وزارة التعليم العالي البحث العلمي

جامعة البصرة – جامعة كربلاء- جامعة تكريت

كلية الزراعة

قسم علوم الاغذية

محاضرات المرحلة الثانية لمادة كيمياء حيوية عملي

اعداد مدرسي الجزء العملي:- م.د. شيرين فاضل عباس - م.م. علي عبد الرحيم كاظم - أ.م.د. سعد ضامن عليوي

جامعة البصرة جامعة كربلاء جامعة تكريت

منهج مقررات كيمياء الحيوية العملي الموحد

ت	المادة	
عملي1	الكشوفات النوعية عن السكريات الاحادية (الكشف العام،الكشف عن الصفة الاختزالية، القوة الاختزالية، التميز بين السكريات المختزلة الدهايدية والكيتونية، الخماسي والسداسية)	مختبر عملي
عملي 2	الكشوفات عن السكريات الثنائية (الكشف العام ، التميز بين السكريات الاحادية والثنائية، التميز بين السكريات المختزلة والغير مختزلة)	مختبر عملي
عملي3	الكشوفات عن السكريات المتعدد(الكشف العام، اختبار الصفة الاختزالية ، اختبار اليود)	مختبر عملي
عملي4	التحلل المائي للنشأ والكشف عن نواتج تحلل النشأ	مختبر عملي
عملي5	امتحان1	مختبر عملي
عملي 6	الاختبارات العامة عن البروتينات	مختبر عملي
عملي7	الكشف عن الاحماض الامينية الكبريتية في البروتينات	مختبر عملي
عملي8	الكشف عن الاحماض الامينية العطرية في البروتينات	مختبر عملي
عملي9	الكشف عن الاحماض الامينية القاعدية في البروتينات	مختبر عملي
عملي10	ترسيب البروتينات- دنترة وتجلط البروتينات	مختبر عملي
عملي11	امتحان2	مختبر عملي
عملي12	الكشوفات الخاصة بالدهون (التميز بين الاحماض الدهنية المشبعة والغير مشبعة، اختبار خلات النحاس، اختبار الرقم اليودي)	مختبر عملي
عملي 13	استحلاب الزيوت تصبن الدهون	مختبر عملي
عملي 15	تزنخ الدهون (اختبار رقم البيروكسيد)	مختبر عملي

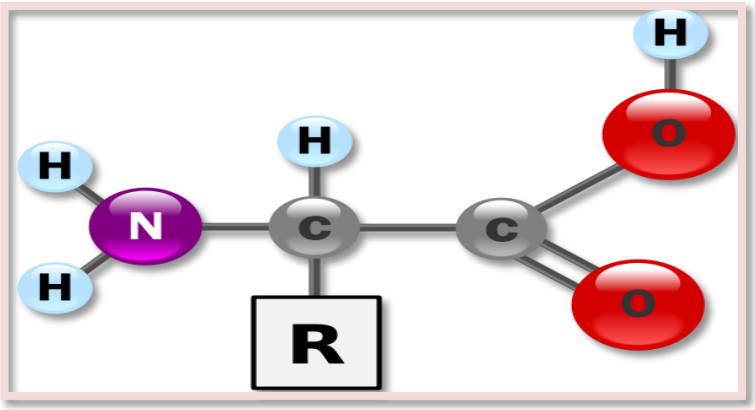
البروتينات PROTEINS

البروتينات (مشتقة من الكلمة الاغريقية Protos وتعني الأول لأهميتها الحيوية البالغة) عبارة عن مواد عضوية معقدة التركيب ذات اوزان جزيئية عالية (1000000-5000) دالتون، وتتكون من عناصر أساسية هي الكاربون بنسبة 50% والهيدروجين بنسبة 7% والاوكسجين بنسبة 3% والنتروجين بنسبة 16% كما يوجد الكبريت بنسبة 0-3% في بعض أنواع البروتينات. تعد البروتينات المكون الرئيسي والاساسي للأنسجة والخلايا الحيوانية والنباتية كالبيض واللحوم والبذور. وتختلف البروتينات عن بعضها في عدد ونوعية وتعاقب الحوامض الامينية المكونة لها. للبروتينات وظائف مهمة منها وظائف التحفيز، وظائف الخزن، وظائف النقل، وظائف دفاعية، وظائف التقلص، السموم، الهرمونات، وظائف بنائية.

