الوحدة السابعة : البروتينات في الأغذية

الجدارة: التعرف على أهمية البروتينات في الأغذية وتراكيبها وفصلها وطرق تقديرها.

الأهداف: أن يتعرف المتدرب على أهمية تقدير البروتينات في الأغذية وتركيبها الكيماوي وأقسامها ورتب بنائها وطرق فصلها وأيضا طرق تقديرها في الأغذية.

مستوى الأداء المطلوب: أن يصل المتدرب إلى إتقان الجدارة بنسبة 90٪.

الوقت المتوقع للتدريب: 4 ساعات

الوسائل المساعدة:

- بعض الكتب والمراجع.
- جهاز عرض باستخدام الحاسب.
- بعض الصور والمعلقات ووسائل الإيضاح.

متطلبات الجدارة: الإطلاع على بعض الكتب والمراجع في مجال الكيمياء الحيوية والعضوية بالإضافة إلى بعض التكليفات من مدرب المقرر بعمل بعض التقارير.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

البروتين في الأغذية Proteins in foods

من المركبات العضوية ذات الوزن الجزيئي الكبير ومعقدة التركيب ويميزها عن غيرها من المركبات العضوية الأخرى وجود عنصر النيتروجين بصورة أساسية مع الأيدروجين والأكسجين وكذلك يُطلق عليها في بعض الأحيان المركبات النيتروجينية هذا بالإضافة إلى بعض العناصر الأخرى مثل الكبريت وبعض المعادن مثل النحاس أو الحديد أو الزنك وهي حالات قليلة. وعموماً رغم اختلاف التركيب الكيماوي للبروتينات المختلفة إلا أنها تحتوى على التركيب الموجود في جدول (6) وهو السائد في معظم أنواعها.

جدول (6) التركيب الكيمائي للبروتين.

العنصر	٪	العنصر	٪
النيتروجين	16	الأكسجين	22
الكربون	50	الكبريت	0.5- 3
الأيدروجين	7		

أهمية البروتين

1- يمد الجسم باحتياجاته من الأحماض الأمينية الأساسية وغير الأساسية Essential and non essential amino acids .

2- تُستخدم في النمو المحافظة على الصحة العامة بالإضافة إلى تعويض الأنسجة التالفة.

3- تتواجد في جميع الأنسجة الحية سواء نباتية أو حيوانية.

4- تدخل في بناء وتكوين العضلات وكذلك العديد من أجهزة الجسم الداخلية.

5- بعضها مثل الجلد يقوم بدور الحماية للجسم.

6- بعض البروتينات يُعتبر مواد مساعدة بيولوجية Biocatalysts مثل الإنزيمات Enzymes والهرمونات Hormones حيث تعمل على تنظيم والتحكم في سير التفاعلات الكيماوية والميتابولزم داخل الجسم.

7- بروتينات الدم تعمل على تنظيم الضغط الأسموزي للخلايا وكذلك رقم حموضة بعض السوائل الحيوية.

8- تُعتبر مهمة في تفاعلات المناعة Immunological reaction حيث إن الأجسام المضادة Antibodies ما هي إلا بروتين الجلوبين المتواجد في بلازما الدم بعد تعديله لكي يقوم بعمل حماية الجسم ضد الميكروبات المهاجمة له أو الأجسام الغريبة والتي قد تُسبب الأمراض.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

9- الحساسية الغذائية Food allergy تحدث بسبب تأثير بعض البروتينات على النظام الدفاعي للجسم وهي تختلف من شخص لآخر.

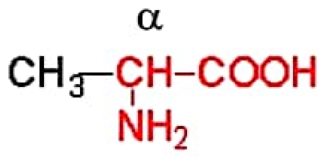
وتُعتبر المواد البروتينية أقل إنتاجاً بالمقارنة مع إنتاج المواد الدهنية أو الكربوهيدراتية وأيضاً ارتفاع سعرها وذلك لزيادة الطلب عليها وأهميتها الغذائية لجميع الأعمار السنية المختلفة أيضاً احتياجات الجسم اليومية من البروتين لكل كيلوجرام من الوزن تُعتبر ثابتة خلال مرحلة اكتمال النمو على العكس من احتياجات الجسم لكلٍ من الدهون والكربوهيدرات حيث تقل مع تقدم العمر.

ولذلك تُعتبر مشكلة زيادة إنتاج البروتين أو تحسين خواصه وإدخال التكنولوجيا الحديثة في مجال البروتين أحد المشاكل والتحديات التي تُواجه الباحثين والمشتغلين في هذا المجال من تكنولوجيا الأغذية خاصةً مع التزايد المستمر في عدد السكان. والجدول التالي يُوضح الاحتياجات اليومية من البروتين للأعمار المختلفة.

جدول (7) الاحتياجات اليومية من البروتين للأعمار المختلفة.

الفئة	العمر	جم بروتين/ كيلوجرام من وزن الجسم
الأطفال الرضّع	حتى ستة أشهر 6- 12 شهر	2.2 2.0
الأطفال	1- 3 سنة 4- 6 سنة 7- 10 سنة	1.8 1.5 1.2
الشباب	11- 14 سنة 15- 18 سنة	1.0 0.9
البالغون	فوق 19 سنة	0.8

والبروتين عبارة عن مجموعة من الأحماض الأمينية Amino acids مرتبطة مع بعضها بروابط بيتيدية Peptide bounds بصفةٍ عامة بجانب وجود روابط أخرى (كبريتية- إيدروجينية) وعند تحلل البروتين تحليلاً مائياً بالأحماض تنتج مركبات بسيطة ذات وزن جزيئي منخفض هي α- amino acid كما هو واضح من مما يلي



وتختلف الأحماض الأمينية بعضها عن بعض في نوع المجموعة الجانبية في كل حمض وقد اكتشف منها عشرون حمضاً أمينياً تُعتبر الوحدات الأساسية في تركيب البروتين بجانب الأحماض الأمينية الأخرى التي

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

لا تدخل في تكوين البروتين ومنها أكثر من 50 حمضاً أمينياً حراً ومنها Ornithine و Citrullines (تنتج في دورة اليوريا) والبيتا ألانين الذي يدخل في تركيب حمض Pantothenic acid، أما أحماض Prolin و Hydroxy prolin فلا تُسمى Amino acids نظراً لعدم احتوائها على مجموعة أمين (NH_2 –) في الوضع ألفا ولكن تُسمى Imino acids نظراً لاحتوائها على مجموعة imino (NH –) في الوضع ألفا.

الخواص العامة للأحماض الأمينية في البروتينات الطبيعية

1- التركيب العام والتقسيم

جميعها أحماض ألفا أمينيه α-amino acids أي إن مجموعة الأمين مرتبطة بذرة الكربون ألفا (ذرة الكربون التالية لمجموعة الكربوكسيل COOH–) ويحتوى كل حمض أميني على مجموعة جانبية يُطلق عليها R-Group ولقد استخدمنا هذه المجموعة كأساس لتقسيم الأحماض الأمينية إلى:

أ- الأحماض الأمينية غير القطبية أي غير المحبة للماء Nonpolar or hydrophobic

ومنها الألانين- الأيسوليوسين- الليوسين- الميثونين- الفينايل الألانين- البرولين- التريتوفان والفالين، وهي أقل ذوباناً في الماء عن الأحماض الأمينية القطبية ونجد الأحماض الأمينية غير المحبة للماء (الكارهة للماء) تزداد كراهيتها للماء بزيادة السلسلة الجانبية (R).

ب- الأحماض الأمينية القطبية أي المحبة للماء ولا تحمل شحنات Polar or hydrophilic uncharged side chains

وفيها نجد أن المجموعة الفعالة لها المقدرة على تكوين رابطة أيدروجينية مع الجزئيات المناسبة مثل الماء . وترجع قطبية السيرين والثيرونين والثيروسين إلى مجموعة الأيدروكسيل (OH–) الموجودة في تركيبها أما في الجلوتامين والأسبراجين تكون راجعة لمجموعة الأميد ($–CO–NH_2$) بينما في السستئين ترجع إلى مجموعة السلفاهيدريل (SH–)، وفى بعض الأحيان الجلايسين يتبع هذه المجموعة. ويعتبر السستئين والثيروسين أكثر الأحماض في هذه المجموعة التي ترجع إليها القطبية حيث إن كلاً من مجموعة السلفاهيدريل ومجموعة الفينول يرجع إليهما التأين الجزئي على pH 7 . وفى البروتينات نجد أن السستئين يتواجد غالباً في صورة مؤكسدة لإنتاج السستين وهذا يظهر عند أكسدة مجموعتين من مجاميع السلفاهيدريل المتواجدة في حامضين من السستئين منتجةً بذلك روابط داي سلفيت Disulfide cross-link، أما الأسباراجين والجلوتامين من السهل تحللهما بواسطة الحامض أو القلوي ليُعطوا حمض الأسبارتك والجلوتاميك.

جـ- أحماض أمينية قاعدية محملة بشحنة موجبة Amino acids with positively charged side chains

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

وهي عبارة عن أحماض قاعدية وبها مجاميع R-group تحت pH 7 تكون محصلة الشحنة الكهربية بها موجبة، ويتبع هذا القسم الحمض الأميني لايسين الذي به مجموعتا أمين أحدهما في α-NH_2 والثانية في الوضع ε-NH_2 وإليها ترجع الشحنة على اللايسين وكذلك حمض الأرجنين الذي يحتوى على مجموعة الجوانيدين وكذلك حمض الهستدين الذي يحتوى على مجموعة إيمدازول الضعيفة القاعدية والذي يحتل بخواصه مركزاً متوسطاً حيث عند رقم pH 6 نجد أن 50٪ من جزيء الحمض يحمل شحنة موجبة ولكن عند رقم pH 7 نجد أن 10٪ فقط من الجزيء يحمل شحنة موجبة.

د- أحماض أمينية حامضية محملة بشحنة سالبة Amino acids with negatively charged side chains

وينتمي إلى هذا القسم حامض الأسبارتيك والجلوتاميك الذي يحتوى كلاً منهما على مجموعتي كربوكسيل ومجموعة أمين، غير أنه تحت ظروف pH 7 تكون المحصلة النهائية للشحنة في الحامضين سالبة.

