Mesop. J. Mar. Sci., 2009, 24 (2): 140 - 147

استخلاص وتشخيص البروتينات الكلية وبعض الحوامض الامينية من الطحلب الأخضر *Cladophora crispata* (Chlorophyta)

احمد محسن عذبي[1]، داود سلمان علي[2] و أنفال نوري[1]

[1]قسم علوم الحياة، كلية التربية، [2]قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة البصرة، العراق

المستخلص تناولت الدراسة الحالية تحديد محتوى طحلب *Cladophora crispata* من البروتينات الكلية واستخلاص وتشخيص بعض الحوامض الامينية في الطحلب بعد عزله من قناة شط العشار وتنقيته وزراعته تحت ظروف مختبرية تمثلت بدرجة حرارة 25 ± 2 درجة مئوية وشدة إضاءة تراوحت بين 130 - 136 مايكرأنشتاين/م^2/ثا ولمدة 16:8 ساعة إضاءة: ظلام باستعمال المزارع الثابتة واستعمل الوسط الزرعي Chu-10 المحور لهذا الغرض. بينت النتائج إن محتوى الطحلب من البروتينات الكلية بلغ 40.3 %. أظهر اختبار طيف الأشعة فوق البنفسجية امتلاك المستخلص البروتيني للطحلب حزمة امتصاص واحدة عند الطول الموجي 230 نانومتر وبامتصاصية مقدارها 2.9. تم تحديد بعض الحوامض الامينية فيه والتي تضمنت الاسبارتيك والفينايل ألانين والتربتوفان.

المقدمة

حظيت الطحالب باهتمام واسع لمعرفة تركيبها الكيميائي وخصائصها الفسلجية وتزامن ذلك مع تطور تقنيات التحليل الكيميائي وان من أهم المركبات الكيميائية ذات القيمة الغذائية هي البروتينات (Venkatarman,1988). وتأتي أهمية بعض الطحالب الدقيقة من الناحية الغذائية كونها تحتوي على 50-70 % بروتين و 60 % من الأحماض الامينية الأساسية مقارنة مع الخضروات والنباتات النجيلية منها فول الصويا فضلاً عن الحليب ولحوم البقر كما أنها غنية بمعظم الفيتامينات وتفوق البيض في أغلبها كما تحتوي على تركيز عال من البيتا كاروتين (Venkatarman, 2003; Zvicohen,1996; الركابي، 2003 ; الجعفر، 2004).

وهناك العديد من العوامل التي تحدد المحتوى البروتيني في الطحالب منها عمر المزرعة والوسط الذي تعيش فيه الطحالب من حيث وفرة المغذيات ووقت الحصاد وطول فترة الإضاءة (Aaronson and Dubinsky,1997)، وقد أظهرت دراسة (Falquef, 1997) إن نسبة البروتين تعتمد على وقت الحصاد بالنسبة للطحالب وعلى طول الفترة الضوئية حيث سجلت أعلى قيم للمحتوى البروتيني في طحلب *Spirulina* في الوقت المبكر من الحصاد مقارنة مع حصاده في وقت متأخر. تشير الدراسات إلى أن هناك العديد من الطحالب الخضر غنية بالحوامض الامينية المهمة فقد أشارت دراسة Bremner (2001) حول محتوى طحلب *Cladophora glomreta* من الأحماض الأمينية لوحظ إنه يحتوي على الكلوتاميك والبروتين والاسبارتيك والسيستين. إن طحلب *Enteromorpha linza* يحتوي على 15 حامض أميني وكانت نسبة الحوامض الامينية المتمثلة بالالانين والليوسين وحامض الاسبارتك وحامض الكلوتامين والكلايسين والهستدين عالية أما السيستين والأيزوليوسين والبرولين فكانت واطئة (Ckekoi *et al*., 1971). وأوضح (Heiba *et al*., 1993) إن طحلب*Cladophora serioides* يحتوي على المثيونين والفالين والثيريونين والآيزوليوسين والثايروسين والآرجنين.