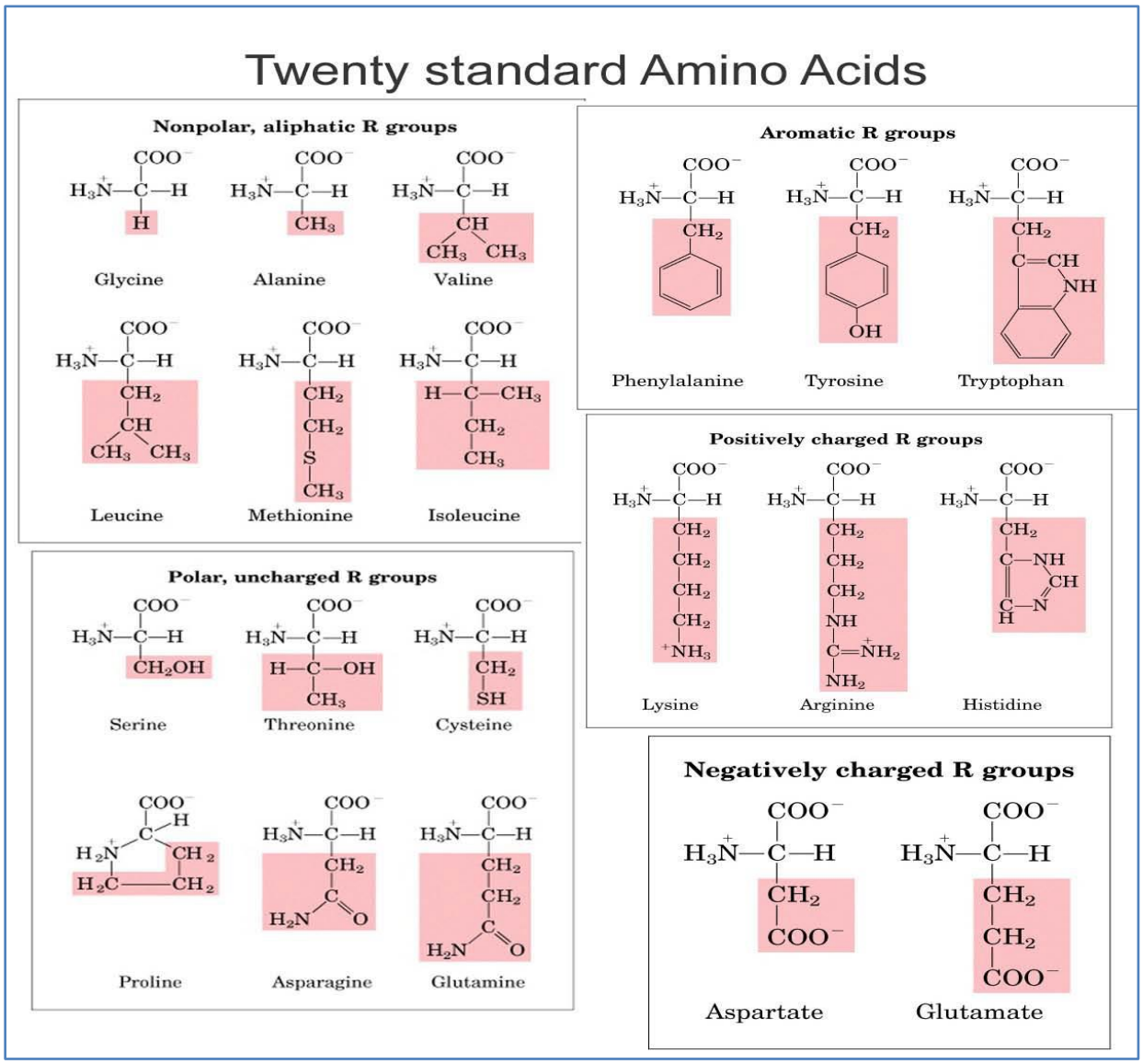
والبروتينات عبارة عن بوليمرات من احماض امينية مرتبطة بأواصر تساهمية (ببتيدية) وتحتوي في تركيبها مجموعة كاربوكسيل COOH الحامضية ومجموعة الأمين NH_2 القاعدية.