2- التناظر

ذرة الكربون ألفا في جميع الأحماض الأمينية غير متناظرة Asymmetric فيما عدا الجليسين Glycine.

3- النشاط الضوئي

جميع الأحماض الأمينية ذات نشاط ضوئي Optically active فيما عدا الجليسين وذلك لاحتوائه على ذرة الكربون ألفا متناظرة Symmetric.

4- الدوران الضوئي

جميعها L- Amino acids بمعنى أن مجموعة الأمين ($-NH_2$) تُوجد جهة اليسار كما يُوجد أكثر من عشرين حمضاً أمينياً D مثل D- Alanine، D- Glutamic والتي تُوجد في جدر خلايا بعض البكتيريا وبعض المضادات الحيوية.

L- Alanine　　　　D- Alanine

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

5- الخواص الحامضية والقاعدية للأحماض الأمينية Acidobasic properties of amino acids Ionization

معرفة الخواص الحمضية والقاعدية للأحماض الأمينية مهم جداً وذلك لمعرفة خواص البروتين وكذلك فصل وتفريد الأحماض الأمينية عن بعضها باستغلال هذه الخواص وباستعراض تركيب الأحماض الأمينية نجد أنها تحتوى على مجاميع الكربوكسيل والأمين، ونجد أن مجموعة الكربوكسيل تسلك مسلك الأحماض الضعيفة ومجموعة الأمين تسلك سلوك القواعد الضعيفة أي إنها تعمل في الوسط الحامضي عمل القواعد وفى الوسط القاعدي عمل الأحماض.

والمواد التي لها القدرة على التأين بصفتين مختلفتين أو بمعنى آخر بشحنتين مختلفتين كما في الأحماض الأمينية تُعرف باسم إلكتروليتات أمفوتيرية، وعلى ذلك نجد أن الأحماض الأمينية تحمل شحنة موجبة في المحاليل الحامضية فتنتقل في المجال الكهربي إلى القطب السالب وفى المحاليل القلوية تحمل شحنة سالبة ونتيجة إلى القطب الموجب ، ويُلاحظ أن الأحماض الأمينية أحادية الكربوكسيل مثل الجليسين يكون في محلوله المائي أيونات ثنائية القطب Zwitterion.

$$\begin{array}{c} H \\ | \\ R-C-COO^{-} \\ | \\ NH_3^{+} \end{array}$$

ولذا يكون جزيء الجليسين متعادلاً كهربياً حيث يتساوى عدد الشحنات الموجبة مع الشحنات السالبة وتُعرف هذه الحالة بنقطة التعادل الكهربي Iso-electric point وإضافة أيونات الهيدروجين إلى الجزيء المتعادل كهربائياً يضعف تأين مجموعة الكربوكسيل ويُصبح الجزيء ذا شحنة موجبة بالنسبة لإضافة بروتون Proton إلى الأيون ثنائي القطب

$$H^{+} + \begin{array}{c} H \\ | \\ R-C-COO^{-} \\ | \\ NH_3^{+} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} H \\ | \\ R-C-COOH \\ | \\ NH_3^{+} \end{array}$$

وبإضافة قاعدة إلى الأيون ثنائي القطب فإنها تعمل على إزالة بروتون من أيون الأمونيوم وبذا يُصبح الجزئ سالب الشحنة

$$\begin{array}{c} H \\ | \\ R-C-COO^{-} \\ | \\ NH_3^{+} \end{array} + \bar{O}H \longrightarrow \begin{array}{c} H \\ | \\ R-C-COOH \\ | \\ NH_3^{+} \end{array}$$

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

ويجب ملاحظة أنه تحت ظروف التعادل الكهربائي نجد أن الأحماض الأمينية متأينة حيث تتساوى فيها الشحنات الموجبة مع الشحنات السالبة وبذلك لا تتحرك في المجال الكهربائي ولا تظهر عليها أي شحنة ظاهرة وكان يُعتقد أن الأحماض الأمينية المتعادلة كهربياً تُوجد في صورة غير متأينة (مفككة) بحيث يكون تركيبها البنائي

$$\begin{array}{c} H \\ | \\ R-C-COO^{-} \\ | \\ NH_3^{+} \end{array}$$

وذلك في المحاليل المائية ، ولكن ثبت أن الأحماض الأمينية عبارة عن أيونات ثنائية القطب.

تقسيم البروتينات Classification of protein

هناك تقسيم على أساس الخواص الطبيعية أو الكيماوية ولكن الأكثر شيوعاً هو على أساس ارتباط البروتين ببعض المكونات الأخرى غير البروتينية وأقسامه هي:

أولاً: البروتينات البسيطة Simple proteins

وهى البروتينات التي تتحلل مائياً وتنتج أحماضاً أمينية فقط أو مشتقاتها وهي غير مرتبطة بأي مواد أخرى وتُقسم على أساس مقدرتها على الذوبان وتأثير الحرارة عليها إلى ما يلي:

1- الألبيومين Albumin

وهى تُسمى أحياناً بالزلاليات وهي قابلة للذوبان في الماء ومحاليل الأملاح ويتم تجميعها وترسيبها بالحرارة Heat coagulated proteins والأخيرة غير قابلة للذوبان في الماء ولكنها تذوب في القلويات وتتواجد في زلال البيض والبيومين الدم واللبن Lactalbumin وكذلك في حبوب البسلة.

2- الجلوبيولين Globulins

لا تذوب في الماء ولكنها تذوب في المحاليل المخففة لأملاح القواعد والأحماض القوية مثل كلوريد الصوديوم أو البوتاسيوم وهي منتشرة في المملكة النباتية والحيوانية مثل جلوبيولينات سير الدم- صفار البيض- ميوسين العضلات وكذلك اللبن β-globulin حيث تكون حوالي 55٪ من بروتينات الشرش Whey proteins.

3- الجلوتلين Glutelins

غير قابلة للذوبان في الماء ولكنها تذوب في المحاليل المخففة للقلويات والأحماض وتتواجد بكثرة في المصادر النباتية مثل جلوتلين القمح والأرز.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

4- **البرولامين** Prolamins

تذوب في محلول 50 – 90٪ كحول إيثايل ولا تذوب في الماء أو الكحول المطلق وتحتوى على نسبة عالية من الحمض الأميني Prolin وأهمها جليادين القمح وهوردين الشعير Hordein وزاين الذرة Zein، مع العلم بأن جلوتين القمح مكون من مخلوط الجلوتلين والجليادين وهو المسؤول عن المطاطية بعد العجن مع الماء.

5- **البروتينات القرنية** Albuminoids or scleroproteins

يقتصر وجود هذه البروتينات على المصادر الحيوانية فهي تُوجد في الأجزاء القرنية من الحيوانات أو الأجزاء التي تقوم بعمل واقي للجسم وهي لا تذوب في الماء أو المحاليل المخففة للأحماض والقواعد، كما يصعب هضمها بواسطة الإنزيمات ومن أمثلتها:

أ- **الكيرياتين** Keratin

ويوجد في جلود الحيوانات والحوافر والشعر والريش والصوف ويحتوى الكيرياتين على نسبة مرتفعة من السستين إذ يبلغ مقداره في شعر الإنسان حوالي 14٪.

ب- **الكولاجين** Collagen

يتواجد في الأنسجة الضامة والروابط وفى العظام ولا يذوب في الماء ويُمكن تحويله إلى بروتين ذائب بتسخينه في الماء ويُعرف البروتين الذائب الناتج باسم جيلاتين Gelatin ويُستعمل بكثرة في كثير من الأغذية.

جـ- **الإيلاستين** Elastin

يُوجد في الأنسجة الضامة للعضلات والأوردة ولا يُمكن تحويله بالغليان إلى جيلاتين.

د- **الفيبروين** Fibroin

ويوجد في حرير دودة القز.

6- **الهستونات** Histons

تتميز باحتوائها على نسبة مرتفعة من الأحماض الأمينية القاعدية خاصةً الأرجنين والهستدين وتُوجد في الحيوانات، وتذوب في الماء وفى الأحماض والقواعد المخففة ولا تذوب فى محاليل الأمونيا المخففة وتُوجد هذه البروتينات مرتبطة مع الأحماض النووية في البروتينات النووية.

7- **البروتامينات** Protamins

خواصها القاعدية أكثر من الهستونات وذلك لاحتوائها على الأرجنين بنسبة تصل إلى 75٪ وتذوب في الماء ومحاليل الأمونيا ولا تترسب بالحرارة وتكون أيضاً مرتبطة مع الأحماض النووية.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

ثانياً: البروتينات المرتبطة Conjugated proteins

عبارة عن بروتينات أكثر تعقيداً فهي تحتوى على نفس تركيب الأحماض الأمينية الموجودة في البروتينات البسيطة بالإضافة إلى مركبات أخرى غير بروتينية مثل الليبيدات- الكربوهيدرات- الأحماض النووية وغيرها وتبعاً لنوع المركبات المرتبطة تقسم إلى ما يأتي:

1- بروتينات نووية Nucleoproteins

تتكون من بروتينات قاعدية بسيطة من نوع الهستون والبروتامين مرتبطة مع أحد الأحماض النووية وتُوجد مكونة لكروموسومات الخلية في النواة كما تُوجد في أنواع منها ذائبة وغير ذائبة في سيتوبلازم الخلية- ومن المصادر الغنية بالبروتينات النووية الخميرة ومنها تُستخلص بالمحاليل القلوية المخففة وبفصل الحامض النووي على حدة يُعامل البروتين النووي بالأحماض المخففة على البارد فيفكك الارتباطات التي تُوجد بين البروتين والحامض النووي.

2- البروتينات الدهنية Lipoproteins

عبارة عن بروتينات مرتبطة بالدهون مثل الليسثين والكولسترول وتُوجد الليبوبروتين في نواة الخلية- الدم- صفار البيض- اللبن- المخ- الأنسجة العصبية والأغشية الخلوية.

