مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية Damascus University Journal of Agricultural Sciences

المجلد 40 العدد 4 (2024): 59-69 Vo 40 No4 (2024): 59-69

إنتاج المانان من عزلات محلية من خميرة Saccharomyces cerevisiae بطريقة التحلل الذاتي

تهاني الحداد[1] أنور محمد الحاج علي[2] بسام العقلة[3]

1–طالبة دكتوراه، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

2–أستاذ، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

3–باحث، قسم التقانة الغذائية، الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وزارة التعليم العالي.

المُلخّص:

نفذ البحث في مخبر الهيئة العامة للتقانة الحيوية خلال الفترة (2019-2021) بهدف استخلاص المانان وفق طريقة التحلل الذاتي من ثلاث عزلات محلية من خميرة الخباز Saccharomyces cerevisiae (SAC1,SAC2,SAC3) والمنماة على وسطين مختلفين (SDB: Sabouraud Dextrose Broth، YEPD: peptone dextrose yeast extract)، ودراسة تأثير المعاملة الحمضية والمعاملة الحرارية في كفاءة عملية التحلل الذاتي، نميت عزلات خميرة الخباز الثلاث على وسط (YEPD) ووسط (SDB) للحصول على أعلى كتلة حيوية من الخميرة، حيث تراوحت المردودية بين 66.21 و 91.49 غ وبين 51.05 و 89.27 غ على وسط YEPD ووسط SDB على التوالي، وتفوقت العزلة (SAC1) من بين العزلات المدروسة من حيث المردودية واستخدمت بهدف الإكثار واستخلاص المانان. استخلص المانان من الخميرة وفق طريقة التحلل الذاتي ودرس تأثير درجة الحرارة (40 و55 و60) م ودرجة الحموضة (5.9 و 4.4) في كفاءة التحلل الذاتي. أظهرت نتائج التحليل الإحصائي تأثيراً معنوياً لكل من درجة الحرارة وتغير درجة الحموضة في كفاءة التحلل الذاتي والذي انعكس بمردودية عالية لكل من النسبة المئوية للبروتين والمادة الجافة الناتجة عن تحلل جدار الخميرة ($P < 0.05$). تم الحصول على أعلى مردودية من نواتج التحلل الذاتي عند درجة حرارة 60 م ودرجة حموضة 4.4. وطبقت الشروط المثلى للتحلل الذاتي لاستخلاص المانان وبلغت النسبة المئوية لكمية المانان المستخلص 81.38 و 77.78% على وسط YEPD ووسط SDB على التوالي.

الكلمات المفتاحية: خميرة الخباز, Saccharomyces Cerevisiae، المانان, التحلل الذاتي.

تاريخ الايداع:2023/1/29

تاريخ القبول: 2023/5/14

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص **CC BY-NC-SA 04**

Production of Mannan from local isolates of Saccharomyces cerevisiae by autolysis

Tahani Alhaddad[1] Anwar mohammad Alhaj Ali [2] Bassam Oklah [3]

1- PhD student, Food Science Department, Faculty of Agriculture, Damascus University.

2- Professor, Food Science Department, Faculty of Agriculture, Damascus University.

3- Researcher, Department of Food Technology, National Commission for Biotechnology, Ministry of Higher Education.

Abstract:

The research was carried out in the laboratory of the National Commission for Biotechnology during the period (2019-2021) in order to extract mannan according to the autolysis method from three local isolates of Saccharomyces cerevisiae *(*SAC1,SAC2,SAC3) grown on two different media (YEPD: peptone dextrose yeast extract, SDB: Sabouraud Dextrose Broth), and studying the effect of acid treatment and heat treatment on the efficiency of the autolysis process. The three baker's yeast isolates were grown on YEPD medium and SDB medium to obtain the highest biomass of yeast where the yield ranged between 66.21 and 91.49 g and between 51.05 and 89.27 g on YEPD medium and SDB medium, respectively, and the isolate (SAC1) outperformed among the studied samples in terms of cost-effectiveness and was used for the purpose of multiplication and extracting mannan from it. Mannan was extracted from yeast according to the autolysis method, and the effect of temperature (40, 55 and 60) C and pH (5.9 and 4.4) on the efficiency of autolysis was studied. Statistical analysis showed a significant effect of temperature and pH change on the autolysis efficiency, which was reflected in a high yield of the percentage of protein and the resulting dry matter on the decomposition of the yeast wall ($P < 0.05$). The highest yields were obtained from the autolysis products at 60°C and pH 4.4. The optimum conditions for autolysis were applied to extract mannan, and the percentage of extracted mannan was 81.38 and 77.78% on YEPD medium and SDB medium, respectively.

Key Words: Baker's Yeast, Saccharomyces Cerevisiae, Mannan, Autolytic.

Received: 29/1/2023
Accepted: 14/5/2023

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

1-المقدمة: Introduction

تصنف خميرة الخباز بأنها فطر وحيد الخلية من حقيقات النواة، وتنمو الخميرة بشكل أمثل عند الدرجة 30°م، وضمن مدى معين من الرقم الهيدروجيني (3.5– 6)، ويمكنها النمو بوجود أو غياب الأوكسجين إلا أنها في الظروف اللاهوائية تكون سرعة نموها أقل (Montes *et al*.,2016,4)، وأظهرت نتائج التحليل الكيميائي أن الجدار الخلوي لخميرة الخباز يتكون من طبقتين وهي الداخلية التي تعطي الجدار الخلوي القوة والمتانة وتتكون من البيتا غلوكان الذي يشكل معقداً مع الكيتين، والخارجية تتكون من المانان ويحدد أغلب مواصفات الخلية السطحية، ويرتبط تساهمياً مع طبقة الغلوكان الداخلية (Aghooi *et al*.,2014,974)، يشكل المانان الطبقة الخارجية للجدار الخلوي لخميرة الخبار ويكون بشكل بروتين سكري، ويتكون بشكل رئيسي من D-mannose (95%) مرتبطة مع بروتين بنسبة 3–5% وفوسفات 1–2% ويطلق على هذا المركب اسم المانوبروتين الفوسفاتي، ويرتبط المانان مع البروتين بأواصر غلايكوسيدية وهذا الارتباط لا يمكن أن ينفصل إلا عند المعاملة القوية للجدار الخلوي بالقاعدة أو التسخين (شكل 1).

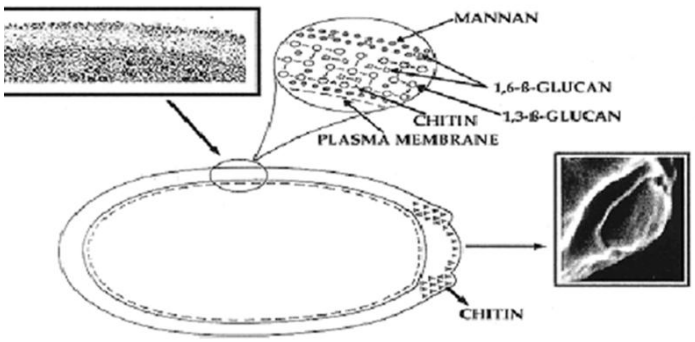
تتصف المانانات بكونها غير سامة ومستضدات ضعيفة مما دفع إلى استخدامها في العديد من المجالات الطبية والغذائية، يبلغ معدل الوزن الجزيئي للمانان (100–200) كيلو دالتون، ويتصف بكونه مسحوق أبيض عديم الرائحة أو يكون بشكل محلول غروي أصفر اللون، ويمتاز بكونه ذواب بالماء بسهولة وغير ذواب في الايثانول، ولا يتأثر بالحرارة العالية والتغير بالرقم الهيدروجيني (Harbah *et al*.,2021,59).

يتواجد المانان بشكل واسع في الطبيعة، وتعد الخمائر من أكثر الكائنات شيوعاً في إنتاج المانان، حيث تصل نسبته إلى 50% من الوزن الجاف للجدار الخلوي، كما ويتواجد في بعض أنواع من الكائنات المجهرية مثل البكتريا والفطريات والطحالب، إضافة لوجوده في كائنات غير مجهرية كبعض أنواع النباتات (AlEqabi,2009,5)، وأهم الخمائر المحتوية على المانان في تركيبها:

Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces rosei, Saccharomyces carlsbergensis Candida albicans, Candida utilis, Candida cloacae , Hansenula wingei.

(Henry *et al*.,2016,1881)

تعد طريقة التحلل الذاتي إحدى طرق استخلاص المانان من خميرة الخباز، والتي تتم بفعل الأنزيمات (البروتيناز والغلوكوناز) التي تعمل على تحطيم الجدار الخلوي وإطلاق البروتينات المانوية من الخميرة (Alexandre & Guilloux-120 Benatier,2006,. وهي عملية اقتصادية ومع ذلك، هناك خطر دائم من التلوث الجرثومي لوجود العديد من العناصر الغذائية ولكون هذه العملية بطيئة، لصالح نمو مسببات الأمراض. يأتي العمل الحالي بمحاولة لتسريع التحلل الذاتي مع التركيز على الإنتاجية العالية لإنتاج مستخلص المانان من خلال عملية سريعة واقتصادية وتقنية بسيطة، حيث تعتمد الاستراتيجية المقترحة على التحكم بالرقم الهيدروجيني لتحفيز الخميرة في البداية على التحلل الذاتي من خلال صدمة حمضية لتنشيط نظام التحلل الذاتي للخلية في ظروف محددة من الحرارة ودرجة الحموضة. ويمكن ملاحظة أن الوقت مهم جدًا للإنتاجية وكذلك لتجنب المخاطر من التلوث الممرض في التحلل الذاتي (Alves *et al*.,2021,1).



(الشكل 1) الجدار الخلوي لخميرة *S. cerevisiae* (Cid *et al.*,1995,349)

مبررات وأهداف العمل:

نظراً للأهمية الاقتصادية والطبية للمانان، وإمكانية استخدامه في العديد من التطبيقات وخاصة كمكثف بيولوجي طبيعي، ولقلة الأبحاث التي تناولت إنتاجه على المستوى الاقتصادي وتحديد الظروف الفيزيائية والكيميائية المثلى لإنتاجه وزيادة نسبته من خلايا الخميرة. لذلك هدف هذا البحث بمحاولة لتسريع التحلل الذاتي للخميرة مع التركيز على الإنتاجية العالية لمستخلص المانان من خلال عملية سريعة واقتصادية وتقنية بسيطة تعتمد على التحكم بالرقم الهيدروجيني لتحفيز الخميرة في البداية على التحلل الذاتي من خلال صدمة حمضية لتنشيط نظام التحلل الذاتي للخلية في ظروف محددة من الحرارة ودرجة الحموضة. ويمكن ملاحظة أن الوقت مهم جدًا للإنتاجية وكذلك لتجنب المخاطر من التلوث الممرض في التحلل الذاتي، والتي تعتمد الإستراتيجية المقترحة على تنمية عزلات محلية من خميرة الخباز *Saccharomyces cerevisiae* المتواجدة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وتحديد العزلة الأفضل من حيث مردودية الكتلة الحيوية. دراسة تأثير المعاملة الحمضية والمعاملة الحرارية على كفاءة عملية التحلل الذاتي للخميرة وبالتالي على انتاج المانان. واستخلاص المانان من العزلة الأفضل بطريقة التحلل الذاتي وفق الشروط الأمثل من حيث درجة الحرارة ورقم الحموضة.

2-المواد وطرائق البحث: Materials & Methods

2-1- الأجهزة المستخدمة:

غرفة العزل (JSCB، اليابان)، مثقلة طرد مركزي (Hettich, ألمانيا)، فرن تجفيف (jSR، اليابان)، مسخن بمحرك مغناطيسي (AREC,أمريكا)، جهاز تقطير الماء (Milli-Q, فرنسا)، حاضنة (Lab Tech، كوريا)، حاضنة هزازة (jSR، اليابان)، مقياس pH (Precisa,سويسرا)، مازج دوار (VELP، إيطاليا)، أوتوغلاف (jSR، اليابان).

2-2-المواد المستخدمة:

1- المـواد الكيميائيـة: حمـض كلـور المـاء، حمـض الكبريـت، هيدروكسـيد الصـوديوم، ايتـانول مطلـق، محلـول فوسـفات مـوقي، محلول tris buffer، محلول سترات موقي، محلول دارئ الفوسفات الملحي، كلوريد الحديدي، كلوريد الصوديوم، غلوكوز، ببتون، مستخلص الخميرة (sigma, ألمانيا).

2- الأوساط الزرعيـة: وسط آغار دكستروز البطاطا PDA، وسط (مستخلص الخميرة، ببتون، غلوكوز)، وسط مستخلص مولت الآغار، وسط الآغار المغذي (NA), وسط المرق المغذي (NB) (sigma, ألمانيا).

2-3- طرائق البحث:

1- سلالات خميرة Saccharomyces cerevisiae: استخدمت ثلاث سلالات من Saccharomyces cerevisiae (SAC1,SAC2,SAC3) المصنفة والموجودة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

2- الغربلة:

قورنت سلالات Saccharomyces cerevisiae المحلية المعزولة واختير أفضلها من حيث الكتلة الحيوية لإنتاج المانان، باستخدام الوسط السائل (مستخلص الخميرة، ببتون، غلوكوز) واستخلص المانان من الكتلة الحيوية الناتجة باستخدام طريقة التحلل الذاتي وفق الشروط الأمثل من حيث درجة الحرارة ودرجة الحموضة (Alves *et al*.,2021,5).

3- طرائق التحليل: Methods of Analysis

أجري البحث في مخابر التقانات الحيوية في الهيئة العامة للتقانات الحيوية – كلية الزراعة، وذلك في الفترة الممتدة بين عامي (2019-2021).

3-1- استخدمت عزلات محلية من خميرة الخباز Saccharomyces cerevisiae المتواجدة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وهي عبارة عن 3 عزلات ورمزت كالتالي (SAC1,SAC2,SAC3)، وتم الاحتفاظ وتنشيط الخميرة باستخدام وسط Malt Agar ووسط Dextrose Potat Agar، كما نميت عزلات الخميرة الثلاث في الوسطين المختارين (peptone dextrose yeast extract :YEPD) ووسط (SDB: Sabouraud Dextrose Broth)، بهدف الحصول على كتلة حيوية كافية لاستخلاص المانان منها وفق عملية التحلل الذاتي بعد تحديد درجة الحرارة والحموضة الأمثل للاستخلاص، بهدف المقارنة من الأفضل من حيث مردودية المانان المستخلص. وفق ما يلي:

1- تنمية الخميرة وحساب الكتلة الحيوية:

حضر وسطين لتنمية الخميرة: وسط YEPD (peptone dextrose yeast extract) ووسط SDB Sabouraud Dextrose (Broth). بعد تحضير الأوساط لقحت بالعزلات الثلاث، وحضنت في حاضنة هزازة على الدرجة 30 م وبسرعة 100 دورة /دقيقة. بعدها ثفلت الخميرة بالشروط التالية: السرعة 1000د/د وحرارة الجو المحيط 25 م وزمن 15 دقيقة.... وأعيد التثفيل أكثر من مرة نظراً لكبر حجم الكتلة المثفلة حتى نقاوة السائل الطافي، ثم حسبت الكتلة الحيوية الناتجة من كل عينة خميرة في كلا الوسطين.

2-دراسة تأثير درجة الحرارة ودرجة الحموضة على كفاءة عملية التحلل الذاتي:

درس تأثير درجة الحرارة ودرجة الحموضة على كفاءة عملية التحلل الذاتي من خلال قياس البروتين والمواد الصلبة الكلية لناتج التحلل الذاتي، بوزن حوالي 50 غ من الخميرة الرطبة للعزلة التي أعطت أفضل نتائج من حيث الكتلة الحيوية، وأجري التحلل الذاتي لها وفقًا للجدول (1) لمدة 60 دقيقة مع التحريك، وتم إجراء 3 مكررات من التحلل الذاتي في نفس الوقت وظروف درجة الحرارة، كما حضر الشاهد بدون إضافة الحمض، وأجري التحلل الذاتي لها بإضافة 100 مل من الماء المقطر وإضافة H2SO4 98% للوصول إلى درجة حموضة نهائية 4.4 وعند درجات حرارة مختلفة (40,55,60) م. بعد 60 دقيقة من التفاعل مع التحريك تم إجراء الطرد المركزي للعينات، وأخذ الراسب الذي يمثل ناتج التحلل الذاتي للخميرةً، من أجل تقييم تأثير رقم الحموضة ودرجة الحرارة خلال وقت التحلل الذاتي، من خلال دراسة البروتين الكلي المستخلص باستخدام طريقة كلداهل، وتقدير المواد الصلبة عن طريق تجفيف ناتج تحلل الخميرة المستخلصة عند 105 درجة مئوية حتى ثبات الوزن وفقًا لطريقة (AOAC, 2000)

الجدول (1): يوضح تأثير رقم الحموضة ودرجة الحرارة لمدة 60 دقيقة في التحلل الذاتي للخميرة

وزن الخميرة غ	كمية الماء المضاف مل	درجة الحرارة م	رقم الpH
50	100	40	5.9
50	100	40	4.4
50	100	55	5.9
50	100	55	4.4
50	100	60	5.9
50	100	60	4.4

3 – طريقة التحلل الذاتي للخميرة المعدلة:

وزن 50 غ من الخميرة الرطبة للعزلة الأفضل من حيث مردودية الكتلة الحيوية ليتم إجراء التحلل الذاتي لها وفق المعاملة الحرارية والحمضية الأمثل ويتم استخلاص المانان منها، حيث أضيف 100 مل من الماء المقطر لها مع التحريك، كما أضيف H2SO4 98% للوصول إلى درجة الحموضة الأمثل وباستخدام درجة الحرارة الأفضل أجري التفاعل لمدة 60 دقيقة مع التحريك، تم إجراء الطرد المركزي للعينات، وأخذ الراسب الذي يمثل ناتج التحلل الذاتي للخميرة ليتم استخلاص المانان منه.

4- استخلاص المانان من الكتلة الحيوية الناتجة:

استخلص المانان من 50 غ من ناتج التحلل الذاتي لخميرة الخباز بطريقة التحلل الذاتي المعدلة، حيث أعيد تعليق الراسب الناتج سابقاً في 50 مل من 1.5 NaOH نظامي، وسخن مع التحريك بدرجة حرارة 80 مْ لمدة 60 دقيقة ، ثم ثفلت العينات بالطرد المركزي بسرعة 3500 د/د لمدة 15 دقيقة، وتم الاحتفاظ بالطافي وأعيد على الراسب خطوات الاستخلاص مرة ثانية، وجمع الطافي الناتج عن الاستخلاص الناتج عن المرحلتين واهمل الراسب. عدل الرقم الهيدروجيني بعدها إلى 7 باستخدام HCL، ثم

وضع في حمام مائي على الدرجة 100 م لمدة 20 دقيقة، تم بعدها التثفيل بالطرد المركزي بسرعة 3500 د/د لمدة 15 دقيقة، أهمل الراسب وأضيف للطافي 10 أحجامه من الايتانول، وترك لمدة 60 دقيقة. تم التثفيل بالطرد المركزي بسرعة 3500 د/د لمدة 15 دقيقة، أهمل الطافي وجمع الراسب. جفف الراسب (المانان) باستخدام فرن تجفيف على الدرجة 40 م.

5- التحليل الإحصائي Statistical Analysis:

استخدم برنامج Genstat Release لتحليل النتائج، وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (RCBD (Complete Block Design Randomized، حيث تم مقارنة وجود فروق معنوية بين المتوسطات بالاعتماد على قيمة أقل فرق معنوي (L.S.D).

3- النتائج والمناقشة: Results & Discussion

أولاً- نتائج تنمية الخميرة والكتلة الحيوية:

يتميز التحلل الذاتي للخميرة بتحلل البروتينات الخلوية والأحماض النووية والدهون والسكريات المتعددة، مما يؤدي إلى موت الخلايا وإذابة الكتلة الحيوية الخلوية. ترتبط الآلية الكيميائية الحيوية التي تؤدي إلى تمزق جدار خلية الخميرة بالعمل التآزري للإنزيمات الداخلية (الجلوكانات والمانازات والكيتينازات) للخلية نفسها. إن تأثير درجة الحرارة على خلايا الخميرة معقد للغاية ويؤثر على تخليق ونشاط هذه الإنزيمات، ولكن لا ينبغي أن تعطل الأنزيمات المسؤولة مثل البروتياز والليباز والنيوكليز التي تعتبر ضرورية لعملية التحلل الذاتي للخميرة وبالتالي لإنتاج المانان منها (Alves et al.,2021,11).

تبين النتائج المتحصل عليها من الدراسة جدول (2) والناتجة عن تنمية ثلاث عزلات محلية من خميرة الخباز Saccharomyces cerevisiae (SAC_1, SAC_2,SAC_3): أن العزلة SAC_1 تفوقت من حيث الكتلة الحيوية الناتجة تليها SAC_2 ثم SAC_3 في الوسط YEPD (91.49>71.03>66.21) غ. كما تفوقت العزلة SAC_1 أيضاً من حيث الكتلة الحيوية الناتجة تليها العزلة SAC_2 ثم SAC_3 في الوسط SDB كما يلي (89.27>66.98>51.05) غ.

الجدول (2): الكتلة الحيوية الناتجة لعزلات الخميرة المدروسة (غ)

العزلة / الوسط	SAC_1*	SAC_2*	SAC_3*	
YEPD	91.49±0.93	71.03±2.75	66.21±3.39	76.2^{a}
SDB	89.27±3.23	66.98±0.11	51.05±4.26	69.1^{b}
	90.4^{A}	69^{B}	58.6^{C}	

*متوسط ثلاثة مكررات± الانحراف المعياري.

تشير الأحرف الكبيرة إلى وجود فروق معنوية بين العزلات المدروسة.($P<0.05$).

تشير الأحرف الصغيرة إلى وجود فروق معنوية بين الأوساط المدروسة.($P<0.05$) .

وقد توافقت النتائج إلى حد ما مع الباحثين (Kollar *et al*.,1992,225) الذين أوضحوا أن نسبة الكتلة الحيوية المستخلصة من خميرة الخباز بلغت 156 غ والناتجة عن100غ خميرة الخباز.

ثانياً- نتائج استخلاص المانان من الكتلة الحيوية :

كانت كمية المانان المستخلصة الجافة الناتجة من الكتلة الحيوية للعزلة المتفوقة SAC_1 كما يوضح الجدول (3) في الوسط YEPDأعلى قيمة (81.38 %) منها في الوسط SDB (77.78%). وقد يعزى ذلك إلى احتواء الوسط الأول على مغذيات بنسب أعلى مقارنة بالوسط الثاني مما شجع العزلات على النمو بشكل فعال أكثر فيه وتكوين المانان بنسب أعلى.

الجدول (3): النسبة المئوية لكمية المانان الجافة الناتجة من عزلة الخميرة SAC1 (%)

العزلة الوسط	SAC_1*
YEPD	81.38±2.44
SDB	77.78±2.33

*متوسط ثلاثة مكررات± الانحراف المعياري.

وقد أوضح الباحثون Shimada وزملاؤه أن كمية المانان المستخلصة من خميرة الخباز كانت 65.9٪ عند استخلاص المانان منها بطريقة التحلل الذاتي (Shimada *et al*.,2021,871). كما أكدت دراسة أجراها (Huang *et al*.,2010,387) أن استخدام الايتانول بعملية استخلاص المانان تؤدي إلى زيادة كمية المانان المستخلص.

ثالثاً– نتائج تأثير درجة الحرارة ودرجة الحموضة على كفاءة عملية التحلل الذاتي:

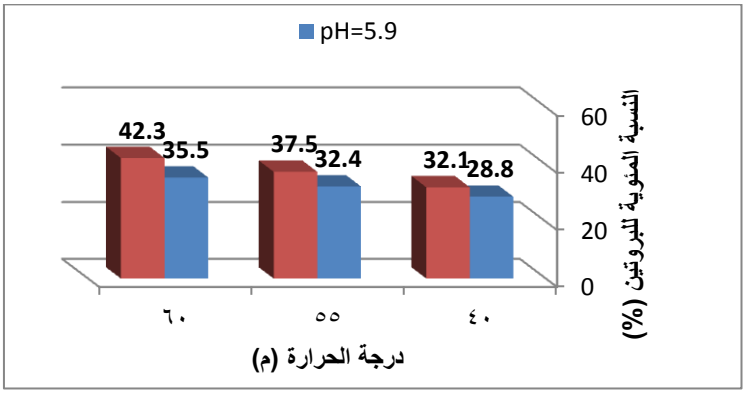
يبين الشكل (3,2) تأثير درجة الحرارة ودرجة الحموضة على كفاءة عملية التحلل من خلال ارتفاع نسبة البروتين والمواد الصلبة بعد المعاملة، ويلاحظ أنه عند درجة حرارة 40 م حصل التحكم على نتائج أفضل من التحلل الذاتي مع الصدمة الحمضية حيث ارتفع البروتين% بمقدار 3.3% (من 28.8 إلى 32.1)% وكذلك الجوامد الكلية% ارتفعت بمقدار 4.3% من (32.4 إلى 36.7)%. وهذا أيضاً ما تم الحصول عليه مع باقي المعاملات الحرارية والحمضية، حيث ارتفعت القيم بالمعاملة الحمضية والحرارية. في حين تفوقت المعاملة بدرجة الحرارة 60 م فيما يتعلق بالتحكم عند نفس درجة الحرارة باستخراج البروتينات والمواد الصلبة الكلية بالمعاملة الحمضية 4.4 حيث ارتفعت من (35.5 إلى 42.3)% البروتين% وكذلك المواد الصلبة% من (33.8 إلى 39.3)%. ومن هنا اعتمدت درجة الحرارة 60 م ودرجة الحموضة 4.4 على أنها الشروط الأمثل لإجراء التحلل الذاتي واستخلاص المانان من العزلة المتفوقة SAC_1. وقد توافقت هذه النتائج مع (Oliveira and Oliva Neto,2011,1007) فيما يتعلق بالرقم الهيدروجيني، والذي حصل على نتائج أفضل عند درجة حموضة تتراوح من 3.8 إلى 5، متفاوتة قليلاً في درجة الحرارة فقط، فعند انخفاض درجة الحموضة، يتم تثبيط آلية التحمل الحراري لـ S. cerevisiae وبالإضافة إلى ذلك، فإنها لا تزال تؤثر على نشاط الإنزيمات المسؤولة عن التحلل الذاتي، والتي تصل إلى الرقم الهيدروجيني المثالي للتفاعل. يشرح هذا كيف أن الرقم الهيدروجيني المرتبط بدرجة الحرارة القصوى هي عوامل تسرع التحلل الذاتي للخميرة. وأوضح (Podpora *et al*.,2015,4) قد يكون للتحلل التلقائي تركيبة متغيرة، وبالتالي قد لا تكون هذه الاختلافات مرتبطة فقط بعملية التحلل الذاتي نفسها، ولكن بأنواع الخميرة المراد تحليلها تلقائيًا أيضاً..

أ– نتائج تأثير درجة الحرارة والحموضة في النسبة المئوية للبروتين:

بينت النتائج الموضحة في الشكل (2) بأن النسبة المئوية للبروتين تراوحت بين (28.8–35.5)% عند درجة الحموضة 5.9، وبين (32.1–42.3)% عند درجة الحموضة 4.4 ودرجات الحرارة المدروسة.

أظهر التحليل الإحصائي وجود تأثير معنوي لدرجة الحرارة في النسبة المئوية للبروتين، تم الحصول على أعلى نسبة مئوية من البروتين (42.3%) عند درجة الحرارة 60 م، بينما كانت النسبة المئوية الأقل (28.8%) عند درجة حرارة 40 م، وقد فسر ذلك الباحثون (Alves *et al*.,2021,11) بأن التأثير الحراري على الخلايا (التحلل الحراري) عند درجات الحرارة المرتفعة يعمل على تعطيل البروتياز الداخلي ويؤدي إلى إطلاق البروتين والمانان والمواد الصلبة الموجودة داخل الخلايا بسبب تمزق الخلية.

تفوقت درجة الحموضة 4.4 معنوياً على درجة الحموضة 5.9 في مردودية البروتين المتحصل عليه (42.3 و35.5)% على التوالي، يمكن أن تبرر الزيادة في مستوى البروتينات المستخرجة والمواد الصلبة الكلية مع الزيادة التدريجية لدرجات الحرارة واختلاف المعاملة الحمضية في النتائج المتحصل عليها، بأن الأنزيمات الأربعة التي تشارك في عملية التحلل الذاتي للخميرة هي: البروتياز A الذي يملك وظيفة حاسمة، فهو مسؤول عن 80٪ من النيتروجين الذي يتم إطلاقه أثناء التحلل الذاتي في ظل الظروف المثلى، ووفقًا لبيانات (Alexandre, 2011, 646) فإن هذا البروتين يحتوي على درجة حموضة مثالية تتراوح بين 2 إلى 5 ودرجة حرارة مثالية من (50 – 60) م. ويحتوي البروتياز B على درجة حموضة مثالية من 6 إلى 10 ودرجة حرارة مثلى من 45 م إلى 55 م، كما يتمتع carboxypeptidase Y بأفضل ظروفه عند الأس الهيدروجيني 4 إلى 5 ودرجة الحرارة من 45 م إلى 60 م، في حين أن كربوكسي ببتيداز S هو الرقم الهيدروجيني 4 و درجة حرارة 60 م.

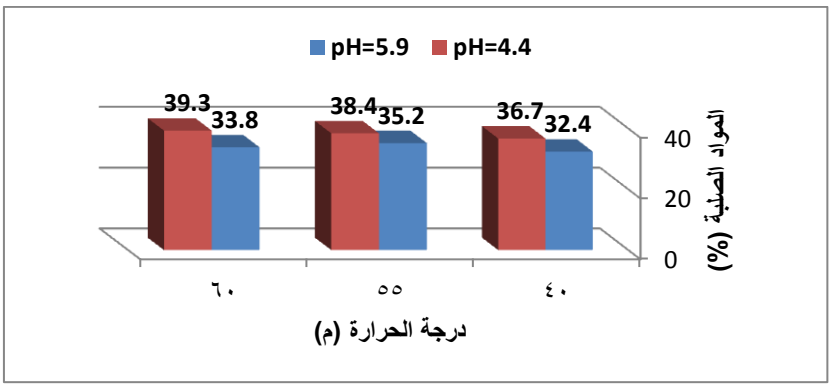


الشكل(2): تأثير كل من درجة الحرارة والحموضة في النسبة المئوية للبروتين (%)

ب- نتائج تأثير درجة الحرارة والحموضة في النسبة المئوية للمواد الصلبة:

تحتوي الخميرة على 65–80% من المواد الصلبة الكلية، وتعد المواد الصلبة أحد المؤشرات الهامة على كفاءة التحلل الذاتي، حيث تقوم عملية التحلل الذاتي بإذابة حوالي 62 ٪ من إجمالي المواد الصلبة، وحوالي 80 ٪ كحد أقصى من محتوى البروتين الأصلي للخميرة (Joseph & Bachhawat,2014,2338). تراوحت النسبة المئوية للمواد الصلبة بين (32.4–35.2)% عند درجة حموضة 5.9، وبين (36.7–39.3)% عند درجة الحموضة 4.4 وذلك ضمن مجال درجات الحرارة المدروسة (الشكل:3).

يبين التحليل الإحصائي تأثير درجة الحموضة معنوياً في النسبة المئوية للمواد الصلبة، بينما لم يكن لدرجة الحرارة أي تأثير. حيث تم الحصول على النسبة المئوية الأعلى (39.3 %) من المواد الصلبة الذائبة عند درجة حموضة 4.4، ويمكن تفسير النتائج وفقاً للباحثين (Alexandre, 2011, 646) كما ذكر سابقاً.



الشكل(3): تأثير كل من درجة الحرارة والحموضة في النسبة المئوية للمواد الصلبة (%)

الاستنتاجات Conclusions:

1-تفوقت العزلة SAC1 من حيث الكتلة الحيوية الناتجة تليها SAC2 ثم SAC3 في الوسط YEPD مقارنة بالوسط SDB وقد يعزى ذلك إلى احتواء الوسط الأول على مغذيات بنسب أعلى مقارنة بالوسط الثاني مما شجع العزلات على النمو بشكل فعال أكثر فيه وتكوين المانان بنسب أعلى.

2-كانت كمية المانان المستخلصة الجافة الناتجة من الكتلة الحيوية للعزلة المتفوقةSAC1 بطريقة التحلل الذاتي المعدلة في الوسط YEPD أعلى قيمة (81.38 %) منها في الوسط SDB (77.78%).

3-تفوقت درجة الحموضة 4.4 معنوياً على درجة الحموضة 5.9 في مردودية البروتين المتحصل عليه (42.3 و35.5)% على التوالي، كذلك تفوقت درجة الحرارة 60 م بالحصول على أعلى نسبة مئوية من البروتين (42.3%).

4-تم الحصول على أعلى نسبة مئوية من المواد الصلبة الذائبة (39.3%) عند درجة الحموضة 4.4. بينما لم يكن لدرجة الحرارة أي تأثير معنوي عليها.

التوصيات Recommendations:

أظهر التحكم بدرجة الحموضة ودرجة الحرارة في عملية التحلل الذاتي للخميرة فعاليته كمحفز لنظام الإنزيم المعقد المسؤول عن التحلل الذاتي للخميرة، حيث تؤكد الدراسات أنه يمكن تقليل زمن التفاعل، والذي ينعكس بدوره على زيادة الطاقة الإنتاجية وخفض تكلفة الإنتاج لاستخلاص المانان، وتجنب مخاطر العوامل الممرضة الناتجة عن زيادة زمن التحلل. وعليه تؤكد الدراسة ضرورة إجراء المزيد من الدراسات على التحلل الذاتي لخميرة Saccharomyces cerevisiae بهدف الحصول منها على مركبات ذات فعالية بيولوجية عالية بتكلفة منخفضة.

التمويل : هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

Refrences:

1. Aghooi V. H., Mortazavi A. S., Milani E., Koochaki A., Mehraban M (2014). Statistical Optimization of Conditions for maximize Production of Mannan by Saccharomyces cerevisiae using response surface methodology, International journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 2(4). p. 974-984.
2. Al-Eqabi E. F. H (2009). Extraction of mannan from yeast Saccharomyces cerevisiae and study of its agglutination activity. p. 1-115. Iraq: Baghdad. Baghdad university.
3. Alexandre H (2011). Downstream processing and product recovery - autolysis of yeasts. In M. Moo-Young (Ed.). Journal of Comprehensive Biotechnology. 10(1). p. 641-648.
4. Alexandre H., Guilloux-Benatier M (2006). Yeast autolysis in sparkling wine-a review. Journal of GrapeWineRes. 12. p. 119–127.
5. Alves E. M., Souza J. F., Oliva Neto P (2021). Advances in yeast autolysis technology - a faster and safer new bioprocess. Brazilian Journal of Food Technology. 24. p. 1-14.
6. AOAC (2000). Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Edition.Maryland, USA; AOAC International
7. Cid V. J., Duran A., Rey F., Snyder M. P., Nombela C., Sanchez M (1995). Molecular Basis of Cell Integrity and Morphogenesis in Saccharomyces cerevisiae. International journal of Microbiological. 59(3). p. 345-386
8. Harbah R., Meledina T. V., Manshin D. V., Andreev V. V (2021). Mannan: structure, biosynthesis, and methods extraction from yeast Saccharomyces cerevisiae, Journal of International Academy of Refrigeration. No 1. p. 59–65.
9. Henry C., Fontaine T., Heddergot C., Robinet P., Aimanianda V., Beau R., Beauvais A., Mouyna I., Prevost C. M., Fekkar A., Zhao Y., Perlin D., Latgé P. J (2016). Biosynthesis of cell wall mannan in the conidium and themycelium ofAspergillus fumigatus, Journal of Cellular Microbiology. No 18. p. 1881–1891.
10. Huang G. L., Yang Q., Wang Z. B (2010). Extraction and Deproteinization of Mannan Oligosaccharides. 65. p. 387 – 390.
11. Joseph R., Bachhawat K. A (2014). Yeasts: production and commercial uses. 12(5). p. 2335-2341. India: Mysore, Central Food Technological Research Institute.
12. Kollar R., Sturdik E., Sajbidor J (1992). Complete fractionation of saccharomyces cerevisiae biomass. Journal of Food Biotechnology. 6(3). p. 225-237.
13. Montes de Oca R.., Salem A. Z. M., Kholif A. E., Monroy H.., Pérez L. S., Zamora J. L., Gutiérez A (2016). YEAST: DESCRIPTION AND STRUCTURE. In book: YEAST ADDITIVE AND ANIMAL PRODUCTION. p. 4-13. India: Publisher: PubBioMed Central Research Publishing Services .
14. Oliveira A. M., Oliva Neto P. D (2011). Improvement in RNA extraction from S. cerevisie by optimization in the autolysis and NH3 hydrolysis. Journal of Brazilian Archives of Biology and Technology. 54(5). p. 1007-1018.
15. Podpora B., Swiderski F., Sadowska A., Piotrowska A., Rakowska R (2015). Spent brewer's yeast autolysates as a new and valuable component of functional food and dietary supplements. Journal of Food Processing & Technology. 6(12). p. 1-5.
16. Shimada Y., Ishida T., Kato Y., Uwagami H., Kato Y., Kanematsu Y., Kikuchi Y., Ohara S (2021). Material balance and energy consumption in the factory-scale coproduction of glucan and mannan from yeast extract residue. 27(6). p. 871-880.