يجب أن تأتي 10-35% من السعرات الحرارية من البروتين. يوجد البروتين في اللحوم والدواجن والأسماك وبدائل اللحوم والأجبان والحليب وما إلى ذلك. تحتوي البروتينات على الكربون والهيدروجين والأكسجين والنيتروجين والفوسفور والكبريت في بعض الحالات. البروتينات جزيئات بيولوجية كبيرة من الأحماض الأمينية ألفا.

البروتين عنصر غذائي أساسي وهام للبقاء على قيد الحياة. وهو مكون رئيسي للخلايا، وبالتالي يوجد في جميع الكائنات الحية. تحتوي الخلايا على أكثر من 3000 بروتين مختلف تؤدي أدوارًا هيكلية ووظيفية متنوعة في الخلية.

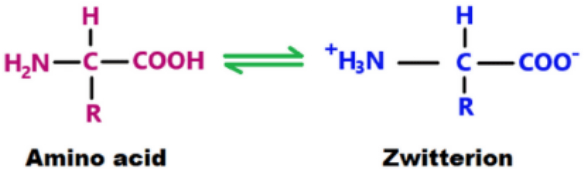
Experiment 4
Qualitative Determination of Protein and amino acids

Protein is an important macronutrient essential for survival. They are an important constituent of cells and hence are present in all living bodies. Cells contain more than 3000 different proteins that play a variety of structural and functional roles in the cell.

10-35% of calories should come from protein. Protein is found in meats, poultry, fish, meat substitutes, cheeses, milk etc. They contain carbon, hydrogen, oxygen, nitrogen, phosphorus and Sulphur in some cases. Proteins are large biological molecules of alpha-amino acids.

Amino acids are the main building blocks of proteins. They are relatively small molecules that characterized by presence of **α-amino group, carboxylic group and a unique R group**. the amino group is attached to alpha carbon, which are crystalline in nature and exist as zwitterions (it has both positive and negative)

الأحماض الأمينية هي اللبنات الأساسية للبروتينات. وهي جزيئات صغيرة نسبيًا تتميز بوجود مجموعة أمينية ألفا ومجموعة كربوكسيل ومجموعة R فريدة. ترتبط المجموعة الأمينية بذرة كربون ألفا، وهي بلورية بطبيعتها وتوجد على شكل أيونات ثنائية القطب (لها شحنة موجبة وسالبة)



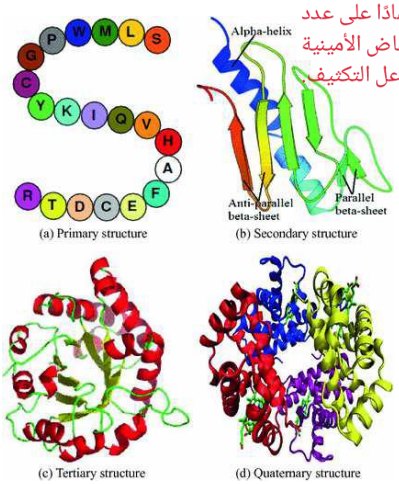
Amino acid **Zwitterion**

Although amino acids share the general structure, they differ in the polarity, size solubility and electrical charge.

على الرغم من أن الأحماض الأمينية تشترك في البنية العامة، إلا أنها تختلف في القطبية والحجم والذوبان والشحنة الكهربائية.

تُشكل الأحماض الأمينية نوعًا محددًا من الروابط يُعرف باسم الرابطة الببتيدية، حيث تخضع جزيئات الأحماض الأمينية لتفاعل تكثيف. تكثيف مجموعة ألفا كربوكسيل لحمض أميني واحد ومجموعة ألفا أمينو لحمض أميني آخر. تُصنف النواتج المتكونة على النحو التالي: اعتمادًا على عدد جزيئات الأحماض الأمينية المشاركة في تفاعل التكثيف.

Amino acids form a specific type of linkage known as **peptide linkage**, amino acid molecules undergo a condensation reaction. the condensation of the **α-carboxyl group** of one amino acid and **an α-amino group** of another. The products formed are classified as; depending on the number of amino acid molecules involved in the condensation reaction.



ثنائي الببتيد: هي نواتج تتكون من تكثيف جزيئين من حمض ألفا أميني.

Dipeptide: they are the products formed by the condensation of two molecules of alpha-amino acid.

