يمكن معادلته بواسطة الكاتيونات لتكوين الأملاح كما يلى:



حامض أمينى — ملح الصوديوم للحامض الأمينى

٢ - الأختزال Reduction

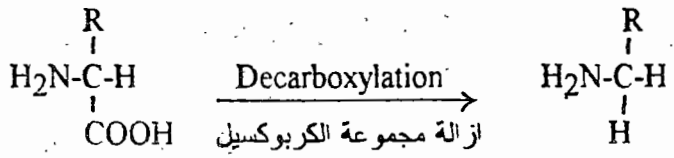
يمكن اختزال المجموعة الكربوكسيلية الى مجموعة كحولية ويسمى الناتج بالكحول الأمينى كما يلى:



حمض أمينى — الكحول الأمينى المقابل

٣- ازالة مجموعة الكربوكسيل Decarboxylation

يعد هذا التفاعل من التفاعلات الحيوية الهامة التى تفقد الأحماض الأمينيةعن طريقة ثانى أكسيد الكربون من مجموعة الكربوكسيل، وسيأتى شرح أهمية هذا التفاعل مستقبلا عند تناولنا لموضوعات التحولات الأيضية (الميتابوليزم)، وتؤدى ازالة المجموعة الكربوكسيلية من الحمض الأمينى الى تحوله الى أمين أولى كما يلى:

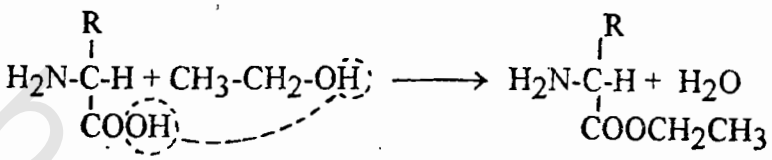


حمض أمينى — أمين أولى

obeikandl.com

٤ - تكوين الأستر Ester formation

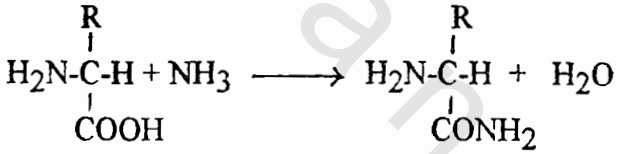
مجموعة الكربوكسيل الموجودة بالأحماض الأمينية شأنها شأن أية مجموعة كربوكسيل أخرى-يمكن أسترتها بنفس الميكانيزم المعروف لتكوين الاستر المقابل كما يلى:



حمض أمينى ايثانول ايثايل استر

٥ - تكوين الأميد Amide formation

مجموعة الكربوكسيل يمكنها التفاعل مع الأمونيا أو الأمينات لتكوين الأميدات(مثل الأسباراجين asparagine من حمض الاسبارتيك والجلوتامين glutamine من حمض الجلوتاميك) ويتم التفاعل كما يلى:



حمض أمينى أميد

وتجدر الأشارة الى ان الأحماض الأمينية المكونة للبروتين يرتبط بعضها ببعض بواسطة روابط أميدية تسمى بألروابط الببتيدية peptide bonds .

ثانيا: تفاعلات مجموعة الأمين

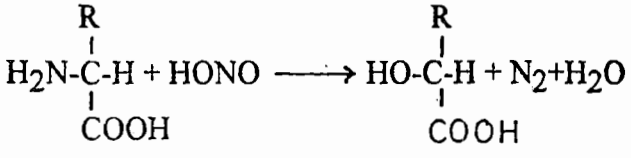
١ - تكوين الملح Salt formation

مجموعة الألفا أمينو الموجودة فى الأحماض الأمينية يمكنها استقبال بروتون لتتحول الى كايتون $-NH_3^+$ والذى يمكن معادلته بواسطة الأنيونات لتكوين الأملاح كما يلى:

الحمض الأمينى هيدروكلوريد الحمض الأمينى

٢ - التفاعل مع حمض النيتروز (تفاعل فان سليك Van slyke)

يمكن لمجموعة الأمين الموجودة بالأحماض الأمينية التفاعل مع حامض النيتروز HNO_2 كما يلى:



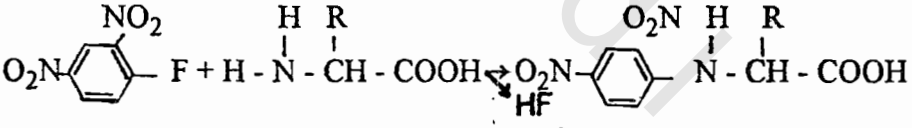
حمض أميني حمض هيدروكسيلي

وكما هو واضح من التفاعل فانه ينطلق غاز النتروجين كناتج من نواتج هذا التفاعل .

ويمكن تقدير غاز النتروجين المنفرد حجميا، ويعتبر هذا التفاعل أساس تقدير مجاميع الأمين الحرة، ومن ثم يستخدم كاختبار لتتبع تحلل البروتينات.

٣- تفاعل سانجر Sanger's reaction

فى عام ١٩٤٥ بهر العالم F.Sanger المشتغلين فى مجال الكيمياء الحيوية، باكتشافه الجديد والذي حصل بسببه عام ١٩٥٨ على جائزة نوبل فى الكيمياء الحيوية،فلقد أمكن ولأول مرة استخدام تكنيكات كيماوية وأنزيمية لمعرفة تتابع الأحماض الأمينية لهرمون الأنسولين، وقد تمكن سانجر Sanger من فصل هذا الهورمون الى سلسلتى بولى ببتيد ثم قام بتكسير (تحليل) الروابط الببتيدية باستخدام أنزيمات متخصصة الى ببتيدات أصغر، بعد ذلك أجرى تفاعل هذه الببتيدات مع جوهر سانجر وهو عبارة عن ١ فلورو، ٢ و ٤ ثنائى نيترو بنزين 1-fluro ,2,4 dinitro benzene تبعا للمعادلة التالية:



جوهر سانجو حمض أميني ٢و٤ ثنائى نيتروفينايل الحمض الأميني

2,4 dinitrophenyl amino acid

(أصفر اللون)

ومن السهل تقدير ناتج التفاعل كميا بواسطة الطرق الأسبكتروفومترية Spectrophotometry والرابطة التى تربط بين النتروجين وثنائى نيترو الفينايل N-dinitro phenyl والموجودة بناتج التفاعل تعتبر أقوى من الرابطة الببتيدية التى تربط الأحماض الأمينية المكونة لجزئ البروتين، ومن ثم يكون من اليسير التحصل على مشتق الحامض الأمينى ثنائى النيترو الأصفر عن طريق الأستخلاص بالايثير أو الكلوروفورم ثم يتم التقدير الكمى بالطرق الأسبكتروفومترية .

ويستخدم تفاعل سانجر للتعرف على تتابع الأحماض الأمينية amino acid sequence في سلسلة البروتين وذلك عن طريق تكوين مشتق ثنائي نيتروفينايل N-dinitrophenyl للحمض الأميني الطرفي المشتمل على مجموعة أمينية حرة (يعرف بالـ N-terminal amino acid) ثم فصله عن طريق التحليل المائي تحت ظروف موائمة والتعرف عليه بأستخدام احدى الطرق التحليلية كطرق الكروماتوجرافيا، وبتكرار تفاعل سانجر يمكن معرفة الحمض الأميني الثاني ثم الثالث وهكذا، ومن ثم يمكن معرفة ترتيب أوتتابع الأحماض الأمينية في سلسلة البولي ببتيد.

وتجدر الأشارة الى أنه بالأضافة الى امكانية تفاعل الطرف الأميني N-terminal residue في السلسلة الببتيدية مع كشاف أو جوهر سانجر فأن مجموعة amino group- في الحمض الأميني ليسين ، مجموعة الايميدازول في حمض الهستيدين ومجموعة الهيدروكسيل في حمض التيروسين ومجموعة السلفهيدريل (SH) في حمض السيستئين cysteine كل هذه المجاميع يمكنها التفاعل مع جوهر سانجر.

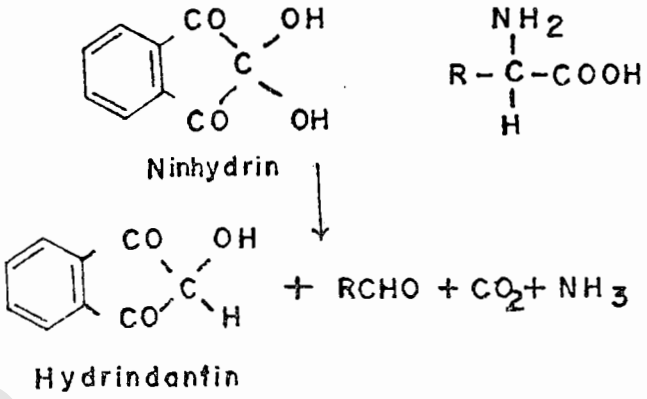
٤ - التفاعل مع النهيدرين Reaction with ninhydrin

النهدرين (triketohydrindene hydrate) مادة مؤكسدة تتفاعل مع كل الأحماض الأمينية الألفا أمينو عند قيم pH تتراوح بين ٤ ، ٦ لتعطي مركبا بنفسجي اللون ، وتعطي الامينات الأولية والأمونيا هذا التفاعل أيضا ولكن مع عدم تكوين غاز ثاني اكسيد الكربون .

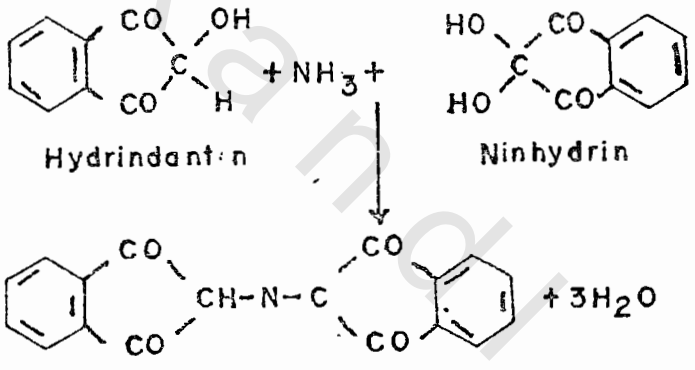
أما الأحماض التي تحتوى على مجموعة أيمينية imino group (البرولين والهيدروكسي برولين) فانها تتفاعل أيضا مع النهيدرين ولكن ناتج التفاعل يكون أصفر اللون وليس بنفسجيا.

وهذا التفاعل يعتبر تفاعلا حساسا جدا وهو من التفاعلات الممتازة للكشف عن الأحماض الأمينية على الكروماتوجرامات chromatograms أو في التقدير الكمي للأحماض الأمينية عند تقديرها بواسطة كروماتوجرافيا التبادل الأيوني ion exchange chromatography كما هو الحال عند استخدام أجهزة تحليل الأحماض الأمينية amino acid analyzers ويتم تفاعل النهيدرين مع الأحماض الأمينية في خطوتين كالتالي:

(١) يتفاعل جزئ من الحمض الأميني مع جزئ من النهيدرين فيؤدى ذلك الى ازالة CO_2 من مجموعة كربوكسيل الحمض الأميني حيث يتحول الأخير الى الدهيد يقل عن الحمض الأميني ذرة كربون واحدة بالاضافة الى تكوين الأمونيا.

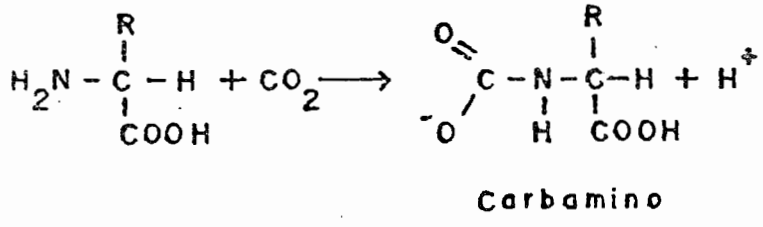


(ب) يتفاعل جزئ من الهيدرنيدانتين المتكون مع جزئ ثان من النهدرين ويتكون مركب معقد بنفسجى اللون .



