مجلــة الكوفــة للعلــوم الزراعيــة 10 ( 1 ) : 158 – 169 2018

# تأثير ظـــــروف الاستـخلاص على حـــاصل الســـكريات الـــمتعددة الـــمستخلصة من الطحلب الأخضر *Cladophora* sp.

أم البشر حميد جابر الموسوي روضة محمود علي العلي *سهام وليد علك الامارة

قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة – جامعة البصرة –جمهورية العراق

**الـــمستخلص**

جـــــــمعت عـــــــــينات مـــــــــن الطحالـب الخضـراء مـن ميـاه شـط العـرب ضـمن منطقـة كرمـة علـي فـي البصـرة وبعـد التنظيـف والتنقيـة تـم تشخيصـها وتبـين انهـا تعـود الـى جنس *Cladophora* sp.، استخلصـت السـكريات المتعـددة بواسـطة كاربونـات الصـوديوم مـن هـذه الطحالـب$Na_2CO_3$، وقـدر محتواهـا مـن السـكريات الكليـة أذ بلغـت 78.4%. تـم دراسـة تـأثير ظـروف الاسـتخلاص علـى حاصـل السـكريات المتعـددة شـملت نسـبة خلـط المـادة الأوليـة: المـذيب( فورمـالين 0.1%)(غم/مـل) أذ اسـتعملت اربـع نسـب 7:1 و9:1 و1 :12 و 15:1 اذ اعطـت نسـبة 9:1 اعلـى حاصـل 7.48%واقـل نسـبة حاصـل كانـت 2.3% بنسـبة خلـط 15:1، واسـتعملت درجـات حراريـة 60 و 80 و100 م اذ أعطـت درجـة 80 م اعلـى نسـبة حاصـل بلـغ7.53%، أمـا اقـل نسـبة حاصـل فقـد كـان عنـد درجـة حـرارة 100 م 2.09%. درس تـأثير الاسـتخلاص بمـدد زمنيـة 2 و4 و6 سـاعات اذ أعطـت مـدة 2و4 سـاعات نسـبة حاصـل 6.95 و7.60% علـى التـوالي بينمـا أعطـت مـدة اسـتخلاص 6 نسـبة حاصـل3.40%. درس تـــــــــأثير الـرقم الهيـدروجيني حيـث اعطـى الرقـــــــــــــم الهيـدروجيني 2 اعلـى حاصـل 7.49مقارنـة مـع كـل مـن الـرقم الهيـدروجيني 4 و6 سـاعات اذ كانـت نسـبة الحاصـل 2.33 و 1.92% علـى التـوالي. مـن خـلال دراسـة الظـروف أعـلاه بينـت النتـائج ان أفضـل نسـبة حاصـل تـم الحصـول عليهـا عنـد الاسـتخلاص مـع كاربونـات الصـوديوم كانـت عنـد نسـبة خلـط 9:1 وبدرجـة حـرارة 80م لمـدة 4 سـاعات وعنـد رقـم هيدروجيني 2.

كـــلمات مفتاحية:الطحالب الخضراء، السكريات المتعددة، الاستخلاص

---

*البحث جزء من رسالة الماجستير للباحث الثالث

تاريخ الاستلام: 28- 3-2017
تاريخ القبول: 16- 5 -2017

**المقدمة**

الطحالب نوع من النباتات البدائية التي تفتقر الى الجذور الحقيقية والسيقان والأوراق، وهي كائنات متعددة الخلايا ويمكنها النمو في المياه المالحة أو المياه العذبة وغالباً ما تكون سريعة النمو ويصل طولها الى 6 م كما في طحلب *Macrocysti spyrifera*.بعض الطحالب تعيش في البيئات المعقدة والتي تتحمل الظروف غير الملائمة مثل الأشعة فوق البنفسجية و التغير بدرجات الحرارة والتقلبات في مستوى المواد الغذائية والملوحة لتتمكن من التكيف السريع مع الظروف البيئية الجديدة وأنتاج مجموعة كبيرة ومتنوعة من المركبات الثانوية النشطة حيوياً والتي لا يمكن العثور عليها في الكائنات الحية الأخرى.اهتم الباحثون في الوقت الحاضر بدراسة الطحالب البحرية ليس بسبب الخصائص الحيوية أو المركبات الوظيفية المحددة ولكن لأهميتها الغذائية التي تعد بروتيناً بديلاً ومصدرا مهما للكربوهيدرات المعقدة (8 و9 و10و11).

