



الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الهندسة الزراعية

قسم علوم الأغذية

استخلاص البيتاغلوكان من خميرة الخباز بطرائق مختلفة ودراسة صفاته الوظيفية

*Extraction of Beta Glucan from Baker's yeast using Different
Methods and Studying its Functional Properties*

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية
(تخصص علوم الأغذية)

إعداد

م. كنانة ممدوح عليكو

المشرف العلمي

د. لينة الأمير

أ. د محمد محمد

أستاذ مساعد في الهيئة العامة للتقانات الحيوية

أستاذ في قسم علوم الأغذية

كلية الزراعة – جامعة دمشق

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة بعنوان: "استخلاص البيتا غلوكان من خميرة الخباز بطرائق مختلفة ودراسة صفاته الوظيفية" جاء نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة كنانة ممدوح عليكو بإشراف الأستاذ الدكتور محمد محمد في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة- جامعة دمشق، والدكتورة لينا الأمير الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وأن المراجع المستخدمة في هذه الرسالة موثقة أصولاً ضمن النص.

المشرف المشارك

المشرف العلمي

المرشحة

الدكتورة لينا الأمير

الأستاذ الدكتور محمد محمد

كنانة عليكو

Certificate

It is hereby certificated that the work described in this thesis: "**Extraction of Beta Glucan from Baker's Yeast Using Different Methods and Studying Its Functional Properties** " is the result of the scientific research done by candidate Kinana Aliko under the supervision of Prof., Mohamad Mohamad, Food Science Department, Faculty of Agriculture and Dr. Lina Alameer Damascus University, National commition of Biotechnology and any reference to other research works has been duly acknowledged in the text.

Candidate

Supervision

Co-supervision

Kinana Aliko

Prof. Mohamad Mohamad

Dr. Lina Alameer

الإهداء

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمد لله الذي تواضع كل شيء لعظمته

الحمد لله الذي استسلم كل شيء لقدرته

الحمد لله الذي ذل كل شيء لعزته

الحمد لله الذي خضع كل شيء لملكه

إلى وكيلي ويني . . .

إلى من رباني وعلمي وأكرمني بعظيم نعمه . . .

لا أقول أهديك لأنك من أعطيت فأسألك صدق النية والقبول

بسم الله الرحمن الرحيم

إلى توأم روحي ونبض قلبي...
إلى رفيق دربي وسندي وقوتي...
إلى ملهمي وأملِي ...
إلى صاحب القلب الكبير والصدر أكنون...
إلى أعظم زوج بعطائه وأعظم أب نحنوه...
إلى من كان معي خطوة خطوة وآثرني على نفسي...
أنت أجمل هديت من الله سبحانه وتعالى...
لن أقول شكراً فلهي لا تكفي...
حفظك الله وحماك لي...

زوجي العزيز

إلى ملاكي أجميل وكنزي الدفين...
إلى حلمي وأملِي..
معك أشعر كأنني ملكة الدنيا كلها...
أحبك من كل قلبي...

ابني علي

إلى أجيل الراسخ بإيمانه....
إلى من علمني قوة الإرادة وعدم الاستسلام....
إلى ينبوع أكنان الذي لا ينبض....
إلى العطاء المتجدد الدائم....
إلى سندي وفخري..

والدي العزيز

إلى أعظم أم في الدنيا ..
إلى من يعجز قلبي عن وصفها ..
وتعجز روعي عن التعبير لها ..
إلى الطيف الذي جاب كياني بتضحيت وحنوه وإرادته ..
إلى العطاء المتجدد الدائم ..
إلى من أموت تحت ثرى قدميها ولا أعطيها حقها

أبي الغالية

إلى صدر تلقاني ...
ووعاء ألقى فيه أحلامي ..
إلى صحبت الدرب وأحبت القلب ..
إلى بسمتي وأملتي ..
إلى من أضافوا كياتي أحمل المعاني ..
لن أنسى جميلكم ما حييت ...

عائلي الثانية (عائلة زوجي)

إلى أم لم تلدني ..
وأخت بكل شيء شاركتني ..
ورفيقت درج ساندتني ...
إلى نوام روعي وملهمتي ..
إلى من فقدت الكلمات لوصفها ..
وغابت أكروف رسمها ..
لم ولن أنسى جميلك ما حييت ..

أختي حواء

إلى كن حياتي أجميل ..
إلى عزوتي وسندي وقوتي..
إلى أخصن الدافع والقلوب الطيبة ..
صداكم ملك كياني واستأثرتني..
فأنتم إرثي وفكري..

عائلي

إلى الظلال الخفية
إلى من سعدت بطيب صحبتهم...
وصدق معاملتهم ...
وجمال عفويتهم...
وجميل مساعدتهم...
لن أنساكم فقد كنتم خير عون لي...

أصدقائي جميعاً وأخص بالشكر

الدكتور بسام العقلة والدكتور رضوان بدر الدين

بطاقة شكر

أتوجه بالشكر الكبير إلى الأساتذة الأفاضل في قسم علوم الأغذية الذي قدموا لي يد المساعدة

خلال دراستي وعملي . . .

كما أخص بالشكر الكبير الزملاء في الهيئة العامة للتقانات الحيوية إلى من سعدت بحميل

مساعدهتهم وصدق معاملتهم، شكراً فقد كنتم خير عون لي . . .

كما أتوجه بالشكر الكبير

إلى الدكتور محمد محمد :

إلى من أحاطني بحنو الأب

إلى من لمست منه طيب المعاملة وصدق العمل

إلى من كان خير دليل ومعلم

من كل قلبي شكراً لرعايتك وإشرافك ولما قدمته لي

إلى الدكتورة لبنه الأمير :

إلى الدكتورة الرائعة التي كانت بحق كأم بحنوها وكأخت بطيبتها وعفويتها . .

ساندتني بكل خطوة خطيتها فكنت خير الناصح والمعلم . .

من كل قلبي شكراً ولن أنساك أبداً . . .

فهرس العناوين

الصفحة	العنوان
1	1- المقدمة
2	2- أهداف البحث
3	3- الدراسة المرجعية
4	3-1- كيمياء السكريات المتعددة
5	3-2- البيتاغلوكان
8	3-3- التطبيقات و الفوائد الوظيفية للبيتاغلوكان
10	3-4- تطبيقات البيتاغلوكان في صناعة الأغذية
11	3-5- خميرة <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>
13	3-6- بنية جدار خلية الخميرة
16	3-7- تكسير جدر خلايا الخميرة
18	3-8- استخلاص البيتاغلوكان
19	3-9- تنقية البيتاغلوكان
20	3-10- الغلايكوجين (α -glucan)
20	3-11- تقدير البيتا غلوكان من الخميرة
22	3-12- الصفات الوظيفية للبيتاغلوكان
22	3-12-1- قابلية ربط الماء
22	3-12-2- قابلية ربط الدهن
22	3-12-3- قابلية تشكيل وتثبيت الرغوة
23	4- مواد وطرائق البحث
23	4-1- المواد
24	4-2- الطرائق
24	4-2-1- التأكد من هوية خلايا الخميرة الجافة المستوردة
25	4-2-2- تكسير جدر خلايا الخميرة
26	4-2-3- تقدير النسبة المئوية لجدار خلية الخميرة
26	4-2-4- تقدير الرطوبة
27	4-2-5- استخلاص البيتاغلوكان
28	4-2-6- المعاملة بحمض الفوسفور (تنقية جزئية)
28	4-2-7- ترسيب البيتاغلوكان $\beta(1-6)$

28	4-2-8- تقدير الكربوهيدرات الكلية (البيتاغلوكان (1-3) β الخام)
29	4-2-9- تنقية البيتاغلوكان جزئياً
29	4-2-10- ترسيب المانوبروتين
29	4-2-11- تقدير البروتين
29	4-2-12- تقدير الغلايكوجين (ألفا غلوكان)
30	4-2-13- تجفيف العينات
30	4-2-14- حلمأة البيتاغلوكان أنزيمياً
30	4-2-15- تقدير البيتاغلوكان
31	4-2-16- تقدير الصفات الوظيفية و دراسة تأثير بعض ظروف التصنيع عليها
32	4-2-17- التحليل الإحصائي
33	5- النتائج والمناقشة
33	5-1- التأكد من هوية خلايا الخميرة المستوردة
34	5-2- التأكد من تحلل خلايا الخميرة بعد تكسير جدر خلايا الخميرة
35	5-3- النسبة المئوية لجدار خلية الخميرة
36	5-4- النسبة المئوية للمادة الصلبة الكلية في جدار خلية الخميرة
39	5-5- النسبة المئوية لـ β -D(1-6) Glucan من جدار خلية الخميرة
40	5-6- تركيز الكربوهيدرات الكلية (الغلوكان الخام) في جدار خلية الخميرة
42	5-7- تأثير طريقة التحلل الذاتي وشروط الاستخلاص المستخدمة في تركيز الكربوهيدرات الكلية
44	5-8- النسبة المئوية للبروتين في الغلوكان الخام
44	5-9- تأثير طريقة التحلل الذاتي ومراحل الاستخلاص والتنقية المستخدمة في تركيز البروتين
46	5-10- تقدير الكربوهيدرات الكلية
47	5-11- تأثير طريقة التحلل الذاتي ومراحل الاستخلاص والتنقية المستخدمة في تركيز الكربوهيدرات الكلية
48	5-12- تقدير الغلايكوجين
49	5-13- تأثير طريقة التحلل الذاتي ومراحل الاستخلاص والتنقية المستخدمة في تركيز الغلايكوجين
50	5-14- حساب نسبة البيتاغلوكان
54	5-15- تقدير الصفات الوظيفية
54	5-15-1- قابلية ربط الدهن
54	5-15-2- قابلية ربط الماء وتأثير الحموضة عليه
55	5-15-3- تأثير طريقة التحلل الذاتي والحموضة في قيم ربط الماء
57	5-15-4- تشكيل وثبات الرغوة تحت تأثير ظروف التصنيع
58	5-15-5- تأثير طريقة التحلل الذاتي ومعاملات التصنيع في حجم الرغوة

60	6-الاستنتاجات
60	7-المقترحات
61	8- المراجع العربية
62	9-المراجع الأجنبية

فهرس الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
1	بعض أنواع الألياف ومصدرها وتركيبها الكيميائي.	4
2	محتوى بعض المنتجات الغذائية من البيتاغلوكان.	10
3	أنواع السكاكر المتواجدة في شريحة الـ API	25
4	المعاملات التي تم تطبيقها عند استخلاص البيتاغلوكان من جدار خلية الخميرة.	27
5	النسب المئوية لجدار خلية الخميرة على أساس الوزن الجاف المحضر باتباع طرائق تحلل مختلفة.	35
6	النسب المئوية للمادة الصلبة الكلية من جدار خلية الخميرة المحضر بطريقة التحلل بالبلزمة (غ/100 غ وزن جاف).	36
7	النسب المئوية للمادة الصلبة الكلية من جدار خلية الخميرة المحضر بطريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف (غ/100 غ جاف).	37
8	النسب المئوية للمادة الصلبة الكلية من جدار خلية الخميرة المحضر بطريقة التحلل الذاتي محددة الشروط (غ/100 غ وزن جاف).	38
9	النسبة المئوية لـ β -D(1-6) Glucan (غ/100 غ وزن جاف)	39
10	النسب المئوية للكربوهيدرات الكلية (الغلوكان الخام) في جدار خلية الخميرة المحضر بطرائق مختلفة.	41
11	تحليل التباين لتأثير متغيرات طريقة التحلل الذاتي ومعاملة الاستخلاص في تركيز الكربوهيدرات الكلية.	43
12	النسبة المئوية للبروتين على أساس الوزن الجاف (غ/100 غ جاف)	44
13	تحليل التباين لتأثير متغيرات طريقة التحلل الذاتي ومعاملة الاستخلاص في تركيز البروتين.	45
14	النسبة المئوية للكربوهيدرات الكلية في مراحل الاستخلاص والتنقية المختلفة (غ/100 غ جاف)	46
15	تحليل التباين لتأثير متغيرات طريقة التحلل الذاتي ومعاملة الاستخلاص في تركيز الغلوكان الخام.	47
16	النسبة المئوية للغلايكوجين في مراحل الاستخلاص والتنقية المختلفة (غ/100 غ جاف)	48
17	تحليل التباين لتأثير متغيرات طريقة التحلل الذاتي ومعاملة الاستخلاص في تركيز	49

الغلايكوجين.

18	النسبة المئوية للبيتاغلوكان المنقى جزئياً (غ/100 غ جاف) المقدرة حسابياً	51
19	النسبة المئوية للبيتاغلوكان المنقى جزئياً (غ/100 غ جاف) المقدرة بالـ HPLC.	51
20	قابلية ربط البيتاغلوكان لزيت دوار الشمس وتأثير البسترة عليها.	54
21	قابلية ربط الماء للبيتاغلوكان وتأثير الحموضة عليها (مل ماء/100 غ بيتاغلوكان).	55
22	تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة فيقيم ربط الماء.	56
23	حجم الرغوة المتشكلة وتأثير معاملات التصنيع فيها (مل).	57
24	تحليل التباين لتأثير متغيري طرائق التحلل الذاتي ومعاملات التصنيع في حجم الرغوة.	58

فهرس الأشكال

الصفحة	عنوان الشكل	رقم الشكل
6	بنية بوليمير البيتاغلوكان من الحبوب.	1
6	بنية بوليمير البيتاغلوكان من الخميرة.	2
7	بنية بوليمير البيتاغلوكان من البكتيريا.	3
14	البنية التفصيلية لجدار خلية الخميرة.	4
15	بنية سلاسل البيتاغلوكان والمانوبروتين.	5
33	محضر غشائي لخميرة <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	6
33	السكريات المخمرة بواسطة الخميرة المدروسة بعد التحضين لمدة 72 ساعة.	7
34	عدم وجود نموات للخميرة بنهاية طريقتي التحلل الذاتي محدد الظروف والتحلل بالبلزمة	8
34	تعداد خلايا الخميرة خلال فترة التحضين 13 يوم.	9
43	تأثير كل من طرائق التحلل الذاتي وشروط الاستخلاص في تركيز الكربوهيدرات الكلية.	10
45	متوسطات نسب البروتين لطرائق التحلل الذاتي الثلاث في مراحل الاستخلاص والتنقية.	11
48	تأثير طريقة التحلل الذاتي ومراحل الاستخلاص والتنقية المستخدمة في تركيز الكربوهيدرات الكلية.	12
50	تأثير طريقة التحلل الذاتي ومراحل الاستخلاص والتنقية في تركيز الغلايكوجين.	13
52	المنحنى المعياري لسكر الغلوكوز والذي تركيزه mM80.	14
52	نسبة البيتاغلوكان المنقى جزئياً للمعاملة المتلى والناتج عن طريقة التحلل بالبلزمة.	15
53	نسبة البيتاغلوكان المنقى جزئياً للمعاملة المتلى والناتج عن طريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف.	16
53	نسبة البيتاغلوكان المنقى جزئياً للمعاملة المتلى والناتج عن طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف.	17
56	تأثير طريقة التحلل الذاتي والحموضة في قيم ربط الماء.	18
59	تأثير طريقة التحلل الذاتي ومعاملات التصنيع في حجم الرغوة (مل).	19

الاختصارات

Amarican Organization for Analytical Chemistry	AOAC
Diehtyl Amino Ethanol	DEAE
European Food Safety Authority	EFSA
Food and Drug Administration	FDA
Functional Food Science in Europe	FUFOSE
Gas Chromatography	GC
Glycosyl Phosphatidyl Inositol	GPI
General Recognized as Safe	GRAS
Sulfuric Acid	H ₂ SO ₄
Hydrochloric Acid	HCL
High Performance liquid Chromatography	HPLC
High Performance Size Exclusion Chromatography	HPSEC
Kilo Dalton	KDa
Mononuclear Phagocyte System	MPS
Trifluoroacetic acid	TFA
United States Food and Drug Administration	US.FDA
Ultra Violet	UV

الملخص

استخلص البيتاغلوكان من جدار خلية خميرة الخباز *Saccharomyces cerevisiae*، حيث تم تحليل جدار خلية الخميرة بثلاث طرائق هي التحلل الذاتي محدد الظروف من حيث درجة الحرارة 50°م ودرجة الحموضة (pH 5) وفترة التحضين 48 ساعة، والتحلل الذاتي غير محدد الظروف والذي تم بحرارة الغرفة ولمدة تحضين 13 يوم، والتحلل بالبلمرة بإضافة 5% ملح كلور الصوديوم. تراوحت النسبة المئوية لجدار خلية الخميرة المستخلص في الطرائق الثلاث بين 14-39 %، حيث تم الاستخلاص بطريقة قلوية - حرارية بتطبيق ظروف مختلفة من زمن، تركيز للقلوي ونسبة جدار خميرة لحجم القلوي وقدرت نسبته في جدار خلية الخميرة على أساس الوزن الجاف لونياً بطريقة الفينول - حمض الكبريت لاختيار معاملة الاستخلاص الأفضل حيث أعطت المعاملة 1:5/1/2 (2 ساعة، 1N ماءات صوديوم، نسبة 1 غ خميرة/5 مل قلوي) أعلى نسبة من البيتاغلوكان الخام وبلغت 52.65% نسبة لوزن الجدار بطريقة التحلل الذاتي محدد الظروف، بينما أعطت طريقتي التحلل الذاتي غير محدد الظروف والتحلل بالبلمرة 44.33، 40.66% على التوالي.

فصل السكر المتعدد $\beta(1-6)$ Glucan عن $\beta(1-3)$ Glucan باستخدام حمض الفوسفور وتم ترسيبه باستخدام الإيتانول حيث أعطت المعاملة 1:2/2/2 أعلى نسبة وبلغت 4.2 غ في طريقة التحلل بالبلمرة، ثم أجريت عملية تنقية جزئية للبيتاغلوكان الخام المستخلص باستخدام حمض الفوسفور ثم ترسيب البروتين بمعاملة حرارية حيث انخفضت نسبة البروتين تدريجياً خلال مراحل الاستخلاص والتنقية وتراوحت في البيتاغلوكان المنقى جزئياً بطرائق التفسير الثلاث بين 0.68-1.31 غ/100 غ وزن جاف، كما قدرت نسبة الغلايكوجين أنزيمياً فتراوحت نسبته في البيتاغلوكان المنقى جزئياً بين 41.80-52.42 غ/100 غ وزن جاف، ثم قدرت نسبة البيتاغلوكان المنقى جزئياً باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC بعد حلمهة العينات أنزيمياً باستخدام أنزيم $\beta(1\rightarrow3)$ -D-Glucanase فأعطت طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف أعلى قيمة وبلغت 29.5 % تلتها طريقتي التحلل الذاتي غير محدد الظروف والتحلل بالبلمرة حيث بلغتا 21.4 - 12.8 % على التوالي.

أبدت طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف أعلى قدرة لربط الدهن والماء حيث بلغتا 242 مل/100 غ، 674 مل/100 غ على التوالي، كما أثرت عملية البسترة سلباً على صفة ربط الدهن لتصل إلى 231 مل/100 غ، بينما أثرت معاملة التحميص إيجاباً على قابلية ربط الماء حيث أدت لارتفاع النسبة بشكل

ملحوظ حتى وصلت إلى 748.22 مل/100 غ. أعطى البيتاغلوكان قدرة تكوين رغوة عالية وصلت إلى 8.5، 8.5، 9.5 مل لطريقة التحلل بالبلزمة، التحلل الذاتي غير محدد ومحدد الظروف على التوالي، كما أدت إضافة الحمض لانخفاض نسبة الرغوة وثباتيتها بنسبة قليلة وأثرت معاملتي التسخين والتبريد سلباً على ثباتية الرغوة وأدت لانخفاضها بدرجة كبيرة.

Abstract

Betaglucan of the cell wall of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* was extracted from the yeast cell wall that was analysed using three methods ; autolysis under controlled conditions at (pH 5, temperature 50 °C and 48 hours incubation), autolysis at uncontrolled conditions by incubating at room temperature for 13 days and the third method was plasmolysis using 5% sodium chloride salt. The percentage of the cell wall produced by the yeast extracts obtained by the three methods ranged between 14-39%. Betaglucan of crude cell wall was extracted by the alkaline – warm up method under different conditions (time, concentration of alkali and proportion of the wall of yeast to alkaline). The percentage of betaglucan was estimated depending on dry weight of cell wall 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 of uncontrolled conditions overcame the method of plasmolysis in their average values of total carbohydrates concentration (crude β -glucan).

(1-6) β Glucan was separated from (1-3) β Glucan using phosphoric acid-ethanol treatment, so that the treatment 2/2/1:2 gave the highest rate reaching 4.2g using the plasmolysis method, then a partial purification process for crude beta glucan was conducted, by treatment with phosphoric acid and high temperature to precipitate the protein . Percentages of protein during the extraction and purification steps were estimated by different analysis methods, they ranged between 0.68-1.31g/100g dry weight of cell wall, percentages of glycogen were also estimated using different analysis methods, they ranged between – 41.80 52.42 g/100g dry weight. Proportion of β -glucan partially purified was estimated using high-performance liquid chromatography HPLC of enzymatically hydrolysed samples treated with β - (1 $\rightarrow$ 3) -D-Glucanase, autolysis under controlled conditions reached the the highest value reaching 29.5% followed by the method of autolysis under uncontrolled conditions and plasmolysis with values of 21.4-12.8% respectively. Highest susceptibility to bind fat and water where reported by controlled conditions method and reached 242 ml/100g, 231ml/100g respectively. Pasteurization process influenced the ability to bind fat negatively leading to a decline in the ratio up to 231 ml / 100 ,whereas acidification process influenced the ability to bind water positively

leading to a high percentage reached 748.22 ml / 100 g. On the other hand, beta glucan offered high ability to make foam reaching 8.5,8.5,9.5 ml in plasmolysis, autolysis under uncontrolled and under controlled conditions respectively, also acidification treatment led to reduction in the stability of the foam and its formation. Heating and cooling treatments influenced the stability of foam and led to its significant decline .

1- المقدمة:

تزايد الاهتمام في العقود الأخيرة لإنتاج مواد هامة اقتصادياً بالاعتماد على الكيمياء الصناعية والكيمياء الحيوية من مصادر حيوية متجددة، رخيصة ومتوافرة كبديل عن المستحضرات التجارية باهظة الثمن، وذلك باستخدام تقانات تصنيعية غير مكلفة وقابلة للتطبيق على المستوى التجاري كالأنزيمات، الملونات، الأحماض العضوية، مضادات الحيوية، الفيتامينات، المدعمات الغذائية وغيرها (Kalinga و Mishra ، 2009).

يعتبر البيتاغلوكان من متعددات السكر الهامة **وظيفياً وصناعياً** لإمكانية استخدامه بالعديد من التطبيقات الصناعية الغذائية حيث يؤدي لتحسين الصفات الحسية والوظيفية للمنتج النهائي (Tiwari و Cummins ، 2009)، كما يملك فوائد صحية كثيرة أدت لتصنيفه كغذاء وظيفي مما جعله مادة هامة في العديد من الصناعات الصيدلانية والتجميلية (Mason ، 2011).

يمتاز البيتاغلوكان بتنوع مصادره من **الحبوب** التي تزرع بكثرة في سوريا حيث يوجد بنسب عالية في الشعير والشوفان وبنسبة أقل في القمح والشيلم بينما تتميز المصادر الأخرى من الأحياء الدقيقة **كالفطور، الخمائر والبكتيريا** بالإضافة **للطحالب والأشنيات** بمزايا تجعلها مهمة جداً ومنها معدل نموها العالي، نموها على المخلفات النباتية والصناعية، بساطة وسرعة تكاثرها. بالإضافة لذلك تعد تقانة إنتاج البيتاغلوكان بسيطة وغير معقدة وغير مكلفة، مما شجع العديد من الدول على إنتاجه **كمدمع غذائي** نتيجة تزايد الوعي الصحي والاتجاه نحو العلاجات الطبيعية البديلة عن العقاقير الطبية أو **كمادة مضافة** لها العديد من التطبيقات الصناعية الهامة (Kalinga و Mishra ، 2009).

ظهر الاهتمام في دراسة عديدات السكر كغذاء وظيفي بعد إجراء العديد من الأبحاث التي أظهرت الفعالية البيولوجية لجدار خلية الخميرة الخام وقدرته على تحفيز جهاز المناعة، والذي تبين فيما بعد أن المكون الفعال فيه هو $\beta(1-3)\text{-D-glucan}$ (Cho و Drener ، 2003)، يعتبر هذا النوع من البيتاغلوكان مكوناً هاماً من مكونات جدار خلية الخميرة حيث يشكل ما يقارب 50% من الجدار (Thammakiti وزملاؤه، 2004)، وقد اهتمت هذه الدراسة باستخلاصه من الخميرة لبساطة وسرعة تكاثرها بالمقارنة مع المصادر النباتية وإمكانية الاستفادة من مخلفات الصناعات المعتمدة على الخميرة كالبيرة أو إنتاج الكحول لإنتاج البيتاغلوكان، وبعده طرائق، حيث تمت تنقيته جزئياً وتقديره ودراسة صفاته الوظيفية كمضاف غذائي وتأثير ظروف التصنيع عليها.

2- أهداف البحث:

- 1- استخلاص البيتاغلوكان من خلايا الخميرة بطرائق مختلفة.
- 2- دراسة تأثير طرائق تكسير الخلايا وظروف الاستخلاص على مردود البيتاغلوكان.
- 3- تنقية البيتاغلوكان بشكل جزئي.
- 4- تقدير البيتا غلوكان بالطريقة اللونية وباستخدام تقانة الكرموتوغرافيا السائلة عالية الأداء .HPLC

- 5- دراسة الصفات الوظيفية للبيتا غلوكان المستخلص.
- 6- تأثير ظروف التصنيع على الصفات الوظيفية للبيتاغلوكان.