ونظراً لما تحويه الطحالب الدقيقة ومنها طحلب *Cladophora crispata* من قيمة غذائية عالية متمثلة بالبروتينات والحوامض الامينية أرتئينا أن نقوم بتحليل هذا الطحلب ومعرفة المحتوى البروتيني له واستخلاص وتشخيص بعض الأحماض الأمينية بواسطة الطرق التشخيصية المتوفرة لدينا.

المواد وطرق العمل

جمعت عينات المياه من قناة العشار التي تمر وسط مدينة البصرة وبصورة عشوائية، استعملت قناني بلاستيكية نظيفة محكمة الغلق سعة 500 سم^3 أعدت لهذا الغرض، جلبت بعد ذلك إلى المختبر مباشرة لغرض التحري عن النوع الطحلبي المراد عزله وتشخيصه وهو الطحلب الأخضر *Cladophora crispata*.

عزل الطحلب وتشخيصه:

لغرض الحصول على عزلة طحلبية تم ترشيح حجم معين من المياه المجلوبة من القناة باستعمال أوراق الترشيح millipores ذات فتحات قطرها 0.45 مايكرومتر، ثم وضعت هذه الأوراق في حجم قليل من الماء المقطر (5-10 سم^3) وفحصت تحت المجهر الضوئي المركب نوع (Bausch and Lomb) وذلك من خلال تحضير الشرائح المجهرية ولغرض الحصول على عزلة وحيدة الطحلب اعتمدت طريقة التخطيط Streaking method للوسط الزرعي الصلب وطريقة التخفيف Dilution method والموضحتان من قبل (Stien, 1973) بعدها صنف الطحلب اعتماداً على المصادر التصنيفية ; Desikachary (1959) ; Prescott (1975) Bourrely (1980).

استزراع الطحلب:

بعد عملية التشخيص للطحلب تم نقله إلى الوسط السائل بواسطة ماصة معقمة أو من الوسط الصلب بواسطة اللاقح المعقم أو من كلا الوسطين إلى عدد من الدوارق الزجاجية المعقمة حجم 100 سم^3 يحتوي كل دورق على 70 سم^3 من الوسط الزرعي المعقم (Chu-10) (Chu, 1942) وأغلقت فوهات الدوارق بالقطن المعقم ونقلت إلى كابينة النمو تحت درجة حرارة 25 ± 2 درجة مئوية وشدة إضاءة تراوحت 150 - 130 مايكروانشتاين م^2/ثا ولمدة 16:8 ساعة إضاءة: ظلام بعدها رجت المزارع وغيرت على الأقل مرتين يومياً لمنع تسرب أو تجمع الطحلب على الجدران والتقليل من فرق الإضاءة واستمرت عملية الزرع لحين الحصول على نمو جديد.

تنقية العزلات:

تم تنقية الطحلب المعزول من الجراثيم حيث اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل(1984) Weideman *et al.* إذ غسلت الطحالب بالماء المقطر المعقم ثم نبذت مركزياً بسرعة 3000 دورة/دقيقة ولمدة 50-90 ثانية، أهمل الراشح وأعيد مزج الراسب بالماء المقطر المعقم مرة أخرى، كررت العملية 12 مرة على الأقل وزرع جزء من الراسب في الوسط الزرعي المعقم لغرض تنشيط النمو وللتأكد من نقاوة العزلة أتبعت الطريقة الموضحة من قبل (Stein 1973) والمتضمنة الفحص المجهري للعزلة بعد زرعها على وسط الآكار المغذي. حضنت بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 18 ساعة للتأكد من نقاوتها ولاختبار خلو المـــــزرعة

من الجراثيم كررت العملية عدة مرات إلى أن ثبت عدم وجود نمو للجراثيم على سطح الوسط المغذي مما أعطى الدليل على نقاوة العزلة الطحلبية وبهذا تم الحصول على عزلة نقية.

