مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية المجلد21 (4) 2008

تاثير صفة التلبد على انتاج الايثانول في بعض متغايرات الخميره

مثلى كاظم محمد جواد ، صدام حسين جبر
كلية تربية _ ابن الهيثم ، جامعه بغداد

الخلاصة

قدرت انتاجية الايثانول لعدة سلالات خمائر مختلفة بدرجة التلبد في وسط عصير التمر 10 بركس ذو الرقم الهيدروجيني 5 بدرجة حرارة حضن 30 م لمدة 48 ساعة فوجد بان انتاجية الايثانول تنخفض بزيادة درجة التلبد وان السلالة غير المتلبدة اكفىء في انتاج الايثانول من السلالة المتلبدة بعدها اختبرت حساسية نفس السلالات للايثانول في الوسط السائل YEL فوجد بان السلالة المتلبدة اكثر حساسية للايثانول من السلالة غير المتلبدة وان الحساسية للايثانول تعتمد على درجة التلبد.

المقدمة

لقي جنس خمائر saccharomyces اهتماما كبيرا من قبل مختلف الباحثين في العالم ، وذلك لاهميتة الكبيرة في انتاج الايثانول .

وتعد خميرة الخبز *sacch cerevisiae* وخميرة البيرة *sacch. carlsbergensis* اهم خمائر هذا الجنس حيث اجريت عدة دراسات عن تواجدها في المصادر الغذائية المختلفة وقابليتها على انتاج الايثانول (1و2) واكد الباحثون 5,4,3 بان خميرة sacch. *cerevisiae* لها قابلية على انتاج الايثانول اعلى بكثير من خميرة *sacch. Carlsbergensis* ، كما لوحظت ظاهرة التلبد Flocculation في عددمن سلالات هاتين الخميرتين حيث تتواجد الخمائر المتلبدة بشكل تجمعات من الخلايا الملتصقة بعضها مع البعض الاخر نتيجة لتفاعل مركبات جدرانها مع مكونات الوسط الغذائي فضلا عن

اسباب اخرى وراثية ، مما يؤدي الى سرعه انفصالها عن الوسط السائل التي تعلق فيه نهاية الدورة التخمرية (8,7,6) ولما كانت حاجة الصناعة الى الاختصار في الوقت والجهد المصروفين في عملية الفصل الميكانيكي اصبحت السلالات التي لها القابلية على التلبد موضع اهتمام العديد من الباحثين والصناعيين، واستخدمت السلالات المتلبدة في انتاج الكحول دون غيرها الا ان البحوث لم تتجه لدراسة علاقة ظاهرة التلبد التي تتواجد في بعض السلالات وانتاجية الايثانول ومن جانب اخر لوحظ بان خميرة البيرة تتميز بخاصية التلبد وانتاج الكحول تحت ظروف تخمرية خاصة تختلف عن الظروف التخمرية لانتاج الكحول من قبل خميرة الخبز لذلك فقد جاءت هذه الدراسة بهدف :

_ دراسة انتاجية سلالة خميرة البيرة للايثانول ومقارنتها مع انتاجية خميرة الخبز تحت الظروف الملائمة لانتاج الايثانول.

– دراسة العلاقة بين صفة التلبد وانتاج الايثانول في سلاسلات خميرة الخبز والبيرة .

المواد وطرائق العمل

السلالات والعزلات :

– خميرة البيرة(Brewing Yeast BY) وهي من نوع *Saccharomyces carlsbergensis* المتلبدة ذات التخمر القعري Bottom ferementation

– خميرة الخبز Baker Yeast 55/R1 المشتقة Nonfloceulant وهي من نوع *Saccharomyces cerevisiae* .

– عزلة متلبدة من سلالة خميرة الخبز ويرمز لها F / 55

– عزلتين مختلفة التلبد من سلالة البيرة ويرمز لها (By 15/2) BYSF/5 .

الاوساط الغذائية المستعملة :

– مستخلص الخميرة السائل (YEL) Broth (6)Yeast-Extraet ويحضر باضافة 1غم من مسحوق مستخلص الخميرة مع 30 كلوكوز(شركة Fluka) ويكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر ويعقم بوساطة المعقام البخاري استعمل هذا الوسط لتنشيط السلالات والعزلات واعداد اللقاح .