الاحماض الامينية Amino acids

هي احماض كاربوكسيلة حاوية على مجموعة امينية متصلة بذرة الكاربون الفا- وتختلف الاحماض الامينية فيما بينها باختلاف السلسلة الجانبية R



تركيب الحامض الاميني



يمكن تقسيم المواد البروتينية إلى ما يلي :-

1- بروتينات بسيطة : وهي البروتينات التي عند تحللها المائي تعطي أحماض - امينية فقط .مثل الالبومينات (Albumins) ,الكلوبيولينات **(Globulins)** .

2- البروتينات المركبة : وهي البروتينات التي عند تحللها المائي تعطي أحماض - امينية ومجموعات كيميائية ليس لها صلة بالبروتين مثل الفوسفوبروتينات, كلوكوبروتينات ,كروموبروتينات .

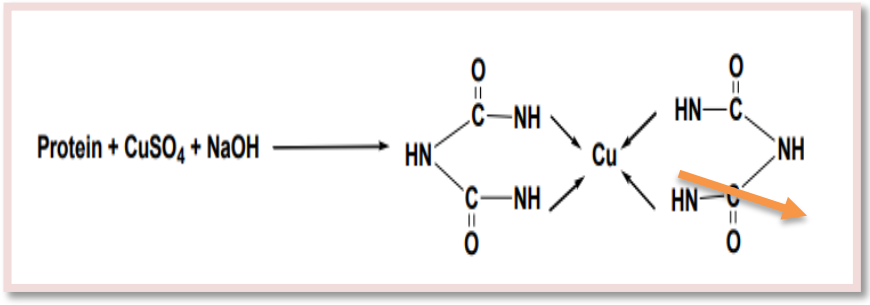
3- **البروتينات المشتقة :** وهي البروتينات التي تنتج من التحلل المائي للبروتينات -البسيطة مثل ميتابروتين , ببتونات, ببتيدات , الجلاتين.

الاختبارات التي تستخدم للكشف عن البروتينات والاحماض الامينية

اولاً: الاختبارات العامة للبروتينات

1- اختبار بيوريت (Buret Test)

اختبار بيوريت هو اختبار كيميائي يستخدم لمعايرة البروتين في الدم والسوائل الحيوية للجسم عند إضافة محلول كبريتات النحاس ($CuSO_4$) في وسط قاعدي (OH^-) إلى محلول بروتيني يتشكل معقد بين أيون النحاس والروابط الببتيدية للبروتين وظهور لون بنفسجي يدعى Copper- Potasium (or sodium) – Complex وفقا للصورة التالية. حيث يشير تكوين اللون الأرجواني إلى وجود روابط ببتيدية في العينة. تتناسب شدة اللون الأرجواني المتطور بشكل مباشر مع تركيز روابط الببتيد الموجودة في المحلول. و يعتبر كشف عام عن جميع المواد البروتينية لذا يكون موجب مع جميع المركبات البروتينية التي تحتوي على آصرتين من الأواصر الببتيدية على الأقل كما يعطي نتيجة موجبة مع نواتج التحلل المائي للبروتينات حتى مرحلة الببتيدات الثلاثية Tripeptides أما الببتيدات الثنائية والأحماض الامينية فلا تعطي كشف موجباً لهذا الاختبار لماذا؟ السبب هو كون الأحماض الامينية لا تحتوي على آصرة ببتيدية والببتيدات الثنائية تحتوي على آصرة ببتيدية واحدة



معقد النحاس التناسقي (Copper- Potasium or sodium) (للاطلاع)

المواد الكيميائية اللازمة:-

هيدروكسيد الصوديوم NaOH (40%)، و محلول كبريتات النحاس CuSO4 (1%) ، مصدر بروتين مثل زلال البيض(البومين) ، كازائين، جلاتين . (يذوب الكازائين في قاعدة مخففة ويذوب الاخران في Saline)