ثلاثي الببتيد: يتكون من تكثيف ثلاثة جزيئات من حمض ألفا أميني.

Tripeptide: they are formed by the condensation of three molecules of alpha amino acid.

عديد الببتيد: إذا اتحد عدد كبير من جزيئات الأحماض الأمينية، يُطلق على الناتج المتكون اسم عديد الببتيد.

Polypeptide: If a large number of molecules of amino acids combine, the formed product is called **a polypeptide**.

Proteins differ primarily from each other in their amino acid sequence. There are about 20+ amino acids here. Some amino acids are not produced by the body and are delivered by diet. They are called amino acids, which are **essential**.

تختلف البروتينات فيما بينها بشكل أساسي في تسلسل الأحماض الأمينية. يوجد هنا أكثر من 20 حمضًا أمينيًا. بعض الأحماض الأمينية لا ينتجها الجسم ويتم الحصول عليها من النظام الغذائي. تسمى هذه الأحماض الأمينية بالأحماض الأساسية.

Detection of Proteins:

Detection based on the following:

1. وجود رابطة ببتيدية: تفاعل البيوريت
1. Presence of peptide bond: Biuret reaction
2. The nature of protein (coagulation by heating, precipitation by strong acid and heavy metals)
2. طبيعة البروتين (التخثر بالتسخين، الترسيب بواسطة الأحماض القوية والمعادن الثقيلة)
3. Presence of certain amino acids: color reactions of amino acids
3. وجود أحماض أمينية معينة: تفاعلات لونية للأحماض الأمينية

Qualitative test

Protein

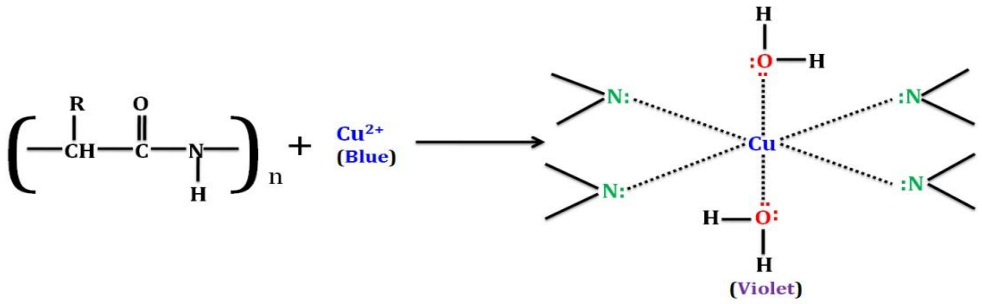
A. Biuret test

يُستخدم هذا الاختبار للكشف عن وجود رابطة ببتيدية (لا تقل عن ببتيدين). عند معالجة البروتين بمحلول كبريتات النحاس في وجود قلوي (هيدروكسيد الصوديوم أو هيدروكسيد البوتاسيوم)، يتفاعل مع أيونات النحاس (II) لتكوين مركب بنفسجي اللون يُسمى البيوريت.

This test is used to detect the presence of **peptide bond** (not less than two peptides) .

When treated with copper sulphate solution in presence of **alkali (NaOH or KOH)**, protein reacts with **copper (II) ions** to form **a violet coloured** complex called biuret.

This test is applied to gelatin, casein and albumin. يُطبق هذا الاختبار على الجيلاتين والكازين والألبومين.



ب. التمسخ الحراري:

B. Heat Denaturation:

Proteins are unequally stable when heated in aqueous solution, fractionation can be achieved by controlling heating. The presence of a substrate, a product, or an inhibitor often stabilizes a protein against heat denaturation. Denaturation consists of the unfolding polypeptide chain and loss of the compact structure. It is usually **irreversible** and can result from the application of heat, extremes of pH or the action of detergent. Denaturation therefore frequently causes **precipitation of the protein.**