(٥) التفاعل مع ثانى أكسيد الكربون Reaction with CO_2

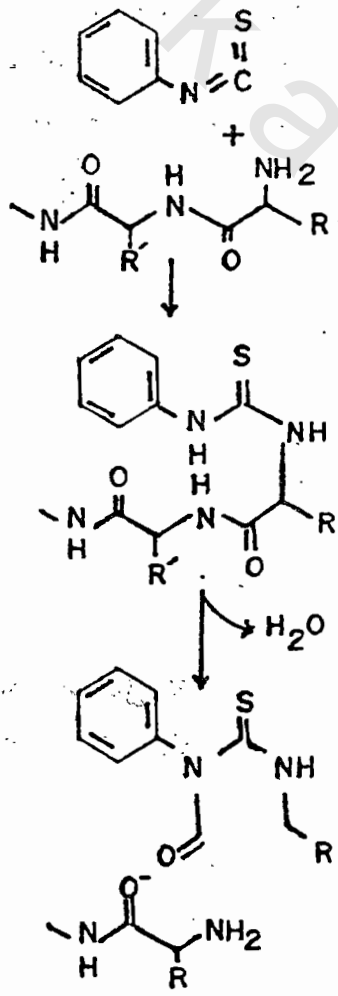
تتكثف مجاميع الأمين الحرة للبروتين مع ثانى أكسيد الكربون مكونة مركبات تسمى الكاربامينو carbamino ويتم التفاعل كما يلى:



وهذا التفاعل هام بالنسبة لبعض البروتينات كـالهيموجلوبين حيث يتم بواسطته نقل بعض ثانى اكسيد الكربون فى الدم .

(٦) تفاعل ادمان Edman's reaction

فى هذا التفاعـــل يستخدم جـوهر ادمان Edman's reagent وهو عباره عـن فينـايل أيـــزوثيوسنات phenyl isothiocyanate، ويستخدم تفاعل ادمان لمعرفة تتابع الأحماض الأمينية فى البولى ببتيد بالطرق الآلية automated sequencing وذلك عن طريق ازالة الحامض الطرفى المحتوى على مجموعة الأمين N-terminal residue الموجـــود بالسلسلة الببتيدية على صورة مشتق phenylthiohydantion .



فينايل ثيوسيانات(جوهر أدمان) +ببتيد

حمض فينايل ثيو هيدانتريك

فينايل ثيوهيدانتيون، ببتيد أقصر بمتبقى واحد

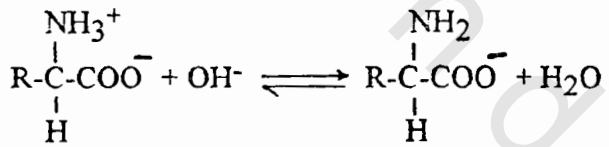
(٧) التفاعل مع الفورمالدهيد (تنقيط الفورمول) Formol titration

يتفاعل الفورمالدهيد مع المجاميع الأمينية ($-NH_2$) الموجودة بالأحماض الأمينية ليكون مركبات أحادية الميثيلول monomethylol وثنائية الميثيلول dimethylol كما يلى

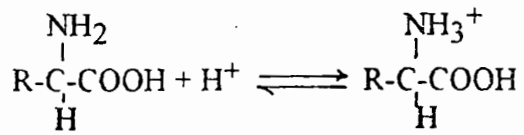
أحادى الميثيلول $-NH_2+HCHO \longrightarrow -NH(CH_2OH)$

ثنائى الميثيلول $-NH(CH_2OH)+HCHO \longrightarrow -N(CH_2OH)_2$

ولايتفاعل الفورمالدهيد مع المجاميع الأمينية المشحونة($-NH_3^+$)، ومن ثم فان اضافة الفورمالدهيد للحمض الأمينى هدفها نقل قيمة الـ pK للمجموعة الأمينية الى أقل قيمة pH ولذا فانه عند تنقيط الحامض الأمينى والفورمالدهيد فان الفرصة تعطى لمجموعة الكربوكسيل لكى تظهر صفاتها الحامضية مما يسمح بتقدير مجاميع الكربوكسيل الحرة فى الأحماض الأمينية عن طريق المعايرة بواسطة NaOH فى وجود دليل الفينولفتالين، وهذا يوضح أن الحمض الأمينى (كما سبق القول) يوجد على صورة أيون مزدوج الشحنة zwitter ion فى الجانب الحامضى وليس القاعدى من منحنى التنقيط ،وهذا الوضع يتغير عند اضافة الفورمالدهيد فى حالة ماذا كانت الصورة غير المشحونة للحمض الأمينى هى الصورة السائدة :



الأيون مزدوج الشحنة



الصورة غير المشحونة

ثالثا: تفاعلات الشق R

١- تفاعل ميلون Millon's reaction

المركبات التى تحتوى على أصل الهيدروكسى بنزين Hydroxy benzene تتفاعل مع جوهر ميلون معطية معقدات . والحمض الأمينى تيروسين ومشتقاته هو الحمض الأمينى الوحيد الذى يعطى نتيجة موجبة مع هذا التفاعل (معقد أحمر اللون)، وجوهر ميلون الأصلى يتكون أساسا من محلول نترات الزئبقيك فى ٥٠٪ حجم/حجم حامض نيتريك، ولكن تم تعديل تركيب هذا الجوهر وأصبح الآن مكونا من محلول ١٥٪ كبريتات الزئبقيك فى ١٥٪حجم/حجم حامض

كبريتيك، والتركيب الحديث لجوهر ميلون يقلل من تداخل الأملاح غير العضوية مما يزيد من دقة النتائج، وتجدر الاشارة الى أن حمض التيروسين سواء كان حرا أو مرتبطا فى صورة بروتين يعطى نتيجة موجبة مع اختبار ميلون .

٢- تفاعل الجليوكسليك Glyoxylic reaction

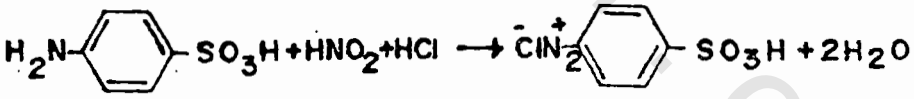
تتفاعل مجموعة الاندول الموجودة فى الحمض الأمينى تربتوفان مع حمض الجليوكسليك glyoxylic acid فى وجود حمض كبريتيك مركز وينتج معقد بنفسجى اللون، ويحتوى حمض الخليك الثلجى بعد تعريضه للضوء على حمض الجليوكسليك .

٣- اختبار الزانثوبروتيك Xanthoproteic reaction

الأحماض الأمينية التى تحتوى على حلقات عطرية تكون مشتقات نيترو صفراء عند التسخين مع حمض النيتريك المركز، أما أملاح هذه المشتقات فتكون برتقالية اللون.

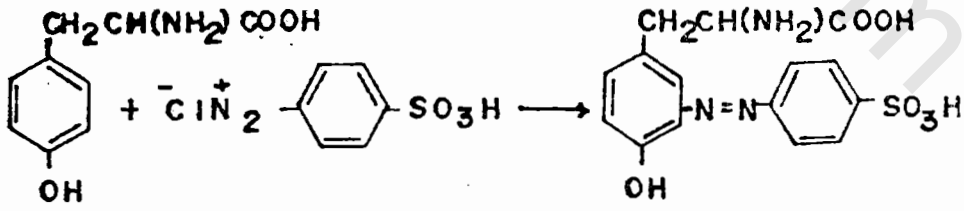
٤- اختبار باولى Pauly's test

تحدث عملية ازدواج coupling بين حمض ثنائى أزوتيزيد السلفانيليك sulphanilic diazotized مع الأمينات، الفينولات والايميدازول وتتكون مركبات آزو شديدة التلون (مركبات ثنائيةالأزونيوم) وهذه المركبات تتكون فقط على البارد ومن ثم فيجب تبريد جميع مواد التفاعل باستخدام حمام ثلجى قبل اجراء عملية الـ diazotization، ويتم التفاعل فى خطوتين كما يلى :



Sulphenilic acid
حمض السلفانيليك

Diazonium compound
مركب ثنائى الأزونيوم



Tyrosine
تيروسين

Diazonium compound
مركب ثنائى الأزونيوم

Azo dye
صبغة الآزو
+
HCl

٥- تفاعل النيتروبروسيد Nitroprusside

تتفاعل مجموعة الثيول الموجودة بالحمض الأمينى سيستين مع مركب نيتروبروسيد الصوديوم Sodium nitroprusside ($Na_2Fe(CN)_5NO$) فى وجود زيادة من الأمونيا لتعطى لونا أحمر يتلاشى فى غضون دقائق .

٦- تفاعل ساكاجوشى Sakaguchi's reaction

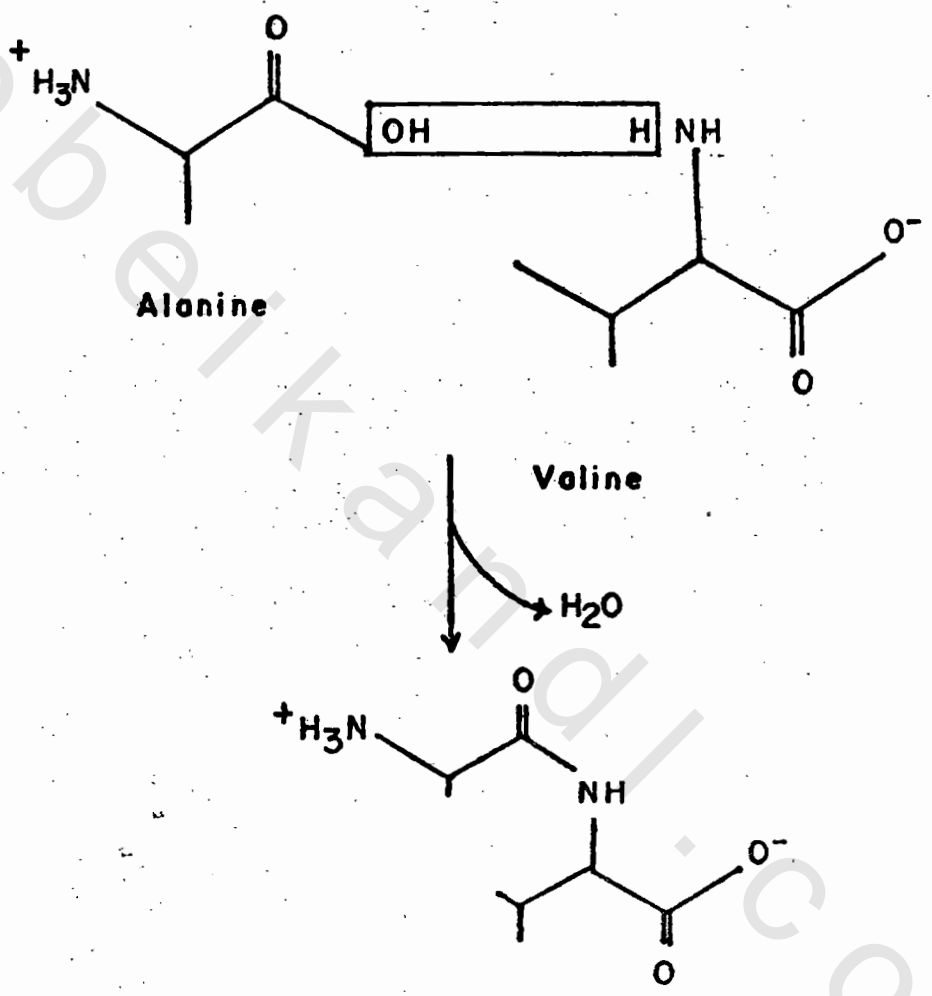
وهو تفاعل متخصص للحمض الأمينى أرجنين فقط وذلك لاحتوائه على مجموعة جوانيدو والتى تتفاعل مع مركب الألفا نافثول naphthol- ومادة مؤكسدة مثل ماء البروم فيتكون لون أحمر .