3- البروتينات الكربوهيدراتية Glycoproteins

تُوجد أنواع مختلفة من البروتينات الحيوانية مرتبطة مع سكريات عددية وأمثلتها الهيبارين الذي يُوجد في دم الثدييات ومنها أنواع المواد المخاطية Mucin ويحتوى الجزء الكربوهيدراتي غالباً على وحدات سكريات أمينية مع وحدات سكريات مختلفة وقد تدخل في تركيبها أحماض يورونية.

4- البروتينات الملونة Chromoproteins

تُوجد أنواع مختلفة من المواد الملونة العضوية أو غير العضوية ترتبط مع البروتينات مثل هيموجلوبين الدم- كلوروفيل- سيتوكروم إنزيم الكتاليز وهذه الأنواع تحتوى على أحد أنواع البورفورين Porphyrin ويحتوى الجزء غير البروتيني على عنصر أحد المعادن الثقيلة. الكاروتين من المجموعات الملونة التي تُوجد مرتبطة مع بعض البروتينات في شبكية العين وله علاقة بتأثير الظلام والضوء على قوة الإبصار.

والفلافين Flavin المشتق من الريبوفلافين يكون المجموعة المرتبطة لبروتينات الفلافو بروتينات Flavoproteins وقد تكون هذه المجموعة المرتبطة Prosthetic group غير عضوية مثل الحديد في Ferritin وهو يحتوى على الحديد في صورة أيدروكسيد حديد غروي مخزن في الكبد حيث يمد الجسم بالحديد عند الحاجة.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

5- **البروتينات الفوسفاتية** Phosphoproteins

وهى البروتينات التي يُوجد بها حامض الفوسفوريك بنسبة مرتفعة ومرتبطة على حالة أستر ولا يُوجد بهذه البروتينات كربوهيدرات أو أحماض نووية ومن أمثلتها كازين اللبن والفيتامين الموجود في صفار البيض Vitilin.

ثالثاً: البروتينات المشتقة Derived proteins

تشمل هذه المجموعة البروتينات الناتجة عن عمليات التحلل المائي للبروتينات الطبيعية، ويتحصل عليها بواسطة الطرق الكيماوية أو الطبيعية ويُمكن تقسيمها طبقاً لدرجة التحلل، ومن البروتينات المشتقة بعض نواتج التحلل المائي غير التام للبروتينات بواسطة الإنزيمات فيتحلل البروتين بالإنزيمات على خطوات كما يلي:

بروتين ← ميتابروتين ← بروتيوز ← بيتون ← بيتيد ← ببتيد عديد ← ببتيد بسيط ← أحماض أمينية

رابعاً: البروتينات المعدلة Modified proteins

وهى البروتينات التي تُعامل إما إنزيمياً أو كيميائياً لإحداث معدل بسيط من التحلل والتغير في التركيب الطبيعي والبنائي لها وهي ما يُطلق عليها Chemical or enzymatic modification of protein ويُستخدم عادةً حمض السكسينيك Succinic أو الخليك Acetic اللامائي وتُسمى هذه العملية Acetylation or succinilation of protein وهي عادةً تُؤدي إلى تحسين في بعض الخواص الدالة أو الوظيفية للبروتين Functional properties بالمقارنة لنفس البروتين قبل المعاملة وهذه العملية تُفيد في استخدام البروتينات المعدلة في مجالات عديدة من الأغذية أيضاً تتحسن القيمة الهضمية ومعدل الهضم للبروتين المعدل عادةً تكون أعلى وقد يُجرى ذلك التعديل بواسطة الإنزيمات المحللة للبروتين Proteases الناتجة من الفطر أو البكتريا ويجب إيقاف معدل التحلل قبل الوصول إلى مرحلة الأحماض الأمينية الحرة والببتيدات البسيطة.

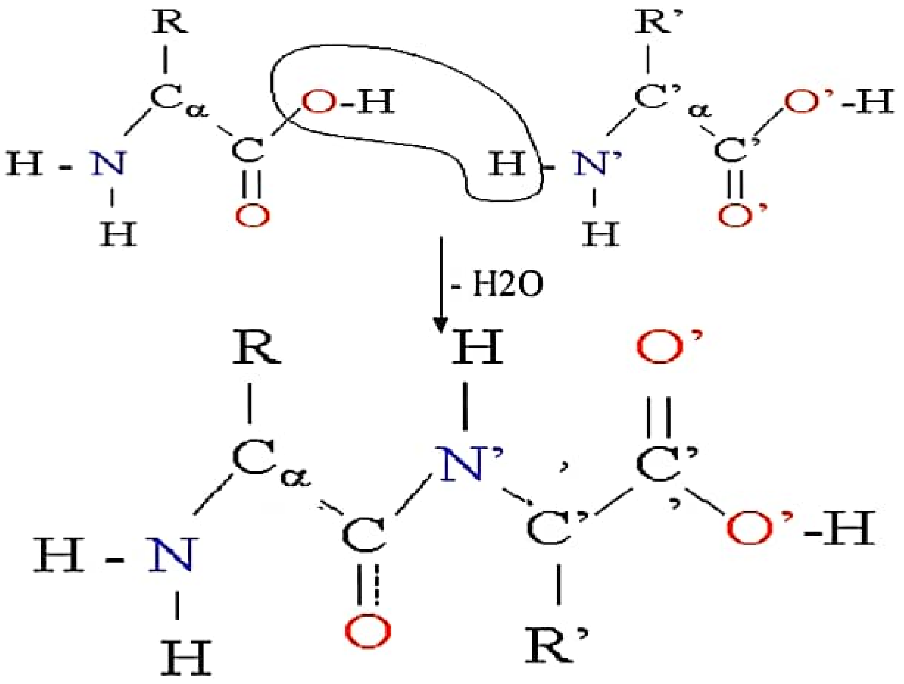
التداخلات التي تتحكم في بناء البروتين The interactions that control protein structure

1- **القوى الاشتراكية** Covalent forces

أ- **الرابطة الببتيدية** Peptide bond

هذه الرابطة ذات دور أساسي في إتمام بناء الجزيء كما أنها أساسية في البناء الأول Primary structure. والشكل التالي يوضح كيفية تكون الرابطة الببتيدية.

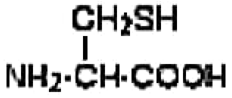
الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



شكل (7) تكون الرابطة الببتيدية.

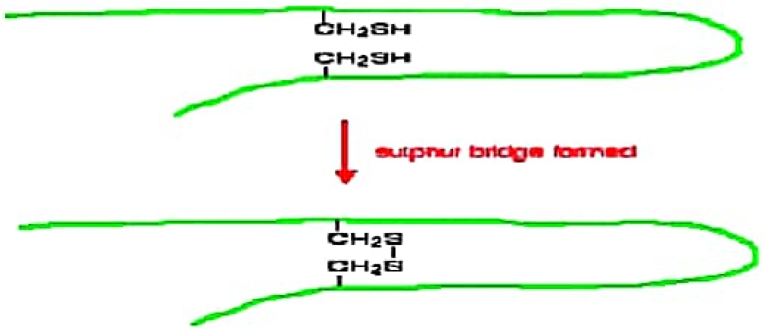
ب- قناطر الداي سلفيد Disulphide cross-linkage

يُمكن أن يكون لقناطر الداي سلفيد تداخل اشتراكي آخر هام والذي يحدث كثيراً في صورة Cross-linkage بين جزيئين مختلفين من سلسلة نفس الببتيد العديد وبينه وبين سلاسل الببتيد العديدة الأخرى (شكل 8)، وهي تنتج من أكسدة جزيئين من بواقي Cysteine ليتكون Cystine.



Cysteinee

وتوجد هذه القناطر في البروتينات لتُساعد بصفةٍ عامة على تثبيت البناء الثلاثي، وعلى الرغم من قوة قناطر الداي سلفيد بمقارنتها بالروابط غير الاشتراكية إلا أن مداها قصير جداً كما هو الحال في الروابط الاشتراكية حيث إن أي إجهاد يكسر القنطرة تماماً.



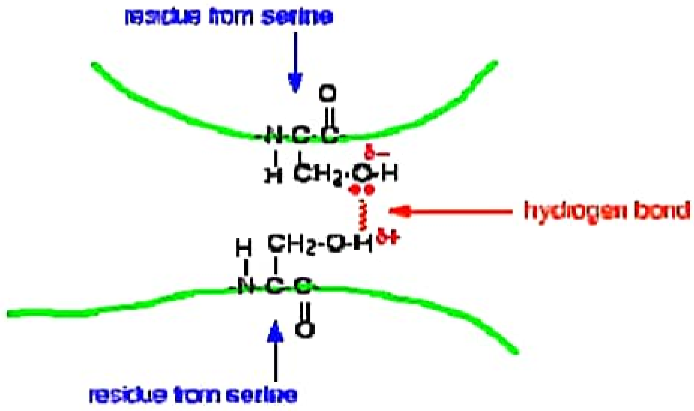
شكل (8) تكوين قناطر الداي سلفيد.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

2- القوى غير الاشتراكية Noncovalent forces

أ- الرابطة الأيدروجينية Hydrogen linkage or hydrogen bridge

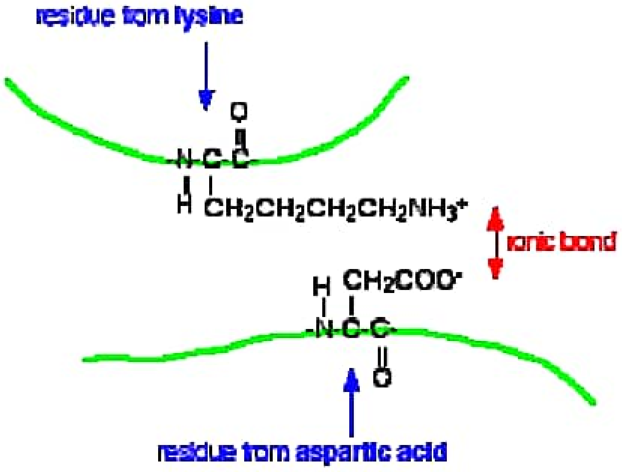
يُمكن أن تتكون بين –NH– أو –OH ومجموعة الكربونيل $C = O$ في الرابطة البتيدية أو مجموعة $-COO^{-}$ تُؤدي إلى تثبيت البناء الرابع لربط جزيئات البروتين (شكل 9).



