استخلاص البيتاغلوكان من جدار خلية خميرة الخباز بطرائق مختلفة

Extraction of β-Glucan from Baker's yeast cell wall by different methods

م. كنانة عليكو[1] أ.د. محمد محمد[2] د. لينا الأمير[3]

Kinana aliko[1] Prof. Dr. Mohammad Mohammad[2] Dr. Lina Al Amir[3]

(1) معيدة في كلية الهندسة الزراعية- قسم علوم الأغذية. جامعة دمشق.

(1) Assistant teacher in Faculty of agriculture - Food science department.

(2) أستاذ في كلية الهندسة الزراعية، جامعة دمشق، قسم علوم الأغذية.

(2) Prof. Dr. Damascus university – Faculty of agriculture – Food science department.

(3) أستاذ مساعد. الهيئة العامة للتقانات الحيوية- قسم التقانات الحيوية الغذائية والصناعية.

(3) Assistant Professor, National Commission for Biotechnology- Food and Industrial Biotechnology department.

الملخص

نفذ هذا البحث في مخابر كلية الزراعة – قسم علوم الأغذية وفي مخبرالتقانات الصناعية والغذائية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية من تاريخ 2012/12/2 وحتى شهر2013/6، هدف البحث إلى استخلاص البيتاغلوكان من خلايا الخميرة بطرائق مختلفة ودراسة تأثير طرائق تكسير الخلايا وظروف الاستخلاص على مردود البيتاغلوكان وتقدير البيتا غلوكان بالطريقة اللونية وباستخدام تقانة الكرموتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC.. استخلص البيتاغلوكان من جدار خلية خميرة الخباز *Saccaromyces cervisiae*، حيث تم تحليل جدار خلية الخميرة بثلاث طرائق هي التحلل الذاتي محدد الظروف (درجة حموضة 5، 50°م، فترة حضانة 48 ساعة)، والتحلل الذاتي غير محدد الظروف (حرارة الغرفة- فترة حضانة 13 يوماً) والتحلل الذاتي المعدل (باستخدام 5% ملح كلور الصوديوم)، وتراوحت النسبة المئوية لجدار خلية الخميرة المستخلص في الطرائق الثلاث بين 14و39 % والذي استخلص منه البيتاغلوكان (من الجدار الخام) بطريقة قلوية – حرارية، حيث طبقت شروط استخلاص مختلفة من الزمن و تركيز القلوي ونسبة جدار خلية الخميرة لحجم القلوي، و قدرت نسبته في جدار خلية الخميرة على أساس الوزن الجاف لونياً بطريقة الفينول – حمض الكبريت لاختيار معاملة الاستخلاص الأفضل إذ أعطت المعاملة 5:1/1/2 (2 ساعة، 1N ماءات صوديوم، نسبة 1غ خميرة/5 مل قلوي) أعلى نسبة من البيتاغلوكان الخام بلغت 52.65% بطريقة التحلل الذاتي محدد الظروف، بينما أعطت طريقتي التحلل الذاتي غيرمحدد الظروف والتحلل الذاتي المعدل 44.33 و 40.66% على التوالي، كما تفوقت طريقتي التحلل الذاتي المضبوط وغير محدد الظروف على التحلل الذاتي المعدل بمتوسطات تركيز الكربوهيدرات الكلية (الغلوكان الخام) وقدرت نسبة البيتاغلوكان المنقى جزئياً باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) بعد حلمئة العينات أنزيمياً باستخدام أنزيم β-(1→3)-D-Glucanas من *Helix pomatia* فأعطت طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف القيمة الأعلى وبلغت 29.5 % تلتها طريقتي التحلل الذاتي غير محدد الظروف والتحلل الذاتي المعدل حيث بلغتا 21.4 و12.8% على التوالي .

الكلمات المفتاحية: البيتاغلوكان، خميرة الخباز، التحلل الذاتي.

©2022 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved. **ISSN: 2305-5243; AIF-23 (p: 231 - 244)**

Abstract

Betaglucan of the cell wall of baker's yeast *Saccaromyces cervisiae* has been extracted, from yeast cell wall that was analysed by three methods are of which was Autolysis under controlled conditions at pH 5, temperature 50 °C and 48 hours incubation, the second method of autolysis was at uncontrolled conditions incubation out at room temperature for 13 days, the last method was plasmolysis by using 5% salt sodium chloride. The percentage of the cell wall of produced yeast obtained by three methods ranged between 14-39%. Beta glucan of crude cell wall was extracted by the alkaline – warm up method where different extraction conditions were applied (time, concentration of alkali and proportion of the wall of yeast to alkaline). The percentage of beta glucan was estimated depending on dry weight using phenol - sulfuric acid method. The treatment using 1N sodium hydroxide and a ratio of 1 g yeast / 5 ml alkaline for 2 hours gave the highest percentage of crude β-glucan of 52.65% using the method of Autolysis under controlled conditions, while the two other methods of Autolysis under uncontrolled conditions and plasmolysis reached percentages of 40.66,44.33%, respectively. Autolysis under controlled and that uncontrolled conditions overcome the method of plasmolysis in their average values of total carbohydrates concentration (crude β-glucan). Proportion of β-glucan partially purified was estimated using high-performance liquid chromatography HPLC of enzymatically hydrolysed samples using enzyme β- (1 → 3) -D-Glucanase from *Helix pomatia*. The method of Autolysis under controlled conditions gave the the highest value reached 29.5%, followed by method of Autolysis under uncontrolled conditions and plasmolysis which reported 21.4-12.8% respectively.

Key words: Beta glucan, Baker's yeast, Autolysis

المقدمة

تتميز خميرة الخباز (*Saccharomyces cervisiae*) بأهميتها الصناعية حيث تدخل في صناعة المشروبات الكحولية والكحول والغليسرين والخل وغيرها، وتشكل الخلايا الميتة جزءاً مهماً من المخلفات الصلبة بعد التخمير وتعد مخلفات الخميرة الميتة منتجاً ثانوياً مهماً في الصناعة لاحتوائها على مركبات كيميائية مهمة صناعياً وغذائياً أهمها سكر البيتاغلوكان (Satrapai وSuphantharika، 2007). يختلف تركيب خلية الخميرة بين الأنواع المختلفة حيث تتألف بشكل أساس عند خميرة الخباز والجعة من 60% مستخلص خميرة و40% جدار خلية الخميرة الذي يتألف بدوره من 58 إلى60% بيتاغلوكان و2% دهون و40% مانان (بوليميرات من سكر المانوز مرتبطة بروابط β(1-4) ويوجد عند النباتات والبكتيريا والخمائر كسكر متعدد بنيوي أو خازن للطاقة) (Thammakiti وزملاؤه، 2004 ؛ Amaral وزملاؤه، 2008 ؛ Cai وزملاؤه، 2008) و ذكرت أبحاث أخرى أن جدار خلية الخميرة يشكل حوالي 15إلى20 % من الوزن للجاف (Williams وزملاؤه، 1991) وهو بدوره يتألف من 28 % مانوبروتين و 2 إلى 3 % بروتين و 1إلى2 % كيتين، غلايكوجين و ثلاثة أنواع من البيتاغلوكان وهي30 إلى 60%: β-1,3-D glucan متفرع غير ذواب بالقلوي و β-1,3-D-glucan متفرع ذواب بالقلوي و β-1,6-D-glucan (5-10%) متفرع ذواب بالحمض ويشكل بوليميراً متفرعاً يربط مكونات الجدار مع بعضها. (Stokke وزملاؤه، 1993 ؛ Manners وزملاؤه، 2001 ؛ Pecka وزملاؤه، 2003)، يوجد البيتاغلوكان في جدار خلية الخميرة في طبقتين أساسيتين الأولى في الطبقة الداخلية القريبة من الغشاء السيتوبلازمي (غير ذواب بالقلوي) ويشكل حوالي 30 إلى 35%، والثانية في الطبقة الوسطى القريبة من جدار الخلية (ذواب في القلوي) وتبلغ نسبته حوالي 20 إلى 22% (Saito وزملاؤه، 2002 ؛ Klis وزملاؤه، 2006)