3- الدراسة المرجعية:

تقسم الكربوهيدرات تغذوياً إلى كربوهيدرات متاحة Kavailable وتعرف بأنها تلك المواد التي تستقلب إلى طاقة أي تخضع لفعل الأنزيمات الداخلية في الأمعاء الدقيقة عند الإنسان، وتتضمن السكاكر الأحادية كالغلوكوز والفركتوز والسكاكر الثنائية كالسكروز واللاكتوز والمالتوز والسكر الثلاثي الرافينوز والسكر الرباعي السناكيوز، كما تشمل عديدات السكر المخزونة كالنشاء والدكستريانات، أما الكربوهيدرات غير المتاحة unavailable وهي توصف عادةً باصطلاح ألياف القوت أو عديدات السكر اللانثوية، وهي التي تقاوم الأنزيمات الداخلية للأمعاء الدقيقة، ولكن بعضها يخضع لتأثير الأنزيمات البكتيرية في الأمعاء الغليظة حيث تستقلب لأحماض دهنية طيارة ومنتجات ثانوية فعالة، وبعضها الآخر يقاوم فتطرح دون تغيير، وهي ذات طبيعة كيميائية أكثر تعقيداً من المتاحة، وتشمل عديدات السكر اللانثوية والليغنين والإنولين والنشاء المقاوم، وتؤثر عن طريق تغيير طبيعة محتويات الجهاز الهضمي وآلية امتصاص المغذيات والمواد الكيميائية الأخرى (James، 1998)، وتقسم الألياف بالنباتات حسب الذوبانية في الماء إلى ألياف ذوابة في الماء و تتألف بشكل أساسي من بعض أنواع البيتاغلوكان (من الشعير والشوفان) الصمغ والمواد الهلامية، المواد البكتينية، الأرابينوكزايان والإنولين وهي تعتبر prebiotic "هي الألياف غير القابلة للهضم التي تحرض وبشكل محدد نمو الأحياء الدقيقة النافعة الموجودة أصلاً في قولون الإنسان" حيث تتخمر في القولون إلى غاز ومنتجات ثانوية فعالة (Andlauer و Furst، 2002)، ألياف غير ذوابة بالماء مثل الليغنين، السيللوز والهيمي سيللوز والكيوتين وهي إما تطرح دون استقلاب في الأمعاء الغليظة وتسمى (bulking fibers) وتكون مسؤولة عن انتظام خروج البراز أو تتخمر في القولون جزئياً أو كلياً إلى غاز ومنتجات ثانوية فعالة وتسمى (Fermentable insoluble fibers) ألياف غير ذوابة قابلة للتخمر ويمكن اعتبارها أيضاً prebiotic. (AACC، 2001؛ Charalampopoulos وزملاؤه، 2002؛ Andlauer و Furst، 2002)، والجدول (1) يبين أهم أنواع الألياف وتركيبها الكيميائي.

الجدول (1) بعض أنواع الألياف ومصدرها وتركيبها الكيميائي.

الاسم	التركيب الكيميائي	المصدر
الألياف غير الذوابة في الماء		
البيتاغلوكان	وحدات غلوكوز $\beta(1-3)$, $\beta(1-6)$	الأحياء الدقيقة
السيللوز	وحدات غلوكوز $\beta(1-4)$	النباتات
الكيتين	<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine $\beta(1-4)$	الحشرات، الفطريات
الهيمي سيللوز	وحدات كزاييلوز، مانوز، غلوكوز، غالاکتوز	الحبوب، البقوليات، الأخشاب
الليغنين	وحدات من كحولات عطرية.	الخشب، الحبوب، النواة الحجرية للفواكه والخضار
الكزانتان	وحدات غلوكوز، مانوز، حمض غلوكورونيك	بكتيريا <i>Xanthomonas</i>
الألياف الذوابة في الماء		
البيتاغلوكان	وحدات غلوكوز $\beta(1-3)$, $\beta(1-4)$	الشعير، الشوفان، الشيلم.
الإينولين	وحدات غلوكوز وفركتوز $\beta(1-2)$	الخضار، الفواكه، الحبوب
البكتين	حمض الغلاكتورونيك مؤسّتر بمجموعات ميتالية	قشور الفواكه والخضار
الألجينات	Mannuronate, Guluronate	الطحالب
الآغار	مزيج من الأغاروز والأغاروبكتين	الطحالب
البولي دكستروز	وحدات غلوكوز	صنعي
لاكتولوز	فركتوز، غالاکتوز	صنعي

(Morris و Eastwood ، 1992)

3-1- كيمياء متعددات السكر:

تعطي متعددات السكر عند حلمائها سكريات أحادية أو مركبات مشتقة منها تختلف عن بعضها في نوع السكريات الأحادية الداخلة في تركيبها وفي وزنها الجزيئي وفي طريقة ارتباط الوحدات مع بعضها، إلا أنها كلها تتكون عن طريق ارتباط السكريات الأحادية بروابط غلايكوزيدية والتي إما أن

تكون α أو β وترتبط عن طريق ذرات الكربون 1:2، 1:3، 1:4، 1:6 سواء أكان في السلسلة الرئيسية أم في الشعب عند نقاط التشعب (محمد والخياط، 2000؛ Guo وزملاؤه، 2008)، وتقسم عديدات السكر إلى :

- عديدات سكر متجانسة Homopolysaccharides: وهي سكريات متعددة تعطي عند حلماتها وحدات سكرية متماثلة مثل النشاء، السيللوز.

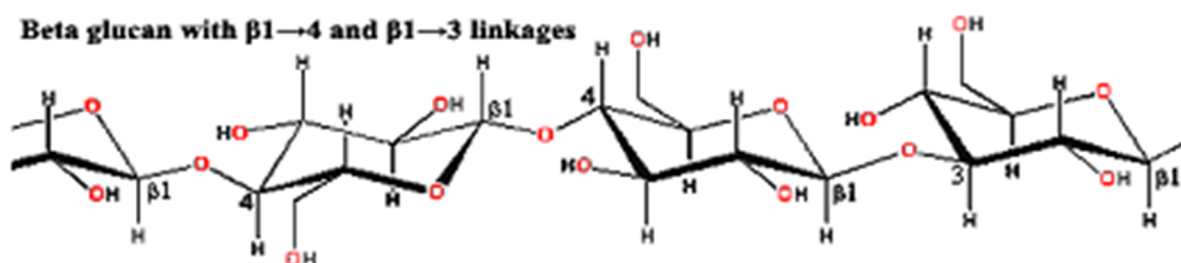
- عديدات سكر غير متجانسة Heteropolysaccharides وهي سكريات متعددة تعطي عند حلماتها وحدات سكرية غير متماثلة مثل حمض الهيلورونيك الذي يتألف من حمض غلوكورونيك و *N-acetyl-D-glucosamine* (محمد والخياط، 2000؛ Guo وزملاؤه، 2008).

ظهر الاهتمام بمتعددات السكر في مطلع القرن العشرين في مجال الصيدلة والكيمياء الحيوية، لاحظ العالم Von Dungern في عام 1900 تأثير مناعي للخميرة مع مكون غريب في مصل الدم، ثم في عام 1940 اكتشف العلماء مادة من جدار خلية خميرة الخباز أطلقوا عليها اسم Zymosan حيث استخدمت لاحقاً من قبل العديد من الباحثين لدراسة مقاومة الأمراض من قبل البشر والحيوانات، عزلت متعددات سكر لأول مرة في عام 1943 من مصدر بكتيري ولم تلق استحساناً لامتلاكها تأثيرات جانبية، في عام 1960 تم التعرف على المكون الفعال في الـ Zymosan والذي سمي β -1-3,6-glucan ثم اكتشف العلماء في عام 1976 قدرتها على تحفيز الجهاز المناعي، حيث امتلكت تأثيرات مضادة للأورام، ثم في وقت لاحق عزلت الـ Schizophyllan و Lentinan، Glucans تأثيرات مضادة للسرطان، ثم في وقت لاحق عزلت الـ Schizophyllan و Lentinan، Glucans وهي متعددات سكر من مصادر مختلفة وسوقت في عام 1995 في اليابان لأغراض طبية بعد ذلك أدخلت ألياف البيتاغلوكان غير الذوابة في التطبيقات الصناعية وتطبيقات التغذية خاصة بغرض استبدال المضادات الحيوية بها (Larroche و Michaud، 2007).

3-2- البيتاغلوكان:

يعرف البيتاغلوكان بأنه سكر متعدد متجانس Homopolysaccharide يتكون من سلسلة خطية أو متفرعة من وحدات الغلوكوز β -D-glucopyranosyl مع درجات متنوعة من التفرع، ويوجد فراغياً بشكل لولبي ثلاثي أو أحادي أو بشكل لفات عشوائية والاختلاف بين أنواع البيتاغلوكان المستخلص من مصادره المختلفة يعود إلى الاختلاف في نوع الروابط الغلايكوزيدية بين وحدات الغلوكوز، فالرابطة β (1-3) هي الأكثر شيوعاً في أنواع البيتاغلوكان وقد تشترك بوجود نوع آخر من الروابط β (1-4) و β (1-6) حسب المصدر (Mason، 2011) ومن أهم مصادر البيتاغلوكان:

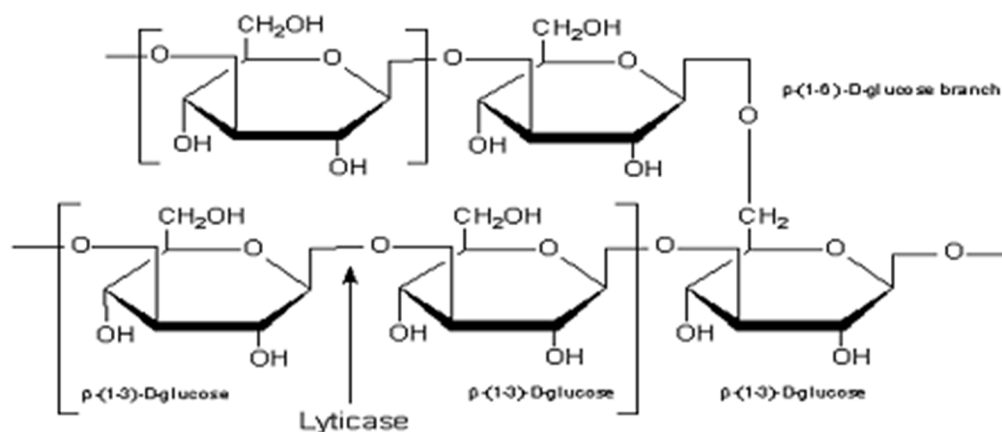
1- الحبوب: مثل الشعير، الشوفان وبدرجة أقل القمح والشيلم وخاصة في النخالة حيث أنه يتركز عادة بطبقة الأليرون وتحت الأليرون من إندوسبرم جدار الخلية، و يتكون جزيء البيتاغلوكان من سلسلة خطية غير متفرعة من β -D-glucan $\beta(1-4)$ ، $\beta(1-3)$ كما هو موضح في الشكل 1، حيث تبلغ نسبة الرابطتين $\beta(1-3)$ و $\beta(1-4)$ 30% و 70% على التوالي، ونحصل عند حلماة روابط البيتاغلوكان على نوعين من المركبات هما: β -D Cellobiosyl glucose و β -D Cellotriosyl glucose * ويشكلان 90-95% من إجمالي السكر المتعدد، وهي مركبات ذات سلسلة أطول من السكر المتعدد بنسبة تتراوح بين 5-10% (Sherwood وزملاؤه، 2003).



الشكل (1): بنية بوليمير البيتاغلوكان من الحبوب (Johansson، 2006)

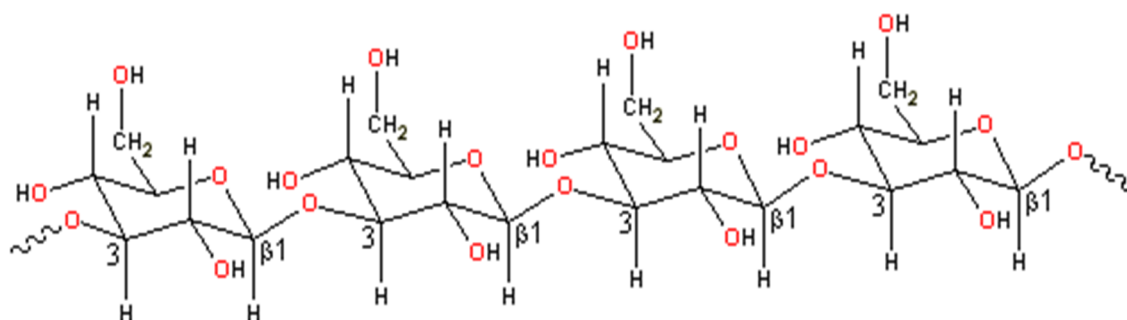
*السيللوز يتألف من وحدات من الغلوكوز مرتبطة بروابط $\beta(1-4)$ ، حيث كل وحدتين غلوكوز مرتبطتان بـ $\beta(1-4)$ تسمى Cellobiose، بينما الـ Cellotriose تمثل ارتباط 3 وحدات من الغلوكوز بالرابطة $\beta(1-4)$ -

2- الخمائر والفطور والطحالب والأشنيات: تتكون سلسلة البيتاغلوكان من $\beta(1-3)$ -D-glucan وعدد قليل من التفرعات $\beta(1-6)$ -D-glucan كما هو موضح في الشكل 2 (Volman وزملاؤه، 2008).



الشكل (2): بنية بوليمير البيتاغلوكان في الخميرة (Volman وزملاؤه، 2008).

3- البكتيريا: تتكون سلسلة البيتاجلوكان من سلسلة غير متفرعة بروابط $\beta(1-3)$ كما هو موضح في الشكل 3 (Lazaridou وزملاؤه، 2003؛ Menaga وزملاؤه، 2012).



الشكل (3): بنية بوليمير البيتاجلوكان من البكتيريا (Menaga وزملاؤه، 2012).

كما يوجد البيتاجلوكان في بعض الفطريات الدعامية (mushroom) مثل: Schizophyllan، Reishi، Maitake، Shiitake، وLz-8 Lentinan (Holtekjolen وزملاؤه، 2006؛ Menaga وزملاؤه، 2012).

يعود تنوع الأشكال البنوية للبيتاجلوكان لاختلاف مصادره وطرائق استخلاصه (Be و Bohn و Miller، 1995) حيث تمثل مجموعة متنوعة من الجزيئات تختلف فيما بينها بالوزن الجزيئي، الذوبانية، اللزوجة والتركيب ثلاثي الأبعاد والاختلافات في نوع روابط البيتاجلوكان والبنية الكيميائية والوزن الجزيئي تؤثر في خصائص الذوبانية، النشاط البيولوجي وآلية التأثير (Mason، 2011)، كما تؤثر درجة التفرع الكبيرة والحجم الكبير من السلاسل الجانبية على الفعالية البيولوجية للبيتاجلوكان (Buliga وزملاؤه، 2004).

يتأثر الوزن الجزيئي للبيتاجلوكان بمصدره فيصل لـ $10^5 \times 27$ دالتون للبيتاجلوكان المستخلص من الشعير ويتراوح بين $10^5 \times 2-1$ دالتون في الشوفان (Aman وزملاؤه، 2004) ويبلغ 100-200 كيلودالتون للبيتاجلوكان المستخلص من الخميرة (EFSA، 2011) ويعود هذا التفاوت للتنوع الكبير بدرجة التفرع والبلمرة (Das، 2010).

يعتبر البيتاجلوكان المستخلص من جدار خلية الخميرة غير ذواب بالماء، بينما المستخلص من الحبوب بعضه ذواب وبعضه الآخر غير ذواب وأظهرت دراسة أن البيتاجلوكان غير الذواب يملك نشاط بيولوجي أكبر من نظيره الذواب (Menaga وزملاؤه، 2012).

يلعب العامل الاقتصادي دوراً كبيراً في اختيار مصدر استخلاص البيتاغلوكان فالمستخلص من الشوفان يفضل على المستخلص من الشعير، بينما تعتبر الخميرة المصدر الأكثر شيوعاً لأنه منخفض التكلفة، في حين يعتبر الفطر من أعلى مصادر البيتاغلوكان تكلفة (Demirbas، 2005).

3-3- التطبيقات والفوائد الوظيفية للبيتاغلوكان:

يملك البيتاغلوكان فوائد صحية عديدة أدت لتصنيفه كغذاء وظيفي، "ويعرف الغذاء الوظيفي حسب FUFOS (Functional Food Science in Europe) بأنه الغذاء الذي يملك تأثير نافع مثبت على واحد أو أكثر من الوظائف الفيزيولوجية للكائنات الحية، ومن أشهر المواد التي تعتبر فعالة بيولوجياً الأحماض الدهنية المتعددة عديمة الإشباع (أوميغا3)، الفيتامينات، المعادن ذات التأثير المضاد للأكسدة، ألياف الحمية الغذائية (prebiotics) والبكتيريا النافعة (probiotics) والمواد التي تعزز المناعة الطبيعية عند الكائنات الحية"، وعليه اعتبر البيتاغلوكان غذاءً وظيفياً لإمكانية استخدامه بالعديد من التطبيقات الصيدلانية والطبية كمادة طبيعية تعزز جهاز المناعة حيث أطلق عليه مصطلح معدل الاستجابة المناعية (Biological response modifier) لأنه يعمل على تنشيط وتقوية وزيادة فعالية خلايا الدم البيضاء (البالعات الكبيرة) التي تقوم بدورها بالتهام البكتيريا والخلايا المتحولة الميتة والغريبة كما أنه أعطى نتائج إيجابية عند استخدامه لمعالجة مرضى الإيدز، اعتبر Szymańska و Bednarek (2007) أن $\beta(1-3) (1-6)-D-$ glucan والذي يملك سلسلة طويلة مع تفرعات جانبية يعتبر prebiotics حيث يحفز نمو البكتيريا النافعة للأمعاء ويهاجم من قبل ما يسمى بـ Peyer's patches (عقد لمفاوية) بالأمعاء الدقيقة وتحولها إلى mononuclear phagocyte system نظام بلعمية وحيدات النوى عن طريق البالعات ثم يحدث تحطم تأكسدي له بعد أيام في الأمعاء الغليظة وقد يدخل جزء بسيط من البيتاغلوكان لنقي العظام والغدد الليمفاوية والطحال ليتحطم بشكل كامل (Beier و Gebert، 1998؛ Hong و زملاؤه، 2004) ويعمل وظيفياً بعدة آليات منها تحريض نمو الفلورا النافعة في الأمعاء الدقيقة التي تخمر البيتاغلوكان لغاز ومنتجات ثانوية نافعة أو التأثير على آلية امتصاص المغذيات والمواد المختلفة في الأمعاء وتنظيم خروج الفضلات كما يقوم بربط المواد الضارة مثل الشحوم والمواد السامة كمركبات الأمين الحلقية ويمنع امتصاصها في الجسم. (Cho و Drener، 2003؛ Szymańska و Bednarek، 2007).

يساعد البيتاغلوكان في المحافظة على صحة جيدة وتسريع الشفاء كما يعتبر مثبط قوي جداً للأورام الخبيثة والحميدة ويساعد على تدعيم العلاج الكيماوي، ولوحظ أن البيتاغلوكان مرتفع الوزن الجزيئي

يملك فعالية أعلى كمضاد للأورام من نظيره منخفض الوزن الجزيئي (Be Miller و Bohn، 1995)، كما أنه يعدل مستوى الكوليسترول الضار والدهون الثلاثية في الجسم ويحافظ على مستويات طبيعية لسكر الدم بالنسبة لمرضى السكري، كما يساعد على ترميم الجلد وتجديده خصوصاً الوجه حيث يوصى بأن يكون جزء من روتين العناية اليومي ويساهم أيضاً في تنظيم ضغط الدم، يساعد على علاج بعض الحالات المرضية (كالتعرض للإشعاع، الصدمة الإنتانية، العمليات الجراحية) بالإضافة لدوره كمضاد للأكسدة ومضاد للأحياء الدقيقة (Vetvicka و Vetvickova، 2007).

يوصى بأخذ 200 مغ/يوم من البيتاغلوكان لتقوية المناعة وخفض الكوليسترول، ويوصى بـ 400 مغ/يوم بحالات طبية معينة. أما عند الإصابة بالسكري، السرطان أو حالات خطيرة أخرى يوصى بـ 400 مغ/يوم لمدة سنة ثم يخفض لـ 200 مغ/يوم، كما حددت منظمة الغذاء والدواء الأمريكية FDA المدخول اليومي للشخص من البيتاغلوكان غير الذواب بـ 413.02 مغ أي ما يعادل 8.90 مغ لكل كيلو من وزن الجسم يومياً للشخص (Mason، 2011)، وتوصي دراسات أخرى بجرعة قدرها 2 مغ بيتاغلوكان لكل كيلو غرام من وزن الجسم يومياً (Vlatka وزملاؤه، 2010)، يؤخذ البيتاغلوكان إما على شكل كبسولات، مسحوق، كريمات أو من مصادره الطبيعية حيث تبين أن 50 غ من الشوفان المجفف أو الشعير تحتوي على 2500 مغ منه، في حين أن 100 غ من حبوب القمح الكاملة تحتوي على 2000 مغ (Mason، 2011).

صنف البيتاغلوكان من قبل منظمة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) على أنه مادة آمنة (GRAS) بسبب عدم امتلاكه أي آثار جانبية حتى في الجرعات العالية منه، كما وجد أنه يعزز فعالية العديد من العقاقير الدوائية مثل المضادات الحيوية (U.S.FDA، 2007)، حيث استهلكت ملايين الجرعات من البيتاغلوكان في الولايات المتحدة الأمريكية وبشكل آمن خلال العقود الأخيرة (Vlatka وزملاؤه، 2010)، ويبين الجدول (2) محتوى بعض المنتجات الغذائية من البيتاغلوكان.

الجدول (2): النسب المستخدمة من البيتاغلوكان في بعض المنتجات الغذائية.

نوع المنتج	الكمية المتناولة بالوجبة الواحدة (غ أو مل)	كمية البيتاغلوكان بالوجبة (مغ)	نسبة البيتاغلوكان %
البسكويت	40-30	200	0.667-0.5
عصائر الفاكهة	240	200	0.083
حبوب الإفطار	40	200	0.5
حليب الصويا	240	200	0.083
اللبن الرائب	225	200	0.089
الشوكولا	40	200	0.5

(U.S.FDA، 2007 ؛ Aimaniada وزملاؤه، 2009).

3-4- تطبيقات البيتاغلوكان في صناعة الأغذية :

يمتلك البيتاغلوكان صفات فيزيائية ووظيفية هامة تجعله ذو أهمية اقتصادية كبيرة، حيث يدخل في تصنيع منتجات متعددة مثل منتجات الخبز، الكيك، المعكرونة، منتجات الحليب، الشوربات، تنبيلة السلطات، المشروبات الغازية، منتجات الألبان منخفضة الدسم ومنتجات اللحوم، حيث ساهم في تحسين تشكيل الخبز وقابلية ربط الماء وثباتية الاستحلاب (Mishra و Kalinga، 2009)، ويمتلك قدرة على تثخين القوام وتحسين البنية والمظهر وهذه ترتبط بالتركيز، الوزن الجزيئي وبنية متعددات السكر (Lazaridou و Biliaderis، 2007؛ Tiwari و Cummins، 2009).

يتمتع البيتاغلوكان خواص ريولوجية تعود لارتفاع لزوجته عند تراكيز منخفضة منه (Butt وزملاؤه، 2008) مما جعل منه مكوناً غذائياً هاماً لاستخدامه بشكل مسحوق (Hunter وزملاؤه، 2002) أو كمركب غروي (Lazaridou وزملاؤه، 2004؛ Lee وزملاؤه، 2009)، حيث يعتبر من المركبات المحبة للماء فيرتبط بكميات كبيرة من الماء عن طريق مجاميع الهيدروكسيل الموجودة في تركيبه وتعتبر هذه الصفة مهمة في التصنيع الغذائي إذ تزيد من تصافي المنتج بالإضافة إلى زيادة الحجم في تصنيع الخبز (Lazaridou وزملاؤه، 2007)، يدخل البيتاغلوكان أيضاً في العديد من التطبيقات الصناعية كعامل استحلاب، عامل تخثر وعامل لتثخين القوام نظراً للزوجته العالية فيستخدم بصناعة

الآيس كريم وفي تنبيلة السلطات (Wood وزملاؤه، 2002)، إضافة إلى تصنيع الأغذية منخفضة المحتوى من الدهون كاللبن الرائب (Liu وزملاؤه، 2005).

يملك البيتاغلوكان قدرة عالية على امتصاص الماء والدهن وتثبيت الرغوة في المحاليل، وهذا يعزز من إمكانية استخدامه في منتجات الألبان خاصة الجبن المطبوخ كمادة مستحلبة وخصوصاً في المنتجات المخبوزة حيث أدى استخدامه في أنواع الأجبان منخفضة الدسم لتحسين الصفات الريولوجية والجيلاتينية، وأشارت الأبحاث أن إضافة محلول البيتاغلوكان للحليب يؤدي لزيادة الخثرة وتحسينها (Tudorica وزملاؤه، 2004؛ الطائي والليثي، 2012)، يمكن استخدامه مع النشاء لتحسين صفاته في تحضير الأغذية بدلاً عن المواد المثخنة مثل كاربوكسي متيل سيللوز أو بعض أنواع الأصماغ كالصمغ العربي والغوار وصمغ اللوكاست. يضاف البيتاغلوكان إلى خلطات الخبز بدلاً من استخدام بعض الأصماغ التي عادة ما تضاف كمادة محسنة للخبز وكذلك الأغذية الحاوية على النشاء لزيادة اللزوجة وإضافته إلى المشروبات والعصائر كمادة مثخنة. (الطائي والليثي، 2012)

يعمل البيتاغلوكان على تحسين الخواص الحسية للمنتج النهائي ومعايير الجودة (Gajdošová وزملاؤه، 2007) فيمكن أن يدخل بصناعة الأغذية المدعمة بالألياف كحبوب الإفطار والوجبات الخفيفة (Cui، 2001)، ويمكن أن يستخدم كغطاء سطحي غير منفذ للماء للمنتجات الغذائية وتجري أبحاث حديثة لاستخدامه كمنظم للبلورة في منتجات الحليب المجمدة (Soukoulis وزملاؤه، 2009؛ Tran وزملاؤه، 2013).

يستخدم البيتاغلوكان حالياً بشكل واسع بالصناعات الغذائية كعامل مثخن (معتدل النكهة، قوام كريمي ناعم) بديل عن الدهن، وكعامل استحلاب لقدرته العالية على ربط الماء والدهن، قدرته على الجلتنة وسهولة التحكم بلزوجته حيث يمكن زيادتها بالتبريد وإنقاصها بالتسخين وهي تعتمد على سلاسة الخميرة المستخدمة (Reed و Nagodawithana، 2005؛ Wylie، 2002؛ Thammakiti وزملاؤه، 2004).

3-5- خميرة *Saccharomyces Cerevisiae*:

يتميز هذا النوع من الخمائر بأهميته الصناعية حيث يدخل بصناعة المشروبات الكحولية، الكحول، الغليسرين، الخل وخميرة الخبز حيث تشكل الخلايا الميتة جزءاً مهماً من المتبقي الصلب بعد عملية التخمير وتعتبر مخلفات الخميرة منتج ثانوي مهم صناعياً لاحتوائها على تركيب كيميائي أهمه متعددات السكر، ويقتصر استخدام هذه المخلفات كعلف للحيوانات والعديد منها يرمى في مجاري

المدن مما يؤدي لتلويثها (Santipanichwong و Suphantharika، 2007؛ Satrapai و Suphantharika، 2007).

