جـامـعـة دمشق
كلية الهندسة الزراعية
قسم علوم الأغـذية

دراسة النشاط التخمري للخمائر المعزولة من عصير التفاح ومركزاته

Study of fermentative activity of isolated yeast strain from apple juice-concentrate

رسالة جامعية أعدت لنيل درجة الماجستير في علوم الأغذية

إعداد الطالبة

م .ضيا أحمد العمر

بإشراف

د.عبد الوهاب مرعي د.صباح يازجي

2011

دراسة النشاط التخمري للخمائر المعزولة من عصير التفاح ومركزاته

Study of fermentative activity of isolated yeast strain from apple juice-concentrate

أعدت الرسالة من قبل المهندسة : ضيا أحمد العمر.

الدرجة العلمية المكتسبة: ماجستير في علوم الأغذية – ميكروبيولوجيا الأغذية.

مكان وتاريخ المناقشة: كلية الزراعة – جامعة دمشق في 26-7-2011.

لجنة الحكم

أ.د.محمد خير طحلة
كلية الزراعة – جامعة دمشق
تكنولوجيا السكر

أ.د.سمير سليق
كلية الزراعة – جامعة دمشق
ميكروبيولوجيا الألبان

أ.د.عبد الوهاب مرعي
كلية الزراعة – جامعة دمشق
ميكروبيولوجيا الأغذية

تصريح لجنة الحكم

نوقشت الرسالة يوم الثلاثاء الموافق 26\ 7 \ 2011 في كلية الزراعة – جامعة دمشق من قبل أعضاء لجنة الحكم وأجيزت.

أعضاء لجنة الحكم	التوقيع
1- أ.د.محمد خير طحلة	.....
2- أ.د.سمير سليق	.....
3- أ.د.عبد الوهاب مرعي	.....

شهادة

نشهد بأن العمل المقدم في هذه الرسالة هو نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة ضيا أحمد العمر بإشراف الدكتور عبد الوهاب مرعي – قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة – جامعة دمشق، والدكتورة صباح يازجي - قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة – جامعة دمشق.

المرشحة	المشرف المشارك	المشرف العلمي
ضيا العمر	د.صباح يازجي	د.عبد الوهاب مرعي

We witness that the described work in this thesis is the result of scientific researchconduted by the candidate Diaa Ahmad Alomar under supervision of Dr. Abd Alwahab Merai at department of food sciences _ Faculty of Agriculture _ Damascus University and Dr. Sabah yazaji at department of food scienes _ Faculty of Agriculture _ Damascus University.

Candidate	undersupervision	
Diaa Alomar	Dr.Abd Alwahab Merai	Dr. Sabah yazaji

تصريح

أصرح بأن البحث الموصوف في هذه الرسالة تحت عنوان (دراسة النشاط التخمري للخمائر المعزولة من عصير التفاح ومركزاته) لم يسبق أن قدم للحصول على أية درجة جامعية أخرى وأن كافة الأعمال والنتائج المذكورة هي جهودي الشخصية، وبتوجيه من المشرف العلمي، وقد نسبت المعلومات والنتائج الأخرى التي ذكرت في هذه الرسالة إلى مصادرها ومؤلفيها في النص وفي قائمة المراجع .

المرشحة

ضيا أحمد العمر

Declaration

I declare that the present research entitled **(Study of fermentative activity of isolated yeast strain from apple juice-concentrate)** is a new research work that has never been studied by any other researcher for any other degree, and that all the included work and results are all of my own personal efforts under the direction of the scientific supervisor . I further declare That all other information and results mentioned in this thesis were ascribed to their writers and sources both in the text and in the list of references.

Candidate

Diaa Ahmad Alomr

الإهداء

إلى أعظم شخص بحياتي ، إلى من أحمل اسمه بكل فخر واعتزاز، إلى من أحبه أكثر من نفسي...

أبي الغالي أطال الله بعمره

إلى من أخجل أن أصفها بكلمات ، إلى من أقف عاجزة أمام صبرها وبسالتها في الحياة، إلى سر الوجود وجمال الحياة ، إلى نبع الحنان ، إلى من كان دعائها سر نجاحي ، وحنانها بلسم جراحي...

حبيبتي وعمري أمي

إلى من أفخر أنهم أخوة لي ، إلى من يجري حبهم في عروقي ، إلى من يلمع قلبي بذكراهم ، إلى من أفرح بقربهم وأسعد بلقائهم .....

إخوتي وأخواتي

إلى ملائكة الرحمة ، إلى القلوب الصغيرة ، إلى النفوس البريئة ، إلى من تحلو الحياة بوجودهم .....

أبناء إخوتي وأخواتي

شكر وتقدير

كم يسرني أن أتقدم بوافر من الشكر والتقدير إلى الدكتور عبد الوهاب مرعي الذي تفضل بالإشراف على هذه الرسالة لما قدمه من جهد ووقت وتوجيهات وآراء قيمة ، ويسعدني أن أشكر الدكتورة صباح يازجي والتي كان لها الأثر الكبير والكبير جدا في إنجاز هذه الرسالة.

كما أتقدم بجزيل الشكر إلى أعضاء لجنة المناقشة أ.د.محمد خير طحلة وأ.د.سمير سليق لتفضلهم بالمشاركة وإبداء الملاحظات والتوجيهات السديدة .

كما أتقدم بجزيل الشكر وعظيم الامتنان إلى أستاذي الفاضل الدكتور محمد مصري الذي كان لي بمثابة الأخ ، ولما قدمه لي من معلومات وسعة صدر وإرشاد في إعداد هذه الرسالة ولتفضله بالإشراف الداخلي على إيفادي.

كما لايفوتني أن أتقدم بالشكر الجزيل إلى الأساتذة والزملاء والعاملين في قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة في جامعتي البعث ودمشق لما أحاطوني به من رعاية ومودة.

كما أتقدم ببالغ الشكر إلى أ.د. فواز العظمة والمهندسين والعاملين في مخبر الأحياء الدقيقة –هيئة التقانة الحيوية.

كما أتوجه بجزيل الشكر إلى كل من المهندس نصر حسنين والمهندس محمد إياس والمهندسة روعة طلي.

وأولا وأخيرا ودائما أشكر الله سبحانه وتعالى الذي منحني هذه الدرجة والمكانة العلمية.

الفهرس

الموضوع	رقم الصفحة
1-المقدمة	**1**
-أهداف البحث	3
2-الدراسة المرجعية	**4**
2-1- تاريخ اكتشاف الخمائر	5
2-2- تعريف الخمائر	5
2-3- تصنيف الخمائر	9
- تقنية API للتصنيف	9
2-4- أنواع الكائنات الحية الدقيقة المسببة للفساد في عصير التفاح	10
2-5- أنواع التخمرات	13
2-6- الظروف المناسبة لعملية التخمر الكحولي	13
- مواصفات التخمر	14
- المسار الأيضي للتخمر	14
2-7- العوامل المؤثرة في إنتاج وتركيز الكحول	16
2-7-1-تركيز المحلول السكري	16
2-7-2- تأثير درجة الحموضة	17
2-7-3- تأثير درجة حرارة التخمر	17
2-7-4- تأثير السلالة ونسبة البادئ	19
2-7-5- عوامل أخرى	22
2-8- تأثير التلقيح بالبكتريا و الخمائر على نجاح عملية التخمر	23
2- 9- المنتجات الثانوية للتخمر الكحولي	24
3 - مواد البحث وطرائقه	**25**
3 -1- المواد وأوساط الزرع	26

3-2- الأجهزة	26
3-3- طرائق البحث	27
3- 3-1- جمع عينات العصير	27
3-3-2- عزل الخمائر على الاغار المائل	27
3-3-3- تصنيف الخمائر	27
3-3-3-1- تصنيف الخمائر مورفولوجيا	27
3-3-3-2- تصنيف الخمائر فيزيولوجيا	28
3-3-4-الغربلة	29
3-3-5- دراسة القدرة التخميرية وأمثلة ظروف التخمر	29
3-3-6- تصميم التجربة لأمثلة ظروف التخمر	30
3 -3-7- تحليل التجربة	32
4- النتائج والمناقشة	**33**
4-1- الوصف المورفولوجي للخمائر	34
4-2- الوصف البيوكيميائي للخمائر بAPI لتحديد النوع	34
4-3- التشخيص الفيزيولوجي لخميرة *Kluyveromyces.lactis* حسب Barrnet	39
4-4- نتائج الغربلة	40
4-5- أمثلة ظروف إنتاج الكحول الإيتيلي من عصير التفاح باستخدام التصميم الإحصائي (RSM)	40
4-5-1- خميرة *Saccharomyces cerevisiae*.	40
4-5-1-1- تأثير درجة الحرارة في تركيز الكحول لإيتيلي	44
4-5 -1-2- تأثير درجة الحموضة في تركيز الكحول الإيتيلي	44
4- 5-1-3- تأثير تركيز السكر في تركيز الكحول الإيتيلي	45
4-5-1-4- تأثير كل متغيرين معا في تركيز الكحول الإيتيلي	46
4-5-2- خميرة *Kluyveromyces lactis*	48