ثانيا: الببتيدات Peptides

عندما ترتبط مجموعتا الكربوكسيل والأمين الموجودتان بالأحماض الأمينية لتكوين الروابط الببتيدية فان ناتج هذا الأرتباط يعرف باسم متبقى الأحماض الأمينية amino acid residues، وهو عباره عن الببتيد peptide .

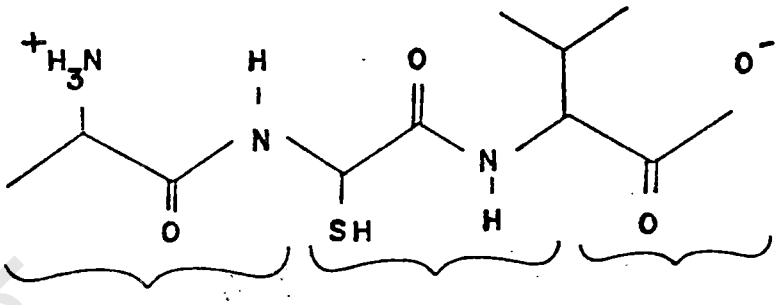
ويتكون الببتيد من ارتباط اثنين أو أكثر من متبقيات الأحماض الأمينية amino acid residues التى ترتبط مع بعضها عن طريق الروابط الببتيدية، واذا كانت هذه المتبقيات عشرة أو أقل سمى ناتج الأرتباط بالببتيد أما اذا زاد العدد عن عشرة سمى بعديد الببتيد polypeptide

وتتكون الروابط الببتيدية ($-\overset{\overset{\large O}{\|}}{C}-NH$) بين حامضين أمينين كالألانين والفالين مثلا لتكوين ثنائى ببتيد dipeptide كما يلى :



ثنائى ببتيد الألانايل فالين Alanyl valine

وكما هو واضح من التفاعل السابق فان الرابطة الببتيدية تتكون عن طريق تفاعل تكثيف condensation ترتبط من خلال مجموعة COOH- من حمض أمينى مع مجموعة NH_2- من حمض أمينى آخر مع تكوين جزئ ماء لكل رابطة ببتيدية تتكون، أما اذا ارتبطت ثلاثة أحماض أمينية كالألانين والسيستئين والفالين مثلا بواسطة الروابطالببتيدية لتكوين ثلاثى ببتيد tripeptide فان الارتباط يتم كما هو موضح بالشكل رقم ٣-١٢.



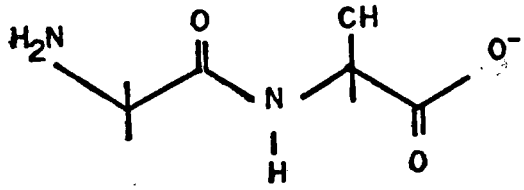
Alanyl Cysteinyl Valine

شكل ٣-١٢: طريقة ارتباط ثلاثة احماض أمينية بواسطة الروابط الببتيدية لتكوين ثلاثى ببتيد tripeptide .

ويلاحظ أن الببتيد الثلاثى يحتوى على ثلاثة متبقيات للأحماض الأمينية amino acid residues وليس ثلاث روابط ببتيدية (لاحظ ان عدد الروابط الببتيدية فى ثلاثى الببتيد اثنان فقط).

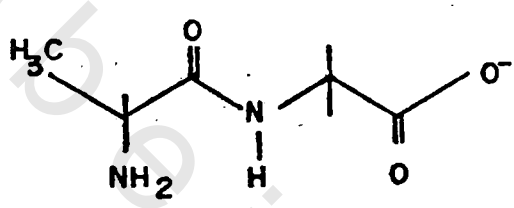
وعادة ماتتم كتابة السلسلة الببتيدية بحيث يكون الطرف المحتوى علىمجموعة الأمين الحرة (يسمى بالمتبقى الطرفى الأمينى N-terminal residue) على اليسار فى حين يكون الحمض الأمينى المحتوى على مجموعة كربوكسيل حرة (يسمى بالمتبقى الطرفى الكربوكسيلى C-terminal residue) على اليمين. ويلاحظ ان اى ببتيد يحتوى على مجموعة أمينية حرة فى أحد طرفيه ومجموعة كربوكسيلية حرة في طرفه الآخر.

وتتم تسمية الببتيد بالبدء بمتبقى الحمض الأمينى الذى يحتفظ بمجموعته الأمينية مع استبدال مقطع (ين) فى آخر اسم الحامض الأمينى بالمقطع (يل) وتتم التسمية وفقا لهذا النظام لكل الأحماض الأمينية بالسلسلة الببتيدية حتى متبقى الحامض الأمينى الذى يحتفظ بمجموعته الكربوكسيلية والذى يظل محتفظا باسمه دون ما تعديل كما يتضح من الشكل رقم ٣- ١٣.



الرابطة الببتيدية (جليسايل ألانين)

(جليسايل ألانين- Glycyl alanin)

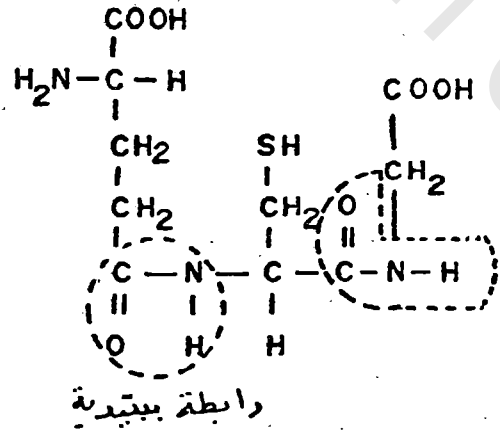


الرابطة الببتيدية (ألانايل جليسين)

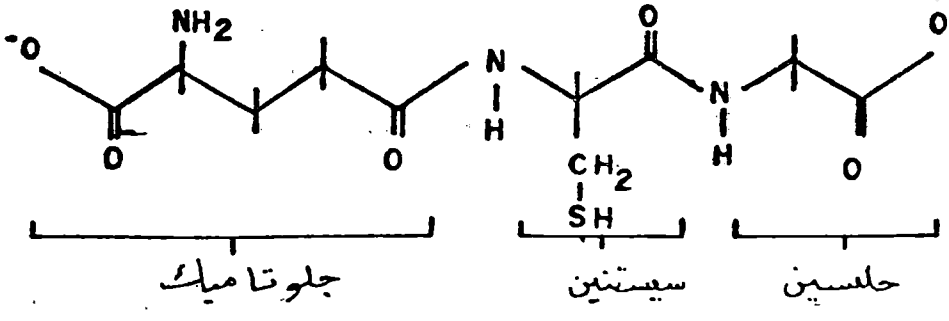
Alanyl glycine (ألانايل جليسين)

شكل ٣-١٣ :الصيغ البنائية للجليسايل ألانين والألانايل جليسين .

ومن الببتيدات الهامة الببتيد الثلاثي tripeptide المعروف باسم جلوتاثيون glutathione وهو عبارة عن جلوتاميل سيستئايل جليسين glutamyl cysteinyl glycine (شكل ٣-١٤)



شكل (٣-١٤): الصيغة البنائية للجلوتاثيون.



البناء الأولى للببتيدات Primary structure of peptides

البناء الأولى للببتيدات هو عبارة عن تتابع متبقيات الأحماض الأمينية amino acid residues المكونة لسلسلة عديد الببتيد، وعند معرفة عدد والبناء الكيماوى وترتيب كل من متبقيات الأحماض الأمينية التى تدخل فى تركيب السلسلة الببتيدية عندئذ يمكن القول بأنه قد تم تقدير البناء الأولى لعديد الببتيد .

ولما كانت عديدات الببتيدات (البروتينات) تحتوى على مائة أو أكثر من متبقيات الأحماض الأمينية فإنه غالبا يكون من غير المناسب استخدام صيغة البناء الشائعة للتدليل على البناء الأولى ولكن يمكن كتابة البناء الأولى باستحدام حروف تم التعارف علميا على كل حرف منها والحامض الأمينى الذى يمثله، فمثلا يرمز لحمض الجلوتاميك بالرمز E وللألانين بالرمز A والليسين بالرمز K والجليسين بالرمز G والتيروسين بالرمز Yكذلك يمكن اختصار اسم كل حامض الى الثلاثة حروف الأولى من اسم الحامض فاذا تكون ببتيد مثلا من الأحماض الأمينية التالية :

Glutamic - Alanine - Lysine - Glycine - Tyrosine - Alanine

فانه يمكن التعبير عنه بطريقتين :

الطريقة الأولى Glu - Ala - Lys - Gly - Tyr - Ala

الطريقة الثانية EAKGYA

ويلاحظ انه اذا ماأستخدم مختصر الخروف الثلاثة الأولى للتعبير عن الحمض الأمينى فانه يتم وضع خط يفصل بين كل حمض والتالى له فى التتابع أما اذا استخدم مختصر الحرف الواحد فيتم كتابة الحروف متجاورة بلا خطوط فاصلة .

وفىحالة وجود جزء من تتابع الأحماض الأمينية فى سلسلة عديد الببتيد غير مؤكد ترتيبها فى السلسلة فان هذا الجزء يتم وضعه بين قوسين كما يلى :

Glu - Lys - (Ala - Gly - Tyr) - His - Ala

وتجدر الأشارة هنا الى أنه يمكن الآن استخدام طرق آلية تستخدم فيها أجهزة مبرمجة لتقدير تتابع الأحماض الأمينية فى سلاسل عديد الببتيد والتعرف عليها وتسمى الأجهزةالمستخدمة فى هذا الصدد بالأجهزة الآلية لتقدير تتابع الأحماض الأمينية automated sequencing instruments أويطلق عليها sequenators، ومثل هذه الأجهزه تعتمد على تفاعل أدمان Edman الذى سبق شرحه، كذلك فلقد أمكن حديثا تخليق بعض السلاسل الببتيدية بواسطة طرق آلية ،ولقد أشرنا الى هذه الطرق فى مقدمة هذا الكتاب .

ثالثا: البروتينات Proteins

جميع البروتينات عباره عن عديدات ببتيد عالية الوزن الجزيئى وليست هناك على وجه اليقين فروق واضحة بين تعبيرى بروتين protein وعديد ببتيد polypeptide اذ أن الخط الفاصل بين عديدات الببتيد عالية الوزن الجزئى والبروتين منخفض الوزن الجزئى ليس خطا قاطعا . وعلى الرغم من أن جميع البروتينات عبارة عن عديدات الببتيد polypeptides فان العديد من البروتينات تحتوى على مركبات أخرى بالأضافة الى الأحماض الأمينية مثل مجموعة الهيم heme ، مشتقات الفيتامينات ، الليبيدات أو الكربوهيدرات ، وللتفريق بين هذه البروتينات وتلك التى تتكون من الأحماض الأمينية فقط فقد تم تسمية الأولى بألبروتينات المركبة complex proteins أما الثانية فسميت بالبروتينات البسيطة simple proteins، والبروتينات المركبة تشترك مع البروتينات البسيطة فى صفاتها كما أن الاولى علاوة على ذلك تتسم بصفات المجاميع الاضافية الموجودة بها بخلاف الأحماض الأمينية .