يختلف تركيب خلية الخميرة بين الأنواع المختلفة، حيث تتألف بشكل أساسي عند خميرة الخباز والجة من 60% مستخلص خميرة (Yeast extracts) و 40% جدار خلية الخميرة (Cell wall) الذي يتألف بدوره من 58-60% بيتاغلوكان و 2% دهون و 40% مانان (بوليميرات من سكر المانوز مرتبطة بروابط $\beta(1-4)$ تتواجد في النباتات والبكتيريا والخمائر كسكر متعدد بنيوي أو خازن للطاقة) وتختلف هذه النسب حسب طريقة تكسير جدر الخلايا والاستخلاص ونوع الخميرة المستخدم (Thammakiti وزملاؤه، 2004؛ Cai وزملاؤه، 2008؛ Amaral وزملاؤه، 2008).

ذكرت دراسات أخرى أن جدار خلية الخميرة يشكل حوالي 15-25% من الوزن الجاف (Williams وزملاؤه، 1991؛ Kim و Yun، 2006)، ويتألف من 28% مانوبروتين، 2-3% بروتين، 1-2% كيتين، 25% غلايكوجين، بيتاغلوكان 30-60% (Stokke وزملاؤه، 1993؛ Manners وزملاؤه، 2001؛ Pecka وزملاؤه، 2003).

يملك جدار خلية الخميرة بنية معقدة، حيث يتألف من طبقة داخلية قريبة من الغشاء البلاسمي مكونها الأساسي $\beta(1,3\text{-}D\text{ glucan})$ متفرع غير ذواب بالقلوي (30-35%) يشكل شبكة ثلاثية الأبعاد وتحمي هذه الطبقة المرنة الخلية من تغيرات الضغط الأسموزي وهو مرتبط مع الكيتين مما يجعله غير ذواب وهو المسؤول عن شكل خلية الخميرة، وطبقة وسطى بيتاغلوكان غير متفرع ذواب بالقلوي (20-22%) قريبة من سطح الخلية (Saito وزملاؤه، 2002؛ Klis وزملاؤه، 2002)، $\beta(1,6\text{-}D\text{ glucan})$ (4-10%) ذواب بالحمض ويشكل بوليمير متفرع يربط مكونات الجدار مع بعضها، وطبقة خارجية من الغلايكوبروتين (30%) حيث تتألف الكربوهيدرات فيها من مانان مفسفر وتختلف الطبقة الداخلية عن الوسطى بعدد أكبر لمر $\beta(1-6)$ في سلاسل الـ $\beta(1-3)$ ، ويشكل المانوبروتين 50-95% من وزن الكربوهيدرات في جدار خلية الخميرة (Muller وزملاؤه، 1997؛ Kopecka و Kreger، 2000).

قام العديد من الباحثين بتقدير المادة الصلبة الكلية لمستخلص البيتاغلوكان من جدار خلية الخميرة حسب الطريقة المتبعة في الـ AOAC (2000) حيث تراوحت بين 20-40% على أساس الوزن الجاف بين المعاملات المختلفة (Suphantharika وزملاؤه، 2003)، بينما تراوحت نسبة البروتين بين 2.9-10.3% على أساس الوزن الجاف (AOAC، 2000؛ Suphantharika وزملاؤه، 2003)،

وتباينت نسبة الكربوهيدرات الكلية والغلايكوجين بين 75.4-88.7% و 18.3-30.4% على التوالي على أساس الوزن الجاف (Marinescu و Stoicescu، 2009).

3-6-بنية جدار خلية الخميرة:

يشكل جدار خلية خميرة الـ *S.cerevisiae* 15-30% من وزنها الجاف ويتألف من: **β -1,3-D glucan**: يشكل الجزء الأكبر من مكونات جدار خلية خميرة الخباز ويوجد بشكل شبكة ليفية، حيث يصل الطول الأعظمي لأليافه 600 nm بقطر 10-30 nm، ويصل وزنه إلى 240000 دالتون ويتألف تقريباً من 1500 وحدة غلوكوز، ويتراوح عدد سلسله من $10^6 \times (1-3)$ ، تؤثر درجة التفرع على طول البوليمير فكلما زادت قل طوله وهذا يعتمد على طول السلسلة الفرعية حيث لا توجد معلومات دقيقة عن طول التفرعات التي يشكلها β -1,6-D glucan ولكن تعطي هذه التفرعات إذا كانت طويلة شكلاً ملتفاً كثيفاً بنهايات مرجعة وتساعد على تشكيل البنية اللولبية على عكس التفرعات القصيرة، يملك هذا البوليمير بنية لولبية بقطر 10-30 nm تتألف من سلسلة من متعددات السكر أو ثلاث سلاسل مرتبطة بروابط هيدروجينية وكل سلسلة بقطر 0.5-1 nm (Pecka وزملاؤه، 2003).

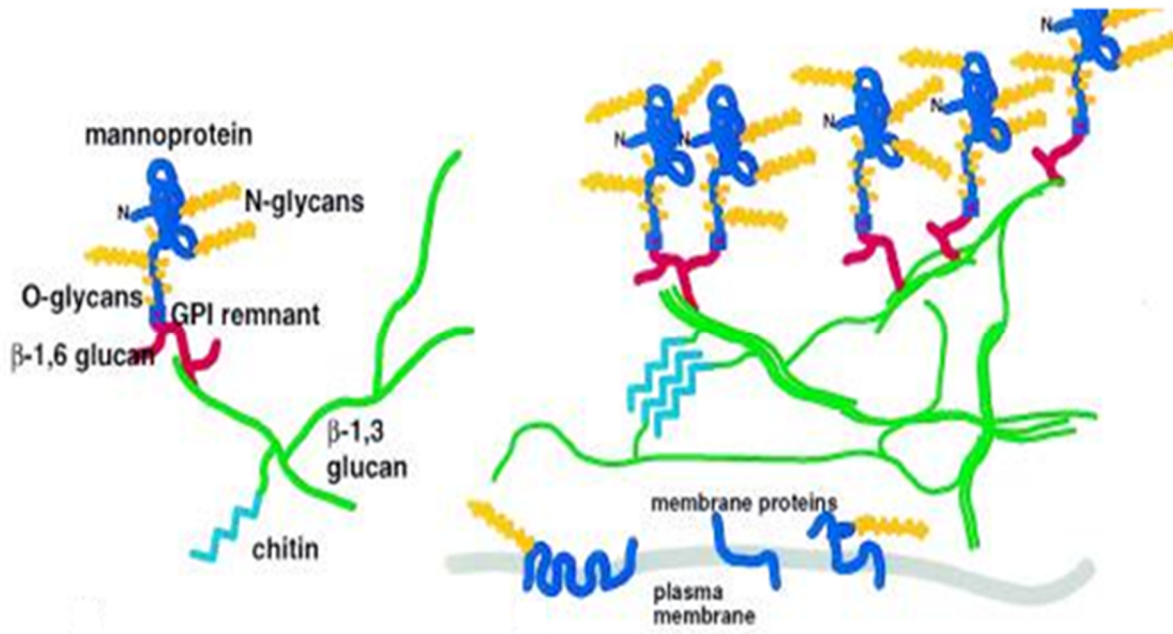
يتوضع الأنزيم المسؤول عن تصنيع β 1,3 glucan في الغشاء البلاسمي، بينما يسمى الأنزيم المسؤول عن تكوين التفرعات (Bgl2p) ويشبه نشاطه نشاط الأنزيم المسؤول عن تكوين تفرعات النشاء.

β -1,6-D glucan: يوجد بشكل متفرع حيث يربط مكونات الجدار مع بعضها البعض بين الطبقتين الداخلية والخارجية، ويتألف تقريباً من 150 وحدة غلوكوز ويشكل 15% من البيتاغلوكان الكلي، ويحمل β 1,6 glucan نفس عدد سلاسل β 1,3 glucan لاتصاله بها (Klis وزملاؤه، 2002).

الكيتين: يوجد ضمن سلاسل مستقيمة تصل لـ 120 وحدة وتعود له صفة عدم الذوبانية حيث يشكل معقداً مع β 1,3 glucan وهذا المعقد يشكل الجزء الأعظمي من الطبقة الداخلية للجدار، يرتبط الكيتين مع β 1,3 glucan و β 1,6 glucan عن طريق النهايات غير المرجعة، ويعتبر α كيتين الشكل الأكثر شيوعاً في جدر خلايا الفطور والخمائر، ويشابه بتركيبه بنية α -cellulose مع وجود روابط هيدروجينية تربط سلسله المؤلفة من وحدات من *N-acetyl-D-glucosamine* مرتبطة بروابط β -1,4، إن الروابط الهيدروجينية التي تشكلها مجموعات الأميد هي التي تعطي الثباتية للكيتين، كما

أن وجود مجموعات الأسيت أميد ميثيل هي التي تعطي الخواص الكارهة للماء وتمنع الذوبانية فيه (Kopecka و Kreger ، 2000).

المانوبروتين: يوجد في الطبقة الخارجية من الجدار، ويتراوح وزنه الوسيط بين 100-200 KDa، ويحمل نفس عدد سلاسل البيتاغلوكان، وهو عبارة عن متعدد ببتيد سكري مرتبط بروابط غلايكوزيدية مع سكر المانوز وتشكل الكربوهيدرات 50-95% من وزنه، ومعظم الروابط في السلاسل السطحية فيه عند الخمائر من النوع N-glycan حيث يتألف من سلسلة طويلة من المانوز (50-200 وحدة) مرتبطة بروابط $\alpha 1,6$ مع تفرعات قصيرة من $\alpha 1,2$ ، $\alpha 1,3$ وفسفرة هذه السلاسل الجانبية هو الذي يعطي سطح الخميرة الشحنة السالبة، كما يتواجد بتركيبية المانوبروتين في الجدار روابط من النوع O-glycan تحتوي على 1-5 جزيئات من سكر المانوز (Klis وزملاؤه، 2002) ويوضح الشكل (4) البنية التفصيلية لجدار خلية الخميرة.



الشكل(4): البنية التفصيلية لجدار خلية الخميرة (Cai وزملاؤه، 2008).

polysaccharide-Glycan

مركبات تتكون من ارتباط عدد كبير من السكريات الأحادية بروابط غلايكوزيدية، كما يشير مصطلح Glycan إلى الجزء الكربوهيدراتي في السكريات المشتقة مثل البروتينات السكرية glycoproteins ، السكريات الأمينية proteoglycans ، الشحوم السكرية glycolipid حتى لو كان السكر ثنائي فقط،

وقد تكون الوحدات السكرية متجانسة أو غير متجانسة، وقد يكون متفرع أو خطي، ويتألف من روابط O-glycan فقط ويتواجد على السطح الخارجي للخلية (Saito وزملاؤه، 2002).

:O-glycan

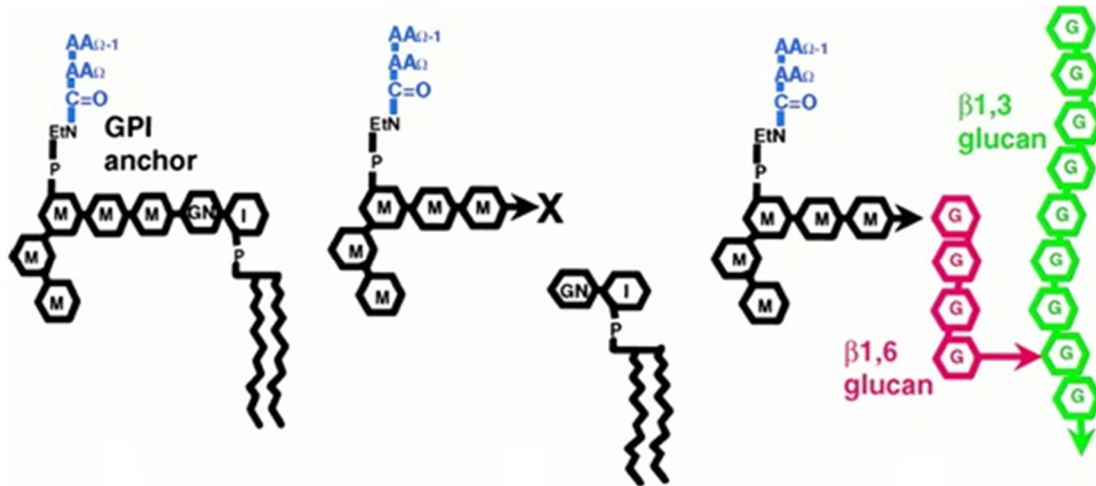
يتألف من أحادي سكر مرتبط مع الثريونين أو السيرين بسلسلة الببتيد بروابط غلايكوزيدية (Saito وزملاؤه، 2002).

:N-glycan

تشير إلى النيتروجين في السلسلة الجانبية للحمض الأميني الأسبارجين حيث يكون تسلسله في الببتيد Asn-X-Ser أو Asn-X-Thr حيث يرتبط معه الجزء السكري بروابط غلايكوزيدية (Saito وزملاؤه، 2002).

عامل الـ GPI (Glycosyl phosphatidyl inositol):

وهو عبارة عن دهن سكري وهو يتألف من مجموعة فوسفاتيديل الإينوسيتول مرتبطة مع المجموعة الكربوكسيلية للبروتين عبر جسر كربوهيدراتي (مانوز- غلوكوز أمين مرتبط برابطة غلايكوزيدية مع الإينوسيتول) وبوجود مجموعة من الإيتانول أمين فوسفات (Saito وزملاؤه، 2002) ويبين الشكل (5) بنية المانوبروتين وعامل الـ GPI وارتباطه مع سلاسل البيتاغلوكان.



الشكل (5): بنية المانوبروتين وارتباط عامل الـ GPI مع سلاسل البيتاغلوكان (Cai وزملاؤه، 2008).

AA, amino acid residue; EtN, ethanolamine; P, phosphate; M, mannose; GN, glucosamine; I, myoinositol, G, glucose, "X" أو مستقبل آخر

3-7- تكسير جدر خلايا الخميرة:

يمكن تكسير جدر خلايا الخميرة باستخدام طرائق مختلفة منها طريقة التحلل الذاتي Autolysis ، التحلل بالبليزما Plasmolysis، التكسير الميكانيكي والحلمأة المائية (Vuka وزملاؤه، 2007). تقسم عملية التحلل الذاتي لمرحلتين، الأولى يحدث فيها تحلل للمكونات الخلوية في داخل الخميرة والثانية يحدث فيها تكسير لجدار الخلية حيث يحدث التحلل ذاتياً بواسطة أنزيمات داخلية تتشكل طبيعياً في الخمائر عندما تكمل دورة نموها وتدخل بطور الموت، وتبدأ هذه العملية بخلخلة في النظام الغشائي للخلية (الغشاء السيتوبلازمي والعضيات الأخرى)، تهاجم الأنزيمات المحللة الخلية حيث يعمل البروتياز على تحليل البروتين الخلوي لببتيدات وأحماض أمينية و يهاجم النوكلياز الأحماض النووية، بينما يعمل البروتيناز والغلوكاناز على تفكيك مكونات جدار الخلية كـ الغلوكان والمانوبروتين وتحويله لمكونات نفوذة للماء، تتحرر أثناء هذه العملية عدة أنزيمات داخلية مثل proteinase، glucanase، mannans، kitanase و carboxy peptidase (Rodriguez وزملاؤه، 2001؛ Erten و Tanguler، 2009).

يتوضع البروتيناز بالغلاف الخارجي لجدار الخميرة، وأوضح Hayashi وزملاؤه، (1991) أنه يوجد 3 أنواع من أنزيم البروتيناز (A,B,C) تعمل خلال فترة التحلل الذاتي بدرجة حموضة 5 حيث يبدأ البروتيناز B بفعالية عالية بعد 6 ساعات من عملية التحلل والبروتيناز C,A يعملان بنفس الوقت بعد 30 ساعة.

يتوضع أنزيم الغلوكاناز بالقرب من جدار الخلية وموضعه الأساسي بالفراغ البلازمي (Reichelt و Fleet، 2003) لذلك عند تحطيم جدار الخلية يبدأ بالعمل بأعلى نشاط ويشبه تقريباً أنزيم البروتيناز، كما يعمل أنزيم الـ carboxy peptidase بأعلى نشاط خلال الفترة الأخيرة من عملية التحلل المقارنة مع الغلوكاناز والبروتيناز وتعمل هذه الأنزيمات بشكل فعال بعد 4-6 ساعات عند درجة حرارة 50-55°م وتؤثر طريقة تكسير جدار خلية الخميرة ودرجة الحرارة ودرجة الحموضة على نشاط الأنزيم (Breddam و Beenfeldt، 2005).

قام Sommer (1996) بتحليل الخميرة ذاتياً بتحضيرها على درجة حرارة الغرفة 25 م° ونسبة إضافة 50 غ من الخميرة الجافة لـ 500 مل من الماء المقطر المعقم، ثم قام العديد من الباحثين بضبط شروط هذه العملية لتسريع تحلل خلايا الخميرة، حيث أشار Vuka وزملاؤه (2007) أن هذه العملية من الممكن أن تحدث بدرجة حرارة 52 م° ودرجة حموضة 5.2 بحاضنة هزازة بقوة 120 دورة

بالدقيقة ولمدة 72 ساعة وتركيز 50 غ خميرة طازجة/100مل ماء مقطر، بينما استخدم Wiwat وزملاؤه (2006) درجة حموضة 5.2 ودرجة حرارة 50م° لمدة 19 ساعة ثم عرض المعلق لدرجة حرارة 85م° لمدة 20 دقيقة لإيقاف عمل الأنزيمات، طبق Javmen وزملاؤه (2012) الشروط التالية لتحليل الخميرة ذاتياً: 3 غ خميرة جافة /40 مل ماء مقطر / 20 مل محلول موفي M3 وللتأكد من موت الخميرة أجريت زراعة لعينة من الكتلة الخلوية، قام Marinescu و Stoicescu (2009) بتحليل جدار الخلية على مرحلتين الأولى باستخدام حرارة 50م° ودرجة حموضة 5 لمدة تحضين 24 ساعة ثم تم تعديل الحرارة لـ 60م° ودرجة الحموضة لـ 3.5 لمدة تحضين 24 ساعة.

عدلت طريقة التحلل الذاتي بتطبيق شروط كيميائية وبيوكيميائية وفيزيائية حيث تعتبر إضافة المحفزات (accelerators) مثل الأملاح (كلوريد الصوديوم) أو المحلات العضوية (تولوين، إيتانول وإيتيل أسيتات) طريقة كيميائية مناسبة وهذا ما يسمى بالتحلل بالبلازما (Plasmolysis Borthwick)، 2004؛ Wiwat وزملاؤه، 2006)، حيث أشار Reed و Nagodawithana (2005) أن إضافة 5% (حجم/حجم) إيتانول مطلق و5% (وزن/وزن) ملح كلور الصوديوم لمعلق الخميرة (40 غ خميرة طازجة/100 مل ماء مقطر) مناسبة لتحفيز عملية التحلل الذاتي، بينما وجد Sugimoto (2001) أن استخدام 1-9% (حجم/حجم) إيتانول مع 2-10% (وزن/وزن) ملح كلور الصوديوم يساعد على زيادة سرعة التحلل الذاتي، كما وجد Oliveira و Pedro (2011) أن درجة حرارة 55.2 م° ودرجة حموضة 5.1 وملح كلور الصوديوم 10.3% (حجم/وزن) لمدة 12 ساعة مناسبة لتحلل الخميرة، كما بين Herbert (2000) أن درجة حموضة 4.5 ودرجة حرارة 54 م° ونسبة ملح كلور الصوديوم 5% (حجم/وزن) وإيتانول 5% (حجم/حجم) مناسبة لعملية التحلل الذاتي لمعلق الخميرة 40% (حجم/وزن) لمدة 24 ساعة.

وفي دراسات أخرى استخدمت محاليل كيميائية قوية كحمض كلور الماء وماءات الصوديوم مع درجات حرارة عالية تصل حتى درجة الغليان كطريقة كيميائية لتكسير جدار الخلية (Lee وزملاؤه، 2001؛ Hunter وزملاؤه، 2002؛ Pelizon وزملاؤه، 2005).

يمكن أيضاً تكسير جدر خلايا الخميرة ميكانيكياً بطرائق فيزيائية مثل التجنيس، التعريض للأموح فوق الصوتية، الطحن بالكرات والتعريض لضغط عالي (Boonraeng وزملاؤه، 2000؛ Nagodawithana، 2005؛ Wenger وزملاؤه، 2008؛ Shokri وزملاؤه، 2008) أو باستخدام أنزيمات خارجية كالبايبين (Adamisch وزملاؤه، 2003).

3-8- استخلاص البيتاغلوكان:

تقسم عملية استخلاص البيتاغلوكان من خلية الخميرة لقسمين، الأول هو تكسير جدار الخميرة لأن البيتاغلوكان يتوضع في جدار الخلية لذلك يجب تحليل الجدار غير الذواب في الماء لفصله عن السيتوبلازم، والثاني يتعلق باستخلاص البيتاغلوكان من الجدار غير الذواب، حيث يستخلص البيتاغلوكان من جدار خلية الخميرة باستخدام ماءات الصوديوم، أحماض مختلفة أو الماء الأوكسجيني وتعتمد عملية الاستخلاص على بقية مكونات خلية الخميرة وقابلية البيتاغلوكان منخفض الوزن الجزيئي على الانحلال بالمحاليل الكيميائية القوية بينما البيتاغلوكان مرتفع الوزن الجزيئي لا ينحل حتى بالتراكيز المرتفعة من القلوي (حتى 10 M Hayen وزملاؤه، 2001؛ Bahl وزملاؤه، 2009)، وبين عدد من الباحثين أن عملية أمثلة ظروف الاستخلاص تهدف للحصول على أعلى مردود من البيتاغلوكان بأقل نسبة من البروتين وباستخدام أقل كمية ممكنة من القلوي حيث يقوم القلوي مع الحرارة العالية بإذابة مكونات الخلية من بروتين وسكر المانان ويبقى البيتاغلوكان غير الذواب بالقلوي مع الراسب (Suphantharika وزملاؤه، 2003؛ Bacic وزملاؤه، 2009)، ومن جهة أخرى أظهرت نتائج بعض الأبحاث إمكانية استخلاص البيتاغلوكان باستخدام طريقة قلوية - حرارية حيث يمكن استخدام درجات حرارة وتراكيز مختلفة من ماءات الصوديوم بتغيير حجم ماءات الصوديوم لوزن جدار الخلية، حيث استخدم Marinescu و Stoicescu (2009) ماءات الصوديوم بتركيز 0.5، 1، 1.5، 2 N لمدة 0.5-1-1.5-2 ساعة ودرجات حرارة 50، 70، 90 م° ونسبة 1:7، 1:5، 1:3، 1:2 (مل ماءات صوديوم/غ وزن جدار الخميرة) ليحصل على أعلى نسبة من البيتاغلوكان 50.4% بأقل نسبة ممكنة من البروتين 2.9% عند درجة حرارة 90 م° ونسبة 1:5 وتركيز N1 ولمدة ساعة، حيث تراوحت نسبة البيتاغلوكان بالمعاملات الأخرى بين 10 - 49% ونسبة البروتين 2.9-10.3%، كما وجد Suphantharika وزملاؤه (2003) أن النسبة 1:5 ودرجة حرارة 90 م° وتركيز N 1 لمدة 2 ساعة هي المثلى لاستخلاص البيتاغلوكان حيث أعطت المعاملة المثلى نسبة 50% بيتاغلوكان ونسبة 1.6% بروتين بينما كانت المعاملة الأقل بنسبة بيتاغلوكان 17.2% ونسبة بروتين 41.2%، وفي أبحاث مشابهة بين Tominac وزملاؤه (2011) أن درجة الحرارة 90 م° والتركيز N 1 ولمدة 2 ساعة هي الأفضل للحصول على أعلى نسبة من البيتاغلوكان حيث وصلت لـ 95% مع نسبة بروتين 3.9%.

قام Javmen وزملاؤه (2012) بأمثلة ظروف استخلاص البيتاغلوكان بالقلوي حيث وجد أن نسبة 5 جدار خلوي/25مل ماءات صوديوم بتركيز M 0.5 بدرجة حرارة 100م° لمدة 4 ساعات هي المثلى للحصول على أعلى نسبة من البيتاغلوكان حيث وصلت لـ 95% من الوزن الجاف لجدار خلية الخميرة كما وجد Yun و Kwang (2006) أن درجة حرارة 90م° ونسبة 5:1 غ خميرة لـ مل قلوي وتركيز M 1 لمدة ساعة مثالي لاستخلاص البيتاغلوكان غير الذواب بالقلوي. استخلص البيتاغلوكان بطريقة قلوية - حامضية ببعض الأبحاث حيث قام Shokri وزملاؤه (2008) باستخدام ماءات الصوديوم 2% - حمض الخل 3% فحصل على نسبة بيتاغلوكان 55% ونسبة بروتين 2.4%.

3-9- تنقية البيتاغلوكان:

أشارت منظمة الغذاء والدواء الأميركية أن المنتج التجاري من البيتاغلوكان غير الذواب يحتوي على كميات قليلة من البروتين أقل من 10% والدهن أقل من 20% ونسبة من الكيتين 1% ونسبة الكربوهيدرات فيه لا تقل عن 80% ونسبة البيتاغلوكان غير الذواب لا تقل عن 70% والمواد الصلبة تتراوح بين 6-12% ونسبة جدار الخلية من الكتلة الخلوية الكلية لا تقل عن 10-12% (U.S.FDA، 2007؛ Sedmak، 2006).

أشار Shokri وزملاؤه عام 2008 أنه يمكن تنقية مستخلص البيتاغلوكان بعد معاملته بالإيتانول باستخدام DEAE Sephacel Chromatography لإزالة المتبقي من البروتين ثم استخدم عامود Concanavalin-A Sepharose لإزالة المانان، كما أوضح Kwang و Yun عام 2006 أنه يمكن تنقية المستخلص بعد المعاملة بالإيتانول باستخدام تقنيتي DEAE Ion-Exchange، Concanavalin A Chromatography.

تعتمد طرائق التنقية على حل المادة الخام المستحصل عليها أولاً بمحل مناسب كالماء مثلاً وغير الذوابة يجب حلماؤها كيميائياً أو أنزيمياً (بأقل ضرر ممكن لبنية السكر المتعدد) لتقليل حجم البوليمير وجعل العينة ذوابة مما يسهل تنقيتها باستخدام تقانات كروماتوغرافية متنوعة مثل: كروماتوغرافيا التبادل الأيوني، كروماتوغرافيا الألفة، كروماتوغرافيا الاستبعاد وكروماتوغرافيا الادمصاص (Aimaniada وزملاؤه، 2009).

تعتمد طرائق التنقية الجزئية على إزالة المتبقي من البروتينات، الدهون والغلايكوجين من المستخلص لتعيين البيتاغلوكان وهو ما يسمى بالتنقية العكوسة، حيث قام عدد من الباحثين بمعاملة البيتاغلوكان

الخام بعد عملية الاستخلاص بحمض الفوسفور على درجة حرارة الغرفة ولمدة ساعتين لفصل- β 1,6-D-glucan الذواب بالحمض، كما عرض الناتج لدرجة حرارة 121م° لمدة 90 دقيقة بوجود محلول موقي من السترات pH 7 لترسيب المانوبروتين (Huang، 2008؛ Dikit وزملاؤه، 2010؛ Tominac وزملاؤه، 2011).