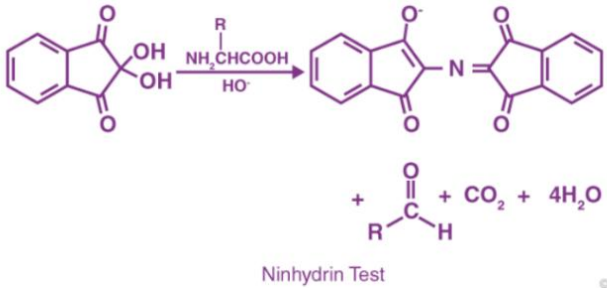
تختلف البروتينات في استقرارها عند تسخينها في محلول مائي، ويمكن تحقيق التجزئة عن طريق التحكم في التسخين. غالبًا ما يؤدي وجود الركيزة أو الناتج أو المثبط إلى تثبيت البروتين ضد التمسخ الحراري. يتكون التمسخ من فك سلسلة الببتيد وفقدان البنية المدمجة. عادةً ما يكون غير قابل للعكس ويمكن أن ينتج عن تطبيق الحرارة أو درجات الحموضة القصوى أو عمل المنظفات. لذلك، غالبًا ما يتسبب التمسخ في ترسيب البروتين.

Amino acid

A. Ninhydrin Test:

النينهيدرين عامل مؤكسد قوي، يتفاعل مع الأحماض الأمينية ألفا لإزالة الكربوكسيل من الحمض الأميني، مما ينتج عنه منتج أزرق بنفسجي شديد اللون، وثاني أكسيد الكربون، والماء، والألدهيدات المقابلة.

Ninhydrin is a powerful oxidizing agent, it reacts with **α-amino** acid to decarboxylate the amino acid yielding an intensely colored blue-purple product, CO2, water and the corresponding aldehydes.



Ninhydrin Test

© Bvius.com

Ninhydrin yields a **similar blue-purple reaction** upon reaction with **primary amines and ammonia.** The reagent also reacts with amino acids such as **proline to yield a yellow to red product**.

يُنتج النينهيدرين تفاعلًا أزرق-بنفسجيًا مشابهًا عند تفاعله مع الأمينات الأولية والأمونيا. يتفاعل الكاشف أيضًا مع الأحماض الأمينية مثل البرولين لإنتاج منتج أصفر إلى أحمر.

This test give a positive result by only amino acids and proteins which **contain free – NH2 groups (α amino group)** in their structure. Amino acid residues for which good color tests have been achieved are **arginine, cysteine, proline, hydroxyproline, tryptophan and tyrosine**. The colour intensity is proportional to the concentration of amino acid i.e. ammonia from the amino groups.

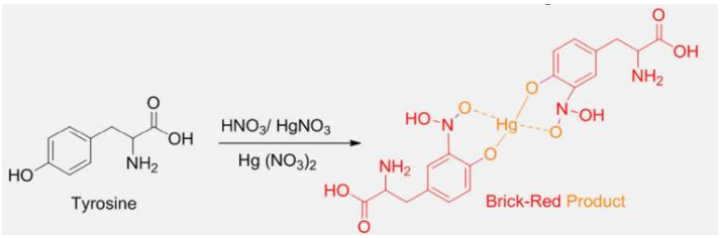
يُعطي هذا الاختبار نتيجة إيجابية فقط مع الأحماض الأمينية والبروتينات التي تحتوي على مجموعات NH2 حرة (مجموعة أمينية) في تركيبها. بقايا الأحماض الأمينية التي تم تحقيق اختبارات لونية جيدة لها هي الأرجينين والسيستين والبرولين والهيدروكسي برولين والتريبتوفان والتيروسين. تتناسب شدة اللون طرديًا مع تركيز الحمض الأميني، أي الأمونيا الناتجة عن مجموعات الأمين.

B. Millon's Test:

Millon's reagent is a concentrated HNO3 reagent that dissolves mercury.

كاشف ميلون هو كاشف HNO3 مركز يذيب الزئبق.

The test by Millon is specific to phenol that contains structures. Specific for **tyrosine** (tyrosine is the only common phenolic amino acid) and proteins containing it.



اختبار ميلون خاص بالفينول الذي يحتوي على تراكيب. خاص بالتيروسين (التيروسين هو الحمض الأميني الفينولي الشائع الوحيد) والبروتينات التي تحتوي عليه.

يُعتبر الراسب الأحمر أو المحلول الأحمر نتيجة إيجابية للتفاعل. تتداخل الأملاح غير العضوية بكميات كبيرة مع الكاشف عن طريق ترسيب الزئبق. لا يُعد راسب HgO الأصفر استجابة إيجابية، ولكنه يُشير عادةً إلى أن المحلول قلوي للغاية.

A red precipitate or a red solution is regarded as a positive test as a consequence of the reaction. Inorganic salts in large amounts interfere with the reagent by precipitating mercury. A yellow HgO precipitate is NOT a positive response, but it usually shows that the solution is too alkaline.