طريقة العمل:- تضاف 5 قطرات من محلول $CuSO_4.H_2O$ الى 2 مل من محلول البروتين في انبوبة اختبار ثم يضاف 2 مل من NaOH (يجب تجنب إضافة كمية زائدة من هذه المادة) ويمزج جيداً، لاحظ ضهور اللون البنفسجي (نتيجة موجبة)

الملاحظة/ تعطي جميع الببتيدات هذا الكشف باستثناء الثنائية

2- اختبار النينهايدرن Ninhydrintest

اختبار النينهيدرين هو اختبار كيميائي يستخدم للتحقق مما إذا كانت المادة العينة تحتوي على أمينات أو أحماض أمينية ألفا(أي انه كشف خاص بالأحماض الامينية الحره). اذ في هذا الاختبار، تتم إضافة مادة النينهيدرين (مركب كيميائي له الصيغة C9H6O4) إلى محلول العينة المراد اختبارها . يشير اللون الأزرق الداكن إلى وجود الأمونيا أو الأمينات الأولية / الثانوية أو الأحماض الأمينية في العينة. لذلك يعتمد هذا الكشف على وجود جذر الأمين α -Amine بصورة حرة، لذا فجميع الأحماض الأمينية تستجيب لهذا الكشف ما عدا الحامض الاميني البرولين والهيدروكسي برولين فانهما يعطيان نتيجة سالبة. لماذا؟ لانهما يمتلكان مجموعتي امين مقيدتين ضمن التركيب الكيميائي الحلقي وبالتالي لاتحصل عملية الاكسدة عليهما لانهما غير حرتين (راجع التركيب الكيميائي للبرولين) .

الاساس العلمي للاختبار:

النهيدرين هي مادة مؤكسدة قوية جداً تتفاعل مع الأحماض الأمينية في وسط pH (4-8) لتعطي مركبات ونواتج ملونة. التفاعل حساس جداً ومثالي لكشف عن الكميات القليلة جداً من الأحماض الأمينية. اذ يتفاعل النهايدرين معها ليعطي اللون البنفسجي .

المواد : محاليل من احماض امينية مختلفة مع نماذج من البروتينات المتوفرة في المختبر(مثل زلال البيض).

طريقة العمل

1-اضف في كل انبوبة 2 مل من محلول الحامض الاميني

1- أضفْ 1 مل على كل أنبوبة من محلول النينهايدِّرينْ تركيز 2% (يحضر كاشف النينهايدرين من خلال اذابة 2 غم من مادة النينهايدرين في 100 مل من كحول الايثانول) .
2- رج جيدًا ثم ضعهًا في حمام مائي للتسخين لمدة 1 الى 2 دقائق ثم دوّن ملاحظاتك (النتيجة الموجبة ظهور اللون البنفسجي المزرق).

ملاحظة/ النينهايدرين يعطي كشف سالبا مع البروتينات

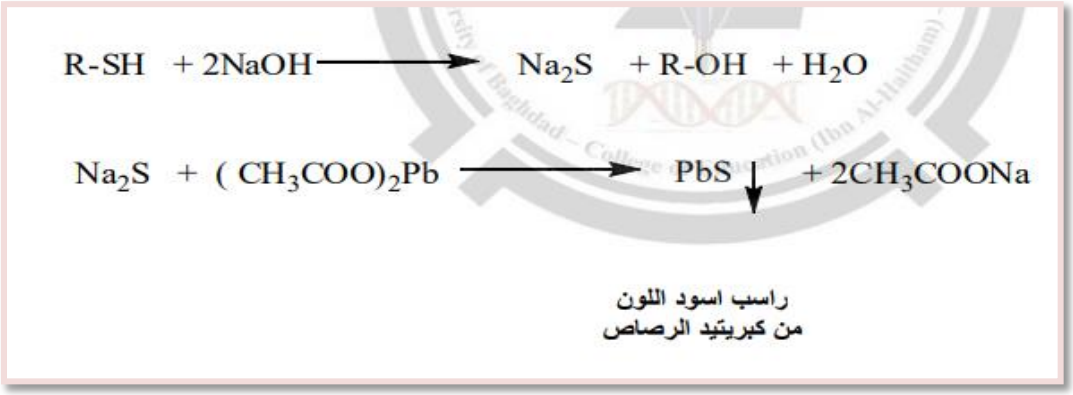
ثانياً:- الكشف عن الاحماض الامينية الكبريتية في البروتينات