شكل (9) تكوين الرابطة الأيدروجينية.

ب- التداخلات الأيونية Ionic interactions

والتي تشمل الرابطة الأيونية أو التنافر بين المجموعات المشحونة مثل $-COO^{-}$، $-NH_3^{+}$ ومجموعات الجوانيدو في باقي حمض L-Arginine، $-S^{-}$ من باقي حمض السيستئين والفينول $-O^{-}$ من باقي حمض Tyrosine والتداخلات بين المجموعات المتعاكسة الشحنة مثل $-COO^{-}$ و $-H_3N^{+}$ والتي تُعطي قناطر الملح Salt bridges (شكل 10).

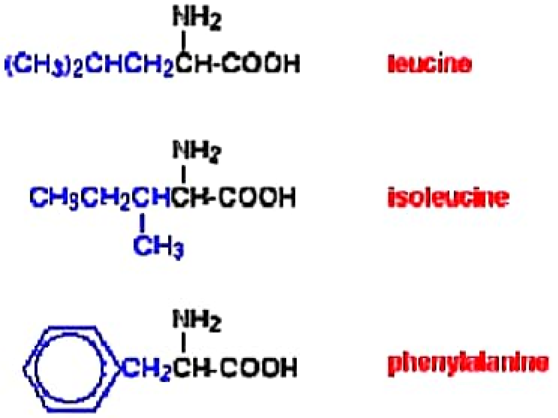


شكل (10) تكوين الرابطة الأيونية.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

جـ- **الأثر التثبيتي للخواص** Hydrophobic

والتي فيها ترتبط المجموعات مع بعضها بطريقة ارتباط مشابهة لارتباط السلسلة الأليفاتية للحمض الدهني بقنطرة الزيت في معلق زيت في ماء ولذلك تكون هذه القابلية لمجموعات R في الأحماض الأمينية الأليفاتية مثل الليوسين والأيزوليوسين أو المجموعات العطرية مثل الفينيل آلانين والتيروسين (شكل11).



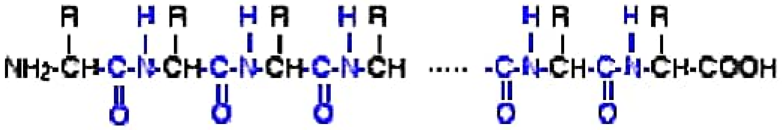
شكل (11) بعض الأحماض الأمينية ذات الأثر التثبيتي في تركيب البروتين.

رُتب بناء البروتين Orders of protein structure

للحصول على الشكل النهائي لجزيء البروتين نجد أنه يمر بثلاث أو أربع مراحل Orders أو Levels مستويات من التنظيم Organization هي:

1- **المستوى أو الرتبة الأولية** Primary level of organization (Primary structure)

ويُحدده نوع وعدد الأحماض الأمينية وتتابعها بنظام معين في السلسلة الببتيدية حيث ترتبط ببعضها من خلال رابطة ببتيدية وهذا البناء يكون هيكل السلسلة ويُوضح الشكل (12) التخطيطي التالي هذا المستوى الأول.



شكل (12) البناء الأول لتكوين البروتين.

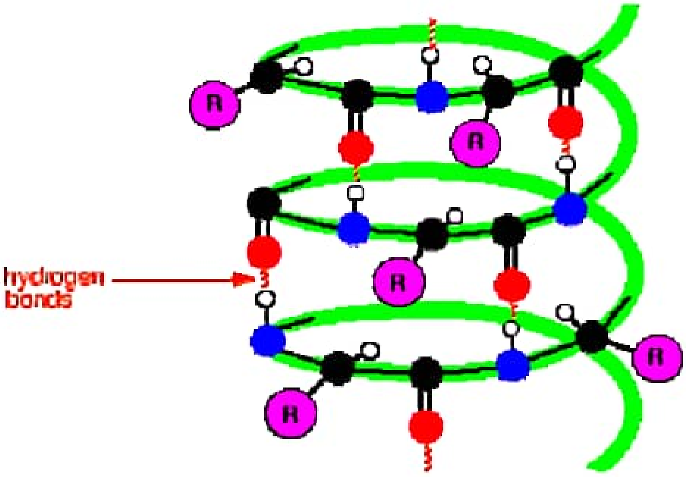
2- **البناء أو المستوى الثاني** Secondary level of organization (Secondary structure)

يُمثل التركيب التكويني للسلسلة الببتيدية التي يُؤثر فيها الالتفاف على طول السلسلة أو التفاف سلاسل ببتيدية مع بعضها في شكل حلزوني والتصاقها مع بعضها وهذا يُحدد التوزيع للذرات والمجموعات في السلسلة الببتيدية ووضعها بالنسبة لبعضها وما يُؤدي له من متشابهات هندسية تأخذ أوضاعاً مخالفة ومضاهية ويُثبت هذا البناء الروابط الثانوية التي من أهمها الروابط الأيدروجينية وهذا البناء تأخذ فيه السلاسل الببتيدية ثلاثة أشكال.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

أ- **الشكل ألفا** α-helix

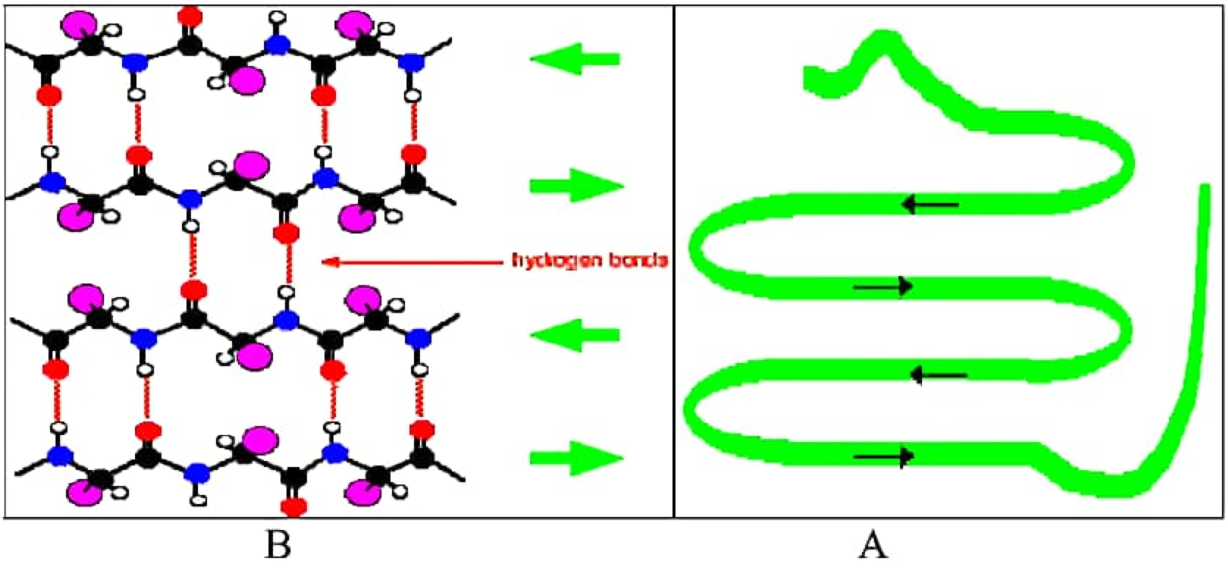
وفيه تلتف سلسلتان ببتيديتان على بعضهما في شكل حلزوني Helix وترتبط السلستين عن طريق روابط هيدروجينية عديدة (شكل 13).



شكل (13) تكوين α-helix.

ب- **الشكل بيتا** β- Pleated sheet (Zigzag structure)

وهو الشكل البسيط غير الملتف وفيه قد تكون سلسلة ببتيدية واحدة في صورة Zigzag كما في الشكل 14 A، أو ترتبط سلسلتان ببتيديتان أو أكثر ببعضهما دون التفاف أي في صورة Zigzag وتتحكم في هذا البناء الروابط الأيدروجينية كما في الشكل 14 B.



شكل (14) تكوين β-Pleated sheet

د- **الشكل العشوائي** Random

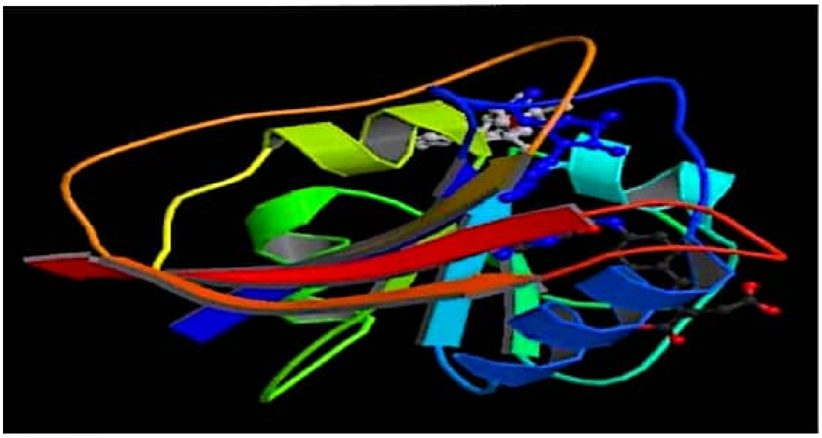
ويُوجد به التركيب الحلزوني والتركيب Zigzag.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

3- **البناء الثالث** Tertiary level of organization (Tertiary structure)

وهو يُمثل الشكل العام المجسم الثلاثي الأبعاد للبروتين ويُحدده التفاف السلاسل الببتيدية على بعضها وتكورها أو انفرامها (شكل 15)، وتثبته الروابط الثانوية. بالإضافة إلى الروابط أن الهيدروجينية تلعب روابط الداي سلفيت أهمية كبيرة في تثبيت هذا البناء، ويُعتبر البناء الثاني والثالث هما الشائعان في أغلب البروتينات المنتشرة.

ويكون شكل (تراكيب) Conformation البروتين في هذا المستوى مرتبطاً بالوظيفة الحيوية التي يُؤديها فمثلاً البروتين الذي يدخل في تكوين الألياف والأغشية يتكون من البروتين الليفي Fibrous protein من حبال ببتيدية مبرومة Coiled coil حول بعضها بينما ذلك الذي يُؤدي وظائف أخرى قد يكون شكله دائرياً أو كروياً تقريباً، وبروتين Globular ويتكون هذا بضغط السلاسل الببتيدية المنثية على نفسها.