This test can be applied to tyrosine, phenylalanine.

يمكن تطبيق هذا الاختبار على التيروسين والفينيل ألانين.

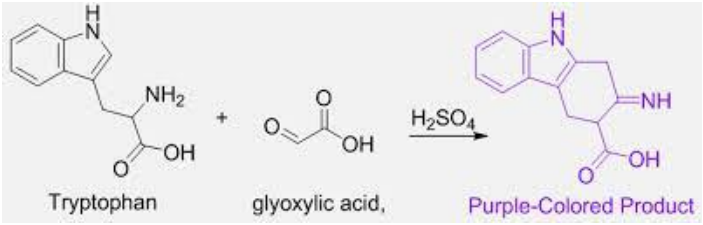
C. Hopkin's Cole Test:

اختبار هوبكنز كول هو اختبار مُحدد يُستخدم للكشف عن حلقة الإندول، وبالتالي التربتوفان في البروتينات. يُطلق على الاختبار أيضًا اسم "اختبار حمض الجليوكسيليك" لأن الكاشف يحتوي على حمض الجليوكسيليك. يتم تحضير حمض الجليوكسيليك من حمض الخليك الجليدي عن طريق تعريضه لأشعة الشمس.

Hopkin's Cole test is a specific test used for the detection of **indole ring** and thus, **tryptophan** in proteins. The test is also termed as 'glyoxylic acid test' as the reagent contains glyoxylic. Glyoxylic acid is prepared from glacial acetic acid by being exposed to sunlight acid.

In the presence of **concentrated H2SO4**, the indole tryptophan group reacts with glyoxylic acid to give a purple color. The H2SO4 added to the reagent helps to stabilize the glyoxylic acid and prevent its decomposition and the release of carbon dioxide.

في وجود حمض الكبريتيك المركز (H2SO4)، تتفاعل مجموعة التربتوفان في الإندول مع حمض الجليوكسيليك لتعطي لونًا أرجوانيًا. يُساعد حمض الكبريتيك المُضاف إلى الكاشف على تثبيت حمض الجليوكسيليك ومنع تحلله وانبعاث ثاني أكسيد الكربون.

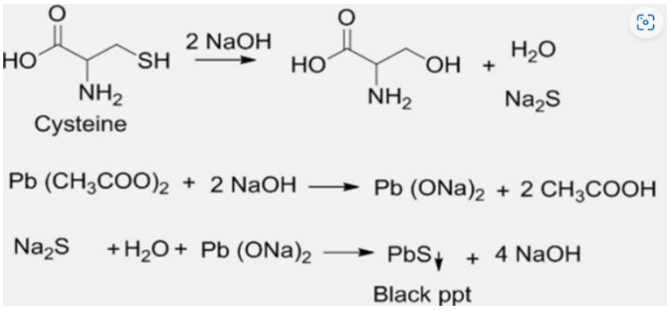


D. Lead – sulfur test

اختبار الرصاص والكبريت D.

Sulfur containing amino acids containing sulfur, S-S group in cysteine, and S-H group like cysteine and cystine on heating with **KOH**, **a black lead sulphide precipitate** is formed by reacting with lead acetate

الأحماض الأمينية المحتوية على الكبريت، ومجموعة S-S في السيستين، ومجموعة S-H مثل السيستين والسيستين، عند تسخينها مع KOH، يتكون راسب أسود من كبريتيد الرصاص عن طريق التفاعل مع أسيتات الرصاص



اختبار نيتروبروسيد خاص بالسيستين، وهو الحمض الأميني الوحيد الذي يحتوي على مجموعة سلفهيدريل (SH). تتفاعل المجموعة مع نيتروبروسيد في محلول قلوي لإنتاج مركب أحمر. مجموعة سلفهيدريل حرة (SH-) قادرة على التفاعل مع نيتروبروسيد في وجود فائض من الأمونيا (NH4OH).

E. Nitroprusside's test

The nitroprusside's test is specific for **cysteine**, the only amino acid containing a **sulfhydryl group (—SH).** The group reacts with nitroprusside in an alkaline solution to yield **a red complex.** a free sulfhydryl group (-SH) that is able to react with the nitroprusside in the presence of excess ammonia (NH4OH).

