وقائع المؤتمر العالمي للتنمية وتداخلاتها مع التنوع الإحيائي بجنوب العراق، 12-14 كانون أول 2011، 89 - 96

فصل بروتينات أسماك الكارب *Cyprinus carpio* والصبور *Tenualosa ilisha* بإستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

شمائل عبد العالي صيوان آل عبد النبي و أم البشر حميد جابر الموسوي
كلية الزراعة، جامعة البصرة، البصرة-العراق

المستخلص - تم فصل وتشخيص ودراسة بروتينات المايوفايبريل وبروتينات الساركوبلازما لسمكتي الكارب الاعتيادي *Cyprinus carpio* والصبور *Tenualosa ilisha*. في هذا البحث استخدمت لفصل هذه البروتينات طريقة الترشيح الهلامي على عمودين من السيفاديكس G-200 و G-75. أظهرت نتائج فصل بروتينات المايوفايبريل وجود أربع قمم بروتينية لكلا نوعي السمك، وقد نزلت بروتينات هذه القمم بحجوم غسل 114 و 159 و 207 و 282 مل على التوالي لسمك الكارب وشكلت النسبة المئوية لوزن كل قمة 14.44% و 30.66% و 38.09% و 16.80% على التوالي، أما بروتينات سمك الصبور فقد نزلت بحجوم غسل 108 و 189 و 255 و 291 مل على التوالي وكانت النسبة المئوية لوزن كل قمة 39.91% و 16.20% و 29.54% و 14.35% على التوالي. أظهرت بروتينات الساركوبلازما وجود قمتين فقط لكلا نوعي السمك، نزلت بروتينات القمة الأولى للكارب والصبور بحجمي غسل 81 و 75 مل وشكل وزناهما 50.65% و 3.78% على التوالي. أما القمة الثانية فقد نزلت بروتيناتها بحجم غسل 252 مل لكل من الكارب والصبور وشكّل وزنها نسبة 49.35% للكارب و 96.22% للصبور.

المقدمة

تعد الأسماك مادةً غذائيةً مهمة، وهي إحدى المصادر الرئيسية للبروتين الذي يعتبر ذا قيمة غذائية عالية لاحتوائه على الأحماض الامينية الأساسية في تغذية الإنسان. وتشكّل نسبة البروتين في لحوم الأسماك حوالي 20-90% من وزنها الجاف و 18.5% من وزنها الرطب، وهي تفوق نسبة البروتين في لحم البقر 16.8% والبيض 13.6% والحليب 3.8% (المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 1996).

يتكون بروتين لحم السمك من ثلاثة أنواع رئيسية هي: بروتينات الليفات (المايوفايبريل) Myofibrillar proteins وهي ذائبة بالمحاليل المتأينة القوية (أكثر من 0.5 مولاري) وتشكل نسبتها 65-75% من البروتينات العضلية الكلية. وبروتينات الساركوبلازما Sarcoplasmic proteins وهذه تذوب بالماء أو المحاليل الملحية المخففة، ونسبتها 20-30% من البروتينات العضلية الكلية. والنوع الثالث بروتينات الأنسجة الرابطةConnective tissue proteins وهي غير ذائبة بالماء أو المحاليل الملحية، ونسبتها تشكل 3% من البروتينات العضلية الكلية (الطائي، 1986 و Mackie, 1990). كما تحتوي العضلة البيضاء في الكثير من أنواع الأسماك على بروتينات ذائبة بالماء، ثابتة تجاه المعاملات الحرارية ولها أوزان جزيئية واطئة تسمى البارفالبومينات Parvalbumins ويرمز لها PA (Etienne *et al*., 1999). تعد كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي أحدى تقنيات وطرائق فصل وتنقية الجزيئات البايولوجية الكبيرة كالبروتينات، إذ يتم فصل هذه الجزيئات على أساس حجومها، ويستخدمها الكيميائيون الحياتيون لفصل البروتينات، الببتيدات، الأحماض النووية، السكريات المتعددة، الأنزيمات والهرمونات وما شابه ذلك (سعيد والغبشة، 1985 و Janson and Ryden, 1998).