تعد بعض الطحالب ذات قيمة غذائية عالية بسبب ارتفاع محتواها من الكربوهيدرات والبروتين والأنزيمات ، بالإضافة الى العديد من الفيتامينات والمعادن منها فيتامين $B_1$ و $B_2$ و $B_6$ و A و C والنياسين واليود و البوتاسيوم والحديد والكالسيوم والمغنسيوم وبذلك فهي تشكل مصدراً رئيساً للغذاء في معظم دول العالم ولاسيما في البلدان الأسيوية كالصين واليابان وكوريا ، كما استعملت الطحالب الدقيقة مؤخراً في صناعة المكملات الغذائية(13).

تختلف سكريات الطحالب والاعشاب البحرية عن السكريات الموجودة في النباتات الراقية بمجموعة الكبريتات، ونسبة عالية من المجموعات الايونية وذوبانها العالي في الماء وخصائصها الريولوجية الفريدة من نوعها. تحتوي معظم الطحالب الحمراء والاعشاب البحرية الخضراء على السليلوز وهي مشابهة في هذا النباتات الوعائية وهو من السكريات البنائية الرئيسة على الرغم من احتواء هذه الطحالب على سكريات أخرى مثل *Codium* و *Rhodeminea* وبشكل عام تشكل السكريات المتعددة حوالي 8 – 29 % من جدار الخلية على أساس الوزن الجاف(1و5). ومن

السكريات المتعددة الموجودة في الطحالب هي Fucoidan، Carrageenan، Agar، Ulvans، laminarin، alginate، alginic acid(14 و16).

## المواد و طرائق العمل:

تحضير الطحالب:

استعمل في الدراسة طحلب *Cladophora* sp. الذي تم جمعه من ضفاف شط العرب في منطقة كرمة علي ونقل في أكياس من البولي اثيلين الى المختبر وتم التأكد من تشخيصه من قبل أساتذة مختصين في قسم الأسماك والثروة البحرية في كلية الزراعة / جامعة البصرة.

بعد الحصول على الطحلب تم وإزالة الاحياء العالقة منه وبقايا النباتات المائية وغيرها من الشوائب، غسل بعد ذلك عدة مرات بالماء المقطر و كررت العملية اكثر من مرة لغرض التخلص من الاحياء المجهرية.اعتماداً على الطريقة الموصوفة من قبلWeidman واخرون(19) وللتأكد من نقاوة الطحلب اعتمدت طريقة Stein (17) والمتضمنة الفحص المجهري للخيوط الطحلبية بعد زرعها على وسط Nutrient agar في اطباق بتري وحضنت في درجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة، ثم فحصت العينات بعد تكرار العملية مرات عدة للتأكد من خلوها من الاحياء المجهرية، بعد التنقية تم التجفيف هوائياً تحت الظل و نشر على رقائق الالمنيوم على شكل طبقة بسمك 1-2 سم مع التقليب المستمر للتخلص من الرطوبة الى اقل ما يمكن وحفظت في عبوات بالتجميد.

-استخلاص السكريات المتعددة من الطحالب

أجري الاستخلاص وفقاً لطريقة (6)، أذ تم خلط 9:1 مادة جافة:0.1% فورمالين وترك المستخلص بعدها ليلة كاملة لغرض الترطيب،رُشح بورق ترشيح Whatman No. 1واخذ الراسب وغسل مع 50 مل من 0.1 مولاري حامض الهيدروكلوريك وهو على المحرك المغناطيسي مدة 15 دقيقة لحين وصول الرقم الهيدروجيني الى 4 ثم الترشيح. أُضيف للراسب 83 مل ماء مقطر لتعديل الرقم الهيدروجيني للمزيج الى10باستعمال مسحوق كاربونات الصوديوم اللامائية وعلى درجة حرارة 80 م ولمدة 4 ساعات مع التحريك المستمر. رشح الخليط وأُضيف للراشح 10% كلوريد الكالسيوم لترسيب السكريات المتعددة، ثم الترشيح مع إضافة 75 مل ماء مقطر على دفعات مع التحريك. اضيف بعدها حامض