تقسيم البروتينات Classification of proteins

يمكن القول بوجود عدد هائل من البروتينات بالطبيعة (يقدر بنحو ٥٠ ألف) ويعزى ذلك الكم الهائل الى عدد الأحتمالات الهائل التى يمكن للأحماض الأمينية أن ترتبط بها مما ينتج عنه بروتينات مختلفة ، فالبروتينات تختلف تبعا لمصدرها وكذا لطبيعة العضو داخل نفس الكائن الحى . والعدد الكبير من البروتينات الموجود بالطبيعة قد حال دون وضع نظام موحد متفق عليه عالميا بحيث يمكن اتباعه لتقسيم البروتينات دون ما تداخل، فجميع التقسيمات التى اقترحت كانت لها مثالبها وقصورها. وعامة فلقد اعتمدت النظم المختلفة لتقسيم البروتينات على ستة أسس هى:

١- الذوبان Solubility

بدأ تقسيم البروتينات تبعا لذائبيتها فى الفترة بين عامى ١٩٠٧-١٩٠٨ وهذا التقسيم مازال مستخدما حتى الأن ولاسيما فى مجال الكيمياء الحيوية الطبية، بيد ان الفروق بين الأقسام المختلفة ليست فروقا قاطعة فعلى سبيل المثال فان التفريق القاطع بين الألبيومينات albumins والجلوبيولينات globulins لايمكن تحقيقه باستحدام الذائبية فقط لكل منها فى الماء أو المحاليل الملحية، ومن ثم فقد تم تقسيم الجلوبيولينات الى الجلوبيولينات الكاذبة pseudoglobulins التى يمكن اذابتها فى الماء بسهولة والجلوبيولينات الحقيقية englobulins وهى غير ذائبة فى الماء الخالى من الأملاح. ويوضح الجدول رقم ٣-٢ تقسيم البروتينات على أساس ذائبيتها .

جدول٣-٢: تقسيم البروتينات على أساس ذائبيتها

البروتين	الذائبية
الألبيومينات Albumins	تذوب فى الماء والمحاليل الملحية .
الجلوبيولينات Glubulins	تذوب بقلة فى الماء ولكنها تذوب فى المحاليل الملحية.
البروتامينات Protamins	تذوب فى الايثانول(٧٠-٨٠٪) ولاتذوب فى الماء ولا فى الايثانول المطلق وتتميز بمحتواها العالى من الأرجنين.
الهستونات Histones	تذوب فى المحاليل الملحية .
البروتينات القرنية Scleroproteins	لاتذوب فى الماء ولافى المحاليل الملحية وهى غنية فى محتواها من الجليسين، الألانين، البرولين.

٢ - الشكل العام Overall shape

يمكن تقسيم البروتينات تبعا لنسب المحاور axial ratios (النسب بين محاور الطول ومحاور العرض)، وتقسم البروتينات من هذه الوجهة الى مجموعتين **المجموعة الأولى: البروتينات الكروية Globular proteins**

ولها نسب محاور أقل من ١٠ وعامة ليست أعلى من ٣-٤ وتتميز هذه البروتينات بوجود سلاسل عديد الببتيد فى شكل لفات مطوية مضغوطة compact folded coils، ومن أمثلة هذه البروتينات هورمون الأنسولين insulin وألبيومينات وجلوبيولينات البلازما وعديد من الأنزيمات **المجموعة الثانية: البروتينات الليفية fibrous proteins**

وهذه البروتينات لها نسب محاور أكبر من ١٠ وتتميز بوجود سلاسل عديدات الببتيد أو مجموعات منها فى صورة لفات تأخذ شكلا لولبيا spiral أو حلزونيا helix وترتبط هذه السلاسل عرضيا عن طريق روابط ثنائية الكبريت S-S والروابط الهيدروجينية. ومن أمثلة هذه البروتينات الكيراتين keratin (البروتين الرئيسى للشعر والصوف والجلد) والميوسين myosin (البروتين الرئيسى المسئول عن انقباض العضلات).

٣- الوظائف الحيوية Biological functions

يمكن تقسيم البروتينات تبعا لوظائفها الحيوية فمثلا هناك البروتينات البنائية structural والبروتينات المساعدة على التفاعل catalytic والأخيرة معظمها أنزيمات وهذه يمكن تقسيمها تبعا لنوع التفاعل الذى تحفزه.

٤- الصفات الفيزيقية physical properties

بعض البروتينات لها أهمية كبيرة من النواحى الطبية، ولذا فهى تقسم تبعا لنظم متخصصة ويمكن باستخدامها التفريق بين البروتينات المتقاربة، ومثال ذلك الليبوبروتينات الموجودة بالبلازما plasma lipoproteins والتى تعمل على نقل الليبيدات الموجودة بالغذاء وتلك التى يتم تكوينها بواسطة الكائن الحى. والطرق المستخدمة فى هذا الصدد تعتمد اما على سلوك الليبوبروتينات فى المجال الكهربى (باستخدام طرق الهجرة الكهربية electrophoresis عند pH =8,6) أو مجال الجاذبية gravitational field ، كذلك فانه تجرى الآن محاولات لتقسيم الليبوبروتينات الموجودة ببلازما الدم على أساس كثافة تأثرتها hydrated densities .

٥- البناء ثلاثى الأبعاد Three-dimensional structure

يمكن تقسيم البروتينات من هذه الوجهة الى قسمين أساسيين هما وجود أو عدم وجود بناء رابعى quaternary structure للبروتين (سيأتى شرح مفهوم هذا البناء فى الصفحات التالية).

وبالأضافة الى ذلك فلقد اوضحت دراسات التركيب باستخدام الأشعة السينية X-ray crystallography أنه يمكن استخدام هذه الطريقة كأساس جيد لتقسيم البروتينات.

٦ - التركيب الكيماوى Chemical composition

من التقسيمات الدارجة للبروتينات هو ذلك التقسيم الذى يعتمد على التركيب الكيماوى للبروتين، وتقسم البروتينات من هذه الوجهة الى قسمين أساسيين .

(أ) البروتينات البسيطة Simple proteins

وهى البروتينات التى تتكون أساسا من الأحماض الأمينية فقط، ومن أمثلة هذه البروتينات. البروتينات الليفية وتشتمل على الكولاجينات، الألاستينات والكيراتينات، وكذلك البروتينات الكروية وتشتمل على الالبيومينات والجلوبيولينات والبرولامينات والهستونات.

(ب) البروتينات المركبة Complex proteins

وهى مركبات من البروتينات البسيطةمرتبطة مع جزئ أو اكثر من مكونات أخرى غير البروتين تسمى المجموعة المرتبطة prosthetic group ومن أمثلة هذه البروتينات: البروتينات النووية- الميوكوبروتينات- الجليكوبروتينات- الفوسفوبروتينات-الكروموبروتينات-

الليبوبروتينات- البروتينات المعدنية . ويوضح الجدول رقم ٣-٣ أهم البروتينات البسيطة وخواصها والمصادر الشائعة لكل منها.

جدول ٣-٣ خواص ومصادر البروتينات البسيطة

الاسم	الخواص	أمثلة لمصادره
١- البيومين Albumin	يذوب فى الماء-يتجمع بالحرارة يمكن ترسيبه فى محلول بالتشبع بكبريتات الأمونيوم .	البيض-اللبن-العضلات ويسمى تبعا للمصدر.
٢-جلوبيولين Globulin	لايذوب فى الماء-يذوب فى محاليل ملحية متعادلة-يتجمع بالحرارة - يترسب من المحاليل بواسطة كبريتات أمونيوم ٥٠٪ .	الدم والعضلات
٣ - جلوتيلين Glutilin	بروتين نباتى-لايذوب فى الماء ولا المحاليل الملحية أو المتعادلة يذوب فى الأحماض والقلويات المخففة .	القمح ويسمى glutinine الأرز ويسمى oryzenin
٤- البرولامين prolamin	يذوب فى كحول ٧٠-٨٠ ٪ لايذوب فى الماء-بروتينات نباتية	القمح ويسمى gliadin الذرة ويسمى zein
٥ - بروتامين Protamin	أبسط البروتينات البسيطة-يذوب فى الماء-يتجمع بالحرارة-يتميز بأنه قاعدى،وهو يتصل بالأحماض النووية .	نواة الخلايا وخاصة خلايا الحيوانات المنوية
٦ - هستونات Histons	تتشابه مع البروتامينات فى كونها بسيطة وقاعدية ونجدها عادة متصلة بالأحماض النووية .	البروتينات النووية
٧ - البروتينات القرنية	مجموعة غير متجانسة من البروتينات لاتذوب فى أى من المذيبات السابقة	

obeikandl.com

Sclero-pro-teins	وهى بروتينات حيوانية أهمها:	
	أ-الكيراتين Keratin	حوافر الحيوانات القرون والشعر
	ب-الكولاجين Collagen	الجلد والعظام والغضاريف
	ج-الألاستين Elastin	الأنسجة الضامة
	د-السيريسين Sericin	الحرير الطبيعى الناتج من دودة القز

وأهم البروتينات المركبة وخواصها ومصادرها موضحة بالجدول رقم ٣-٤ .

جدول ٣-٤: خواص ومصادر البروتينات المركبة

الاسم	الخواص	أمثلة المصادر
البروتينات النووية Nucleoproteins	ترتبط فيها البروتينات(البروتامينات) مع الأحماض النووية،وهى تذوب فى محاليل كلوريد الصوديوم المخففة	أنوية سيتوبلازم الخلايا
الميكوبروتينات والجليكوبروتينات Mucoproteins & glycoproteins	الميكوبروتينات:ترتبط فيها البروتينات مع عديدات السكر المخاطية وتحتوى على أكثر من ٤٪ جلوكوز أمين. الجليكوبروتينات:تحتوى على أقل من ٤٪ جلوكوز أمين .	مكون رئيسى فى الأنسجة الضامة وبعض بروتينات سيرم الدم . سيرم الدم .
الفوسفوبروتينات Phospho-proteins	المجموعة المرتبطة عبارة عن حامض فوسفوريك مرتبط مع مجموعةOH للأحماض الأمينية الهيدروكسيلية (رابطة استر).	كازين اللبن-أنزيم الببسين
البروتينات الملونة Chromo-proteins	المجموعة المرتبطة مع البروتين تكون ملونة .	الهيموجلوبين(دم الفقريات) الهيموسيانين(دم بعض اللافقريات) الهيموجلوبين(بالعضلات)
الليبوبروتينات Lipoproteins	بروتينات بسيطة متحدة مع الليبيدات .	كوليسترول الدم،ليبوفيتيلين بصفار البيض .

البروتينات المعدنية	يدخل فى تركيبها المعادن كالنحاس أو المنجنيز أو الماغنسيوم.	انزيم تيروسيناز Tyrosinase انزيم أرجيناز Arginase أنزيم زانثين Xanthine أوكسيديز Oxidase

---

مستويات بناء البروتين Levels of protein structure

يتكون البروتين من ارتباط الأحماض الأمينية بعضها ببعض عن طريق الروابط الببتيدية كما أسلفنا، وتتابع الأحماض الأمينية وتركيبها وكيفية تنظيمها فى السلاسل عديدة الببتيد. كلها عوامل تحدد شكل جزئ البروتين، ومما لاشك فيه أن عمليات ارتباط السلاسل الببتيدية وانتظامها يكون نتيجة لوجود روابط كيماوية تعتبر مسئولة عن مثل هذا الارتباط ويمكن القول بأن بناء البروتين عامة يثبت بواسطة نوعين من الروابط القوية وثلاثة أنواع من الروابط الضعيفة، وتشتمل الروابط القوية على:

الرابطة الببتيدية - الرابطة ثنائية الكبريت .

فى حين تشتمل الروابط الضعيفة على:

الرابطة الهيدروجينية - الرابطة الكارهة للماء - الرابطة الملحية أو الالكتروستاتيكية .