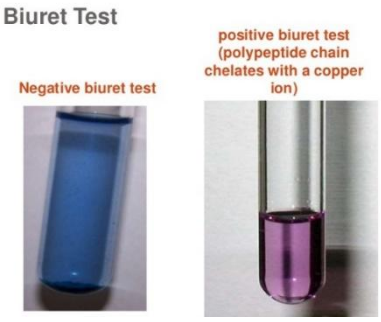
Reactions:

$$\underset{\text{Na-Nitroprosside}}{Na_2(CN)_5Fe(NO)_2H_2O} + \underset{\text{Cys}}{HS\text{-}CH_2CHNH_2COOH} \xrightarrow{NH_4OH} \text{Red complex}$$

Fig: Na-nitroprusside reaction with Cys amino acid.

الخطوات سهلة مو محتاجة ترجمة او شرح

Practical work



A. Biuret test:

1. Place 15 drops of each sample (unknown) test solution in a separate test tube.
2. add 5 drops of 20% NaOH and mix.
3. Add 2 ml of 0.2% CuSO4 solution, **warm if necessary**

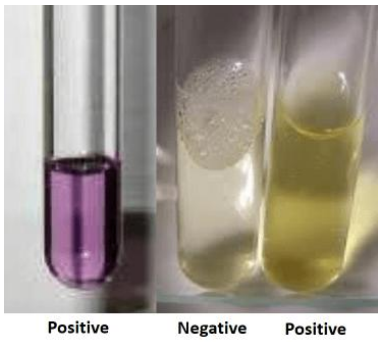
B. Heat denaturation:

Take 5 ml of each sample (unknown) test solution in a separate test tube, heat to **boiling**.

What do you observe?

C. Ninhydrin Test:

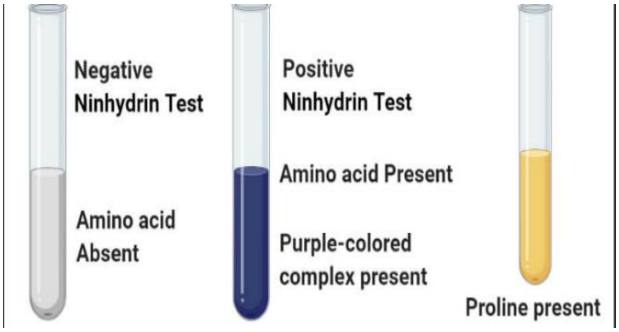
1. Take 2 ml of each sample solution in a separate test tube.
2. Add 0.5 ml of 0.1 % Ninhydrin reagent the test tubes.
3. Place the test tubes in the water bath for 5 minutes and then allow cooling to room temperature.
4. Observe the formation of a deep blue/purple colour indicates the presence of amino acids.



Result:

- ✓ blue-purple reaction
- ✓ yellow or yellow to red color

Interpretation

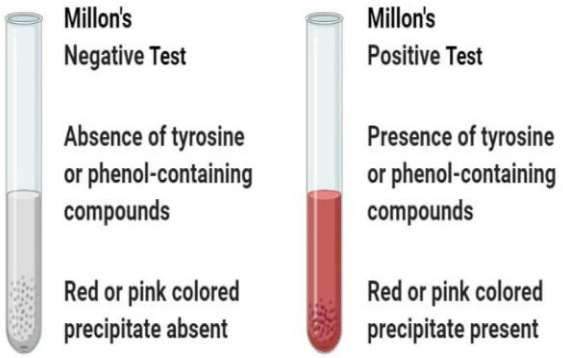


1. This reaction suggests that amino acids, other amines, and ammonia are present in the test material.
2. Negative: not a.a , not protein
3. Positive purple: aa or protein with free amino gp
4. Positive yellow: proline aa or hydroxyproline.

1. يشير هذا التفاعل إلى وجود أحماض أمينية،أمينات أخرى، وأمونيا في مادة الاختبار.
2. سلبي: ليس حمضًا أمينيًا، وليس بروتينًا
3. إيجابي بنفسجي: حمض أميني أو بروتين مع مجموعة أمينية حرة.
4. إيجابي أصفر: حمض أميني برولين أو هيدروكسي برولين.

D. Millon's test

1. Take 2 ml of each sample solution or unknown solution is taken in a seperate test tube.
2. To this, about 2 ml of Millon's reagent is added. Observe the formation of red brick precipitate
3. if red colored precipitate is not observed immediately. the test tubes are then kept in the water bath for about 2 minutes The tubes are then observed for the formation of the colored precipitate.