الهيــدروكلوريك لحــين الوصــول الــى الــرقم الهيـدروجيني 2 مــع التحريــك المسـتمر. اضـيف مســحوق كاربونــات الصــوديوم لرفــع الــرقم الهيـدروجيني الــى 8 مــع التحريــك مــدة ســاعة واحـدة، رشـح الخلـيط لفصـل السـكريات المتعـددة التي جففت عند درجة حرارة 50 م.

تــــقــــديــــــر الســــكــريــــات الــكــلــيــة

قــــدرت الســــــــكريات الكليــة بــــطريــــقة الفــــينول-حــامــــض الــــــــــكبريتيك والــتــــــــي ذكــــرهــــــاDuboisواخــــرون(9) وّزن 5 ملغــم مــن عينــة الســكريات المتعــددة المستخلصــة واكمــل الحجــم الــى 50 مــل بالمــاء المقطـر ثـم اخـذ 1 مـل منهـا وبـثلاث مكـررات ومزجـت جيـداً مـع 1 مـل مـن كاشـف الفينـول 5% فــي أنابيــب اختبــار، اضــيف بعــدها 5 مــل مــن حــامض الكبريتيــك المركــز، تــرك المــزيج مــدة 10 دقــائق ووضــع المــزيج بعــد ذلــك فــي حمــام مــائي بــــــــــدرجة حــرارة 25 م مــدة 20 دقيقــة حتــى ظــــهور اللــون البنــي. قــرأت الامتصاصــية الضــوئية عنــد طــول مــوجي 480نــانومتر. حضــر منحنــى قياســي لســكر الارابينــوز بأذابــة25 ملغــم فــي 250 مــل مــاء مقطـر ثـم أجريـت سلسـلة مـن التخـافيف للحصـول علــى التراكيــز الاتيــة 20، 3، 40 ،50 ،60، 70،80،90، 100 مــايكروغرام. مــل$^{-1}$. رسـمت العلاقـة بـين الامتصاصـية الضـوئية وتركيـز سـكر الارابينــوز لمعرفــة تركيــز الســكريات الكليــة فــي مستخلص الطحالب.

**جدول(1) : تــــركيز سكر الارابينوز لتحضير المنحنى القياسي**

| رقم الانبوبة | حجم محلول الارابينوز الخزين(مل) | حجم الماء المضاف مل | الحجم النهائي مل | تركيز المحلول مايكروغرام. مل$^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 2 | 0.2 | 0.8 | 1 | 20 |
| 3 | 0.3 | 0.7 | 1 | 30 |
| 4 | 0.4 | 0.6 | 1 | 40 |
| 5 | 0.5 | 0.5 | 1 | 50 |
| 6 | 0.6 | 0.4 | 1 | 60 |
| 7 | 0.7 | 0.3 | 1 | 70 |
| 8 | 0.8 | 0.2 | 1 | 80 |
| 9 | 0.9 | 0.1 | 1 | 90 |
| 10 | 1 | 0 | 1 | 100 |

العوامـل المـؤثرة علـى حاصـل السـكريات المتعددة

تـم دراسـة تـأثير نسـبة الخلـط ودرجـة الحـرارة والـرقم الهيـدروجيني ومـدة الاسـتخلاص حسـب الطريقـة المـذكورةSeedevi واخـرون(15). وتـم حسـاب نسـبة الحاصـل حسـب المعادلـة التالية:-

$$\text{الحاصل \%} = \frac{\text{وزن السكريات المتعددة المستخلصة(غم)}}{\text{وزن المادة الخام (غم)}} \times 100$$