4-5-2-1- تأثير درجة الحرارة في تركيز الكحول الإيتيلي	52
4-5-2-2- تأثير درجة الحموضة في تركيز الكحول الإيتيلي	52
4-5-2-3- تأثير تركيز السكرفي تركيز الكحول الإيتيلي	53
4-5-2-4- تأثير كل متغيرين معا في تركيز الكحول الإيتيلي	54
4-5-3 - خميرة *Candida gulliermondi*	65
4-5-3-1- تأثير درجة الحرارة في تركيز الكحول الإيتيلي	60
4-5-3-2- تأثير درجة الحموضة في تركيز الكحول الإيتيلي	61
4-5-3-3- تأثير تركيز السكر في تركيز الكحول الإيتيلي	61
4-5-3-4- تأثير كل متغيرين معا في تركيز الكحول الإيتيلي	62
5- الاستنتاجات	**65**
6- المقترحات	**67**
7- المراجع العربية والأجنبية	**69**

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
1	تصميم التجربة حسب RSM	31
2	الوصف المورفولوجي للخمائر المعزولة من عصير التفاح	34
3	أنواع السكاكر المستقلبة من قبل الخمائر بواسطة API	38
4	التشخيص الفيزيولوجي لخميرة *Klyuveromyces.lactis*	39
5	الخمائر المعزولة ونسب وجودها	40
6	تركيز الكحول الناتج من تخمر عصير التفاح بوساطة خميرة S.*cerevisiae*	41
7	معامل الانحدار للكحول المنتج خميرة S.*cerevisiae*	43
8	تحليل التباين للكحول المنتج خميرة S.*cerevisiae*	44
9	تركيز الكحول الناتج من تخمر عصير التفاح بوساطة خميرة K.I	49
10	معامل الانحدار للكحول المنتج خميرة K.I	51
11	تحليل التباين للكحول المنتجK.I	52
12	تركيز الكحول الناتج من تخمر عصير التفاح بوساطة خميرة C.g	57
13	معامل الانحدار للكحول المنتج خميرةC.g	59
14	تحليل التباين للكحول المنتجC.g	60

قائمة الأشكال

رقم الصورة	عنوان الصورة	رقم الصفحة
1	تصنيف الخمائر باستخدام شريحة API	35
2	أمثلة ظروف التخمر خميرة S.*cerevisiae*	46
3	تأثير تركيز السكر وpH في تركيز الكحول خميرة S.*cerevisiae*	46
4	تأثير تركيز السكر ودرجة الحرارة في تركيز الكحول خميرة S.*cerevisiae*	47
5	تأثير الـ pH ودرجة الحرارة في تركيز الكحول خميرة S.*cerevisiae*	48
6	أمثلة ظروف التخمر K.l	54
7	تأثير الـpH ودرجة الحرارة في تركيز الكحولK.l	54
8	تأثير تركيز السكر ودرجة الحرارة في تركيز الكحولK.l	55
9	تأثيرالـpH وتركيز السكر في تركيز الكحولK.l	56
10	أمثلة ظروف التخمر C.g	62
11	تأثير الـpH ودرجة الحرارة في تركيز الكحولC.g	62
12	تأثير تركيز السكر ودرجة الحرارة في تركيز الكحولC.g	63
13	تأثيرالـpH وتركيز السكر في تركيز الكحولC.g	64

قائمة الإختصارات

الاختصار	الدلالة
TSS	تركيز السكر
S. *cerevisiae*	خميرة *Saccharomyces cerevisiae*
K.l	خميرة *Kluyveromyces lactis*
C.g	خميرة *Candida gulliermondi*

الملخص العربي

عزلت 5 خمائر من عينات عصير التفاح ومركزاته جمعت من محافظة السويداء وتم تصنيفها موروفولوجياً بالاعتماد على Barnett، كما صنّفت بيوكيميائيا باستخدام تقنية الـ API لتحديد نوع الخميرة، فتبيّن مايلي:

1- *Saccharomyces cerevisiae*

2- *Candida gulliermondi*

3- *Candida famata*

4- *Candida utalis*

5- *Kluyveromyces lactis*

غربلت هذه الخمائر المصنّفة لمعرفة قدرتها على تخمير عصير التفاح وإنتاج الكحول الإيتيلي، فتبيّن قدرة ثلاث خمائر على إنتاج الكحول هي : *Saccharomyces cerevisiae- Kluyveromyces lactis- Candida gulliermondi*

قيس نشاطها التخمري ومن ثم أمثلة ظروف التخمر وتحديد تركيز الكحول الناتج، فكانت أفضل درجة حرارة 35°م وأفضل رقم pH 4.5 وأفضل تركيز للمحلول السكري في عصير التفاح 12% بيركس، وذلك عند نسبة تلقيح 6% ومدة تخمير 50 ساعة وكانت أفضل هذه الخمائر على تخمير عصير التفاح وإنتاج الكحول الإيتيلي هي S*accharomyces cerevisiae* حيث بلغ تركيز الكحول عندها 7.44%(v\v).

Abstract

Five yeasts were isolated from apple juice and apple concentrates, which were collected from Al-Suidaa Governorate. These yeasts were morphologically classified according to Barnett and physiologically using the technique of API in the aim of determining yeast type. Consequently, these yeasts were:

1- Saccharomyces cerevisiae

2- Candida gulliermondi

3- Candida famata

4- Candida utalis

5- Kluyveromyces lactis

Classified yeasts were screened to determine their ability in fermenting apple juice and producing ethanol. It has been revealed that three yeasts *Saccharomyces cerevisiae* - *Kluyveromyces lactis* - *Candida gulliermondi* can produce ethanol. Accordingly, their fermenting activities were measured, and then optimal conditions of ethanol production were determined. The statistical study showed that the optimal temperature, pH and brix were 35º C, 4.5 and 12% consequently when the starter size was 6% and fermenting time 50 hours. Moreover, *Saccharomyces cerevisiae* was the best yeast in fermenting apple juice and producing ethanol, where ethanol concentration was 7.44% (v/v).

أولا: المقدمة

INTRODUCTION

1-المقدمة:

انتشرت زراعة التفاح في سورية في منتصف الأربعينات لتحتل الآن مكانا بارزا في الإنتاج الزراعي السوري، نظرا لمكانتها الاقتصادية والغذائية. تتوزع زراعة التفاح في سوريا من جبل العرب في السويداء إلى كفرام في ظهر القصير، وبلغت المساحة المزروعة في السويداء حوالي 11700 هكتار 40% منها لم تدخل فيها الأشجار بطور الإثمار، اقتصرت زراعة التفاح في محافظة السويداء من خلال الاعتماد على بعض الأصناف المحلية (سكري-فضي-أبو غبرة) في بعض قرى المحافظة مثل قرية سهوة الخضر، بنيما بدأ إدخال الأصناف الأجنبية في عام 1948 خاصة صنفي التفاح الرئيسيان (غولدن ديليشس وستاركن ديليشس)،(الشاذلي، 1999). توسعت فيما بعد بمطلع السبعينات من القرن الماضي. تعد الظروف البيئية التي تتمتع بها محافظة السويداء مناسبة لزراعة التفاح بدءاً من التربة، والارتفاع عن سطح البحر والوضع الطبوغرافي إلى جانب الهطول المطري وتوفر درجات الحرارة المنخفضة شتاءً والتي تناسب معظم الأصناف الرئيسية للتفاح إلى جانب الحرارة المعتدلة صيفاً وتوفر الرطوبة النسبية مما جعل من هذه الزراعة منافسة بكل المقاييس خاصة عندما يتوفر الإرشاد الفني الصحي(حسن والزناتي، 1990). يتبع التفاح (*Mill pumila malus*) إلى العائلة الوردية، ويوجد حوالي 20 نوعا من أنواع التفاح في أوروبا وآسيا وأمريكا الشمالية، ويعتقد بعض الباحثين في الفاكهة أن الموطن الأصلي للتفاح هو جبال الهمالايا، ومناطق جنوب القوقاز. تتكون ثمرة التفاح من: ماء 84% ، بروتين 0.4%، مواد سكرية 13.3%، أحماض 0.56%، وأملاح معدنية 0.6% مع وجود 59 سعرة حرارية (كالوري) في كل 100غ، كما تحتوي الأملاح المعدنية على الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم والمغنيسيوم والفوسفور والكلور..... إضافة إلى مجموعة من الفيتامينات هي A،B1،B2،B6، E وكذلك البكتين. شهدت صناعة عصير التفاح تقدما ملحوظا في الآونة الأخيرة سواء من حيث كمية الإنتاج أو التقانات المتبعة، فقد طورت معدات الاستخلاص والتصنيع فأنتج عصير التفاح بالطريقة المستمرة بجودة عالية وتكاليف منخفضة، وتعتبر القيمة الغذائية العالية للفواكه وكذلك التقدم العلمي في مجال تغذية الإنسان في العالم السبب الأساسي لاستهلاك عصير الفاكهة، حيث أن ظهور الفاكهة الموسمي هو السبب الرئيسي لإنتاج العصير منها، وأن هذا الاتجاه من العمل يسمح وبشكل اقتصادي بتوفير الفواكه الموسمية على شكل عصير (أسهل للتخزين)