الكشف عن الأحماض الأمينية التي تحتوي على الكبريت (اختبار خلات الرصاص)

الهدف: هذا الاختبار مميز للأحماض الأمينية المحتوية على مجموعة الكبريت في المجموعة الطرفية مثل :السيستين، السستائين

الاساس العلمي للاختبار:

يعتمد الكشف على تحويل الكبريت العضوي في البروتينات والحوامض الامينية الكبريتية مثل السستين والسستائين عند معاملتها مع هيدروكسيد الصوديوم NaOH %40 الى كبريت لا عضوي والذي يمكن الكشف عنه باستعمال خلات الرصاص Lead Acetate مكونا كبريتيد الرصاص الأسود اللون وبإمكان تمثيل ذلك بالمعادلات التالية:



ان هذا الكشف يتم بوجود التسخين وان تكون راسب اسود في قعر انبوبة الاختبار دلالة على وجود الكبريت في السستائين وكذلك السيستين ان هذا الكشف يتم بسهولة لهذين الحامضين الامينيين وبإمكان القول ان الكبريت الموجود في الحامضين الامينيين سستين وسستائين هو كبريت غير مستقر قلوياً، اما الكبريت الموجود في الحامض الاميني مثيونين فهو مستقر قلوياً وعلية لا يعطي راسب اسود عند معاملته بهيدروكسيد الصوديوم 40% وخلات الرصاص.

طريقة العمل

يغلى 2 مل من محلول الحامض الاميني في انبوبة الاختبار مع 1 مل من NaOH %40 لمدة دقيقتين ثم تبرد انبوبة الاختبار ويضاف 5 قطرات من محلول خلات الرصاص 2% ويغلي المزيج مره ثانية. ولاحظ تكون راسب اسود. دلالة على ان البروتينات تحتوي في تركيبها على احماض امينية حاوية على كبريت غير مستقر قلوياً

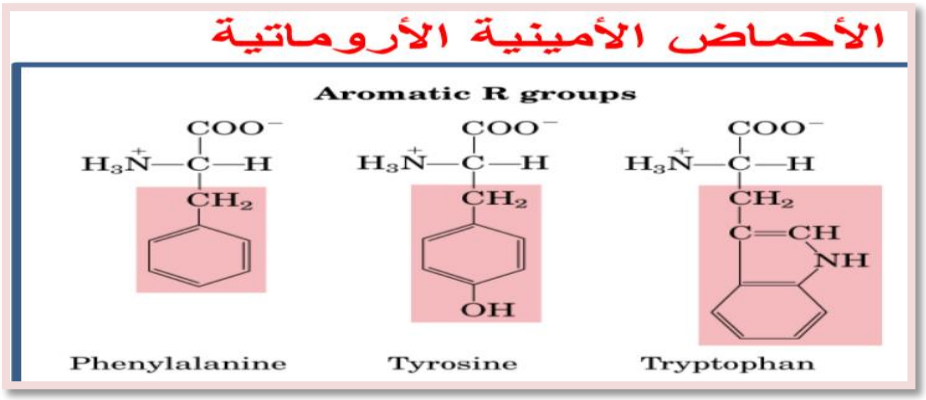
ثالثاً: الكشف عن الاحماض الامينية العطرية في البروتينات

اختبار الزانثوبروتيك Xanthoproteic test

الهدف: يستخدم هذا الاختبار للكشف عن حلقة البنزين الموجودة في الأحماض الأمينية العطرية الأروماتيه مثل التايروسين و التربتوفان .

الاساس العلمي للاختبار:

تتفاعل الأحماض الأمينية العطرية المحتوية على حلقة بنزين مع حمض النيتريك المركز HNO_3 (عند درجات حرارة عالية) خاصة التايروسين وبدرجة أقل التربتوفان مانحه إياه مشتقات نايتروجينية التي ينتج عنها ظهور لون أصفر واضح .