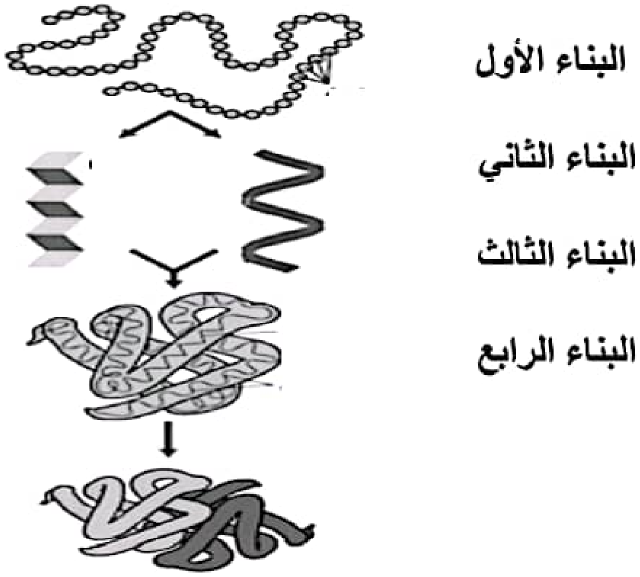


شكل (15) البناء الثالث للبروتين.

4- **البناء الرابع** Quaternary level (Quaternary structure)

وهو الناتج من تجمع جزيئات البروتين البسيط المتصلة مع بعضها في جزيء واحد وقد تكون هذه الجزيئات من النوع الحلزوني أو الملتف وتعمل روابط ثنائي الكبريتيد (داي سلفيت) على تثبيت هذا البناء، وهو يتوقف على نوع البروتين ونوع شحناته الكهربية ودرجة حموضة المحلول، هذا وتعمل أيونات الكالسيوم والخارصين أيضاً على تجميع جزيئات بعض البروتينات، فنجد أن أيونات الكالسيوم تعمل على تجميع جزيئات إنزيم ألفا أميليز وبذلك يتكون البناء الرابع له وتعمل أيونات الخارصين على تجميع جزيئات إنزيم جلوتاميك ديهيدروجينيز مكوناً البناء الرابع له. ويمكن تلخيص مراحل تكوين البروتين كما في الشكل التالي.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



شكل (16) ملخص لرتب بناء البروتين.

التركيب التكويني للبروتين

يُعتبر شكل جزيء البروتين في حالته الطبيعية مميزاً لكل نوع من أنواع البروتينات وعلى حسب شكل البروتين في حالته الطبيعية يُمكن تقسيمه إلى قسمين هما :

1- **البروتين الليفي أو الخيطي** Fibrous or linear

وهو بروتين ثابت التركيب لا يذوب في الماء ولا في محاليل الأملاح المخففة وهذا البروتين يمتد على طول محور واحد والسلاسل الببتيدية فيه تكون موجة مغزلية ويقوم بدور هام وأساسي في ربط الأنسجة الحية والأوتار ويُعتبر من ضمن بروتينات العظام وكرياتين الشعر.

2- **البروتين الحبيبي أو الكروي** Globular or spherical

وهذا النوع تُوجد فيه السلاسل الببتيدية ملتفة حول بعضها في شكل كرة مضغوطة أو على شكل منفرط هذا النوع ذائب في المحاليل الملحية المائية وسريع الانتشار ويقع على هذا النوع مسؤولية النشاط الديناميكي في الخلية ويقع تحت هذا النوع جميع الإنزيمات وبعض الهرمونات وكذلك بعض البروتينات التي تقوم بدور ناقل في الخلية مثل الأليبيومين والهيموجلوبين.

وهناك نوع آخر يقع بين النوعين السابقين أي بين الليفي والكروي فيشبه الليفي في أنه يتكون في حلزون طويل ويشبه الكروي في أنه يذوب في محاليل الأملاح وينتمي لهذا البروتين الميوسين المكون الرئيس للعضلات وكذلك الفيبروجين المكون الرئيس لتجلط الدم.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

فصل البروتينات Protein isolation

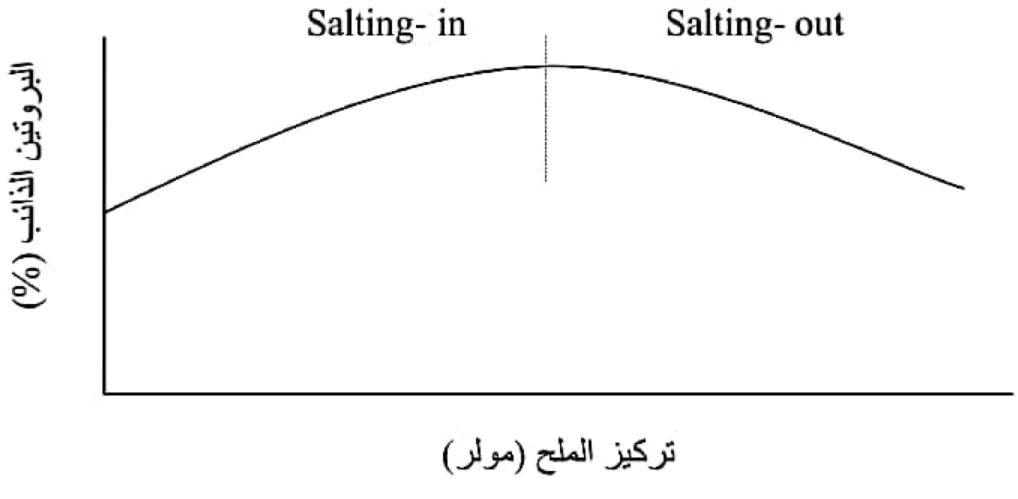
فصل البروتينات كأفراد في صورة نقية مهمة صعبة وتحتاج لمجهود ووقت طويل ويتم فصل البروتينات من المستخلصات المائية لها بإحدى الطرق الآتية:

1- **فصل البروتينات بفعل تركيز الأملاح في محاليلها المائية** Salt fractionation

تُستخدم الكثير من الأملاح لترسيب البروتين في محاليله المائية مثل كبريتات الماغنسيوم وكبريتات الصوديوم وكلوريد الصوديوم وكبريتات الأمونيوم.

عند استخدام كلوريد الصوديوم بتركيز منخفض يزداد ذوبان البروتين في محاليله Salting-in لأن التنافس بين أيونات الملح والبروتين على جزئيات الماء يكون لصالح البروتين، أما في حالة زيادة تركيز كلوريد الصوديوم فيقل ذوبان البروتين في محاليله Salting-out (شكل 17) وذلك راجع لأن التنافس بين أيونات الملح والبروتين على جزئيات الماء يكون لصالح أيونات الملح فيُرسب البروتين (تجمع) حيث تنخفض السعة المائية للبروتين.

ويُفسر عملية ترسيب البروتين بواسطة الأملاح بتجمع الماء حول أيونات الملح وبذلك تقل درجة نشاط جزئيات الماء وهذا يُؤدي إلى تقارب جزئيات البروتين فتتجمع وبالتالي تُرسب، وتُؤدي الأملاح إلى حدوث Dehydration للبروتين وبالتالي يُرسب البروتين.



شكل (17) تأثير التركيز المتزايد من الملح على استخلاص البروتين الذائب.

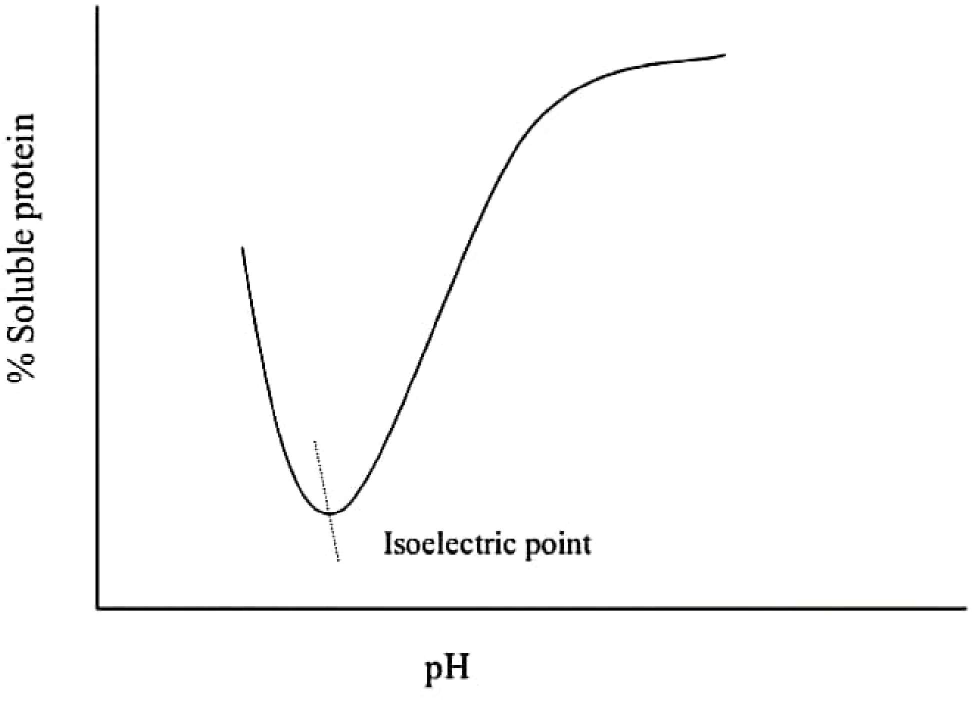
2- **ترسيب البروتينات عند نقطة التعادل الكهربي** Isoelectric point

تعرف نقطة التعادل الكهربي Isoelectric point للبروتين على أنها رقم الحموضة الثابت للبروتين والتي عندها يكون البروتين أقل ذوباناً وتكون محاليله أقل ما يُمكن من اللزوجة كما يكون البروتين متعادلاً من الناحية الكهربية (شكل 18).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

عند استخدام هذه الطريقة في فصل البروتينات يجب مراعاة إضافة الأحماض أو القواعد تدريجياً وبكميات ضئيلة في كل مرة حتى لا يفقد البروتين خواصه. وفيما يلي شرح مختصر لفصل البروتين بهذه الطريقة، يُوضع مستخلص البروتين في كأس مزود بمحرك ويُغمر به إلكترود جهاز الـ pH ثم يجرى التنقيط بمحلول الحامض أو القلوي المخفف تدريجياً وتُراقب درجة الـ pH التي يحدث عندها عكارة في المحلول، وبالتالي ترسيب للبروتينات تُجرى بعد ذلك عملية طرد مركزي للمحلول العكر فينفصل الراسب.