تقدير معدل النمو:

أتبعت الطرق القياسية الموضحة في Stein (1973) لتقدير النمو حيث قيست كثافة الخلايا من خلال الكثافة الضوئية باستعمال جهاز المطياف الضوئي نوع (Uviko810) عند طول موجي 650 نانومتر. وعبر عن معدل النمو بثابت النمو (K) والذي قدر حسب معادلة Fogg (1975) التالية:

$$K = Log\ Nt - Log\ No / t$$

حيث K = معدل النمو (ثابت النمو). Nt = المحصول بعد t يوم. No = المادة الطحلبية عند بداية التجربة.

t = الوقت بالأيام.

أما بالنسبة لوقت التضاعف (G) فقد حسب وفق المعادلة التالية:

$$G = 0.301 / K$$

إكثار العزلة وحصادها:

استعملت دوارق زجاجية جافة ونظيفة سعة لترين، أضيف لكل دورق 1.4 لتر من الوسط الزرعي المعقم ولقح كل دورق بـ 140 سم^3 من المزرعة وفي الطور اللوغاريتمي للحصول على كميات كافية من الكتلة الحية وتحت ظروف الزرع المذكورة، حصد الطحلب على مرحلتين الاولى عند نهاية الطور اللوغاريتمي والثانية عند منتصف الطور المستقر وباستعمال جهاز الطرد المركزي (Baird and Tatlock IV) بسرعة 3000 دورة/دقيقة ولمدة 15 دقيقة بعدها جفدت العينات بجهاز التجفيد Freezing dried نوع LABConCO 18, ثم حفظت في درجة حرارة – 18 درجة مئوية لحين إجراء الاختبارات الخاصة بمحتوى الطحلب من البروتينات الكلية والأحماض الامينية.

تقدير البروتينات الكلية:

أتبعت طريقة Harborne (1984) في استخلاص البروتينات الكلية.

مطياف الأشعة تحت الحمراء Infra red Spectrum (IR):

مزجت كمية من المادة المستخلصة (البروتينات) جيداً مع كمية قليلة من بروميد البوتاسيوم (KBr) analar وضغطت بشكل أقراص صغيرة ووضعت في جهاز مطياف الأشعة تحت الحمراء وسجلت الامتصاصية وأن نوع الجهاز المستعمل كان FT-IR-84005, SHIMADZ- Japan (Silverstein *et al.*,1981).

مطياف الأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet Spectrum (UV):

قيس طيف الأشعة فوق البنفسجية للبروتينات الكلية المستخلصة باستعمال جهاز الأشعة فوق البنفسجية نوع PCTROSCAN 80D وللمدى ما بين 200-400 نانومتر باستعمال الماء المقطر كمذيب (Silverstein *et al.*, 1981).

قياس درجة الانصهار Melting point measurement:

قيست درجة الانصهار للبروتين المستخلص من الطحلب وذلك بوضع كمية من المادة المستخلصة في أنبوبة شعرية مسدودة من أحد طرفيها ثم وضعت في جهاز قياس درجة الانصهارElectrothermel melting point apparatus.

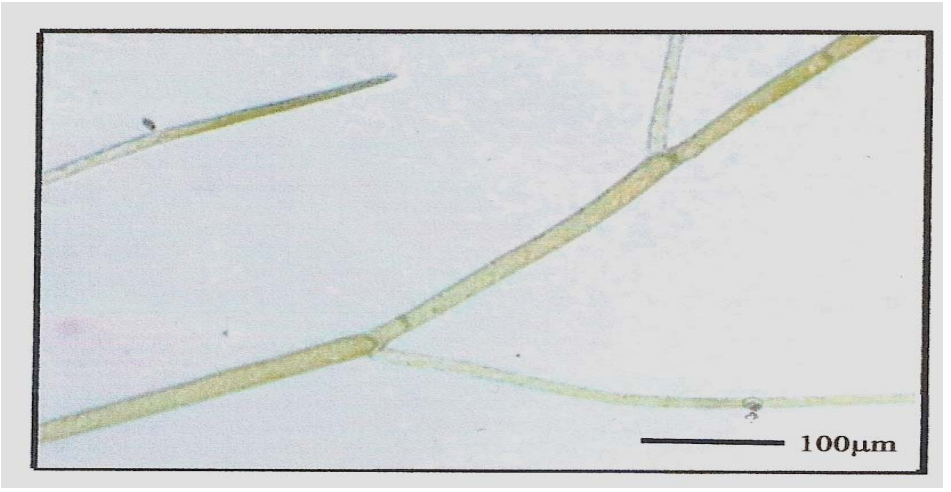
فصل الأحماض الامينية وتحديدها:

اتبعت طريقة Plummer (1987) لفصل الأحماض الامينية وتحديدها.

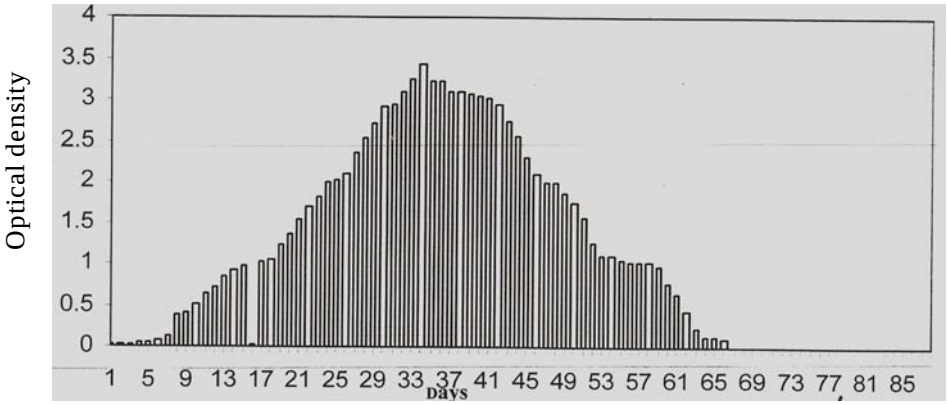
وصف الطحلب:

هو احد الطحالب الخضر الخيطية المتعددة الخلايا والمتفرعة تفرعاً حقيقياً ومتعاقباً، يتواجد في المياه العذبة والضحلة ملتصقاً أو حراً طافياً، خلاياه اسطوانية الشكل، والمحور الرئيسي ذو قطر يتراوح بين 40 – 75 مايكرومتر، أما الأفرع الجانبية فهي أصغر حجماً من المحور الرئيسي ذات قطر يتراوح بين 20 - 35 مايكرومتر، جدار الخلية يكون سميكاً مكون من عدة طبقات سليلوزية متكونة من لويفات مرتبة بشكل مغزلي والبلاستيدة الخضراء شبكية متعددة البايرونويد كما في (الشكل 1) (Bourrly, 1980).

تم قياس معدل النمو للطحلب حيث يبدأ بالطور الأسي في اليوم الثامن من زراعته وتحصل زيادة مطردة في عدد خلاياه، ويستمر تقريباً إلى اليوم الثلاثين ومن ثم يبدأ طور الاستقرار الذي استمر إلى اليوم الثاني والأربعين وبعدها بدأ طور التناقص في اليوم الثالث والأربعين ولذلك حصد هذا الطحلب في اليوم السابع والثلاثين في منتصف طور الاستقرار ولقد أظهر الطحلب ثابتاً (K) للنمو مقداره 1.3 بينما قيمة زمن تكاثر الجيل (G) هو 0.23 كما في الشكل 2 و الجدول 1.



شكل 1: الطحلب *C. crispata*



شكل 2: منحني نمو الطحلب *C. crispata*

جدول 1: يبين قيمة ثابت النمو (K)، وزمن تكاثر الجيل (G)، والفترة الزمنية للنمو والحصاد لطحلب *C. crispata*.