يتكون البيتاغلوكان وهو سكر متعدد متجانس (Homopolysaccharide) من سلسلة خطية أو متفرعة من وحدات الغلوكوز (β-D-glucopyronosyl) مع درجات متنوعة من التفرع و يوجد فراغياً بشكل لولبي ثلاثي أو أحادي أو

بشكل لفات عشوائية، ويعود الاختلاف بين أنواع البيتاغلوكان المستخلص إلى نوع الروابط الغلايكوزيدية الرابطة بين وحدات الغلوكوز، فالرابطة (β(1-3 هي الأكثر شيوعاً في أنواع البيتا غلوكان وقد يشاركها وجود أنواع أخرى من الروابط β(1-4) و β(1-6) حسب المصدرو يتكون جزيء البيتا غلوكان من سلسلة خطية غير متفرعة D- glucan- (1-4)،β(1-3) في الحبوب (Sherwood وزملاؤه، 2003)، و سلسلة البيتا غلوكان عبارة عن بوليميرات منglucan-D-β(1-3) وعدد قليل من التفرعات D-glucan- β(1-6) في خلايا الفطور والخمائر والطحالب (Volman وزملاؤه، 2008)، وتكون سلسلة البيتا غلوكان غير متفرعة ومكونة من وحدات غلوكوز مرتبطة بروابط β (1-3) (Lazaridou وزملاؤه، 2003) و يعتمد استخلاص البيتا غلوكان من الخميرة على تكسير جدر الخلايا بالتحلل الذاتي الأنزيمي وطرائقه المعدلة (Marinescu وStoicescu، 2009)، حيث تتم هذه العملية بتحلل المكونات الخلوية داخل الخميرة وتكسيرجدار الخلية إذ يحدث التحلل ذاتياً (Autolysis) بوساطة أنزيمات داخلية تتشكل طبيعياً في الخمائر عندما تتم دورة نموها وتدخل بطور الموت، ويمكن أن يتم التحلل الذاتي بدون ضبط لشروط الوسط أو مع ضبط لشروطه من حرارة ودرجة حموضة وإضافة محفزات على التحلل الذاتي مثل الأملاح المعدنية ككلور الصوديوم أوالمحلات العضوية كالإيتانول وتسمى Plasmolysis (Borthwick، 2004 ؛ Wiwat وزملاؤه، 2006؛ Vuka وزملاؤه، 2007 ؛ Javmen وزملاؤه، 2012)، ويمكن أيضاً تكسير جدر خلايا الخميرة فيزيائياً بالتجنيس والتعريض للأمواج فوق الصوتية والطحن بالكرات أو التعريض لضغط عالي (Boonraeng وزملاؤه، 2000 ؛ Wenger وزملاؤه، 2008) أو بحلمأة جدر الخلايا بالأحماض أو بالأنزيمات الخارجية كالبابايين (Adamisch وزملاؤه، 2006).

تتم عملية استخلاص البيتاغلوكان بعد تكسير جدر الخلايا باستخدام ماءات الصوديوم ودرجة حرارة حوالي 90 م° باستخدام تراكيز مختلفة من القلوي ونسب إضافة من القلوي لوزن معين من جدر الخلايا وفترات زمنية مختلفة حيث يجب أمثلة ظروف الاستخلاص للوصول لأعلى مردود من البيتاغلوكان (Suphantharika وزملاؤه، 2003 ؛ Marinescu وStoicescu ، 2009 ؛ Tominac وزملاؤه، 2011)، ويحتوي البيتاغلوكان المستخلص على مواد عضوية كالبروتينات والدهون والغلايكوجين وβ-1,6-D-glucan ، حيث تُجرى عملية تنقية جزئية لإزالتها من المستخلص لتعيين البيتاغلوكان وهو مايسمى بالتنقية العكوسة، ويستخدم حمض الفوسفور للتخلص من β-1,6-D-glucan، كما يعرض المستخلص لدرجة حرارة 121 م° لمدة 90 دقيقة ودرجة حموضة 7 لترسيب المانوبوتين (Huang، 2008 ؛ Dikit وزملاؤه، 2010 ؛ Tominac وزملاؤه، 2011)، ويقدر البيتاغلوكان المستخلص بحلمأته حمضياً أو أنزيمياً بوساطة أنزيم β-Glucanase ويقدر الغلوكوز الناتج إما بطرائق لونية باستخدام المطياف الضوئي أو باستخدام الكرموتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) (Talaga وزملاؤه، 2002).

يهدف البحث إلى:

1- استخلاص البيتاغلوكان من خلايا الخميرة بطرائق محتلفة.
2- دراسة تأثير طرائق تكسير الخلايا وظروف الاستخلاص في مردود البيتاغلوكان.
3- تقدير البيتا غلوكان لونياً وباستخدام تقانة الكرموتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC).

مواد البحث وطرائقه

1- الخميرة: استخدمت خميرة الخباز الجافة (*Saccaromyces cesvisie*) مستوردة من شركة Bakaldrin - فرنسا.
2- الأجهزة والمواد المستخدمة:

- أنزيم β-(1→3)-D-Glucanase from *Helix pomatia* من شركة (Sigma)- ألمانيا
- جهاز الكرموتوغرافيا السائلة عالية الأداء من شركة Knauer- ألمانيا
- جهاز المطياف الضوئي Optizim 3000 plus- كوريا.
- حاضنة هزازة من شركة Memmert- ألمانيا.
- حمام مائي هزاز من شركة JSR – اليابان.
- مثفلة بحجرات سعة 700 مل من شركة Memmert - ألمانيا.

ثم أجريت التجارب والتحاليل التالية:

- **تكسير جدر خلايا الخميرة الجافة**

1- طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف (pH=5، 50 م°، 48 ساعة): أُضيفت الخميرة الجافة إلى الماء المقطر المعقم بنسبة 10%،ثم عُدلت درجة الحموضة إلى 5 باستخدام حمض كلور الماء 1ن، وأضيف محلول موقي من حمض الستريك وسترات الصوديوم 3M بنسبة 20% من المعلق السابق، وتم التحضين على درجة حرارة 50 م° لمدة يومين، وتم إيقاف عملية تحلل الخميرة وعمل الأنزيمات بالتسخين في حمام مائي عند درجة حرارة 85 م° لمدة 10 دقائق (Javmen وزملاؤه، 2012).