يعاد المحلول مرة أخرى للكأس ويجرى التنقيط مرة أخرى حتى يمكن فصل بروتينات أخرى عند رقم تعادل كهربي Isoelectric point آخر. وتكرر العملية كما سبق حتى يمكن فصل أكبر عدد من البروتينات الموجودة. وفي حالة ما إذا لوحظ أن العكارة لم تتكون عند استخدام محلول قلوي فتعاد التجربة باستخدام محلول حامضي.



شكل (18) تأثير الـ pH على ذائبية الروتين.

3- **استخدام المذيبات العضوية** Organic solvents

الأساس في هذه الطريقة أن جزيئات البروتين عليها شحنات سالبة أو موجبة بينها قوة جذب وعند زيادة قوة الجذب بين الشحنات يتجمع البروتين ويُرسب، وعند إضافة المذيبات العضوية للمستخلص البروتيني فإن ذلك يُؤدي إلى خفض الثابت الكهربي Dielectric constant ومعنى ذلك زيادة جذب الشحنات السالبة والموجبة مما يُؤدي إلى تجميع جزيئات البروتين.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الشروط الواجب مراعاتها في المذيبات العضوية المستخدمة في ترسيب البروتينات في محاليلها المائية

1- أن يكون لها مقدرة على الامتزاج بالماء بسهولة.

2- أن تتميز بثابت كهربائي منخفض Low dielectric constant.

3- يُمكن التخلص منها بدون مجهود كبير.

4- أهم المذيبات العضوية المستخدمة في هذا الغرض هي الأسيتون وكحول الإيثايل وكحول الميثايل، ويُراعى عند استخدام هذه الطريقة في ترسيب البروتينات يجب ألا تقل القوة الأيونية للمحلول البروتيني عن 0.03 وأن يكون تركيز البروتين ما بين 2- 3٪.

عيوب هذه الطريقة

1- تُؤدي إلى فقد خواص البروتين لطبيعته Denaturation وذلك لفعلها المجفف أي نزع الماء المحيط بجزئيات البروتين.

2- إنتاج حرارة ذات تأثير ضار على خواص البروتين وذلك عند إضافة بعض المذيبات العضوية إلى الماء ، ولذلك يجب عند إضافة هذه المركبات العضوية إلى المحلول البروتيني مراعاة إضافتها ببطء وعلى دفعات تدريجياً ويُفضل أن يكون كل من المحلول البروتيني والمذيب العضوي على درجة حرارة منخفضة قرب الصفر المئوي أو درجة تجمد المذيب.

4- **استخدام المعادن الثقيلة في فصل البروتين** Heavy metals

تتحمل البروتينات بشحنة سالبة عند pH 7 وعند إضافة المعادن ذات الشحنة الموجبة إليها تعمل على تعادل الشحنات الموجودة على البروتين وبذلك تُؤدي إلى ترسيب البروتين في محاليله، ويجب مراعاة أن الترسيب بهذه المعادن يكون فعالاً في المحاليل المتعادلة أو ضعيفة القلوية حيث في الوسط الشديد القلوي قد يُؤدي إلى ترسيب هيدروكسيد المعدن كذلك يجب أن يكون تركيز المعدن المستخدم مخففاً، ومن أهم المعادن المستخدمة هي كبريتات النحاس وخلات الرصاص.

5- **التبلور** Crystallization

يُمكن في هذه الطريقة ترسيب البروتينات بإضافة ملح كبريتات الأمونيوم ثم تُجرى عملية التخلص من هذا الملح بوضع البروتينات المترسبة والتي أعيدت إذابتها في أقل كمية من الماء المقطر في غشاء شبه منفذ يغمر في ماء مقطر جار لمدة 12 ساعة وذلك حتى يتم التخلص تماماً من جميع أيونات الملح وتُسمى هذه العملية باسم Dialysis ويُمكن أثناء إجراء عملية التخلص من الملح أن تظهر بعض بلورات من البروتينات الذائبة وهذه البلورات يُمكن جمعها عن طريق الطرد المركزي ثم تُجرى عملية الـ Dialysis مرة أخرى حتى تنفصل بلورات أخرى.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

ويجب الإشارة إلى أن كل مجموعة من البلورات لا يعني أنها لبروتين واحد كما هو مفهوم من بلورة الأملاح المعدنية فقد تكون البلورة الواحدة تحوي أكثر من نوع من البروتينات.

6- **الترشيح الجيلي** Gel filtration chromatography

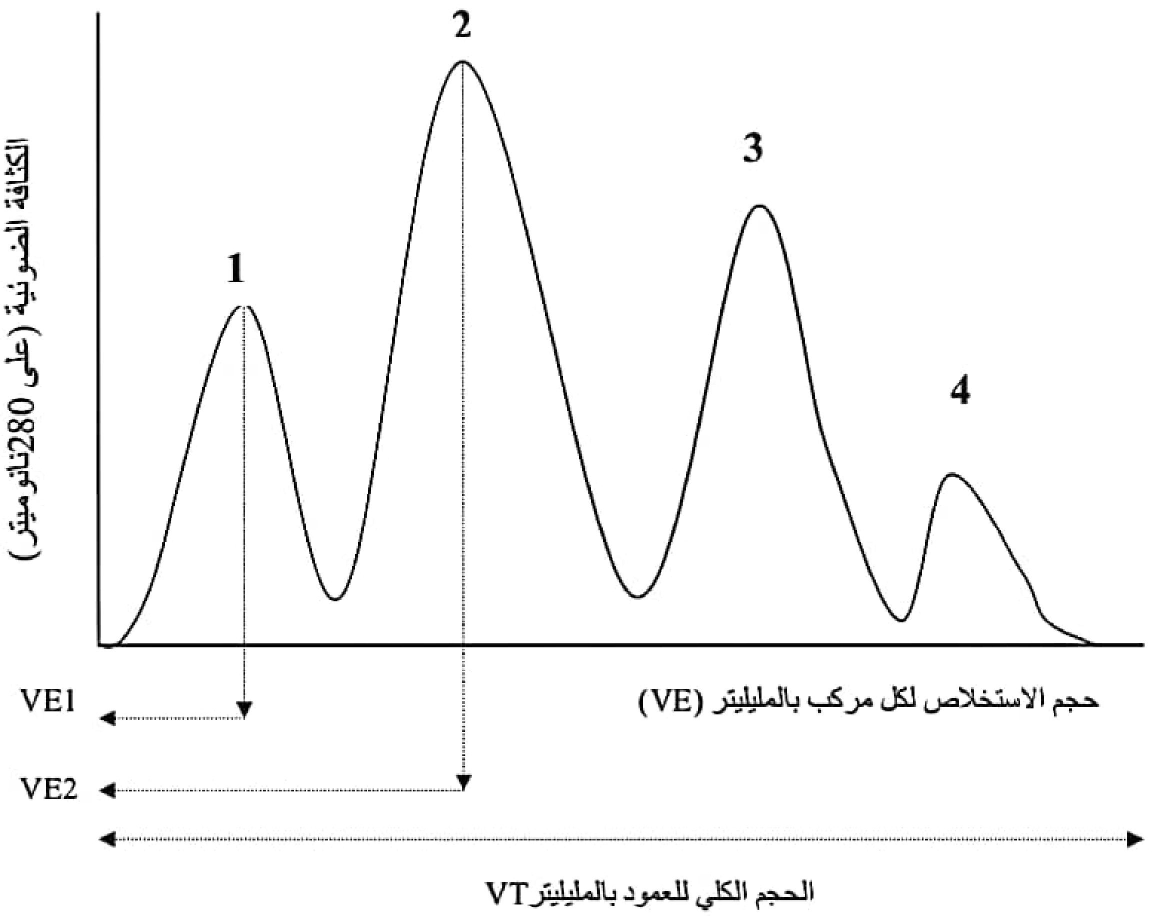
في هذه الطريقة يتم مرور الجزيئات خلال عمود من مادة الجيل التي حدث لها انتفاخ كامل بالمذيب المستخدم وعادةً ما يكون محلولاً منظماً معروفاً رقم حموضته وقوته الأيونية pH and ionic strength وفى هذه الحالة يتم الفصل على أساس قطر وحجم الجزيئات التي لها قطر أكبر من مسام مادة الجيل يحدث لها أن تُغمر في المسافات البينية الموجودة بين حبيبات الجيل نفسه وتصل إلى مؤخرة العمود أسرع وتخرج معه أولاً ، أما المركبات ذات الأقطار الأقل فإنها تدخل في مسام حبيبات الجل نفسه وتأخذ وقتاً أطول حتى تصل إلى مؤخرة العمود وتخرج منه وبذلك فإن معدل سرعتها يكون أقل من المركبات ذات الوزن الجزيئي العالي Retardation time يكون أكبر منه في حالة الجزيئات الأكبر وبذلك تتحرك المركبات بسرعة تختلف حسب قطر وشكل الجزيء نفسه مما ينتج سهولة انفصال هذه الجزيئات عن بعضها.

ويتم استقبال الجزيئات الخارجة من العمود في أنابيب اختبار في أجزاء كل منها حوالي 3- 4 مل وذلك عن طريق ضبط معدل السريان Flow rate إلى حوالي 18- 20 مل/ ساعة مستخدماً ما يُسمى بـ Fraction collector أو يدوياً ثم تُقاس الكثافة الضوئية لهذه الأجزاء كلاً على حدة وذلك على طول موجبة قدرة 280 nm باستخدام جهاز Spectrophotometer ثم ترسم العلاقة ما بين الكثافة الضوئية لهذه الأجزاء مع حجم كل جزء على المحور الأفقي.