العزلات الطحلبية	فترة الطور التمهيدي	فترة الطور الأسي	فترة طور المستقر	فترة الحصاد	ثابت النمو (K)	زمن تكاثر الجيل (G)
C. crispata	0 – 8	8 – 30	30 – 42	36 – 37	1.3	0.23

النتائج

بينت النتائج أن نسبة البروتين الكلي في الطحلب *C.crispata* قد بلغت 40.3 %، كما أظهرت النتائج إن الطحلب يحتوي على ثلاثة حوامض أمينية وهي الاسبارتيك والفينايل ألانين والتربتوفان وذلك حسب قيمة الـ Rf الخاص بكل بقعة ظهرت في تقنية الـ TLC (جدول 2).

جدول 2: يوضح محتوى طحلب *C. crispata* من الحوامض الامينية.

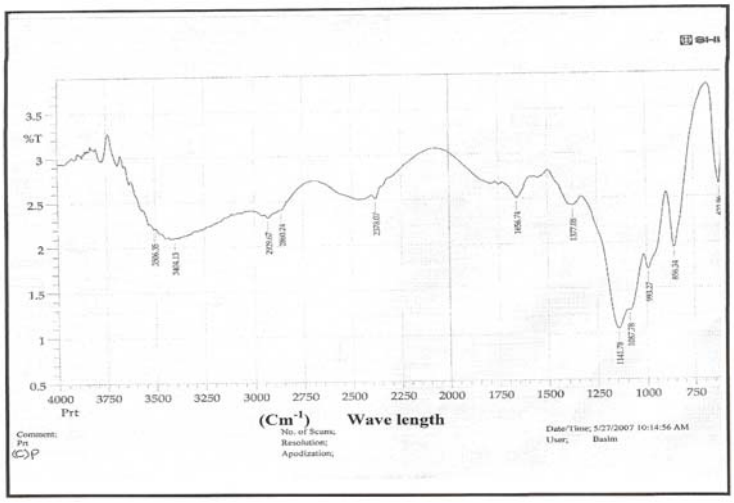
الحامض الاميني المتوقع	قيمة الـ Rf
الاسبارتيك	0.1
الفينال ألانين	0.55
التربتوفان	0.45

سجل طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص البروتيني العائد إلى طحلب *C. crispata* المعزول كما في الجدول 3 والشكل 3. حيث سجلت أهم الحزم الامتصاصية والمجاميع الفعالة العائدة للمستخلص البروتيني للطحلب. اظهر المستخلص البروتيني لطحلب *C. crispata* قمة امتصاص واحدة عند الطول الموجي 230 نانومتر وبامتصاصية مقدارها 2.9 كما في الشكل 4. إن درجة انصهار المستخلص البروتيني للطحلب *C. crispata* كانت 224 dec°م.

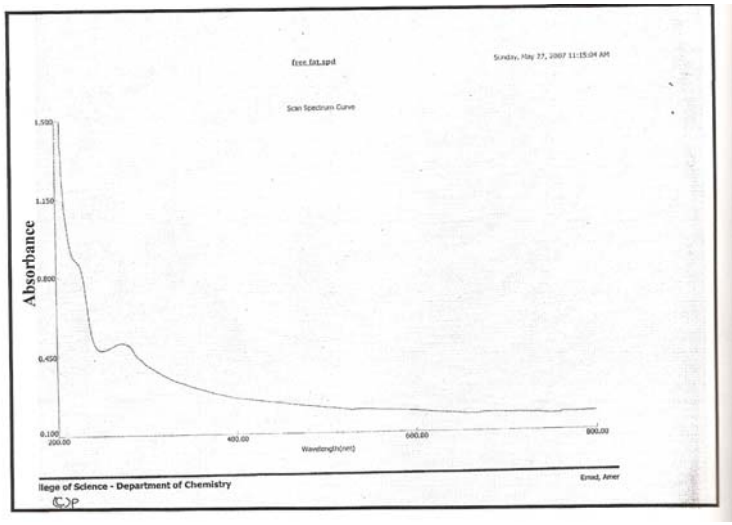
الجدول 3: يوضح أهم الحزم الامتصاصية والمجاميع الفعالة العائدة للمستخلص البروتيني في طحلب *C. crispata*