**الـنـتـائج والـمـنـاقـشة:**

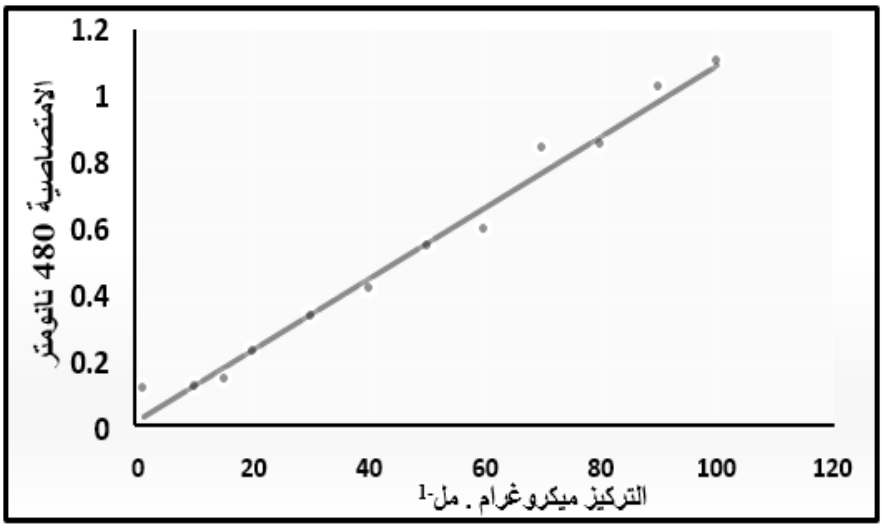
مـحـتـوى السـكـريات الـكـلـية

توضـح النتـائج فـي الشـكل(1) ان محتـوى السكريات الكلية وصل الى 78.4% وجاءت هذه النتـائج اقـل مـن التـي حصـل عليهـا Parthiban واخـرون(12) عنـد تقـديرهم محـتوى السكريات الكـلـيـة فـي الـجينات الصـوديوم المستخلصة مـن ثلاثة أنواع مـن الطحـالب البـنـيـة والتـي كانـت بحـدود 83.42-90.67%، واقـل أيـضاً مـما وجـده Seedevi واخرون (15)مـن خـلال تقـديرهم محـتوى الـسكريات الـكـلية الموجـودة فـي السـكريات المكبرتة المستخلصة من الطحلب الأحمر *Codium tomentosum* البالغـة 88.7%، ولكنهـا مـقـاربة لـمـا تـوصل الـيـه Viswanathan and Nallamuthu(18)عنـدمـا قـدرا المحتـوى الـكـلي للسـكريات فـي الـجينات الصـوديوم المـستخلصة مـن سـتة أنـواع مـن الطـحـالب البـنية أذ بـلغت نسبة السكريات الكلية في الأنواع *Colpomeni asinuosa* و *Lobophora variegate* 78.54 و 75.56% على التوالي بينما تراوحـت فـي الأنـواع الأخـرى المدروسـة مـا بـين 82.42 -93.21%.

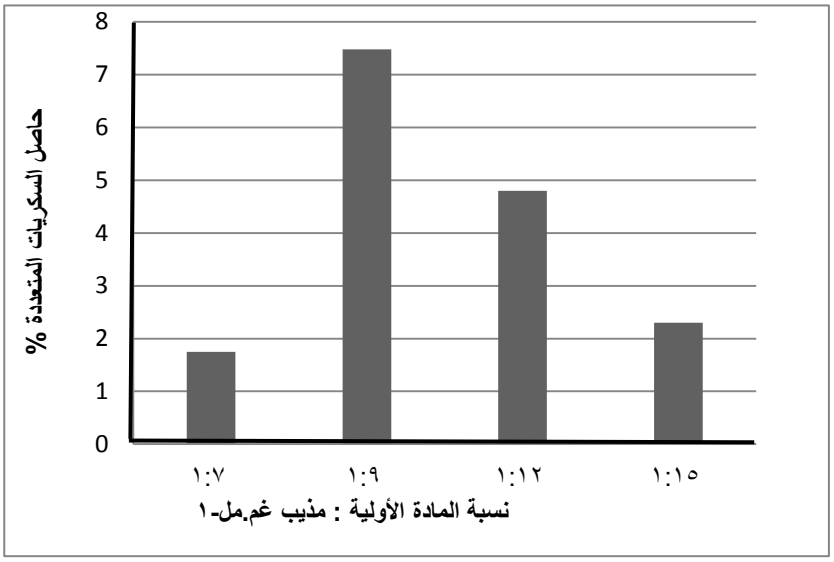
تـعتمد الاختلافـات علـى مرحلـة النمـو، الموقـع الجغرافـي، التركيـب الكيميـائي للسـكريات، الظـروف البيئيـة ونوعيـة الميـاه فضـلاً عـن اخـتلاف الاجنـاس والانـواع وطريقـة الاسـتخلاص. ان السـكريات المـتعـددة هـي خلـيط معقـد غيـر متـجانس مـن السـكريات المـتفرعة والمـرتبطة بهـا بروتـينات وكـبريتات وخلـيط مـن الايـونات المرتبطـة مـع بـعضها بالكالسـيوم والبـوتاسيوم وتـمتلك الطـحـالب الخـضراء علـى نسـبة عـالـية مـن الـكاربـوهـيدرات مـقارنة بـكل مـن الطـحالب الحمـراء والبنيـة( 4 و15و18).