(كردوش والشيخ، 1993) فهي عملية اقتصادية خفضت من تكاليف تخزين ونقل الفاكهة الطازجة. تنتج أنواع كثيرة من العصائر منها الرائقة وغير الرائقة وكما تنتج العصائر طازجة أو مجمدة أو معلبة أو مسحوق، وبسبب الإنتاج الموسمي لثمار التفاح وإنتاج كميات كبيرة من العصير لجأ المصنعون إلى تحويله إلى مركزاته لإطالة مدة حفظه ولتصغير حجم التخزين ويعمد إلى تمديده عند الحاجة ويتم التركيز تحت التفريغ بتركيز 73.4% سكر، وحموضة 1.64%، وتحت درجة حرارة

90°م(الشاذلي،1999)، وعلى الرغم من اتباع هذه الإجراءات فإن هذه المركزات تتعرض للفساد إلا أنه يكون بطيئا بسبب حموضتها وارتفاع تركيزها والذي يعود بشكل أساسي للخمائر حيث تشكل 90% من الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في العصائر.

أهداف البحث:

نظرا لعدم توفر الدراسات عن الخمائر وقدرتها التخميرية في سوريا كان الهدف من هذا البحث :

1- عزل الخمائر من عصير التفاح ومركزاته .

2- تشخيص الخمائر المعزولة بيوكيميائيا بطريقة *API Bio Merieux* ومورفولوجيا وفيزيولوجيا حسب Barnett في حال عدم القدرة من تشخيصها بالطريقة السابقة.

3- دراسة قدرة الخمائر على تخمير هذه العصائر وعلى إنتاج الكحول.

ثانيا :الدراسة المرجعية
AND LITERATURE REVIEW

2-1- تاريخ اكتشاف الخمائر The date of discovered yest:

تستطيع الخمائر تحويل السكر إلى كحول عن طريق التخمر الكحولي ويعود اكتشاف هذه العملية إلى عام 1610، حيث وصف العالم *Van helment* كلمة غاز للتعبير عن الفقاعة التي تنتج من التخمر(Ron, 2000)، أما العالم *Leeuwenhoek* وصف خلايا الخميرة عام 1980 ومع تقدم التطور العلمي اخترع المجهر(*Microscope*) واكتشف غاز ثاني أوكسيد الكربون كناتج من نواتج التخمر من قبل العالم *Joseph black* عام 1754، أثبت العالم *Lavoisier* نواتج التخمر وهي الإيتانول و CO_2 في سنة 1789، وفي سنة 1815 أصبح مفهوم المول معروفا وأظهر العالم *Gay lussac* أن 1 مول من الغلوكوز ينتج وبالضبط 2 مول من الإيتانول و 2 مول من Co_2 (Boulton *et al.*, 1996)، ولكن عملية التخمر كانت لغز كيميائي رائع وهام، وأشار العالم *Barezeliius* أن للخمائر دور فعال في ذلك إلى أن جاء العالم الفرنسي لويس باستور الذي أثبت أن التخمر عملية فيزيولوجية تتم بمساعدة الخمائر وبدونها لا يتم التخمر. أجرى العالم *Eduard Buchner* تجربته والتي استمرت 40 عاما حيث أخذ مستخلص الخلايا الحرة للخميرة التي تسبب تحول السكر إلى كحول وأثبت أن مستخلص الخلايا الحرة من الخميرة تتضمن مادة فعالة والتي تدعى بالأنزيمات والتي هي ضرورية من أجل التخمر (Lonvaud-Funel, 1995) نال جائزة نوبل على هذا الاكتشاف عام 1907. اكتشف العالم *Harden* عام 1905 الفوسفات اللاعضوي الذي يضاف إلى مستخلص الخميرة لزيادة معدل النمو (Williamson, 1994) .

2-2- تعريف الخمائر Definition yeasts:

تعرف الخمائر على أنها كائنات صغيرة وحيدة الخلية مجهرية لا تحوي المادة الكلوروفيلية، يتراوح قطرها بين 8-15 ميكرومتر حقيقية النواة. تنتمي للفطريات من نوع *Ascoporidae* وغالباً من النوع *Ascomycota* ويصنف قسما كبيرا من الخمائر في صف الزقيات *Ascomycetes* وقسم أخر يتبع الفطريات الناقصة *Deuteromycetes* والقليل منها يتبع الدعاميات *Basidiomycetes* (الشرابي وهابيل، 2001). يعد العالم الفرنسي لويس باستور المكتشف الأول لطبيعة الخمائر حيث أرجع ظاهرة التخمر في دراسته إلى هذه الكائنات الحية الصغيرة وأثبت أنه بدون الخميرة لا يحدث التخمر، وهي تفضل النمو في وسط نشوي ورطب عند درجات حرارة متوسطة وتشكل في السوائل غشاء مخاطي لزج أو جاف، أغلب أنواع الخميرة قادرة على تخمير السكريات المختلفة منتجة كحولا وثاني أكسيد الكربون ولهذه الخاصية أهمية في صناعة الخبز والبيرة والنبيذ وأنواع الكحول، كما يمكن استخدام الخميرة بحد ذاتها كغذاء للإنسان والحيوانات لأنها تمتاز بارتفاع نسبة البروتين فيها، وتستعمل الخميرة أيضا في إنتاج بعض الفيتامينات والأنزيمات وفي الإنضاج السطحي لبعض أنواع الجبن، وقد تكون الخمائر غير مرغوب فيها عندما تسبب تلف وفساد عصير الفواكه والمحاليل السكرية والمولاس والبيرة والنبيذ واللحوم وكثير من المواد الغذائية الأخرى (John *et al.*, 1996).

توجد الخمائر في أماكن عديدة مختلفة في الطبيعة، ولكنها أقل إنتشاراً من البكتيريا، توجد الخمائر على السطح الخارجي للفواكه وأوراق النبات، كما وتوجد في التربة والحشرات التي تحمل الخمائر في قنواتها الهضمية، تنمو الخمائر في المواد الغذائية الحامضية التي تحتوي على نسبة لا بأس بها من السكر (الشرابي وهابيل، 2001). الخمائر عبارة عن مجموعة كبيرة غير متجانسة من الكائنات الحية الدقيقة، وعدد قليل منها صغير الحجم لا تزيد بحجمها عن حجوم البكتيريا، ولكن معظم الخمائر أكبر بكثير من البكتيريا، بعضها أطول بمقدار (4 –24) مرة من البكتيريا(Peng *et al.*, 2009)، وعلى الرغم من أن الشكل الظاهري يتغير باختلاف النوع إلا أنه ثابت تقريباً بالنسبة لخلايا النوع الواحد ويعتمد عليه في التعرف عليها وتصنيفها(حماد، 2010)، وتتألف خلية الخمائر من :

1- الجدار الخلوي Cell Wall :

- يحيط بالخلية جدار خلوي :
- يحدد شكلها .
- كما يحمي السيتوبلاسما من المؤثرات الخارجية .
- يسمح بمرور المواد ولا يسمح لغيرها.
- قد يكون الجدار الخلوي رقيقا لا يتميز إلى طبقات، أو قد يكون سميكا متميزا إلى ثلاث طبقات تختلف عن بعضها بالتركيب الكيميائي، وتتألف الطبقات الثلاث كما يلي :

أ- الطبقة الخارجية Outer Stratum : وتتكون أساسا من المانان مع كميات محدودة من الكيتين .