وبناء جزئ البروتين يخضع لأربعة أنظمة تعرف بمستويات البناء وهى:

١- البناء الأول Primary structure

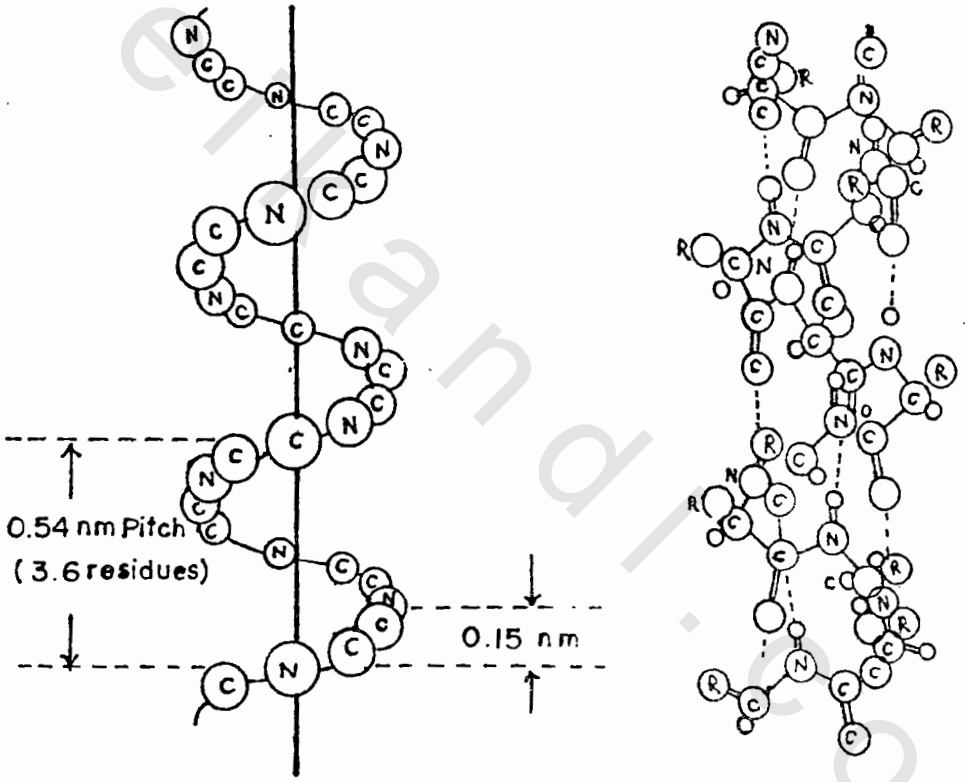
ويقصد به تتابع sequenc الأحماض الأمينية فى السلسلة الببتيدية التى تكون هيكل جزئ البروتين، أما البروتينات التى تتكون من اكثر من سلسلة عديد ببتيد فيكون لكل سلسلة بناؤها الأولى، وكذلك فان البناء الأولى يحدد أماكن الروابط ثنائية الكبريت disulfide bonds ان وجدت.

٢- البناء الثانوى Secondary structure

يمكن للسلسلة الببتيدية ببنائها الأولى أن تلتف فى صورة حلزونية لتعطى مستوى ثانيا من التجمع تكون فيه الروابط الهيدروجينية هى المسئولة عن تكوين الحلزون، ويتم تكوين الروابط الهيدروجينية بين الهيدروجين H المرتبط مع نتروجين حمض أمينى وبين الأكسجين O المرتبط مع الكربون فى ثالث حمض أمينى يليه فى السلسلة، ونتيجة لذلك تأخذ سلسلة البروتين الشكل الحلزونى spiral وهذا الشكل اما أن يكون حلزونا مضغوطا compact ويسمى حلزون ألفا - helix أو أن يكون مفردا فى صورة سلاسل عكسية التوازى تعرف بصفائح بيتا sheets-

وهذه الفروق تكون أوضح ما يمكن بالنسبة للبروتينات الموجودة طبيعيا فى صورة الياف مثل الصوف والشعر (تؤدى عملية كى الشعر الى تحويله من الصورة المجعدة helix- الى الصورة المفرودة sheet- نتيجة لتأثير الحرارة على الروابط الهيدروجينية) .

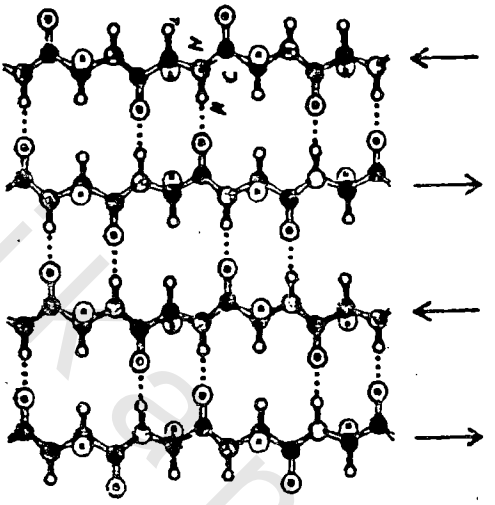
ويوضح الشكلان ٣-١٥، ٣-١٦: طريقة بناء كل من α-helix والـ β-sheet.



شكل ٣-١٥: بناء الـ α-helix للبروتين.

الشكل الأيسر يوضح ذرات الكربون α ، نتروجين α والكربون الكربوكسيلى الذى يكون هيكل الحلزون. أما الشكل الأيمن فيوضح بالاضافة الى ذلك المجاميع المستبدلة R ، وذرات H ، O المكونة للروابط الهيدروجينية (موضحة بالنقط).

Ref Haggis et al. Introduction to Molecular Biology, Willey, (1964)

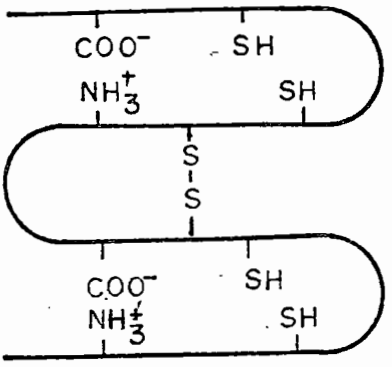


شكل ٣-١٦: السلاسل عكسية التوازى المكونة للـ β-sheet حيث تتصل السلاسل فى اتجاهات عكسية. وتؤدى الروابط الهيدروجينية بين مجموعة CO.NH الى تثبيت البناء أما مجاميع R فانها تتكون بأعلى وأسفل مستوى الـ Sheet .

Ref. Stryer, L. : Biochemistry, 2nd ed Freeman, (1981).

٣- البناء الثالثى Tertiary structure

يمكن للصورة α-helix أو β-sheet للبيتيدات أن تترتب فى تكوين قريب من الشكل الكروى أو البيضاوى، ويسمى هذا التركيب بالبناء الثالثى (شكل ٣-١٧) ،وتعتبر الروابط الهيدروجينية مسئولة الى حد ما عن الشكل المعين للبناء الثالثى علاوة على الروابط الملحية المتكونة بين مجموعات الكربوكسيل COOH- الحرة ومجموعة الأمين الحرة NH_2- وكذا الروابط ثنائية الكبريت S-S

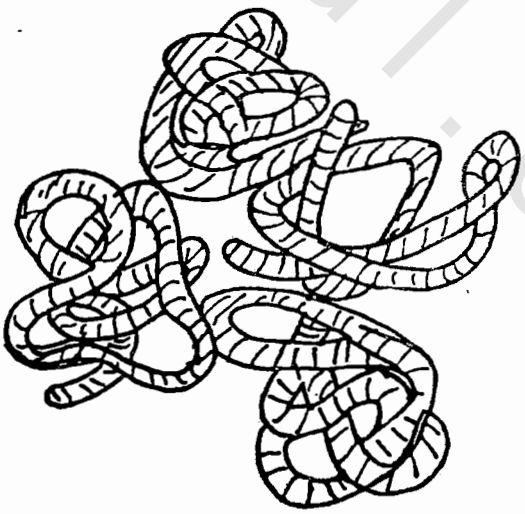


شكل ٣-١٧: البناء الثالثى للبروتين .

المصدر: التابعى ومحسب (١٩٧٦).

٤- البناء الرابعى Quaternary structure

اذا ما ارتبطت سلسلتان أو أكثر من السلاسل عديدة الببتيد عن طريق قوى تغاير الروابط التعاونية (اى ليست روابط ببتيدية أو ثنائية الكبريت) ينتج عن ذلك مستوى آخر من مستويات بناء البروتين يعرف بالبناء الرابعى . والروابط المشتركة فى هذا البناء هى الروابط الهيدروجينية والملحية (الالكتروستاتيكية) وهذه تتكون بين متبقيات الأحماض الأمينية على أسطح سلاسل عديدات الببتيد، وتسمى كل سلسلة protomer أو monomer أو subunit أما مجموعة السلاسل فتسمى oligomer، ويوضح الشكل رقم ٣-١٨ البناء الرابعى للبروتين .



شكل ٣-١٨: البناء الرابعى للبروتين .

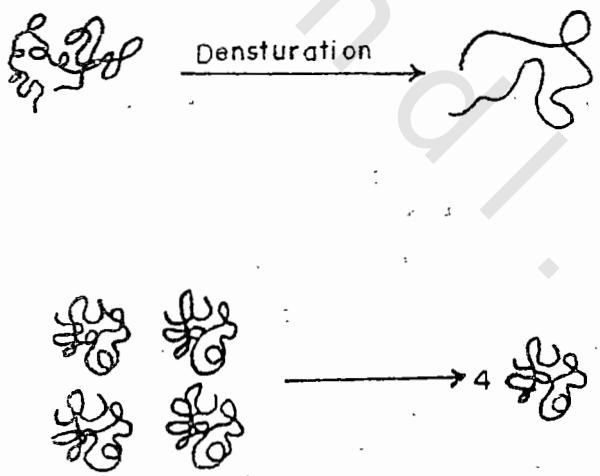
المصدر: التابعى ومحسب (١٩٧٦).

دنترة البروتينات Denaturation of proteins

obeikandl.com

الدنترة هى أية عملية تغير من البناء المنتظم للجزئ الطبيعى للبروتين native protein الى صورة أكثر فى عدم انتظامها، وفى أثناء الدنترة يحدث تكسير للروابط الهيدروجينية والروابط الكارهة للماء hydrophobic كذلك يواكب عملية الدنترة زيادة قيمة الأنتروبى entropy (مقياس لدرجة عدم انتظام النظام) للجزيئات، والدنترة يمكن أن تكون عكسية reversible كما فى حالة أنزيم الكيموتربسين chymotrypsin والذى يفقد نشاطه بالتسخين ويستعيده عند التبريد، غير أنه فى معظم الحالات يكون من غير الممكن استعادة البروتين لنشاطه بعد حدوث عملية الدنترة وفى هذه الحالة تكون الدنترة غير عكسية irreversible .

وبعد حدوث الدنترة فان البروتين يصبح أقل ذوبانا ويفقد أى نشاط بيولوجى يكون متسما به مثل الصفات الهورمونية، القدرة على ربط الـ antigen والنشاط الأنزيمى ويوضح الشكل رقم ٣-١٩ مفهوم عملية دنترة البروتينات.



شكل ٣-١٩: رسم يوضح مدلول عملية دنترة البروتين .

الشكل العلوى: سلسلة واحدة من عديد الببتيد monomer .

الشكل السفلى: مجموعة سلاسل oligomers .

المصدر Rodwell, (1985).

، الدنترة يمكن أن تحدث بواسطة عديد من العوامل أهمها:

(أ) عوامل فيزيقية Physical factors

مثل الحرارة، الضغط، التجميد، القوى السطحية، الأشعة السينية والاشعاعات فوق البنفسجية ultra-violet والموجات فوق الصوتية ultrasonic waves .

(ب) عوامل كيماوية Chemical factors

مثل الأحماض والقلويات المركزة، المذيبات العضوية، الأميدات ومشتقاتها والمعادن الثقيلة.

