



جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

التحري عن الوقود الحيوي من بعض الطحالب الدقيقة
بتقانة عزل ودمج البروتوبلاست

طه عبدالوهاب خميس الصميدعي

اطروحة دكتوراه

علوم حياة / تقنيات حياتية

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتور قتيبة شعيب محمد صالح
النعمة

الأستاذ المساعد

الدكتور يوسف جبار إسماعيل
الشاهري

٢٠٢٠م

١٤٤٢هـ

الخلاصة

اعتمدت في هذه الدراسة ثلاثة أنواع من الطحالب الدقيقة، واحدة منها معزولة من البيئة المحلية وهي *Chlorococcum humicola* واثنان معزولتان من البيئة المصرية وهما *Scendesmus dimorphus* و *Chlorella vulgaris*. وتضمنت الدراسة ثلاثة محاور رئيسة شمل المحور الاول تنمية الطحالب الدقيقة في مفاعل ضوئي سعة 5 لتر ومن ثم تقدير انتاجية الطحالب من الكتلة الحيوية و اجراء تحليل كيميائي لمكونات الخلايا الجافة ومعرفة نسب مكوناتها الحيوية وتشخيص الاحماض الدهنية الداخلة في تركيب الدهون. وتناول المحور الثاني عزل البروتوبلاست من هذه الطحالب وتحديد صفاته الحيوية ثم زراعته وتقييم مدى قدرته على اعادة الاخلاف. وركز المحور الثالث لإحداث تهجين جسمي بين انواع البروتوبلاست المعزولة لإنتاج هجن جسمية. نجحت الدراسة الحالية في تنمية الطحالب بانواعها الثلاثة على وسط Chu 13 في مفاعل ضوئي محلي الصنع سعة 5 لتر، وبعد 25 يوماً من التحضين ظهر أن أعلى إنتاجية 1.58 غم لتر⁻¹ من الكتلة الحيوية حققها الطحلب الدقيق *S. dimorphus*، ثم جاء الطحلب *Chlo. humicola* بإنتاجيه 1.39 غم لتر⁻¹ وأخيراً الطحلب *C. vulgaris* اذ بلغت إنتاجيته من الكتلة الحيوية 0.91 غم لتر⁻¹. وبينت نتائج التحليل الكيميائي للخلايا الجافة للطحالب تبايناً ملحوظاً في مكوناتها، فقد أظهر الطحلب الدقيق *S. dimorphus* أعلى إنتاجية بنسبة مئوية 29.43% من الكربوهيدرات بينما أعطى الطحلب *Chlo. humicola* بنسبة مئوية 24.77% من الكربوهيدرات ثم الطحلب *C. vulgaris* بنسبة مئوية 19.46%. وأظهرت نتائج تقدير البروتين حصول الطحلب *Chlo. humicola* على أعلى إنتاجية 22.46% وفي المرتبة الثانية الطحلب *C. vulgaris* بنسبة مئوية 21.63% تلاه الطحلب *S. dimorphus* بنسبة مئوية 20.46% فقط. وأشارت نتائج تقدير الدهون الكلية في هذه الطحالب أن الطحلب *C. vulgaris* حقق أعلى إنتاجية من الدهون الكلية بلغت 29.6% تلاه الطحلب *Chlo. humicola* بالمرتبة الثانية في كمية الدهون الكلية وبلغت 24.2% وأخيراً الطحلب *S. dimorphus* بإنتاجيه 23.4% من الدهون الكلية.

وأشارت نتائج تشخيص الدهون باستخدام كروماتوغرافيا الغاز Gas Chromatography تعريف الأحماض الدهنية الداخلة في تركيب الدهون الكلية. وأن أعلى نسبة تم الحصول عليها عند تحليل الدهون من الطحلب *S. dimorphus* كانت لأستر الحامض الدهني المشبع المرستيك (C14:0) بنسبة مئوية 47% وأستر الحامض الدهني المشبع اللينكوسيريك (C24:0) بنسبة مئوية 7.194% بالإضافة الى نسبة قليلة من الأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة الأخرى. بينما وجد من تحليل الدهون الكلية للطحلب *C. vulgaris* أن أعلى نسبة من أسترات الاحماض الدهنية كانت لأستر الحامض الدهني المشبع البالميستيك (C16:0) بنسبة مئوية 25.906% ثم أستر الحامض الدهني غير المشبع الاركيدونك (C20:4) بنسبة مئوية 13.083% ونسبة قليلة أخرى من أسترات الأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة الأخرى. وأظهر تشخيص الدهون الكلية المنتجة من الطحلب

Chlo. humicola أن عدد من أسترات الأحماض الدهنية المشبعة مثل أسترات الحامض الدهني المشبع الأركيديك (C20:0) بنسبة مئوية 36.205% وأسترات الحامض الدهني غير المشبع لينولك (C18:2) بنسبة مئوية 28.371% وأسترات حامض الدهني البالميستيك (C16:0) بنسبة مئوية 7.428% ونسبة قليلة من أسترات الأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة الأخرى.