قام Huang (2008) بفصل المانوبروتين باستخلاصه من جدار خلية الخميرة باستخدام ماءات الصوديوم ودرجة حرارة 100م° ثم ترسيبه بالإيثانول.

3-10- الغلايكوجين (α -glucan):

وهو عبارة عن بوليمير من وحدات الجلوكوز مرتبطة بنوعين من الروابط β -1,4 و β -1,6 وتتراوح نسبته في جدار الخميرة من 1% كأقل نسبة لـ 29% كأعلى نسبة من الوزن الجاف (Sedmak، 2006)، يوجد شكلين من الغلايكوجين في خميرة الخباز: غلايكوجين ذواب في الماء يوجد في سيتوبلازم الخلية يعمل على تأمين الطاقة اللازمة لعمليات الإستقلاب، وغلايكوجين غير ذواب في الماء، مرتبط بالبيتاغلوكان في جدار خلية الخميرة بروابط مشتركة يلعب دوراً فيزيولوجياً بإعطاء القدرة على تحمل الضغط الأسموزي تحت تأثير الإجهاد الكحولي (Dake وزملاؤه، 2011)، وقد أشار Akalpita وNarayan عام 2002 أنه يمكن تقدير الغلايكوجين غير الذواب بتفكيك المعقد $\alpha\beta$ glucan أنزيمياً باستخدام amyloglucosidase بنسبة 15 وحدة أنزيمية لـ 35 مغ من العينة بوجود 4 مل محلول موقي من أسيتات الصوديوم 100mM بدرجة حموضة 4.2 ودرجة حرارة 37م° لمدة ساعتين، بينما استخدم Dake وزملاؤه عام 2011 نسبة 1مل من الخميرة المهضومة قليلاً مع 2 وحدة من الأنزيم ولمدة ساعة، وفي المقابل استخدم Zeenat وزملاؤه (1999) 50-100 مغ من العينة مع 2 وحدة أنزيم ومحلول موقي من أسيتات الصوديوم 50mM بدرجة حموضة 5 ودرجة حرارة 37م° لمدة 2 ساعة.

3-11- تقدير البيتا غلوكان من الخميرة :

يقدر البيتاغلوكان بالحلقة وهي تقسم لقسمين هما الحلقة الحامضية باستخدام TFA, HCl, H_2SO_4 (Trifluoroacetic acid) والحلقة الأنزيمية باستخدام أنزيمي β -Lichenase، Glucanase (Codd و McCleary، 1991)، ويتم تقدير الجلوكوز المتكون بعدة طرائق منها:

- الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء (HPLC) High performance liquid chromatography مع استخدام عمود الطور المعاكس (Talaga وزملاؤه، 2002).

- الكرماتوغرافيا الغازية: بإجراء عملية ميثلة للغلوكوز المتكون من الحلمهة بأحماض قوية، ثم يتم تقديرها بالـ (GC) Gas Chromatography (Schwandt و Pattersen، 1991).
 - المطياف الضوئي حيث تقاس الإمتصاصية بطول موجة 490 nm (Codd و McCleary، 1991).
 - HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography) وهي تقنية لتقدير الوزن الجزيئي للبيتاغلوكان وتحديد كميته حتى لو كانت صغيرة جداً (Suortti، 1993).
 - Capillary Electrophoresis: وهي طريقة تعتمد على اختلاف سرعة الذوبانية للمكونات ضمن حقل كهربائي بعد حلمهة البيتا غلوكان انزيمياً وباستخدام كاشف الـ UV (Soga و Serwe، 2000).
- يمكن استخدام صبغات خاصة مثل Calcoflour و Congo red لترسيب البيتاغلوكان من خلايا الخميرة ثم حلمهة المعقد (البيتا غلوكان - صبغة) إلى غلوكوز بإضافة وسط حمضي ثم يتم تحليله بالـ HPLC (Wood و Weisz، 1991).
- قام Javmen وزملاؤه عام 2011 بحلمأة البيتاغلوكان بمحلول حمض الكبريت 50% لتركيز 2 مغ / مل لمدة 24 ساعة ثم عدل المحلول بماءات الصوديوم 2 M (5 مل لكل 1 مل بيتاغلوكان محلاً)، ثم قدر الغلوكوز بطريقة الفينول - حمض كبريت حيث قيست الامتصاصية بعد نصف ساعة على طول موجة 490 nm، ويمكن قياس الغلوكوز بطريقة الداى نتروساليسيليك أسيد (Miller، 1959).
- قدر Lee وزملاؤه عام 2011 نسبة البيتاغلوكان بجهاز الكروماتوغرافيا السائلة وباستخدام حمض فلور الماء لحلمأة العينات وبدرجة حرارة 121م لمدة 90 دقيقة وتم التعبير عن الغلوكان بنسبة الغلوكوز المقدرة فكانت 31% ونسبة بروتين 2.9%، استخدم Tominac وزملاؤه عام 2009 حمض الكبريت لحلمأة البيتاغلوكان حيث قدر بجهاز الـ HPLC فكانت نسبة البيتاغلوكان 93% مع نسبة بروتين 3.16-5.52% (Tominac وزملاؤه، 2011)، وبلغت نسبة البيتاغلوكان عند Stoicescu و Marinescu عام 2009 بين 37.2-50.4% على أساس الوزن الجاف باستخدام حمض الكبريت كمادة محلمأة.

3-12- الصافات الوظيفية للبيتاغلوكان:

يمتلك البيتاعلوكان صفة ربط الماء والدهن في الوقت نفسه مما يؤهله لأن يكون عامل استحلاب مناسب للعديد من التطبيقات الغذائية (Guo وزملاؤه، 2008)، كما أشار Temelli عام 2002 إلى إمكانية استخدام البيتاعلوكان لتثبيت نظام الرغاوي والمستحلبات.

3-12-1- قابلية ربط الماء:

قام Thammakiti وزملاؤه عام 2004 بدراسة قابلية ربط الماء لمستخلص البيتاعلوكان حيث استخدم نسبة 500 مغ من البيتاعلوكان/3مل ماء وتمت عملية المزج لمدة 30 ثانية وكررت 7 مرات بفواصل 10 دقائق بين كل مرة وحسبت النسبة المئوية لربط الماء بعد عملية الطرد المركزي حيث تراوحت بين 500-650 مل/100غ، كما قدر No وزملاؤه عام 2000 قابلية ربط الماء بنفس الطريقة السابقة بنسبة 0.5 غ/10 مل ماء لمدة 30 دقيقة وفاصل بين كل 10د وحساب النسبة المئوية لربط الماء حيث تراوحت بين 650-740 مل/100غ، بينما تراوحت عند Bhatti عام 1997 بين 250-370 مل/100غ.

3-12-2- قابلية ربط الدهن:

درس Thammakiti وزملاؤه عام 2004 قابلية ربط الدهن لمستخلص البيتاعلوكان بنفس الطريقة السابقة لربط الماء باستبدال الماء بزيت دوار الشمس حيث تراوحت النسبة المئوية لربط الدهن بين 75-250 مل/100غ، كما لوحظ أن النسبة المئوية لربط الدهن تراوحت بين 75-140 مل/100غ (الطائي والليثي، 2012).

3-12-3- قابلية تشكيل وتثبيت الرغوة:

يعتمد تشكيل الرغوة على وجود مركبات فعالة سطحياً وتتألف من جزء هيدروفيلي محب للماء وجزء هيدروفوبي كاره للماء يتفاعل مع جزيئات الهواء ويتم ذلك بفعل ميكانيكي (الخفق، التحريك الشديد) ويشكل شبكة قوية ملتصقة بالجيوب الهوائية (عن طريق الجزء اللاقطبي) من جهة وبالمحلول المائي من جهة أخرى (الجزء القطبي الهيدروفيلي)، يملك البيتاعلوكان بتركيبه مجموعات محبة للماء مثل مجاميع الهيدروكسيل ومجموعات كارهة للماء مثل الأحماض الدهنية الداخلة بتركيب الغلايكوليبيد N,O-Glycan وعامل الـ GPI (Glycosylphosphatidylinositol) Brennan و Cleary، (2004).

درس Lazaridou وزملاؤه عام 2003 قابلية تشكيل الرغوة وتثبيتها لمستخلص البيتاغلوكان باستخدام ألبومين المصل البقري وبيكربونات الصوديوم فتراوحت بين 2-1 مل ثم درس تأثير الحموضة والتسخين والتبريد على ثباتية الرغوة حيث وجد أن الرغوة لم تتأثر بالتبريد والحموضة بينما انهارت بالتسخين.

4- مواد البحث وطرقه:

أجري هذا البحث في مخابر قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية واستخدم لإنجازه المواد التالية:

4-1- المواد:

- الخميرة المدروسة: خميرة الخباز الجافة *Saccharomyces cerevisiae* مستوردة من شركة Bakaldrin - فرنسا.
- أنزيم β -(1→3)-D-Glucanase من *Helix pomatia* من شركة (Sigma) - ألمانيا.
- ستاندر بيتاغلوكان β -1,3-Glucan from *Euglenagracilis* من شركة (Sigma) - ألمانيا.
- أنزيم أميلو غلوكوزيداز من شركة (Sigma) - ألمانيا.
- أنزيم Amyloglucosidase من *Aspergillus nige* من شركة (Sigma) - ألمانيا.
- فوسفات أحادية وثنائية الصوديوم من شركة (Sigma) - ألمانيا.
- ماءات الصوديوم من شركة (Sigma) - ألمانيا.
- ألبومين المصل البقري من شركة (Sigma) - ألمانيا.
- شريحة API (Api 20 C AUX Bio merieux) من شركة Bio merieux - ألمانيا.
- حمض الكبريت، حمض الفوسفور، حمض كلور الماء من شركة (Sigma) - ألمانيا.

4-1-1- الأجهزة المستخدمة:

- جهاز الكرموتوغرافيا السائلة عالية الأداء من شركة Knauer - ألمانيا
- جهاز المطياف الضوئي Optizim 3000 plus - كوريا.
- حاضنة هزازة من شركة Memmert - ألمانيا.
- مثقلة انابيب من شركة Memmert - ألمانيا.
- حمام مائي هزاز من شركة JSR - اليابان.
- مثقلة بحجرات سعة 700 مل من شركة Memmert - ألمانيا.

4-2- الطرائق:

4-2-1- التأكد من هوية خلايا الخميرة الجافة المستوردة:

أ- الفحص المورفولوجي: حضر معلق مائي من خلايا الخميرة الجافة المستخدمة ثم زرعت على وسط دكستروز البطاطا وحضنت لمدة 48 ساعة على درجة حرارة 25 م°، ثم حضر غشاء من الخلايا وصبغ بصبغة الصفرائين وفحصت تحت المجهر (Mcnamara و Mageau ، 1998).

ب- اختبار تخمر السكاكر بواسطة الـ API (Api 20 C AUX Bio merieux):

أخذ جزء من مستعمرة الخميرة بواسطة إبرة التلقيح وذلك بعد تنشيط الخميرة لمدة 24 ساعة على وسط PDA agar ولقحت بها أمبولة Suspension medium ذات الـ 2 مل ومزجت جيداً باستعمال الـ Vortex للحصول على كثافة حوالي 2 ماكفارلند، ثم أخذ منها 100 ميكروليتر ووضعت ضمن أمبولة API C medium وتمت المجانسة بلطف مع مراعاة عدم تشكل أية فقاعات، ملئت الحفر الموجودة في شريحة الـ API الحاوية على السكاكر المختبرة من معلق الخميرة ثم أغلقت الشريحة بغطائها ووضعت في الحاضنة على درجة 29 م° لمدة 48 إلى 72 ساعة. دونت نتائج تخمير السكاكر في دفتر الشيكات المرفق وجرت مقارنة تسلسل الأرقام بدليل الـ API الملحق وذلك للتعرف على جنس ونوع الخميرة والجدول رقم 3 يبين أنواع السكاكر في شريحة الـ API (Covadonga وزملاؤه، 2002).

الجدول(3):أنواع السكاكر المتواجدة في شريحة الـ API:

GLU	D- Glucose	1
GLY	Glycerol	2
2KG	Calcium 2 Keto-Gluconate	3
ARA	L- Arabinose	4
XYL	D-Xylose	5
GAL	D- Galactose	6
INO	Inolin	7
ADO	Adonito	8
XLT	Xylitol	9
SOR	D- Sorbitol	10
MDG	Methyl-a D- Glucopyranoside	11
NAG	N-Acetyl-Glucosamine	12
CEL	D- Cellobiose	13
LAC	D- Lactose	14
MAL	D-Maltose	15
SAC	D- Sacchrose(sucrose)	16
TRE	Trihalose	17
MLZ	D-Melezitose	18
RAF	D-Rafeinose	19

4-2-2- تكسير جدر خلايا الخميرة:

كسرت جدر خلايا الخميرة الجافة بثلاث طرائق:

• طريقة التحلل بالبلمة Plasmolysis :

أضيفت الخميرة الجافة إلى الماء المقطر المعقم بنسبة 10%، حيث استخدم 50 غ من الخميرة الجافة لـ 500 مل من الماء المقطر المعقم، ثم عدل الـ pH إلى 5 باستخدام حمض كلور الماء N1 وأضيف محلول موفي من حمض الخل وخلات الصوديوم 3M بنسبة 20% من المعلق السابق، وأضيف ملح كلور الصوديوم بنسبة 5% لإتمام عملية البلمة، ثم حضن المعلق بالحاضنة الهزازة بمعدل 90 هزة/دقيقة عند درجة حرارة 50م° لمدة 24 ساعة، أوقفت عملية تحلل الخميرة وعمل الأنزيمات بالتسخين في حمام مائي على درجة حرارة 85م° لمدة 10 دقائق، وتم إجراء زراعة لعينة من المعلق على وسط دكستروز البطاطا لمدة 3 أيام للتأكد من تحلل الخميرة. (Nagodawithana،

(2005)

• **طريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف : Unconditional Autolysis :**

أضيفت الخميرة الجافة إلى الماء المقطر المعقم بنسبة 10%، وحضنت 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 85م° لمدة 10 دقائق، وتمت مراقبة تماوت خلايا الخميرة خلال فترة التحضين السابقة بواسطة عد خلايا الخميرة على وسط دكستروز البطاطا ورسم منحني موت لها (Sommer، 1996).

• **طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف: Autolysis Conditional:**

أضيفت الخميرة الجافة إلى الماء المقطر المعقم بنسبة 10%، ثم عدلت درجة الحموضة إلى 5pH باستخدام حمض كلور الماء 1N وأضيف محلول موقي من حمض الستريك وسترات الصوديوم 3M بنسبة 20% من المعلق السابق وحضنت بدرجة حرارة 50م° لمدة يومين، أوقفت عملية تحلل الخميرة وعمل الأنزيمات بالتسخين في حمام مائي عند درجة حرارة 85م° لمدة 10 دقائق، وتم إجراء زراعة لعينة من المعلق على وسط دكستروز البطاطا لمدة 3 أيام للتأكد من تحلل الخميرة (Marinescu و Stoicescu، 2009؛ Javmen وزملاؤه، 2012).

الجدار الخام المستحصل عليه من الطرائق الثلاث تم وزنه وتقدير رطوبته وحفظه بدرجة حرارة -18م°

4-2-3- تقدير النسبة المئوية لجدار خلية الخميرة:

قدرت النسبة المئوية لجدار خلية الخميرة الناتجة عن طرائق التحلل الثلاثة باستخدام مثقلة بقوة 6000 دورة في الدقيقة ودرجة حرارة 4م° لمدة 10 دقائق، حيث أهمل الجزء السائل الطافي الذي يمثل مستخلص الخميرة وتم الاحتفاظ بالجزء الراسب الذي يمثل جدار خلية الخميرة وحسبت نسبته المئوية. (Vuka وزملاؤه، 2007).

4-2-4- تقدير الرطوبة:

قدرت الرطوبة باستخدام طريقة التجفيف بالفرن حيث عرض وزن معين س1 من العينة المتجانسة والموضوعة بصورة طبقة رقيقة على طبق التجفيف إلى درجة حرارة 105 م° حتى ثبات الوزن، ثم أخذ وزنها بعد التجفيف س2 والفاقد في الوزن يتم حسابه على أنه نسبة الرطوبة في العينة، وحسبت النسبة المئوية لجدار خلية الخميرة على أساس الوزن الجاف كالتالي:

$$\text{للرطوبة \%} = \frac{\text{وزن العينة قبل التجفيف س1} - \text{وزن العينة بعد التجفيف س2}}{\text{وزن العينة قبل التجفيف}} \times 100$$

حيث وزن العينة بعد التجفيف = وزن العينة بعد التجفيف - وزن الطبق فارغاً (AOAC، 2000) .

4-2-5 - استخلاص البيتاغلوكان:

تم استخلاص البيتاغلوكان من جدار خلية الخميرة المستحصل عليه بالطرائق الثلاث

أجريت عملية الإستخلاص على درجة حرارة 90 م° وتغيير ثلاثة عوامل:
الزمن (1-2 ساعة) - نظامية القلوي (1-2 N) - نسبة جدار الخميرة إلى القلوي g/ml (1:5-1:2) أي ثماني معاملات، ثم أجريت عملية طرد مركزي وغسيل 3 مرات بالماء المقطر، وقد تم اختيار هذه المعاملات استناداً لما قام به الباحثان Stoicescu و Marinescu عام 2009 حيث أعطت أفضل نتائج وأعلى نسبة من البيتاغلوكان، والجدول (4) يبين معاملات استخلاص البيتاغلوكان من جدار خلية الخميرة.

الجدول (4) المعاملات التي تم تطبيقها عند استخلاص البيتاغلوكان من جدار خلية الخميرة.

النسبة مل قلوي / غ جدار الخميرة	النظامية	الزمن
1:5	1	1
1:5	1	2
1:5	2	1
1:5	2	2
1:2	1	1
1:2	1	2
1:2	2	1
1:2	2	2

البيتاغلوكان المسخلص تم وزنه وغسيله بالماء المقطر وتقدير رطوبته ثم معاملته بحمض

4-2-6- المعاملة بحمض الفوسفور (تنقية جزئية):

تهدف هذه العملية إلى فصل البيتاغلوكان $\beta(1-6)$ عن البيتاغلوكان $\beta(1-3)$ وتشير بعض الأبحاث إلى قدرة حمض الفوسفور على إذابة جزء من المانوبروتين، حيث أضيف حمض الفوسفور بتركيز 4 % للمستخلص المستحصل عليه من عملية الاستخلاص (الفقرة 4-2-5)، على درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ثم طرد المعلق مركزياً وغسل ثلاث مرات بالماء المقطر لفصل الرشاحة (المحتوية على البيتاغلوكان $\beta(1-6)$ عن الراسب الذي يمثل البيتاغلوكان $\beta(1-3)$ الخام (Tominac) وزملاؤه، (2011).

الرشاحة : تم ترسيب البيتاغلوكان $\beta(1-6)$ منها.

الراسب يمثل البيتاغلوكان $\beta(1-3)$ الخام: تمت عملية وزنه وغسله بالماء المقطر وتقدير رطوبته ثم تقدير الكربوهيدرات الكلية له.

4-2-7- ترسيب البيتاغلوكان $\beta(1-6)$:

أضيف الإيثانول للرشاحة المتحصل عليها من المعاملة بحمض الفوسفور 4%(الفقرة 4-2-6) بمعدل حجم رشاحة إلى ثلاثة حجوم إيثانول مطلق (1:3)، وتركت لمدة 24 ساعة على درجة حرارة الغرفة، ثم ثقلت العينات بقوة 9000 دورة/دقيقة لمدة ساعة حيث أهمل السائل وبقي البيتاغلوكان $\beta(1-6)$ بشكل راسب على جدران الأنبوبة، وزنت الأنبوب وطرح منها وزن كل أنبوب للحصول على وزن السكر (Huang، 2008).

4-2-8- تقدير الكربوهيدرات الكلية (البيتاغلوكان $\beta(1-3)$ الخام):

أخذ وزن 0.05 غ من البيتاغلوكان المستخلص في الفقرة (4-2-6) وأضيف له 25 مل حمض كبريت تركيزه 50% لإجراء عملية الحلمأة وحضن عند درجة حرارة الغرفة لمدة 24 سا، ثم أضيف لكل 1مل بيتا غلوكان محلاً 5مل ماءات صوديوم 0.5 N للتعديل، حيث قدرت الكربوهيدرات الكلية بطريقة الفينول - حمض الكبريت بأخذ 0.2مل من المحلول السكري المحلاً والمعدل بماءات الصوديوم وأكمل إلى 1مل بالماء المقطر وأضيف له 1مل فينول 5% و5مل حمض كبريت مركز دفعة واحدة وقيست الامتصاصية على طول موجة 490 نانومتر بعد ربع ساعة، حيث قدر تركيز السكريات من خلال منحنى معياري تم تحضيره بتركيز معلومة من سكر الغلوكوز (Javmen وزملاؤه، 2012).

اعتماداً على نسبة الكربوهيدرات الكلية تم إجراء عملية غربلة لاختيار أحسن معاملة استخلاص من كل طريقة تحلل حيث استخدمت المعاملة المثلى لإعادة استخلاص البيتاغلوكان المتحصل عليه بالفقرة (2-2-4) حيث تمت تنقيته جزئياً.

4-2-9- تنقية البيتاغلوكان جزئياً:

تمت عملية الاستخلاص بالقلوي بمعاملة الاستخلاص الأمثل ابتداءً من جدار خلية الخميرة المحفوظ (في هذه المرحلة يتم التخلص من جزء من البروتين + البيتاغلوكان الذواب بالقلوي) ثم عوملت العينات بحمض الفوسفور 4% (في هذه المرحلة يتم التخلص من Glucan (1-6) β وجزء من الغلايكوجين) ثم تم ترسيب المانوبروتين فحصلنا على بيتاغلوكان منقى جزئياً قدرت مكوناته من رطوبة، بروتين، كربوهيدرات كلية وغلايكوجين ثم جرت عملية تجفيفه وطحنه.

4-2-10- ترسيب المانوبروتين :

عوملت العينات بمحلول موقى من السترات pH 7 0.1 M مع potassium metabisulphate M 0.02 ثم وضعت العينات بالأوتوغلاف 121 م° لمدة 90 دقيقة، ثم طرد المعلق مركزياً بسرعة 6000 دورة بالدقيقة لمدة 10 دقائق حيث أهمل الجزء الطافي وأخذ الراسب (Dikit وزملاؤه، 2010).

4-2-11- تقدير البروتين:

قدرت نسبة البروتين في المراحل المختلفة من الاستخلاص والتنقية حسب طريقة كداهل (AOAC، 2000).

4-2-12- تقدير الغلايكوجين (ألفا غلوكان):

قدرت نسبة الغلايكوجين بحلمأته باستخدام أنزيم Amyloglucosidase من *Aspergillus niger*، حيث أضيف 15 وحدة من الأنزيم لـ 35 مغ من الركيزة (الغلوكان الخام وغلايكوجين) و أكمل الحجم لـ 4 مل بواسطة محلول موقى من حمض الخل وخلات الصوديوم بتركيز 100 ميلي مول و pH 4 ثم حضنت العينات لمدة ساعتين على درجة حرارة 37 م° حيث تم إيقاف عمل الأنزيم بحمام مائي ثم قدر الغلوكوز المتكون باستخدام طريقة الفينول - حمض الكبريت سابقة الذكر (Akalpita و Narayan، 2002).

4-2-13 - تجفيف العينات:

جففت العينات بالفرن العادي على درجة حرارة 60 م° لمدة 6 ساعات ثم طحنت يدوياً وخزنت على درجة حرارة 4 م° (AOAC، 2000).

4-2-14 - حلمأة البيتاغلوكان أنزيمياً:

أ- تحضير محاليل العينات: حضرت العينات بوزن 0.05 غ من البيتاغلوكان الجاف المستخلص، وأضيف لها 25 مل ماء مقطر و 25 مل محلول موقي من السترات 0.2 M، ثم عُدل الـ pH بماءات الصوديوم 4% إلى نقطة التعادل وأكمل الحجم لـ 100 مل بالماء المقطر.

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

ج- معاملة العينات: أضيف 285 ميكرو لتر أنزيم 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 أضيف الأنزيم مع التحريك المستمر لمدة ساعة واحدة، ثم أوقف عمل الأنزيم بوضع العينات في حمام مائي درجة حرارته 100 م° لمدة 10 دقائق.

د- تنقيت العينات: نُقلت المزائج لفصل الأنزيم عن العينات المحلمأة بمعدل 6000 دورة/ لمدة 15 دقيقة، وحقنت في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة (Murashima وزملاؤه، 2002 ؛ McCarthy وزملاؤه، 2005).

4-2-15 - تقدير البيتاغلوكان:

أولاً: بتقانة الـ HPLC :

قدرت العينات بجهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء من نوع Knauer وباستخدام كاشف RI وعمود NH₂ وبتدفق 1.5 مل/ د حيث حقن شاهد معياري من الغلوكوز بتركيز 80 mM وباستخدام مذيب أسيتونتريل/ماء منزوع الشوارد بنسبة 15/85% (McCarthy وزملاؤه، 2005).

ثانياً: حسابياً اعتماداً على الطريقة اللونية:

وذلك بطرح النسبة المستحصل عليها عند تقدير الغلايكوجين الفقرة (4-2-11) من النسبة المستحصل عليها عند تقدير البيتاغلوكان الخام الفقرة (4-2-9) ويعبر عنها كنسبة مئوية على أساس الوزن الجاف (Javmen وزملاؤه، 2012).

4-2-16- تقدير الصفات الوظيفية ودراسة تأثير بعض ظروف التصنيع عليها:

أ- قابلية ربط الماء:

قدرت قابلية ربط الماء للبيتا غلوكان، حيث وزن 0.5 غ من البيتاغلوكان ووضع في أنبوبة مع إضافة 10 مل من الماء المقطر ثم مزجت بالمازج الكهربائي (Vortex) لمدة دقيقة واحدة، تركت لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة مع مراعاة مزج الأنابيب مدة 5 ثواني كل 10 دقائق حيث ثقلت بسرعة 6000 دورة لمدة 25 دقيقة، أهمل الجزء الطافي ووزنت الأنابيب مرة ثانية وحسبت النسبة المئوية لربط الماء بقسمة الماء المرتبط على وزن العينة وعبر عنها كنسبة مئوية، أعيدت العملية السابقة نفسها ولكن باستبدال الماء بمحلول فوسفاتي موفي pH 4 (Thammakiti وزملاؤه، 2004).

ب- قابلية ربط الدهن:

قدرت قابلية ربط الدهن للبيتا غلوكان، حيث وزن 0.5 غ من البيتاغلوكان ووضع في أنبوبة مع إضافة 10 مل من زيت دوار الشمس ثم مزجت بالمازج الكهربائي (Vortex) لمدة دقيقة واحدة، تركت لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة مع مراعاة مزج الأنابيب مدة 5 ثواني كل 10 دقائق ثم ثقلت بسرعة 6000 دورة لمدة 25 دقيقة، أهمل الجزء الطافي ووزنت الأنابيب مرة ثانية وحسبت النسبة المئوية لربط الدهن بقسمة الماء المرتبط على وزن العينة وعبر عنها كنسبة مئوية، ثم أجريت عملية بسترة على درجة حرارة 90°م° وأعيد قياس النسبة المئوية للدهن المرتبط (Thammakiti وزملاؤه، 2004).

ج- قابلية تشكيل الرغوة وثباتيتها:

قدرت الرغوة للبيتاغلوكان حيث مزج 4 مل من محلول ألبومين السيروم البقري بتركيز 2% مع 1 مل من بيكربونات الصوديوم بتركيز 5% مع 0.012 غ بيتاغلوكان مع 1 مل ماء مقطر لمدة 30 ثانية في أنبوبة مدرجة وقيست الرغوة مباشرة، ثم أضيف 1 مل من حمض الستريك ومزجت مرة أخرى لمدة 30 ثانية وقيست الرغوة مباشرة وبعد 0.25 ساعة، وقيست الرغوة على درجتى حرارة 95°م° و15°م° مباشرة وبعد إعادة عملية المزج (Lazaridou وزملاؤه، 2003).

4-2-17- التحليل الإحصائي:

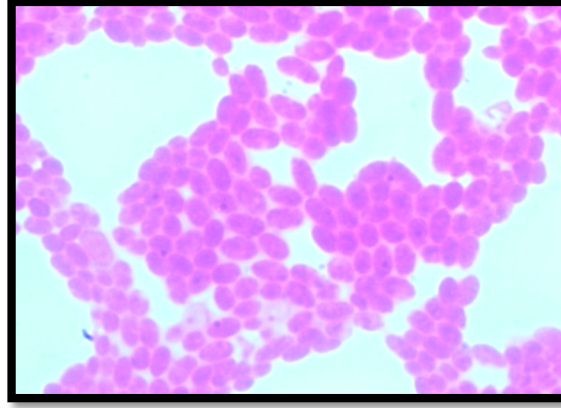
أجري اختبار تحليل التباين كتجربة عاملية بتصميم قطاعات عشوائية كاملة باستخدام Balanced ANOVA وأتبع اختبار Tucky لتحديد الفروق المعنوية بين المتوسطات على مستوى معنوية 0.05 باستخدام برنامج Minitab الإحصائي حيث طبقت ثلاثة مكررات لكل معاملة واستخدم عاملين في تحليل التباين، يمثل العامل الأول طريقة تكسير جدار خلية الخميرة ويمثل العامل الثاني معاملة الاستخلاص (Muthuvelayudham و viruthagiri، 2010).

5- النتائج والمناقشة:

5-1- التأكد من هوية خلايا الخميرة المستوردة:

أ- الفحص المورفولوجي:

فحصت خلايا خميرة الخباز المستخدمة في البحث تحت المجهر بعد صبغها بصبغة الصفرانين والشكل (6) يبين محضر غشائي لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* تظهر تحت المجهر بشكل خلايا بيضاوية متجمعة غير متبرعمة (Talaro, 2002).



الشكل (6) محضر غشائي لخميرة *Saccharomyces cerevisiae*.

ب- اختبار تخمر السكاكر بواسطة الـ API (Api 20 C AUX Bio merieux):

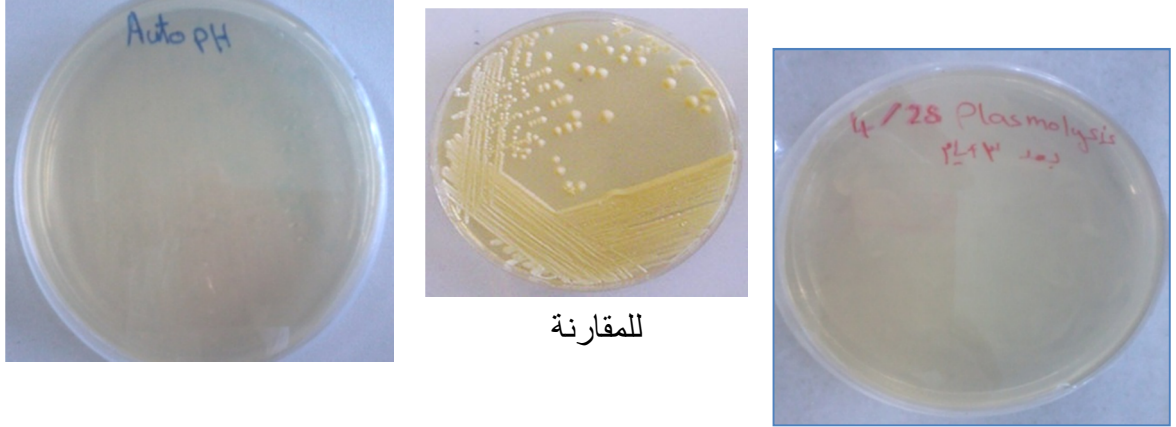
دونت نتائج تخمير السكاكر في دفتر الشيكات المرفق وأجريت مقارنة تسلسل الأرقام بدليل الـ API الملحق وذلك للتعرف على جنس ونوع الخميرة، فتبين ان الخميرة المستخدمة في البحث هي *Saccharomyces cerevisiae* بنسبة 97.5% والشكل (7) يوضح السكريات المخمرة بواسطة الخميرة المدروسة بعد التحضين لمدة 72 ساعة.

API 20 C AUX		REF: _____		BIO MÉRIEUX																		
Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie																						
48 h	72 h	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	Hyphae/ Pseudo- hyphae	
0	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	
Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri Test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andra tests / Inne testy										Ident. / Ταυτοποίηση: 97.5% <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>												

الشكل (7) السكريات المخمرة بواسطة الخميرة المدروسة بعد التحضين لمدة 72 ساعة.

5-2- التأكد من تحلل خلايا الخميرة بعد تكسير جدر خلايا الخميرة:

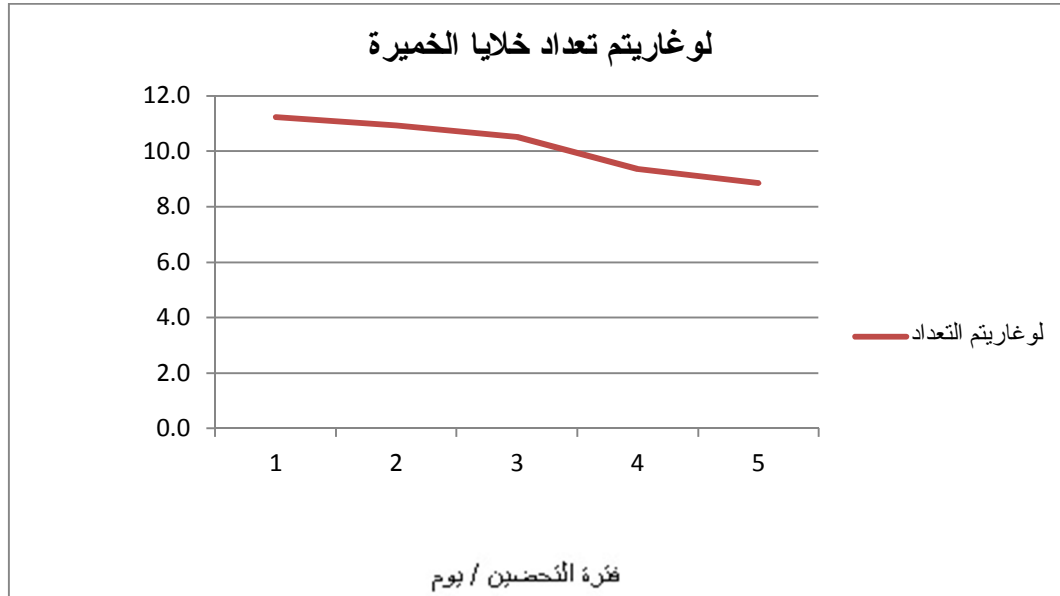
أ- تم التأكد من تحلل خلايا الخميرة بنهاية طريقتي التحلل الذاتي محدد الظروف والتحلل بالبلزمة وذلك بزراعة عينة من المعلق الناتج عن تكسير جدر خلايا الخميرة على وسط دكستروز البطاطا فكانت النتيجة سلبية بعد التحضين لمدة 3 أيام على درجة حرارة 25 م° والشكل (8) يظهر عدم وجود نموات مما يدل على انتهاء عملية التحلل.



الشكل (8) عدم وجود نموات للخميرة بنهاية طريقتي التحلل الذاتي محدد الظروف والتحلل بالبلزمة

ب- تعداد خلايا خميرة الـ *Saccharomyces cerevisiae* في نهاية فترة التحلل الذاتي:

تمت مراقبة تحلل خلايا الخميرة عند تحضينها بطريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف لمدة 13 يوم، وذلك بزراعة حجم من المعلق الناتج عن تكسير جدر خلايا الخميرة كل عدة أيام على وسط دكستروز البطاطا والتحضين لمدة 3 أيام على درجة حرارة 25 م° ويبين الشكل (9) انخفاض تعداد خلايا الخميرة مع نهاية فترة التحلل الذاتي (13 يوم).



يبين الشكل (9) انخفاض تعداد خلايا الخميرة خلال فترة التحلل الذاتي حيث كان التعداد في اليوم الأول من التحلل الذاتي 10×1.65^{11} خلية/مل (اللوغاريتم 11.2) وانخفض ليصل إلى 10×7^8 خلية/مل (اللوغاريتم 8.8) في نهاية فترة التحلل الذاتي غير محدد الظروف والبالغة 13 يوم.

5-3- النسبة المئوية لجدار خلية الخميرة:

قُدرت النسبة المئوية لجدر خلايا الخميرة بعد عملية تحلل الخميرة بالطرائق الثلاث، ويبين الجدول (5) النسبة المئوية لجدر خلايا الخميرة على أساس الوزن الجاف للخميرة.

الجدول (5) النسب المئوية لجدر خلايا الخميرة على أساس الوزن الجاف المحضر باتباع طرائق تحلل مختلفة.

النسبة المئوية لجدار خلية الخميرة على أساس الوزن الجاف للخميرة	النسبة المئوية للرطوبة	الطريقة
29.12	84	التحلل بالبلمزة (plasmolysis)
14.04	79.73	التحلل الذاتي غير محدد الظروف (13 يوم، درجة حرارة الغرفة)
39.1	75.88	التحلل الذاتي محدد الظروف (50°C، pH 5، 48 ساعة)

يوضح الجدول (5) النسب المئوية لجدر خلايا الخميرة الناتج عن تكسير خلايا الخميرة بثلاث طرائق، حيث تراوحت النسب المئوية لجدر خلايا الخميرة على أساس الوزن الجاف للخميرة بين 14.04-39.1 غ/100 غ وزن جاف خميرة، يتضح من الجدول أن أعلى نسبة لجدر خلايا الخميرة كانت عند استخدام طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف حيث بلغت 39.1%، وهذا يوافق ما ذكره الباحث Amaral وزملاؤه عام 2008 من أن الجدار يشكل 40% من خلية الخميرة، وكانت أقل نسبة لجدر خلايا الخميرة عند استخدام طريقة التحلل الذاتي غير محددة الظروف إذ بلغت 14.04% فقط، وهذا يوافق ما ذكره الباحثان Kim و Yun عام 2006 من أن نسبة جدار خلية الخميرة تتراوح بين 15-25% وسبب اختلاف النسب يعود لاختلاف كفاءة طرائق التحلل المستخدمة حيث لم يكتمل تحلل الخميرة بشكل كامل بطريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف فأعطت نسبة جدار قليلة.

5-4- النسبة المئوية للمادة الصلبة الكلية في جدار خلية الخميرة:

قُدرت نسبة المادة الصلبة الكلية في جدار خلية الخميرة المتحصل عليه من عملية التحلل السابقة بطرائقها الثلاث وتبين الجداول (6، 7، 8) النسب المئوية للمادة الصلبة الكلية على أساس الوزن الجاف لجدار خلية الخميرة.

الجدول (6) النسب المئوية للمادة الصلبة الكلية من جدار خلية الخميرة المحضر بطريقة التحلل بالبلزمة (غ/100 غ وزن جاف جدار خلية خميرة).

شروط الاستخلاص زمن/مل قلووي: غ جدار	الوزن الأولي لجدار خلية الخميرة جاف (غ)	الوزن الرطب للمادة الصلبة من الجدار بعد الاستخلاص (غ)	النسبة المئوية للرطوبة	الوزن الجاف للمادة الصلبة من الجدار بعد الاستخلاص (غ)	النسبة المئوية للمادة الصلبة الكلية من الجدار غ/100 غ وزن جاف جدار
1:5/1/1	4.57	4.46	90	0.45	9.84
1:5/2/1	4.57	4.63	91	0.42	9.19
1:5/1/2	4.57	4.65	95	0.23	5.03
1:5/2/2	4.57	5.49	90	0.55	12.03
1:2/1/1	4.57	5.11	88	0.61	13.34
1:2/2/1	4.57	4.89	89	0.54	11.81
1:2/1/2	4.57	4.66	91	0.42	9.19
1:2/2/2	4.57	5.23	88	0.63	13.78

يبين الجدول (6) النسب المئوية للمادة الصلبة الكلية المستخلصة من جدار خلية الخميرة قبل إجراء عملية التنقية باستخدام طريقة التحلل بالبلزمة لتكسير جدار الخميرة، حيث تراوحت بين 35.0-13.78% على أساس الوزن الجاف للجدار، وبلغت أعلى قيمة لها عند المعاملة 1:2/2/2 والمعاملة 1:2/1/1 حيث أعطت 13.78% و 13.34% على التوالي وأقل قيمة لها عند المعاملة 1:5/1/2 وبلغت 5.03%، بينما أعطت المعاملتين 1:5/2/2 و 1:2/2/1 قيمًا وسطية وصلت لـ 12.03% و 11.81% على التوالي وهذا يوافق ما ذكره العالم Thammakiti وزملاؤه عام 2004 من أن شروط الاستخلاص تؤثر على الوزن الجاف للمادة الصلبة الكلية من جدار خلية الخميرة.

الجدول (7) النسب المئوية للمادة الصلبة الكلية من جدار خلية الخميرة المحضر بطريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف (غ/100 جاف جار خلية خميرة).

النسبة المئوية للمادة الصلبة الكلية من الجدار غ/100 غ وزن جاف	الوزن الجاف للمادة الصلبة من الجدار بعد الاستخلاص (غ)	النسبة المئوية للرطوبة	الوزن الرطب للمادة الصلبة من الجدار بعد الاستخلاص (غ)	الوزن الأولي لجدار خلية الخميرة جاف (غ)	شروط الاستخلاص زمن/N/مل قلوي:غ جدار
11.14	0.32	94.13	5.43	2.87	1:5/1/1
9.40	0.27	94.87	5.26	2.87	1:5/2/1
6.27	0.18	95.65	4.13	2.87	1:5/1/2
10.45	0.30	92.6	3.99	2.87	1:5/2/2
21.25	0.61	89.58	5.86	2.87	1:2/1/1
12.89	0.37	93.56	5.69	2.87	1:2/2/1
13.93	0.40	88.75	3.55	2.87	1:2/1/2
13.93	0.40	89.32	3.79	2.87	1:2/2/2

يبين الجدول (7) النسبة المئوية للمادة الصلبة الكلية (غلوكان خام) المستخلصة من جدار خلية الخميرة قبل إجراء عملية التنقية وعند استخدام طريقة التحلل الذاتي غير محددة الظروف (13 يوم) لتكسير جدار الخميرة حيث تراوحت النسب المئوية على أساس الوزن الجاف بين 6.27 % كأقل قيمة عند المعاملة 1:5/1/2 و 21.25 % كأعلى قيمة عند المعاملة 1:2/1/1، وسجلت باقي المعاملات قيماً تدرجت من 9.40، 10.45، 11.14، 12.89 إلى 13.93 % عند المعاملات التالية 1:2/1:5، 2/2/1:5، 1/1/1:5، 1/2/1:2 و 2/1/1:2 و 2/1/1:2 على التوالي، وهذه النتائج بعضها يوافق والآخر يخالف ما ذكره العالم Suphantharika وزملاؤه عام 2003 بأن النسبة المئوية للغلوكان الخام تتراوح ما بين 20-40% من جدار خلية الخميرة

الجدول (8) النسب المئوية للمادة الصلبة الكلية من جدار خلية الخميرة المحضر بطريقة التحلل الذاتي محددة الظروف (غ/100 غ وزن جاف).

شروط الاستخلاص زمن/N/مل قلوي: غ جدار	الوزن الأولي لجدار خلية الخميرة جاف (غ)	الوزن الرطب للمادة الصلبة من الجدار بعد الاستخلاص (غ)	النسبة المئوية للرطوبة	الوزن الجاف للمادة بعد الاستخلاص (غ)	النسبة المئوية للمادة الصلبة الكلية من الجدار غ/100 غ وزن جاف
1:5/1/1	2	6.67	89	0.74	37
1:5/2/1	2	5.93	93.4	0.42	21
1:5/1/2	2	7.39	95.76	0.39	19.5
1:5/2/2	2	3.3	91	0.3	15
1:2/1/1	2	9.4	93.11	0.57	28.5
1:2/2/1	2	7.63	91.52	0.63	31.5
1:2/1/2	2	5.86	91.85	0.47	23.5
1:2/2/2	2	6.44	93.89	0.52	26

يبين الجدول (8) النسب المئوية للمادة الصلبة الكلية (غلوكان خام) المستخلصة من جدار خلية الخميرة عند استخدام طريقة التحلل الذاتي محددة الظروف (pH 5، 50°م 48 ساعة) لتكسير جدار الخميرة قد تراوحت بين 15-37 % على أساس الوزن الجاف لجدار خلية الخميرة، ومن الجدول السابق نلاحظ أن طريقة التكسير السابقة رفعت من كفاءة الإستخلاص وأعطت نسبة مادة صلبة مرتفعة حيث وصلت أعلاها لـ 37% عند المعاملة 1:5/1/1 تليها النسب 31.5، 28.5، 26 و 23.5% عند المعاملات التالية 1:2/2/1، 1:2/1/1، 1:2/2/2 و 1:2/1/2 على التوالي، وكانت باقي نسب الغلوكان أقل من 21%، وهذا يوافق ما ذكره العالم Supphantharika وزملاؤه، عام 2003.

يتضح من الجداول (6 ، 7 ، 8) أن طريقة تكسير جدار خلية الخميرة وشروط الاستخلاص تؤثر بشكل كبير على النسبة المئوية للمادة الصلبة الكلية (الغلوكان الخام) المستخلصة من جدار الخميرة حيث تفوقت طريقة التحلل الذاتي محددة الظروف على غيرها، وتفاوتت النسب بين معاملة استخلاص وأخرى بشكل كبير، حيث كانت أعلاها 37% عند المعاملة 1:5/1/1 بطريقة التحلل الذاتي محددة الظروف وأقلها 5% عند المعاملة 1:5/1/2 بطريقة التحلل بالبلمرة.

5-5- النسبة المئوية لـ β -D(1-6) Glucan من جدار خلية الخميرة:

فُصل مركب β -D(1-6) Glucan عن β -D(1-3) Glucan بترسيبه بحمض الفوسفور 4% من المادة الصلبة الكلية (غلوكان خام) المستخلصة بالقلوي من جدار خلية الخميرة، ويبين الجدول (9) نسبته على أساس الوزن الجاف لجدار خلية الخميرة.

الجدول (9) النسبة المئوية لـ β -D(1-6) Glucan (غ/100غ وزن جاف)

الطريقة	المعاملة زمن/ن/مل قلوي: غ جدار	الوزن الرطب لببتا 1-6 غلوكان (غ)	الوزن الجاف لببتا 1-6 غلوكان (غ)	% لببتا 1-6 غلوكان من جدار خلية الخميرة
التحلل بالبلزمة plasmolysis	1:5/2/1	1.2	0.11	2.41
	1:5/1/2	1.05	0.05	1.09
	1:5/2/2	0.8	0.08	1.75
	1:5/1/1	1.2	0.12	2.63
	1:2/1/2	0.95	0.09	1.97
	1:2/1/1	0.95	0.11	2.41
	1:2/2/2	1.65	0.20	4.37
	1:2/2/1	0.9	0.10	2.18
التحلل الذاتي غير محدد الظروف (13 يوم)	1:5/2/1	0.8	0.04	0.90
	1:5/1/2	1.15	0.05	1.10
	1:5/2/2	0.6	0.04	1.00
	1:5/1/1	1.7	0.10	2.20
	1:2/1/2	0.8	0.09	2.00
	1:2/1/1	0.95	0.10	2.20
	1:2/2/2	0.95	0.10	2.20
	1:2/2/1	1.75	0.11	2.50
التحلل الذاتي محدد الظروف (pH 5, C°50)	1:5/2/1	1.5	0.10	5.00
	1:5/1/2	0.9	0.04	2.00
	1:5/2/2	0.55	0.05	2.50
	1:5/1/1	1.6	0.18	9.00
	1:2/1/2	0.9	0.07	3.50
	1:2/1/1	0.75	0.05	2.50
	1:2/2/2	0.95	0.06	3.00
	1:2/2/1	0.65	0.06	3.00

يبين الجدول (9) النسبة المئوية لـ β -D(1-6) Glucan على أساس الوزن الجاف من جدار خلية الخميرة والذي تم فصله من الغلوكان الخام بعد معاملته بحمض الفوسفور، حيث تراوحت نسبته ما بين 0.9-9% في طرائق التحلل الثلاث، وسجلت المعاملة 1:2/2/2 بطريقة التحلل بالبلزمة plasmolysis والمعاملة 1:5/1/1 بطريقة التحلل الذاتي محدد الظروف أعلى نسبتيين حيث

بلغتا 4.37، 9% على التوالي، وهذا يوافق ما ذكره العالم pecka وزملاؤه عام 2003 بأن نسبة β Glucan (1-6) -D- تتراوح بين 4-10%، وسجلت المعاملة 1:5/2/2 والمعاملة 1:5/2/1 بطريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف أقل نسبتيين حيث بلغتا 1، 0.9% على التوالي، بينما كانت أغلب النسب الأخرى بين 1.09-3.5 % كقيم وسطية، وهذا يخالف ما ذكره العالم السابق وقد يعود هذا الفرق لتأثير كفاءة شروط الاستخلاص من حرارة ومدة زمنية وكفاءة طرق التكسير، حيث كانت طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف هي الأفضل حيث أعطت معاملات الاستخلاص فيها أعلى نسبة غلوكان وتراوح معظمها بين 2.00-5.00% تليها طريقة التحلل بالبلزمة وتراوح معظمها بين 2.18-4.37%.

5-6- تركيز الكربوهيدرات الكلية (الببتاغلوكان الخام) في جدار خلية الخميرة:

قُدر تركيز الكربوهيدرات الكلية (الغلوكان الخام) في جدار خلية الخميرة (بعد حلماتها بحمض الكبريت) بطريقة لونية (فينول - حمض كبريت) وقيست الامتصاصية وأسقطت على منحنى معياري للغلوكوز، واختيرت معاملة الاستخلاص الأفضل من طرائق التحلل الثلاث على أساس نسبة الغلوكان الخام الأعلى المتحصل عليها (غ/100 غ وزن جاف)، ويوضح الجدول (10) تركيز الكربوهيدرات الكلية على أساس الوزن الجاف لجدار خلية الخميرة والتي تمثل الغلوكان الخام.

الجدول (10) النسب المئوية للكربوهيدرات الكلية (الغلوكان الخام) في جدار خلية الخميرة المحضر بطرائق التحلل المختلفة.

الطريقة	المعاملة زمن/N/مل قلوي: غ جدار	التركيز بعد الحلمأة	التركيز غ/100 غ جاف
التحلل بالبلزمة plasmolysis	1:5/1/1	1.313	^c 13.13
	1:5/2/1	2.120	^b 23.55
	1:5/1/2	2.216	^a 44.33
	1:5/2/2	1.321	^c 13.21
	1:2/1/1	1.305	^c 10.88
	1:2/2/1	1.193	^c 10.84
	1:2/1/2	1.297	^c 14.41
	1:2/2/2	1.391	^c 11.59
التحلل الذاتي محدد الظروف (pH 5, C°50)	1:5/1/1	1.190	^c 10.82
	1:5/2/1	1.643	^b 24.89
	1:5/1/2	2.232	^a 52.65
	1:5/2/2	1.345	^c 14.95
	1:2/1/1	1.150	^c 16.69
	1:2/2/1	1.203	^c 14.19
	1:2/1/2	1.262	^c 15.49
	1:2/2/2	1.782	^b 29.17
التحلل الذاتي غير محدد الظروف (13 يوم)	1:5/1/1	1.868	^b 31.82
	1:5/2/1	1.257	^c 24.50
	1:5/1/2	1.769	^a 40.66
	1:5/2/2	0.903	^d 12.20
	1:2/1/1	1.372	^d 13.17
	1:2/2/1	1.412	^c 21.93
	1:2/1/2	1.284	^e 11.41
	1:2/2/2	1.099	^e 10.29

تشير الأحرف المتشابهة في العمود الواحد ضمن الطريقة الواحدة لعدم وجود فرق معنوي على مستوى ثقة 5%

يبين الجدول (10) النسبة المئوية للبيتاغلوكان الخام على أساس الوزن الجاف من جدار خلية الخميرة حيث سجلت المعاملة $1:5/1/2$ أعلى نسبة للبيتاغلوكان في الطرائق الثلاث لتكسير جدار خلية الخميرة وبلغت 44.33% في طريقة التحلل بالبلزمة تليها المعاملة $1:5/2/1$ والتي بلغت 23.55%، بينما بلغت أعلى نسبة من البيتاغلوكان في طريقة التحلل الذاتي غير محددة الظروف 40.66% عند المعاملة $1:5/1/2$ ، تليها المعاملات $1:5/1/1$ ، $1:5/2/1$ ، $1:2/2/1$ حيث بلغ تركيز البيتاغلوكان فيها 31.82، 24.50، 21.93% على التوالي، وسجلت المعاملة $1:5/1/2$ بطريقة التحلل الذاتي محدد الظروف أعلى نسبة بين المعاملات والطرائق السابقة حيث وصل تركيز البيتاغلوكان لـ 52.65% وهذا يتوافق مع ما ذكره الباحث Shokri وزملاؤه عام 2008 بأن نسبة البيتاغلوكان وصلت لـ 55%، تليها المعاملتين $1:2/2/2$ ، $1:5/2/1$ حيث وصل التركيز فيهما لـ 29.17، 24.89% على التوالي، وهذا يوافق ما ذكره الباحث Suphantharika وزملاؤه عام 2003 بأن نسبة البيتاغلوكان تتراوح بين 17.2-50%، بينما تراوحت نسبة البيتاغلوكان في المعاملات الأخرى في طرائق التحلل الثلاث بين 10-16% وهذه النسب أقل مما ذكره العالم السابق ويعزى هذا إلى انخفاض كفاءة شروط الاستخلاص من وقت وتركيز للقلوي ونسبة جدار خلية لحجم القلوي في هذه المعاملات وهذا يتوافق مع ما ذكره الباحثان Marinescu و Stoicescu عام 2009 أن استخدام تراكيز مختلفة من ماءات الصوديوم وتغيير حجم ماءات الصوديوم لوزن جدار الخلية أعطى نسباً مختلفة من البيتاغلوكان تراوحت بين 10-49%.

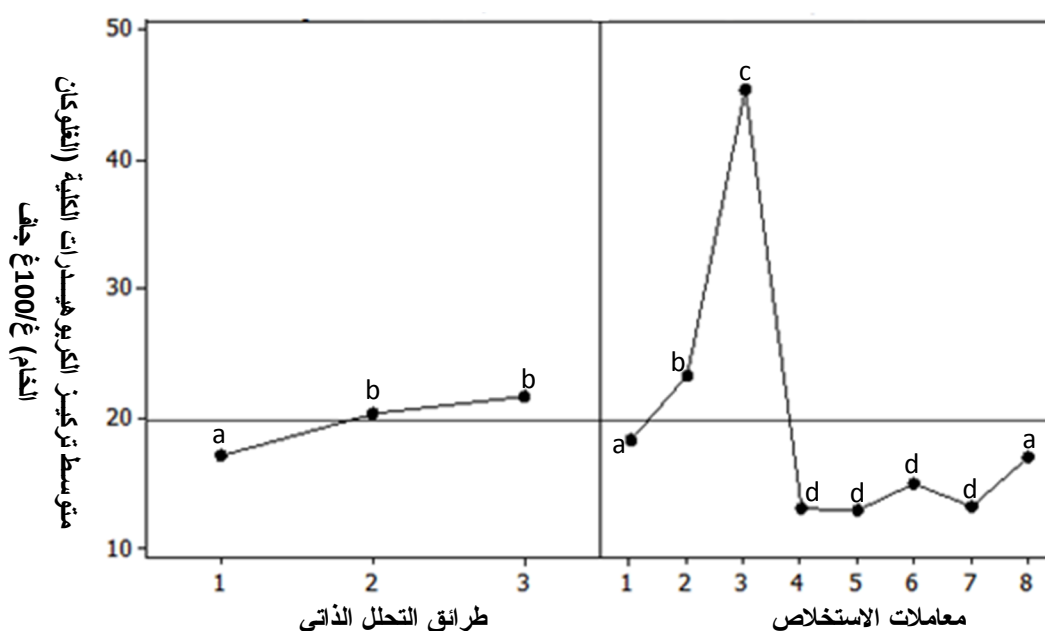
5-7- تأثير طريقة التحلل الذاتي وشروط الاستخلاص المستخدمة في تركيز الكربوهيدرات الكلية (الغلوكان الخام):

أُجري التحليل الإحصائي لنتائج تركيز الكربوهيدرات الكلية، لمعرفة مدى تأثير المتغيرات المدروسة وهي طريقة التحلل ومعاملة الاستخلاص في تركيز الكربوهيدرات الكلية (الغلوكان الخام) ويوضح الجدول (11) تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة في تركيز الكربوهيدرات الكلية، ولدراسة وجود فروق معنوية في قيم متوسطات تركيز الكربوهيدرات الكلية المتحصل عليه نتيجة استخدام طرائق تحلل وشروط الاستخلاص مختلفة، ويوضح الشكل (10) تأثير كل من طرائق التحلل وشروط الاستخلاص في تركيز الكربوهيدرات الكلية.

الجدول (11) تحليل التباين لتأثير متغيرات طريقة التحلل الذاتي ومعاملة الاستخلاص في تركيز الكربوهيدرات الكلية.

المصدر	درجة الحرية	التباين (MS)	التباين %	p
المكررات	2	29.98	2.38	0.362
طريقة التحلل الذاتي	2	135.79	10.77	0.013
معاملة الاستخلاص	7	1066.16	84.55	0

يبين الجدول (11) أن أكثر من 84% من التباين في تركيز الكربوهيدرات الكلية ناتج عن متغير معاملة الاستخلاص المستخدمة، كما يبين وجود فروق معنوية بشكل عام بين طرائق التحلل الذاتي ومعاملات الاستخلاص المستخدمة على مستوى ثقة 5%.



طرائق التحلل الذاتي: 1- التحلل بالبلزمة 2- التحلل الذاتي محدد الظروف 3- التحلل الذاتي غير محدد الظروف.
شروط الاستخلاص: 1- (1:5/1/1) 2- (1:5/2/1) 3- (1:5/1/2) 4- (1:5/2/2) 5- (1:2/1/1) 6- (1:2/2/1) 7- (1:2/1/2) 8- (1:2/2/2)

الشكل (10) تأثير كل من طرائق التحلل الذاتي وشروط الاستخلاص في تركيز الكربوهيدرات الكلية.

يتبين بالدراسة الإحصائية من الشكل (10) وجود فروق معنوية بين متوسطات تركيز الكربوهيدرات الكلية عند استخدام طرائق تحلل ذاتي ومعاملات استخلاص مختلفة، ويلاحظ تفوق طريقتي التحلل الذاتي محدد الظروف وغير محدد الظروف على طريقة التحلل بالبلزمة، في حين تفوقت معاملة الاستخلاص 1:5/1/2 على معاملات الاستخلاص الأخرى من حيث تركيز الكربوهيدرات الكلية وهي المعاملة الأفضل التي اعتمدت في مراحل البحث التالية.

5-8- النسبة المئوية للبروتين في البيتاغلوكان الخام:

قدرت نسبة البروتين في جدار خلية الخميرة الخام وفي البيتاغلوكان المتحصل عليه بطرائق التحلل الثلاث خلال مراحل التنقية المختلفة، ويبين الجدول (12) النسبة المئوية للبروتين على أساس الوزن الجاف لجدار خلية الخميرة.

الجدول (12) النسبة المئوية للبروتين على أساس الوزن الجاف (غ/100 غ جاف جدار خلية خميرة).

مراحل التنقية	التحلل بالبلزمة	التحلل الذاتي غير محدد الظروف	التحلل الذاتي محدد الظروف
جدار خام	^b 8.5±0.51	^a 32.25 ± 1.63	^b 10.57 ± 0.51
بيتاغلوكان خام	^b 2.12±0.08	^a 2.48 ± 0.09	^b 1.75 ± 0.03
بيتاغلوكان منقى جزئياً	^a 1.31 ± 0.06	^b 0.68± 0.06	^a 1.03 ± 0.12

تشير الأحرف المتشابهة ضمن السطر الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة 5%

يبين الجدول (12) النسب المئوية للبروتين على أساس الوزن الجاف من البيتاغلوكان الخام في طرائق التكسير الثلاث، حيث كانت نسبة البروتين مرتفعة في جدار خلية الخميرة حيث وصلت لـ 32.25% بطريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف تليها النسبة 10.57، 8.54 % بطريقة التحلل الذاتي محدد الظروف والتحلل بالبلزمة على التوالي، بينما انخفضت هذه النسب بشكل كبير بعد الاستخلاص حيث بقي الجزء الأكبر من المانوبروتين مع سائل الاستخلاص القلوي فانخفضت النسب إلى 2.12، 2.48، 1.75% في طريقة التحلل بالبلزمة والتحلل الذاتي غير محدد ومحدد الظروف على التوالي وهذا يتوافق مع ما ذكره الباحث Suphantharika وزملاؤه عام 2003، كما انخفضت لقيمة أقل بعد المعاملة بحمض الفوسفور لانهلال جزء من البروتين المتبقي بحمض الفوسفور حيث وصلت لأخفض قيمة لها بطريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف وبلغت 0.68% وتراوحت القيمتين الباقيتين بين 1-1.31% وهي أقل من القيمة التي ذكرها الباحث Shokri وزملاؤه عام 2008 حيث بلغت نسبة البروتين بعد المعاملة القلوية - الحامضية 2.4% والسبب اختلاف نوع الحمض المستخدم للتنقية حيث استخدم في البحث حمض الفوسفور والباحث Shokri استخدم حمض الخل.

5-9- تأثير طريقة التحلل ومراحل التنقية المستخدمة في تركيز البروتين:

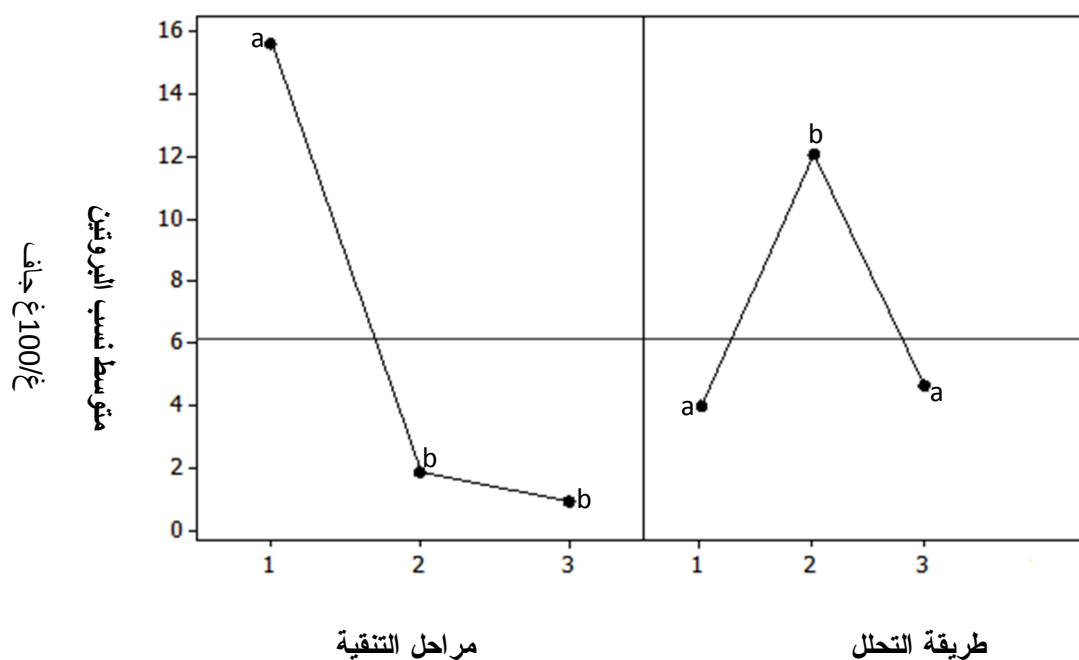
أجري التحليل الإحصائي لنتائج تركيز البروتين، لمعرفة مدى تأثير المتغيرات المدروسة وهي طريقة التحلل الذاتي ومراحل الاستخلاص والتنقية في تركيز البروتين المتحصل عليه في مراحل

الاستخلاص والتنقية المختلفة (الجدول 13)، ولدراسة وجود فروق معنوية في قيم متوسطات تركيز البروتين المتحصل عليه نتيجة استخدام طرائق التحلل الذاتي ومراحل الاستخلاص والتنقية المختلفة، الشكل (11).

الجدول (13) تحليل التباين لتأثير متغيرات طريقة التحلل الذاتي ومعاملة الاستخلاص في تركيز البروتين.

المصدر	درجة الحرية	التباين (MS)	التباين %	p
المكررات	2	0.04	0.00	0.998
مراحل التنقية	2	808.97	82.87	0
طرائق التحلل	2	141.53	14.50	0.004

يبين الجدول (13) أن أكثر من 82% من التباين في تركيز البروتين ناتج عن متغير مراحل الاستخلاص والتنقية، كما يبين وجود فروق معنوية بشكل عام بين طرائق التحلل ومراحل التنقية المدروسة.



طريقة التحلل: 1- التحلل بالبلزمة 2- التحلل الذاتي غير محدد الظروف 3- التحلل الذاتي محدد الظروف.
مراحل التنقية: 1- الجدار الخام 2- بعد المعاملة بالقلوي 3- بعد المعاملة بحمض الفوسفور.
الشكل (11) متوسطات نسب البروتين لطرائق التحلل الذاتي الثلاث في مراحل الاستخلاص والتنقية.

تبين من الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين متوسطات تركيز البروتين المتحصل عليها باستخدام طرائق التحلل الثلاث وخلال مراحل التنقية المختلفة حيث تفوقت طريقة التحلل بالبلزمة على طريقتي التحلل الذاتي الأخرتين فقد أعطت طريقة التحلل بالبلزمة أقل نسبة بروتين مع وجود فروق

معنوية، في حين لوحظ انخفاض واضح في نسبة البروتين في مرحلتي ما بعد المعاملة بالقلوي وما بعد المعاملة بالفوسفور .

5-10- تقدير الكربوهيدرات الكلية :

قُدرت نسبة الكربوهيدرات الكلية (الغلوكان الخام) في مراحل التنقية المختلفة وذلك لمعاملة الاستخلاص الأفضل وهي (1:5/1/2) لطرائق تحليل الخميرة الثلاث المستخدمة، ويبين الجدول (14) النسبة المئوية للكربوهيدرات الكلية في مراحل الاستخلاص والتنقية المختلفة على أساس الوزن الجاف.

الجدول (14) النسبة المئوية للكربوهيدرات الكلية في مراحل التنقية المختلفة (غ/100 غ جدار خلية خميرة جاف).

التحلل الذاتي محدد الظروف	التحلل الذاتي غير محدد الظروف	التحلل بالبلزمة	مراحل التنقية
^b 7.60 ± 0.81	^a 12.27 ± 0.34	^b 9.76 ± 0.66	جدار خام
^a 2.01 ± 0.18	^a 1.76 ± 0.30	^a 1.87 ± 0.17	بيتاغلوكان خام
^a 52.42 ± 1.13	^b 41.80 ± 1.84	^b 42.79 ± 1.68	بيتاغلوكان منقى جزئياً

تشير الأحرف المتشابهة ضمن السطر الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة 5%

يبين الجدول (13) النسب المئوية للكربوهيدرات الكلية حيث تراوحت في جدار خلية الخميرة بين 7-12% بطرائق التكسير الثلاث وكانت بأعلى نسبة لها بطريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف 12.27% تليها النسبتين 9.76 و 7.60% بطريقة التحلل بالبلزمة والتحلل الذاتي غير محدد الظروف على التوالي، انخفضت هذه النسب بشكل ملحوظ بعد المعاملة بالقلوي فتراوحت بالطرائق الثلاث بين 1.76-2% وهذا قد يعود لحدوث تفاعل ميلارد حيث ارتبط السكر مع البروتين بوجود حرارة عالية عند الاستخلاص، بينما عادت للارتفاع بشكل كبير بعد المعاملة بحمض الفوسفور ووصلت لأعلى قيمة لها بطريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف وبلغت عندها 52.42% تليها طريقتي التحلل بالبلزمة والتحلل الذاتي غير محدد الظروف ووصلت عندها لـ 42.79، 41.80% على التوالي وهذا يتوافق مع ما ذكره الباحث Suphantharika وزملاؤه عام 2003 بأن نسبة الكربوهيدرات الكلية (البيتاغلوكان الخام) تتراوح بين 17.2-50%، وسبب هذا الارتفاع قد يعود لأن نواتج تفاعل ميلارد تعود بالوسط الحمضي بتفاعل عكسي لتعطي المواد التي دخلت بالتفاعل وهي السكر والبروتين (محمد والخياط، 2000).

5-11- تأثير طريقة التحلل الذاتي ومراحل الاستخلاص والتنقية المستخدمة في تركيز

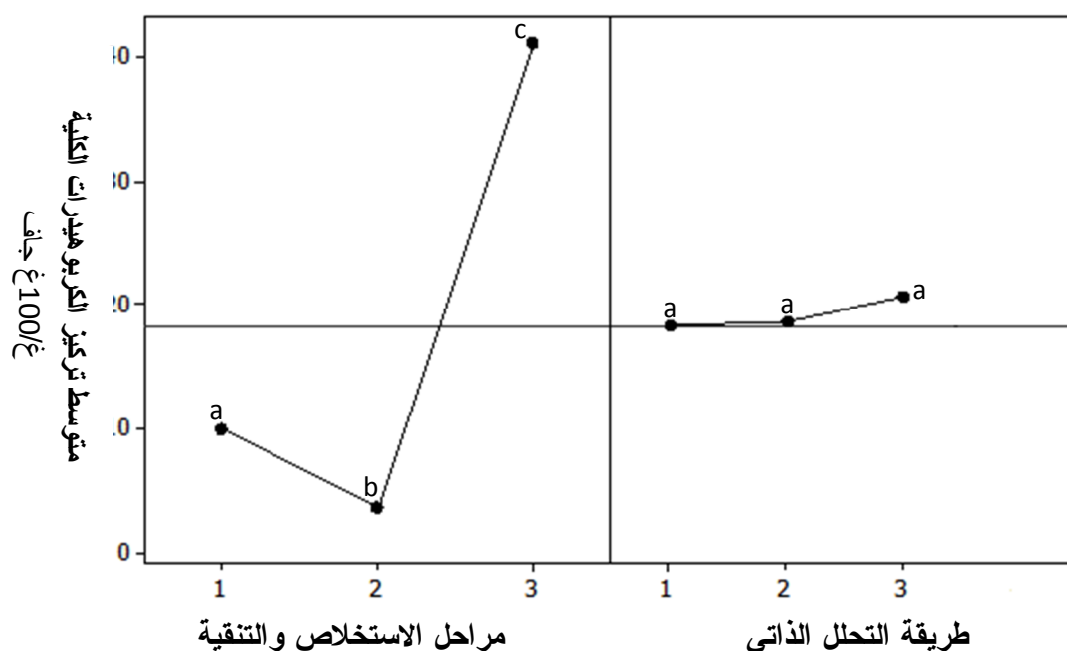
الكربوهيدرات الكلية:

أُجري التحليل الإحصائي لنتائج تركيز الكربوهيدرات الكلية (الغلوكان الخام) المتحصل عليه نتيجة استخدام معاملة الاستخلاص الأفضل (1:5/1/2) بطرائق التحلل الذاتي الثلاث ومراحل الاستخلاص والتنقية المختلفة، لمعرفة مدى تأثير المتغيرات المدروسة في تركيز الغلوكان الخام المتحصل عليه (الجدول 15)، ولدراسة وجود فروق معنوية في قيم متوسطات تركيز الكربوهيدرات الكلية المتحصل عليها نتيجة استخدام طرائق التحلل الذاتي (معاملة الاستخلاص الأفضل) وفي مراحل الاستخلاص والتنقية المختلفة، الشكل (12).

الجدول (15) تحليل التباين لتأثير متغيرات طريقة التحلل الذاتي ومعاملة الاستخلاص في تركيز الغلوكان الخام.

المصدر	درجة الحرية	التباين (MS)	التباين %	p
المكررات	2	1	0.02	0.973
مراحل الاستخلاص والتنقية	2	4770.8	98.35	0
طرائق التحلل الذاتي	2	44.2	0.91	0.305

يبين الجدول (15) أن أكثر من 98% من التباين في تركيز الغلوكان ناتج عن متغير مراحل الاستخلاص والتنقية، كما يبين عدم وجود فروق معنوية بين طرائق التحلل الذاتي الثلاث في قيم تركيز الغلوكان الخام.



طريقة التحلل الذاتي: 1- التحلل بالبلزمة 2- التحلل الذاتي غير محدد الظروف 3- التحلل الذاتي محدد الظروف.
مراحل الاستخلاص والتنقية: 1- الجدار الخام 2- بعد المعاملة بالقلوي 3- بعد المعاملة بحمض الفوسفور.

الشكل (12) تأثير طريقة التحلل الذاتي ومراحل الاستخلاص والتنقية المستخدمة في تركيز الكربوهيدرات الكلية.

يتبين من الشكل (12) وجود فروق معنوية بين متوسطات الكربوهيدرات الكلية المتحصل عليها بتطبيق معاملة الاستخلاص الأفضل (1:5/1/2) في مراحل الاستخلاص والتنقية المختلفة، ويلاحظ أن أعلى نسبة كربوهيدرات كلية كانت في المرحلة الأخيرة من مراحل الاستخلاص والتنقية مع وجود فروق معنوية، في حين لم يلاحظ وجود فروق معنوية بين طرائق التحلل الذاتي الثلاث.

12-5- تقدير الغلايكوجين:

قُدرت نسبة الغلايكوجين في مراحل التنقية المختلفة وذلك لمعاملة الاستخلاص الأفضل وهي (1:5/1/2) لطرائق تحلل الخميرة الثلاث المستخدمة (الجدول 16).

الجدول (16) النسب المئوية الغلايكوجين في مراحل التنقية المختلفة (غ/100غ جدار خلية خميرة جاف)

مراحل الاستخلاص والتنقية	التحلل بالبلزمة	التحلل الذاتي غير محدد الظروف	التحلل الذاتي محدد الظروف
جدار خام	^a 22.80 ± 0.28	^c 12.83 ± 0.21	^b 16.05 ± 0.18
بيتاغلوكان خام	^b 8.35 ± 0.07	^a 10.49 ± 0.53	^c 0.23 ± 18.17
بيتاغلوكان منقى جزئياً	^a 28.08 ± 0.76	^c 16.73 ± 0.57	^b 22.00 ± 0.33

تشير الأحرف المتشابهة ضمن السطر الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة 5%

يبين الجدول (16) النسب المئوية للغلايكوجين حيث كانت بأعلى نسبة لها بطريقة التحلل بالبلمرة وبلغت 22.80% تليها النسبتين 12.83 و 16.05% بطريقتي التحلل الذاتي غير محدد ومحدد الظروف على التوالي، انخفضت هذه النسب بشكل ملحوظ بعد المعاملة بالقلوي بطريقتي التحلل بالبلمرة والتحلل الذاتي غير محدد الظروف فوصلت لـ 8.35-10.49% على التوالي وهذا قد يعود لحدوث تفاعل ميلارد نتيجة وجود نسبة من البروتين ودرجة حرارة عالية 90 م° مما أدى إلى ربط سكر الغلوكوز، بينما ارتفعت بطريقة التحلل الذاتي محدد الظروف بشكل بسيط من 16.05 إلى 18.17%، عاد تركيز الغلايكوجين للارتفاع بشكل كبير بعد المعاملة بحمض الفوسفور ووصلت لأعلى قيمة لها بطريقة التحلل بالبلمرة وبلغت عندها 28.08% تليها طريقتي التحلل الذاتي محدد الظروف والتحلل الذاتي غير محدد الظروف حيث بلغتا 22، 16.73% على التوالي وهذا يوافق ما ذكره الباحثان Marinescu و Stoicescu عام 2009 بأن نسبة الغلايكوجين في مستخلص البيتاغلوكان من جدار خلية الخميرة تتراوح بين 18.3-30.4% وسبب هذا الارتفاع قد يعود لتفكك نواتج ميلارد بالوسط الحمضي (محمد، 1999)..

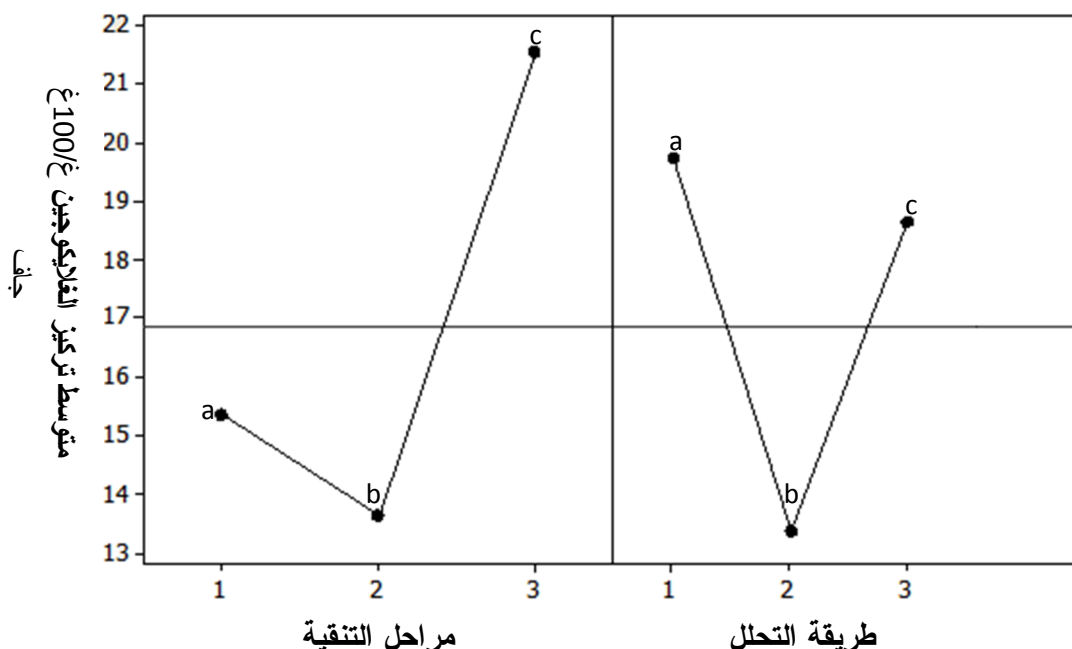
5-13- تأثير طريقة التحلل الذاتي ومراحل الاستخلاص والتنقية المستخدمة في تركيز الغلايكوجين:

أجري التحليل الإحصائي لنتائج تركيز الغلايكوجين المتحصل عليه نتيجة استخدام طرائق التحلل، لمعرفة مدى تأثير المتغيرات في تركيز الغلايكوجين المتحصل عليه في مراحل التنقية (الجدول 17)، ولدراسة وجود فروق معنوية في قيم متوسطات تركيز الكربوهيدرات الكلية المتحصل عليها نتيجة استخدام طرائق التحلل الذاتي (معاملة الاستخلاص الأفضل) وفي مراحل التنقية المختلفة، ويوضح الشكل (13) تأثير كل منهما في تركيز الغليكو جين .

الجدول (17) تحليل التباين لتأثير متغيرات طريقة التحلل ومراحل التنقية في تركيز الغلايكوجين.

المصدر	درجة الحرية	التباين (MS)	التباين %	p
المكررات	2	0.67	0.22	0.962
مراحل التنقية	2	207.32	69.21	0
طرائق التحلل	2	74.24	24.78	0.013

يبين الجدول (17) أن حوالي 69% من التباين في تركيز الغلايكوجين ناتج عن متغير مراحل التنقية وحوالي 24% من التباين ناتج عن طرائق التحلل ، كما يبين وجود فروق معنوية بشكل عام بين طرائق التحلل ومراحل التنقية المدروسة.



طريقة التحلل الذاتي: 1- التحلل بالبلزمة 2- التحلل الذاتي غير محدد الظروف 3- التحلل الذاتي محدد الظروف.
مراحل الاستخلاص والتنقية: 1- الجدار الخام 2- بعد المعاملة بالقلوي 3- بعد المعاملة بحمض الفوسفور.
الشكل (13) تأثير طريقة التحلل الذاتي ومراحل الاستخلاص والتنقية في تركيز الغلايكوجين.

يبين الشكل (13) وجود فروق معنوية بين متوسطات تركيز الغلايكوجين المتحصل عليها من تطبيق معاملة الاستخلاص 1:5/1/2 في طرائق التحلل الثلاث ومراحل التنقية المختلفة، يلاحظ من الشكل السابق أن أقل نسبة غلايكوجين سجلتها طريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف وفي مرحلة ما بعد المعاملة بالقلوي (الاستخلاص).

5-14- حساب نسبة البيتاغلوكان :

قدرت النسبة المئوية للبيتاغلوكان الناتج من معاملة الاستخلاص الافضل وهي 1:5/1/2 لطرائق تحلل الخميرة الثلاث بطريقتين الأولى حسابية وذلك بطرح نسبة الغلايكوجين من الكربوهيدرات الكلية والمقدرتين لونياً، والثانية باستخدام الكرموتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) الجداول (18)، (19) والأشكال (14)، (15)، (16)، (17).

الجدول (18) النسبة المئوية للبيتاغلوكان المنقى جزئياً (غ/100 غ جدار خميرة جاف) المقدرة حسابياً

الطرائق	نسبة البيتاغلوكان المنقى غ/100 غ جاف
التحلل بالبلزمة	^a 14.71± 0.36
التحلل الذاتي غير محدد الظروف	^b 24.22±1.22
التحلل الذاتي محدد الظروف	^c 31.25±2.05

تشير الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة 5%

يبين الجدول (18) نسبة البيتاغلوكان المقدرة على أساس الوزن الجاف لجدار خلية الخميرة أن طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف سجلت أعلى نسبة للبيتاغلوكان بلغت 31.25%، تليها طريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف إذ بلغت 24.22% وأقل نسبة للبيتاغلوكان كانت 14.71% بطريقة التحلل بالبلزمة، وتتوافق هذه النتائج مع ما ذكره الباحث Suphantharika وزملاؤه، 2003 بأن نسبة البيتاغلوكان ضمن شروط الاستخلاص ذاتها تراوحت بين 17.2-50%.

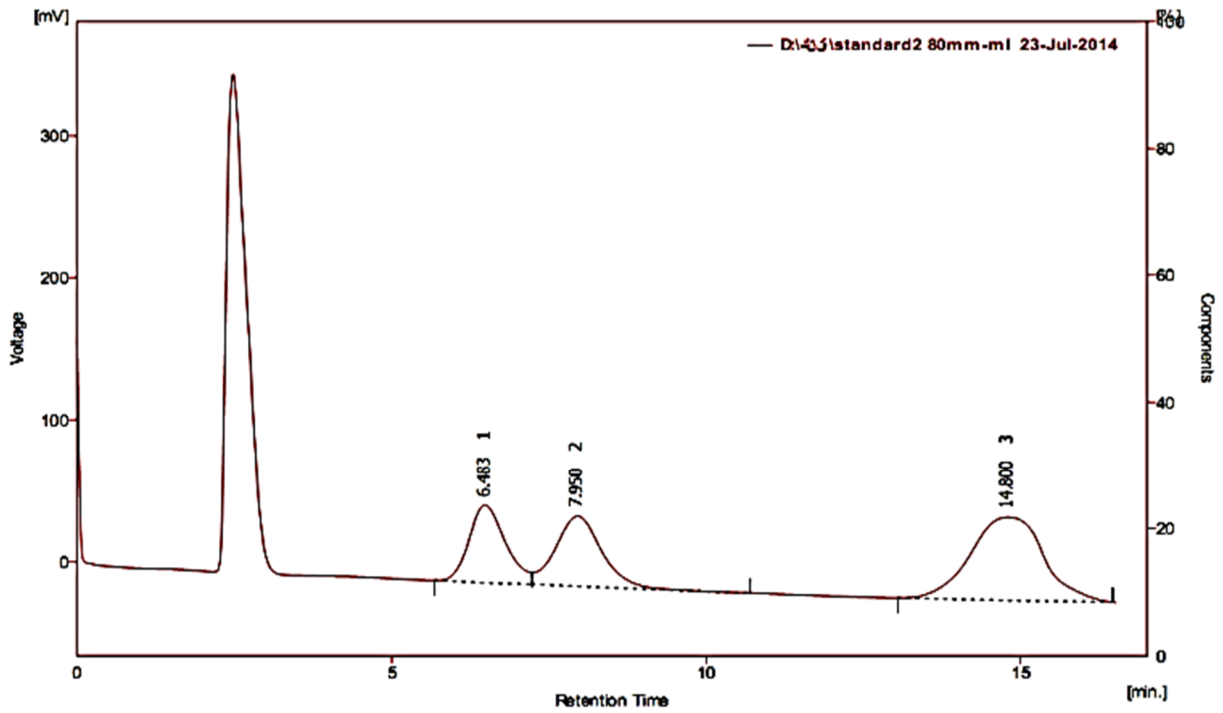
الجدول (19) النسبة المئوية للبيتاغلوكان المنقى جزئياً (غ/100 غ جاف) المقدرة بالـ HPLC.

الطرائق	نسبة البيتاغلوكان المنقى جزئياً غ/100 غ جاف
التحلل بالبلزمة	^a 12.8
التحلل الذاتي غير محدد الظروف	^b 21.4
التحلل الذاتي محدد الظروف	^c 29.5

تشير الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة 5%

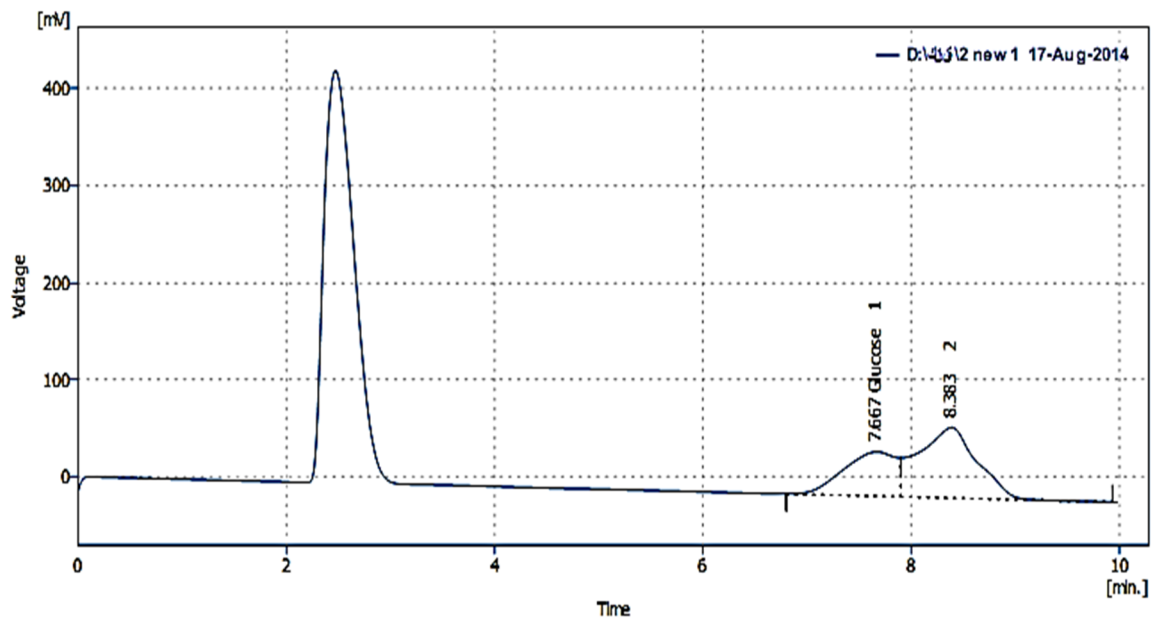
يبين الجدول (19) أن أعلى نسبة للبيتاغلوكان المنقى جزئياً بلغت 29.5% في طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف، تليها طريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف وبلغت 21.4% وأقل نسبة للبيتاغلوكان كانت 12.8% بطريقة التحلل بالبلزمة، وتتوافق هذه النتائج مع ما ذكره الباحث Suphantharika وزملاؤه، 2003 بأن نسبة البيتاغلوكان ضمن شروط الاستخلاص ذاتها تراوحت بين 17.2-50%.

نلاحظ من النتائج السابقة تقارب كبير بين نسبتي البيتاغلوكان المقدرة حسابياً وبتقانة الـ HPLC والفروق البسيطة تعود إلى أن بعض الشوائب تعطي نتيجة إيجابية بالطريقة اللونية أي تزيد الامتصاصية فيزداد التركيز فهي طريقة حساسة جداً.



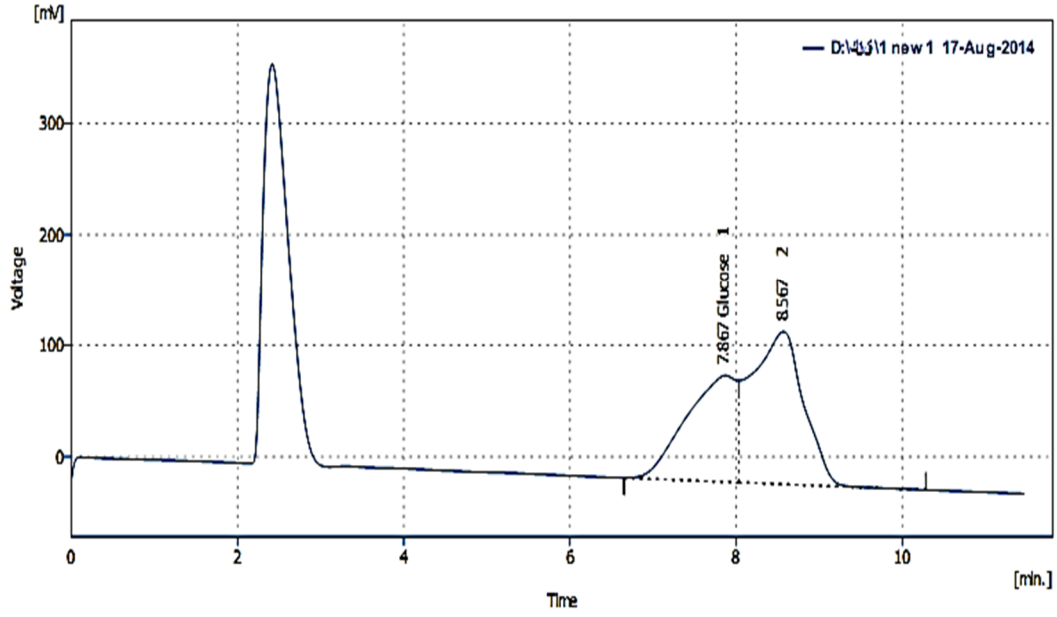
الشكل (14) المنحنى المعياري لسكر الغلوكوز والذي تركيزه mM80

شروط التحليل: تدفق 1.5 مل/د - مذيب أسيتونتريل/ماء منزوع الشوارد بنسبة 15/85 %.

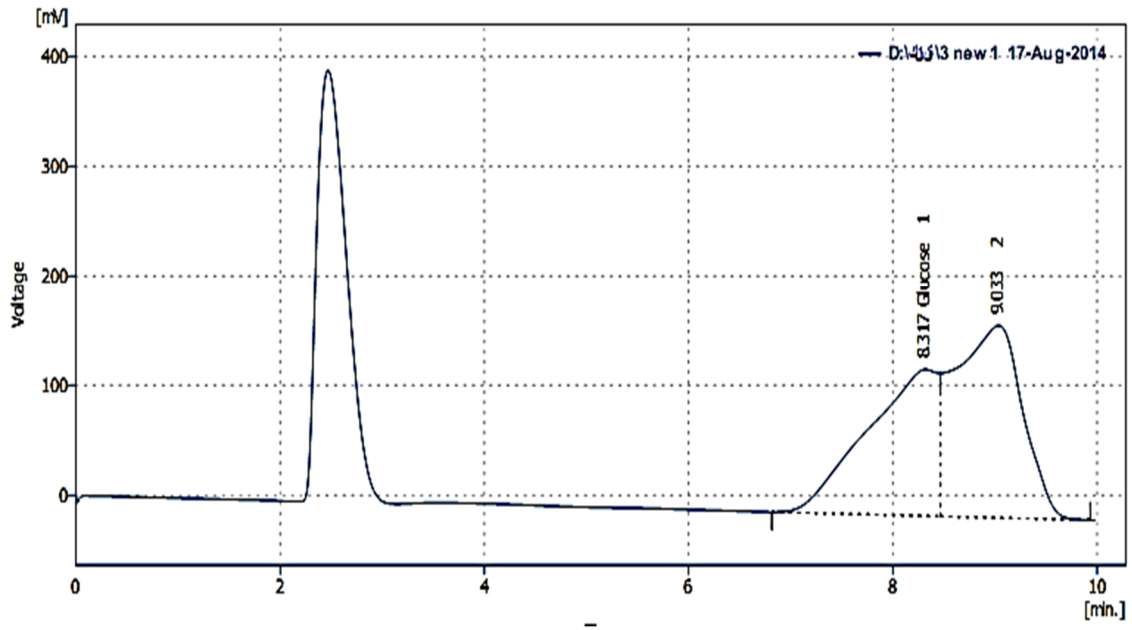


الشكل (15) نسبة البيتاغلوكان المنقى جزئياً للمعاملة المثلى والنتائج عن طريقة التحلل بالبلزمة.

شروط التحليل: تدفق 1.5 مل/د - مذيب أسيتونتريل/ماء منزوع الشوارد بنسبة 15/85 %.



الشكل (16) نسبة البيتاغلوكان المنقى جزئياً للمعاملة المثلى والناتج عن طريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف.
شروط التحليل: تدفق 1.5 مل/د - مذيب أسيتونتريل/ماء منزوع الشوارد بنسبة 15/85 %.



الشكل (17) نسبة البيتاغلوكان المنقى جزئياً للمعاملة المثلى والناتج عن طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف.
شروط التحليل: تدفق 1.5 مل/د - مذيب أسيتونتريل/ماء منزوع الشوارد بنسبة 15/85 %.

5-15- تقدير الصفات الوظيفية:

5-15-1- قابلية ربط الدهن:

تفاوتت قدرة البيتاغلوكان على ربط الزيت بين طرائق التحلل الثلاث فكانت مرتفعة بطريقة التحلل الذاتي محدد الظروف ومنخفضة بالطريقتين الباقيتين، كما أثرت عملية البسترة كأحد عوامل التصنيع على نسبة ربط الدهن وأدت لانخفاضها. يبين الجدول (20) قابلية ربط البيتاغلوكان لزيت دوار الشمس وتأثير البسترة عليها.

الجدول (20) قابلية ربط البيتاغلوكان لزيت دوار الشمس وتأثير البسترة عليها.

المعاملة	مل زيت/100 غ بيتاغلوكان قبل البسترة	مل/ 100 غ بيتاغلوكان بعد البسترة
التحلل بالبلزمة	^a 25.00 ± 1.2	^a 19.45 ± 1.5
التحلل الذاتي غير محدد الظروف	^b 5.00 ± 0.9	^b 1.18 ± 0.8
التحلل الذاتي محدد الظروف	^c 242.00 ± 10.4	^c 231.02 ± 17.6

تشير الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة 5%

يبين الجدول (20) حجم الزيت المرتبط مقدرة بـ مل زيت لكل 100 غ بيتاغلوكان وتأثير ظروف التصنيع (بسترة) عليها، حيث أعطت طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف أعلى قيمة لربط الدهن وبلغت 242 مل وهذا يطابق ما ذكره الباحث Thammakiti وزملاؤه عام 2003 بأن نسبة ربط الدهن للبيتاغلوكان تتراوح بين 75-250 مل/100 غ بيتاغلوكان، في حين أعطى الباقي نسباً منخفضة عما ذكره الباحث وهذا قد يعود إلى أن الطريقتين السابقتين أدت لفقدان المجموعات المسؤولة عن ربط الدهن كالفوسفوليبيدات الداخلة بتركيب البيتاغلوكان، في حين أن النسب انخفضت بعد عملية البسترة وهذا يعود لترسب البروتينات والتي تكون مسؤولة بشكل جزئي عن ربط الدهن من خلال الأحماض الأمينية الكارهة للماء كالبرولين، الآلانين... وغيرها، فأعطت طريقة التحلل الذاتي محددة الظروف أعلى نسبة وصلت لـ 231 مل وانخفضت في طريقة التحلل بالبلزمة من 25 مل إلى 19.45 مل، بينما انخفضت في طريقة التحلل الذاتي غير محددة الظروف من 5 - 1.18 مل.

5-15-2- قابلية ربط الماء وتأثير الحموضة عليه:

قُدرت قابلية البيتاغلوكان لربط الماء ودرس تأثير الحموضة عليها كأحد عوامل التصنيع، ويبين الجدول (21) قابلية ربط الماء للبيتاغلوكان وتأثير الحموضة عليها.

الجدول (21) قابلية البيتاغلوكان لربط الماء وتأثير الحموضة عليها (مل ماء/100 غ بيتاغلوكان).

الطريقة	بدون حموضة	مع حموضة
التحلل بالبلزمة	^a 500.37 ± 15.60	^a 857.55 ± 27.50
التحلل الذاتي غير محدد الظروف	^b 121.00 ± 28.50	^b 736.39 ± 20.00
التحلل الذاتي محدد الظروف	^c 674.50 ± 25.00	^b 48.20 ± 26.77

تشير الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة 5%

يبين الجدول (21) حجم الماء المرتبط مقدراً بـ مل ماء لكل 100 غ بيتاغلوكان وتأثير ظروف التصنيع (حموضة) عليها، حيث أعطت طريقة التحلل الذاتي محدد الظروف أعلى قيمة لربط الماء وبلغت 674.50 مل/100 غ، تليها طريقة التحلل بالبلزمة وبلغت 500.37 مل/100 غ وهذا يطابق ما ذكره الباحث Thammakiti وزملاؤه عام 2003 بأن نسبة ربط الماء للبيتاغلوكان تتراوح بين 500-650 مل/100 غ بيتاغلوكان وهذا يعزى لاحتوائه على نسبة عالية من مجاميع الهيدروكسيل القادرة على تكوين روابط هيدروجينية مع الماء، في حين أعطت طريقة التحلل الذاتي غير محددة الظروف نسباً منخفضة عما ذكره الباحث حيث بلغت 121 مل/100 غ، بينما نجد أن نسبة ربط الماء ارتفعت بشكل كبير عند استبدال الماء بالمحلول الفوسفاتي الموقي pH 4 وهذه النتيجة متوقعة وذلك لزيادة عدد المجموعات القطبية من المحلول الفوسفاتي وبالتالي زيادة نسبة ربط الماء عن طريق الروابط الهيدروجينية حيث أعطت طريقة التحلل بالبلزمة نسبة 857.55 مل/100 غ، تليها طريقتي التحلل الذاتي محدد وغير محدد الظروف حيث بلغت نسبة ربط الماء 748.20، 736.39 مل/100 غ على التوالي، وهذه النسب تتوافق مع ما ذكره الباحث No وزملاؤه عام 2000 أن نسبة ربط الماء تتراوح بين 650 - 740 مل / 100 غ.

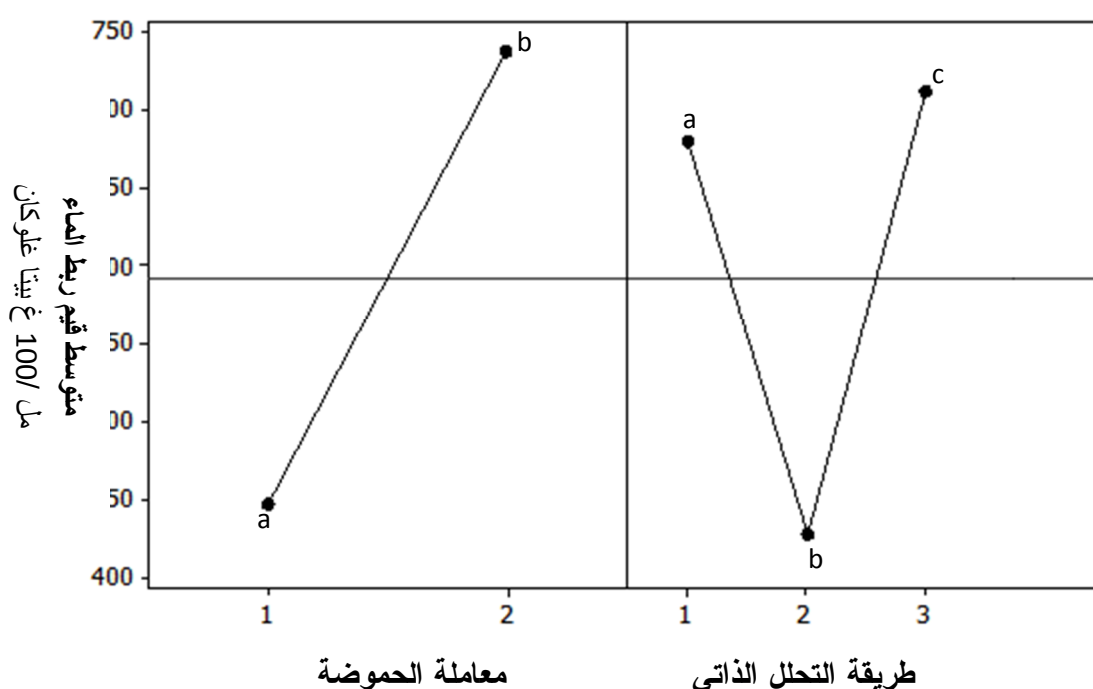
5-15-3- تأثير طريقة التحلل الذاتي والحموضة في قيم ربط الماء:

أجري التحليل الاحصائي لنتائج قيم ربط الماء لمعرفة مدى تأثير طرائق التحلل المستخدمة والحموضة في قيم ربط الماء، ويبين الجدول (22) تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة فيقيم ربط الماء، ولتحديد الفروق المعنوية بين متوسطات قيم ربط الماء المتحصل عليها نتيجة تطبيق طرائق تحلل مختلفة، ويبين الشكل (18) تأثير طريقة التحلل والحموضة في قيم ربط الماء.

الجدول (22) تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة فيقيم ربط الماء.

المصدر	درجة الحرية	التباين (MS)	التباين %	p
المكررات	2	1146	0.18	0.937
الحموضة	1	501126	80.74	0
طرائق التحلل	2	100741	16.23	0.007

يبين الجدول (22) أن الحموضة هي العامل الرئيسي المؤثر في قيم ربط الماء المتحصل عليها حيث أنه حوالي 80% من التباين في قيم ربط الماء ناتج عن متغير الحموضة، كما يبين وجود فروق معنوية بشكل عام بين طرائق التحلل والحموضة.



طريقة التحلل الذاتي: 1- التحلل بالبلزمة 2- التحلل الذاتي غير محدد الظروف 3- التحلل الذاتي محدد الظروف.

معاملة الحموضة: 1- بدون حموضة 2- مع حموضة.

الشكل (18) تأثير طريقة التحلل الذاتي والحموضة في قيم ربط الماء.

يبين الشكل (18) وجود فروق معنوية بين متوسطات قيم ربط الماء، حيث تفوقت طريقتي التحلل بالبلزمة والتحلل الذاتي محدد الظروف على الطريقة الثالثة، ويلاحظ أن المعاملة الحمضية زادت من قدرة البيتاغلوكان على ربط الماء حيث يلاحظ وجود فرق معنوي واضح بين قيم ربط الماء عند المعاملة بالحمض.

5-15-4- تشكيل وثبات الرغوة تحت تأثير ظروف التصنيع:

قدرت قابلية البيتاغلوكان على تشكيل الرغوة ومدة ثباتيتها وتأثير ظروف التصنيع فيها، ومقارنتها مع الشاهد حيث كان حجم الرغوة فيه 6 مل بدون تطبيق معاملات التصنيع المختلفة، ويبين الجدول (23) حجم الرغوة المتشكلة وتأثير معاملات التصنيع فيها.

الجدول (23) حجم الرغوة المتشكلة وتأثير معاملات التصنيع فيها (مل).

الطريقة	معاملات التصنيع					
	بدون معاملة	إضافة الحمض	بعد 15 د	95 م بدون خض	مع خض	تبريد 15 د
التحلل بالبلزمة	9.5 ± 0.3^a	7 ± 0.1^a	6.25 ± 0.3^a	1.00 ± 0.1^a	6.00 ± 0.3^b	5.00 ± 0.8^a
التحلل الذاتي غير محدد الظروف	8.5 ± 0.3^b	7 ± 0.3^a	3.00 ± 0.1^c	1.00 ± 0.1^a	7.5 ± 0.3^a	1.00 ± 0.2^b
التحلل الذاتي محدد الظروف	8.5 ± 0.3^b	6.75 ± 0.8^a	5.5 ± 0.3^b	1.00 ± 0.2^a	7.5 ± 0.3^a	1.00 ± 0.2^b

تشير الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة 5%

يبين الجدول (23) حجم الرغوة المتشكلة والنتيجة عن البيتاغلوكان حيث بلغت بطريقة التحلل بالبلزمة 9.5 مل وبطريقة التحلل الذاتي محدد وغير محدد الظروف 8.5 مل، بينما أعطى الشاهد حجم رغوة 6 مل وهي ناتجة عن المحلول البروتيني ألومين السيروم البقري أي أن الرغوة الناتجة عن البيتاغلوكان فقط بلغت 2.5- 3.5 مل وهي ناتجة عن وجود مجموعات هيدروفيلية وهيدروفوبية في بنية البيتاغلوكان تساعد على تشكيل الرغوة (Brennan و Cleary، 2004).

كما يبين الجدول (22) تأثير ظروف التصنيع على ثبات الرغوة حيث انخفض حجم الرغوة بشكل ضئيل عند إضافة الحمض وهذا يعود إلى منافسته على ربط المجموعات القطبية بروابط هيدروجينية، في حين انهارت الرغوة بعد 15 دقيقة ووصلت إلى حجم 6.25 مل بطريقة التحلل بالبلزمة وإلى 3 و 5.5 مل بطريقتي التحلل الذاتي غير محدد الظروف والتحلل الذاتي محدد الظروف على التوالي، كما انهارت الرغوة المتشكلة عند التسخين لدرجة حرارة 95 م° فوصلت إلى 1 مل بالطرائق الثلاثة، وهذا يعود لتفكك الروابط المسؤولة عن تشكيل الشبكة الهوائية بالتسخين وهذا يتوافق مع ما ذكره الباحث Izydorczyk وزملاؤه عام 1991 ولكن عند إعادة عملية الخض عادت الرغوة لحجمها الأول، وهذا يدل على أن التسخين لم يخرّب بنية البيتاغلوكان وإنما فكك الروابط المسؤولة عن تشكيل الرغوة، كما انهارت الرغوة عند التبريد فوصلت إلى قيمة 1 مل بطريقتي التحلل الذاتي محدد وغير محدد الظروف بينما حافظت على قيمة 5 مل بطريقة التحلل بالبلزمة، ولكن عند إعادة عملية الخض

عادت الرغبة لحجمها الأول فبلغت قيمة 6، 2، 5 مل بكل من طريقة التحلل بالبلزمة، التحلل الذاتي غير محدد الظروف ومحدد الظروف على التوالي، وهذا يدل على أن التبريد لم يخرب بنية البيتاغلوكان وإنما فكك الروابط المسؤولة عن تشكيل الرغبة.

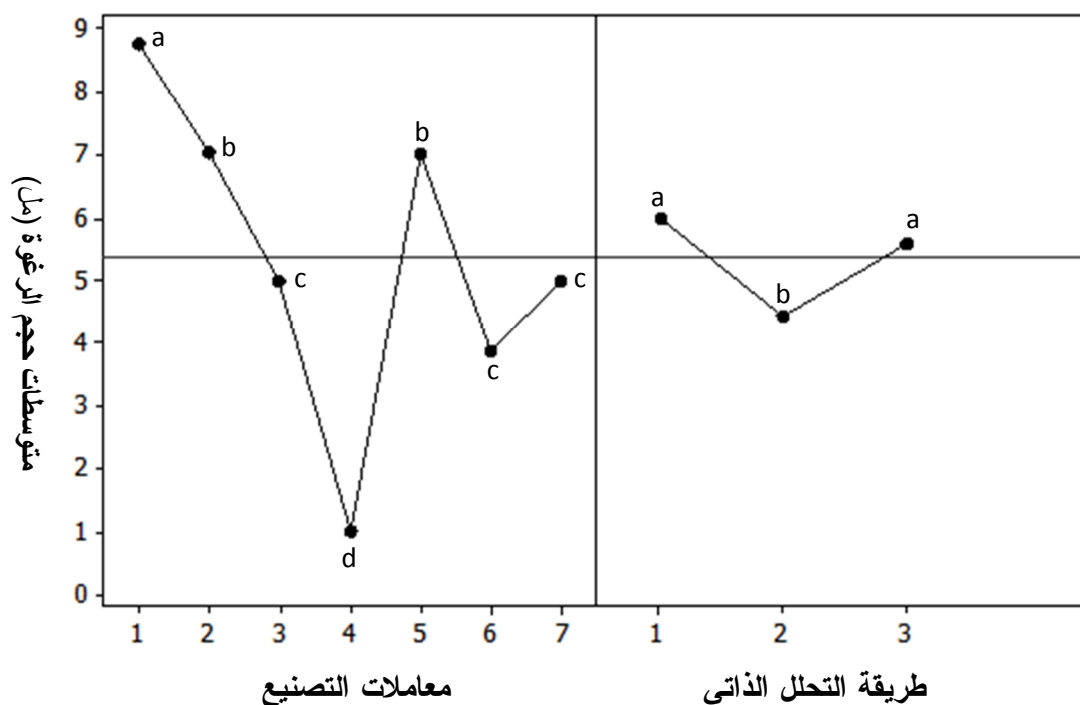
5-15-5- تأثير طريقة التحلل الذاتي ومعاملات التصنيع في حجم الرغبة:

أجري التحليل الإحصائي لنتائج حجم الرغبة لمعرفة مدى تأثير طرائق التحلل الذاتي المستخدمة ومعاملات التصنيع في حجم الرغبة، ويبين الجدول (24) تحليل التباين لتأثير متغيري طرائق التحلل الذاتي ومعاملات التصنيع في حجم الرغبة، ولتحديد الفروق المعنوية بين قيم متوسطات حجم الرغبة المتحصل عليها نتيجة تطبيق طرائق تحلل ذاتي ومعاملات تصنيع مختلفة، ويبين الشكل (19) تأثير طريقة التحلل الذاتي ومعاملات التصنيع في حجم الرغبة.

الجدول (24) تحليل التباين لتأثير متغيري طرائق التحلل الذاتي ومعاملات التصنيع في حجم الرغبة.

المصدر	درجة الحرية	التباين (MS)	التباين %	p
المكررات	2	0.358	0.41	0.67
معاملات التصنيع	6	76.405	87.82	0
طرائق التحلل الذاتي	2	9.35	10.75	0

يبين الجدول (24) أن معاملات التصنيع المختلفة هي العامل الرئيس المؤثر في حجم الرغبة المتحصل عليها حيث أنه حوالي 87% من التباين في حجم الرغبة ناتج عن متغير معاملات التصنيع، كما يبين وجود فروق معنوية بشكل عام بين طرائق التحلل الذاتي ومعاملات التصنيع المطبقة.



طريقة التحلل الذاتي: 1- التحلل بالبلزمة. 2- التحلل الذاتي غير محدد الظروف. 3- التحلل الذاتي محدد الظروف. معاملات التصنيع: 1- بدون معاملة. 2- إضافة حمض. 3- بعد 15د. 4- 95م° بدون خض. 5- 95م° مع خض. 6- تبريد 15د. 7- مع خض.

الشكل (19) تأثير طريقة التحلل الذاتي ومعاملات التصنيع في حجم الرغوة (مل).

يبين الشكل (19) تأثير طريقة التحلل الذاتي ومعاملات التصنيع المختلفة في حجم الرغوة حيث يلاحظ وجود فروق معنوية بين متوسطات حجم الرغوة المتحصل عليها عند تطبيق معاملات تصنيع مختلفة، ويلاحظ أن أعلى قيمة للرغوة كانت عند عدم تطبيق أي معاملة تصنيع وأقلها عند تطبيق معاملة حرارية (95 م°) في حين أثرت عملية المعاملة الحمضية بشكل معنوي في حجم الرغوة المتحصل عليها.

6- الاستنتاجات:

- 1- تفوقت معاملة الاستخلاص 2/1/5:1 (ساعة N/قلوي/ غ جدار خميرة: مل قلوي) بطريقة التحلل الذاتي محدد الظروف بنسبة البيتاغلوكان .
- 2- - بلغت أعلى نسبة لـ β -D(1-6) Glucan في طريقة التحلل الذاتي المعدل وعند تطبيق المعاملة 2/2/2:1 .
- 3- أعطت طريقة التحلل الذاتي غير محدد الظروف أقل نسبة بروتين، بينما بلغت أعلى نسبة للغلايوجين المقدر أنزيمياً بطريقة التحلل الذاتي المعدل.
- 4- أبدى البيتاغلوكان المستخلص بطريقة التحلل الذاتي محدد الظروف أعلى قابلية لربط الدهن والماء .
- 5- أثرت عملية البسترة سلباً على خاصية ربط الدهن للبيتاغلوكان بينما زادت المعاملة الحامضية من قابلية البيتاغلوكان لربط الماء بشكل ملحوظ.
- 6- أعطى البيتاغلوكان نسبة تكوين رغوة عالية وأدت إضافة الحمض لانخفاض هذه النسبة قليلاً، كما أثرت معاملتي التسخين والتبريد سلباً على ثباتية الرغوة وأدت لانخفاضها بدرجة كبيرة.

7- المقترحات:

- 1- الاستفادة من مخلفات الإنتاج الزراعي كالشعير والشوفان وكوالح الذرة لاستخلاص البيتاغلوكان الذواب في الماء ومقارنتها مع مصادر البيتاغلوكان من الخميرة.
- 2- دراسة الفرق بين البيتاغلوكان الذواب وغير الذواب في الماء من حيث الصفات الفيزيائية والوظيفية والتطبيقات الصناعية.
- 3- تنقية البيتاغلوكان باستخدام أعمدة كروماتوغرافية ودراسة الفرق بين البيتاغلوكان المنقى جزئياً وكلياً.
- 4- إجراء دراسة صيدلانية لمعرفة الفرق في تأثير البيتاغلوكان الذواب وغير ذواب في الماء على تعزيز جهاز المناعة.

8-المراجع العربية:

1. الطائي مكارم علي موسى والليثي شذى عبد الله، (2012)، استخلاص البيتأ غلوكان من نخالة الشعير وتقويم بعض صفاته الوظيفية وتقدير وزنه الجزيئي، مجلة العلوم الزراعية العراقية، 43(2) : 100-108.
2. محمد محمد والخياط حمادة غسان، (2000)، كيمياء مكونات الأغذية، جامعة دمشق، الطبعة الثانية.

9-المراجع الأجنبية :

- AACC. 2001. The definition of dietary fibre. *Cereal Foods World*. 46:112-119.
- Adamisch B, Karner F and Hampel W. 2003. Proteolytic activity of a yeast cell wall lytic *Arthrobacter* species. *Letters in Appl Microbiol*. 36, 227–235.
- Aimaniada V, Clavaud C, Fontaine T, Delepierre M and Latage J.P. 2009. Cell wall (1→6)- β -D-glucan of *Saccharomyces cerevisiae* structural characterization and in situ synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 284, 13401-13412.
- Akalpita U.A and Narayan B.P. 2002. Glycogen—a covalently linked component of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and biotechnology*. 23(2), 212-225.
- Aman P, Rimsten L and Andersson R. 2004. Molecular weight distribution of β -glucan in oat-based foods. *The Journal of Cereal Chemistry*. 81(3), 356-360.
- Amaral A.E, Carbonero E.R and Simao R.C. 2008. An unusual water-soluble β -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. *The Journal of Carbohydrate Polymers*. 72 (3), 473-478.
- Andlauer W and Furst P. 2002. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook *Food Research International*. 35: 171–176.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC..
- Bacic A, Fincher G.B and Stone B.A. 2009. Chemistry, biochemistry and biology of 1–3 Beta Glucans and related polysaccharides. Academic Press, Burlington, San Diego, London, New York. Pp: 5-13.
- Bahl A.K, Vercellotti S.V, Vercellotti J.R and Klein E. 2009. Methods of purifying beta-glucans. US Patent 7550584.
- Beier R and Gebert A. 1998. Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches. *Am J Physiol*. 1,130-137.
- Bhatty R.S. 1997. Laboratory and pilot plant extraction and purification of beta-glucans from hull-less barley and oat brans. *Journal of Cereal Science*. 22: 163–170.
- Bohn J.A and Be Miller J.N. 1995. (1,3)- β -Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *The Journal of Carbohydrate Polymers*. 28, 3–14.

- Boonraeng S, Foo-Trakul P, Kanlayakrit W and Chetanachitra C. 2000. Effects 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.
- Breddam, M. and Beenfeldt T. 2005. Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes. *Appl. Microbiol. Biotech.* 35, 323-329.
- Brennan C and Cleary L. 2004. The influence of a (1→3)(1→4)-β-D-glucan rich fraction from barley on the physico-chemical properties and in vitro reducing sugars release of durum wheat pasta. *Int J Food Sci Technol.* 41(8), 910-918.
- Buliga G.S, Brandt D.A and Fincher G.B. 2004. The sequence statistics and solution conformation of a barley (1, 3,1,4)-β -D-glucan. *Carbohydrate Research.* 157(1), 139–156.
- Butt M.S., Tahir-NadeemM., Khan M.K., Shabir R and Butt M.S. 2008. Oat: unique among the cereals. *European Journal of Nutrition.* 47:79–68.
- Cai W., Gu X and Tang J. 2008. Extraction, purification and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta*. *The Journal of Carbohydrate Polymers.* 71 (3), 403-410.
- Charalampopoulos D, Wang R, Pandella S.S and Webb C. 2002. Application of cereals and cereal components in functional food: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 79:131–141.
- Cho S.S and Drener L.M. 2003. Hand book of dietary fiber. Marcel Dekker. Inc. Newyork, Basel. 195-197.
- Covadonga, R., Arias, K., Lorrie, M. & Renee, M., 2002. Yeast species associated with orange juice : Evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology Journal.*, 68, 1955-1961
- CuiS.W. 2001. Polysaccharides gums from agricultural products: Processing, structure and functionality. Lancaster, USA: Technomic Publishing Company Inc.
- Dake S. M, Khetmalas B .M and Amarapurkar V.S. 2011. Role of insoluble glycogen in ethanol adaptation mechanism of *Saccharomyces italicus*. *Indian Journal of Science and Technology.* 4, 120-125.

- Das A. 2010. (1,6)-beta-glucan from a somatic hybrid of *Pleurotus florida* and *Volvarella volvacea*: isolation, characterization, and study of immunoenhancing properties. Carbohydrate research. 345: 974–978.
- Demirbas A. 2005. β -Glucan and mineral nutrient contents of cereals grown in Turkey. Food Chemistry. 90: 773–777.
- Dikit P, Maneerat S, Musikasang H and H-kittikun A. 2010. Emulsifier properties of the mannoprotein extract from yeast isolated from sugar palm wine .Science Asia. 36, 312–318.
- Eastwood M.A, Morris E.R. 1992. Physical properties of dietary fibre that influence physiological function: a model for polymers along the gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr. 55: 436–442.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2011. Scientific Opinion on the safety of ‘yeast beta-glucans’ as a Novel Food ingredient .EFSA Journal. 9(5), 2137 . pp.22.
- Erten H and Tangüler H. 2009. The Effect of Different Temperatures on autolysis of baker’s yeast for the production of yeast extract. Turk J Agric For 33, 149-154.
- Gajdošová A, Petrušáková Z, Havrlentová M, Červená V, Hozová B, Šturdík E and Kogan G .2007. Thecontent of water-soluble and water-insoluble β -d-glucans in selected oats and barley varieties. Carbohydrate Polymers. 70:46–52.
- Guo H, Yi W, Song J.K, Wang P.G. 2008. Current understanding on biosynthesis of microbial polysaccharides. Curr Top Med Chem 8 (2): 141–51.
- Hayashi R., Moore S, and Stein W.H. 1991. Carboxy peptidase from yeast. The J. of Biol. Chem. 248 (7), 2296 - 2302.
- Hayen D.G and Pollmann D.S. 2001 Animal feeds comprising yeast glucan. US Patent 6214337.
- Herbert D, Phipps D.J and Strange R.E. 2000.Chemical analysis of microbial cells, In Methods in Microbiology vol. 5.Academic Press, London. Pp 265-302.
- Holtekjølén A.K, Uhlen A.K, Brathén E.S, Sahlström S and Knutsen S.H. 2006. Contents of starch and non-starch polysaccharides in barley varieties of different origin. Food Chemistry. 94:348–358.
- Hong F, Yan J, Baran J.T, Allendorf, D J.; Hansen, R.D., Ostroff, G.R; Xing, P X and Cheung, N. 2004. Mechanism by which orally administered b-1,3

- glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J Immunol.* 173(2), 797-806.
- Huang G. 2008. Extraction of Two Active Polysaccharides from the Yeast Cell Wall. *Biopolymers.* 32, 156-167.
- Hunter K.W.Jr., Gault R.A., Berner M.D. 2002. Preparation of microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Letters in Applied Microbiology.* 35: 267-271.
- Izydorczyk, M. Biliaderis C.G and Bustuk W. 1991. Physical properties of water – soluble pentosans from different wheat varieties. *Cereal Chem.* 68 (2) : 145-150.
- James C.S. 1998. *Analatical Chemistry of Food.* Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA. 1th, p: 32-55.
- Javmen A, Grigiškis S and Gliubutė R. 2012. β -glucan extraction from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using *Actinomyces rutgersensis* 88 yeast lyzing enzymatic complex. *BIOLOGIJA.* 58(2), 51–59.
- Johansson, L. 2006. Structural analyses of (1→3),(1→4)- β -D-glucan of oats and barley (dissertation). EKT series 1354. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology. p85.
- Kalinga D and Mishra V.K. 2009. Rheological and physical properties of low fat cake sproduced by addition of cereal beta-glucan concentrates. *Journal of Food Processing Preservation.* 33 , 384-400.
- 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, Mol P, Hellingwerf K and Brul S. 2002. Dynamic of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews.* 26, 239–256
- Kopecka M and Kreger D.R. 2000. Assembly of micro fibrils in vivo and in vitro from 1-3 β -D-glucan synthesized by protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* 143:387–395.
- Kwang S.K, Yun S.H. 2006. Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology.* 496–500.
- Lazaridou A and Biliaderis C.G. 2007. Molecular aspectsof cereal beta-glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *Journal of Cereal Science.* 46, 101–118.
- Lazaridou A, Biliaderis C, and Izydorczk M. 2003. Molecular size effect on rheological properties of oat B-glucans in solution and gels. *Food Hydrocolloids.* 17, 693-712.

- Lazaridou A, Biliaderis G, Micha-Screttas M and Steele B. R. 2004. A comparative study on structure-function relations of mixed-linkage (1→3),(1→4)linear β -D-glucans. *Food Hydrocolloids*. 18, 837–855.
- Lazaridou A, Duta A, Belc N, and Biliaderis C. 2007. Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten free formulations. *J. Food Eng.* 79, 1033-1047.
- Lee J.N, Lee D.Y, Ji, I.H. Kim G.E, Kim H.N and Sohn J.W. 2001. Purification of soluble β -glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 65(4), 837–841.
- Lee S, Inglett G. E, Palmquist D and Warner K. 2009. Flavor and texture attributes of food containing β -glucan-rich hydrocolloids from oats. *LWT–Food Science and Technology*. 42,350–357.
- Liu S, Buring J.E, Sesso H.D, Rimm E.B, Willett W.C and Manson J.E. 2005. A prospective study of dietary fiber intake and risk of cardiovascular disease among women. *Journal of the American College of Cardiology*. 70, 613–619.
- Manners D.J, Masson A.J and Patterson J.C. 2001. The structure of a β 1,3-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.
- Mason.R. 2011. What is Beta Glucan. Safe Goods. 561 Shunpike Road. Sheffield: MA 01257. USA. 3th,p:9-25.
- McCarthy T, Hanniffy O, Lalor E, Savage A.V and Tuohy M.G. 2005. Evaluation of three thermostable fungal endo- β -glucanases from *Talaromyces emersonii* for brewing and food applications .*Process Biochemistry*. 40, 1741-1748.
- McCleary B.V and Codd R. 1991. Measurement of (1→3),(1→4)- β -D-glucan in barley and oats: A streamlined enzymic procedure. *J. Sci Food Agric*. 55, 303-312.
- Mcnamara M.A, Mageau P. R.1998. Microbiology Laboratory Guidebook. United States Department Of Agriculture. Food Safety And Inspection Service.Office Of Public Health And Science Microbiology Division. 3rd Ed, Vol1 & 2.
- Menaga D, Dhandapani R, Rajakumar S and Ayyasamy P.M. 2012. Beta-Glucans: A New Source For Human Welfare. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. 3 (1), 1-14.

- Michaud H.P and Larroche C. 2007. New developments and properties for - (1,3)-glucans. Recent Pat. Biotechnol. 1, 59–73.
- Miller G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. Analit Chem. 31(3): 426–428.
- Muller A, Ensley H, McNamee R, Jones E, McLaughlin E, Chandley W, Browder W, Lowman D and Williams D. 1997. The application of various protic acids to the extraction of 1-3 β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydr Res. 299, 203–208.
- Murashima K, Nishimura T, Nakamura Y, Koga J, Moriya T, Sumida N, Yaguchi T and Kono T. 2002. Purification and characterization of new endo-1,4- β -D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. Enzyme and Microbial Technology. 30, 319-326.
- Muthuvelayudham. R and viruthagiri.T. 2010. Application of central composite design based response surface methodology in parameter optimization and on cellulose production using agricultural waste. International Journal of Chemical and Biological Engineering. 3, 97-104.
- Nagodawithana T. 2005. Disruption of yeast cell wall and its byproducts . Food Technol. 46, 138-145.
- No H.K, K.S. Lee. and S.P. Meyers, 2000 . Correlation between physicochemical characteristics and binding capacities of chitosan products. J. Food Sci., 65 (7).
- Oliveira A.M and Pedro N. 2011. Improvement in RNA Extraction from *S. cerevisiae* by optimization in the autolysis and NH₃ hydrolysis. Journal of Biology and Technology. 54, (5), 1007-1018.
- Pattersen R.C and Schwandt V.H. 1991. Wood sugar analysis by anion chromatography. J Wood Chem Technol. 11, 495-501.
- Pecka M, Phaff J.H and Fleet G.H. 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.
- Pelizon A.C, Kaneno R, Soares A, Meira D and Sartori A. 2005. Immunomodulatory Activities Associated with β -Glucan Derived from *Saccharomyces cerevisiae*. Physiol Research. 54, 557–64.
- 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. pp. 369–412.

- Reichelt, B.Y. and Fleet G.H. 2003. Isolation properties, function and regulation of endo-(1 $\rightarrow$ 3)- β -glucanase in *Schizosaccharomyce pombe* .J. of Bacteriol. 147(3), 1085-1094.
- Rodriguez M.A, Polo M.C, Carrascosa A.V. 2001. Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. Int J Food Microbiol. 71: 45–51.
- Saito H, Yoshioka Y, Yolo M and Yamada J. 2002. Distinct gelation mechanisms between linear and branched 1-3 β -D-glucans as revealed by high resolution solid state ^{13}C NMR. Biopolymers. 29, 1689–1698.
- Santipanichwong R and Supphantharika, M. 2007. Carotenoids as colorants in reduced-fat mayonnaise containing spent brewers yeast β glucans as a fat replacer. Food Hydrocolloids. 21(4), 574-565
- Satrapai S and Supphantharika M. 2007. Influence of spent brewers yeast β -glucan on gelatinization and retrogradation of rice starch. Carbohydrate Polymers. 67 (4), 500-510.
- Sedmak J.J. 2006. Production of β -glucans and Mannans. US Patent Application Nov 23, 2006 US 2006/0263415 A1.
- Sherwood E.R, Williams D.L, McNamer R, Jones E, Browder I.W and Di Luzio N. 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
- Soga T and Serwe M. 2000. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. Food Chemistry. 69, 339-344.
- Sommer R. 1996. Yeast autolysate. The 9th International Symposium on yeast. Sydney, Australia. Pp: 82-83.
- Soukoulis C, Lebesi D and Tzia C. 2009. Enrichment of ice cream with dietary fibre: Effects on rheological properties, ice crystallization and glass transition phenomena. Food Chemistry. 115, 665–671.
- Stokke B.T, Elgsaeter A, Hara C, Kitamura S and Takeo K. 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.

- Sugimoto H. 2001. Synergistic effect of ethanol and sodium chloride on autolysis of baker's yeast for preparing food-grade yeast extract. *J. of Food Sci.* 39, 939 – 942.
- Suortti T. 1993. Size-exclusion chromatographic determination of β -glucan with post- column reaction detection. *Journal of Chromatography.* 632, 105-110.
- Supphantharika M, Khunrae P, Thanardkit P and Verduyn C. 2003. Preparation of spent brewers yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Biopolymers.* 4, 56-67
- Szymańska C.M and Bednarek D. 2007. Beta-glucans alternative antibiotic growth promoters. *J Life of the Veterinary.* 82, 842–843.
- Talaga P, Vialle S and Moreau M. 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.
- Talaro.p.k,2002, foundation in microbiology, Mc Graw Hill international, New York,6th.
- Temelli F. 2002. Extraction and functional properties of barley β -glucan as affected by temperature and pH. *J. Food Sci.* 62, 1194- 1201.
- Thammakiti S, Supphantharika M, Phaesuwan T, Verduyn C. 2004. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. *Int. J. Food Sci. Technol.* 39, 21–29.
- Tiwari U and Cummins E. 2009. Factors influencing β glucan levels and molecular weight in cereal based products. *Cereal Chemistry.* 86, 290-301.
- Tominac L, Vesna Z, Katarina B, Petra G and Zoran H. 2011. Rheological properties, water-holding and oil-binding capacities of particulate β -Glucans isolated from spent brewer's yeast by three different procedures. *Food Technol and Biotechnol.* 49 (1) 56–64.
- Tran M.T ,Duy N.Q, Minh N.P, Dao D.T. 2013. Optimization of beta-glucan extraction from waste brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* using autolysis, enzyme, ultrasonic and combined enzyme – ultrasonic treatment. *American Journal of Research Communication.* 1(11), 149-158.
- Tudorica C.M, Jones E, Kuri V and Brennan C.S. 2004. The effects of refined barley β glucan on the physico-structural properties of low-fat dairy products: curd yield, microstructure, texture and rheology. *Journal of Science of Food and Agriculture.* 84:1159–1169.

- U.S. FDA. 2007. Part 172-Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. §I 72.898-Bakers yeast glycan. In. U.S. Code of Federal Regulations (CFR). Title 21-Food and Drugs (U S Food and Drug Administration). US. Government Printing Office (GPO), Washington, DC, p 120.
- Vetvickova J and Vetvicka V. 2007. Physiological effects of different types of β -glucan. *Int. J. Food Sci.Technol.* 23,221–229.
- Vlatka P.T, Vesna Z.K, Katarina B, Petra G, Zoran H, Sinisa S and Igor S. 2010. Rheological Properties, Water-Holding and Oil-Binding Capacities of Particulate β -Glucans Isolated from Spent Brewer's Yeast by Three Different Procedures. *Journal of Food Technology and Biotechnology.* 4, 125-142.
- Volman J.J, Ramakers J.D and Plat J. 2008. Dietary modulation of immune function by E-glucans. *Physiology and 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, De Phillips P and Bracewel D. 2008. A Microscale yeast cell disruption technique for integrated process development strategies. *Biotechnol Prog.* 24: 606–614.
- Williams L, McNamee B, Pretus H, Ensley H, Browder W and Di Luzio N. 1991. Method for the solubilization of 1-3 β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Res.* 219:203–213.
- Wiwat L.A, Motonobu G, Mitsuru S, Manop S, Chirakarn M and Chattip P. 2006. Hydrothermal decomposition of yeast cells for production of proteins and amino acids. *Journal of Hazardous Materials.* B137, 1643–1648.
- Wood P.J and Weisz J. 1991. Use of Calcofluor in analysis of oat beta-D-glucan. *Cereal Chemistry.* 61, 73-79.
- Wood P.J, Siddiqui I.R, and Paton D. 2002. Extraction of high viscosity gums from Oat. *Cereal Chemistry.* 54, 524-533.
- Wylie R.J. (2002) Fat substitutes and health – An advisory from the nutrition committee of the American heart association, *Circulation*, 11, 2800–2804.
- Zeenat G.S, Narayan B.P and Eric E.S. 1999. Two pools of glycogen in *Saccharomyces*. *Journal of bacteriology.* 130 (2), 815-825.