(ج) عوامل بيولوجية Biological factors

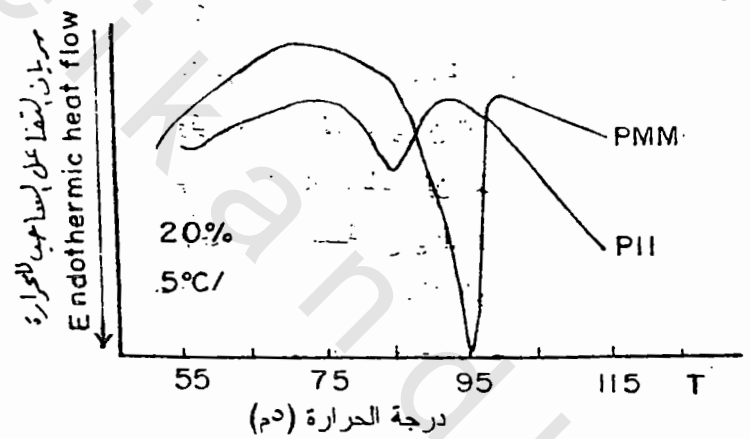
مثل الأنزيمات المحللة للبروتين حيث تحدث الدنترة قبل التحلل المائى، وتجدر الاشارة الى أن البروتينات المدنترة تميل الى التجمع coagulation ولاتتساوى كل البرتينات فى قابليتها للدنترة بنفس العامل المؤدى للدنترة، وتعمل الدنترة على تغيير البناء الثالثى والرابعى للبروتينات.

ويمكن معرفة مدى حدوث الدنترة لبروتين ما اما باستخدام طرق التحليل الحرارى thermal analysis أو عن طريق قياس الصفات الوظيفية functional properties للبروتين، وبالنسبة للتحليل الحرارى فيمكن استخدام الجهاز المعروف باسم المسعر المتفحص التفريقى differential scanning calorimetry (DSC) حيث يمكن بواسطته تقدير حرارة التفاعل أى enthalpy (ΔH) والتى تعادل حرارة الدنترة heat of denaturation ويرمز لها بالرمز ΔHd وتقدر بالكالورى/١ جم بروتين وكذا يمكن عن طريق الـ DSC تقدير درجة الحرارة التى تحدث عندها دنترة البروتين موضع الأختبار، وكلما قلت قيمة ΔHd ودرجة حرارة الدنترة Td لذات البروتين كلما دل ذلك على حدوث دنترة جزئية للبروتين فى أثناء عمليات عزله أو تنقيته.

ويستخدم فى جهاز الـ DSC مدى واسع من درجات الحرارة يتراوح بين -١٠٠ ° ٥٠٠ °م والجهاز يسجل الفرق فى القوة الكهربية اللازمة لحفظ كل من العينة المختبرة والمادة القياسية reference على درجات حرارة متساوية عند تسخينها (أو تبريدها) بمعدلات قد تصل الى ٨٠ °م/ق، ويترجم الفرق فى القوة الكهربية خلال التغيرات الكيماوية أو الطبيعية التى تطرأ على العينة، وهذا الفرق يكون مساويا للطاقة الحرارية الممتصة خلال هذا التغير أو الانتقال .

ويتم تسجيل التغير فى القوة الكهربية بجهاز الـ DSC على شكل منحنيات تدل مساحة المنحنى على ΔHd أما قمة المنحنى (فى حالة التفاعلات الساحبة للحرارة exothermic وقاع المنحنى فى حالة التفاعلات المنتجة للحرارة endothermic) فتعبر عن درجة حرارة الدنترة

Td ، ويبين الشكل رقم ٣-٢٠ منحنيين من منحنيات الـ DSC باستخدام معزولين لبروتينات الفول البلدى تم عزلهما بطريقتين مختلفتين وهما (PII) protein isoelectric precipitate حيث تم ترسيب البروتين عند نقطة التعادل الكهربى (pI). أما المعزول الثانى Protein Micellar Mass(PMM) فقد تم تحضيره بطريقة جديدة تعتمد على اذابة البروتين فى محلول ملحى تم ترسيبه عن طريق خفض القوة الأيونية، وكما هو واضح من الشكل فان Hd تختلف لكل من هذين المعزولين (٢،٤٣ ، ٤٠ر٤ كالورى/جم لكل من PII والـ PMM على الترتيب) كذلك كانت درجة حرارة الدنترة ٨٢ °م للـ PII، ٩٧ °م للـ PMM مما يدل على حدوث دنترة أثناء تحضير بروتين الفول بطريقة الترسيب عند نقطة التعادل الكهربى.



شكل ٣-٢٠: ثرموجرام بواسطة الـ DSC لمعزولين من بروتينات الفول البلدى تم عزلهما بطريقتين مختلفتين.

PII. Protein isoelectric precipitate

PMM Protein Micellar Mass

المصدر Youssef et al. (1986).

الخواص العامة للبروتينات General properties of proteins

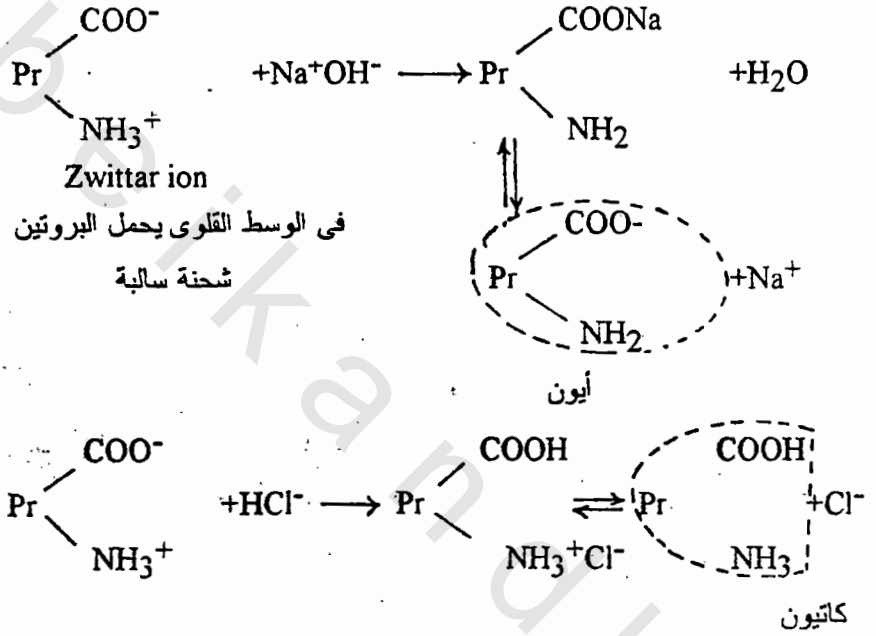
من الخواص المميزة للبروتينات:

١- الوزن الجزيئى Molecular weight

تتميز البروتينات بأوزانها الجزيئية العالية والتى تتراوح بين عدة آلاف الى عدة ملايين وقد أدى ذلك الى صعوبة استخدام الطرق العادية لحساب الوزن الجزيئىمثل حساب التغير فى نقطة الغليان أونقطة التجمد، ولتقدير الوزن الجزيئى للبروتين تستخدم بعض الطرق والتى أهمها تقدير الضغط الأسمورى .

٢- الخاصية الأمفوتيرية للبروتينات Amphoteric property

من الصفات المميزة للبروتينات أنها أمفوليتات أى أنها تسلك مسلك الأحماض الضعيفة وكذا القواعد الضعيفة، كذلك فان طبيعة البروتينات كالكتروليتات تعزى ايضا الى تأين بعض المجاميع الموجودة فى جزئ البروتين .



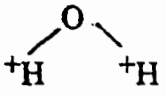
فى الوسط الحامضى يحمل البروتين شحنة موجبة وعند نقطة التعدل الكهربى isoelectric point فان محصلة الشحنةعلى جزئ البروتين = صفر.

٣- التبلور Crystalization

تتميز البروتينات بالرغم من ارتفاع أوزانها الجزيئية بانها سهلة البلورة وذلك اذا ماقورنت بالسكريات أو عديدات التسكر، وتعزى سهولة بلورةالبروتين الى وجود الشحنات حيث تجعل ترتيب الجزيئات فى تنظيم ثابت أمرا يسيرا.

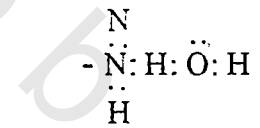
٤- الأرتباط بالماء (التأدرت) Hydration

كما نعلم فان جزئ الماء ليس متجانسا من ناحية توزيع الشحنات ولذا فيوجد طرف (+) وآخر (-) للجزئ . والبروتين الذى يحمل شحنات عديدة يسحب جزيئات الماء نحوه ويتصل بها فاذا كانت جزيئات موجبة (+) فانها تسحب الاكسجين فى اتجاهها.



obeikandl.com

ويمكن للجزئ ان يسحب جزئ ماء آخر وبالتالى تكون شحنة البروتين موجبة أو سالبة . والنتيجة ان البروتين يحيط نفسه بجزيئات عديدة من الماء وهذا مايطلق عليه hydration، وهى خاصية هامة جدا لأنها تتيح للبروتين الماء الازم للتفاعلات التىتحدث. ومن الصعوبة بمكان نزع كل كمية الماء التى تحيط بجزيئات البروتين .



طرق عزل البروتينات Methods of protein isolation

كما هو الحال بالنسبة للمواد البيولوجية الأخرى فانه عند عزل البروتينات يجب تجنب استخدام الظروف العنيفة extreme conditions، وعامة فان تركيز البروتين العالى، درجة الحرارة المنخفضة ، الـ pH القريب للتعادل تعد أفضل الظروف لعزل البروتينات والا فإن احتمال حدوث دنترة للبروتين يكون احتمالا قائما.

وأهم طرق عزل البروتينات هى:

١- الترسيب بالاملاح Salt precipitation

عند اضافة الملح الى محلول بروتين تحدث زيادة فى ذائبية البروتين، وتعرف هذه الظاهرة بالتمليح الداخلى salting in ، وتعزى الزيادة المبدئية لذائبية البروتين الى تثبيت stabilization البروتين كنتيجة لنقص معاملات النشاط activity coefficients للمجموعات المتأينة، وكلما زادت القوة الأيونية *(I) ionic strength فان الذائبية تصل الى أقصاها ثم بزيادة تركيز الملح عن حد معين تقل ذائبية البروتين وتعرف هذه الظاهرة بالتمليح الخارجى salting out. ومن التفسيرات التى وضعت لتفسير ظاهرة التمليح الخارجى هو حدوث تنافس بين البروتين ومحلول الملح على جزيئات الماء المتاحة لعملية الاذابة solvation حيث يتحول الأرتباط من بروتين - ملح الى بروتين - بروتين مما يؤدى الى تجمع جزيئات البروتين ثم ترسيبها.

ولقدوضعت معادلة رياضية تربط بين الذائبية S والقوة الأيونية I خلال عملية التمليح الخارجى، والمعادلة هى :

$$\text{Log } S = \beta - k_s I$$

حيث :

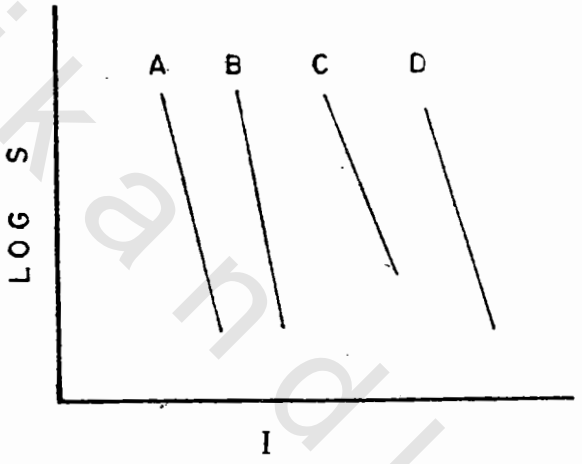
β= لوغاريتم ذائبية افتراضية عندما تكون قيمة I صفرا

K_s= معامل التمليح الخارجى.