2- طريقة التحلل الذاتي المعدل (Plasmolysis): أضيفت الخميرة الجافة إلى الماء المقطر المعقم بنسبة 10%، حيث استُخدم 50غ من الخميرة الجافة لـ 500 مل من الماء المقطر المعقم، ثم عُدل الـ pH إلى 5 باستخدام حمض كلور الماء 1ن، وأضيف محلول موقي من حمض الخل وخلات الصوديوم بنسبة 20% من المعلق السابق، وأضيف ملح كلور الصوديوم بنسبة 5% لإتمام عملية البلزمة، ثم حُضن المعلق بالحاضنة الهزازة بمعدل 90 هزة/دقيقة عند درجة حرارة 50 م° لمدة 24 ساعة، وتم إيقاف عملية تحلل الخميرة وعمل الأنزيمات بالتسخين في حمام مائي عند درجة حرارة 85 م° لمدة 10 دقائق (Reed و Nagodawithana ، 2005).

3- طريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف: أُضيفت الخميرة الجافة إلى الماء المقطر المعقم بنسبة 10%، وحُضنت عند درجة حرارة 25 م° لمدة 13 يوماً لتتحلل ذاتياً، ثم تم إيقاف عملية تحلل الخميرة وعمل الأنزيمات بالتسخين في حمام مائي عند درجة حرارة 85 م° لمدة 10 دقائق (Erten وTanguler ، 2006).

- **تقدير النسبة المئوية لجدار خلية الخميرة:**

طُرد المعلق لطرائق التحلل السابقة مركزياً بقوة 6000 دورة في الدقيقة وعلى درجة حرارة 4 م° لمدة 10 دقائق حيث أهمل الجزء السائل الذي يمثل مستخلص الخميرة وتم الاحتفاظ بالجزء الراسب الذي يمثل جدار خلية الخميرة، حيث قُدرت رطوبته و نسبة الجدار الجاف من خلية الخميرة (Vuka وزملاؤه، 2007).

- **استخلاص البيتاغلوكان:**

أُخذ 28.6 و14.2 و 8.3 غ وزناً رطباً من جدار خلية الخميرة الناتج من طرائق التحلل الذاتي الثلاث السابقة (طريقة التحلل الذاتي المعدلة وطريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف على التوالي)، ثم أُجريت عملية الإستخلاص عند درجة حرارة 90 م° وتغيير ثلاثة عوامل هي الزمن (1 و 2 ساعة) ونظامية القلوي (1 و 2 N) ونسبة جدار الخميرة إلى القلوي g/ml (1:5- 1:2)، ثم أجريت عملية طرد مركزي وغسيل 3 مرات بالماء المقطر (Marinescu وStoicescu، 2009).

الجدول1. معاملات استخلاص البيتاغلوكان المستخدمة في البحث.

الزمن (ساعة)	تركيز القلوي (N)	النسبة (جدار:قلوي)
1	1	5:1
2	1	5:1
1	1	2:1
2	1	2:1
1	2	5:1
2	2	5:1
1	2	2:1
2	2	2:1

- **تقدير الرطوبة:**

قُدرت الرطوبة باستخدام طريقة التجفيف بالفرن على درجة حرارة 105 م° حتى ثبات الوزن، وقدرت النسبة المئوية لجدار خلية الخميرة على أساس الوزن الجاف (AOAC، 2000).

- **تقدير السكريات الكلية (الغلوكان الخام):**

أُجريت عملية الحلمأة بحمض الكبريت 50% (0.05 g سكر/25 مل حمض) لمدة 24 سا عند درجة حرارة الغرفة، ثم تم التعديل لكل 1 مل بيتا غلوكان محلمأ 5مل ماءات صوديوم 0.5 N، ثم قُدرت الكربوهيدرات الكلية بطريقة الفينول – حمض الكبريت، حيث أُخذ 0.2 مل من ناتج الحلمأة وأكمل لـ 1مل بالماء المقطر وأضيف له 1 مل فينول 5% و 5مل حمض كبريت مركز دفعة واحدة، وقُدرت الامتصاصية على طول موجة 490 نانومتر بعد ربع ساعة، كما قدر تركيز السكريات من خلال منحنى معياري تم تحضيره بتراكيز معلومة من سكر الغلوكوز(Javmen وزملاؤه، 2012).

- **تقدير البيتاغلوكان أنزيمياً باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء:**

تم اختيار أفضل معاملة استخلاص وهي 5:1/1/2 بطرائق تحليل الخميرة الثلاث على أساس تركيز الكربوهيدرات الكلية (الغلوكان الخام)، وقُدرت فيها نسبة البيتاغلوكان باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء حيث تم حلمأة العينات أنزيمياً كما يلي:

أ- تحضير محاليل العينات: حُضرت العينات بوزن 0.05غ من البيتاغلوكان الجاف، وأضيف لها 25 مل ماءً مقطراً و25 مل محلول موقي من السترات 0.2 M، ثم عُدل الـ pH بماءات الصوديوم 4% وأكمل الحجم لـ 100مل بالماء المقطر.

ب- تحضير الأنزيم: حضر الأنزيم (0.2 وحدة/مغ،10مغ) بإضافة 500 ميكرولتراً محلول موقي من السترات 0.1 M وأكمل الحجم لـ 2 مل بالماء المقطر.

ج- معاملة العينات: أضيف 285 ميكرولتراً من **β-(1→3)-D-Glucanase** لكل 1.4 مل عينة، حيث وضعت العينات في حمام مائي درجة حرارته 40 م° لمدة 5 دقائق مع تحريك بمعدل 300 دورة/دقيقة، ثم أُضيف الأنزيم مع التحريك المستمر لمدة ساعة، وأُوقف عمل الأنزيم بوضع العينات في حمام مائي درجة حرارته 100 م° لمدة 10 دقائق، ثم ثُفلت العينات لفصل الأنزيم عن العينات المحلمأة، وحُقنت في جهاز الكروموتوغرافيا السائلة من نوع Knauer وباستخدام كاشف RI وعمود NH2 وبتدفق 1.5 مل/ د حيث حقن محلول معياري بتركيز 80 mM وباستخدام مذيب أسيتونتريل/ماء منزوع الشوارد بنسبة 15/85 % (McCarthy وزملاؤه، 2005).

التحليل الاحصائي

أُجري اختبار تحليل التباين كتجربة عاملية بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة باستخدام Balanced ANOVA وأتبعت باختبار Tucky لتحديد الفروق المعنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية 0.05 باستخدام برنامج Minitab الإحصائي، حيث طُبقت ثلاثة مكررات لكل معاملة واستخدم عاملان في تحليل التباين، يمثل العامل الاول طريقة تكسير جدار خلية الخميرة ويمثل الثاني معاملة الاستخلاص.

النتائج والمناقشة

1- النسبة المئوية لجدار خلية الخميرة:

يبين الجدول1 النسبة المئوية لرطوبة الجدار الخلوي الناتج عن تكسير جدر خلايا الخميرة بثلاث طرائق، حيث أُهمل الجزء السائل والذي يمثل مستخلص الخميرة وقُدرت رطوبة الكتلة الصلبة والتي تمثل جدار خلية الخميرة، وقُدرت النسبة المئوية على أساس الوزن الجاف.