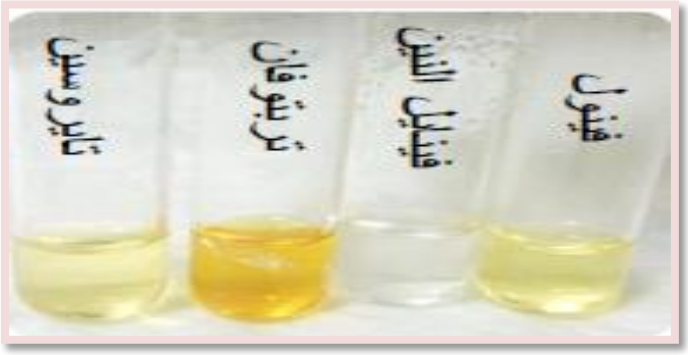
المواد:- محلول زلال البيض ومحلول من الاحماض الامينية التايروسين والتربتوفان

طريقة العمل

1- اضف 5 قطرات من HNO_3 المركز الى محلول البروتين
2- سخن لدرجة الغليان لمدة دقيقة واحدة (لاحظ اللون او الراسب الأصفر المتكون. برد الأنبوبة ثم اضف اليها قليل من محلول هيدروكسيد الصوديوم 40% ولاحظ اللون البرتقالي المتكون. ان الأحماض الأمينية التي تحتوي على حلقة اروماتية تكون مشتقات نتروجينية صفراء اللون عند معاملتها مع HNO_3 المركز اما املاح هذه المشتقات فتكون برتقالية اللون.

ملاحظات/

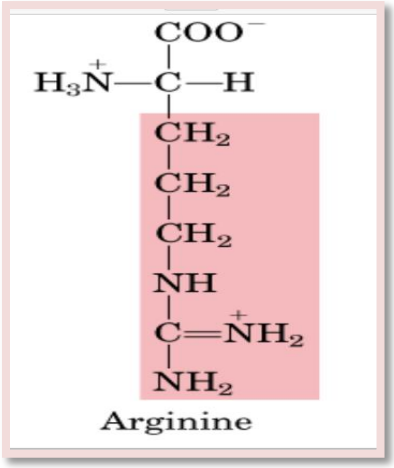
1- ان الحامض الاميني الاروماتي فنيل الانين يعطي كشف سالب مع كشف الزانثوبروتيك على الرغم من امتلاكه حلقة بنزين في تركيبة الكيميائي وذلك بسبب كون مجموعة الفنيل فيه مستقرة جداً ولا تتأثر بالحرارة.
2- لا يعد الكشف مميزاً للحوامض الامينية الاروماتية بل يكون موجب لجميع المركبات الاروماتية.
3- قد يلاحظ ظهور راسب ابيض بمجرد إضافة الحامض بسبب ترسب الميتا بروتينات (Metaproteins) في حال استعمال الالبومين Albumin اما في حالة الببتونات Peptones والبروتيوزات Proteoses فلا يظهر الراسب.
4- يعطي الجلاتين Gelatin كشفاً سالباً او ضعيفاً لقلة الحوامض الامينية الاروماتية فيه.



رابعاً : الكشف عن الاحماض الامينية القاعدية في البروتينات

اختبار زاكا كوجى Sakaguchi test

الهدف: هو اختبار خاص يكشف عن مجموعة الكوانيدين (Guanidine) والتي تشكل جزء من الحامض الأميني ارجنين (Arginine) وجميع البروتينات الحاوية له حيث يتم التعرف على هذا الحامض و تمييزه عن باقي الأحماض الأمينية.



Arginine

الاساس العلمي للاختبار:

تتفاعل مجموعة الكوانيدين الموجودة في حامض الأرجنين مع ألفا- نافثول بوجود الهيبو بروميت او هيبوكلوريت الصوديوم كعامل مؤكسد فيعطي معقد ذو لون أحمر غامق يدل على وجود هذه المجموعة وبالتالي وجود الحامض الأميني Arginine.

المواد: - محلول زلال البيض،حامض ارجنين ، كلايسين، هستدين، محلول هيدروكسيد الصوديوم40%، ماء البروم(الهيبوبرومايت) 1% (او استخدم هايبوكلورايت الصوديوم 10%) حسب توفرها في المختبر، الفا-نفثول الايثانولي تركيزه 1%

طريقة العمل

1- ضع في أنبوبة 2 مل من محلول الحامض الأميني.