ومن ثم فان التغيير الطفيف فى قيمة I يؤدى الى تغيير كبير فى قيمة K_s . وتعتبر قيمة K_sقيمة ثابتة لمعظم البروتينات لنفس محلول الملح فى حين تعتمد قيمة β على نوع البروتين.

واذا ماتواجد خليط من اربعة بروتينات مثلا (نفرض أنها A,B,C,and D) فانه يمكن فصل هذا الخليط الى مكوناته عن طريق تجميع الرواسب عند قيم مختلفة للقوة الأيونية شكل (٣-٢١) وعمليا فانه لايحدث فصل كامل لكل مكونات الخليط حيث يوجد تداخل.

overlap فى منحنيات اذابة مكونات خليط البروتين، ومع ذلك فان ترسيب البروتينات بالأملاح يعد طريقة جيدة لفصل البروتينات فى حالة ما اذا استخدمت مع طرق اخرى.



شكل ٣-٢١: تأثير القوة الأيونيةعلى ذائبية مكونات خليط من البروتينات

(A,B,C and D)

وتعتبر كبريتات الأمونيوم ammonium sulphate من أكثر الأملاح استخداما فى ترسيب البروتينات وفصلها عن بعضها، وكبريتات الأمونيوم لها ذائبية عالية ويمكن تحضير محلول مشبع منها على درجة حرارة الغرفة باضافة ٧٦٧جم من الكبريتات الى ١ لتر ماء(محلول ١٠٠٪ مشبع) ويمكن تحضير محاليل وسطية من حيث قيم تشبعها ومن

$$* \quad I = \frac{C_1Z_1 + C_2Z_2 + C_3Z_3 \quad .....etc.}{2}$$

C= تركيز الأيون مول/لتر .

Z= تكافؤ الأيون .

ثم يمكن فصل البروتينات المختلفة كل عند قيمة التشبع التى توائم ترسيب كل بروتين على حده .

٢- ترسيب البروتين عن طريق خفض القوة الأيونية

Protein precipitation by ionic-strength reduction

سجل E. D. Murray من جامعة مانيتوبا بكندا فى عام ١٩٨١ براءة اختراع أمريكية US patent سجل فيها طريقة جديدة لعزل بروتينات الحبوب والبقوليات والبذور الزيتية - بحيث يمكن الحصول على معزولات بروتينية protein isolates عالية النقاوة (يصل محتواها من البروتين الى ٦ر٩٥٪) بالأضافة الى الحصول على البروتين فى صورة غير مدنترة أى native form .

وتتلخص طريقة Murray فى استخلاص البروتين من مركزات البروتين (التى يمكن الحصول عليها عن طرق الفصل الفيزيقية التى تعتمد على الهواء والتى تسمى بالـ air classification) بمحلول معلوم العيارية من كلوريد الصوديوم (ملح الطعام)، وتتم عملية الاستخلاص على ٣٧ °م لمدة ساعة ثم اجراء عملية ترشيح فوق عالى، بعد ذلك يؤخذ المترشح الساخن ويضاف الى ماء صنبور بارد (عند ٤ °م) فيحدث ترسيب فورى للبروتين بفعل خفض القوى الأيونية، ويمكن القول بأن الطريقة فى خطوتها الأولى (الاستخلاص) عبارة عن تمليح داخلى salting in وفى خطوتها الثانية (ترسيب البروتين) عبارة عن تمليح خارجى salting out أى أنه قد تم استخدام تكنيك يعتمد على كره الماء hydrophobic out mechanism فى ترسيب البروتين وقد أطلق Murray على معزول البروتين المحضر بهذه الطريقة اسم Protein Micellar Mass (PMM)، وتجدر الاشارة الى ان الدراسات التطبيقية التى اجريت على الـ PMM بجامعتى مانيتوبا بكندا والاسكندرية بمصر (مراجع أرقام ١٠،٤،٣،٢ بآخر هذا الباب) قد أوضحت تفوق الـ PMM من النواحى الوظيفية والحيوية مقارنة بذات المعزولات من عدد من البقوليات تم عزلها بطرق مختلفة، ولقد سبق فى سياق حديثنا عن الدنترة اعطاء منحنى حرارى thermogram لكل من الـ PMM ومعزول بروتينى تم ترسيبه عند نقطة التعادل الكهربى (PII) من نفس المصدر النباتى (شكل ٣-٢٠)، وتبين لنا أن الـ PMM يفوق الـ PII حيث أن الثانى يعتبر مدنترا جزئيا partially denatured مقارنة بالـ PMM .

٣- ترسيب البروتينات بالحرارة Precipitation of proteins by heat

عامة يؤدى رفع درجة الحرارة الى تقليل ذائبية البروتينات، ومن هنا تتأتى أهمية النص على درجة الحرارة التى تم عندها اجراء عزل مخاليط البروتينات عن بعضها (عملية الـ fractionation).

ويؤدى التسخين المنظم الى دنترة وازالة البروتينات غير المرغوب فيها، غير أن هذه العملية يجب اجراؤها بعناية فائقة للحيلولة دون دنترة البروتينات المراد عزلها، وكمثال لتطبيق هذه الطريقة فى عزل البروتينات فانه يمكن فصل مخلوط مكون من انزيم ريبونكليويز ribonuclease مع بروتينات أخرى برفع درجة الحرارة الى نحو ٩٠ °م فتحدث دنترة (تجمع) للبروتينات الموجودة مع الانزيم وتترسب فى حين يظل الانزيم فى المحلول حيث انه يتميز بالثبات الحرارى (heat stable) عند درجة حرارة تصل الى ٩٠ °م، وننوه فى هذا الصدد الى أن وجود مادة التفاعل مع الأنزيم يؤدى الى زيادة الثبات الحرارى للأنزيم بنحو عشرة درجات مئوية أعلى من تلك التى تحدث عندها دنترة الأنزيم فى عدم وجود مادة التفاعل .

٤- ترسيب البروتينات بالمذيبات العضوية

Precipitation of proteins by organic solvents

يمكن ترسيب البروتينات باستخدام المذيبات العضوية، ويجب فى هذه الحالة استخدام هذه المذيبات بحذر حيث أن العديد من البروتينات تتم دنترته بواسطة مثل هذه الجواهر الكيماوية وخاصة عند درجة حرارة الغرفة، ولذا فعادة مايتم استخدام هذه المذيبات فى صورة مبرده حيث يتم استخدام الايثانول أو الأسيتون أو الميثانول بعد تبريدها.

ويلاحظ أن اختلاف درجة نقاء الكيماويات يؤدى الى التحصل على نتائج مختلفة فمثلا استخدام كيماويات لها درجة نقاء *GPR يعطى نتائج مختلفة عما اذا استخدمت كيماويات **AR.

وربما يكون تأثير المذيبات على البروتينات راجعا الى حدوث ترسيب عن طريق خفض قيمة ثابت الازدواج الكهربى dielectric constant ومن ثم زيادة ارتباط جزيئات

---

* Generally pure reagent

** Analar reagent

*البروتين بعضها ببعض أى زيادة التداخلات مع بروتين - بروتين protein-protein interaction.

وتجدر الاشارة الى ان استخدام المذيبات العضوية لترسيب البروتينات يؤدى الى حدوث انفصال split off للمجاميع المرافقة للبروتينات بدرجة أقل مما تحدثه الأملاح، ولهذا فانه فى بعض الحالات يفضل استخدام المذيبات عن الأملاح لفصل البروتينات . وترسيب البروتينات بواسطة المذيبات العضوية يكون افضل ما يمكن عند قيم منخفضة من القوة الأيونية (٠٫٣ أوأقل)، ولذا فان اجراء عملية ديلسة dialysis (الأنتشار الغشائى) مبدئية للعينة قبل استخدام المذيب العضوى يعتبر امرا ضروريا، بيد انه يجب ملاحظة ضرورة عدم التخلص من الاملاح الموجودة تماما اذ ان غياب مثل هذه الاملاح سيجعل من عملية ترسيب البروتين بواسطة المذيب العضوى أمرا غير يسير.

٥- ترسيب البروتينات بالأدمصاص Precipitation of proteins by adsorption

يمكن فصل البروتينات بطريقة تعتمد على ادمصاص البروتين على مادة جل، حيث تتفاوت البروتينات فى قابليتها أو ميلها affinity للادمصاص علىنفس مادة الجل، وتجدر الاشارة الى أن ظروف فصل البروتينات بهذه الطريقة تعتبر ظروفا تجريبية empercial، ومن المواد المستخدمة كجل فوسفات الكالسيوم والألومينا alumina، وعادة مايتم ادمصاص البروتين فى محلول حامضى فى حين تتم الازاحة elution باستخدام قلوى ضعيف .

٦- استخلاص البروتينات فى وجود الانزيمات البروتيوليتية

Partially hydrolyzed protein preparation (PHP)

يؤدى وجود الأنزيمات المحللة للبروتين proteolytic enzymes (مثل الببسين pepsin والتربسين trypsin) أثناء استخلاص بعض البروتينات الى زيادة كفاءة الاستخلاص وكمية الناتج yield من البروتين، فقد تبين من الدراسات أن وجود الانزيمات البروتيوليتية قد ادى الى زيادة كمية المواد النتروجينية المستخلصة من كسب بذرة القطن من ١٦٪ الى ٧٠٪ ، ومن ٢٠٪ الى ٩٠٪ بالنسبة لكسب فول الصويا (البذور بعد استخلاص الدهن).

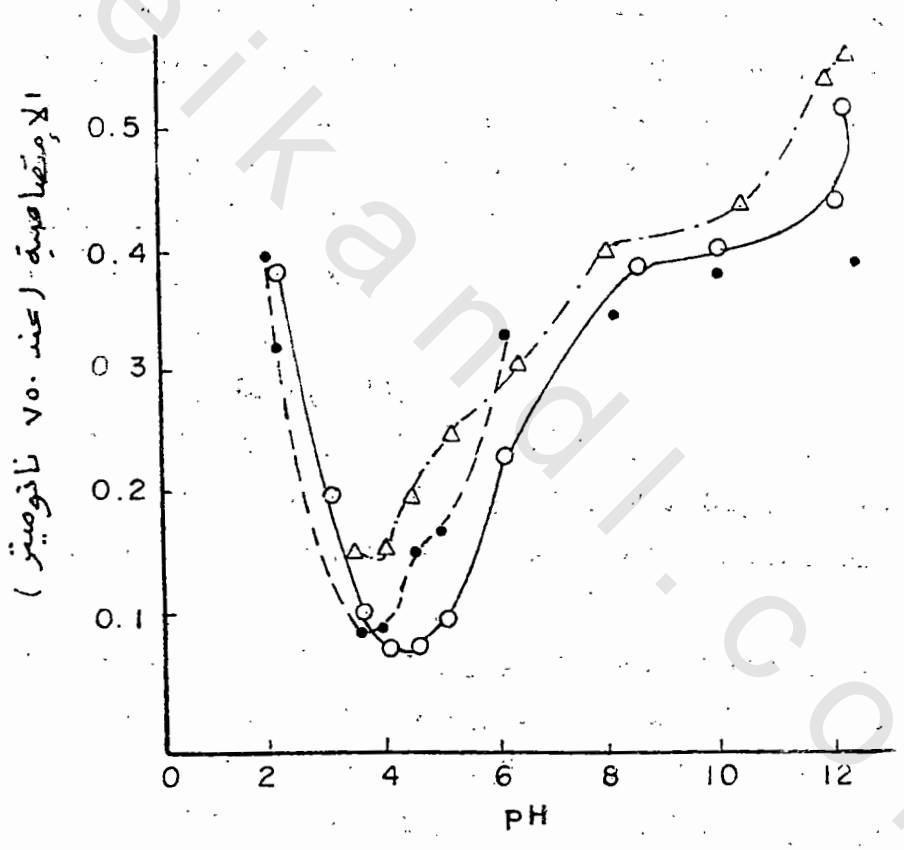
٧- ترسيب البروتينات عند نقط التعادل الكهربى

precipitation of proteins at the isoelectric points

تتوقف ذائبية البروتين على pH الوسط الموجود فيه هذا البروتين أى أنها pH-dependent حيث تصل ذائبية البروتين الى ادناها عند نقطة التعادل الكهربى (شكل ٣-٢٢) واذا ما اريد ترسيب بروتين ما عند نقطة تعادله الكهربى pI (أى عند الـ pH الذى تكون عنده محصلة الشحنة على جزئ البروتين = صفرا) فأنه يجب التحكم فى تغيير manipulation الـ pH بمنتهى الدقة اذ ان اختلاف الـ pH بمقدار وحدة واحدة على أى من جانبى الـ pI كفيل

بزيادة ذائبية البروتين بنحو عشرة مرة، وكما هو الحال بالنسبة للحرارة فانه يمكن التحكم فى تغيير الـ pH لفصل البروتينات عن بعضها، فعلى سبيل المثال يمكن فصل مخلوط يحتوى على أنزيمى ألفا وبيتا أميلاز كما هو الحال بالنسبة لمستخلص المولت (البذور المنبتة وخاصة الشعير) عن طريق خفض pH المستخلص الى القيمة ٣ فيؤدى ذلك الى ترسيب amylase - فقط ومن ثم يمكن الحصول على أنزيم amylase - فى صورة نشطة من المستخلص.