الجدول2. النسبة المئوية لجدار خلية الخميرة على أساس الوزن الجاف.

الطريقة	الرطوبة (%)	جدار خلية الخميرة (%)
التحلل الذاتي المعدل (Plasmolysis)	84	29.12
التحلل الذاتي غير محدد الظروف (13 يوم)	79.73	14.04
التحلل الذاتي مضبوطة الشروط (50 م°، 5 pH، 48ساعة)	75.88	39.1

يوضح الجدول 2 النسب المئوية لجدار خلية الخميرة الناتج عن تكسير خلايا الخميرة بثلاث طرائق، حيث تراوحت النسب المئوية لجدار خلية الخميرة على أساس الوزن الجاف بين 14.04 إلى 39.1 غ/100غ جاف، ويتضح من الجدول نفسه أن النسب المئوية لجدار الخميرة كانت بأعلى نسبة عند استخدام طريقة التحلل الذاتي مضبوطة الشروط حيث بلغت 39.1%، وهذا يوافق ما ذكره Amaral وزملاؤه (2008) بأن الجدار يشكل 40% من خلية الخميرة، وكانت أقل نسبة لجدار خلية الخميرة عند استخدام طريقة التحلل الذاتي غير مضبوطة الشروط وبلغت 14.04%، وهذا يوافق ما ذكره الباحثان Kim وYun عام 2006 بأن نسبة جدار الخميرة تتراوح بين 15-25%.

2- النسبة المئوية للمادة الصلبة الكلية من جدار خلية الخميرة بعد الاستخلاص:

يبين الجدول 3 النسب المئوية للمادة الصلبة الكلية على أساس الوزن الجاف الناتجة بعد عملية استخلاص البيتاغلوكان بالقلوي من جدار خلية الخميرة الناتج عن تحليل الخميرة بطريقة التحلل الذاتي المعدلة.

الجدول3. النسب المئوية للمادة الصلبة الكلية من جدار خلية الخميرة بطريقة التحلل الذاتي المعدلة.

شروط الاستخلاص (زمن/ن/مل قلوي:غ جدار)	الوزن الرطب بعد الاستخلاص (غ)	الرطوبة (%)	الوزن الجاف بعد الاستخلاص (غ)	المادة الصلبة الكلية من الجدار (%)
5:1/1/1	4.46	90	0.45	**9.76**
5:1/2/1	4.63	91	0.42	**9.12**
5:1/1/2	4.65	95	0.23	**5.09**
5:1/2/2	5.49	90	0.55	**12.01**
2:1/1/1	5.11	88	0.61	**13.42**
2:1/2/1	4.89	89	0.54	**11.77**
2:1/1/2	4.66	91	0.42	**9.18**
2:1/2/2	5.23	88	0.63	**13.73**

يبين الجدول السابق النسب المئوية للمادة الصلبة الكلية (غلوكان خام) المستخلصة من جدار خلية الخميرة قبل إجراء عملية التنقية باستخدام طريقة التحلل الذاتي المعدلة لتكسير جدار الخميرة، حيث تراوحت بين 5.09-13.73 % على أساس الوزن الجاف، وبلغت أعلى قيمة لها عند المعاملة 2:1/2/2والمعاملة 2:1/1/1 حيث أعطت 13.73% و13.42% على التوالي وأقل قيمة لها عند المعاملة 5:1/1/2وبلغت 5.09%، بينما أعطت المعاملتين 5:1/2/2 و 2:1/2/1 قيماً وسطية وصلت لـ12.01% و11.77% على التوالي، ولم تتجاوز النسبة المئوية للمادة الصلبة في باقي معاملات الاستخلاص 10%، وهذا يوافق ماذكره Thammakiti وزملاؤه (2004) من أن شروط الإستخلاص تؤثر في نسبة الغلوكان الخام من جدار الخلية، ولكن النسب كانت أقل مما ذكره Suphantharika وزملاؤه (2003).

ويبين الجدول 4 النسبة المئوية للمادة الصلبة الكلية على أساس الوزن الجاف الناتجة بعد عملية استخلاص البيتاغلوكان بالقلوي من جدار خلية الخميرة الناتج عن تحليل الخميرة بطريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف.

الجدول4. النسبة المئوية للمادة الصلبة الكلية من جدار خلية الخميرة المحضر بطريقة التحلل الذاتي غير مضبوطة الشروط.

شروط الاستخلاص (زمن/ن/مل قلوي:غ جدار)	الوزن الرطب بعد الاستخلاص (غ)	الرطوبة (%)	الوزن الجاف بعد الاستخلاص (غ)	المادة الصلبة الكلية من الجدار (%)
5:1/1/1	5.43	94.13	0.32	**11.11**
5:1/2/1	5.26	94.87	0.27	**9.40**
5:1/1/2	4.13	95.65	0.18	**6.26**
5:1/2/2	3.99	92.6	0.30	**10.29**
2:1/1/1	5.86	89.58	0.61	**21.28**
2:1/2/1	5.69	93.56	0.37	**12.77**
2:1/1/2	3.55	88.75	0.40	**13.92**
2:1/2/2	3.79	89.32	0.40	**14.10**

يظهر الجدول 4 النسب المئوية للمادة الصلبة الكلية (غلوكان خام) المستخلصة من جدار خلية الخميرة قبل إجراء عملية التنقية وعند استخدام طريقة التحلل الذاتي غير مضبوطة الشروط (13 يوماً) لتكسير جدار الخميرة، حيث تراوحت بين 6.26 و 21.28 % على أساس الوزن الجاف، وبلغت أعلى قيمة لها عند المعاملة 2:1/1/1 حيث بلغت 21.28% وهذا يوافق ما ذكره Suphantharika وزملاؤه (2003) من أن النسبة المئوية للغلوكان الخام تراوحت ما بين 20-40%، وبلغت أقل قيمة لها عند المعاملة 5:1/1/2 حيث بلغت 6.26%، إذ سجلت المعاملة الأخيرة وباقي المعاملات قيماً أقل مما ذكرته الدراسة السابقة حيث تدرجت من 9.40 و 10.29 و 11.11 و 12.77 و 13.92 إلى 14.10 عند المعاملات التالية 5:1/2/1، 5:1/2/2، 5:1/1/1، 5:1/2/1، 2:1/1/2و2:1/1/2على التوالي.

الجدول5. النسبة المئوية للمادة الصلبة الكلية من جدار خلية الخميرة بطريقة التحلل الذاتي مضبوطة الشروط.