2- أضفْ 1 مل من هيدروكسيد الصوديوم 40% ثم رج جيداً.

3-أضف 2-3 قطرات من محلول ألفا-نفثول الكحولي.

4-أضف الى المحلول قطرتين من ماء البروم (او استخدم هايبوكلورايت الصوديوم) ولاحظ تكون اللون الأحمر دلالة على وجود الارجنين .

ملاحظة/ ان هذا الكشف من الدقة والحساسية بحيث يمكن اعتباره كشفا عاما للبروتينات لان جميع البروتينات المعروفة تحتوي على الحامض الاميني الارجنين والحاوية على جذر الكوانيدين بالقدر الكافي لإعطاء كشف موجب.

خامساً: ترسيب البروتينات

1- ترسيب البروتينات باملاح الفلزات الثقيلة (الايونات الموجبة)
Precipitation of proteins by Salt of Heavy Methods

تعتمد فكرة الترسيب على إضافة محلول فلز ثقيل (مثل خلات الرصاص وكلوريد الزئبقيك و كبريتات الخارصين وكلوريد الحديديك وكلوريد الخارصين وكبريتات الحديديك) الى محلول البروتين الحامل لشحنة سالبة (نتيجة معاملته بقاعدة) وترسيبه على شكل بروتينات الفلز Metal proteinate حيث يعادل الايون الموجب الشحنة السالبة على جزيئة البروتين فيرسبها.

طريقة العمل:-

1- يوضع 3 مل من محلول زلال البيض في أربعة انابيب اختبار ثم يضاف الى :
- الانبوبة الأولى: 5 قطرات من محلول كلوريد الزئبقيك 1%.
- الانبوبة الثانية: 5 قطرات من محلول نترات الفضة 1% .
- الانبوبة الثالثة : 5 قطرات من محلول خلات الرصاص 1%.
- الانبوبة الرابعة : 5 قطرات من محلول كبريتات النحاس 1%.

2- يلاحظ لون الراسب المتكون في كل انبوبة اختبار.

ملاحظة/ ان ترسيب البروتينات بهذه الطريقة أهمية مميزة اذ انه في حال حدوث تسمم بواسطة احدى هذه الفلزات (خصوصا للعاملين في مصافي النفط ومعامل البطاريات) فيمكن استخدام زلال البيض او الحليب كترياق حيث يرسب الفلز الثقيل مع البروتين ويحول دون امتصاصه، مع مراعات وجوب التقيؤ مباشرة للتخلص من المعادن الثقيلة وذلك لإمكانية تحلل البروتينات الحاوية على العناصر الثقيلة داخل المعدة مرة ثانية.

2- ترسيب البروتين بحامض النتريك المركز (كشف هيلر)
Precipitation by Conc. HNO_3 (Heller Test)

عند إضافة حامض معدني مركز الى محلول البروتين يؤدي ذلك الى تغيير جوهر البوتين الطبيعي فيترسب نتيجة لذلك ولا يمكن اذابته مره ثانية. يوضع 3 مل من حامض النتريك المركز في انبوبة اختبار ويضاف بحذر على جدار الانبوبة الداخلي من محلول زلال البيض حيث يلاحظ الحلقة البيضاء من راسب البروتين المتكون بين طبقتي المحلول.

3- الترسيب بواسطة المذيبات العضوية اللاقطبية (الترسيب بالكحول).

تترسب البروتينات بواسطة الكحول لكون الكحول اكثر ذوباناً في الماء من البروتين حيث لا يبقي كمية كافية من الماء لذوبان البروتين.

المواد والكواشف

1- زلال البيض
2- كحول اثيلي 95% (مركز)

طريقة العمل :-

اضف بضع قطرات من الكحول الاثيلي 95% الى 1 مل من محلول زلال البيض ولاحظ تكون راسب ابيض.

ملاحظات/

1- الكحول لا يرسب البروتين ترسيب كاملا.
2- بعض البروتينات مثل الكلياديات (البرولامينات) لا تترسب بالكحول وذلك لأنها تذوب في الكحول.