الطحلب	NH2-Strech	CH2 & CH3 aliphatic Sym. & antisym	C=O streching	C-N stretching
Cl. crispata	3404 cm^{-1} (m)	2929 cm-1 (m)	1656 cm^{-1} (m)	1141 cm^{-1} (s)

S = strong, m = medium, w = weak, br = broad



شكل 3: طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص البروتيني للطحلب *C. crispata*



شكل 4: طيف الأشعة فوق البنفسجية للمستخلص البروتيني للطحلب *C. crispate*

المناقشة

سجل الطحلب *C. crispata* قيمة واطئة لتكاثر الجيل (G) حيث كانت 0.23 وقيمة عالية لثابت النمو K وكانت 1.3 مما يدل على ملائمة الوسط المستخدم في زراعته أو ان هذه النتائج توافقت مع دراسة (Qiong and M:Hon (2004.

يشكل البروتين الكلي الجزء الأكبر من المحتوى الكيميائي للطحلب يليه الدهون ثم الكربوهيدرات (Brown *et al*., 1997). فقد احتوى الطحلب على 40.3 % وهذه النسبة تتوافق مع دراسة العلي (2004) الذي سجل نسبة البروتين الكلي في الطحلب 40 % إلا انه لا يتوافق مع دراسة احمد والدبيكل (2000) الذي ذكر أن نسبة البروتين الكلية في الطحلب *Cladophora secunda* 19.21 % والذي يعود إلى نفس جنس الطحلب المدروس وقد يعود السبب الى اختلاف الوسط الزرعي المستخدم أو ظروف الزراعة بشكل عام.

كما سجل طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص البروتيني العائد للطحلب المدروس ظهور حزم امتصاص تعود إلى المجموعة التركيبية والمتمثلة بمجموعة $(-NH)^{-1}$ عند الطول الموجي ($3404\text{-}3444\ cm^{-1}$) والتي تنتشر في التراكيب الببتيدية والبروتينية وكذلك ظهور الحزم الخاصة بمجاميع CH3- & CH2- عند ($2923\text{-}2929\ cm^{-1}$) والتي تبين أن المركب أليفاتي، وكذلك ظهور الحزم المميزة إلى مجموعة الكاربونيل ($1645\text{-}1656\ cm^{-1}$) والمتواجدة في آصرة الامايد كما في الشكل 2 والجدول 3، أما باقي حزم الامتصاصية فتوضح المجاميع التركيبية ذات العلاقة بالمجاميع الفعالة للطحلب المدروس.

وأظهرت النتائج أن طحلب *C. crispata* احتوى على الحوامض الامينية الاسبارتيك والتربتوفان والفنايل ألانين. وتتوافق هذه النتائج مع دراسة (Strusi (1962 في دراسته على نوع آخر يعود إلى نفس الجنس حيث أشار إلى أن الطحلب *C. prdifera* يحتوي على الحوامض الامينية نفسها التي يحتوي عليها الطحلب *C. crispata* وكذلك تتفق مع دراسة (Heiba *et al*. 1993) في احتواء الطحلب *C. serioides* الذي يعود إلى الجنس نفسه.

المصادر

احمد، سمية محمد والدبيكل، عادل يعقوب 2000. استخلاص الاكر والتركيب الكيميائي لطحلب الكلادوفورا *Cladophora secunda*. مجلة أبحاث البصرة، 24(1): 49 – 53.

الجعفر، أحمد محسن عذبي 2004. دراسة محتوى بعض الطحالب النقية من الفيتامينات. العراق. أطروحة دكتوراه. كلية التربية، جامعة البصرة.

الركابي، حسين يوسف خلف 2003. استخدام المزارع الكتلوية لبعض الطحالب الدقيقة في تغذية الدواجن. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم، جامعة البصرة.

Aaronson, S. and Z. Dubinsky, 1997. Mass production of micro algae. Experienta, 38: 36-40.