شروط الاستخلاص زمن/ن/مل قلوي:غ جدار	الوزن الرطب بعد الاستخلاص (غ)	الرطوبة %	الوزن الجاف بعد الاستخلاص (غ)	المادة الصلبة الكلية من الجدار%
5:1/1/1	6.67	89	0.74	**37**
5:1/2/1	5.93	93.4	0.42	**21**
5:1/1/2	7.39	95.76	0.39	**19.5**
5:1/2/2	3.3	91	0.3	**15**
2:1/1/1	9.4	93.11	0.57	**28.5**
2:1/2/1	7.63	91.52	0.63	**31.5**
2:1/1/2	5.86	91.85	0.47	**23.5**
2:1/2/2	6.44	93.89	0.52	**26**

يبين الجدول 5 النسب المئوية للمادة الصلبة الكلية (غلوكان خام) المستخلصة من جدار خلية الخميرة قبل إجراء عملية التنقية وعند استخدام طريقة التحلل الذاتي مضبوطة الشروط (pH 5 و 50م° و 48 ساعة) لتكسير جدار الخميرة حيث تراوحت بين 15 و 37 % على أساس الوزن الجاف، ومن الجدول السابق ويُلاحظ أن طريقة التكسير السابقة رفعت من كفاءة الإستخلاص وأعطت نسبة مادة صلبة مرتفعة حيث وصلت أعلاها لـ 37% عند المعاملة 5:1/1/1 تليها النسب 31.5 و 28.5 و 26 و 23.5% عند المعاملات التالية 2:1/2/1 و2:1/1/1 و2:1/2/2 و2:1/1/2 على التوالي، وكانت باقي نسب الغلوكان أقل من 21%، وهذا يوافق ما ذكره Suphantharika وزملاؤه (2003).

يتضح من الجداول(2 و3 و 4) أن طريقة تكسير جدار خلية الخميرة وشروط الاستخلاص تؤثر بشكل كبير في النسبة المئوية للمادة الصلبة الكلية المستخلصة من جدار الخميرة، حيث تفوقت طريقة التحلل الذاتي مضبوطة الشروط على غيرها، وتفاوتت النسب بين معاملة استخلاص وأخرى بشكل كبير، حيث كانت أعلاها 37% عند المعاملة 5:1/1/1 بطريقة التحلل الذاتي مضبوطة الشروط وأقلها 5.09% عند المعاملة 5:1/1/2 بطريقة التحلل الذاتي المعدلة.

3- تركيز الكربوهيدرات الكلية (الغلوكان الخام) في جدار خلية الخميرة:

قُدر تركيز الكربوهيدرات الكلي لمعاملات الاستخلاص بطريقة فينول – حمض الكبريت اللونية المختلفة، حيث اختيرت المعاملة الأفضل اعتماداً على تركيز الكربوهيدرات الكلية التي تمثل الغلوكان الخام.

الجدول6. النسبة المئوية للكربوهيدرات الكلية (الغلوكان الخام) في جدار الخميرة.

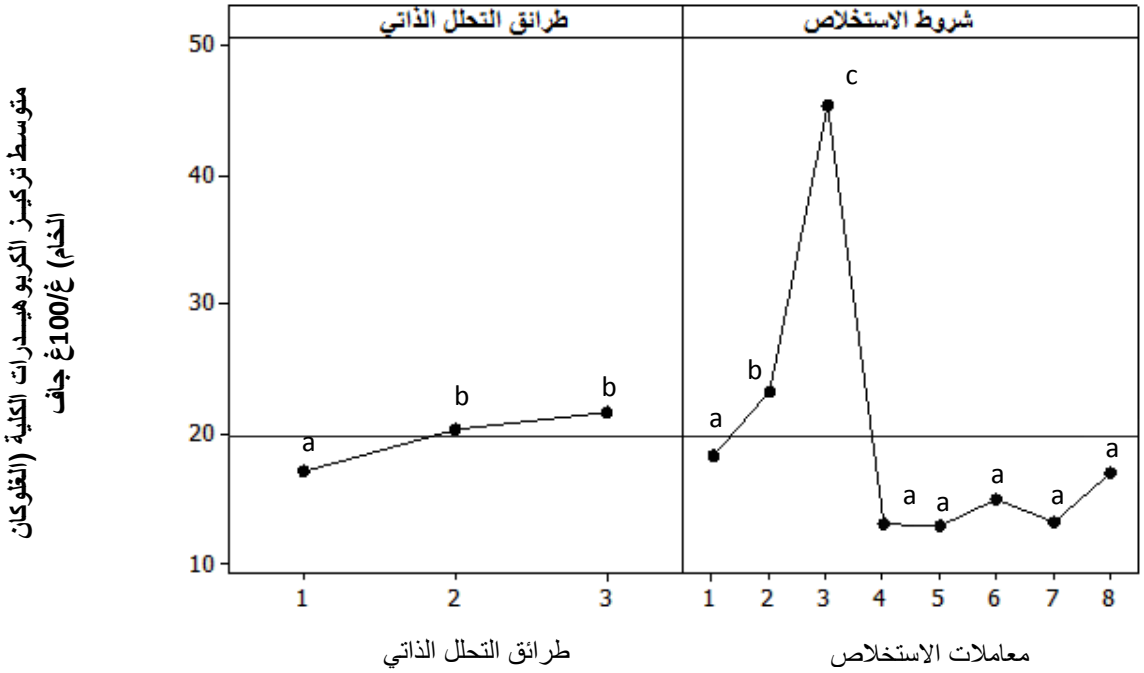
الطريقة	المعاملة	الامتصاصية بعد الحلمأة	التركيز بعد الحلمأة	التركيز غ/100غ جاف
التحلل الذاتي المعدل (Plasmolysis)	5:1/1/1	0.502	1.313	13.13 [a]
	5:1/2/1	0.803	2.120	23.55 [b]
	5:1/1/2	0.839	2.216	**44.33** [c]
	5:1/2/2	0.505	1.321	13.21 [a]
	2:1/1/1	0.499	1.305	10.88 [a]
	2:1/2/1	0.457	1.193	10.84 [a]
	2:1/1/2	0.496	1.297	14.41 [a]
	2:1/2/2	0.531	1.391	11.59 [a]
التحلل الذاتي محدد الظروف (50 م°، 5 pH)	5:1/1/1	0.456	1.190	10.82 [a]
	5:1/2/1	0.625	1.643	24.89 [b]
	5:1/1/2	0.845	2.232	**52.65** [c]
	5:1/2/2	0.514	1.345	14.95 [a]
	2:1/1/1	0.441	1.150	16.69 [a]
	2:1/2/1	0.461	1.203	14.19 [a]
	2:1/1/2	0.483	1.262	15.49 [a]
	2:1/2/2	0.677	1.782	29.17 [b]
التحلل الذاتي غير محدد الظروف (13 يوم)	5:1/1/1	0.709	1.868	31.82 [a]
	5:1/2/1	0.481	1.257	24.50 [b]
	5:1/1/2	0.672	1.769	**40.66** [c]
	5:1/2/2	0.349	0.903	12.20 [d]
	2:1/1/1	0.524	1.372	13.17 [d]
	2:1/2/1	0.539	1.412	21.93 [b]
	2:1/1/2	0.491	1.284	11.41 [e]
	2:1/2/2	0.422	1.099	10.29 [e]

تشير الأحرف المتشابهة عامودياً ضمن الطريقة الواحدة إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى 0.05