وتمكنت الدراسة الحالية من عزل البروتوبلاست من الأنواع الطحلبية الدقيقة الثلاثة والحصول على ناتج عزل بلغ $10^6 \times 1.3$ خلية مل⁻¹ من البروتوبلاست المعزول من الطحلب الدقيق *S. dimorphus* باستخدام المحلول الانزيمي المتكون من 0.6% من انزيم Proteinase K و2% من انزيم Cellulase R-10 و1% من انزيم Pectinase ونجاح عزله بعد 48 ساعة من معاملة الخلايا بالانزيمات، والحصول على ناتج عزل بلغ $10^6 \times 1.3$ خلية مل⁻¹ من البروتوبلاست المعزول من الطحلب الدقيق *C. vulgaris* باستخدام المحلول الانزيمي سابق الذكر، والحصول أيضاً على ناتج عزل بلغ $10^6 \times 1.2$ خلية مل⁻¹ من البروتوبلاست المعزول من الطحلب الدقيق *Chlo. humicola* باستخدام المحلول الانزيمي المتكون من 1% من انزيم Cellulase R-10 و1% من انزيم Pectinase و2% من انزيم Macerozyme R-1 ونجحت عملية عزله بعد 24 ساعة من معاملة الخلايا بالمحلول الانزيمي في درجة حرارة مثلى 30 مئوية. وظهر البروتوبلاست المعزول من الطحالب الثلاث بشكل كروي أو بيضوي الشكل اضافة الى كبر حجمه مقارنة بالخلايا الاصلية. وبينت النتائج ان نسبة حيوية البروتوبلاست المعزول من الطحالبين *S. dimorphus* و *C. vulgaris* كانت 100%، بينما بلغت 98.13% للطحلب *Chlo. humicola*. وأشارت الفحوصات المجهرية الى احتواء البروتوبلاست بجميع أنواعه على النواة. ونجحت زراعة البروتوبلاست بكل أنواعه على وسط الاخلاف Knop الصلب الحاوي على المانيتول وكونت مستعمرات جديدة.

ومن النتائج البارزة نجاح التهجين الجسمي بين أنواع البروتوبلاست المعزول من الطحالب الثلاثة. فقد أظهرت نتائج الاندماج الكيميائي حدوث أفضل نسبة للاتصاق البروتوبلاست عند المعاملة بمحلول الاندماج الحاوي مركب متعدد الأتلين كلايكول (PEG) بنسبة مئوية 35% الذي أعطى أعلى نسبة التصاق بلغت 42، 54 و55% لثنائيات بروتوبلاست الطحالب *C. vulgaris* × *S. dimorphus* و *Chlo. humicola* × *S. dimorphus* و *Chlo. humicola* × *C. vulgaris* على التوالي، في حين لم تنجح التجارب في الحصول على هجائن جسمية.

وأظهرت نتائج الاندماج الكهربائي نجاحاً في ظروف الاندماج باستخدام تقنية الاندماج والحصول على سلاسل من البروتوبلاست بنسبة مئوية 95% خلال 29 ثانية عند تطبيق 15 فولت وتردد 2 ميكاهيرتز من التيار المتناوب، ثم الحصول على نسبة من الخلايا المندمجة بلغت 6.4% بين بروتوبلاست الطحالب *Chlo. humicola* و *C. vulgaris* عند تسليط 1500 فولت من التيار المستمر لمدة 25 ملي ثانية.

SUMMARY

In this investigation three species of microalgae were adopted, *Chlorococcum humicola* (locally isolated), *Scendesmus dimorphus* and *Chlorella vulgaris* from the (Egyptian isolated). The study involved three main parts, the first part focused on the growth of microalgae in a 5-litre photobioreactor, estimating the biomass production of algae and chemical analysis of the dry cell's content to identify their vital components and detect the fatty acids in fats. The second part focused on the isolation of protoplast from algae, determine in some vital characteristics, cultivation it, and assess its ability for regeneration. While the last part spotted the hybridization of isolated protoplast to produce somatic hybrids. The current study succeeded in growing all three species of algae on Chu 13 medium in a manufactured 5-litre photobioreactor. After 25 days of incubation, the biomass yields were 1.58 g l^{-1} , 1.39 g l^{-1} and 0.91 g l^{-1} for *S. dimorphus*, *Chlo. humicola* and *C. vulgaris* respectively. The chemical analysis of the dried cells showed that *S. dimorphus* produced the highest yield of carbohydrate, which was 29.43%, while *Chlo. humicola* and *C. vulgaris* produced 24.77% and 19.46% respectively.

The results of protein estimation also showed that *Chlo. humicola* has the highest yield, 22.46%, while *C. vulgaris* and *S. dimorphus* 21.63% and 20.46%. respectively. The estimation of the total fat in the three algae also indicated that *C. vulgaris* has the highest yield of fat 29.6%, followed by *Chlo. humicola* 24.2% and then finally algae *S. dimorphus* in 23.4%.

Cryptogram of GC showed that the highest percentage of fat obtained from *S. dimorphus* was for the Myristic ester (C14: 0) by 47% and the Linkoceric ester (C24: 0) was 7.194% in addition to a small percentage from other saturated and unsaturated fatty acids. It was found from a total lipid analysis of *C. vulgaris* that the highest percent 25.906% of fatty acid esters was Palmatic ester (C16:0) then 13.083% of the unsaturated fatty acid Archidone ester (C20:4) and small percentages of other esters

from saturated and polyunsaturated fatty acids. *Chlo. humicola* showed the presence of some saturated fatty acid esters, such as Arachidic ester (C20:0) at 36.205% and the unsaturated fatty acid Linoleic ester (C18:2) at 28.371% Palmitic ester (C16:0) with a percentage of 7.428% and a small percent from other polyunsaturated fatty acids esters.

In this work, protoplasts were successfully isolated from the three microalgae species. At the same time protoplast yield was $10^6 \times 1.3$ cell ml^{-1} obtained *S. dimorphus* using an enzymatic solution containing 0.6% of Proteinase K, 2% of Cellulase R-10 and 1% of Pectinase involved 48 hours. The yield $10^6 \times 1.3$ cell ml^{-1} was obtained from *C. vulgaris* using the previous mentioned enzymatic solution, while protoplasts yield was $10^6 \times 1.2$ cell ml^{-1} obtained from *Chlo. humicola* using an enzymatic solution containing 1% Cellulase R-10, 1% Pectinase and 2% Macerozyme R-1 during 24 hours at 30 C°. Protoplasts were spherical or oval. The results showed that the viability of protoplast isolated from algae *S. dimorphus* and *C. vulgaris* was 100%, while in *Chlo. humicola* was 98.13 %. These protoplasts of all types contained nucleus. Culture of all types of protoplasts using agar solidified knop medium containing mannitol was supporting formation colonies.

Chemical fusion indicates good adhesion ratio of the protoplast cells was obtained by using the fusion solution containing the polyethylene glycol (PEG) by 35%, which gave the highest adhesion rate of 42, 54 and 55% for the algae protoplast binaries *C. vulgaris* \times *S. Dimorphus* and *Chlo. humicola* \times *S. dimorphus* and *Chlo. humicola* \times *C. vulgaris*, respectively, and no somatic hybrids .

The results confirmed the incidence of successful somatic hybridization, this study use cell fusion technology during 29 seconds and 95% of protoplast chains were produced by applying 15 volts and 2 MHz frequency of AC, then got a 6.4% percent of fused cells among the algae protoplast *Chlo. humicola* \times *C. vulgaris* at 1500 volts of DC for 25 milliseconds.

University of Mosul
College of Education for
Pure Sciences



**Investigation of Biofuel from Some
Microalgae Using Protoplast Isolation and
Fusion Technique**

Taha Abdullwahab Khamees Al-Someidaie

Ph.D. Thesis

Biology / Biotechnology

Supervised by

Assist. Professor

**Dr. Yousif Jabar
Al-Shahery**

Assist. Professor

**Dr. Qutaiba Shuaib
Al-Nema**

2020 A.D

1442 A.H