طرق تقدير البروتين في الحليب protein determination

تقدير البروتين الكلي Total Protein content

أن مهمة المحلل الغذائي غالبا ما تنحصــــر في معرفة كمية البروتين الكلية للغذاء بغض النظر عن كون هذا البروتين من نوع واحد أو مزيجا ولتحقيق هناك طرق مختلفة في **تحضـــير النموذج الغذائي** للتحليل منها عملية الهرس بالهاون والطواحين وأجهزة التجنيس أو باســـتعمال طرق أخرى في تفكيك خلايا الأنســـجة كالتجميد و الانصـــهار أو باســـتعمال مصـــادر اهتزازية معينه أما **الاســـتخلاص** فيتم باســتعمال المحاليل المحلية المخففة أو المحاليل العضـــوية أو ماء ويتم تنقيه باســـتخدام طرق **تنقية الترشـــيح الهلامي والتبادل الايوني** والتأكد من درجة نقاوة البروتين المستخلص باستعمال **طرق الهجرة الكهربائية (Electrophoresis)** وهناك طرق مختلفة .

1- تقدير النايتروجين البروتيني Nitrogen Determination

تعتمد على كمية N_2 في النموذج وهي تفترض بأن هذه كمية من N_2 في البروتينات الأغذية هي عموما متشـابهة وتبلغ(16%) بعد معرفة كمية N_2 تضـــرب هذه النتيجة في العامل البروتيني وهو **6.25** وتســـتثنى بعض المواد الأخرى مثل الألبان (6.38) والحبوب (5.7) لكي نحصـــل على كمية البروتين في الغذاء ومن الطرق الشـــائعة في تقدير النايتروجين هي

أ- طريقة دوماس Dumas Method

تعتمد هذا الطريقة بالأســـاس على تحطيم النموذج الغذائي الممزوج مع أوكســـيد النحاس على درجة حراره C° (700-750) والحصـــول على النـــايتروجين المتحرر مبـــاشـــرة حيث يمكن قيـــاس حجمـــه بواســـطـــة نايترومتر Nitrometer

ب- تقدير البروتين الخام – بطريقة كلدال Kjeldahl Method

تشتمل طريقة كلدال على أكسدة المواد العضوية وهضمها بواسطة الحامض وتحويل النيتروجين إلى أمونيا. تتفاعل الأمونيا مع الزائد من الحامض لتكون كبريتات الأمونيوم. يحول الوسط إلى قلوي بإضـافة هيدروكسـيد الصـوديوم وتمتص الأمونيا المتحررة في حمض بوريك وتعاير مع حمض الهيدروكلوريك القياسي.

حيث هنالك ثلاث مراحل لتقدير البروتين بطريقة كلدال

1. مرحلة الهضم Digestion:

$$\text{Protein} + H_2SO_4 \xrightarrow{370\text{-}410\ C/\text{الهضم}} Co_2 + H_2O + SO_2 + NH_4^+$$

$$NH_4 + H_2SO_4 \longrightarrow (NH_4)_2SO_4 + H_2$$

2. مرحلة التقطير Distilation :

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

$$NH_4OH \longrightarrow NH_3 + H_2O$$

$$NH_3 + H_3BO_3 \longrightarrow NH_4^+ + H_2BO_3^-$$

جذر البورات او ملح البورات

3. مرحلة التسحيح Titration:

$$NH_4^+ + H_2BO_3^- + HCl \longrightarrow NH_4Cl + H_3BO_3$$

المواد و الأجهزة المستخدمة

أ- وحدة هضم وتقطير
ب- دوارق كلدال.
ت- عامل مساعد (Catalyst)
ث- حمض الكبريتيك المركز
ج- محلول هيدروكسيد الصوديوم (46%).
ح- محلول حمض البوريك 2%
خ- مخلوطد الدليل: أزرق الميثلين مع أحمر الميثيل (0.25 غم أزرق الميثلين + 0.375 غم أحمر الميثيل مذابة في 300مل كحول إثيلي 95%).
د- حمض الهيدروكلوريك القياسي (0.1ع).