تـأثير ظـروف الاسـتخلاص علـى حاصـل السكريات المتعددة

تأثير نسبة المادة الأولية:المذيب(غم/ مل)




**شكل(1): المنحنى القياسي لسكر الارابينوز**




**شكل(2): تـــأثير نـسبة المادة الأولية: المذيب(غم/ مل)**

تـــــــــبين الـــــــــــنتائج فـــي الـــشكل(2) تأثير نسبة المـادة الأولية: المذيب(غم/ مـل) أذ لـوحظ أن نسـبة 9:1 هـــــــــي الأعلـــى فـــي حـــــــاصل الســكريات الـــــــمتعددة المستخلصـــة مـــن طحلـــب *Cladophora*sp.والبـــالغ 7.48% أذ بـــــلغت نـــــسبة الحاصل1.75% عندما كانت النسبة 7:1 مادة جافة:مذيب ولكن انخفضت نسبة الحاصل بشكل واضـح عنـد زيـــــــــــادة نسـبة الـــــــمذيب الـــى المـــــــــادة

الجافة أذ وصلت نسبة الحاصل الى 4.8 %عند النسبة 12:1.

**على حاصل السكريات المتعددة المستخلصة**

أما عند زيادة النسبة الى 15:1 كانت نسبة الحاصل منخفضة جداً والبالغة 2.3% ويمكن ان يعود السبب في انخفاض نسبة الحاصل عند زيادة نسبة المذيب الى زيادة ذوبان السكريات المتعددة وصغر حجم الجزئيات مما أدى الى حصول فقدان كبير في كمية السكريات وصعوبة تجميعها، في حين ان نسبة 9:1 وهي الأفضل أذ ان كمية المذيب تكون كافية لأذابة السكريات المتعددة وبالتالي فان كمية الماء المتبقية تكون قليلة مما يؤدي الى تقليل الوقت والطاقة المستهلكة خلال عملية التركيز(7).