نتيجة إيجابية: تُثبت النتيجة الإيجابية في اختبار ميلون بتكوّن راسب أحمر أو وردي اللون. وهذا يدل على وجود التيروسين أو بروتين يحتوي على التيروسين.

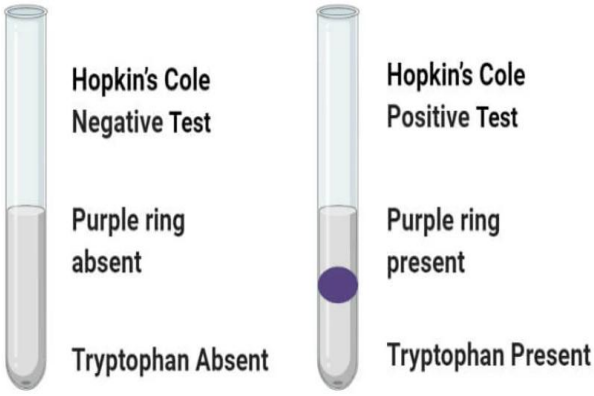
Positive result: A positive result in the Millon's test is demonstrated by the formation of a red brick or pink colored precipitate. This indicates the presence of tyrosine or tyrosine containing protein.

Negative result: A negative result in the Millon's test is demonstrated by the absence of colored precipitate in the test tube. This indicates the absence of tyrosine or tyrosine-containing protein.

نتيجة سلبية: تُشير النتيجة السلبية في اختبار ميلون إلى عدم وجود راسب ملون في أنبوب الاختبار. وهذا يدل على عدم وجود التيروسين أو البروتين المحتوي على التيروسين.

E. Hopkins-Cole test

1. In two separate test tubes, take 2 ml of Hopkins-Cole reagent and 2 ml of each sample liquid are taken.
2. To this, concentrated H_2SO_4 is added along the sides of the test tube held at a slanting position. Two distinct layers of liquid are to be formed without mixing. (*Note: Mouth of the tube must point away from the face, as we should be careful while adding the sulfuric acid.*)



3. The test tube should be observed for the formation of a purple colored ring at the interface of two layers.

نتيجة إيجابية: تتمثل النتيجة الإيجابية في تكوّن حلقة بنفسجية اللون عند نقطة التقاء طبقتين. يشير هذا إلى وجود بروتينات تحتوي على التربتوفان.

Interpretation of result

Positive result: A positive result is represented by the formation of a purple-colored ring at the junction of two layers. This indicates the presence of tryptophan-containing proteins.

Negative result: A negative result is represented by the absence of a purple-colored ring in the test tube. This indicates the absence of tryptophan-containing proteins.

نتيجة سلبية: تتمثل النتيجة السلبية في عدم وجود حلقة بنفسجية اللون في أنبوب الاختبار. يشير هذا إلى عدم وجود بروتينات تحتوي على التربتوفان.

F. Lead sulfur test

1. In two separate test tubes, place 2 ml of sample solution add 2 ml of 20% NaOH and boil for a minute.
2. Cool it and add a drop of 20 % lead acetate solution.
3. Observe the formation of black lead sulfide precipitate.

Note: Carry out this test in the hood if possible.

Positive test: Formation of black precipitate indicate the presence of sulfur-containing amino acid.

نتيجة إيجابية: يشير تكون الراسب الأسود إلى وجود حمض أميني يحتوي على الكبريت.

Negative test: No formation of black precipitate indicates the absence of sulfur-containing amino acid.

نتيجة سلبية: عدم تكون الراسب الأسود يدل على عدم وجود حمض أميني يحتوي على الكبريت.

G. Nitroprusside test:

1. In two separate test tubes, place 2 ml of sample solution.
2. Add 0.5 mL nitroprusside solution and shake thoroughly.
3. Add 0.5 mL of 20% Sodium hydroxid .
4. Observe the color change.

Result interpretation

Positive test: Formation of red color indicate presence of cysteine.

Negative test: No formation of red color indicates absence of cysteine.

اختبار إيجابي: يشير ظهور اللون الأحمر إلى وجود السيستين.
اختبار سلبي: يشير عدم ظهور اللون الأحمر إلى عدم وجود السيستين.