طريقة العمل :

1. نزن 1-2 غم من العينة ثم تلف بورق ترشيح تنقل الى دورق كلدال سعة 100مل ويضاف الى الدورق العامل المساعد (Catalyst) وهو عبارة عن خليط من 9 غم كبريتات البوتاسيوم او الصوديوم للامائية مع 1 غم كبريتات النحاس) ثم يضاف 25مل من حامض الكبريتيك المركز.
2. يوضع الدورق على مصدر التسخين ويبدأ بالتسخين بصورة تدريجية الى أن تهضم معظم المادة ثم تزيد التسخين وتستمر على ذلك الى ان تتحول جميع محتويات الدورق الى مادة عديمة اللون او ازرق فاتح او مخضر .
3. يبرد الدورق ويضاف له 200 مل من الماء المقطر لغسل عنق الدورق ولضمان نزول المواد العالقة فيه واذابة المواد الصلبة أذا كانت موجودة.

Alaa R. Al-Asadi

1. يجعل المحيط قاعدياً باضافة 40-50 مل من محلول 46 % هيدروكسيد الصوديوم ثم يتم التقطير حيث تستقبل الامونيا في 40-50 مل من حامض البوريك تركيز 2% مضـــافاً اليه بعض قطرات (4-5) من دليل المثيل الأزرق والمثيل الأحمر
2. يثبت دورق الهضم على جهاز التقطير ويوصل بالمكثف
3. يقلب دورق الهضـــم بهدوء لخلط محتوياته ثم يبدأ التســـخين إلى الغليان (بهدوء في البداية) حتى جمع حوالي 150مل في دورق الاستقبال.
4. يسحح المتقطر مع محلول مخفف من حامض HCl تركيز 0.1 عياري لحين الوصول الى نقطة انتهاء التفاعل.
5. تجرى تجربة ضابطة (Blank) وذلك بوضع ورقة ترشيح فارغة في دورق الهضم بدل الورقة المحتوية على العينة.
6. تحسب نسبة النتروجين ومن ثم نسبة البروتين من المعادلة التالية .

$$\text{Total } \boldsymbol{N}\% = \frac{(Ml\ of\ \boldsymbol{HCl}\ for\ sample - Ml\ of\ \boldsymbol{HCl}\ for\ Blank) \times \boldsymbol{N} \times \boldsymbol{N}\ \text{وزن الملي مكافئ}}{Wt.of\ sample\ (mg)} * 100$$

وزن الملي مكافئ للنتروجين = 0.014

N = عيارية حامض HCl (0.1)

Protein% = Total N% × 6.38

عيوب طريقة كلدال

1- أن حســـاب البروتين علي أنة النيتروجين مضـــروبا في 6.25 فيه خطا قد يكون كبير في بعض الأحيان فالمواد الغذائيـة تحتوي علي مواد ازوتيـة غير بروتينيـة مثـل الامونيـا والأحمـاض الامنيـة قـد تحتوي علي 80 % نيتروجين وبهذا قد يختل تقدير البروتين بطريقة كلدال لمثل هذه المواد.

2- البروتينات المختلفة لا تحتوي علي 16 نيتروجين بل تختلف النسبة اختلافا كبيرا في أنواع البروتينات المختلفة فالبروتين الحيواني يحتوي علي 16.67 % نيتروجين والكازين يحتوي علي 15 % نيتروجين أما البروتينات النباتية فقد تحتوي علي 16.4 إلي 18.7 % نيتروجين وحتى البروتين الواحد تختلف نسبة البروتين فيه ففي الكازين تختلف النسبة من 14.7 إلي 16.04 % علي حسب تصحيح التقدير بالنسبة للرطوبة أو الرماد

Alaa R. Al-Asadi

3- يعتري تقدير البروتين الكلي بطريقة كلدال صعوبات جوهرية أهمها تحديد أحسن العوامل المساعدة وبأفضل النسب وأفضل مده للهضم بحيث لا تؤدي إلى أخطا ء كبيرة.

2- الطرق الطيفية Spectrophotometric method

تمتاز غالبية البروتينات بأظهار خاصية الامتصاص العالي للأشعة فوق البنفسجية على طول موجي قدره **280** نانوميتر وان مقدار هذا الامتصاص يتوقف على كمية بعض الحوامض الأمينية ذات المجاميع الحلقية مثل (التايروسين و التربتوفان و والفنيل الينين) بواسطة جهاز Spectrophotometer بينما يستعمل أطوال موجية بين(400-700) نانوميتر في تقدير بعض البروتينات الملونه والتي تسمى (Chromoproteins) كهيوكلوبين الدم .