يبين الجدول 6 النسب المئوية للبيتاغلوكان الخام على أساس الوزن الجاف من جدار خلية الخميرة حيث سجلت المعاملة 5:1/1/2 أعلى نسبة للبيتاغلوكان في الطرائق الثلاث لتكسير جدار خلية الخميرة حيث بلغت 44.33 % في طريقة التحلل الذاتي المعدلة تلتها المعاملة 5:1/2/1 والتي بلغت 23.55%، بينما بلغت أعلى نسبة من البيتاغلوكان في طريقة التحلل الذاتي غير محددة الظروف عند المعاملة 5:1/1/2 40.66%، تليها المعاملات 5:1/1/1 و5:1/2/1 و2:1/2/1 حيث بلغ تركيز البيتاغلوكان 31.82 و 24.50 و 21.93% على التوالي، وسجلت المعاملة 5:1/1/2 بطريقة التحلل الذاتي محدد الظروف أعلى نسبة بين المعاملات والطرائق السابقة حيث وصل تركيز البيتاغلوكان لـ 52.65% وهذا يتوافق مع ما ذكره Shokri وزملاؤه (2008) من أن نسبة البيتاغلوكان وصلت لـ 55%، تلتها المعاملتين 2:1/2/2 و 5:1/2/1 حيث وصل التركيز فيهما لـ 29.17 و 24.89% على التوالي، وهذا يوافق ما ذكره Suphantharika وزملاؤه (2003) من أن نسبة البيتاغلوكان تتراوح بين 17.2 و 70.2%، بينما تراوحت نسبة البيتاغلوكان في المعاملات الأخرى في طرائق التحلل الثلاث بين 10 و 16% وهذه النسب أقل مما ذكره العالم السابق، ويُعزى هذا إلى انخفاض كفاءة شروط الإستخلاص من وقت وتركيز القلوي ونسبة جدار خلية لحجم القلوي في هذه المعاملات وهذا يتوافق مع ما ذكره Marinescu وStoicescu (2009) أن استخدام تراكيز مختلفة من ماءات الصوديوم وتغيير حجم ماءات الصوديوم لوزن جدار الخلية أعطى نسباً مختلفة من البيتاغلوكان تراوحت بين 10 و 49%.

4- تأثير طريقة التحلل الذاتي وشروط الاستخلاص المستخدمة في تركيز الكربوهيدرات الكلية (غ/100غ جاف):

أجري التحليل الإحصائي لدراسة وجود فروق معنوية في قيم متوسطات تركيز الكربوهيدرات الكلية المتحصل عليه نتيجة استخدام طرائق التحلل الذاتي وشروط الاستخلاص المختلفة، ويوضح الشكل 1 تأثير كل منهما في تركيز الكربوهيدرات الكلية (غ/100غ جاف).



الشكل1. تأثير كل من طرائق التحلل الذاتي وشروط الاستخلاص في تركيز الكربوهيدرات الكلية (غ/100غ جاف).

حيث أن الأرقام تشير إلى:

- طرائق التحلل الذاتي 1- التحلل الذاتي المعدل 2- التحلل الذاتي محدد الظروف 3- التحلل الذاتي غير محدد الظروف.

-شروط الاستخلاص: 1- (5:1/1/1) 2- (5:1/2/1) 3- (5:1/1/2) 4- (5:1/2/2) 5- (2:1/1/1) 6- (2:1/2/1) 7- (2:1/1/2) 8- (2:1/2/2)

تبين من التحليل الإحصائي لمتوسطات تركيز الكربوهيدرات الكلية على مستوى طرائق التحلل الذاتي وجود فروق معنوية بين طريقة التحلل الذاتي المعدل وطريقتي التحلل الذاتي مضبوط وغير محدد الظروف، حيث تبين أن متوسط تركيز الكربوهيدرات الكلية (الغلوكان الخام) المتحصل عليها من الطريقتين الأخيرتين أعلى منه في طريقة التحلل الذاتي المعدل، كما تفوقت المعاملة 5:1/1/2 بشكل معنوي وكبير بالمقارنة مع المعاملات الأخرى وقد يعود ذلك لطول فترة الاستخلاص (2 ساعة) والتي مكنت من استخلاص كمية أكبر من البيتاغلوكان من جدار خلية الخميرة، وتلتها بفارق معنوي المعاملة 5:1/2/1 والتي تفوقت بدورها على باقي المعاملات التي لم توجد فروقات معنوية بينها.

5- نتائج تقدير البيتاغلوكان بالكرموتوغرافيا السائلة:

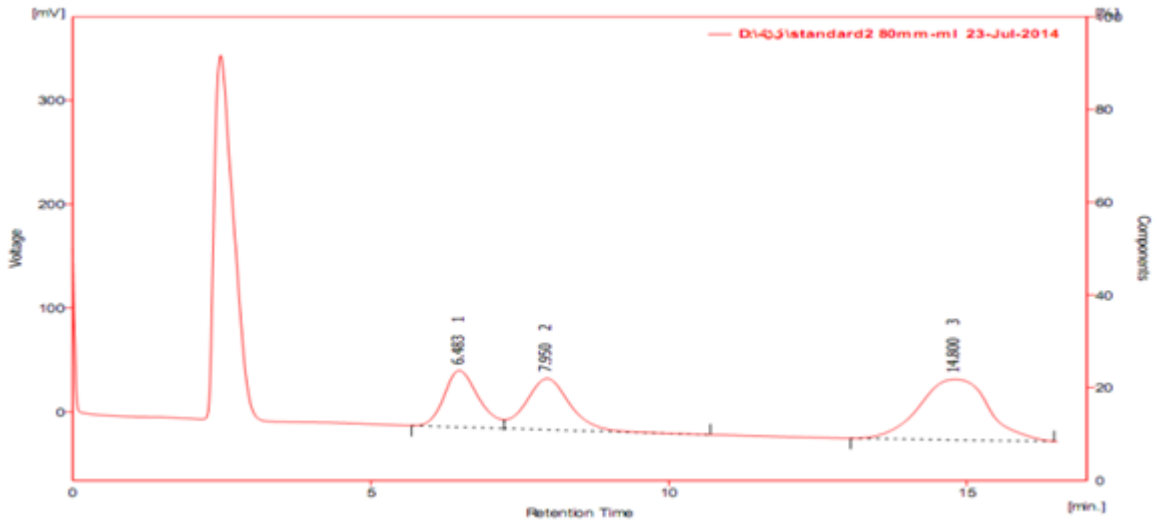
قُدر البيتاغلوكان المستخلص من جدار الخميرة باستخدام الكرموتوغرافيا السائلة بعد حلمأته أنزيمياً إلى غلوكوز، ويبين الجدول 7 نسبة البيتاغلوكان في في جدار الخميرة.