Al-Aarajy, M. 1996. Studies on the mass culture of some microalgae as food for fish larvae, ph. D. thesis, Univ. Basrah, 107 p.

Bourrly, P. 1980. Les Algues deuu douce, initiation a la systematigue. Soc. Nouv. Edit. Boubee, Paris, 517 p. Cited by Venkartman and Becker, 1985.

Bremner, M. 2001. The amino acid composition of some commen marine algae from lceland, J. Fisheries and Aquatic Sci., 18: 107-109.

Brown, M.R., S.W. Jeffry, J. Volkman and G. Dunstan, 1997. Nutritional proprieties of microalgae for in maricultuers. Aquaclt, 151: 315-331.

Ckekoi, V.N., Areshidze, I.V., and Dudkin, M.S., 1971. Nitrogen composition of green algae of the black sea. Biol. Nauki., 14(9): 75-77.

Desikachary, T.V. 1959. Cyanophyta Indian. Concil of Agricultural Research. New Delhi, India.
Falquet, J., 1997. The nutritional aspects of *Spirulina*. Anten. Technol., 1:1-23.
Harborne, J.B. 1984. Phytochemical method, 2nd ed., Chapman and Hall, London.
Heiba, H.I., Al-Nagdy, S.A., Rizk, A.M. and Durgham, M.M. 1993. The amino acid composition of some common marine algae from Qater (Arabian Gulf), Qatar Univ. Sci. G., 13: 219-225.
Plummer, D.T. 1987. An introduction to practical Biochemistry 3rd Edition, by McGRAW- HiLL, Book Company, England.
Prescott, G.W. 1975. Algae of the westeren great lake area 6th ed. Willam C.Brown Co. publisher Dubugue. Towa, 977 pp.
Qiangm H. and S. Miltonm 2004. Selection of high performance Microagae for Bioremediation of nitrate Contaminated Ground water, Technical report for Grant num. 01-HO-GR-0113.
Silverstein, R.M., C. Bassler and T. Morrill, 1981. Spectrometric Identification of organic compounds. By John Wiley & Sons, 4th New York.
Stein, J. R., 1973. Hand book of phycological methods. Cambridge Univ. press. Cambridge, U.K.
Strusi, A. 1962. Composition of the protein and free amino acid of seaweed do the small Tarentsea, Boll. Pesca, piscicott\\lt Idro. Boil. [Ns], 17(1):107-108.
Venkatarman, L.V. 1988. *Spirulina*. In: cyanobacterial biotechnology, eds: G. Subrmanian, B.D. Koushik and G.S. Venkaratman. Oxford and IBH publishing Co. put. Ltd, New Delhi, 267 p.
Venkatarman, L.V. 2003. *Spirulina*: Global reach of a heath care product. pp:1-10.
Weideman, V.E., Walne, P.R. and Tainor, F.R. 1984. Anew technique for obtaining axenic culture of algae. Can. J. Bot., 42: 958-959.
Zvicohen, 1996. The chemocal of *Spirulina platensis* physiology. Cell biology and biotechnology. London, U.K.

Extraction and identification of total proteins and some amino acids in the green alga *Cladophora crispata (Chlorophyta)*

A.M. Athbi[1], D.S. Ali[2] and A.N. Abaas[1]
[1]Biology Department, Education College, [2]Chemistry Department, Science College, Basrah University, Iraq

Abstract The present study involves the determination of total proteins in the green alga *Cladophora crispata*, isolation and identification of amino acids. The alga was isolated from Al-Ashar canal in Basrah. The results indicated that the isolated alga was capable of growing on Ch-10 medium, the highest constant of growth K = 1.3, and the lower time of reproducing a generation G = 0.23. The total protein content in *C. crispata* was 40.3 %. The proteins extract in algae show a shoulder at wave length 230 nm by absorption (2.9). Concerning amino acids examined by using the thin layer chromatography method (TLC), it was noticed that the alga contains the amino acids Aspartic, Phenylalanine and Tryptophan.