3- **تقدير البروتين بطريقة لونية**

أ- طريقة برادفورد Bradford Method

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

ب- طريقة البايوريت Biuret Method

تعتمد أساس هذه الطريقة على أن المركبات التي تحتوي على أواصر ببتيديا Peptide Bonds عددها من أثنان أو أكثر تكون معقدا ذو لون أرجواني أو بنفسجي عندما تتحد هذه الببتيدات مع الأملاح النحاس في وسط محلول قاعدي وهذا اللون يمكن قياسه بجهاز Colorimeter.

ت- طريقة الفورمالين Formaldehyde or Formalin Method

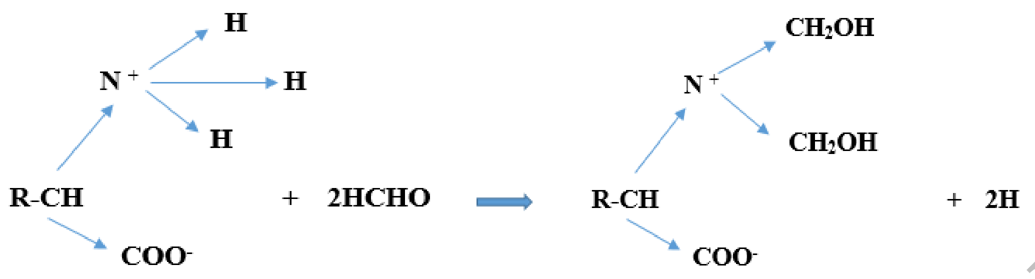
وهي طريقة تسحيحية سهلة وسريعة يمكن استعمالها للتقديرات التقريبية للبروتين

أساسها العلمي :

يعتمد أساسها العلمي على السلوك المتذبذب للأحماض الامينية نظرا لاحتوائها على مجموعة قاعدية وأخرى حامضية وبالتالي يسلك البروتين سلوك الحامض والقاعدة .

عند إضافة الفورمالد يهايد الى محلول يحتوي على البروتين سيرتبط بمجموعة الفا امين NH2 وهي موجودة فقط في احدى نهايتي السلسلة الببتيدية ونتيجة لهذا الارتباط تتحرر ايونات الهيدروجين من مجموعة الأمين ال محلول فترتفع حموضة الوسط .

Alaa R. Al-Asady



ان مقدار الارتفاع في الحموضة يتناسب مع عدد مجاميع الأمين فكلما كانت الحموضة اكثر دل ذلك على ارتفاع عدد هذه المجاميع في المحلول وهذا دليل على ارتفاع كمية البروتين .

طريقة العمل :

1. يؤخذ 10مل من الحليب بواسطة ماصة وينقل الى دورق مخروطي ثم يضاف له 1مل من دليل الفينولنفثالين 1% ثم يضاف 0.4 مل من محلول أوكزلات البوتاسيوم المشبع وهي مادة حاملة تمنع ترسب الكازين ويترك المزيج لمدة دقيقتين.
2. يسحح المزيج مع محلول 0.1 عياري هيدروكسيد الصوديوم لحين الوصول الى لون الوردي.
3. يضاف للمزيج 2 مل من الفورمالين ثم يعاير مع محلول 0.1 عياري هيدروكسيد الصوديوم لحين الوصول الى نفس اللون السابق.
4. يهمل حجم هيدروكسيد الصوديوم في المعايرة الاولى ثم يسجل حجم هيدروكسيد الصوديوم اللازم للمعايرة الثانية.
5. تجري التجربه على (البلانك)Blank بأخذ 2 مل من الفورمالين ويضاف لها 10مل ماء مقطر ويضاف 1مل من دليل الفينولنفثالين ثم يعاير مع محلول 0.1 عياري هيدروكسيد الصوديوم ويسجل حجم القاعدة ثم تطبق المعادلة التالية:

Protein % = ml of NaOH (0.1N) for sample - ml of NaOH (0.1N) for Blank × 1.7

في المرحلة الأولى تسحح عينت الحليب مثلا مع هيدروكسيد الصوديوم 0.1 اعياري وبوجود دليل الفينولفثالين حتى يتغير اللون الى الوردي وبذلك نتخلص من الحموضة الطبيعية للحليب .

وفي المرحلة الثانية يضاف الفورمالين فيلاحظ اختفاء اللون الوردي مما يدل على ارتفاع حموضة الحليب بسبب ايونات +H من البروتين فيجرى تسحيحها مرة أخرى حتى ظهور اللون الوردي من جديد ويكون حجم القاعدة في التسحيح الأخير هو المهم في حساب نسبة البروتين

Alaa R. Al-Asady