- اكر مستخلص الخميرة Yeast Extraet Agar-YEA نفس الوسط السابق باضافة 20 غم اكر(شركة Maknur) ويستخدم لحفض السلالات والعزلات بدرجة 4م°

- وسط مرق مستخلص الخميرة والبيتون والدكستروز Yeast Extvact Pepton Dextrose Broth (YPD) (9)

ويحضر باظافة 10 غم من مسحوق مستخلص الخميرة مع 20 غم من البيتون و20غم من الدكستروز ويكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر بوساطة المعقام البخاري بضغط 15 باوند / انج ودرجة حرارة 121 م° لمدة عشرين دقيقة . استعمل هذا الوسط لتنمية الخمائر ومعرفة درجة تلبدها.

- **وسط التخمر** : استخدم وسط عصير التمر كان تركيز السكر فية 10 بركس الذي تم الحصول عليه من معمل شركة الصناعات الكيمياوية العصرية وباس هيدروجيني 5 (PH5) وقد دعم باليوريا باضافة 0.30 غم لكل لتر من الوسط وزع الوسط بحجم 500 مل لكل دورق سعة 1 لتر ووضع في كل دورق انبوب زجاجي تمتد احدى نهايتيه الى وسط التخمر عبر السداد القطني والاخرى تنحرف خارج الدورق وتعقم مع الوسط

تحضير اللقاح : نشطت سلالات الخميرة بتنميتها على وسط مستخلص الخميرة السائل حيث اخذت مسحة كاملة من خلايا الخميرة النامية في اكر مستخلص الخمير(Slant) بوساطة ناقل (Ioop) لتلقيح 50 مل من وسط مستخلص الخميرة السائل وحضن المزروع لمدة يومين في درجة حرارة 30 م°

- طريقة المزرعة الهزازة Shaking Culture باستخدام الحاضنة الهزازة *Shaking* Incubator حيث كانت سرعة الاهتزاز 150 دورة / دقيقة. استخدمت هذه الطريقة في تحضير لقاح وسط التخمر وتنمية خلايا الخميرة في وسط التخمر .

- قياس حجم الراسب: وهو اختبار يعتمد اساسا على سرعة الترسيب وقياس حجم الراسب لعالق الخميرة حيث استخدمت هذه الطريقة لقياس شدة التلبد في السلالات والعزلات وهي الطريقة الموصوفة في(10).

التحاليل المستخدمة :

_ **تقدير السكر**: اتبعت الطريقة الموصوفة في (11) .

_ **التقدير الكمي للمحتوى الكحولي** : اتبعت الطريقة الحجمية المذكورة في (12) .

_ **تقدير التركيز الادنى المثبط والقاتل للخميرة (MIC)**: اتبعت الطريقة الموصوفة في (13).

_ **تقدير النواتج الايضية بجهاز غاز- سائل كروماتوغرافيا**: قدرت النواتج الايضية في تخمر وسط التمر 10 بركس باستخدام جهاز الغاز- السائل كروماتوغرافيا من شركة pye unieam Model 204 والعمود المستخدم (Carbewax) بابعاد 0.2 × 150 سم ودرجة حرارة 120م° استخدم كشف التاين اللهبي FID بدرجة حرارة 200 م° وكانت سرعة جريان الغاز الناقل 20 سم /دقيقة.

_ **تقدير السكر بوساطة الة البركس (Brix)**: استخدم الة البركس لتقدير كمية السكر المتبقي في اوساط التخمر المستخدمة عند كل قراءة خلال عملية التخمر.

_ **تقدير درجة التلبد بقياس حجم الراسب** : وهو اختيار يعتمد اساسا على سرعة الترسيب وقياس حجم الراسب بالطريقة التي وردت في المرجع 11,8 حيث حضر لقاح سلالات الخمائر تحت الدراسة لتلقيح وسط YPQ سائل بحجم 50 مل لكل دورق سعته 100 مل وحضنت الدوارق في حاضنة مائية هزازة لمدة يومين في درجة حرارة 30م° ثم جمعت خلايا كل سلالة بوساطة جهاز الطرد المركزي وغسلت بوساطة الماء المقطر المعقم وعلق 1 غم من الخلايا لكل سلالة في 10 مل من منظم الخلات Asetate Buffer باس هيدروجيني 4.5 والحاوي على 0.05 % كبريتات الكالسيوم ومزجت الخلايا جيدا ثم حسب الراسب للخلايا خلال 40,30,20,10 دقيقة باستعمال انابيب مدرجة بمدى zero _ 10 مل وبدرجة حرارة 30م°

النتائج والمناقشة :