ولعل القارئ يرجع الى الصفات الأمفوتيرية للأحماض الأمينية والتى سبق شرحها بأستفاضة فى هذا الباب لكى يتفهم ميكانيزم ترسيب البروتينات عند نقط تعادلها الكهربى.



شكل ٣-٢٢: منحنى اذابة بروتينات بعض البقوليات (لاحظ أن الأذابة فى أدناها عند الـ pI).

المصدر Abdel-Aal et al. (1986)

obeikandl.com

٨- فصل البروتينات بالتقسيم الهوائى

Separation of proteins by air classification

طريقة التقسيم الهوائى air classificaition تتم بواسطة أجهزة تسمى المقسمات الهوائية air classifiers ويمكن استخدامها لفصل بروتينات الحبوب والبقوليات والمساحيق الجافة المحتوية على البروتينات الى مكوناتها من البروتين والنشا.

وتعتمد طريقة air classification على فصل مكونات المخاليط تبعا لمقاس الجسيمات particle size حيث تتم عملية التقسيم الهوائى باستخدام تيار من الهواء فى مجال للقوة الطاردة المركزية centrifuged field والتى تعمل على فصل الجسيمات الصغيرة فى حين تؤدى القوى المضادة للقوةالطاردة المركزية (حوالى ١١ الف لفة/ دقيقة) بالأضافة الى قوى الأحتكاك frictional forces الى فصل الجسيمات الكبيرة أو الخشنة، والجزء الخشن غالبا ما يحتوى على النشا فى حين يحتوى الجزء الناعم على البروتين، وتتأثر كفاءة الفصل بواسطة هذه الطريقة بثلاثة عوامل هى:

أ - قوة مجال الطرد المركزى .

ب - سرعة تيار الهـــــــواء.

ج - معدل تغذية مقسم الهواء بالدقيق .

وتسبق عملية التقسيم بالهواء عملية طحن للحبوب تجرى بواسطة نوع خاص من الطواحين تسمى بال pin mills أو الطاحونة ذات المسامير حيث يتم طحن الحبوب بعد ضبط محتواها الرطوبى (عملية تكييف conditioning) بواسطة هذه الطواحين. وغالبا ما يجرى الطحن مرتين.

ولقد امكن الحصول على مركزات بروتينية protein concentrates عالية المحتوى من البروتيـــــن (نحو ٨٠٪) عن طريق اعـــــادة عملية التقســـــيم الهوائى air classification، ومما لاشك فيه أن هذه الطريقة تعتبر أفضل الطرق لفصل بروتينات الحبوب لأنها منخفضة التكاليف اذ لايستدعى الأمر أكثر من تزويد المطحن بجهاز مقسم هوائى air classifier دون ما الحاجة الى تنكات كبيرة ومن ثم حيز كبير للمصنع - لاستخلاص البروتينات بالطرق الرطبة، ويفوق الجانب الاقتصادى أهمية امكانية الحصول على البروتيـــــن بكل مستويـــات بنائة دون ما تغيير أى يكون native protein اذ أنه فى طريقة التقسيم بالهواء لاتستخدم أية جواهر كيماوية أو حرارة يكون من شأنها دنترة البروتين .

الصفات الوظيفية للبروتين Functional properties of proteins

توجد مقاييس لبعض الصفات الوظيفية للبروتينات والتى تعتبر بمثابة مؤشر لمدى حدوث دنترة للبروتين فى أثناء عمليات عزله أو تنقيته. وأهم الصفات الوظيفية التى يمكن قياسها هى:

١- قدرة مسك الماء Water Holding Capacity (WHC)

٢- امتصاص الدهن Fat absorption

٣- القدرة على تكوين رغوة Foamability

٤- اللزوجة Viscosity

٥- معامل ذائبية النتروجين Nitrogen Solubility Index (NSI)

٦- القدرة على استحلاب الزيت Oil emulsifying capacity

ولقد أوضحت دراسات عديدة امكانية استخدام هذه العوامل كمقاييس للحكم على مدى حدوث دنترة للبروتينات، ومما لاشك فيه أن الدنترة تؤدى الى احداث تغيير فى البناء الثالثى tertiary والرابعى quaternary للبروتين مما يواكبه ظهور مجاميع جديدة كانت بداخل السلاسل المطوية (أى حدوث عملية فتح unfolding للسلاسل) كذلك فان الدنترة تؤدى الى التأثير على مجاميع وظيفية موجودة بجزيئات البروتين وهى فى حالتها الطبيعية native ... ومثل هذه التأثيرات سيكون لها بلا شك تأثير على كل الصفات التى تتحدد بوجود مجاميع وظيفية معينة .

التحليل المائى للبروتينات Hydrolysis of proteins

يتحلل جزئ البروتين مائيا بفعل الأحماض المعدنية أو القلويات أوالأنزيمات. والناتج النهائى لعملية التحليل هذه عبارة عن الأحماض الأمينية.

وتتم عملية التحليل المائى للبروتين تبعا للخطوات التالية:

Protein	بروتين
Proteose	بروتيوز
Pepton	ببتون
Polypeptide	عديد ببتيد
Peptide	ببتيد
Amino acids	أحماض أمينية

ويمكن اجراء عملية التحليل المائى للبروتينات بثلاث طرق رئيسية هى:

١- التحليل المائى بالأحماض المعدنية:

يمكن اجراء التحليل المائى للبروتين بواسطة الأحماض المعدنية المركزة مثل HCl (٦جزيئى) وتجرى عملية التسخين على ١١٠+٥ °م تحت مكثف عاكس فى وجود تيار من غاز النتروجين (لمنع تحطم الأحماض الأمينية) سيستين cystine ومثيونين methionine وذلك لنحو ٣٠ ساعة .

ولقد وجد أنه تحت الظروف السابقة للتحليل المائى فانه يتم تحطيم كامل للحمض الأمينى تربتوفان بينما يحدث تحطيم جزئى للسيرين والثربونين.

٢- التحليل المائى بالقلويات القوية:

وفى هذه الطريقة يتم استخدام محلول واحد عيارى من هيدروكسيد الصوديوم أو الباريوم. وتحت هذه الظروف لأيتأثر الحمض الأمينى تربتوفان ومن ثم فلتقديره يجب اجراء التحليل المائى بالقلوى. كذلك فباستخدام القلوى يتم تحطيم جزئى أو كلى لبعض الأحماض الأمينية. بالاضافة الى فقد جميع الأحماض الأمينية لنشاطها الضوئى أو تكون مخاليط راسمية (عملية racemization) وهذه النقطة هامة ويجب مراعاتها اذا ماأريد تقدير الأحماض الأمينية بواسطة الطرق الميكروبيولوجية microbiological assay اذ أن أى كائن حى دقيق يستخدم فى التقدير يكون متخصصا لمشابه ضوئى بذاته.

٣- التحليل المائى باستخدام الأنزيمات البروتيوليتية:

تستخدم الأنزيمات المحللة للبروتينات لتحليل البروتين مائيا، وهذه الأنزيمات تشتمل على أنزيمات الكربوكسى ببتيديز carboxy peptidase (الأنزيمات التى تكسر السلسلة الببتيدية من الطرف الكربوكسيلى) وأنزيمات الأمينو ببتيد amino peptidases (الأنزيمات التى تكسر السلسلة الببتيدية من الطرف الأمينى).

ومما لاشك فيه أن طريقة تحليل البروتينات مائيا بواسطة الأنزيمات تعد أفضل طرق التحليل حيث أنها لاتسبب تحطيم أى من الأحماض الأمينية وأن كان لها بعض المثالب أهمها حدوث التحليل ببطء كما أن عملية التحليل نادرا ما تصل الى منتهاها.

وسنعطى عند تناولنا لموضوع الأنزيمات أمثلة للأنزيمات المحللة للبروتينات ومستويات تخصصها specificity levels.

المراجع

١ - شحاته ، أحمد محمد التابعى (دكتور)، زينب شحاته محسب (دكتور) (١٩٧٦).
أساسيات الكيمياء الحيوية - الطبعة الثانية - دار المعارف بمصر.

2- Abdel-Aal, E.M.; Shehata, A.A.; El-Mahdy. A.R. and Youssef, M.M. (1986). Exctractability and functional propertries of some legume proteins isolated by three different methods. J. Sci. Food Agric., 37: 553-559.

3- Armtfied, S.D. and Murray, E.D. (1981). The influence of processing parameters on food protein functionality. I- Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 14: 289-295.

4- Murray, E.D.; Myers, C.D.; Barker, L.D. and Maurice, E.T.J. (1981). Functional attributes of proteins : A non covalent approach in processing and utilizing plant proteins. In: Stanley, D.W.; Murray, E.D. and Lees, D.H. (eds.). Utilization of protein resources. Food and Nutritional Inc. Westporte, CT.

5- Plummer, D.T. (1978). An introduction to practical biochemistry. Mc Graw-Hill Book Company (UK) Limited, London.

6- Rodwell, V.W. (1985). Amino acids and reptides. In: Martin, D.W., Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. and Granner, D.K -Harper's Review of Biochemistry, Lange Medical Publications, Los Altos, California USA.

7- Rodwell, V.W. (1985). Proteins- In., Martin, D.W. Mayes, P.A., Rodwell, V.W. and Granner, D.K.- Harper's Review of Biochemistry, Lange Medical Publications, Los Altos, California, USA.

8- Sosulski, F.W. and Sosulski, K. (1986). Plant proteins. Applications, biological effects and chemistry. In: Ory, R.L. (ed.). Developed from a symposium sponsored by the Division of Agricultural and Food Chemistry at 190th Meeting of the American Chemical Society Chicago, Illinois-September 8-13, 1985.

Food Chemistry at 190th Meeting of the American Chemical Society. Chicago, Illinois-September 8-13, 1985.

9- Tyler. R T., Toung, C.G. and Sosulski, F.W. (1984). Air classification of legumes: Cut-size effects. Can. Inst. Food Sci. Technol. j., 17 (2): 71-78.

10- Youssef, M.M. and Bushuk, W (1986). Breadmaking properties of composite flours of wheat and faba bean protein preparations. Cereal Chem., 63 (4): 357-361

obeikandl.com