مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (39) العدد (1) 2017
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (39) No. (1) 2017

تأثير بعض ظروف النمو على كمية الكربوهيدرات ونوعيتها في طحلب *Chlorella vulgaris* المعزول من المياه العذبة في جنوب سورية

د. محمد نداف*
د. عدنان علي نظام**
حسام عكو***

(تاريخ الإيداع 18 / 9 / 2016. قبل للنشر في 5 / 1 / 2017)

□ ملخّص □

نظراً إلى كفاءة الطحالب في عملية التركيب الضوئي وإنتاج الكربوهيدرات ذات القيمة الغذائية والصناعية فقد أُجري هذا البحث بهدف دراسة كمية الكربوهيدراتونوعيتها فيالنوع *Chlorella vulgaris* المعزول من المياه العذبة في جنوب سورية، وتحديد مدى تَأثُّرها باختلاف درجة الحرارة (15، 25، 35 س°) وتركيز نترات الصوديوم (0.1، 0.25، 0.4 غ/ل) وقيم pH(6، 7، 8) خلال النمو. أوضحت النتائج أنكمية الكربوهيدرات الكلية ضمن ظروف النمو المختلفة تراوحت بين 20% و 40%، وكان للغالاكتوز والرامنوز السيادة على باقي السكريات. كما تبين أن درجة الحرارة (15 س °) هي الأفضل للحصول على أكبر كمية من الكربوهيدرات بأعلى نسبة من النشا والسليلوز والهيميسليلوز والبكتين. وحققالتركيز المنخفض0.1غ/ل من نترات الصوديوم أكبر كمية من الكربوهيدرات بأعلى محتوى من البكتين ومركباته، ولميتأثر محتوى الكتلة الحيوية من الغلوكوز بنسبة النتروجين في وسط النمو. كان الوسط الحمضي هو الأفضل للحصول على أكبر كمية من الكربوهيدرات بينماازدادت نسبة السليلوز والنشا والبكتين في الوسط القلوي على حساب باقي المركبات.

الكلمات المفتاحية : *Chlorella vulgaris*، شروط النمو، الكربوهيدرات، السكريات الأحادية، الطحالب الخضراء الدقيقة.

*أستاذ، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة تشرين ، اللاذقية، سورية.
**أستاذ، قسم علم الحياة النبات، كلية العلوم، جامعة دمشق ، دمشق، سورية.
***طالب دكتوراه، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة تشرين – . مساعد باحث في قسم التنوع الحيوي ، الهيئة العامة للتقانة الحيوية،دمشق، سورية

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (39) العدد (1) 2017
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (39) No. (1) 2017

Effect of some growth conditions on thequantity and quality of carbohydrates in *Chlorella vulgaris*isolated from fresh water in southern Syrian

Dr. Mohammad Naddaf*
Dr. Adnan Ali Nizam**
Hussaam Okkou***

(Received 18 / 9 / 2016. Accepted 5 / 1 /2017)

□ ABSTRACT □

According to the algae ability in photosynthesis and carbohydrate production with high value in nutrition and industry, this research was carried out during 2015 to study the qualitative and quantitative content of carbohydrates in *Chlorella vulgaris* which was isolated from southern Syrian fresh water, and to determine the effect of the growth conditions; temperature (15, 25, 35 C), sodium nitrate concentration (0.1, 0.25, 0.4 g/l) and pH (6, 7, 8) on that content. The results showed that the total content was in the range of 20% to 40%;with galactose and rhamnose dominating among the rest of sugars. The temperature 15°C was the best to get the greatest total content with the highest value of starch, cellulose, hemicellulose and pectin. In addition, the low nitrate concentration 0.1 g/l was combined with the highest content of pectin and its compounds, while the glucose content was not affected by the nitrogen concentration. Related to pH effect, the acidic media was proved to be the best for the highest carbohydrate content. Moreover, cellulose, starch, and pectin increased in the alkali medium over the rest of carbohydrates.

Keywords: Chlorella vulgaris, growth conditions, carbohydrate, monosaccharaides.

* **Professor, Department of Food Science, Agriculture faculty, Tishreen University, Latakia, Syria**
****Professor, Plant Biology Department, Faculty of Science, Damascus University.**
*****Postgraduate Student, Department of Food Science, Agriculture faculty, Tishreen University - Research Assistant, department of biodiversity, NCBT, Damascus, Syria.**

مقدمة

يعدنقص موارد المواد الأولية الغذائية والصناعية أحد أهم التحديات التي تواجه البشرية (Lal, 2006)؛الأمر الذي حث العلماء للبحث في استغلال موارد غير تقليدية تلبي الطلب المتزايد، فاستُحدثت وطورت تقنيات جديدة كاستزراع الطحالب التي تستعمل مستخلصاتها في الصناعات الغذائية والدوائية والتجميلية والنفطية (Priyadarshani and Rath, 2012).

تمثِّل الطحالب مجموعة من الأحياء ذاتية التغذية، شبيهة بالنباتات بسيطة البنية ذات أشكال وأحجام مختلفة، تنمو في أوساط مائية أو رطبة، وتبدي كفاءة عالية في عملية التركيب الضوئي مقارنة بالنباتات الراقية، وتتجلى في قدرتها الكبيرة على إنتاج حمض الفوسفوغليسريك؛الوحدة الأساسية في بناء الغلوكوز والحموض الدهنية والأمينية التي تمثل أساس بناء الكربوهيدرات والليبيدات والبروتينات (Gouveia, 2011).وتقسم الطحالب إلى مجموعتين: الطحالب الدقيقة Microalgae التي تضم الأنواع مفردة الخلية، والطحالب الكبيرة Macroalgae عديدة الخلايا (Mchugh, 2003)، ويعدُّ الجنس *Chlorella* (من الطحالب الخضراء الدقيقة) أكثر طحالب المياه العذبة استعمالاً في التغذية والصناعة(Misurcova *et al.*, 2012)، ويعدّ النوع*C. vulgaris*الأهم من حيث القيمة الغذائية والتصنيعية (Sydney *et al.*, 2010).

يتضمن التركيب الكيميائي للكتلة الحيوية الجافة للطحالب الدقيقة 30–50% من البروتين، 20–40% من الكربوهيدرات و 8–15% من الليبيدات (Hu, 2004)، وتختلف هذه النسب حسب نوع الطحلب وظروف النمو. وتعد الكربوهيدرات من المركبات الأكثر أهمية في النوع *C. vulgaris* لارتفاع نسبتها،إذ يمكن أن تصل إلى نحو 50% من الوزن الجاف(Becker, 2007)، ولغناها بالسليلوز والهيميسليلوز والنشا؛ المركبات ذات الأهمية في صناعة التخمير والصناعات الغذائية (Zhou *et al.*, 2011).توجد الكربوهيدرات في الطحالب إما في الجدار الخلوي على هيئة سكريات معقدة أهمها السليلوز 25–30% والهيميسليلوز 15–25%والبكتين35%والغليكوبروتينglycoprotein5–10% (Wang and Evangelou, 1995)، إضافة إلى نسب قليلة من الكيتوزانchitosan والآغارagarوالألجيناتalginate، ويخزن القسم الآخر على هيئة نشا في الصانعات الخضراء، ويكوّن السليلوز والنشا القسم الأكبر من كربوهيدرات الطحالب الدقيقة (Pieper *et al.*, 2012)، ولكن تتغير نسب هذه المركبات السكرية ونوعيتها حسب نوع الطحالب وظروف نموها(Pieper *et al.*, 2012)، في حين أنها تتحلمه جميعاً إلى سكريات أحادية(كما في الجدول 1) أهمها: الغلوكوز Glucoseوالزايلوز Xylose والغالاكتوز Galactose والأرابينوز Arabinoseوالمانّوز Mannoseوالرامنوز Rhamnose (Sluiter *et al.*, 2010)؛إذ تؤلف هذه السكريات 95% من الكربوهيدرات الكلية، وحتى 65%من الوزن الجاف (Pettersen and Schwan, 1991)، كما تختلف العلاقة النسبية بين هذه السكريات من نوع لآخر. فقد بيّن Athbi وآخرون (2012)في دراسة للنوع *C. vulgaris* أن الغلوكوز كان السكر الأعلى نسبة بوضوح11.5% من باقي السكريات؛ ثم الزايلوز والغالاكتوز الرايبوز والرامنوز، على الترتيب، بنسبة قاربت 8.6% لكل منها، إلا أن هذه العلاقة كانت مختلفة عند النوع*S. obliquus*،فقد تبع الغلوكوز كل من المانوز ثم الزايلوز، بينما كانت النسبة الأقل لسكر الأرابينوز (Miranda *et al.*, 2012)، أما في دراسة Ogawa وآخرين (1999) كان الرامنوز السكر السائد في النوع *C. vulgaris*.

الجدول 1: أهم السكريات الأحادية الناتجة عن الحلمهة الكاملة للسكريات المعقدة والثنائية (Schutte, 1991)

نوع الكربوهيدرات .	نواتج الحلمهة
النشاء – السليلوز	الغلوكوز
الهيميسليلوز	الغلوكوز + الزايلوز+ الأرابينوز
البكتين	الغالاكتوز + الأرابينوز
سكريات الأوليغو Oligosaccharides	الغلوكوز + الفركتوز + الغالاكتوز

وتكمن أهمية دراسة تركيب كربوهيدرات الطحالب من السكريات الأحادية، بعد حلمهتها كيميائياً أو إنزيمياً،في تحديد المحتوى الكلي من الكربوهيدرات،وفهم البنية الهيكلية للكربوهيدرات المتعددة؛مما يفيد في عمليات التحويل والتخمير التطبيقية، كما تعدّ عاملاً مساعداً في الإجراءات المتبعة لتحطيم وتحليل الجدر الخلوية،بغرض استخلاص الزيت والسكريات الذوابة في آن واحد(Templeton*et al.*, 2012).

وتؤثر العديد من العوامل الفيزيائية والغذائية في كمية كربوهيدرات الطحالب ونوعيتها؛ مما يضفي اختلافات معنوية على قيمتها الغذائية والاقتصادية (Brown *et al.*, 1997)، وأهم هذه العوامل: درجة الحرارة والمغذيات وقيمةpH والضوء(Rousch*et al.*, 2003).

درجة الحرارة: يظهر تأثير الحرارة جلياً في التركيب الكيميائي للطحالب الدقيقة، إذ يمكن لأي تغير في درجات الحرارة، مهما كان بسيطاً، أن يسبب تغيراً ملحوظاً في بعض المكونات الكيميائية، وبوجه عام، فإن انحراف درجة الحرارة عن قيمتها المثلى للنمو، أو التعرض لأي نوع من الإجهاد خلال فترة النمو، يؤدي إلى زيادة نسبة الليبيدات والكربوهيدرات في الكتلة الحيوية للطحالب، يقابلها نقصان في نسبة البروتينات(De Oliveira *et al.*,1999).

النترات: هناك العديد من الأبحاث التي درست تأثير مصدر النتروجين وتركيزه في تركيب الطحالب الدقيقة (Battah *et al.*, 2014)، وقد تبين أن إحداث عوز نتروجيني، على مختلف أنواع الطحالب الدقيقة، يساهم في دفع عملية التركيب الحيوي وتراكم الليبيدات أو الكربوهيدرات، أو كليهما معاً ، (Pancha*et al.*, 2014). وأنه في ظروف عوز النتروجين، يزداد محتوى الطحالب من الكربوهيدرات عادة، كآلية للبقاء إذتتوقف الخلايا عن الانقسام وتتجه إلى تخزين الطاقة على هيئة كربوهيدرات (Encarnación*et al.*, 2010).

قيمة pH: تعد درجة حموضة وسط النمو ذات تأثير جوهري في الكتلة الحيوية المتكونة ومحتواها من الكربوهيدرات والمركبات الأخرى إذ تؤثر في الشكل الذي يوجد عليه الكربون في وسط النمو؛مما يغير قابلية امتصاصه من قبل الطحالب الدقيقة (Becker, 1994;Zang*et al.*, 2011)،كما تؤثر قيمة pHعلى نحو غير مباشر في المركبات الكربوهيدراتية،إذ تزيد القيم القلوية من تراكمها مع الليبيدات في خلايا الطحالب (Guckert and Cooksey, 1990)، وتعد قيم pH الحمضية بين 3 – 6.2 والقلوية 8.3 – 9 ذات تأثير سلبي في النوع *C.vulgaris*من حيث معدل النمو (Rachlin and Grosso, 1991)، وتأثير إيجابي من حيث تراكم الكربوهيدرات(Yeh*et al.*, 2010).

أهمية البحث وأهدافه

إنّ ما تتميز به سورية من طول فترات الإشعاع الشمسي واعتدال درجات الحرارة في معظم أوقات السنة، وما فيها من برك للمياه العذبة وبحيرات يزدهر فيها العديد من أنواع الطحالب، كل ذلك يمهّد الطريق لانطلاق أبحاث ومشروعات تطبيقية للاستفادة من هذه الظروف وتسخيرها لإنتاج الطحالب كمصدر غني بالمواد الحيوية، من خلال ترشيد استزراع الطحالب في البرك والبحيرات، حتى استزراعها في أوساط صنعية، ثم جمعها ومعالجتها لتكون مصدراً رخيصاً غنياً بالعديد من المركبات وفي مقدمتها الكربوهيدراتذات القيمة الغذائية العالية التي يمكن استعمالها في مجالات غذائية وتصنيعية شتى. بناءً على هذه الأهمية الحيوية والاقتصادية لكربوهيدرات الطحالب، فقد هدف هذا البحث إلى دراسة المحتوى الكمي والنوعي لكربوهيدرات النوع *Chlorella vulgaris* (واسع الا نتشار في المياه العذبة في سورية)،وتحديد مدى تأثُّرها باختلاف درجة الحرارة وتركيز نترات الصوديوم وقيم pH خلال النمو، وتحديد القيم المثلى لهذه المتغيرات التي تنتج كتلة حيوية بمحتوى من الكربوهيدرات متميزكمياً ونوعياً، ويتحقق ذلك من خلال الآتي:

- استزراع النوع *Chlorella vulgaris* من الطحالب الخضراء ضمن ظروف تغذوية وبيئية مختلفة(درجة حرارة، pH وتركيز النترات) في المختبر.
- متابعة تغيرات محتوى الكربوهيدرات الكلية والسكريات الأحادية الناتجة عن حلمهتها.
- تحديد أفضل الظروف التي تنتج كربوهيدرات بمواصفات كمية ونوعية متميزة.

طرائق البحث و موادهـ:

جُمعت عينات المياه المحتوية على الطحالب الخضراء الدقيقة من المناطق الممتدة على طريق دمشق القنيطرة ومن محافظة القنيطرة، وأجريت عملية جمع عينات الطحالب وعزلها وتنقيتها اعتماداً على طريقة Phang و Chu(1999) الموصى بها من قبل Parvin وآخرين (2007).

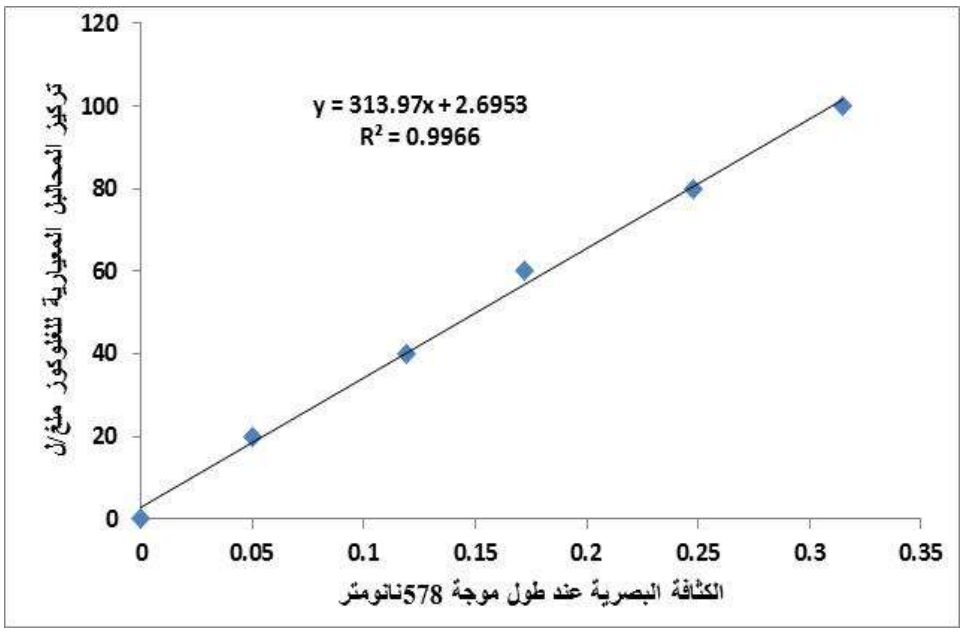
أجري تعريف النوع *C.vulgaris* وتحديده مجهرياً، اعتماداً على المفاتيح التصنيفية التي وضعت من قبل APHA, AWWA, WPCF (2005).

-**التنمية والإكثار** : أجريت جميع التجارب المتعلقة بالتنمية والإكثار بواقع ثلاث مكررات لكل تجربة ضمن المفاعل الحيوي (المصمم والمصنع في الهيئة العامة للتقانة الحيوية والذي يتحكم في جميع ظروف النمو) بطريقة الدفعات (Batch) باستعمال وسط Bold's Basal Medium(BBM)(Bischoff and Bold, 1963) بمدة زمنية 15 يوماً(نهاية فترة النمو اللوغاريتمي تقريباً) لكل دفعة تحت ظروف تنمية ثابتة (إضاءة مستمرة 10000 لوكس، سرعة دوران 250 دورة/د، تدفق غازات (هواء + CO_2) 2 لتر/د، تركيز غاز CO_2 في الهواء 500ppm وأخرى متغيرة درجة الحرارة (15، 25، 35 س°) تركيز نترات الصوديوم (0.1، 0.25، 0.4 غ/ل) ودرجة pH (6، 7، 8)، حيث يحدث تغيير متغير واحد مع تثبيت باقي ظروف النمو في كل دفعة.واختُيرت القيم المركزية لظروف النمو السابقة (25 س°، 0.25 غ/ل، pH = 7) كونها الأفضل لنمو الطحالب الخضراء الدقيقة ولاسيما النوع المدروس وفق Hernande وآخرين (2009) و Yehوآخرين (2010).أجريت عملية التنميةفي كل دفعة بتلقيح وسط الطحالب BBM الموجود داخل المفاعل الحيوي بكمية من المزرعة النقية للطحالب (بادئ) المحضرة مسبقاً إذ استمرت إضافة البادئ حتى وصلت الامتصاصية الضوئية(المقاسة بالمطياف الضوئي Spectrophotometer) لوسط النمو إلى 150 عند طول موجة 680 نانومتر.

في نهاية اليوم 15 للتنمية أُجريت عملية فصل للطحالب عن المحلول المغذي باستعمال جهاز فصل الطحالب المصمم والمصنع في الهيئة العامة للتقانة الحيوية أيضاً وهو يعتمد على ترشيح وسط التغذية مع حمولته من الطحالب الخضراء باستعمال مرشحة خزفية ذات مسام بقطر 0.5 ميكرون تحت التفريغ. بعد الحصول على الكتلة الحيوية الرطبة (70 – 81% رطوبة) من جهاز فصل الطحالب أجري تجفيف العينات بطريقة التجفيد، وهي الطريقة التي ينصح بها Molina وآخرون (2003)كونها تحافظ على العينة بشكلها الأمثل لاستخلاص مركباتها الكيميائية، ولم تتجاوز نسبة الرطوبة في العينة المجففة النهائية 7%.

أُجريت التجارب في مختبرات الهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق وفي مختبرات قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة جامعة تشرين وفي مختبرات قسم علم الحياة النباتية في كلية العلوم بجامعة دمشق، خلال عام 2015.

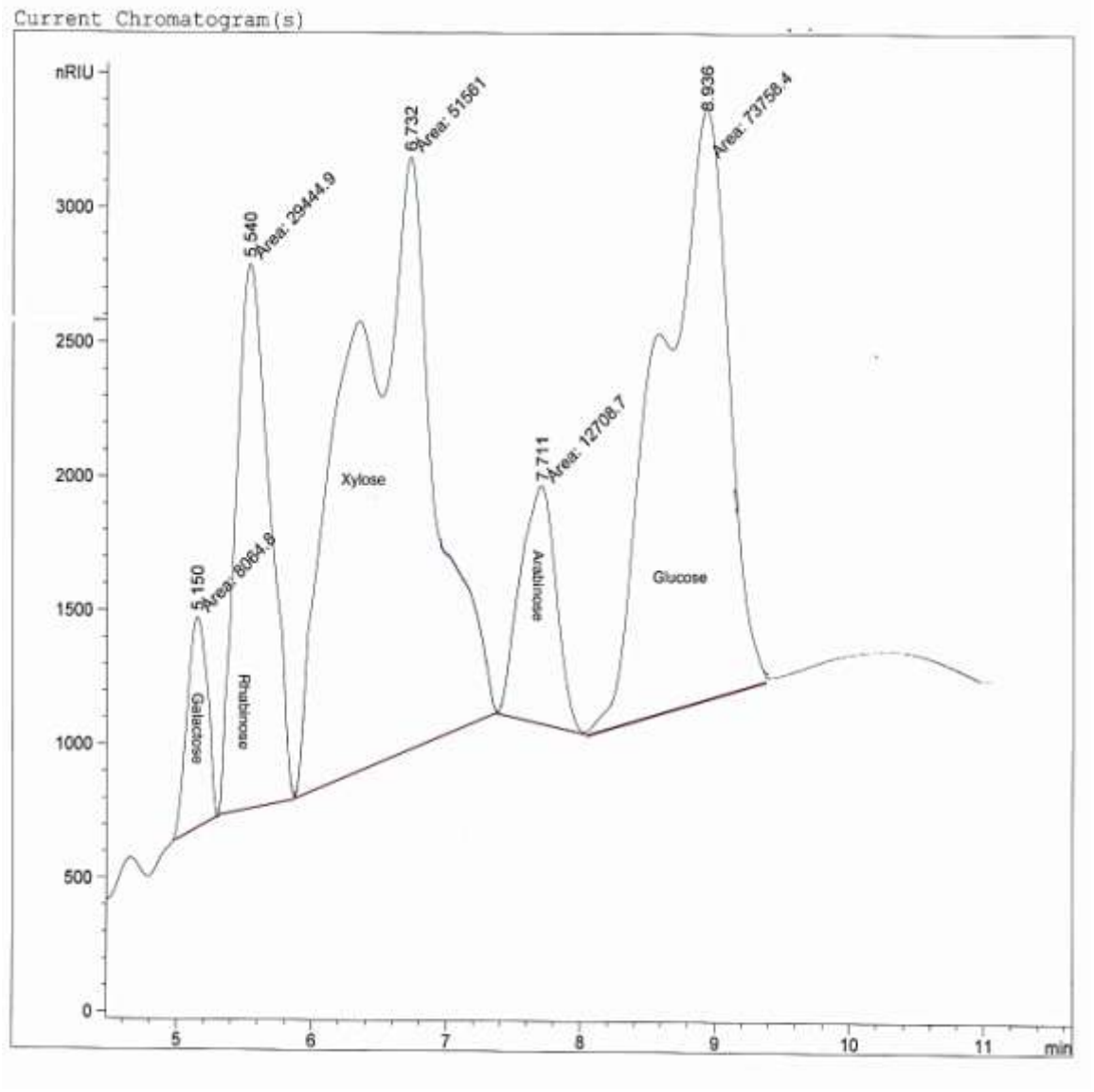
تقدير الكربوهيدرات الكلية كمياً:قدرت الكربوهيدرات كنسبة مئوية من المادة الجافة الكلية بطريقة الأنثرون Anthrone methodالتي تعتمد على حلمهة المركبات الكربوهيدراتية في العينة بحمض الكبريت 75% وتحويلها إلى غلوكوز ثم فيرول بحيث يرتبط الأخير بمركب الأنثرون لتكوين محلول ذي لون بتدرجات الأخضر تختلف شدته حسب نسبة الكربوهيدرات المحلمهة، حيث قيست الامتصاصية الضوئية لمحلول الحلمهة عند طول موجة 578نانومتراًباستعمال المطياف الضوئي ومنها تم حساب نسبة الكربوهيدرات في العينة (Gerhardt *et al.*, 1994).حسبت تراكيز الكربوهيدرات في العينات المدروسة اعتماداً على معادلة خط الانحدار (كما في الشكل 1) التي استنتجت بناءً على دراسة علاقة الارتباط بين تراكيز محاليل غلوكوز عيارية (عوملت بالمعاملات نفسها التي عوملت بها العينة) والامتصاصية الضوئية لها عند طول الموجة السابق نفسه، وعُبّر عن التراكيز بالميكروغرام/مل التي حولت لاحقاً لنسب مئوية.



الشكل(1): مخطط معياري لعلاقة الارتباط بين تراكيز الغلوكوز والامتصاصية الضوئية

Y: التركيز ملغ/ل ، x: الامتصاصية الضوئية عند طول موجة 578 نانومتر

-التقدير النوعي للكربوهيدراتفي عينات الطحالب : حسبت السكريات الأحادية كنسبة مئوية من المادة الجافة الكلية حيثأجري التقدير النوعي وفق الطريقة المتبعة في المختبر الوطني للطاقة المتجددة (NREL) رقم TP-5100- 60957 الموصى بها من قبل Van Wychen و Laurens (2015)، وهي تعتمد على حلمهة العينة بحمض الكبريت لإرجاع جميع السكريات المعقدة إلى صيغتها الأحادية ثم تقديرها باستعمال تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، بوساطة جهاز HPLC ماركة Agilent الأمريكية طراز 1100مزود بكاشف قرينة الانكسار RID، تمت التحاليل باستعمال عمود Agilent ZorbaxCarbohydrateطوله150مموقطره 4.6 مميحوي طوراً ثابتاً بسماكة 5 ميكرونات.فُصِلت ومُيِّزت خمسة أنواع من السكريات الأحادية هي: الغلوكوز والغالاكتوز والأرابينوز والرامنوز والزايلوز .حُدِّد زمن الاحتباس والمساحات المعيارية للسكريات الأحادية ضمن الشروط التي ضُبط عليها جهاز HPLC باستعمال تراكيب معيارية نقية معروفة التركيز للسكريات الأحادية تم الحصول عليها من شركة Sigmaوبالمقارنة معها كما في الشكل(2) الآتي:



الشكل (2): منحني كروماتوغرام السكريات المعيارية في جهاز HPLCبتركيز 300 ppm

التحليل الإحصائي:

أجري تحليل النتائج باستعمال تجارب القطاعات العشوائية البسيطة وفق النموذج الإحصائي العام

$X_{ijl} = \mu + \beta_j + \varepsilon_{ijl}$ حيث أن :

X_{ijl} : الصفة المدروسة (المحتوى الكلي من الكربوهيدرات، السكريات الأحادية كلاً على حدة).

μ : المتوسط العام للصفة.

β_j : تأثير القطاعات (نسبة N، PH، درجة الحرارة) j(عدد القطاعات 3 لكل متغير)

ε_{ijl}: الخطأ العشوائي (الخطأ المتبقي).

أجريت التحاليل الإحصائية باستعمال البرنامج الإحصائي IBM SPSS Statistics 20 من خلال طريقةOne-Way ANOVAمتبوعة باختبار Tukey للمقارنة بين المتوسطات،وكانت جميع التجارب الإحصائية عند مستوى ثقة 95%.

النتائج والمناقشة

أولا: تأثير درجة الحرارة في كميةالكربوهيدرات ونوعيتها:

أ - الكربوهيدرات الكلية:

يتضح من النتائج في الجدول (2)تغير كمية الكربوهيدرات مع تغير درجة الحرارة على نحو معنوي ، وبلغ أقصى حد له عند درجة الحرارة 15س°، بقيمة تساوي ضعف ما وصل إليه تقريبا عند درجة الحرارة 25 س°، وهذا يتفق مع حقيقة أن انزياح درجة الحرارة عن القيم المثالية للنمو يترافق دوماً مع ازدياد في نسبة الكربوهيدرات الكلية كما أشارت نتائج الأبحاث (De Oliveira *et al.*,1999)، ومما يجدر ذكره، أن هذا الازدياد في نسبة السكريات كان عند درجات الحرارة الأعلى (35 س°) أقل مما هو عليه عند الحرارة الأدنى (15 س°) وبفرق معنوي واضح مقارنة بدرجة الحرارة المثالية (25 س°)؛ مما يشير إلى أن التأثير السلبي لرفع درجة الحرارة عن الحد المثالي لها حتى درجة 35 س°في النوع*C. vulgaris* أقل مما هو عليه عند خفض درجة الحرارة حتى 15 س° وفقاً للتأثير الذي يحدثه تغير درجة الحرارة في لزوجة السيتوبلازما وهو ما يسبب ردة فعل تتجلى في زيادة تخزين الكربوهيدرات تتناسب مع هذا التأثير كما أشارت الأبحاث السابقة في هذا المجال (Raven and Geider, 1988).

جدول 2: تأثير درجة الحرارة في كمية كربوهيدرات طحالب النوع *C. vulgaris* ونوعيتها.

درجة الحرارة / المتغيرات	15م°	25م°	35م°
المادة الجافة الكلية (غ/ل)	$^{a}0.38 \pm 3.54$	$^{c}0.69 \pm 0.01$	$^{b}0.48 \pm 0.01$
الكربوهيدرات الكلية %	$^{c}40.12 \pm 3.56$	$^{a}22.14 \pm 1.08$	$^{b}30.03 \pm 1.79$
غالاكتوز %	$^{b}11.37 \pm 1.00$	$^{b}10.78 \pm 0.52$	$^{a}6.42 \pm 0.38$
غلوكوز %	$^{c}8.47 \pm 0.75$	$^{b}6.84 \pm 0.33$	$^{a}5.38 \pm 0.32$

رامنوز %	$^{b}8.59 \pm 0.76$	$^{a}2.49 \pm 0.12$	$^{c}15.68 \pm 0.93$
زايلوز %	$^{c}6.14 \pm 0.54$	$^{b}1.63 \pm 0.08$	$^{a}0.58 \pm 0.03$
أرابينوز %	$^{c}5.57 \pm 0.49$	$^{a}0.40 \pm 0.02$	$^{b}1.98 \pm 0.12$

الأحرف المتشابهة ضمن الصف الواحد تشير لعدم وجود فرق معنوي على مستوى ثقة 95%

ب - السكريات الأحادية:

يظهر الجدول(2)،الاختلافات الحاصلة في نسب السكريات الأحادية الناتجة بتغير درجات حرارة النمو،فقد كانت نسبة الغالاكتوز متقاربة عند درجتي الحرارة 15س° و 25س°، لكنها أعلى بفارق معنوي مما كانت عليه عند درجة الحرارة 35س°،وهذا يؤكد تأثر نسبة البكتين سلبياً بارتفاع درجة الحرارة فوق 25 س° إذ إن الغالاكتوز هو الناتج الرئيس لحلمهة البكتين وفق Schutte(1991)، وتعبر الزيادة في نسبة الغالاكتوز عن نشاط النمو الخلوي؛ إذ يتحد الغالاكتوز مع الليبيدات مكونا galactolipids في جدار الخلية ويشكل الأغشية المسؤولة عن إتمام عملية التركيب الضوئي (Harwood, 2004). أما الغلوكوز فقد تدرج صعوداً وبفارق معنوي مع انخفاض درجة الحرارة من 35س° إلى 15س°، وهذا يؤكد وجود تناسب عكسي بين نسبة النشا والسليلوز من جهة ودرجة الحرارة من جهة أخرى،لأنالسكرين المعقدين الأخيرين هما المسؤولان الرئيسان عن إنتاج الغلوكوز بالحلمهة (Schutte, 1991)، وقد حقّق الرامنوز النسبة الأكبر في درجة حرارة 35س° وبفارق ضعفين عن درجة الحرارة 15س°وستة أضعاف عن درجة الحرارة 25س°، وهذا يعزى لارتفاع نسبة السكريات ا لمعقدة الحمضية الموجودة في جدار الخلية في درجات الحرارة العالية التي تنتج بعد حلمهة الرامنوز(Popper and Tuohy, 2010; Pieper *et al.*, 2012)، كما ارتفعت نسبة الزايلوز بوضوح في درجة حرارة 15س°بعد أن كانت شبه معدومة عند درجة حرارة 35س°؛مما يدل على زيادة تكوين الهيميسليلوز مع انخفاض الحرارة لأنه المصدر الرئيس للزايلوزكما أشار Schutte(1991)، وازدادت نسبة الأرابينوز بمقدار ضعفين عند خفض درجة الحرارة من 35س°إلى15س°؛مما يدل على زيادة البروتينات السكرية glycosylated proteins التي تدخل في تركيب الجدر الخلوية التي تعطي بحلمهتها الغ الاكتوز والأرابينوز وفقاً لـPopper وآخرين (2011).

ثانياً: تأثير نسبة نترات الصوديوم في كمية الكربوهيدرات ونوعيتها:

أ - الكربوهيدرات الكلية:

بينت النتائج في الجدول (3) أن التركيز المنخفض 0.1غ/ل من نترات الصوديوم أعطى أعلى نسبة من الكربوهيدرات في حين لم يلاحظ وجود فرق معنوي بين التركيزين 0.25غ/ل و 0.4غ/ل؛ وهذا يتفق مع التفسير بأن محتوى الطحالب من الكربوهيدرات يزداد، كآلية للبقاء، تحت ظروف عوز النتروجين في وسط النمو، حيث تتوقف الخلايا عن الانقسام وتتجه إلى تخزين الطاقة على هيئة ليبيدات وكربوهيدرات (Encarnación*et al.*, 2010;Pancha*et al.*, 2014).

ب - السكريات الأحادية:

يلاحظ من الجدول (3) أن نسبة جميع السكريات الأحادية ازدادت معنوياً عند خفض تركيز نترات الصوديوم إلى 0.1غ/ل، باستثناء سكر الغلوكوز الذي حافظ على نسبة ثابتة تقريباً، ولم يتأثر بتغير التركيز؛ مما يعني عدم وجود علاقة بين نسبة النتروجين في وسط النمو ونسبة كل من النشا والسليلوز المصدر الرئيس للغلوكوز بعد الحلمهة وفقاً لما ذكره Schutte(1991). كما أظهر سكر الغالاكتوز تأثرا كبيراً مع تغير تركيزالنترات، حيث تضاعف

الجدول 3: تأثير تركيز نترات الصوديوم في كمية كربوهيدرات طحالب النوع *C. vulgaris* ونوعيتها

نسبة النترات / المتغيرات	0.1 غ/ل	0.25 غ/ل	0.4 غ/ل
المادة الجافة الكلية (غ/ل)	$^{a}0.59 \pm 0.01$	$^{b}0.69 \pm 0.01$	$^{c}0.74 \pm 0.01$
الكربوهيدرات الكلية %	$^{b}35.50 \pm 3.13$	$^{a}22.14 \pm 1.08$	$^{a}20.95 \pm 2.69$
غالاكتوز %	$^{c}16.81 \pm 1.48$	$^{b}10.78 \pm 0.52$	$^{a}8.04 \pm 1.03$
غلوكوز %	$^{a}8.09 \pm 0.71$	$^{a}6.84 \pm 0.33$	$^{a}7.27 \pm 0.93$
رامنوز %	$^{b}3.51 \pm 0.31$	$^{a}2.49 \pm 0.12$	$^{b}4.40 \pm 0.57$
زايلوز %	$^{c}3.62 \pm 0.32$	$^{b}1.63 \pm 0.08$	$^{a}0.54 \pm 0.07$
أرابينوز %	$^{b}3.47 \pm 0.31$	$^{a}0.40 \pm 0.02$	$^{a}0.70 \pm 0.09$

الأحرف المتشابهة ضمن الصف الواحد تشير لعدم وجود فرق معنوي على مستوى ثقة 95%.

مع كل خفض للتركيز ابتداءً من 0.4غ/ل، ومن المحتمل أن يكون هذا مرتبط بزيادة نسبة البكتين المرافقة لنقص النتروجيني، إذ إن الغالاكتوز ناتج الحلمهة الأساسي من البكتين وفق ما ذكرهBurana-osota(2010)، بينما لم يكن خفض التركيز من 0.4غ/ل إلى 0.25غ/ل مؤثراً في الأرابينوز.وأما فيما يتعلق بالرامنوزفقد ازداد عما كان عليه عند التركيز 0.25 غ/ل، وبفرق معنوي، مع تغير تركيز النترات زيادة أونقصاناً، وهذا مرتبط بزيادة أونقصان كمية السكريات المعقدة البكتينية التي يعدّ الرامنوز أحد أهم نواتج حلمهتها كما أشار Buchanan وآخرون (2000).

ثالثاً: تأثير قيمة pH وسط النمو في كميةالكربوهيدرات ونوعيتها:

أ - الكربوهيدرات الكلية:

أظهرت النتائج في الجدول (4)تأثُّر الكربوهيدرات الكلية بوضوح وعلى نحو معنوي باختلاف قيم pHوسط النمو، ولما كان الوسط المعتدل هو الأمثل لنمو هذا النوع *C. vulgaris*فإن أي انحراف في قيم pHعن القيمة 7 أدى إلى زيادة في كمية الكربوهيدرات الكلية التي بلغت أعلى مستوى لها في الوسط المائل نحو الحموضة،وهذا يتفق مع ما ذكره Yeh وآخرون (2010) حول التأثير السلبي للوسط الحمضي على نمو خلايا هذا النوع من الطحالب الدقيقة، وبرر ذلك Zangوآخرون (2011) إذ يكون الكربون في الأوساط الحمضية بصيغة يصعب امتصاصها من قبل الطحالب؛ مما يحرض ردة فعل تتجلى في تخزين الكربوهيدرات كآلية للبقاء.

ب - السكريات الأحادية:

يلاحظ من النتائج في الجدول (4) أيضا ازدياد نسبة كل من سكر الغالاكتوز والغلوكوز مع ازدياد قيمة pH في حين سلك الزايلوز سلوكاً معاكساً، بينما كان تأثير الوسط الحمضي واضحاً في سكر الرامنوز الذي فاق بستة أضعاف الوسط المعتدل وضعفين في الوسط القلوي. وقد انحصر تأثُّر الأرابينوز إيجابياً بانخفاض قيمة pHوكان تأثُّره بالوسط القلوي ظاهرياً، وهذا يعني وفقاً للنواتج النهائية لحلمهة المركبات السكرية المشار إليها من قبل Schutte(1991)، أن نسبة السليلوز والنشا والبكتين تزداد في الوسط القلوي على حساب الهيميسليلوز والسكريات المعقدة الحمضية وباقي المركبات الكربوهيدراتية.

الجدول 4: تأثير pH في كمية كربوهيدرات طحالب النوع *C. vulgaris* ونوعيتها.

pH / المتغيرات	6	7	8
المادة الجافة الكلية (غ/ل)	^{a}0.11 ± 0.01	^{c}0.69± 0.01	^{b}0.50 ±0.01
الكربوهيدرات الكلية %	^{c}37.84 ± 2.60	^{a}22.14 ± 1.08	^{b}30.91 ± 2.95
غالاكتوز %	^{a}6.82 ± 0.47	^{b}10.78 ± 0.52	^{c}13.24 ± 1.27
غلوكوز %	^{a}4.72 ± 0.32	^{b}6.84 ± 0.33	^{c}9.02 ± 0.86
رامنوز %	^{c}15.71 ± 1.08	^{a}2.49 ± 0.12	^{b}7.16 ± 0.68
زايلوز %	^{c}5.20 ± 0.36	^{b}1.63 ± 0.08	^{a}0.65 ± 0.06
أرابينوز %	^{b}5.39 ± 0.37	^{a}0.40 ± 0.02	^{a}0.85 ± 0.08

الأحرف المتشابهة ضمن اللون الواحد أو السطر الواحد تشير لعدم وجود فرق معنوي على مستوى ثقة 95%.

أنواع ونسب سكريات كربوهيدرات الطحالب الدقيقة نوع *C. vulgaris*:

بينت النتائج المتحصل عليها في هذا البحث بشكل عام أن محتوى النوع *C.vulgaris* من الكربوهيدرات تراوح بين 2.690 ± 20.95% و 3.541 ± 40.124%، وهو يقارب المجال 20–40% الذي حدده Hu (2004)، إلا أنه جاوز القيم المحددة من قبل Becker (1994) للنوع نفسه، فقد وقعت ضمن المجال 12 – 17% فقط، ويعود اختلاف نسبة الكربوهيدرات لاختلاف ظروف النمو الفيزيائية والغذائية كما ذكر الباحث (Becker, 2007). ويوضح الجدول (5) تركيب كربوهيدرات طحالب النوع ***C. vulgaris*** من السكريات الأحادية :

الجدول(5): النسب العظمى والدنيا للسكريات الأحادية الداخلة في تركيب كربوهيدرات طحالب النوع *C. vulgaris*.

السكر الأحادي	S.D±النسبة العظمى	S.D±النسبة الدنيا
الغالاكتوز	16.81 ±1.48	6.42±0.38
الغلوكوز	9.02±0.86	4.72 ±0.32
الرامنوز	15.71 ±1.08	2.49±0.12
الزايلوز	6.137±0.541	0.54±0.07
الأرابينوز	5.58 ±0.49	0.40 ±0.02

يُلاحظ من النتائج في الجدول (5) تفوق نسبة كل من سكر الغالاكتوز والرامنوز على باقي السكريات الأحادية، وكانت النسبة الأقل من نصيب الأرابينوز؛ الأمر الذي جاء متفقاً مع نتائج بعض الدراسات السابقة، إذ بيّن Harwood (2004) أن نسبة الغالاكتوز هي السائدة في النوع *C.vulgaris*، وكانت السيادة لنسبة الرامنوز في النوع نفسه لدى Ogawa وآخرين (1999)، ولكن مخالفاً من ناحية أخرى لما وجده Athbi وآخرون (2012) في أن نسبة الغلوكوز هي الأعلى (11.5%) بين جميع السكريات، مع تقارب نسب السكريات الأخرى إلى حد كبير (نحو 8.6%)؛وهذا يمكن تفسيره باختلاف ظروف نمو طحالب النوع المذكور.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات

- تراوح المحتوى الكلي من الكربوهيدرات فيالنوع *C. vulgaris* بين 20% و40%.
- يسود كل من سكر الغالاكتوز والرامنوز على باقي السكريات الأحادية في طحالب النوع *C. vulgaris*.
- درجة الحرارة 15 س° هي الأفضل للحصول على أكبر كمية من الكربوهيدرات بأعلى نسبة من النشا والسليلوز والهيميسليلوز والبكتين.
- درجة الحرارة 35 س°هي الأفضل للحصول على أعلى نسبة من سكر الرامنوز.
- التركيز المنخفض (0.1غ/ل) من نترات الصوديوم هو الأفضل للحصول على أكبر كمية من الكربوهيدرات بأعلى محتوى من البكتين والمعقدات التي يكوّنها.
- لا يتأثر محتوى الكتلة الحيوية من الغلوكوز الممثَّل بالسليلوز والنشاء بنسبة النتروجين في وسط النمو.
- الوسط الحمضي هو الأفضل للحصول على أكبر كمية من الكربوهيدرات الكلية يليه الوسط القلوي.
- تزداد نسبة السليلوز والنشا والبكتين في الوسط القلوي على حساب الهيميسليلوز والسكريات المعقدة الحمضية وباقي المركبات الكربوهيدراتية .

التوصيات

- زيادة الاهتمام بالأبحاث التطبيقية على الطحالب الخضراء الدقيقة المنتشرة في المياه السورية لأهميتها كمصدر متجدد للكتلة الحيوية.
- الاستفادة من نتائج البحث وتطبيقها عملياً بهدف الحصول على كتلة حيوية تناسب أغراضاً تصنيعية معينة في مجالات كثيرة.
- إجراء المزيد من الأبحاث على تأثير مجالات أوسع من درجات الحرارة ونسب النتروجين وقيم pH وتحديد الأنسب في الحصول على الكربوهيدرات.
- دراسة العوامل الأخرى المؤثرة في كمية الكربوهيدرات في الطحالب الدقيقة كالإضاءة ونسبة CO_2.

المراجع:

APHA, AWWA, WPCF. *Standards methods for the examination of water and wastewater*. 21st ed., APHA-AWWA-WPCF, Washington, DC, 2005.

ATHBI, A. M., Dawwood S. A. and Anfal N. A. *The quantity determination of total carbohydrates and monosaccharides from some green algae (ChloropHyta).* Marsh Bulletin, Vol. 7, N°.1, 2012, 27-38.

BATTAH, M. G., El-Ayoty, Y. M. Esmael, A. E. and Abd El-Ghany, S. E. *Effect of different concentrations of sodium nitrate, sodium chloride, and ferrous sulpHate on the growth and lipid content of Chlorella vulgaris*. Journal of Agricultural Technology, Vol. 10, N°. 2, 2014, 339-353.

BECKER, E. W. *Microalgae as a source of protein*. Biotechnology advances, Vol. 25, N°. 2, 2007, 207–210.

BECKER, E. W. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, U.K., 1994, 186-187.

BISCHOFF, H.W. and Bold, H.C. *Phycological studies. IV. Some soil algae from EnchantedRock and related algal species*. University of Texas Publications, Vol. 6318, 1963, 1-95.

BROWN, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K. and Dunstan, G. A. *Nutritional properties of microalgae for mariculture*. Aquaculture, Vol. 151, , 1997, 315-331.

BUCHANAN, B. B., Gruissem, W. and Jones, R. L. Biochemistryand Molecular Biology of Plants. American Society of Plant PHysiologists, Rockville, Maryland, 2000, 1367.

BURANA-OSOTA,j., Soonthornchareonnonb, N., Chaidedgumjorna, A., Hosoyamac, S. and Toidac, T. *Determination of galacturonic acid from pomelo pectin in term of galactose by HPAEC with fluorescence detection*. Carbohydrate Polymers, Vol. 81, N°. 2, 2010, 461–465.

DE OLIVEIRA, M. A. C. L., Monteiro, M. P. C., Robbs, P. G. and Leite, S. G. F. *Growth and chemical composition of Spirulina maxima and Spirulina platensis biomass at different temperature*. J.Aqua. Intl., Vol. 7, N°. 4, 1999, 261-275.

ENCARNACIÓN, R. C., Benitez, S. G., Santos, M. G., and Medina, C. S. *Maximization of Scenedesmus dimorpHus Lipid Yield for the Production of Biodiesel*. Polytechnic University of Puerto Rico San Juan, Puerto Rico, 2010.

GERHARDT, P., Murray, R. G., Wood, W. A. and Krieg, N. R. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington DC., 1994.

GOUVEIA, L. *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*, in *Springer Briefs in Microbiology*. 1st. ed., Springer Publisher, Berlin Heidelberg, 2011, 68.

GUCKERT, J. B. and Cooksey, K. E., *Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes inChlorella (ChloropHyta) during high pH induced cell cycle inhibition*. J. PHycol., Vol. 26, N°. 1, 1990, 72–79.

HARWOOD, J. L. *Membrane Lipids in Algae*. In: Siegenthaler, P. A. and Murata, N. [Eds.] *Lipids in PHotosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Springer, Dordrecht, 2004, 53-64.

HERNANDEZ, J. P., de-Bashan, L. E., Rodriguez, D. J., Rodriguez, Y. and Bashan, Y. *Growth promotion of the freshwater microalga Chlorella vulgaris by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium Bacillus pumilus from arid zone soils*, Eur. J. Soil Biol., Vol. 45, N°. 6, 2009, 88–93.

HU, *Q. Environmental effects on cell composition.* In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook ofMicroalgal Culture*. Blackwell Science Ltd., Oxford OX2 0EL, UK, 2004, 83–93.

LAL, D. *India: Population Change and Its Consequences*. Population and Development Review, Vol. 32, N°.1, 2006, 145–182.

MCHUGH, D. J. *A guide to the seaweed industry*. FAO Fisheries Technical, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2003, 441.

MIRANDA, J. R., Passarinho, P. C. and Gouveia, L. *Bioethanol production from Scenedesmus obliquus sugars:the influence of pHotobioreactors and culture conditions on biomass production*. Appl.Microbiol.Biotechnol., Vol. 96, N°. 2, 2012, 555–564.

MISURCOVA, L., Skrovankova, S., Samek, D., Ambrozova, J. and Machu, L. *Health benefits of algal polysaccharides in human nutrition*. Advances in Food and Nutrition Research, Vol. 66, 2012, 75-145.

MOLINA-GRIMA, E., Belarbi, E-H., AciénFernández, F. G., Robles Medina, A. andChisti, Y. *Recovery of microalgal biomass and metabolites: processoptions and economics*. Biotechnology Advances, Vol. 20, 2003, 491–515.

OGAWA, K., Ikeda, Y. and Kondo S. A. *new trisaccharide, α-d-glucopyranuronosyl-(1 →3)- α -l-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -l- rhamnopyranose from Chlorella vulgaris*. Carbohydr. Res., Vol. 321, N°. 1–2, 1999, 128-131.

PANCHA, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R. and Mishra, S. *Nitrogen stress triggered biochemical and morpHological changes in the microalgae Scenedesmus sp. CCNM 1077*. Bioresour. Technol., Vol. 156, 2014, 146-154.

PARVIN, M., Zannat, M. N. and Habib, M. A. B. *Two Important Techniques for Isolation of Microalgae*. Asian Fisheries Science Journal. Vol. 20, N°. 1, 2007, 117-124.

PETTERSEN, R. C. and Schwandt, V. H. *Wood sugar analysis by anion chromatograpHy*. J. Wood Chem. Technol., Vol. 11, N°. 4, 1991, 495–501.

PHANG, S. M. and Chu W. L. *Algae culture Collection, Catalogue of Strains*. Institute of Post Graduate Studies and Research, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia, 1999, 77.

PIEPER, S., Unterieser, I., Mann, F. and Mischnick, P. *A new arabinomannan from the cell wall of the chlorococcal algae Chlorella vulgaris*. Carbohydr. Res., Vol. 352, 2012, 166-176.

POPPER, Z. A. and Tuohy, M. G. *Beyond the green: understanding the evolutionary puzzle of plant and algal cell walls*. Plant PHysiol., Vol. 153, N°. 2, 2010, 83-373.

POPPER, Z. A., Gurvan, M., Hervé, C., Domozych, D., Willats, W. G. T., Tuohy, M. G., Kloareg, B. and Stengel, D.B. *Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants*. Annual Review of Plant Biology, Vol. 62, 2011, 567-90.

PRIYADARSHANI, I. and Rath, B. *Commercial and industrialapplications of micro algae - A review*. J Algal BiomassUtln., Vol. 3, N°. 4, 2012, 89-100.

RACHLIN, J. W. and Grosso, A. *The effects of pH on the growth ofchlorella and its interactions with cadmium toxicity*. Arch. Environ. Toxicol., Vol. 20, N^{o}. 4, 1991, 5005-5008.

RAVEN, J.A. andGeider, R.J. *Temperature and algal growth*. New PHytol. Vol. 110, N°.4, 1988, 441–461.

ROUSCH, J. M., Bingham, S. E. and Sommaerfeld, M. R. *Change in fatty acid profiles of thermo-intolerent and thermo tolerant marine diatoms during temperature stress*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, Vol. 295, N°. 2, 2003, 145-156.

SCHUTTE, J. B. *Nutritional value and pHysiological effects of D-xylose and L-arabinose in poultry and pigs*. PHD. Thesis, Wageningen University,the Netherlands, 1991, 172.

SLUITER, J. B., Ruiz, R. O., Scarlata, C. J., Sluiter, A. D. and Templeton, D.W. *Compositional Analysis of lignocellulosicFeedstocks. 1. Review and Description of Methods*. J. Agric. Food Chem., Vol. 58, N°. 16, 2010, 9043–9053.

SYDNEY, E. B., Sturm, W., Carvalho, J.C. Thomaz-Soccol, V. Larroche, C. Pandey, A. and Soccol, C.R. *Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae*. Bio resource Technology, Vol. 101, N°. 15, 2010, 5892-5896.

TEMPLETON, D. W., Quinn, M., Van Wychen, S., Hyman, D. and Laurens, L. M. L. *Separation and quantification of microalgal carbohydrates*. Journal of ChromatograpHy, U. S. A., Vol. 1270, 2012, 225–234.

VAN WYCHEN, S. and Laurens, L. M. L. *Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass*. NREL/TP-5100-60957. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2015.

WANG, J. and Evangelou, V. P. *Metal tolerance aspects of plant cell wall and vacuole*. In:Pessarakli, M. (Ed.), *Handbook of Plant and Crop PHysiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, U. S. A., 1995,695– 717.

YEH, K. L. and Chang, J. S. *Effects of Cultivation Conditions and Media Composition on Cell Growth and Lipid Productivity of Indigenous Microalga Chlorella vulgaris ESP-31*. Journal of Bioresource Technology, Vol. 105, 2012, 120-127.

YEH, K., Chang, J. and Chen, W. *Effect of light supply and carbon source on cell growthand cellular composition of a newly isolated microalga Chlorella vulgaris ESP-31*. Engineering in Life Sciences. Vol. 10, N°. 3, 2010, 201-208.

ZANG, C., Huang, S., Wu, M., Du, S., Scholz, M., Gao, F., Lin, C., Guo, Y. and Dong, Y. *Comparison of Relationships between pH, Dissolved Oxygen and ChloropHyll a for Aquaculture and Non-aquaculture Waters.* Water, Air and Soil Pollution, Vol. 219, N°. 1-4, 2011, 157-174.

ZHOU, N., Zhang, Y., Wu, X., Gong, X. and Wang, Q. *Hydrolysis of Chlorella biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl2*. Bioresource Technol., Vol. 102, N°.21, 2011, 10158–10161.