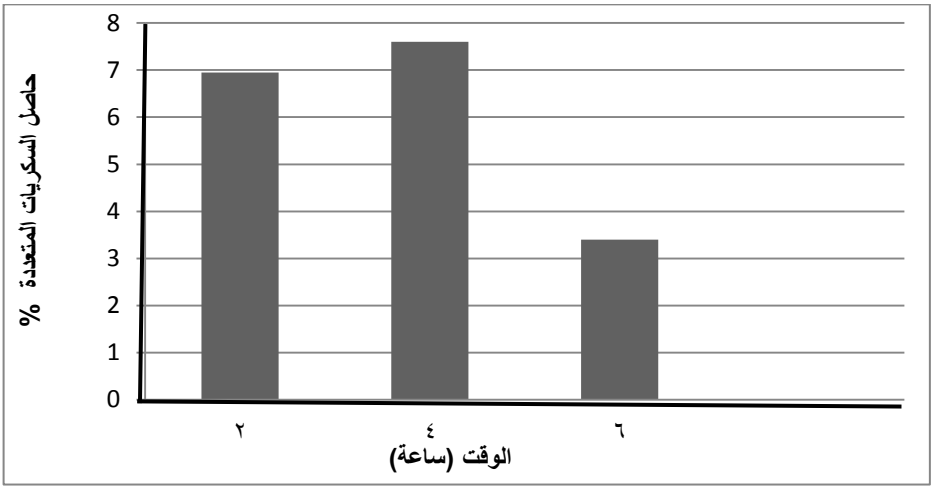
تأثير درجة الحرارة

يظهر الشكل (3) تأثير درجات الحرارة المختلفة 60و80و100معلى حاصل السكريات المتعددة أذ ظهر من خلال النتائج ان درجة حرارة 60 م قد أعطت حاصل مقداره 3.31% بينما كان مقدار الحاصل على درجة حرارة 80 مْ 7.53% وهو اعلى قيمة للحاصل مقارنة بدرجات حرارة 60 و100 م ، في حين درجة حرارة 100 م قد أعطت حاصل 2.09% .تؤدي درجات الحرارة العالية الى تكسر سلاسل البوليمرمما يؤدي الى انخفاض نسبة الحاصل، أذ يحدث تحلل جزئي أو كلي للسكريات المتعددة المحبة للماء بسبب درجات الحرارة العالية (2).

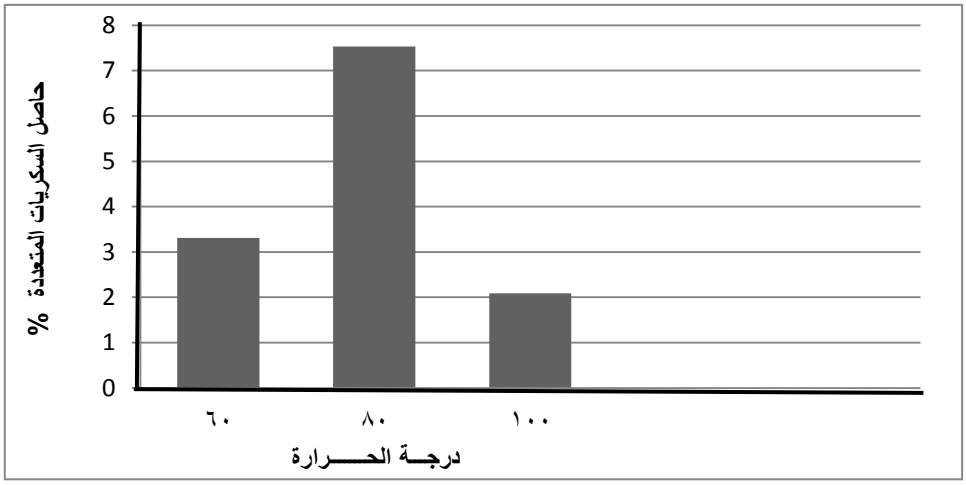
**المتعددة المستخلصة**

تأثير مدة الاستخلاص

عند دراسة تأثير مدة الاستخلاص2 و4 و6 ساعات على حاصل السكريات المتعددة المستخلصة من الطحلب الأخضر *Cladophora* sp. كما موضح في الشكل(4) لوحظ أن حاصل السكريات ازداد مع زيادة مدة الاستخلاص من 2 الى 4 ساعات أذ بلغ 6.95%و7.60% على التوالي، ولكن هذه الزيادة بدأت بالأنخفاض عند زيادة مدة الاستخلاص الى 6 ساعات أذ انخفضت قيمة الحاصل الى 3.40% ويمكن ان يعود السبب في ذلك الى ان مدة الاستخلاص الطويلة تؤدي الى تكسر سلاسل السكريات المتعددة الى وحدات اصغر فضلاً عن استخلاص مكونات أخرى غير سكرية إضافة الى زيادة الطاقة المستهلكة (7) ومن خلال هذه النتائج تبين ان مدة الاستخلاص 4 ساعات كانت كافية لاستخلاص اكبر كمية من السكريات المتعددة مقارنة بمدد الاستخلاص الأخرى.