الجدول7. نسبة البيتاغلوكان على أساس الوزن الجاف

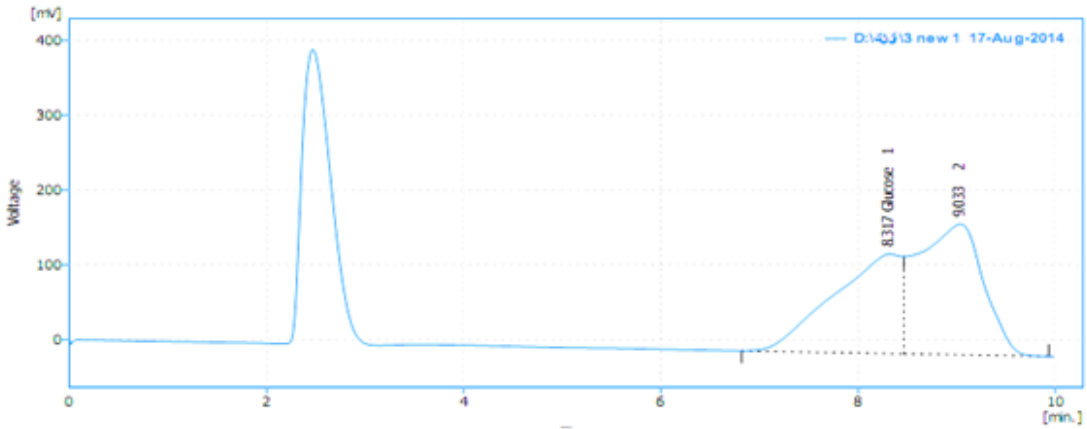
الطرائق	نسبة البيتاغلوكان النقي (غ / 100 غ جاف)
التحلل الذاتي المعدل	12.8 c
التحلل الذاتي غير محدد الظروف	21.4 b
التحلل الذاتي محدد الظروف	29.5 a

تشير الأحرف المتشابهة عامودياً إلى عدم وجود فروق معنوية على مستوى 0.05

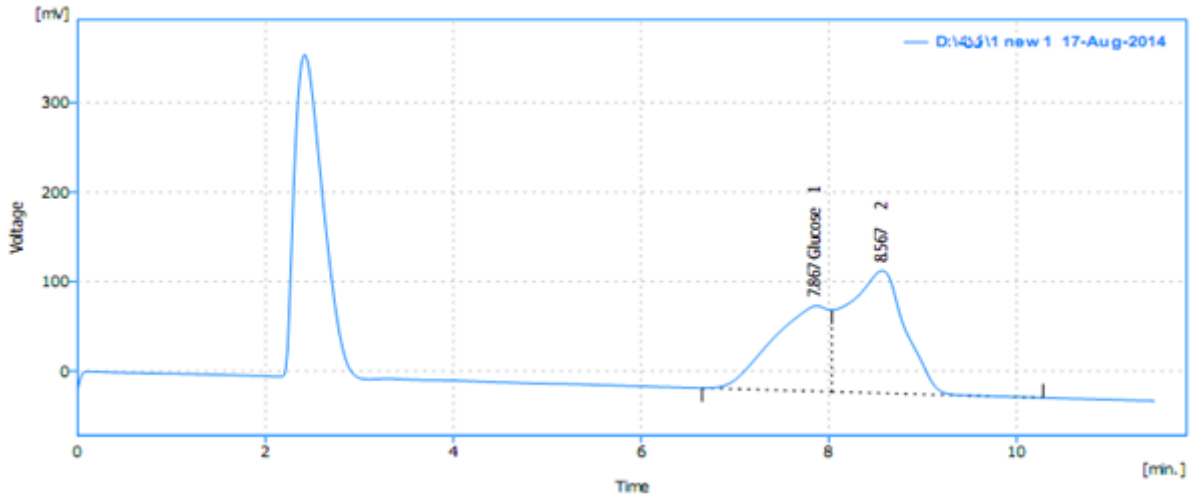
ويبين الجدول7 نسبة البيتاغلوكان المقدرة على أساس الوزن الجاف لجدار خلية الخميرة والناتجة عن معاملة الاستخلاص 5:1/1/2، حيث بلغت أعلى نسبة لها بطريقة التحلل الذاتي محدد الظروف (29.5%) تلتها طريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف وبلغت 21.4% وبلغت أقل نسبة 12.8% بطريقة التحلل الذاتي المعدلة وهذه النتائج تتوافق مع ما ذكره Suphantharika وزملاؤه (2003) من أن نسبة البيتاغلوكان ضمن شروط الاستخلاص ذاتها تراوحت بين 10 و 40%، وتوضح الأشكال التالية تركيز الغلوكوز الناتج عن نتائج تحليل البيتاغلوكان.



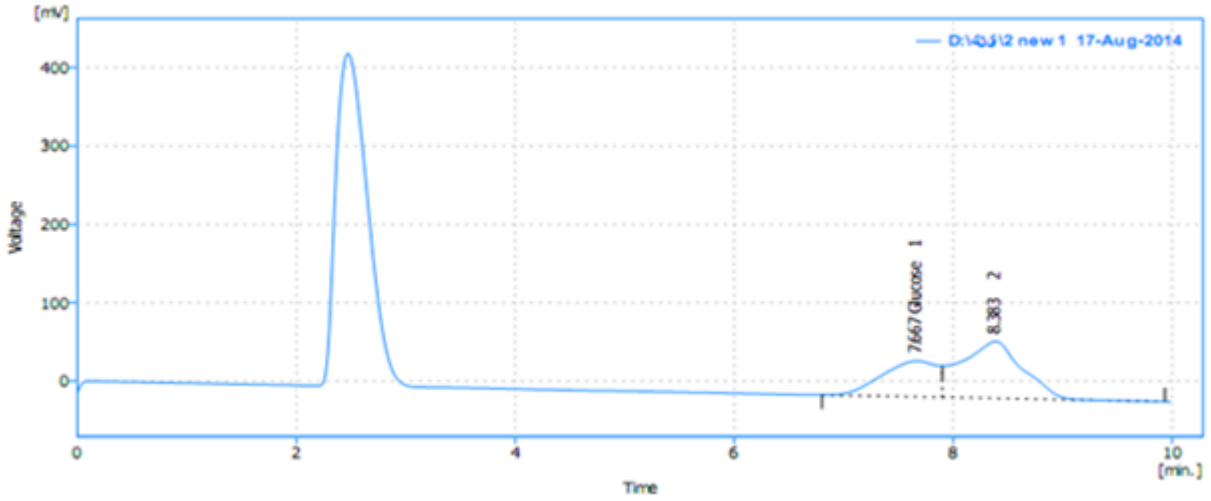
الشكل2. المنحنى المعياري لسكر الغلوكوز



الشكل3. تركيز الغلوكوز بطريقة التحلل الذاتي محدد الظروف



الشكل4. تركيز الغلوكوز بطريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف.



الشكل5. تركيز الغلوكوز بطريقة التحلل الذاتي المعدل.

الاستنتاجات

1- بلغت نسبة جدار خلية الخميرة عند تكسير جدارها بطرائق التحلل الذاتي محدد الظروف والتحلل الذاتي غير محدد الظروف والتحلل الذاتي المعدل 39.1 و 29.12 و 14.04% على التوالي.

2- تفوقت معاملة الاستخلاص 5:1/1/2على باقي معاملات الاستخلاص بطرائق التكسير الثلاث حيث بلغت نسبة الكربوهيدرات الكلية (الغلوكان الخام)52.65 في طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف.

3- تفوقت كل من طريقتي التحلل الذاتي محدد الظروف و غيرمحدد الظروف على التحلل الذاتي المعدل بقيمة متوسطات تركيز الكربوهيدرات الكلية، حيث دلت الدراسة الإحصائية على وجود فروق معنوية بينها.

4- تراوحت نسبة البيتاغلوكان المنقى جزئياً عند تقديره بتقانة الكرموتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) بين 12.8 و 29.5%، وأعطت طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف القيمة الأعلى.