شرح النتائج المتحصل عليها في الشكل (19):

1- عدد المنحنيات Peaks يدل على عدد المركبات الموجودة في العينة.
2- مدى انتظام المنحنيات يدل على نقاوة هذا المركب وعدم وجود المركبات الأخرى كشوائب معه.
3- قمة المنحنيات Peaks من ناحية Sharpness or broadness يدل على مدى كفاءة الفصل تحت هذه الظروف، كذلك يدل على إعطاء فكرة تقريبية عن الأوزان الجزيئية لهذه المركبات
4- المنحنيات Peaks التي تخرج أولاً دليل على أنها أعلى في الوزن الجزيئي والعكس مع آخر منحنى.
5- المساحة الموجودة تحت كل منحنى بمقارنتها بالمساحة الكلية تُعطى فكرة عن تركيز كل مركب Fraction على حدة وأيهما الكبير Major وأيهما الصغير Minor.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



شكل (19) فصل البروتين بالترشيح الجيلي.

استخدامات الترشيح الجيلي Gel filtration

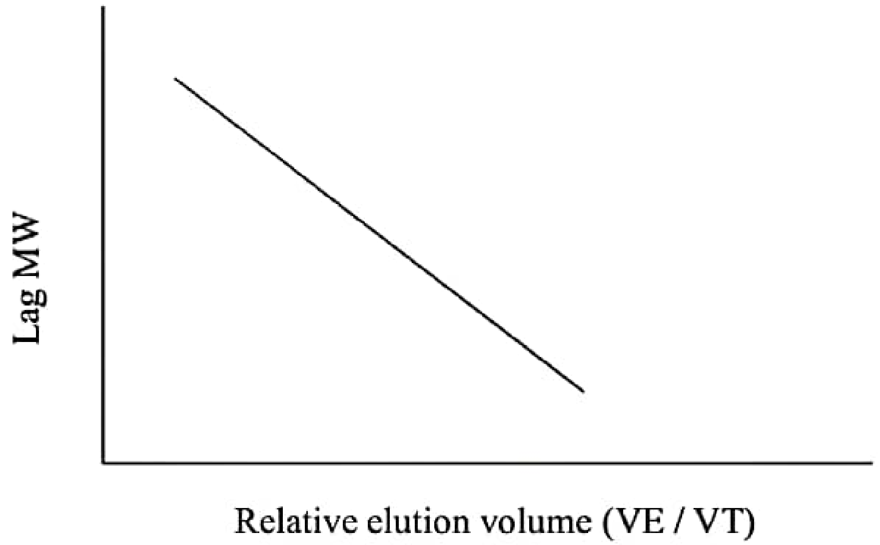
1- يُفيد في معرفة المكونات الفردية للعينة.

2- يُفيد في عمليات الفصل والتنقية للمواد المراد تنقيتها.

3- يُفيد في التخلص من المواد السامة أو الضارة وعادةً ما يكون لها وزن جزيئي صغير.

4- يُفيد في تقدير الوزن الجزيئي للبروتينات النقية وذلك بمقارنتها باستخدام بروتين قياسي Standard proteins ويتم توقيع العلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي Lag MW على المحور الرأسي مع (Relative elution volume) VE / VT على المحور الأفقي كما هو موضح بالشكل التالي.

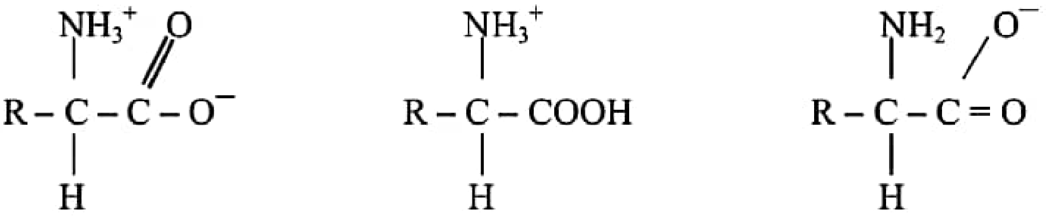
الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner



شكل (20) العلاقة بين الوزن الجزيئي للبروتين وحجم سائل الاستخلاص.

7- فصل البروتينات باستخدام التفريق أو الهجرة في المجال الكهربائي Electrophoresis

تتميز البروتينات بخاصية الأمفوتيرية نظراً لوجود مجموعات الأمين والكربوكسيل عليها وفى وجود القلويات فإنها تتفاعل مع مجموعات الكربوكسيل وتكون النتيجة هي اكتساب الجزيء لشحنة سالبة أما في الوسط الحامضي فأن الحامض يتفاعل مع مجموعة أمين ويكتسب الجزيء الشحنة الموجبة. وفى حالة تساوي عدد الشحنات الموجبة والسالبة على الجزيء أي إنه متعادل كهربائياً Isoelectric point فإن محصلة الشحنات الموجودة على جزيء البروتين يكون مجموعها صفراً ويتكون ما يُعرف باسم Zwitterion.



Zwitterion وسط حامضي وسط قلوي

ويتوقف فصل البروتينات في هذه الطريقة على طبيعة التوزيع الكهربي ومقداره ونوعه على جزيء البروتين وفى هذا النظام يُوضع المحلول البروتيني في مجال كهربي ذي قوة كبيرة وبذلك يُمكن أن تتفصل مجموعة البروتينات إلى أفراد بعضها يتجه إلى القطب السالب والبعض الآخر يتجه نحو القطب الموجب مع تفاوت في مقدار وسرعة هذا الانتقال في المجال الكهربي.

ويُعاب على هذه الطريقة ارتفاع ثمن الأجهزة والكيميائيات ولا تُستخدم إلا في فصل مقادير ضئيلة من البروتينات (ملليجرامات) وعلى ذلك يُفضل استخدام هذه الطريقة في الحكم على نقاوة البروتين.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

العوامل المؤثرة على سرعة الانتقال والفصل Factor affecting migration

أولاً: العينة Sample

أ- الشحن

يزداد معدل التحرك بزيادة الشحنة Net charge وهي تعتمد عامة على درجة حموضة الوسط.

ب- الحجم

يقل معدل التحرك بالنسبة للمركبات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة نظراً لزيادة الاحتكاك وقوى التجاذب الإلكتروستاتيكي الناتجة من الوسط المحيط . فالجزيئات البلورية (ذات وزن جزيئي كبير) تدمص جزئياً على الورق وتترك ذيلاً Trail tailing خلف كل شريط من المواد المفصولة الرئيسة.

جـ- الشكل

يظهر الجزيئات ذات الحجم المتساوي والتي تختلف في شكلها مثل البروتين الليفي والدائري اختلافاً متبايناً في تحركها نظراً لاختلاف تأثير الاحتكاك وقوى التجارب الإلكتروستاتيكي.

ثانياً: المجال الكهربي Electric field

عند مرور التيار الكهربي لعدة ثوان تنتج حرارة نتيجة لتحول الطاقة الكهربائية إلى طاقة حرارية وهذه الحرارة الناتجة تعمل على تبخير الماء من المحلول المنظم وتكثفه على جدران الـ Jar البارد ويكون معدل التبخير صغيراً في حالة استخدام الفولت المنخفض ويزداد كلما ازداد الفولت، وحيث إن أملاح المحلول لا تتطاير بالتبخير فإنه يزداد تركيز الأملاح على وسط الفصل وبالتالي تقل من مقاومتها باستمرار لمرور التيار الكهربائي، وعليه يجب أن تختار الظروف المناسبة من حيث الفولت بأن يكون عالياً بالقدر الذي يُعطي أحسن فصل في وقت قصير ولكن لا ينتج حرارة والتي يُحدثها عندها البخر ويُمكن التغلب على مشكلة البخر بوضع الجهاز في الثلاجة.

ثالثاً: المحلول المنظم Buffer

أ- التركيب

المحاليل المنظمة المستعملة عادةً هي الفورمات- الخلات- السترات- البورات- الفوسفات ويُفضل الفوسفات في فصل البروتينات.

ب- التركيز

تزداد نسبة التيار المحمولة بواسطة المحلول المنظم بزيادة تركيز أيوناته بينما تقل نسبة التيار المحمولة بواسطة العينة وهذا يُقلل من معدل تحركها، وعند التركيز المنخفض فإنه تقل نسبة التيار المحمولة بواسطة المحلول المنظم بينما تزداد نسبة التيار المحمولة بواسطة العينة ومن ثم يزداد معدل

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

تحركها وتنتج حرارة أقل ولكن يزداد انتشار مكونات العينة بدرجة عالية وبالتالي تقل كفاءة الفصل. والمحلول المنظم ذو التركيز العالي يُؤدي بصفةٍ عامة إلى زيادة مرور التيار ومن ثم تنتج حرارة أكثر وعلى ذلك تستعمل محاليل منظمة لها تركيز يقع في حدود (0.05- 0.15 مولر).

جـ- درجة الـ pH

تلعب الـ pH دوراً هاماً في تأين المركبات العضوية حيث تزداد درجة تأين الأحماض العضوية بزيادة الـ pH والعكس في حالة القواعد العضوية . وعلى ذلك فإن مدى تحرك المركبات يعتمد على درجة الـ pH. وعادةً تُستعمل محاليل منظمة لها pH يقع في حدود 1- 11 لتُعطي الفصل المطلوب.

رابعاً: الوسط الدعامي Supporting medium

أ- الورق

يُعتبر الورق دعامة مناسبة جداً لكثير من التجارب وذلك لرخص ثمنه وسهولة استعماله وأهم عيوبه هي اختلاط المناطق مع بعضها.

ب- خلات السيلولوز

يُمكن الحصول على شرائح عالية النقاوة من خلال السيلولوز وتتميز هذه المادة بقابليتها المنخفضة جداً لادمصاص المواد عليها مما يجعلها تُعطي فصلاً واضحاً مع استعمال كميات قليلة من العينة وأهم عيوبها أنها مرتفعة الثمن بالنسبة للورق.