تم قياس درجة تلبد سلالة وعزلة خميرة الخبز ومتغايرات خميرة البيرة Rl / 55 ، 55/F ، By ، By15/2 ، BYSF/5 باتباع طريقة قياس حجم الراسب ، باستخدام درجة حرارة 30 م° واس هيدروجيني 4.5 اذ يشير الجدول (1) الى عدم حصول ظاهرة التلبد في سلالة خميرة الخبز 55/Rl بينما اعطت عزلة خميرة الخبز المتلبدة 55/F اكبر حجم من الراسب مقارنة مع باقي العزلات ثم تلتها سلالة

خميرة البيرة BY ومن ثم العزلة BY15/2 والعزلة BYSF/5 ثم صنفت متغايرات خميرة البيرة كالاتي : BY جيدة التلبد BY15/2 متوسط التلبد BYSF/5 ضعيفة التلبد

نميت سلالة الخبز غير المتلبدة R1/55 والعزلة المتلبدة F/55 في الوسط التخمري الصناعي (عصير التمر 10% بركس) المستعمل في الصناعات الوطنية لانتاج الايثانول ذو الاس الهيدروجيني 5 ودرجة حرارة 30 م° لمدة 48 ساعة ، اضهرت النتائج المبينة في الشكل (1) بان السلالة غير المتلبدةR/55 ذو انتاجية اعلى من انتاجية السلالة المتلبدة 55/F استهلكت السلالة غير المتلبدة سكر عصير التمر باكمله بعد مرور 24 ساعة يقابله انتاج 5 % حجم / حجم ايثانول فيما كانت انتاجية السلالة المتلبدة 2.8 % حجم /حجم ايثانول ، مع بقاء نسبة عالية من السكر في العصير بعد مرور 24 ساعة وبهذا الخصوص اشارت بعض المصادر الى ان بعض سلالات الخمائر تزداد انتاجيتها للكحول في الاوساط الحامضية [14] ويبدو ان المواد المتوفرة في عصير التمر هي التي ساعدت على سرعة انتاج الكحول خلال 24 ساعة اذ يحتوي عصير التمر على مواد اساسية للتمر وبكميات متفاوتة فضلا عن السكريات والفيتامينات B2,B1,A وحامض النيكوتينك والاملاح المعدنية وستة عشر نوعا من الاحماض الامينية الحرة وارتفاع نسبة السكريات الاحادية (الفركتوز والكلوكوز)[15]. ثم نميت متغايرات خميرة البيرة السلالة By جيدة التلبد والعزلة By15/2 متوسطة التلبد والعزلة By SF/5 قليلة التلبد في نفس الوسط المذكور وباستخدام نفس ظروف التنمية فاظهرت النتائج المبينة في الشكل (2) بان انتاجية الايثانول تزداد بانخفاض درجة التلبد فكانت نسبة الايثانول المنتجة بعد مرور 24 ساعة من فترة الحضن هي 3.2% حجم /حجم ايثانول من قبل السلالة جيدة التلبد By ارتفعت النسبة الى 3.6 حجم /حجم ايثانول في العزلة متوسط التلبد By15/2 و4.7 حجم /حجم ايثانول في السلالة قليلة التلبد By SF/5 تبع ذلك التفاوت في كمية سكر التمر المستهلكة خلال الاربع وعشرين الساعة الاولى من مدة التخمر حيث كان السكر المستهلك من قبل السلالة قليلة التلبد اكثر من السكر المستهلك من قبل السلالتين الاخيرتين حيث استهلكت جميع السكر خلال 24 ساعة

أي ان كمية السكر المستهلك تزداد بانخفاض درجة التلبد في السلالات المستخدمة وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه الباحث في المرجع (16) عند مقارنة انتاجية الايثانول لخميرة *Sacch pombe* المتلبدة وغير المتلبدة وقد تم تقدير الميثانول والبروبانول والاستالديهاد في ناتج التقطير لوسط عصير التمر 10 بركس بجهاز GLC فكانت تراكيز هذه المواد تنخفض عند الخمائر المتلبدة ويرتفع في الخمائر غير المتلبدة كما في الجدول (3) يتضح مما تقدم ان هناك علاقة بين درجة تلبد الخمائر وانتاجيتها للكحول اذ ان خميرة البيرة المتلبدة ذات انتاجية منخفضة مقارنة مع عزلة خميرة البيرة ذات التلبد القليل توضح هذه العلاقة ايضا في خميرة الخبز عند مقارنة انتاجية العزلة المتلبدة F/55 للكحول مع انتاجية السلالة الام غيرالمتلبدة R1/55 وقد اشار الباحث في المرجع (10) الى انخفاض انتاجية خميرة البيرة مقارنة مع انتاجية سلالات عديدة من خميرة الخبز .

ومن الجدير بالذكر الاشارة هنا في ضوء الناتج المذكورة في هذه الدراسة اهمية التوسع في البحث عن علاقة درجات التلبد المختلفة وانتاجية الايثانول نظرا لاهمية ظاهرة التلبد في الصناعات التخميرية اذ انها قد تغني عن استعمال اجهزة الطرد المركزي او غيرها للحصول على الرائق. فضلا عن دور التلبد بشكل مباشر او غير مباشر في انخفاض تراكيز بعض النواتج الايضية غير المرغوبة في المشروبات الكحولية اخذين بنظر الاعتبار التقنيات الجديدة المستعملة في انتاج الكحول من قبل الخمائر المتلبدة.

حساسية عزلات الخمائر متباينة التلبد لتراكيز مختلفة من الايثانول :

وجدت الخمائر المتلبدة اكثر حساسية للكحول مقارنة مع نظيراتها غير المتلبدة او ضعيفة التلبد كما مبين ذلك في الجدول (3) ولم تشير المصادر العلمية المتوفرة لدينا الى علاقة بين تحمل خميرة الخبز والبيرة المستعملة في هذه الدراسة للايثانول ودرجة تلبد هذه الخمائر الا ان الباحثين (16) و(17) اشارا في دراستهم الى انخفاض حساسية خميرة *S. Pombe* المتلبدة للايثانول مقارنة مع الخميرة الام غير المتلبدة. وقد لاينسجم هذا مع ما ذكر انفا بخصوص امكانية الاستفادة من الخمائر المتلبدة في انتاج الكحول ولكن بالامكان استعمال طرائق وراثية مناسبة للحصول

على سلالات من الخميرة ذات تلبد مناسب ومقاومة عالية نسبيا للكحـــول وانتاجيـــة جيدة لهذه المادة، وهذا ماتم الحصول عليه في خميرة *S. pombe* في المرجع (16) وقد تكون لهذه الطريقة فائدة اقتصادية عند تطبيقها في سلالات خميرة الخبز والبيرة وعزلاتها المستخدمة في هذه الدراسة ، للدراسات اللاحقة .

المصادر

1- Ammer,k.,Afifi, S.A and Fahmy, AA (1975) Egypt.J. Food.Sci. 3 (1) :17-23

2- Minarik, E. and Bchova, H. (1980) Kvasny prum. 26(9):206-208 (C.F. Microbiology Abs.A. Vol. 16;(1981).

3- Brian, F. and Cuenca, R. .(1984)An. Bromatol. 35(1): 105-110 (C.F.Chemical.Abs. Vol.101: (1984)

4- Gokhale, D.V.; Rao, B.S. and Sivaromakri-hnom, S. (1968). Enzyme microb. Tecnnol.8: 623-626

5- Beaven,M.j.;Charpentier, C.and Rose, A.H. (1982). J.Gen Microbiol. 128:145-1447

6- Suzzi, G.;Romano, P. and Zambonelli, C. Can. (1978). J. Microbiology Vol 27:

7- Stewart, G;G. and Russell, I. (1981); Yeast flocculation, Brew. Sci. 2:61_92.

8- Savitree, L., Masanomi, N., Histoshi, F,.Toshiomi, Y. ; Tatsuji, S; Jaroon, K. and Hisahara, T. J. Fermont. Technol. 26(1):55-62.(1984).

9- Gutz, H., Heslot H; Leupold, U. and loprieno, A. Schiz. Pombe; Cited in king R. C. (1974) Handbook of Genetics-Vol.l Plenum press. New York.

10- Gokhale, D.V.; Rao, B. S. and Sivaromakrishnam, S. (1986) Enzyme Microb. Technal. 8: 623-626.

11- Hiroshi, K.; Yoshio, S.; Tosnio, M.; Harumi, K. and Yorikazu, S. .(1985) J. ferement. Technol. 63(2) : 159-165

12- AOAC-Association of official Analytical Chernists Official Method of Analiysis 12th ed-Washington DC,V, S. A. (1975)

13- Al-Zaidy, H. M. (1975) Study of the antimicrobial activity of some Alcohol" Ph. D. Thesis Heriot-wait Univ., Edinb.

14- Parasons, R. V.; Mcdoffe, N.G, and Din, G.A. (1984) Bitechnol. Lett. 6:677-680.

15- العكيدي ، سلوى عبد الرحمن(1988) دراسة عن تـاثيرات الكحـولات الاليفاتيـة والسايكلوهكسمايد من سلالات برية وطافرة من خميرة *S. pornbe* رسالة ماجـستير قسم علوم حياة كلية تربية – جامعه بغداد .

16- عبد الرزاق شذى (1989). دراسة وراثية وبيئية عن الايثانول بوساطة خميرة *S. pombe* رسالة ماجستير قسم علوم حياة كلية العلوم ، جامعة بغداد

17- Ibrahm, M.A.K.;AL-Shahwani, M.F.; Kaddouri, N,N. and Abdul-Aziz, G. M. (1989) The fifth Scientific Conference of the scientific research council. Baghdad April 28th-May 2nd .(In press)

جدول رقم (1)قياس درجة التلبد بطريقة قياس حجم الراسب لمتغايرات خميرة البيرة وسلالةوعزلة خميرة الخبز باستخدام درجة حرارة 30 م واس هيدروجيني 4.5 .

الوقت بالدقيقة	حجم الراسب /مللتر			
السلالة	10	20	30	40
BY	0.4	0.5	0.7	0.9
BY15/ 2	0.3	0.4	0.6	0.6
BYSF/5	0.1	0.2	0.2	0.3
55/F	0.4	0.5	0.8	1.0
55/R 1	0.1	0.1	0.1	0.1

الخميرة المتلبدة تعطي راسب بحجم 1.5 -4.0 مللتر

الخميرة غير المتلبدة تعطي راسب بحجم0.1 أو أقل

جدول (2) النواتج الايضية لعزلات خميرة الخبز والبيرة بوساطة جهاز (GLC) في وسط عصير التمر 10 بركس .

سلالات الخميرة	ايثانول	بروبانول	ميثانول	استلديهايد
55/R1	4.5	0.0214	0.00235	0.0013
55/F	2.32	0.0107	0.0009	0.001175
BY	2.71	0.0124	0.0012	0.00126
BY15/2	3.0	0.0147	0.0017	0.00154
BYSF/5	3.9	0.0201	0.00211	0.00161

جدول رقم (3) تاثير الايثانول القاتل والمثبط لسلالات خميرة الخبز والبيرة المنماة في وسط المستخلص الخميرة السائل YEL بعد الحضن بدرجة حرارة C30 لمدة 5 ايام وباستعمال 10^7 خلية /مل .

السلالة	تركيز الايثانول المثبط	تركيز الايثانول القاتل
55/R1 سلالة خميرة الخبز غير المتلبدة	%14	%18
55/F سلالة خميرة الخبز المتلبدة	%12	%16
BY سلالة خميرة البيرة جيدة التلبد	%9	%11
BY15/1 عزلة خميرة البيرة متوسطة التلبد	%10	%13
BYSF/1 عزلة خميرة البيرة قليلة التلبد	%11	%14

شكل (1) مقارنة لإنتاجية الإيثانول واستهلاك السكر من قبل خميرة الخبز غير المتلبدة 55/R1 والسلالة المتلبدة 55/F في وسط عصير التمر 10 بركس ودرجة حرارة 30 c وأس هيدروجيني 5.

شكل (2) مقارنة الانتاجية الايثانول واستهلاك السكر من قبل متغايرات خميرة البيرة BY جيدة التلبد والعزلة BY15/2 متوسطة التلبد والعزلة BYSF/5 قليلة التلبد في وسط عصير التمر 10% بركس ودرجة حرارة 30 م وأس هيدروجيني 5 .

IBN AL- HAITHAM J. FOR PURE & APPL. SCI VOL.21 (4) 2008

The Effect of Flocculation on The ethanolic Production in Some Various Yeast

M. K. M. Jwad, S. H. J. Al-Haidari
Department of Chemistry,College of Eduction Ibn –Al Haitham,University of Bayhdad
Department of Biloyy, College of Eduction Ibn –Al Haitham,University of Baghdad

Abstract

Ethanol production were evaluated by many strains with varing degree of flocculation in fermentation medium of date extract with10 Brix, PH5 in 30C° for 48hr.It was found that ethanol production decrease with increase of flocculation degree and non-flocculant strain is more efficient in producing ethanol from flocculant strain,then ethanol sensitivity were examined for the same strains, in liquid medium YE, it was found that strain is more sensitive from non-flocculant and ethanol sensitivity depends upon flocculation degree.