المقترحات

1- الإستفادة من مخلفات معامل التصنيع الغذائي مثل معامل الخميرة و البيرة وإنتاج الكحول لإنتاج البيتاغلوكان.

2- الإستفادة من مخلفات الإنتاج الزراعي كالشعير والشوفان وكوالح الذرة لاستخلاص البيتاغلوكان الذواب في الماء ومقارنتها مع مصادر البيتاغلوكان من الخميرة.

3- دراسة الفرق بين البيتاغلوكان الذواب وغير الذواب في الماء من حيث الصفات الفيزيائية والوظيفية والتطبيقات الصناعية.

المراجع

- **Adamisch B., F. Karner and W. Hampel**. 2006. Proteolytic activity of a yeast cell wall lytic Arthrobacter species. Letters in Appl Microbiol. 36: 227–235.
- **Amaral A.E., E.R. Carbonero and R.C. Simao**. 2008. An unusual water-soluble β-glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. Journal of Carbohydrate Polymers. 72 (3): 473-478.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC.
- **Boonraeng S., P. Foo-Trakul, W. Kanlayakrit and C. Chetanachitra**. 2000. Efects of Chemical, Biochemical and Physical Treatments on the Kinetics and on the Role of Some Endogenous Enzymes Action of Baker's Yeast Lysis for Food-Grade Yeast Extract Production. Kasetsart J (Natural Science). 34: 270–278.
- **Borthwick K.A.** 2004. Purification of soluble beta Glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. J. Microbiol. 65 (4): 837-841.
- **Cai W., X. Gu and J. Tang**. 2008. Extraction, purification and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta*. Journal of Carbohydrate Polymers. 71 (3): 403-410.
- **Dikit P., S. Maneerat, H. Musikasang and A. H-kittikun**. 2010. Emulsifier properties of the mannoprotein extract from yeast isolated from sugar palm wine, Science Asia. 36: 312–318.
- **Erten H and Tanguler H**. 2006. The Effect of Different Temperatures on Autolysis of Baker's Yeast for the Production of Yeast Extract. Turk J Agric for 33: 149-154.
- Huang G. 2008. Extraction of Two Active Polysaccharides from the Yeast Cell Wall. Biopolymers. 32: 156-167.
- **Javmen A., S. Grigiškis and R. Gliebutė**. 2012. β-glucan extraction from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using *Actinomyces rutgersensis* 88 yeast lyzing enzymatic complex. Biologija. 58(2): 51–59.
- **Kim K.S and Yun H.S**. 2006. Production of soluble -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology. 39: 496–500.
- **Klis F., P. Mol, K. Hellingwerf and S. Brul**. 2006. Dynamic of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews. 26: 239–256.
- **Lazaridou A., C. Biliaderis and M. Izydorczk**. 2003. Molecular size effect onrheological properties of oat B-glucans insolution and gels. food Hydrocolloids. 17: 693-712.

- **Manners D.J., A.J. Masson and J.C. Patterson**. 2001. The structure of a β1,3-D-glucan from yeast cell walls. Biochem Journal, 135:19–30.
- **Marinescu G and Stoicescu A**. 2009. Researches concerning the preparation of spent brewer's yeast β-glucans. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, 15(4): 547-553.
- **McCarthy T., O. Hanniffy, E. Lalor, A. Savage and M.G. Tuohy**. 2005. Evaluation of three thermostable fungal endo-β-glucanases from *Talaromyces emersonii* for brewing and food applications. Process Biochemistry. 40: 1741-1748.
- **pecka M., H.J. Phaff and G.H. Fleet**. 2003. Demonstration of a fibrillar component in the cell wall in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its chemical nature. J Cell Biol, 62: 66–76.
- **Reed G and Nagodawithana W.T**. 2005. Yeast-Derived Products and Food and Feed Yeast. Yeast Technology. Vol 2, AVI Books, Van Nostrand Reinhold Co, New York, NY, USA. 369–412.
- **Saito H., Y. Yoshioka, M. Yoloi and J. Yamada**. 2002. Distinct gelation mechanisms between linear and branched 1-3β-D-glucans as revealed by high resolution solid state 13C NMR. Biopolymers. 29: 1689–1698.
- **Satrapai, S and M. Suphantharika**. 2007. Influence of spent brewer's yeast β-glucan on gelatinization and retrogradation of rice starch. Journal of Carbohydrate Polymers. 67 (4): 500-510.
- **Sherwood E.R, D.L. Williams, R. Mc Namer, E. Jones, I.W. Browder and N. Di Luzio**. 2003. Enhancement of IL-1 and IL-2 production by soluble glucan. Int. J. Immunopharmacol. 9: 261–267.
- **Shokri H., Asadi F and Khosravi A.R**. 2008. Isolation of beta-glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran, 20;22(5): 414-21
- **Stokke B.T., A. Elgsaeter, C. Hara, S. Kitamura and K. Takeo.** 1993. Physicochemical properties of 1-6-branched 1-3 β-D-glucans Physical dimensions estimated from hydrodynamic and electron microscopic data. Biopolymers,33: 561–573.
- **Suphantharika M., P. Khunrae, P. Thanardkit and C. Verduyn**. 2003. Preparation of spent brewer's yeast b-glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, Penaeus monodon. Biopolymers. (4): 56-67.
- **Talaga P., S. Vialle and M. Moreau**. 2002. Development of a high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection-based quantification assay for pneumococcal polysaccharides and conjugates. Vaccine 20: 2474-2484.
- **Thammakiti S., M. Suphantharika, T. Phaesuwan and C. Verduyn**. 2004. Preparation of spent brewer's yeast -glucans for potential applications in the food industry. Int. J. Food Sci.Technol. 39: 21–29.
- **Tominac L., Z. Vesna, B. Katarina, G. Petra and H. Zoran**. 2011. Rheological Properties, Water-Holding and Oil-Binding Capacities of Particulate b-Glucans Isolated from Spent Brewer's Yeast by Three Different Procedures. Food Technol and Biotechnol. 49 (1): 56–64.
- **Volman J.J., J.D. Ramakers and J. Plat**. 2008. Dietary modulation of immune function by E-glucans. Physiology & Behavior. 94: 276–284.

- **Vuka T., Marica R and Slavica M**. 2007. Utilization of baker's yeast *(Saccharomyces cerevisiae)* for the production of yeast extract: effects of different enzymatic treatments on solid, protein and carbohydrate recovery. J. Serb. Chem. Soc. 72 (5): 451–457.
- **Wenger M., P. De Phillips and D. Bracewel**. 2008. A Microscale Yeast Cell Disruption Technique for Integrated Process Development Strategies. Biotechnol Prog. 24: 606–614.
- **Williams L., B. McNamee, H. Pretus H. Ensley, W. Browder and N. Di Luzio**. 1991. method for the solubilization of 1-3β-D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydr Res. 219: 203–213.
- **Wiwat L.A., G. Motonobu, S. Mitsuru, S. Manop, M. Chirakarn, and P. Chattip**. 2006. Hydrothermal decomposition of yeast cells for production of proteins and amino acids. Journal of Hazardous Materials. B137: 1643–1648.

N° Ref: 540