جـ- الجيل

من أكثر الطرق انتشارا وبصفةٍ خاصة في فصل المركبات التي لها نفس الشحنة ولكن تختلف قليلاً في كتلتها ، وفيما يلي الأنواع المختلفة من الجيل:

1- جيل النشا

من أهم عيوبه صعوبة استخلاص المركبات المفصولة منه ويمتاز برخص سعره.

2- جيل الآجار

هذا الوسط شفاف وبالتالي يُناسب لنوع خاص Photometric scanning وهو رخيص الثمن وسهل الحصول عليه.

3- جيل الأكريلميد العديد

يُفضل عن المادتين السابقتين لما يلي:

أ- ذو خواص ثابتة على نطاق واسع من الظروف الكيميائية والطبيعية.

ب- يمتاز بإمكانية استخدام أنواع عديدة من المحاليل المنظمة ذات درجات pH مختلفة.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

جـ- يُمكن التحكم في حجم المسام الموجودة به Pore size مما يُؤدي إلى فصل أحسن للجزيئات المختلفة الحجم.

د- لا يُوجد عليها أي شحنات كهربائية على مدى واسع من درجات الـ pH وبالتالي يُعتبر خاملاً من الناحية الكيماوية حيث لا يُؤثر على درجة تأين المركبات المراد فصلها على عكس النشا والآجار التي تحمل شحنات سالبة على درجات الحموضة المتعادلة. هذا وما زال الآجار يُستخدم في فصل ودراسة الـ Lipoproteins أما النشا فيُستخدم في فصل ودراسة α-Globulins.

استخدامات الـ Electrophoresis

1- يُستخدم في دراسة مكونات البروتين الفردية في عينةٍ ما.

2- يُستخدم في حساب Relative mobility.

3- يُستخدم في حساب الوزن الجزيئي باستخدام SDS.

4- يُستخدم في الحكم على نقاوة البروتينات أثناء عمليات العزل والتنقية للبروتينات من مصادرها الطبيعية.

5- يُستخدم كاختبار تأكيدي للنتائج المتحصل عليها من الطرق الأخرى السابقة.

8- **الطرد المركزي العالي** Analytical ultracentrifugation

تتميز البروتينات بأوزانها الجزيئية المرتفعة حيث تتراوح ما بين 20 ألف وبضعة ملايين فإذا فرضنا وجود مجموعة من البروتينات في محلول منظم وتتفاوت الأوزان الجزيئية لهذه البروتينات فيما بينها ثم عرضت إلى الطرد المركزي العالي والذي تتفاوت سرعته ما بين 50.000 -60.000 لفة في الدقيقة الواحدة فإن هذه البروتينات تنفصل عن بعضها متجهةً نحو المركز ولكن بسرعات مختلفة فالبروتين الأكثر وزناً يُطرد نحو المركز أسرع من البروتين الأقل منه وزناً. وعادةً تُزود الأجهزة بجهاز حساس للتصوير يُمكن بواسطته تتبع حركة كل بروتين أثناء إجراء عملية الطرد المركزي.

9- **الفصل على المواد الادمصاصية ذات الشحنات الكهربية** Ion exchange chromatography

يُمكن فصل البروتينات المختلفة بنجاح باستخدام المواد الادمصاصية الصناعية ذات الشحنات الكهربية وتُعرف هذه المواد باسم Ion exchange resin وغالباً ما تحمل هذه المواد على السيلولوز أو مشتقاته لزيادة سطح ادمصاصها وزيادة سرعة مرور المحاليل البروتينية بها وهذه المواد الادمصاصية إما أن تكون سالبة أو موجبة ومثال الأولى مادة سالبة الشحنة Carboxy methyl cellulose (CMC) تحمل مجموعة كربوكسيلية نشطة مثال الثانية موجبة الشحنة تحمل مجموعة أمينية نشطة Diethyl amine ethyl cellulose (DEAEC).

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

تقدير البروتين في الأغذية Determination of protein in foods

1- تقدير البروتين الكلي بطريقة ميكروكلداهل Micro- Kjeldahl method

يتم في هذه الطريقة تقدير النسبة المئوية للنيتروجين الكلي ثم تحويلها إلى بروتين كلي عن طريق ضربها في معامل تحويل النتروجين إلى بروتين، وهذا المعامل يختلف باختلاف نوع البروتين فمثلا يكون معامل تحويل النتروجين إلى بروتين في معظم البروتينات 6.25 وفي منتجات الألبان 6.38 في حين في الحبوب 5.7. والأساس في هذه الطريقة يتم على ثلاث مراحل هي:

1- مرحلة الهضم

و فيها يتم تحويل المركبات النيتروجينية بالعينة إلى كبريتات أمونيوم $(NH_4)_2\ SO_4$ وذلك عن طريق غليان العينة مع حامض الكبريتيك المركز كما في المعادلة الآتية:

$$2NH_3 + H_2SO_4 \longrightarrow (NH_4)_2SO_4$$

الأبخرة والغازات الناتجة في مرحلة الهضم ضارة بالجهاز التنفسي ولذلك يجب إجراء الهضم داخل خزانة الغازات أو استخدام المصيدة الموجودة بالعمل.

2- مرحلة التقطير

وفيها يتم تحطيم أو تكسير كبريتات الأمونيوم السابق تكوينها بواسطة الصودا الكاوية المركز (40٪) وتحرير الأمونيا منها عن طريق التقطير بالبخار في نظام مقفل واستقبالها في محلول 2٪ من حمض البوريك H_3BO_3 كما في المعادلة الآتية:

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \longrightarrow 2NH_4OH + Na_2SO_4$$

$$3NH_4OH + H_3BO_3 \longrightarrow (NH_4)_3BO_3 + 3H_2O$$

3- مرحلة المعايرة

ويتم فيها معايرة بورات الأمونيوم $(NH_4)_3\ BO_3$ المتكونة من حمض HCl المعلوم القوة وبمعرفة حجم الحامض يُمكن حساب كمية النيتروجين في العينة كما في المعادلة الآتية:

$$(NH_4)_3BO_3 + 3HCl \longrightarrow 3NH_4Cl + H_3BO_3$$

حيث يؤخذ وزنة معلومة من العينة المراد تقدير البروتين بها (0.5- 1 جرام) وتوضع في دورق هضم زجاجي ذي عنق طويل ويوضع عليها حمض كبريتيك مركز (15 مل) ومسحوق هضم (كبريتات نح + كبريتات بوتاسيوم + ثاني أكسيد السيلينيوم) ثم توضع في وحدة الهضم الخاص بجهاز كلد (الشكل A 21) وتترك لمدة 4 ساعات أو حتى تصبح العينة عديمة اللون ثم تبرد.

يضاف إلى العينة المهضومة ماء مقطر حتى يصل الحجم إلى 100 مل ثم توضع في وحدة التقطير الخاصة بجهاز كلداهل (الشكل B 21) حيث يدفع على العينة محلول هيدروكسيد الصوديوم (40 ٪)

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

أوتوماتيكيا ثم يدفع أيضا فيها البخار الساخن أوتوماتيكيا ويستمر التقطير 10 دقائق ويستقبل المتقطر في حامض البوريك (2 ٪) المحتوي على دليل مختلط (أحمر الميثيل + بروموكريزول جرين).

تجري عملية المعايرة للسائل المتقطر بواسطة حمض الهيدروكلوريك (1/ 70 عياري) حتى يتغير لون الدليل ثم تحسب النسبة المئوية للنتروجين في العينة ثم تضرب في معامل تحويل النتروجين إلى بروتين.

شكل (21) وحدة هضم (A) وتقطير (B) البروتين.

2- **تقدير النيتروجين اللابروتيني بالأغذية** Determination of non-protein nitrogen in foods

يعتمد هذا التقدير على ترسيب بروتين المادة الغذائية بواسطة حامض الخليك ثلاثي الكلور TCA ثم تقدير النيتروجين في الراشح، مع مراعاة أن النسبة المئوية للنتروجين الناتج لا تضرب في معامل التحويل.

وفيها يؤخذ وزنة معلومة من العينة (1 جرام) ويضاف عليها في دورق مخروطي حمض الخليك ثلاثي الكلور (20 مل) تم ترج لمدة ساعة يعقبها إجراء الطرد المركزي ثم يؤخذ حجم معلوم من السائل المترشح (10 مل) ويجرى عليها خطوات الهضم والتقطير والمعايرة كما ذكر سابقا في تقدير البروتين الكلي ثم تحسب النسبة المئوية للنتروجين اللابروتيني.

3- **تقدير البروتين لونيا بطريقة لوري** Colorimetric determination by Lawry et al..

يتفاعل البروتين مع محلول Folin-ciocalteau ليُعطى لوناً معقداً، اللون المتكون ناتج لتفاعل محلول النحاس القلوي مع البروتين وأيضاً إلى اختزال الفوسفومولبيدات بواسطة التيروسين والتربتوفان الموجودين في البروتين.

حيث يُؤخذ وزنة معلومة من العينة ويستخلص منها البروتين في محلول كلوريد الصوديوم (1 عياري) بالرج لمدة ساعة ثم الطرد المركزي ثم يؤخذ حجم معلوم من الراشح (0.1- 0.2 مل) في أنبوبة اختبار ويُضاف

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

إليها ماء مقطر حتى يكون الحجم النهائي 1 مل ثم يُضاف 5 مل من محلول قلوي (1- محلول 2 ٪ صوديوم بوتاسيوم طرطرات، 2- محلول 1 ٪ كبريتات نحاس، 3- يخلط المحلولان 1، 2 بنسب متساوية مباشرة قبل التفاعل، 4- محلول هيدروكسيد صوديوم 0.1 عياري يذاب فيه 2 ٪ كربونات صوديوم، 5- يخلط 1 مل من المحلول 3 مع 50 مل من المحلول 4 قبل الاستخدام مباشرة) ثم يضاف لمحتويات الأنبوبة 0.5 مل من محلول Folin-ciocalteau والرج سريعاً، ويحدث في هذه الحالة تكون لون أزرق والذي يُقاس على طول موجة 750 نانوميتر بعد تكونه بـ 30 دقيقة. ويتم عمل منحنى قياسي من البروتين النقي ومنه يُمكن معرفة تركيز البروتين بالعينة.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner