مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (39) العدد (4) 2017
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (39) No. (4) 2017

Effect of some growth conditions on biomass carbohydrates of *Scenedesmus dimorphus isolated from Syrian fresh water*

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

(Received 2 / 2 / 2017. Accepted 20 / 7 /2017)

□ ABSTRACT □

According to the importance of studying total carbohydrates and its structure of monosaccharaides in the downstream applications for fermentation and food industry; this research was conducted to estimate the quantitative and qualitative content of carbohydrates in the microalgae *Scenedesmus dimorphus* isolated from local fresh water, and to determine the effects of the temperature (15, 25, 35°C) , the concentration of sodium nitrate (0.1, 0.25, 0.4 g / L) and the pH values (6, 7, 8) during growth. The results, showed that the total amount of carbohydrates ranged for all the different growth conditions between 14% and 44%, and galactose was prevalent among the monosaccharaides. It also showed that applied temperatures had no effect on the total carbohydrates, but the highest percentage of starch and cellulose was obtained at 25°C, and the lower temperature stimulated hemicellulose and glycoproteins formation. On the other hand, lower concentration of nitrate (0.1 g / L)produced the highest amount of carbohydrates and pectin in particular , while starch, cellulose and hemicellulose were not affected by nitrogen in the growth medium. The total carbohydrates, including the pectin, were increased by shifting the pH from the neutral value, while the cellulose and starch increased in the alkaline media only, on behalf of hemicellulose.

Keywords: *Scenedesmus dimorphus*, growth conditions, carbohydrate, monosaccharaides, green microalgae.

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

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (39) العدد (4) 2017
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (39) No. (4) 2017

تأثير بعض شروط النمو في كربوهيدرات الكتلة الحيوية لنوع الطحالب الخضراء الدقيقة *Scenedesmus dimorphus* المعزول من المياه العذبة السورية

د. محمد ديب نداف*

د. عدنان علي نظام**

حسام عكو***

(تاريخ الإيداع 2 / 2 / 2017. قبل للنشر في 20 / 7 / 2017)

□ ملخّص □

اعتماداً على الحاجة لإيجاد مصادر جديدة غير تقليدية لكربوهيدرات ذات بنية هيكلية معينة لاستعمالها في التخمير والصناعات الغذائية، أُجري هذا البحث بهدف تقدير الكربوهيدرات الكلية ومحتواها من السكريات الأحادية في أحد أنواع الطحالب المعزول من المياه العذبة السورية *Scenedesmus dimorphus*، وتحديد مدى تَأثُّرها باختلاف درجة الحرارة (15، 25، 35 س°) وتركيز نترات الصوديوم (0.1، 0.25، 0.4 غ/ل) وقيم pH وسط النمو (6، 7، 8).

تراوحت كمية الكربوهيدرات الكلية ضمن ظروف النمو المختلفة من 14% إلى 44%، وتميَّز الغالاكتوز بالسيادة على باقي أنواع السكريات الأحادية، وليس لتغير درجة الحرارة ضمن المجال 15–35 س° أي تأثير في كمية الكربوهيدرات الكلية، ولكن كانت أعلى نسبة من النشاء والسليلوز عند درجة الحرارة 25 س°، وقد حفزت الحرارة المنخفضة على تكوين الهِميسليلوز، والبروتينات السكرية. كما حقق التركيز المنخفض0.1غ/ل من نترات الصوديوم أكبر كمية من الكربوهيدرات بأعلى محتوى من البكتين، بينما لم يتأثر محتوى الكتلة الحيوية من النشا والسليلوز والهميسليلوز بنسبة النتروجين في وسط النمو، كما ازدادت النسبة الكلية للكربوهيدرات عند انزياح pH الوسط عن القيمة 7 ورافقها في ذلك زيادة البكتين، على عكس نسبة السليلوز والنشا التي ازدادت في الوسط القلوي على حساب الهميسليلوز.

الكلمات المفتاحية: *Scenedesmus dimorphus*، 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.

مقدمة

تنمو الطحالب أساساً في المياه، وهي ذاتية التغذية كالنباتات، إلا أنها تفوقها في إنتاج حمض الفوسفوغليسريك؛ الوحدة الأساسية في بناء الغلوكوز والحموض الدهنية والحموض الأمينية التي تمثّل بدورها أساس بناء الكربوهيدرات والليبيدات والبروتينات، على الترتيب (Gouveia, 2011)؛ الأمر الذي جعلها مورداً غير تقليدي للتزود بالمواد الأولية الصناعية والغذائية (Lal, 2006)، ودفع إلى تطوير تقنيات جديدة لاستزراع الطحالب واستعمال مستخلصاتها في الصناعات الغذائية والدوائية والتجميلية والنفطية وغيرها من الصناعات، في عدد من بلدان العالم (Priyadarshani and Rath, 2012)، مثل أنواع الأجناس *Spirulina*، *Chlorella*، *Scenedesmus* (من الطحالب الدقيقة Microalgae التي تضم الأنواع وحيدة الخلية) (Misurcova *et al.*, 2012).

يتكون التركيب الكيميائي للكتلة الحيوية في الطحالب الدقيقة من نسب متفاوتة من الليبيدات والبروتينات والكربوهيدرات (Hu, 2004)، وتختلف هذه النسب حسب نوع الطحلب وظروف النمو. ووفق Becker (1994) فإن نسبة الكربوهيدرات في النوع *S. dimorphus* تقع بين 21 – 52% وتعطي هذه النسبة المرتفعة من الكربوهيدرات لهذا النوع أهمية تصنيعية (Zhou *et al.*, 2011). وتتوزع الكربوهيدرات في خلايا الطحالب الدقيقة، ضمن الجدار الخلوي على هيئة سكريات معقدة، أهمها السليلوز(25–30%) والهميسليلوز(15–25%) والبكتين (35%) والغليكوبروتين (5–10%) (Wang and Evangelou, 1995)، فضلا عن نسب قليلة من الكيتوزان والآغار والألجينات alginate، ويخزن القسم الآخر على هيئة نشاء في الصانعات الخضراء، ويكوّن السليلوز مع النشاء القسم الأكبر من كربوهيدرات الطحالب الدقيقة (Pieper *et al.*, 2012)، ولكن تتغير نسب هذه المركبات الكربوهيدراتية ونوعيتها حسب نوع الطحالب وظروف نموها(Kapaun and Reisser, 1995)، وتتحلمه ثنائيات ومتعددات السكر لتعطي السكريات الأحادية، مثل: الغلوكوز Glucose والكزيلوز Xylose والغالاكتوز Galactose والأرابينوز Arabinose والمانّوز Mannose والرامنوز Rhamnose (كما في الجدول1). أكّدت الباحثة Albers (2013) في دراستها للحصول على الاتانول انطلاقاً من تخمير كربوهيدرات الكتلة الحيوية لنوع الطحالب *S. dimorphus* أن نسبة السكريات السداسية (الغلوكوز والغالاكتوز والمانوز) كانت متقاربة إلى حد ما وشكلت مانسبته 75 – 85% من مجمل الكربوهيدرات، وأشارت أيضاً إلى وجود الرامنوز ولكن بنسبة أقل، إلا أن هذه العلاقة كانت مختلفة عند النوع *S. obliquus*، إذ ساد الغلوكوز وتبعه المانوز ثم الكزيلوز، وكانت النسبة الأقل لسكر الأرابينوز (Miranda *et al.*, 2012).

الجدول 1: أهم السكريات الأحادية الناتجة عن الحلمهة الكاملة للسكريات الثنائية والسكريات المتعددة (Schutte, 1991).

نوع الكربوهيدرات	نواتج الحلمهة
السليلوز	غلوكوز Glucose
الهميسليلوز	غلوكوز + كزايلوز Xylose + أرابينوز Arabinose
سكريات الأوليغو Oligosaccharides	غلوكوز + فركتوز + غالاكتوز Galactose
البكتين	غالاكتوز + أرابينوز + حمض اليورنيك Uronic acid

يؤثر العديد من عوامل النمو الفيزيائية (درجة الحرارة، درجة الحموضة، شدة الإضاءة، ....الخ) والغذائية (مصدر ونسبة الآزوت، مصدر ونسبة الكربون) في كمية الكربوهيدرات ونوعيتها في الطحالب؛ مما يضفي اختلافات

معنوية على قيمتها الغذائية والاقتصادية (Brown *et al.*, 1997)، وأهم هذه العوامل: درجة الحرارة والمغذيات ودرجة الحموضة والضوء (Rousch *et al.*, 2003)، إذ إن التعرض لأي نوع من الإجهاد خلال فترة نمو الطحالب يؤدي إلى زيادة نسبة الليبيدات والكربوهيدرات في كتلتها الحيوية، يقابلها نقصان في نسبة البروتينات (Warr *et al.*, 1985; Tomaselli *et al.*, 1987; Oliveira *et al.*,1999). وقد تبين أنه في ظروف عوز النتروجين، يزداد عادة محتوى الطحالب من الكربوهيدرات كآلية للبقاء، إذ تتوقف الخلايا عن الانقسام وتتجه إلى تخزين الطاقة على هيئة كربوهيدرات (Encarnación *et al.*, 2010)، بينما تؤثر قيمة pH على نحو غير مباشر في المركبات الكربوهيدراتية، إذ تزيد القيم القلوية من تراكمها مع الليبيدات في خلايا الطحالب الدقيقة (Guckert and Cooksey, 1990)، فقد أكّد Jiang وآخرون (2013) مقدرة النوع *S. dimorphus* على النمو في مجال من قيم pH [6.5 – 8]؛ وبالتالي فإن الانزياح عن هذه القيم يرافقه زيادة في كمية الكربوهيدرات.

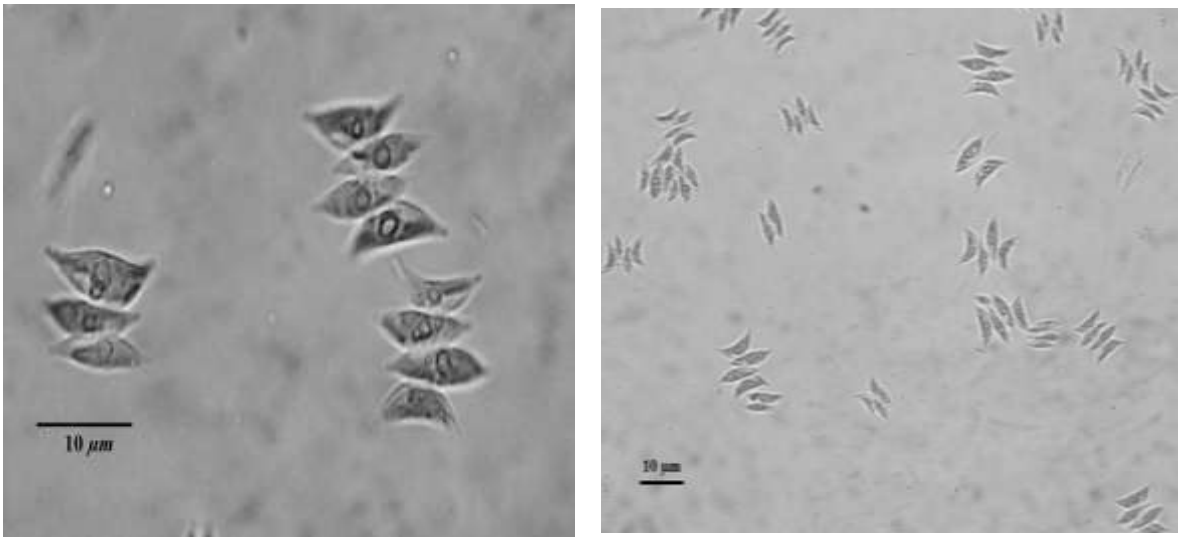
أهمية البحث وأهدافه

تكمن أهمية دراسة تركيب كربوهيدرات الطحالب من السكريات الأحادية، وتحديد المحتوى الكلي منها، في فهم البنية الهيكلية للكربوهيدرات المتعددة؛ مما يفيد في عمليات التحويل والتخمير التطبيقية والصناعات الغذائية، كما تعدّ عاملاً مساعداً في الإجراءات المتبعة لتحطيم الجدر الخلوية وتحليلها، بغرض استخلاص الزيت والسكريات المنحلة في آن واحد. وبناءً على ذلك، فقد هدف هذا البحث إلى دراسة المحتوى الكمي والنوعي لكربوهيدرات النوع *Scenedesmus dimorphus* الواسع الانتشار في السورية ، والتغيرات التي تطرأ عليها باختلاف درجة الحرارة وتركيز نترات الصوديوم وقيم pH خلال النمو، وتحديد القيم المثلى لهذه المتغيرات التي تساهم في إنتاج كتلة حيوية تحوي نسبة من الكربوهيدرات متميزة كمياً ونوعياً.

طرائق البحث و مواده

أُجريت التجارب في مختبرات الهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق، وفي مختبرات قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة بجامعة تشرين، وفي مختبرات قسم علم الحياة النباتية من كلية العلوم بجامعة دمشق، خلال عام 2015. جُمعت عينات المياه المحتوية على الطحالب الخضراء الدقيقة من المناطق الممتدة على طريق دمشق القنيطرة ومن محافظة القنيطرة، وأجريت عمليات الجمع والعزل والتنقية اعتماداً على طريقة Phang و Chu (1999) الموصى بها من قبل Parvin وآخرين (2007).

تم تعريف النوع *S. dimorphus* وتحديده مجهرياً، اعتماداً على المفتاح التصنيفي المورفولوجي الموضوع عام 2005 من قبل كل من الجمعية الأمريكية للصحة العامة American Public Health Association (APHA) والرابطة الأمريكية لأعمال المياه American Water Works Association (AWWA)، واتحاد بيئة المياه Water Environment Federation (WEF). إذ تتصف مستعمراته بأنها غير محاطة بمادة هلامية وتترتب فيها الخلايا على نحو متناوب أو خطي، للخلايا جدار خلوي أملس، شكلها إبري إلى مغزلي دون انتفاخات قطبية، يتراوح طولها بين 4 – 10 ميكرونات، الخلايا المتوسطة تكون مستقيمة والخلايا الطرفية منحنية نحو الخارج. ويبين الشكل 1 مستعمرات وخلايا هذا النوع كما ظهرت تحت المجهر في هذه الدراسة.



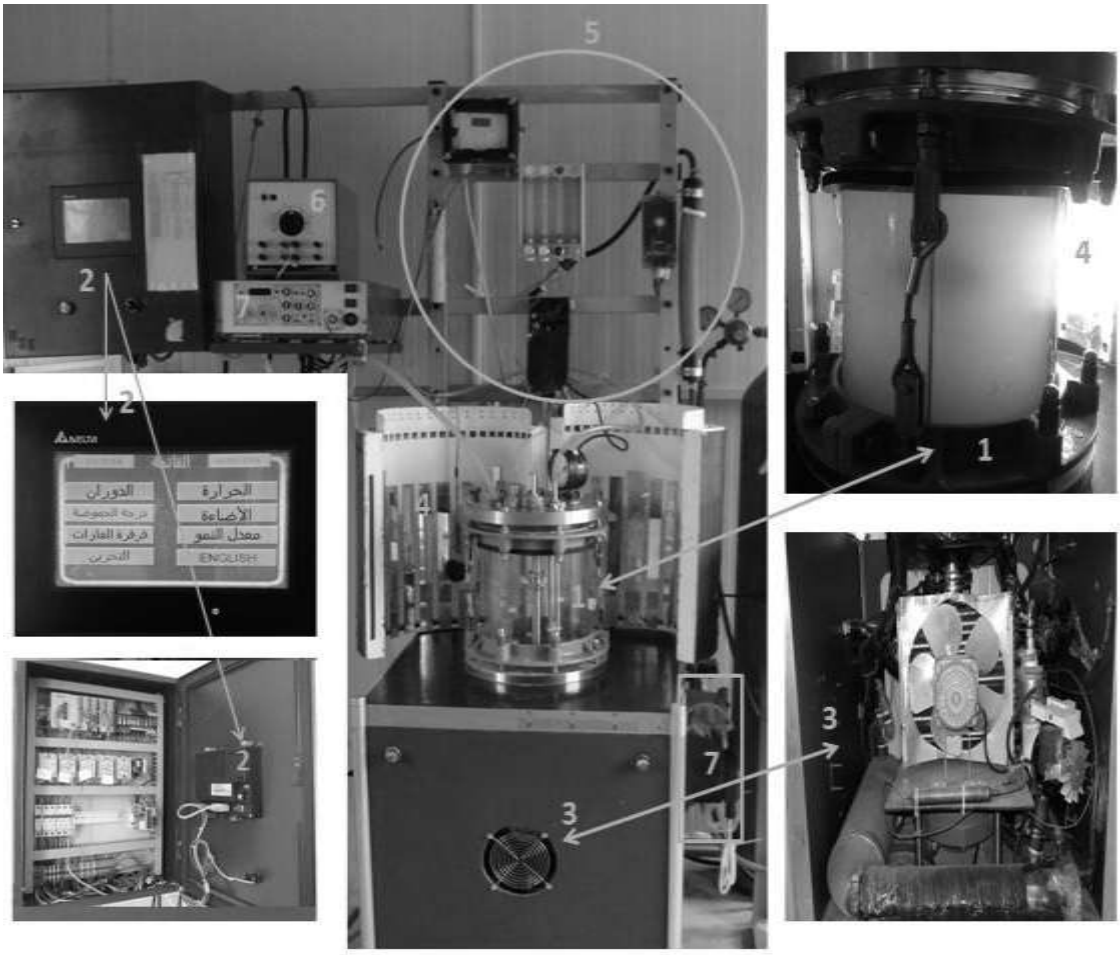
الشكل 1: مستعمرات وخلايا النوع *S. dimorphus* كما ظهرت تحت المجهر في هذه الدراسة

- تنمية الطحالب وإكثارها:

أجريت التجارب المتعلقة بالتنمية والإكثار جميعها بواقع ثلاث مكررات لكل تجربة ضمن المفاعل الحيوي (المصمم والمصنَّع في الهيئة العامة للتقانة الحيوية الذي يتحكم في جميع ظروف النمو الأساسية) والموضح مع أقسامه في الشكل 2، تمت التنمية وفق نظام الدفعات (Batch) باستعمال وسط Bold's Basal Medium (BBM) (Bischoff and Bold, 1963) بمدة زمنية 15 يوماً (حتى 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 500 ppm) 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 كان تغيير عامل واحد مع تثبيت باقي ظروف النمو في كل دفعة. وقد اختُيرت ظروف النمو السابقة كونها الأفضل لنمو الطحالب الخضراء الدقيقة وفق Hernandez وآخرون (2009) و Yehوآخرون (2010).

أجريت عملية التنمية في كل دفعة بتلقيح وسط الطحالب BBM الموجود داخل المفاعل الحيوي بكمية من المزرعة النقية للطحالب (بادئ) المحضّرة مسبقاً، إذ استمرت إضافة البادئ حتى وصلت الامتصاصية الضوئية (المقاسة بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer) لوسط النمو إلى 150 عند طول موجة 680 نانومتراً.

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 محتواه من الطحالب الخضراء باستعمال مرشحة خزفية ذات مسام بقطر 0.5 ميكروناً تحت تفريغ. وبعد الحصول على الكتلة الحيوية الرطبة (70 – 81% رطوبة) من جهاز فصل الطحالب، أجري تجفيف العينات بطريقة التجفيد التي أوصى بها Grima وآخرون (2003)؛ كونها تحافظ على العينة على النحو الأمثل لاستخلاص مركباتها الكيميائية، ولم تتجاوز نسبة الرطوبة 7% في العينة المجفَّدة النهائية.



الشكل 2: أقسام المفاعل الحيوي المصنع في الهيئة العامة للتقانة الحيوية لتنمية الطحالب.

1. حوض التنمية، مصنوع من زجاج خاص سعته النظرية 14 لتراً.

2. لوحة تحكم يمكن من خلالها ضبط ومراقبة جميع شروط النمو (درجة الحرارة، درجة الحموضة، شدة الإضاءة، سرعة الدوران، تدفق الغازات ودرجة حرارتها)، وتستعمل لقياس معدل النمو بانتظام حسب برنامج يمكن تعديله باستعمال مبدأ المطياف الضوئي، ويمتلك القدرة على تخزين كمية كبيرة من البيانات.

3. وحدة تبريد وتسخين تعمل بوساطة لوحة التحكم ضمن المجال الحراري (4 – 90 م°).

4. وحدة إضاءة مكونة من مشعات متألقة/فلورسنت تتغير شدة إضاءتها لتصل إلى 30000 لوكس.

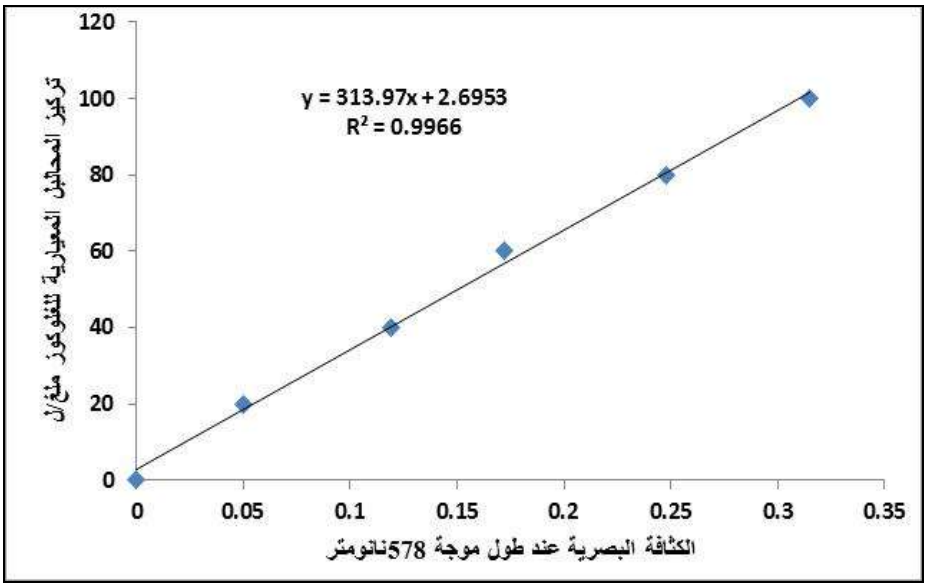
5. وحدة ضبط الغازات التي تعمل على تنظيم تدفق الغازات (هواء، CO_2) الداخلة إلى وسط النمو وتنقيتها والتحكم في درجة حرارتها، ويتم كل ذلك من خلال آلية في لوحة التحكم.

6. جهاز ضبط سرعة الدوران يعمل بالمشاركة مع لوحة التحكم على ضبط سرعة الدوران داخل حوض النمو.

7. حدة معايرة درجة pH وسط النمو التي تتألف من مضخة للحمض ومضخة للقلوي مع حساس pH، تعمل على الحفاظ على قيمة pH ثابتة عبر الضخ الآلي لمحلول 0.1 نظامي من HCl أو NaOH.

- تقدير كمية الكربوهيدرات الكلية كنسبة مئوية من الكتلة الحيوية الجافة:

قدرت الكربوهيدرات الكلية بطريقة أنثرون Anthrone method التي 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 578 نانومتر باستعمال جهاز المطياف الضوئي، ومنها تم حساب نسبة الكربوهيدرات في العينة (Gerhardt *et al.*, 1994). كما حسبت تراكيز الكربوهيدرات في العينات المدروسة اعتماداً على معادلة خط الانحدار (الشكل 3) التي استُنتجت بناءً على دراسة علاقة الارتباط بين تراكيز محاليل الغلوكوز العيارية والامتصاصية الضوئية لها عند طول الموجة السابق نفسه، وعُبّر عن التراكيز بالميكروغرام/مل التي تم تحوِّيلها لاحقاً لنسب مئوية.

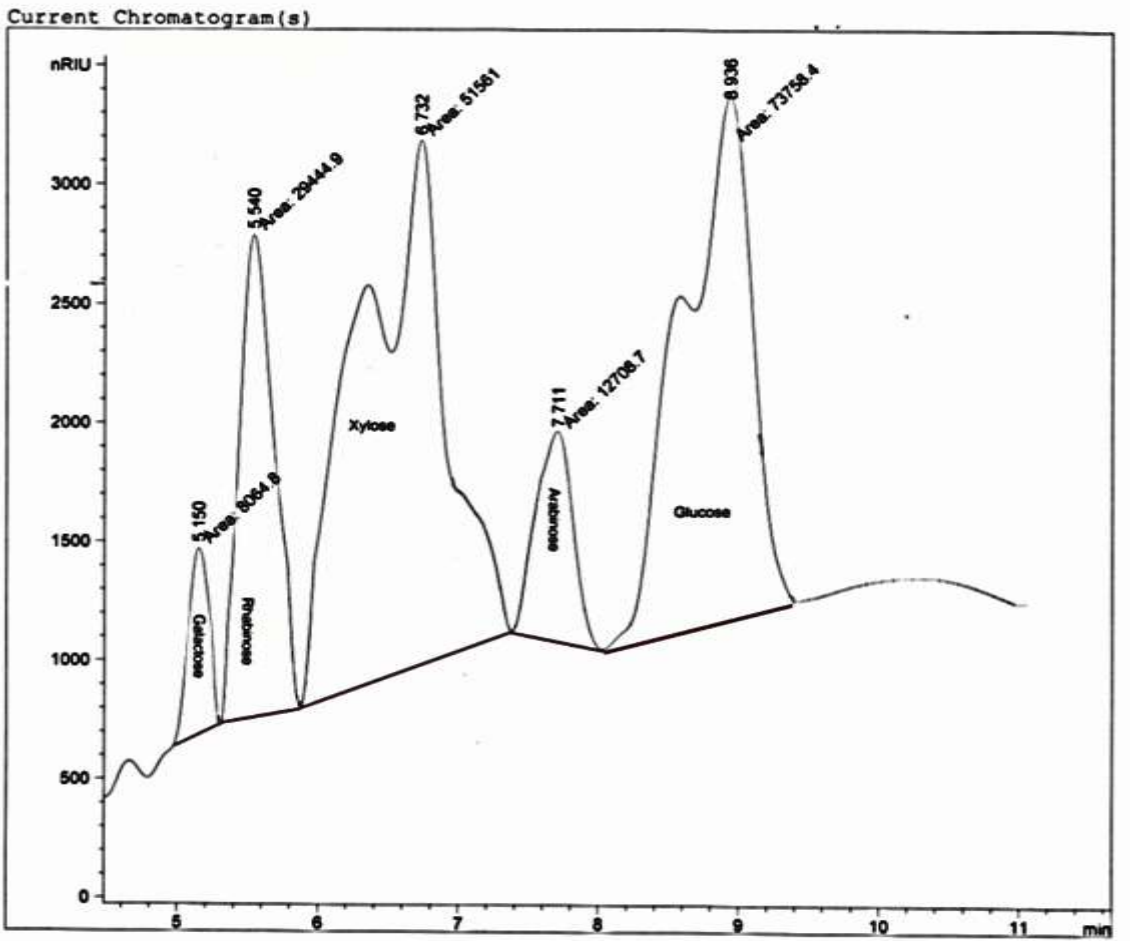


الشكل(3): مخطط معياري لعلاقة الارتباط بين تراكيز الغلوكوز والامتصاصية الضوئية

y: التركيز مغ/ل ، x: الامتصاصية الضوئية عند طول موجة 578 نانومتر

- تقدير نوعية الكربوهيدرات في عينات طحالب النوع *S. dimorphus*:

أجري التقدير النوعي وفق الطريقة المتبعة في المختبر الوطني للطاقة المتجددة (NREL) رقم TP-5100-60957 التي أوصى بها Van Wychen و Laurens (2015)، وهي تعتمد على حلمهة العينة بحمض الكبريت لاختزال السكريات المتعددة إلى وحداتها الأحادية ثم تقديرها بتقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC (جهاز Agilent طراز 1100 مزود بكاشف قرينة الانكسار RID)، وأُجريت التحاليل باستعمال عمود Agilent Zorbax Carbohydrate طوله 150 مم وقطره 4.6 مم، يحتوي طوراً ثابتاً بسماكة 5 ميكرونات، فُصِلت ومُيِّزت خمسة أنواع من السكريات الأحادية هي: غلوكوز وغالاكتوز وأرابينوز ورامنوز وكزيلوز. وقد حُدّد زمن الاحتباس والمساحات المعيارية للسكريات الأحادية (الشكل 4) ضمن الشروط التي ضُبط عليها جهاز HPLC بالمقارنة بتراكيب معيارية نقية معروفة التركيز للسكريات الأحادية (من شركة Sigma).



الشكل 4: كروماتوغرام السكريات المعيارية في جهاز HPLC بتركيز 300 ppm

التحليل الإحصائي:

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

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

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

μ : المتوسط العام للصفة.

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

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

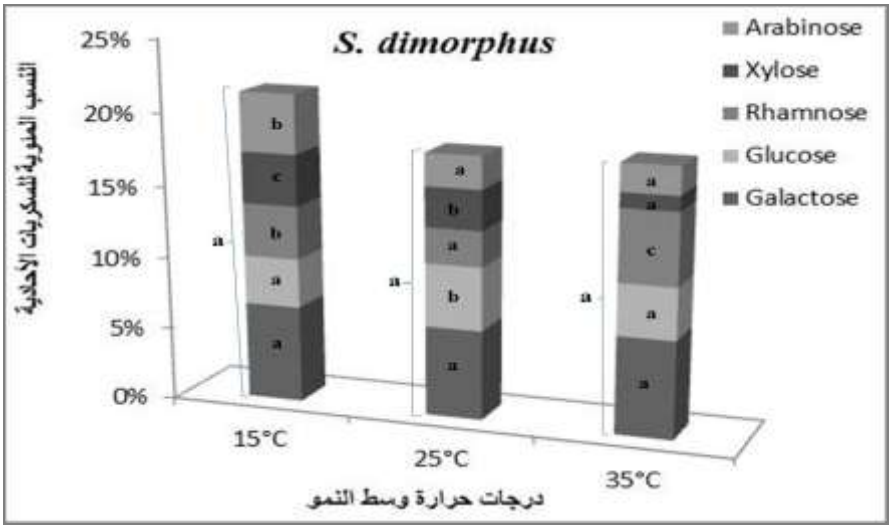
أجريت التحاليل الإحصائية باستعمال البرنامج الإحصائي IBM SPSS Statistics 20 من خلال طريقة One– Way ANOVA متبوعة باختبار Tukey للمقارنة بين المتوسطات، وكانت جميع التحاليل الإحصائية عند مستوى ثقة $P < 0.05$.

النتائج والمناقشة

أولا: تأثير درجة حرارة النمو في كمية الكربوهيدرات ونوعيتها:

أ- الكربوهيدرات الكلية:

لم تتأثر الكربوهيدرات الكلية معنوياً في النوع *S. dimorphus* بتغير درجة الحرارة (الشكل 5)، ويمكن القول بناءً على ذلك، إن مجال درجات الحرارة 15-35 س° يقع ضمن المجال المناسب لنمو النوع الطحلبي؛ إلا أن تغير درجات الحرارة ضمن هذا المجال كان له تأثيراً ظاهرياً في نسبة الكربوهيدرات الكلية التي تتأثر كميتها إيجاباً مع انزياح درجة الحرارة عن القيم المثالية للنمو (Tomaselli *et al.,* 1987; Oliveira *et al.*,1999).



الشكل 5: تأثير درجة حرارة النمو في كمية ونوعية كربوهيدرات النوع *S. dimorphus* ،

الأحرف المتشابهة ضمن اللون الواحد تشير إلى عدم وجود فرق معنوي على مستوى ثقة 95%

ب- السكريات الأحادية:

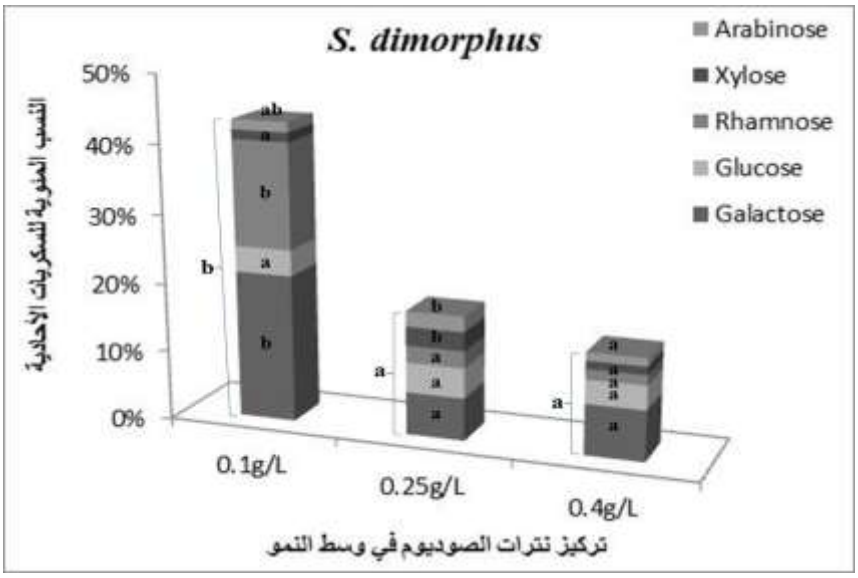
يتضح من الشكل 5 الاختلافات في نسب السكريات الأحادية الناتجة عن تغير درجات الحرارة، فقد كانت نسبة الغالاكتوز مماثلةً للمحتوى الكلي للكربوهيدرات نفسه إذ كان الفرق ظاهرياً بين نسب الغالاكتوز في جميع درجات الحرارة، وهذا يبيّن عدم تأثر نسبة المركبات البكتينية باختلاف درجة الحرارة ضمن المجال الحراري [15 - 35 س°]، إذ إن الغالاكتوز هو الناتج الرئيس لحلمهة البكتين ومركباته (Schutte, 1991)، ويمكن أن تشير النسب المتساوية من الغالاكتوز في جميع درجات الحرارة إلى تساوي تأثير درجات الحرارة في نشاط النمو الخلوي المرتبط بنسبة الغالاكتوز في الأغشية الخلوية وفق ما أشار إليه (Harwood, 1998). أما الغلوكوز فقد أظهر تفاعلاً سلبياً مع انخفاض درجة الحرارة وارتفاعها عن الدرجة 25 س°، وهذا يبين أن درجة الحرارة 25س° هي الأفضل للحصول على أعلى نسبة من النشاء والسليلوز؛ لأن متعددات السكريات الأخيرة هي مسؤولة عن إنتاج سكر الغلوكوز بالحلمهة (Schutte, 1991)، وقد حقّق سكر الرامنوز أكبر نسبة (4.95%) في درجة حرارة 35 س°، وبفارق ضعفين عن القيمة الصغرى عند درجة حرارة 25 س°، وهذا يعود إلى ارتفاع نسبة متعددات السكريات الحمضية الموجودة في جدار الخلية في درجات الحرارة العالية التي تنتج سكر الرامنوز بعد حلمهتها (Popper and Tuohy, 2010; Pieper *et al.*, 2012)، ولكن ارتفعت نسبة سكر الكزيلوز مع انخفاض درجة الحرارة لتبلغ 3.5 ضعفاً عند درجة حرارة 15 س°، مما كانت عليه عند الدرجة 35 س°؛ وهذا يدل على تشكل الهميسليلوز مع انخفاض درجة الحرارة

الذي يعدّ المصدر الرئيسي للكزيلوز (Schutte, 1991)، كما ازدادت نسبة سكر الأرابينوز بمقدار ضعفين تقريباً عند الدرجة 15 س° عما كانت عليه عند الدرجتين 25 س° و35 س°؛ مما يدل على زيادة البروتينات السكرية التي تدخل في تركيب الجدر الخلوية التي تعطي الأرابينوز كأحد نواتج حلمهتها (Popper *et al.*, 2011).

ثانياً: تأثير تركيز نترات الصوديوم في كمية الكربوهيدرات ونوعيتها:

أ- الكربوهيدرات الكلية:

لوحظ أن التركيز المنخفض (0.1 غ/ل من نترات الصوديوم) أعطى أعلى نسبة من الكربوهيدرات (43.46%) ولم يلاحظ وجود فرق معنوي بين التركيز 0.25 غ/ل و0.4 غ/ل، كما هو واضح في الشكل 6 وهذا يتفق مع ازدياد كمية الكربوهيدرات في خلايا الطحالب الدقيقة، كآلية للبقاء تحت ظروف عوز النتروجين في وسط النمو (Hu *et al.*, 2008; Encarnación *et al.*, 2010; Pancha *et al.*, 2014)، وتتفق نتيجة هذا البحث مع ما وجده Vasilevaوآخرون (2015)، حيث تراكمت الكربوهيدرات في ظروف غياب النتروجين، على حساب زيادة الكتلة الحيوية لأنواع طحالب الجنس *Scenedesmus*.



الشكل 6: تأثير تركيز نترات الصوديوم في كمية ونوعية كربوهيدرات طحالب النوع *S. dimorphus*.

الأحرف المتشابهة ضمن اللون الواحد تشير إلى عدم وجود فرق معنوي على مستوى ثقة 95%.

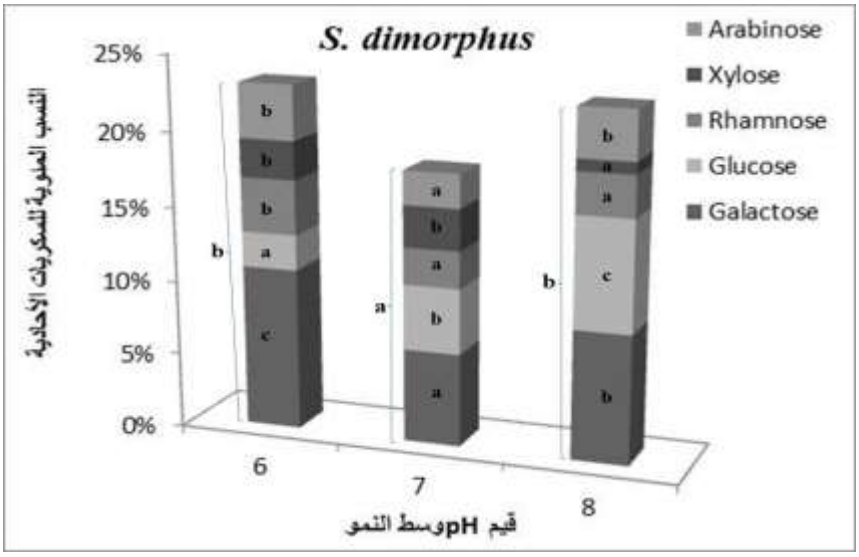
ب- السكريات الأحادية:

يبين الشكل 6 أيضاً أن التغيرات المعنوية في نسبة سكر الغالاكتوز والرامنوز حدثت عند خفض تركيز نترات الصوديوم في وسط النمو إلى 0.1 غ/ل، إذ بلغت أعلى قيمة (21.49%) لها وبفارق كبير عن باقي التراكيز؛ وهذا يرتبط أساساً مع زيادة نسبة البكتين المرافقة لنقص النتروجين، إذ إن سكري الغالاكتوز والرامنوز هما نواتج الحلمهة الأساسية من البكتين والسكريات المتعددة (Buchanan *et al*, 2000; Burana-osota, 2010). أما باقي السكريات الأحادية فلم تتأثر إلى حد ما بتغير تركيز النترات في وسط النمو، وهذا يؤكّد عدم وجود علاقة قوية بين نسبة النتروجين في وسط النمو ونسبة النشاء والسليلوز والهميسليلوز المصدر الرئيس لسكريات الغلوكوز والأرابينوز والكزيلوز بعد الحلمهة (Schutte, 1991).

ثالثاً: تأثير قيمة pH وسط النمو في كمية الكربوهيدرات ونوعيتها:

أ- الكربوهيدرات الكلية:

يبين الشكل 7 الآتي التأثير المعنوي الإيجابي والمتساوي لكل من الوسطين الحمضي والقلوي في نسبة الكربوهيدرات الكلية، ويعود ذلك لكون قيمة pH 7 هي الأفضل لنمو هذا النوع من الطحالب وفق هذه الدراسة وهذا يتفق مع Kang (2012)؛ وبالتالي فإن زيادة النسبة الكلية للكربوهيدرات عند انزياح درجة pH عن القيمة 7 مبرر وفق القاعدة التي تنص على أن تعرُّض الطحالب لأي نوع من الإجهاد خلال فترة النمو يؤدي إلى زيادة نسبة الليبيدات والكربوهيدرات في الكتلة الحيوية، يقابلها نقصان في نسبة البروتينات الكلية (Oliveira *et al.*,1999; Warr *et al.*, 1985; Tomaselli *et al.*, 1987)، ويعود ذلك إلى كون تغير درجة pH يغيّر تركيب الكربونات في وسط النمو فيصبح أكثر أو أقل قابلية للامتصاص من قبل الطحالب، ويؤثر في مرونة جدار الخلية؛ مما يزيد أو يقلل من قدرتها على الانقسام؛ أي يزيد أو ينقص تراكم الكربوهيدرات فيها Barsanti and Gualtieri, 2006; Zang *et al.*, (2011).



الشكل 7: تأثير درجة pH وسط النمو في كمية ونوعية كربوهيدرات طحالب النوع *S. dimorphus*.

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

ب- السكريات الأحادية:

يبين الشكل 7 التغيرات التي طرأت على نسب السكريات الأحادية مع تغير درجة pH وسط النمو، فقد لوحظ تضاعف في نسبة سكر الغلوكوز مع كل ارتفاع في درجة pH وسط النمو، بعكس سكر الكزيلوز الذي انخفض مع تحول الوسط إلى القلوي، وهذا يرتبط وفق Kapaun و Reisser (1995) إلى زيادة نسبة السليلوز ونقصان نسبة الهميسليلوز في الجدار الخلوي مع ارتفاع درجة pH. ويعدّ هذا مهماً جداً في صناعة التخمير التي تعتمد على النسب العالية من السليلوز على حساب الهميسليلوز للحصول على إيتانول عالي الجودة (John *et al.*, 2011)، وقد لوحظت زيادة نسبة سكري الغالاكتوز والأرابينوز في الوسط القلوي والحمضي مقارنة بالوسط المتعادل، وكانت هذه الزيادة متساوية في الوسطين فيما يتعلق بسكر الأرابينوز، بينما تفوقت بوضوح في الوسط الحمضي فيما يتعلق بسكر

الغالاكتوز، وهذا يعود لزيادة نسبة البكتين في الوسط القلوي والحمضي مقارنة بالوسط المتعادل الذي يمثّل المصدر الأساس للغالاكتوز والأرابينوز وفق Schutte (1991)، وقد يعود أيضاً وفق Popper وآخرين (2011) لزيادة نسبة الأرابينوغالاكتانات arabino-galactans المرتبطة مع البروتينات لتشكل البروتينات السكرية التي تدخل في تركيب جدار الخلية، أما الرامنوز فقد تأثر بالوسط الحمضي فقط، إذ أبدى زيادة معنوية مقارنة بالوسط القلوي والمتعادل وهذا يشير وفق Pieper وآخرون (2012) إلى زيادة السكريات المتعددة الحمضية acidic polysaccharides.

-السكريات الكلية وأنواعها في طحالب النوع *S. dimorphus*:

بينت نتائج هذا البحث عموماً أن محتوى طحالب النوع *S. dimorphus* من الكربوهيدرات يتراوح بين 14.80 ± 43.50% و1.70 ± 14.70%، وهو يقارب مجال النسب 21 - 52% المعتمد من قبل Becker (1994)، وقد وجد Albers (2013) أن نسبة الكربوهيدرات الكلية لبعض أنواع الطحالب ومن بينها النوع *S. dimorphus* كانت ضمن المجال (35-83%) وهو أعلى من المجال الذي أمكن الحصول عليه في هذا البحث، علماً بأن نسبة الكربوهيدرات يمكن أن تصل إلى حدود أعلى وفقاً لظروف النمو (Becker, 2007)، وأما فيما يتعلق بتركيب الكربوهيدرات من السكريات الأحادية (الجدول 2)، فقد لوحظ تفوق في نسبة سكر الغالاكتوز تلاه سكر الرامنوز مقارنة بباقي السكريات الأحادية، وكانت النسبة الأقل من نصيب سكر الكزيلوز؛ وهذا يخالف ما وجده Albers (2013) في دراسته على تركيب الكربوهيدرات من السكريات الأحادية لبعض أنواع الطحالب الدقيقة من بينها النوع *S. dimorphus* إذ كانت نسبة كل من سكر الغلوكوز والغالاكتوز والمانوز متقاربة إلى حد ما مع نسبة قليلة من الرامنوز.

الجدول 2: النسب العظمى والدنيا للسكريات الأحادية الداخلة في تركيب كربوهيدرات طحلب النوع *S. dimorphus*.

السكر الأحادي	S.D± النسبة المئوية العظمى	S.D± النسبة المئوية الدنيا
غالاكتوز	21.50 ± 7.3	6.21 ± 0.5
غلوكوز	7.40 ± 0.6	2.35 ± 0.1
رامنوز	15.40 ± 5.2	1.46 ± 0.2
كزيلوز	3.60 ± 0.4	0.80 ± 0.1
أرابينوز	4.10 ± 0.5	1.20 ± 0.1

الاستنتاجات و التوصيات

-تراوحت نسبة الكربوهيدرات الكلية في طحالب النوع *S. dimorphus* بين 14 - 44%.

-يسود سكر الغالاكتوز على باقي السكريات الأحادية في كربوهيدرات طحالب النوع *S. dimorphus*.

-لا يوجد تأثير لدرجة الحرارة في نسبة الكربوهيدرات الكلية، وقد أمكن الحصول على أعلى نسبة من النشاء والسليلوز عند درجة حرارة 25 س°، وحفزت درجة الحرارة المنخفضة على تكوين الهميسليلوز، والبروتينات السكرية.

-يعد التركيز المنخفض (0.1غ/ ل) من نترات الصوديوم هو الأفضل للحصول على أكبر كمية من الكربوهيدرات، بأعلى محتوى من البكتين فيها.

-لا يتأثر محتوى الكتلة الحيوية من النشاء والسليلوز والهميسليلوز بنسبة نتروجين وسط النمو.

-تزداد النسبة الكلية للكربوهيدرات عند انزياح درجة pH الوسط عن القيمة المتعادلة ويرافقها في ذلك البكتين.

-تزداد نسبة السليلوز والنشاء في الوسط القلوي على حساب الهميسليلوز.

وبناء على ما سبق نوصي بما يلي:

-توجيه المزيد من الاهتمام للطحالب المنتشرة في المياه السورية والاستفادة منها غذائياً وصناعياً .

-الاستفادة من نتائج البحث وتسخيرها للحصول على كتلة حيوية بمحتوى كربوهيدرات مرتفع وتركيب مميز من السكريات الأحادية وفق الهدف النهائي للتنمية.

-إدخال الكتلة الحيوية الناتجة عن هذا النوع بشكل خاص في صناعة البكتين ومنتجاته.

-أجراء المزيد من الأبحاث لفهم تأثير عوامل النمو الأخرى في كربوهيدرات هذا النوع كالإضاءة ونسبة CO_2 وغيرها.

المراجع

ALBERS, E. *The use of algal biomass produced on waste material as substrate for bioethanol production with yeast*. Inst. Kemi- ochbioteknik – Industriell bioteknik, Chalmers tekniskahögskola, Göteborg, 2013, 13.

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

BARSANTI, L A. and GUALTIERI, P. *Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. 1th. ed., Taylor & Francis Group, LLC, United States of America, 2006, 301.

BECKER, E. W. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, U.K., 1994, P. 291.

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

BISCHOFF, H.W. and BOLD, H.C. *Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock 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. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 2000, 1367.

BURANA-OSOTA,j., SOONTHORNCHAREONNONB, N., CHAIDEDGUMJORN, A., HOSOYAMA, S. and TOIDA, 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.

OLIVEIRA, M. A. C. L. DE., 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 temperatures*. Aquaculture International, 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, 44.

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, P. 791.

GOUVEIA, L. *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*, in *Springer Briefs in Microbiology*. 1th. ed., Springer Publisher Heidelberg Dordrecht London New York, 2011, 69.

GUCKERT, J. B. and COOKSEY, K. E., *Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in Chlorella (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, 1998, 15-29.

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°. 1, 2009, 88–93.

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

HU, Q., SOMMERFELD, M., JARVIS, E., GHIRDI, M., POSEWITZ, M., SEIBERT, M. DARZINS, A. *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances*. Plant Journal, Vol. 54, N°. 4, 2008, 621-639.

JIANG, Y., ZHANG, W. I., WANG, J., CHEN, Y., SHEN, S. and LIU T. *Utilization of simulated flue gas for cultivation of Scenedesmus dimorphus*. Bioresource Technology, Vol.128, 2013, 359-364.

JOHN, R. P., ANISHA, G., NAMPOOTHIRI, K. M. and PANDEY, A. *Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol, Bioresource Technology*, Vol. 102, N°. 1, 2011, 186-193.

KANG, J. *Mitigation of ammonia gas from animal house using microalgae*. Graduate Theses and Dissertations, 2012, Paper 127.

KAPAUN, E. and REISSER, W. *A chitin-like glycan in the cell wall of a Ollorella sp. (Chlorococcales, Chlorophyceae)*. Planta Vol. 197, N°. 4, 1995, 577-582.

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

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.

GRIMA, M. E., BELARBI, E-H., ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G., ROBLES MEDINA, A. and CHISTI, Y. *Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics*. Biotechnology Advances, Vol. 20, 2003, 491–515.

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.

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, P. 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.

PIORRECK, M.; BAASCH, K. H. and POHL, P. *Biomass Production, Total Protein, ChloropHylls, Lipids and Fatty Acids of Freshwater Green and Blue-green Algae Under Different Nitrogen Regimes*. J. PHytochemistry, Vol. 23, N°.2, 1984, 207- 216.

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, 373 - 83

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, 567-590.

PRIYADARSHANI, I. and RATH, B. *Commercial and industrial applications of micro algae - A review*. J. Algal Biomass Utln., Vol. 3, N°. 4, 2012, 89-100.

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.

TOMASELLI, L., TORZILLO, G., GIOVANNETTI, L., BOCCI, F., TREDICI, M. R., PUSHPARAJ, B., PAPUZZO, T., BALLONI, W. and MATERASSI, R. *Recent research of Spirulina in Italy*. Hydrobiologia, Vol. 151, N°.152, 1987, 79−82.

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.

VASILEVA, I., MARINOVA, G. and GIGOVA, L. *Effect of nitrogen source on the growth and biochemical composition of a new Bulgarian isolate of Scenedesmus sp*. J. BioSci. Biotechnol, SE/ONLINE, 2015, 125-129.

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.

WARR, S. R. C., REED, R. H., CHUDEK, J. A., FOSTER, R. and STEWART, W. D. P. *Osmotic adjustment in Spirulina Platensis*. Planta, Vol. 163, N°. 3, 1985, 424−429.

YEH, K., CHANG, J. AND CHEN, W. *Effect of light supply and carbon source on cell growth and 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 Technology, Vol. 102, N°.21, 2011, 10158–10161.