**شكل(3):تأثير درجات الحرارة على حاصل السكريات**



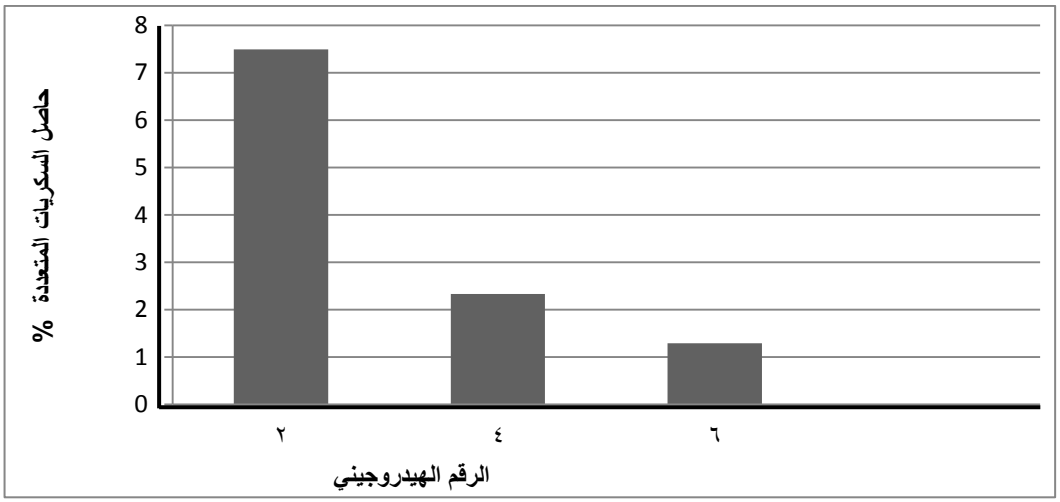

**شكل(4): تأثير مدة الاستخلاص على حاصل السكريات**

**المتعددة المستخلصة**

تأثير الرقم الهيدروجيني

يبين الشكل(5) تأثير الرقم الهيدروجيني 2 و4و6على حاصل السكريات المتعددة المستخلصة أذ تبين انخفاض نسبة الحاصل مع زيادة الرقم الهيدروجيني باتجاه التعادل، أذ اعطى الرقم الهيدروجيني 2 اعلى حاصل بلغ 7.49%بينما كان الحاصل عند الرقم الهيدروجيني4 و6 2.33% و1.92% على التوالي.اتفقت هذه النتيجة مع ما حصل عليه Hernãndez-Carmonaواخرون(6) عند استخلاص الجينات الصوديوم من الطحالب البنية *Macrocystis*

*pyrifera* الـــذين وجـــدوا ان افضـــل رقـــم هيدروجيني للاستخلاص هو 2 .




**شـــــــــكل(5):تـــــــــأثير الرقم الهيدروجيني عـــــلى حاصل السكريات المتعددة المستخلصة**

**المصادر**

1-Alves, A; R. A. Souse and Rei, R. L.2013. A practical perspective on Ulvan extracted from green algae. J. Appl . Phycol .,25(2):407- 424.

2-Auhim, H. S and S. S. Hassan. 2013.Productionand characterization of alginate from *Azotobacter vinellandii* $A_3$. Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry ,2(3):507-512.

3-Dubois, M.; K. A. Gillis; J. K. Hamilton; P. A. Rebers and Smith, F.1956.Colorimetricmethod for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry ,28:350-356.

4-Guangling, J.; Y . Guangli ; W. Wei; W. Xiaoliang; Z. Junzeng and Ewart, S.H.2012.Properties of polysaccharides in several seaweeds format antic Canada and their potential anti-influenza viral activities. Journal of Ocean University of China,11(2):205-212.

5-Heffernan,N .2015.Characterization and seasonal variation of bioactive

compounds (polyphenols, carotenoids and polysaccha-rides) from Irish origin macro algae with potential for inclusion in functional food products .Ph.D .Thesis . University of Limerick .Limerick, Ireland.