ويوجد العديد من مواد التعبئة التي تستخدم في الترشيح الهلامي منها: السيفاديكس Sephadex، السيفاروس Sepharose، الألتروجيل Ultrogel والبايوجيل Bio-gel وغيرها كثير. ونتيجةً للتطورات الحاصلة في مجال تكنولوجيا الاسماك والمنتجات السمكية فقد اقترحت طرائق وتقنيات عديدة ومتتابعة لتحليل بروتيناتها بمختلف أنواعها، وفضلاً عن هذا فهي تفيد في الكشف عن عمليات الغش وخاصةً في حالة تصنيع المنتجات السمكية، إذ يعمد البعض إلى استخدام أنواع رخيصة واعتبارها ذات نوعيات عالية (Yman, 1992). ونظراً لندرة البحوث المتعلقة بفصل البروتينات الحيوانية باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي، فقد استهدفت هذه الدراسة فصل بروتينات نوعين من الأسماك المنتشرة في بيئتنا المحلية وهما الكارب الاعتيادي *Cyprinus carpio* Lennaeus, 1758 (الدهام، 1977) والصبور *Tenualosa ilisha* Hamilton-Buchana, 1822 (النور، 1998).

المواد وطرائق العمل

تحضير الأسماك:

تم الحصول على أسماك الكارب الاعتيادي من محطة تربية الأسماك التابعة لمركز علوم البحار/جامعة البصرة، وقد تراوحت أوزانها ما بين 315-377 غم، وأطوالها الكلية من 27-29 سم، النوع الثاني أسماك الصبور وتم الحصول عليها من السوق المحلية وبحالتها الطازجة، تراوحت أوزانها بين 450-500 غم، أما أطوالها الكلية فتراوحت ما بين 37-40 سم.

غُسلت الأسماك وأزيلت عنها القشور والجلد والعظام والزعانف والرؤوس، ثم فرم اللحم باستخدام ماكنة الفرم Meat chopper والتي قطر فتحاتها 4 ملم، حتى الحصول على كتلة لحمية متجانسة (وقد استغرقت هذه العمليات مدة ساعة واحدة)، ومن ثم حفظ اللحم المفروم - بعد وضعه في أكياس البولي أثلين النظيفة - في المجمدة على حرارة -18 ± 2°م لمدة ليلة كاملة واستخدم بعدها في عمليات فصل بروتينات المايوفايبريل والساركوبلازما.

استخلاص البروتينات العضلية:

استخلصت بروتينات الليفات (المايوفايبريل) وبروتينات الساركوبلازما لكلا النوعين المدروسين من السمك حسب الطريقة المتبعة من قبل LeBlanc & LeBlanc (1989) مع بعض التحويرات. جمّدت البروتينات المستخلصة وجُفِّدت باستخدام جهاز التجفيد Edwards freeze dryer البريطاني المنشأ، بعدها سُحق البروتين المجفد باستخدام الهاون الخزفي، وقد بلغ وزن بروتينات المايوفايبريل 25 و 22.5 غم لكل من الكارب والصبور على التوالي، أما بروتينات الساركوبلازما فكان وزنها 15 غم في حالة سمك الكارب و 14 غم في سمك الصبور.

الترشيح الهلامي لبروتينات الأسماك:

فصل بروتينات المايوفايبريل:

أستخدم السيفاديكس المجهز من شركة Pharmacia fine chemical السويدية، وحضر حسب الطريقة الموضحة من قبل هذه الشركة، إذ تم وزن 18 غم من السيفاديكس G- 200 وغُمِرَ في 500 مل من الماء المقطر، بعد وضعه في بيكر، وسخن في حمام مائي على درجة حرارة 90°م لمدة خمس ساعات لغرض الانتفاخ، بعدها ترك

ليبرد وأضيف له 0.2 % NaN_3 (Sodium Azide) لمنع التلوث الميكروبي. ثم أُجريت عملية إزالة الهواء للتخلص من الفقاعات الموجودة داخل حبيبات السيفاديكس وبينها، بعدها سكب الهلام في عمود زجاجي أبعاده (90×2.5) سم وترك ليستقر، إذ كان إرتفاع الهلام فيه 80 سم، وأجريت موازنة للهلام بإضافة المحلول الدارئ المتكون من (100 ملي مول KCl /20 ملي مول KH_2PO_4) والمتوازن بالأس الهيدروجيني 7.

تحضير النماذج وإجراء الفصل:

أذيب 0.5 غم من بروتين المايوفايبريل في 15 مل من المحلول الدارئ، وبعد تمام إذابته رشح باستخدام ورق الترشيح Whatman No.1 للتخلص من الأجزاء غير الذائبة، ثم حقن محلول العينة على سطح الهلام في العمود وأضيف بعده المحلول الدارئ ونظمّت سرعة الجريان بمعدل 1 مل كل 5 دقائق، جمعت 130 أنبوبة تحتوي كل منها 3 مل من المحلول الدارئ، وسُجِّلت الامتصاصية لكل أُنبوبة على طول موجي 280 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer من نوع Cecil المجهز من شركة Cecil Instruments البريطانية.

فصل بروتينات الساركوبلازما:

أتبعت الطريقة المذكورة سابقاً، إلا أنه تم وزن 50 غم من السيفاديكس G-75، ومدة التشرب 3 ساعات على حرارة 90°م، وطول الهلام في العمود 80 سم، وأجريت الموازنة بالمحلول الدارئ 0.1 مولاري tris/HCl وعلى رقم هيدروجيني 8.2.

تحضير النماذج وإجراء الفصل:

أُذيب 0.2 غم من بروتين الساركوبلازما في 5 مل من المحلول الدارئ، وبعد تمام إذابته أُضيف له 0.05 مل من 2-Mercaptoethanol ورشح بإستخدام ورق الترشيح Whatman No.1 ثم حقن محلول العينة على سطح الهلام في العمود. أُضيف بعده المحلول الدارئ ونظمت سرعة الجريان بمعدل 1 مل كل 2 دقيقة، جمعت 115 أُنبوبة تحتوي كل منها 3 مل من المحلول الدارئ. سُجلت الامتصاصية لكل أنبوبة كما ذكر سابقاً.

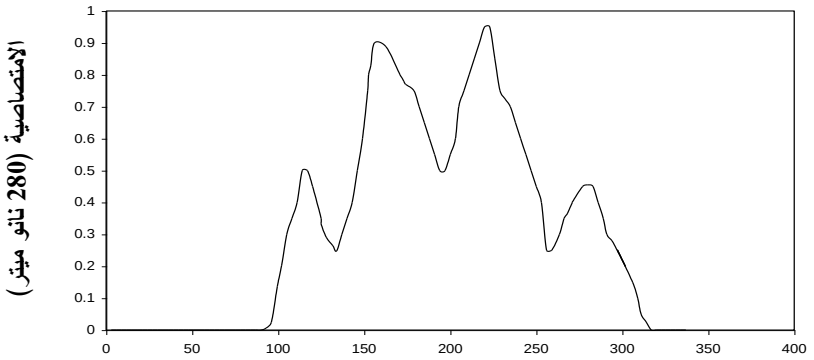
النتائج والمناقشة

يوضح الشكلان (1 و 2) والجدول (1) نتائج الترشيح الهلامي لبروتينات المايوفايبريل لأسماك الكارب والصبور، إذ أظهرت وجود أربع قمم رئيسية لكل منهما. في حالة بروتينات سمك الكارب يلاحظ أن القمتين الأولى والرابعة صغيرتان وتتوسطهما قمتان كبيرتان. إن ظهور القمة الأولى مبكراً يعني أن البروتين المكون لها لم يسمح له بالدخول في ثغرات السيفاديكس وقد إنساب بين حبيباته وهذا يعني أن وزنه الجزيئي أكبر من حدود الإقصاء للسيفاديكس G-200 (وهي 200000 دالتون)، والذي يؤكد ذلك قيمة معامل التوزيع (Kav) إذ بلغت 0.02.

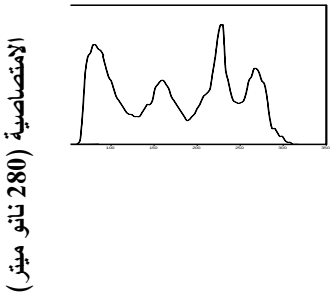
لقد شكلت نسبة وزن هذه القمة 14.44% من بروتينات المايوفايبريل. القمم الثانية والثالثة والرابعة نزلت بروتيناتها بحجوم غسل (Ve) 159 و 207 و 282 مل على التوالي، وإن تأخر نزولها يعني أن الأوزان الجزيئية لبروتيناتها أقل مما في القمة الأولى، وقد بلغت النسبة المئوية لوزن كل قمة منها 30.66% و 38.09% و 16.80% على التوالي.

أما بالنسبة لبروتينات المايوفايبريل لسمك الصبور فقد ظهرت أول قمة مبكراً وفي الحجم الميت Void volume (Vo) وقد كانت قيمة Kav لها تساوي صفراً، كما بلغت النسبة المئوية لوزن هذه القمة 39.91% وهي أكبر مما يقابلها في بروتينات المايوفايبريل لسمك الكارب، أما القمم الثانية والثالثة والرابعة فقد نزلت بروتيناتها بحجوم غسل 189 و255 و291 مل على التوالي، وكانت النسبة المئوية لوزن كل قمة 16.20% و 29.54% و 14.35% على التوالي.

جميع البحوث والدراسات تؤكد على ان القمتين الأولى والثانية غالباً ما تمثلان بروتينَي المايوسين الثقيل السلاسل (MyHC) والأكتين باعتبارهما يمتلكان أكبر وزنين جزيئيين، فضلاً عن كونهما يشكلان أكبر نسبتين بين بروتينات المايوفايبريل، إذ يشكل المايوسين حوالي 50%، والأكتين حوالي 15-30%. وهذا يتفق مع ما قام به كل من Ohnishi & Rodger (1980) و Schreus *et al*. (1985) و النجماوي (1985).



شكل (1): الترشيح الهلامي لبروتينات المايوفايبريل لسمك الكارب.



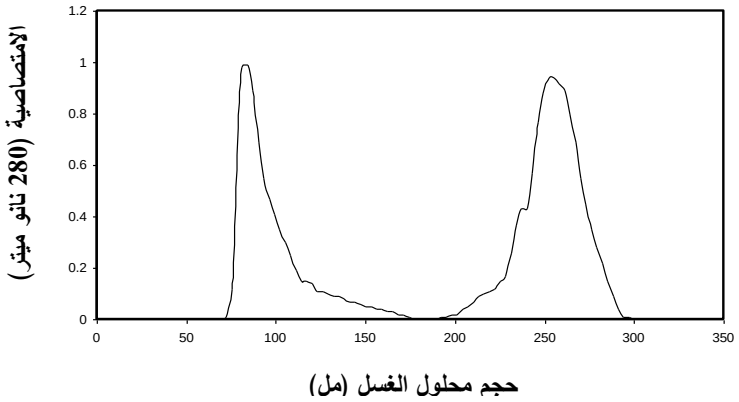
شكل (2): الترشيح الهلامي لبروتينات المايوفايبريل لسمك الصبور.

جدول 1. نسبة وزن القمة وحجم محلول الغسل (Ve) وقيم معامل التوزيع(Kav) للقمم المتحصلة بالترشيح الهلامي لبروتينات المايوفايبريل لأسماك الكارب والصبور.

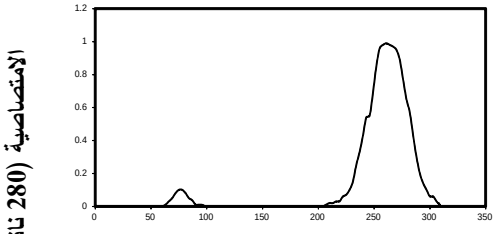
رقم القمة	وزن القمة %		Ve (ml)		Kav	
	سمك الكارب	سمك الصبور	سمك الكارب	سمك الصبور	سمك الكارب	سمك الصبور
1	14.44	39.91	114	108	0.02	صفر
2	30.66	16.20	159	189	0.19	0.30
3	38.09	29.54	207	255	0.37	0.54
4	16.80	14.35	282	291	0.64	0.68

أما بالنسبة للبروتينات الأخرى كالتروبومايوسين، التروبونينات، الأكتنينات والمايوسين الخفيف السلاسل، قد ينزل كل منها على حدة في قمة واحدة أو ربما في قمتين أو ثلاث، وذلك بسبب صغر وتقارب أوزانها الجزيئية واعتماداً على نوع مادة تعبئة العمود Column packing المستخدمة في عملية الفصل، وطريقة استخلاص البروتين من العضلة، أو حسب طبيعة المحلول الدارئ المستخدم في عملية إنزال العينة. هذه النتائج جاءت مقاربة لما حصل عليه Seki & Arai (1974) عند استخدامهما للسيفاديكس G-200 لفصل بروتينات المايوفايبريل المستخلصة من عضلات بعض أنواع الأسماك البحرية.

أما نتائج الترشيح الهلامي لبروتينات الساركوبلازما لأسماك الكارب والصبور فهي موضحة في الشكلين (3 و 4) والجدول (2) وقد أظهرت وجود قمتين بروتينيتين رئيسيتين لكل نوع سمك. نزلت بروتينات القمة الأولى لكلا النوعين مبكراً وتقريباً في حجم (Vo)، أي أن وزنها الجزيئي أكبر من حدود الإقصاء للسيفاديكس G-75، أي أكبر من 70000 دالتون، ويؤكد ذلك قيمة Kav التي بلغت صفراً،وقد شكلت بروتينات هذه القمة نسبة 50.65% و 3.78% لكل من الكارب والصبور على التوالي. القمة الثانية لساركوبلازما سمك الكارب نزلت مباشرة بعد القمة الأولى بحجم غسل 252 مل، وقد شكلت بروتيناتها نسبة 49.35% من بروتينات الساركوبلازما الكلية، أما القمة الثانية لساركوبلازما سمك الصبور فقد نزلت متأخرة عن القمة الأولى وفي حجم غسل 252 مل وشكلت بروتيناتها نسبة 96.22% من بروتينات الساركوبلازما الكلية.



شكل (3) الترشيح الهلامي لبروتينات الساركوبلازما لسمك الكارب



شكل (4): الترشيح الهلامي لبروتينات الساركوبلازما لسمك الصبور.

جدول 2. نسبة وزن القمة وحجم محلول الغسل (Ve) وقيم معامل التوزيع (Kav) للقمم المتحصلة بالترشيح الهلامي لبروتينات الساركوبلازما لأسماك الكارب والصبور.

رقم القمة	وزن القمة%		Ve (ml)		Kav	
	سمك الكارب	سمك الصبور	سمك الكارب	سمك الصبور	سمك الكارب	سمك الصبور
1	50.65	3.78	81	75	صفر	صفر
2	49.35	96.22	252	252	0.55	0.55

المصادر

الدهام، نجم قمر، 1977. أسماك العراق والخليج العربي. الجزء الأول. مطبعة الإرشاد، بغداد، 395 ص.

سعيد، سمير عبد الرحيم والغبشة، ثابت سعيد، 1985. مدخل الى تقنيات الفصل في الكيمياء. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل، 146 ص.

الطائي، منير عبود جاسم، 1986. تكنولوجيا اللحوم والأسماك. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، مطبعة جامعة البصرة، ص 130-368.

المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 1996. دراسة الجدوى الفنية والاقتصادية لإنتاج الأعلاف السمكية من مصادر غير تقليدية، ص 8-9.

النجماوي، معتصم حسين محمد، 1985. تأثير التعتيق والمعاملة بالبابين على بروتينات المايوفايبريل وبعض الصفات الأخرى للحوم الأغنام المسِنة. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة صلاح الدين، 229 ص.

النور، ساجد سعد حسن، 1998. حياتية تكاثر الصبور *Tenualosa ilisha* (Hamilton–Buchanan) في شط العرب والمياه الإقليمية العراقية. أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة البصرة، 164 ص.

Etienne, M., Jerome, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kundiger, R., Yman, I.M., Ferm, M., Craig, A., Mackie, I., Jessen, F., Smelt, A. and Luten, J. 1999. A standardized method of identification of raw and heat-processed fish by urea isoelectric focussing. Electrophoresis, 20: 1923-1933.

Janson, J. and Ryden, L. 1998. Protein Purification. Principles, High-Resolution Methods and Applications, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc. Publication, Canada.

LeBlanc, E.L. and LeBlanc, R.J. 1989. Separation of Cod (*Gadus morhua*) fillet proteins by electrophoresis and HPLC after various frozen storage treatments. J. Food Sci., 54(4): 827-834.

Mackie, I.M. 1990. Identifying species of fish. Analytical proceedings, 27: 89-92.

Ohnishi, M. and Rodger, G.W. 1980. Analysis of the salt-soluble protein fraction of cod muscle by gel filtration. In: Advances in fish science and technology. J.J. Connell, ed. Fishing News Book. Ltd Farnham, Surrey, England, pp: 422-428.

Schreurs, V.V.A.M., Boekholt, H.A., Koopmanschap, R.E. and vanRotterdam, W. 1985. Relative synthesis rate of individual muscle proteins. Netherlands Journal of Agricultural Science, 33: 297-302.

Seki, N. and Arai, K. 1974. Gel filtration and electrophoresis of fish myofibrillar proteins in the presence of sodium dodecyl sulfate. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 40: 1187-1194.

Yman, I.M. 1992. Identifying fish species by IEF with PhastSystem. Application Note 379, PhastSystem, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden. pp: 1-6.

Separation of Carp (*Cyprinus carpio*) and Hilsa shad (*Tenualosa ilisha*) Proteins by sing Gel Filtration Chromatography

Sh.A.S. Al-Abdul-Nebi and A.E.H.J. Al-Mousawi
College of Agriculture, University of Basrah, Basrah-Iraq

Abstract - A program of separation, identification of the myofibrillar and sarcoplasmic proteins of two species of fishes (*Cyprinus carpio*), and (*Tenualosa ilisha*). This study dealt with the separation of the proteins by Gel filtration chromatography on two columns of Sephadex G-200 and G-75. Results of myofibrillar proteins showed presence of four peaks for both species of fish. Proteins of these peaks were eluted in volume 114, 159, 207 and 282ml respectively for Common carp, percentage of each peak formed 14.44%, 30.66%, 38.09% and 16.80% respectively. Whereas Hilsa shad proteins were eluted in volume 108, 189, 255 and 291 ml respectively, and the percentage of each peak formed 39.91%, 16.20%, 29.54% and 14.35% respectively. Sarcoplasmic proteins showed only two peaks for the two species of fish. Proteins of the first peak for Common carp and Hilsa shad were eluted in volume 81 and 75ml, and their weights percentage formed 50.65% and 3.78% respectively, whereas the proteins of the seconed peak were eluted in volume 252ml for the both Common carp and Hilsa shad, and their weight percentage formed 49.35% for Common carp and 96.22% for Hilsa shad.