6-Hernández – Carmona, G; D. J . McHung ; D. L. Arvizu – Higuera and Rodríguez-Montesino, Y.E. 2002.Pilot plant scale extraction of alginate from macro algae *pyrifera* 4–conversion of alginic acid to sodium alginate, drying and milling. Journal of Applied Phycology,14:445- 451

7-Hu, M; H. Zhang; B. Feng ; K. Liu and Guo, S. 2013. Extraction of polysaccharides from *Fomes officinalis* ames and their antitumer activity. Experimental and Therapeutic Medicine ,6:451-454.

8-Ibañez, E. and A. Cifuentes.2013. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. Journal of Science Food and Agriculture,93:703-709.

9-Khan, S. and S. Satam. 2003. Seaweed mariculture : Scope and potential in India . Agriculture Asia,8(4):26-29.

10-Kharkwal, H; D. Joshi; P. Panthari; M. K. Pant and Kharkwal, A.C. 2012.Algae as future drugs.Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research,5:1-4.

11-Laungsuwon, R. and W. Chulalaksananukul.2013. Anti-oxidant and anticancer activities of freshwater green algae *Cladophora glomerata* and *Microspore floccose* , from Nan river in northern Thailand . Maejo International Journal of Science and Technology ,7(02):181–188.

12-Parthiban, C.; K. Parameswari; C. Saranya; P. Anntharaman and Hemalatha, A.2012. Production of sodium alginate from selected seaweeds and their physiochemical and biochemical properties. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,40:1- 4

13-Priyadarshani, I. and B. Rath. 2012. Commercial and industrial applications of microalgae –a review. J. Algal Biomass Utln ., 3(4):89-100.

14-Rhein - Knudsen, N; M. Tutor and Meyer, A. S . 2015. Seaweed hydrocolloid production: An update on enzyme assisted extraction and modification technologies. Mar. Drugs., 13:3340-3359.

15-Seedevi, P; S. Sudharsan ; V. S. Kumar; V. S. Kumar; A. Srinivasan; S. Vairamani and Shanmugam, A. 2013 . Isolation and characterization of sulphated polysaccharides from *Codium tomentosum* collected from southeast coast of India . Adv. Appl. Sci. Res., 4(5):72-77.

16-Silva, T. H.; A. Alves; E. G. Popa; L. L. Reyes; M. E. Gomes; R. A. Souse; S. S. Silva; J. F. Mano and Reis, R. L. 2012. Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery Approaches. Biomatter,4:1-12.

17-Stein, J. R.1973. Hand Book of Physiological Methods .Cambridge University. Press Cambridge, UK.

18-Viswanathan , S . and T. Nallamuthu. 2014. Extraction of sodium alginate from selected seaweeds and their physico-chemical and biochemical Properties .International Journal of Innovative Research in Science Engineering and Technology, 4: 10998–11003.

19-Weidman,V. E.; P. R. Walne and Tainor, F. R.1984.A new technique for abtaining axinic cultures of algae. Can. J. Bot., 4:958 – 959.

مجلــة الكوفــة للعلــوم الزراعيــة 10 ( 1 ) : 158 – 169 2018

# The effect of extraction conditions on the yield extracted polysaccharides from green algae *Cladophora* sp.

Aum .El-Basher Hameed Jabber Al-Mossawi Raodah Mahmood .Ali . Al-Ali Suham* Waleed .Alag.Al- Aumara

Department of Food Science – College of Agriculture

University of Basrah –Republic of Iraq.

## Abstract

Samples of green algae were collected from Shatt Al-Arab River in Carmet-Ali In Basrah ., They were cleaned , purified and identified as *Cladophora* sp., then polysaccharides were extracted by sodium carbonate . the effect of extraction conditions on polysaccharides yield was studied . These conditions were :algae materials to solvent ration (1:7 ,1:9 ,1:12 and 1:15g:ml) ,temperature (60 ,80 and 100 °C) ,time (2 ,4 ,6 h)and pH (2,4 and 6). The highest polysaccharides yield was (7.49%)at conditions: algae materials to solvent ration (1:9 g/ml) ,temperature (80°C), time (4h)and pH (2).

Keywords: Green Algae, Polysaccharides, Extraction.

*Part of M.Sc .Thesis of the third author

Receiving Date : 28 - 3- 2017
Acceptance Date : 16 - 5 -2017