ب- الطبقة الوسطى Middle Stratum :تتكون من الغلوكان.

ج- الطبقة الداخلية Inner Stratum: تتكون من مواد بروتينية وتبقى محيطة بالغشاء السيتوبلاسمي.

يمكن إزالة الغشاء الخلوي بعدة طرق منها رج معلق الخلايا بوجود قطع صغيرة جدا من الزجاج Glass beads أو بواسطة الموجات الفوق صوتية Ultrasonic.(Cabroglu *et al.*, 2003)

2- الغشاء السيتوبلاسمي :

هو جدار رقيق يلي الجدار الخلوي ويتكون أساسا من البروتينات الدهنية Lipoprotein وهو غشاء شبه نفوذ ينظم مرور المواد الغذائية الذائبة بالبيئة وخروج نواتج عملية الاستقلاب الخلوي.

3- الشبكة الأندوبلاسمية:

توجد الشبكة الاندوبلاسمية قي السيتوبلاسما وهي تشبه تلك الموجودة في الخلايا النباتية والحيوانية، ترجع أهميتها لكونها تلعب دورا هاما في عملية التبرعم.

4- الحبيبات الدهنية :

توجد في السيتوبلاسما، وتحتوي بعض أنواع الخمائر على نسبة عالية من المواد الدهنية قد تصل إلى 50% من الوزن الجاف تستخدم في إنتاج المواد الدهنية، وتختلف كمية المواد الدهنية باختلاف ظروف التنمية (Lilly *et al.*, 2000)

5- الفجوة :

توجد في داخل خلية الخميرة فجوة كبيرة ويوجد عند أحد أطرافها جسم صغير كثيف هو النواة، تظهر الفجوة كجزء شفاف عند فحصها بالمجهر الضوئي تشغل جزء كبير من الخلية، قد توجد فجوة واحدة كبيرة أو عدة فجوات صغيرة ذات حجم مماثل، تحتوي الفجوة على مواد دهنية (ليبيدات) وفوسفات، كما تحتوي على أنزيمات الحلمهة (التحلل المائي) مثل أنزيمات البروتياز وأنزيمات الاستيراز، وإذا ما تحررت هذه الأنزيمات من الفجوة إلى السيتوبلاسما نتيجة لتعرض الخلايا لظروف غير مناسبة (مثل ارتفاع درجة الحرارة إلى 50°م) فإنها تسبب تحليل الحموض النووية والبروتينات والكربوهيدرات وتسمى هذه العملية بالتحلل الذاتي.(Miral *et al.*,2001).

6- الجسيمات الكوندرية (الميتوكوندريا):

هي جسيمات في السيتوبلاسما تعطيها المظهر الحبيبي، تحتوي على أنزيمات الأكسدة والإرجاع ويتراوح عددها في الخلية بين (4-24) موزعة قريبا من الغشاء السيتوبلاسمي.

7- النواة:

يطلق عليها البعض المواد النووية وهي محاطة بغشاء نووي مثقب وتوجد ملامسة للفجوة، ولكن أثناء التبرعم فإنها تكون موجودة بين الفجوة والبرعم المتكون، حيث تنقسم النواة بالاستطالة إلى نواتين تتحرك إحداهما إلى البرعم وتظل الأخرى في الخلية الأم(Pretorius, 2000)، تتكاثر معظم الخمائر خضرياً بالتبرعم Budding ولكن قليلاً منها يتكاثر بالإنقسام الثنائي البسيط والخلايا الناتجة عن التبرعم يمكن أن تبقى منفردة أو أنها تتصل مع بعضها لتشكل ميسيليوما كاذبا وكما يمكن أن تتكاثر الخمائر جنسيا عن طريق تشكيل الأبواغ الأسكية المتطورة عن اللاقح *Zygote* أو عن طريق خلايا خضرية يمكن أن تتكاثر الأنواع التابعة للجنس *Saccharomyces* لاجنسيا بطريقة التبرعم والأنواع التابعة لـ *Schizosaccharomyces* بواسطة الانقسام الثنائي البسيط، ويمكن للخمائر التابعة للفطريات الأسكية *Ascomycetes* أن تتكاثر جنسيا منتجة أبواغا أسكية ضمن كيس أسكي حيث يتشكل في كل كيس بين 2-8 بوغة وأحيانا 12 ومن أمثلتها الخمائر التابعة لرتبة *Endomycetales* علما أن بعض الخمائر غير القادرة على التكاثر جنسيا تتبع إلى الفطريات الناقصة *Deuteromycetes* مثل *Tourla lactis* التي تتكاثر بواسطة التبرعم فقط، وهناك خمائر تتصف بقدرتها على الانقسام الثنائي والتبرعم معا مثل الأنواع التابعة للجنس *Candida*(العيسى، 2005).

تأخذ خلية الخميرة شكل كروي أو بيضوي وقد تكون بشكل ثمرة الليمون أو اسطوانية أو مستطيلة، تستطيل بعض أنواع خلايا الخمائر مكونة جسماً خيطياً حقيقياً أو غير حقيقيا، لا تختلف أنواع الخمائر من حيث الشكل الظاهري أو من حيث التركيب فقط، ولكنها تختلف اختلافا كبيراً في الصفات الفيزيولوجية والمزرعية. على البيئات " الأوساط الزرعية " الصلبة: تكوّن الخمائر ذات المشيجة نمواً يشبه الفطريات يصعب غالباً تمييزه عن فطريات العفن، أما الخمائر وحيدة الخلية النموذجية فإنها تكوّن

مستعمرات تشبه كثيراً المستعمرات التي تكوّنها البكتيريا(Valois and Padilla Zakour, 2004)، وعلى البيئات أو الأوساط الغذائية السائلة: تنمو الخمائر الغشائية Film yeasts على السطح وتبقى عادة في هذا الوضع حتى ينكسر الغشاء أو يغوص عندما يثقل وزنه، وهناك خمائر أخرى تسمى بالخمائر السطحية أو القمية yeasts Top: تتجمع خلاياها في كتل تطفو بفعل الغاز الذي يعلق في الكتل فوق سطح السائل المتخمر، وسبب تشكل الغشاء هو أن الخمائر تشكل البراعم فتطفو على سطح السائل، وهناك نوع ثالث من الخمائر يعرف بالخمائر القاعية "خمائر القعر" yeasts Bottom حيث تنفصل البراعم المتكونة عن بعضها البعض وتسقط في قاع السائل المتخمر، ويكون معظم ناتجها من الكحول الإيتيلي " مع جزء قليل من غاز ثاني أكسيد الكربونCO_2 ، وتشمل هذه الخمائر معظم الخمائر المستخدمة في الصناعة، فالجنس *Saccharomyces* يمثل الخمائر التي تنتج الكحول الإيتيلي، حيث تستخدم الخميرة ذات الخلايا الدائرية في صناعة البيرة، في حين تستخدم الخميرة ذات الخلايا البيضاوية في صناعة النبيذ (Rajko and Janez,1999)، تقوم الخمائر الغشائية بوجه عام بأكسدة الأغذية العضوية مثل: السكريات والكحولات والحموض العضوية منتجة منها غاز ثاني أكسيد الكربونCO_2 مؤدية إلى بعض التغيير في المواد الغذائية من ناحية الطعم والرائحة والشكل وتسمى مثل هذه الخمائر بالخمائر الكاذبةFalse yeasts، أحياناً يطلق عليها Wild yeasts، أما الخمائر القاعية والسطحية فإنها عادة تخمر الأغذية الكربوهيدراتية منتجة غاز ثاني أكسيد الكربونCO_2 وكميات متفاوتة من الكحول الإيتيلي(Aleksander *et al.,* 2008)، الخمائر المخمرة "السطحية والقاعية " فهي ذات أهمية كبيرة في صناعة الخبز والمشروبات الكحولية والإنتاج الصناعي للكحول الإيتيلي ويطلق عليها اسم الخمائر الحقيقية yeasts True (walker, 1998).

2-3 - تصنيف الخمائر Classification of yeast:

قام العالم Lodder في عام 1950 بتصنيف الخمائر اعتماداً على الصفات المورفولوجية والقدرات الفيزيولوجية، أما العالم Barnett فقد اعتمد في عام 2000 بتصنيف الخمائر على الاختبارات التقليدية التي تتراوح مابين 60 إلى 90 اختبار، وتم مؤخراً تطوير طرق سريعة للتغلّب على صعوبة استخدام الطرق التقليدية وإحدى هذه الطرق هي تقنية الـ API 20 C AUX من الشركة الفرنسية Bio Merieux والتي استخدمت على نطاق واسع وتتكوّن من 19 اختبار تمثيلي (Verweij *et al.*, 1999). كما تم مؤخراً تطوير طريقة تدعى Rapid Yeast Plus Identification تتميّز بسرعة التمييز خلال 4 ساعات فقط، وذلك اعتماداً على الخصائص الفيزيولوجية بحيث لاتتطلّب نمو الخمائر لإجراء الاختبارات البيوكيميائية وبالتالي تقلّل زمن التشخيص (Covadonga *et al.*, 2002). تعتمد هذه الطريقة على التفاعلات الأنزيمية بين المواد المشكّلة للأنزيم، وتسمح بالتعرّف على الاختلافات ما بين أنواع الخمائر(Espinel *et al.,* 1998).

طرأ على التصنيف الميكروبيولوجي في العقد الأخير من القرن الماضي تغيّراً من خلال إدخال تقنية الـ PCR (Polymerization Chian Reaction) وقد استخدمت هذه الطريقة للتصنيف الميكروبي بشكل عام ثم اعتمدت بعد ذلك في تصنيف الخمائر (White *et al.*, 1990).

تعد طريقة الـ PCR والمتبعة بالرحلان الكهربائي وسيلة واعدة للتمييز السريع لسلالات الخمائر الممرضة والمعزولة من مستعمرات نامية على آجار الدم (Shin *et al.*, 2001)، من ناحية أخرى فإن أهمية الخمائر ليست محصورة بالحالات المرضية للبشر، وإنما لها دور هام في الصناعات الميكروبيولوجية والغذائية كصناعة الخبز والنبيذ وغيرها.

كما توجد خمائر ضارّة تنمو على بعض الأغذية مؤدية لفسادها، لهذا السبب كانت الحاجة لاستخدام طرائق التصنيف الدقيقة والسريعة لسلالات الخمائر لمراقبة العمليات التقنية الحيوية ولمعرفة مصدر تلوّث الأغذية، ولسوء الحظ فإن التقانات المستخدمة للتصنيف صممّت بالاعتماد على السلالات الممرضة وتستخدم للكشف عن الخمائر المتوحّشة (Covadonga *et al.*, 2002).

تعتمد طرائق التشخيص الجديدة بشكل رئيسي على تسلسل الأحماض النيوكليتيدية والتي عدّلت لكي تتضمّن عزلات الخمائر، بعض هذه الطرائق تتمتّع بإمكانية تشخيص عالية مثل تلك الطرائق التي تعتمد على تحليل الـ DNA (Esteve *et al.*, 2001).

- **تقنية API للتصنيف:**

تسمح هذه التقنية بالاستخدام الدقيق ل 19 اختبار بيوكيميائي لتمييز معظم الخمائر الهامة بعد 48 ساعة من التحضين (Espinel *et al.*, 1998)، استحدثت هذه الطريقة من قبل شركة Bio Merieux حيث تلقّح أمبولة وسط الـ API بخلايا الخميرة المنتقاة من المستعمرات الفردية، ويتم التشخيص بالاعتماد على الملحق المرفق مع الشريحة (Covadonga *et al.*, 2002).

طورت تقنية جديدة تدعى API Candida system لها المقدرة على تمييز 198 خميرة معزولة بالمقارنة مع الطريقة السابقة والتي تستخدم كطريقة مرجعية، وقد ميّزت هذه التقنية 91.4% و71.7% من العزلات مع وبدون اختبارات إضافية على الترتيب، ويعتقد بأن هذه التقنية سهلة وجيدة لتمييز الخمائر ويمكن استخدامها اعتيادياً في المخابر (Bernal *et al.*, 1998).

2-4- أنواع الكائنات الحية الدقيقة المسببة للفساد في عصير التفاح:

توجد الخمائر في عصائر الفاكهة بنسبة 90% بينما توجد البكتريا والفطور بنسبة 10% (Jian-keli *et al.*, 2007)، ويعد العصير من المركبات سريعة الفساد تحت تأثير الأحياء في ظروف التخزين غير المناسبة لذلك لجأ المصنعون إلى تحويل هذا العصير إلى مركزاته لإطالة مدة حفظه (Siuchnmska and Sobczak, 1983).

تستطيع الخميرة أن تخمر سكر الفاكهة التي تحتوي عادة على 6–12% فركتوز بدون معاملة سابقة للتخمر، والفاكهة التي تحتوي على كميات كبيرة من الفركتوز والسكروز هي العنب، والخوخ، والمشمش، والكمثرى، والأناناس، والتفاح . ظهرت منذ حوالي عشرة أعوام آراء تنادي بعدم استخدام هذه الفاكهة كمواد خام لإنتاج الكحول نظرا لارتفاع ثمنها، كما أن الفاكهة قابلة للفساد بسرعة مما يجعلها تفقد سكرها القابل للتخمر أثناء تخزينها، لكن الوضع اختلف الآن بعد زيادة أسعار الطاقة فهناك جهود كبيرة تبذل لبحث إمكانية الاستفادة من فاكهة المناطق الاستوائية والمناطق ذات المناخ شبه الجاف في إنتاج الكحول على المستوى الصناعي(Ebeler *et al.*, 2000)، وهناك أنواع من هذه الفاكهة مثل البلح وثمار شجرة المطر أعطت نتائج مبشرة في هذا الصدد، وبالفعل تستخدم عصائر الموز والبلح والأناناس والفائض من العنب أو العنب زائد النضج، كمواد خام محلية لإنتاج الإيثانول، كما تستخدم سكريات الذرة السكرية والمشروبات الرطبة ومخلفات صناعة الحلويات وسكريات خرشوف القدس. ونظراً لأن هذه المواد قابلة للتلف فيجب أن تستخدم بدون تأخير، ويحتوي عصير الذرة السكرية على حوالي 16% سكريات في صورة مثالية للتحول إلى كحول ولا تتطلب معاملة إنزيمية أو طبخ حراري مما يوفر 50% من الطاقة اللازمة لإنتاج الإيثانول واستخلاصه (Sun *et al.*, 2001)، كما أن المخلفات السليولوزية المتبقية تصلح عليقة جيدة للحيوانات. كذلك فإن الخرشوف أو ما يعرف بخرشوف القدس هو محصول سكري آخر يسود في شمال أمريكا، وتعطي سيقانه أكثر من 2 طن سكريات لكل هكتار كما تعطي درناته أكثر من 15 طن من الإنيولين لكل هكتار، وقد أمكن استخدام سيقانه ودرناته معاً كمواد خام لإنتاج الإيثانول بواسطة الخميرة *Kluyveromyces marxianus* وقدرت كمية الإيثانول المنتجة بأكثر من طن من السيقان وحوالي 7 طن من الدرنات بالنسبة لكل هكتار في السنة بدون القيام بتحليل السليولوز (Breisha , 1987).

أشار(Merai, 1991) عند مقارنته لنمو أنواع الكائنات الحية الدقيقة من فطريات *Aspergillus niger –Penicillum notatum* وخمائر *Sacchromyces cerevisiae* وبكتريا *Lactobacillus plantarum*، *Leuconostoc mesenteroides* في عصائر الفاكهة بتراكيز (30%) و (68%) خلال فترة التخزين (3أشهر) فتبين من خلال نتائجه ظهور تباين في النمو حيث كان النمو جيداً في الوسط ذو التركيز (30%) بينما انعدم في التركيز الآخر، واستنتج من ذلك أن هذه السلالات الميكروبية لا تنتمي إلى الأحياء الدقيقة الأسموفيلية وتوصل إلى إمكانية تخزين العصائر المركزة بتراكيز سكرية عالية خلال فترة زمنية تفوق ال(6 أشهر) دون أن يعترضها أي نوع من أنواع الفساد شريطة إتباع ظروف تخزينية سليمة وصحيحة (Tonon *et al.*, 2001).

تعمل بعض أنواع بكتريا حمض الخل على إفساد عصير التفاح الصافي الطبيعي حيث عزلت 5 أنواع مختلفة من بكتريا حمض الخل م 30– 40 عينة عصير تفاح كحولي وكانت بكتريا *Acenetobacter xylinum* الأكثر شيوعا في هذه العينات (Bernal *et al.,* 1998) عزلت سلالتين من بكتريا حمض

الخل (تنتج كميات كبيرة من حمض الخل) خلال تخمر عصير التفاح وذلك بتخزين عصير التفاح لعدة أشهر 3–10 أشهر على درجة الحرارة 37°م ووصل عددها إلى 900 خلية /مل، وبعد ذلك بدأ التعداد يتناقص بشكل ملحوظ في الأشهر الستة الأخيرة وأصبح هناك صعوبة في تحديد الكائنات الحية الدقيقة، وتعتبر الكربونات العالية والحرارة المنخفضة كافية لمنع تطور أي فساد في العصير ويكون النمو جيدا عند درجة الحرارة 20–25 °م ويقل عند 25–30 °م ويعاق النمو فوق 30°م وتبقى الخلايا قابلة للحياة أكثر من 12 أسبوع على درجة حرارة 20–25 °م وتلك البكتريا كانت سالبة الغرام ولا تشكل أبواغ وإيجابية الكتالاز (Brugnon *et al.,* 2009). ويتميز عصير الفواكه عموما بارتفاع حموضته كما يتميز بغناه بالسكريات الأمر الذي يكفي لتشجيع نمو الخمائر بدرجات الحرارة التي تتراوح بين 15.6– 53°م (باشا، 1992)، حيث تشكل الخمائر 90% من الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في عصير التفاح وتتبع الأجناس التالية:

Zygosaccharomyces , Saccharomyces , Schizosaccharomyces

وبعض الخمائر المتوحشة مثل:

Torulopsis , Cryptococcus , Rhodotorula , Hansenula ,Klockera , Candida

وجميعها تحدث تغيرات في الطعم واللون والرائحة مما يسبب فساد العصير ويجعله غير صالح للاستهلاك البشري (Thornton & Rodriguez, 1996)، وفي هذا الصدد أشار (Sobczak, 1991) إلى إمكانية تحديد وعزل أجناس وأنواع من الخمائر من خلال قدرتها على تخمير السكريات المختلفة (غلوكوز – جالاكتوز– مالتوز –لاكتوز –رافينوز).

حيث أن غالبية الخمائر تحتاج إلى سكريات أحادية أو ثنائية ويصعب عليها استهلاك السكريات المتعددة وهي لا تتمكن من اختراق جدران الخلايا النباتية إلا في حال تهتك هذه الجدران وبذلك تدخل إلى الداخل لتسبب تخمرات كحولية أو أكسدة وتكوين حموض عضوية (دباغ، 2004)، وهذا الاختلاف بين الخمائر بالقدرة على التخمير ناشئ عن اختلافها بمسارات الاستقلاب من خلال امتلاكها لجينات أو أنزيمات خاصة بها مثل جينات أو أنزيمات الأنفرتاز لعمليات تحول السكريات إلى كحول إيتيلي(Fregonesi *et al.*, 2007).

أجريت دراسة على كل من عصير التفاح الطازج والمتخمر والمخمر فتم عزل 6 أنواع من الخمائر صنفت كالتالي: *Kloeckera apiculata , Candida krusei, Candida valida, Candida sorbosa , Metschnikowia pulcherrima and Saccharomyces chevalieri* .(Ethirj *et al.*, 1983).

صنفت الخمائر المعزولة من عصير التفاح المجهز بطريقة الضغط الهوائي كالتالي :

Hanseniaspora valbyensis – Saccharomyces cerevisia Metschnikowia) (*pulcherrima* (Valdramidisa *et al.*, 2008)، بينما سادت الخميرتين:

S .bayanus *S.cerevisiae* في العصير المحضر بطريقة الضغط التقليدي ولوحظ أثناء التخمر تناوب الخمائر ففي البداية سادت *S.bayanus* أما في المرحلة المتوسطة عزلت *S.cerevisiae* وسيطرت *Hanseniaspora valbyensis* في نهاية عملية التخمر (Boulton *et al*.,1996).

عزلت كل من الخمائر التالية من عصير التفاح

Kluyveromyces marxianus, Candida krusei, Zygosaccharomyces spp . and *Rhodotorula*, وتم تحديد عدد الخمائر المتشكلة (سمك الغشاء الحيوي) في ظروف الجريان الصفائحي للعصير والساكن حيث اختلف عددها باختلاف سلالة الخميرة، وانخفض عدد كل من الخمائر *K.marxianus, R.mucilaginosa* , *C.krusei* في الظروف الساكنة بينما تزايدت أعداد *Zygosaccharomyces spp* (Brugnon *et al*., 2009).

2-5- انواع التخمرات:

عرف الإنسان التخمرات Fermentarion منذ قدم التاريخ عبر نشاطه الحياتي، فقد استخدم الخمائر Yeast لتحضير الخبز والبيرة والخمور والخل ومشتقات الألبان، دون أن يكون لديه أدنى تصور عن العوامل المسببة لها، وفي النصف الثاني من القرن التاسع عشر تحديدا استطاع باستور أن يحدد الطبيعة الحيوية لعملية التخمر باكتشافه أن هذه العملية تتم بفعل الأحياء الدقيقة، وكان هذا الاكتشاف بداية عصر جديد استطاع فيه الإنسان أن يستخدم الأحياء الدقيقة بأسلوب علمي في الصناعة. تقوم الأحياء الدقيقة خلال وجودها ونموها في الوسط الغذائي الملائم، بممارسة نشاطها الحيوي الذي يهدف إلى الحصول على الطاقة من خلال تحويل الكربوهيدرات وبعض المواد العضوية الأخرى إلى مواد جديدة، محدثة بذلك تغيرات عميقة في طبيعة مكونات الوسط (Gawel, 1998)، وتتم بعض هذه التغيرات في ظروف لاهوائية Anearobic مثل التخمر الكحولي Alcoholic fermentation، وتخمر حمض اللبن Lactic acid fermentation، ويتم بعضها في ظروف هوائية Aerobic مثل تخمر حمض الخل Acetic acid fermentation وتخمر حمض الليمون Citric acid، يلاحظ من التخمرات التي سبق ذكرها، أن بعضها تقوم به بكتريا مثل التخمر اللبني، وتخمر حمض الزبدة وتخمر حمض الخل (Fisher and Noble 1994)، وبعضها الاخر تقوم به الخمائر من مثل التخمر الكحولي (صناعة الكحول الإيتيلي والنبيذ والبيرة)، أما تخمر حمض الليمون فيقوم به فطر من نوع Aspergillus (صادق، 2005).

2-6- الظروف المناسبة لعملية التخمر الكحولي:

يتحول(في التخمر النموذجي) 95% من السكر إلى إيتانول (كحول إيتيلي) وغاز ثاني أوكسيد الكربون, و1% يتحول إلى مادة خلوية، ويبقى 4% تتحول إلى منتجات نهائية وفق المعادلة الكيميائية التالية (Ribereau_Gayon *et al*., 2000) :

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$$

غلوكوز إيتانول ثاني أوكسيد الكربون

وتعتمد هذه النسب المئوية على نسبة البادئ ودرجة حرارة التخمر والمادة المغذية (Zoecklein *et al*., 1995)، والظروف المناسبة لنمو الخميرة وحدوث التخمر هي محلول سكري بتركيز 10-18% ويفضل عادة أن يكون 12% ، pH=4-4.5 ، درجات حرارة 20-25 °م (أبو صالح والتل، 2009). أجريت دراسة لتقييم دور بعض العوامل الثابتة مثل pH ودرجة الحرارة ونسبة البادئ وتركيز السكر على إنتاج الكحول من عصير التفاح باستعمال خلايا خميرة *S.cerevisiae* فتبين أن pH=6 تركيز المحلول السكري 10% ودرجة الحرارة32.5° م ونسبة البادئ 8% حجما والمدة 24 ساعة تلك الشروط تعطي أعظم تركيز من الكحول (7.62%) (Szambelan *et al*., 2004).

يعرف الكحول الإيتيلي بروح الخمر ويتم اصطناعه من المحاليل السكرية المتخمرة بواسطة خميرة الجعة (Swiegers *et al*., 2005) ويتميز بأنه:

1- سائل لا لون له قابل للتطاير كثافته 0.816.

2- يغلي بالدرجة 80 °م ويشتعل بلهب أزرق .

3- يتمدد بالحرارة وينكمش بالبرودة ولا يتجمد.

4 - يدخل في بناء المشروبات الكحولية بالنسب التالية :

البيرة 2-4%، العرق العادي 12- 20%، النبيذ والمشروبات الكحولية المركزة مثل الوسكي والشامبانيا والفودكا بنسبة 35-50% (Carrau *et al*., 2005).

5- يستعمل في صناعة العطور وله نوعين لذلك :

- كحول طبيعي: يعرف باسم الكحول الطبي تركيزه يتراوح مابين 70- 98% وهو يستعمل في صناعة العطور المختلفة .

- كحول صناعي: ويعرف باسم الكحول الفرنسي وهو مخصص لغسيل ماكينات النسيج ويمكن أيضا استعماله في صناعة العطور (Bell and Henschke, 2005) .

6- يدخل كمادة وسيطية في العديد من الصناعات الكيميائية .

7- يستخدم كمذيب في صناعة الصبغات والزيوت والشموع وأدوات التجميل .

8- يستخدم في التطهير في المستشفيات والمنازل والمختبرات.

9- يستخدم كوقود بخلطه بالبنزين بنسبة 10%.(Ugliano *et al*., 2006).

- **مواصفات التخمر:**

يجب أن تتم عملية التخمر تحت الظروف التالية : نسبة السكر 10-18%، درجة الحموضة

4–5، درجة الحرارة 21–27° م، مدة التخمير 2–3 أيام، نسبة الكحول عند نهاية التخمر العملية 6–9 %، نسبة تحول السكر إلى كحول 90–98%. (Campos *et al.*, 2002).

- **المسار الأيضي للتخمر:**

إن المهتمين بإنتاج الكحول الإيتيلي مهما كان تخصصهم لابد وأن يكون لديهم فكرة عن مسارات التفاعل التي يمر بها السكر من أول دخوله إلى داخل الخلية حتى إنتاج الكحول. وبدون إلمام المنتجين بهذه المسارات لن يستطيعوا معرفة أسباب توقف أو مشاكل التخمر التي غالباً ما تكون مرتبطة بانحراف التفاعل عن مساره الطبيعي. وليس بالضرورة أن يكون صاحب المشروع عالماً في الكيمياء الحيوية، ولكن على الأقل لابد أن يكون لدية خلفية لما يحدث داخل المخمر وهذا ما سوف نبسطه فيما يلي:

تتم تفاعلات تكوين الكحول الإيتيلي على عدة مراحل:

المرحلة الأولى: يتم في هذه التفاعلات دخول سكر الغلوكوز إلى داخل خلية الخميرة، حيث أن المواد ذات الوزن الجزيئي الكبير لا يمكن أن تدخل إلى الخلية (Burns *et al.*, 2001)، وبالتالي لابد وأن تتحلل أولاً إلى سكر الغلوكوز الذي يمكنه الدخول إلى الخلية لصغر حجمه.

المرحلة الثانية: تسمى الغلكزة Glycolysis وهي تحول أو تحلل أو أكسدة الغلوكوز إلى جزيئين حامض بيروفيك وهي أول مرحلة في تمثيل المواد الكربوهيدراتية وتتم داخل السيتوبلازم في جميع الكائنات الحية ويطلق عليها أيضاً مسار إيميدن مايرنهوف (Embden–Meyernhof Pathway). وتتم عملية الغلكزة في خطوات عديدة وتشمل كثير من الإنزيمات ولكنها ببساطة شديدة عبارة عن انشطار جزيء سكر الغلوكوز ذو الست ذرات كربون إلى جزيئين متشابهين كل منهما عبارة عن سكر ذي ثلاث ذرات كربون (Girard *et al.*, 1997). وتتأكسد جزيئات كل من السكرين ذو الثلاث ذرات كربون إلى حامض بيروفيك. أي أنه خلال عملية تحلل الغلوكوز ينتج لكل جزيء غلوكوز 2 جزيء حامض بيروفيك. ينتزع الهيدروجين في هذه العملية من الغلوكوز وتستقبله مرافقات الإنزيم NDA الموجودة في الخلية فتختزل إلى الصورة NADH2 . ومن المهم أيضاً الإشارة إلى أن عملية تحلل الغلوكوز لا يمكن أن تستمر إلا إذا حدث إعادة أكسدة للصورة المختزلة من مرافق الإنزيم NAD والتي نتجت من خطوات نزع الأيدروجين(Renolds *et al.*, 2001).

المرحلة الثالثة: تبدأ بعد إنتاج حامض البيروفيك وفيها يقوم إنزيم Carboxylase الذي يسود في الخمائر بنزع مجموعة الكربوكسيل من حامض البيروفيك لينتج عن ذلك أسيتالدهيد وثاني أكسيد الكربون كما يلي:

$$CH_3COCOO+H^+ \rightarrow CH3CHO + CO_2$$

تتحد الأسيتالدهيد الناتجة في وجود الماغنسيوم (^{++}Mg) مع مركب Thiamine pyrophosphate ويتكون مركب وسطي أمكن تعريفه حديثاً وأطلق علية اسم الأسيتالدهيد النشطة Active acetaldehyde(Jackson, 2000).

المرحلة الرابعة: مع سيادة إنزيم Carboxylase في الخمائر وسيادة الظروف اللاهوائية لا تذهب الأسيتالدهيد النشطة في اتجاه دورة كربس وإنما تتحلل الأسيتالدهيد النشطة مرة أخرى معطية أسيتالدهيد حرة تختزل إلى كحول الإيثانول عن طريق ذرتي أيدروجين يتم الحصول عليهما من إعادة أكسدة $NADH_2$ الناتجة من عملية تحلل الغلوكوز التي تقوم بها الخميرة بشكل جيد.

$$CH_3CHO + NADH_2 \rightarrow CH_3CHOH + NAD$$

يخدم تكون كحول الإيتانول من الناحية الفسيولوجية غرضين مهمين لحياة الخلية وهما:

- إزالة الأسيتالدهيد المتكونة أول بأول إذ أنها سامة لخلايا الميكروبات.
- يسمح باستمرار عملية الـ Glycolysis وإلا يمكن أن تفشل نظراً لتراكم $NADH_2$ بدون إعادة أكسدة (بريشة، 2011)، يتم استخلاص الكحول بالتقطير ثم تمرير الناتج على أعمدة الكربون النشط للتخلص من الشوائب وثاني أوكسيد الكربون يتم تحويله إلى ثلج جاف لرفع القيمة الاقتصادية لعملية التخمر، وتجفف خلايا الخميرة كإضافة إلى أعلاف الحيوانات كمصدر للبروتين والفيتامينات (Quoted *et al.*, 1996).

2-7- العوامل المؤثرة في إنتاج وتركيز الكحول:

يحتاج كل مصنع لإنتاج الكحول إلى تحسينات مستمرة في عملية التخمر نفسها. وقد وجد العلماء أن الطريقة الابتدائية لتقليل تكلفة الإنتاج هي الآليات التي تؤدي إلى زيادة التركيز النهائي للإيثانول، هذا الهدف بالإضافة إلى زيادة معدل التخمر هما أساس التقنيات الحديثة في إنتاج الكحول، بمعنى آخر إذا أمكن زيادة تركيز الكحول عن طريق زيادة تركيز المادة الأولية (المادة الخام) وفي نفس الوقت زيادة معدل تصنيع الكحول بواسطة خلايا الخميرة وتقليل كمية الماء المستخدم مما يؤدي إلى اختصار زمن التخمر، و كل ذلك سيؤدي إلى تقليل تكلفة عملية الإنتاج

(Bernal *et al.*, 1998)، وأهم العوامل المؤثرة في إنتاج وتركيز الكحول هي:

2-7-1- تركيز المحلول السكري:

تحتاج غالبية الخمائر إلى سكريات أحادية أو ثنائية ويصعب عليها استهلاك السكريات المتعددة، وهي لا تتمكن من اختراق جدران الخلايا النباتية إلا في حالة تهتك هذه الجدران وبذلك تدخل إلى الداخل لتسبب تخمرات كحولية أو أكسدة وتكوين حموض عضوية (دباغ، 2004). أجريت دراسة لتحديد التركيز الأمثل من السكر اعتمادا على النشاط التخمري للخميرة حيث تم تطبيق الشروط التالية:

pH =6 ودرجة الحرارة 30 °م واستمر التخمر لمدة 24 ساعة وباستخدام بادئ *Saccharomyces cerevisiae*، بينما طبقت عدة تراكيز من المحلول السكري كالتالي 6- 7- 8- 9-10 %، فكان أعظم تركيز للكحول هو 9.35 % (أي أعظم نشاط للخميرة) عند التركيز10% ، في دراسة أخرى تبين أن رفع تركيز السكر في العصير من 200 غ /ل إلى 300غ /ل ينقص معدلات نمو بعض الخمائر مما يؤدي إلى نقص في الوزن الجاف لكل من الخمائر المدروسة التالية : (*Kloeckera*

apiculeta ,Torulaspora delbrueckii , Pichia anomala, and Saccharomyces وأنواع *Candida* وفي نهاية المطاف تتناقص كتلة الخلايا (*cerevisiae*
(Charoenchai *et al.*, 1998). تبين لدى إجراء دراسة على تأثير تركيز السكر في معدل التخمر حيث تمت إضافة 0.5 % من الجلاتين للعصير مع تسخينه وذلك لتخفيض المحتوى من التانينات ثم أضيف عصير فاكهة مركز لرفع تركيز السكر، و أضيف 0.1% من داي أمونيوم هيدروجين الفوسفات (كمصدر للنتروجين) وبذلك أصبح سائل التخمر جاهز وانتهى التخمر خلال أسبوع وارتفع المحتوى من الكحول 8.25% وزادت قدرة الخميرة *Saccharomyces cerevisiae var ,* *ellipsoideus* على تحمل الكحول وخزن النبيذ لمدة 6 أشهر مع احتفاظه بكامل خواصه الفيزيائية والكيميائية والحسية (Simon *et al.*, 1996). ويكون الاحتفاظ بحمض الأسكوربيك أفضل عند التركيز العالي من السكر، كما أن كل من الحموضة الطيارة والاسترات والفينولات الكلية والألدهيدات تزداد عند التركيز العالي من السكر (Luis *et al.*, 2004).

2-7-2- تأثير درجة الحموضة :

تعتبر درجة الحموضة عامل مهم من أجل نمو الخمائر ويتراوح pH المناسب لنمو الخميرة من 4-6 (Quoted *et al.*, 1996)، وأجريت تجربة لتحديد الـ pH المناسب لنمو الخميرة تم فيها تطبيق الشروط المثلى لتخمر الخميرة مع تغيير قيم الـ pH 4- 5 -6 – 7-8 فكان أعلى تركيز كحول عند pH=6 حيث بلغ 6.91 %(Ough and Amerine, 1988) .

تبين أن تغير متوسط الـ pH ما بين 3-4 لا يبدي أي فرق معنوي في معدل نمو الخمائر *(Kloeckera apiculeta ,Torulaspora delbrueckii , Pichia anomala ,Various candida Species* , and *Saccharomyces cerevisia*)
أو كتلة خلاياها (charoenchai *et al.*, 1998)

2-7-3- تأثير درجة حرارة التخمر :

تتناسب كمية الكحول المنتجة مع ارتفاع درجة الحرارة حيث بينت التجارب أن تركيز الكحول يزداد بزيادة درجة الحرارة من 25-32.5°م مع بادىء من *Saccharomyces cerevisiae* وفيما بعد هذا المستوى يتناقص تركيز الكحول ويكون أعلى معدل عند درجة الحرارة 32.5° م حيث بلغ 8.53% خلال زمن التخمر 24 ساعة (Zhang *et al.*, 2007).

لقد درس(Bilbao *et al.*, 2010) تأثير درجة الحرارة (10 – 25)°م في بقاء ونمو كل من *Saccharomyces cerevisiae* و*Kloeckera apiculata* خلال تخمر عصير التفاح فتبين أن نمو وبقاء *Saccharomyces cerevisiae* لا يتأثر بالحرارة ولا بوجود *Kloeckera apiculata* ، وإن نمو هذه الأخيرة يتزايد بشكل أساسي عند درجة الحرارة 10°م مع إنتاج أكبر كمية من أسيتات

الإيتيل وأن تركيز أسيتات الايتيل كان بأدنى حدوده عندما كانت كلا الخميرتين تعملان معا عند الدرجة 25 , 10° م (Spilimbergo *et al.*, 2007).

درس (Charoenchai *et al.*, 1998) تأثير درجة الحرارة في معدل التخمر لـ 22 سلالة مختلفة من الخمائر، ووجدوا أن الحرارة العالية تزيد معدلات النمو وبعض الأنواع المختلفة من الخمائر امتلكت درجات حرارة محددة مثل *S.cerevisiae* *S.bayanus* والتي امتلكت نزعة لأن تكون أكثر احتمالا للكحول عند الحرارة العالية (Eglinton *et al.*, 2000)، وقد تبين لدى استخدام الـ *S.bayanus* لتعديل الخواص الكيميائية والحسية للنبيذ بدلا من*S.cerevisiae* أن *S.bayanus* ينتج تركيز عالي من بعض الكحولات وبشكل خاص

2-phenyl ethanol , 1-phenyl ethyl acetate , أكثر من *S.cerevisiae* (Antonelli *et al.*, 1999).

درست الظروف المناسبة لحدوث التخمر بواسطة خميرة *S. bayanus Ec1118* فتبين وجود علاقة طردية بين معدل التخمر ودرجة الحرارة حيث يزداد بارتفاعها ويصل إلى حده الأقصى عند الدرجة 25°م بينما تكون الأسترات بأعلى كمية عند الحرارة المنخفضة ومن خلال تطبيق عدة درجات حرارة أثناء التخمر وهي 15 -20 – 25- 30 °م تبين ما يلي : تتشكل المركبات التالية بأعلى كمية عند الدرجة 15°م :

2-phenethyl acetate , n-propoyl acetate , ethyl octanoate , isoamyl acetate , hexyl acetate , ethyl hexanoate , ethyl decanoate ,heptanol ,1-butanol، (John *et al.*, 1983).

ويتشكل المركب ethyl butyrate عند الدرجة 20 °م، وتشكلت المركبات التالية بأعلى كمية عند الدرجة 35°م: *2-phenetyl alcohol, pentanol , 1-propanol* وتزايد تركيز *epicatechin* , *catechin* (مواد غير مرغوبة) في النبيذ النهائي مع تزايد درجة الحرارة وأعلى تركيز منها كان عند الدرجة 25 °م، وجدت أعلى كمية كحول عند أعلى درجة حرارة (Gerbaux *et al.*, 2002).

أجري التخمر في شروط المصنع والمخبر لتبيان تأثير الحرارة ووسط الزرع على سلوك التخمر ونمو الخميرة مستعملين سائل التخمر الطبيعي والصناعي على التوالي ولوحظ تأثير درجة الحرارة والزراعة على سلوك التخمر والمركبات اللبيدية في الخمائر ومركبات النكهة في النبيذ، فتبين أن الحرارة المنخفضة تؤدي إلى تخمر بطئ ومعدل تخمر قليل، حيث تراوح معدل التخمر من 18.6 إلى 23% عند درجة حرارة 25 °م، بينما كان 8.6 و 10.9%عند درجة حرارة 13 °م. وقد وصل إلى أعلى قيمة في المصنع، وكان تركيز المركبات الطيارة في أعلى معدل في سائل التخمر الطبيعي، ووأثرت درجة الحرارة بنفس الطريقة على التخمر في المخبر والمصنع (Kato *et al.*, 2003). تزيد الحرارة

المنخفضة نسبة الأحماض الدهنية و*Fusel alcohol acetate ester* و *ethyle ester* وتخفض من الحموض الطيارة، وأعلى تركيز من الأحماض الدهنية كان الهكيسانيك، وكان أعظم احتباس للتربينات في التخمر الصناعي عند كلا درجتي الحرارة. وكان محتوى حمض الخل والذي يمثل الحموضة الطيارة ينخفض بانخفاض درجة الحرارة في كلا وسطي التخمر لكن منتجاته كانت أعلى في التخمر الصناعي (Torija *et al.*, 2003a) .

درس(Kourkoutas *et al.*, 2001) كل من معدل النمو وكتلة الخلايا الأعظمية خلال التخمر الكحولي بفعل كل من (*Kloeckera apiculeta ,Torulaspora delbrueckii, Pichia anomala ,Various candida Species , and Saccharomyces cerevisiae*) عند درجات حرارة مختلفة 10- 15-20-25 ˚م فتبين أن معدلات النمو للخمائر آنفة الذكر تتزايد بارتفاع درجة الحرارة، ومن أجل معظم السلالات السابقة كانت كتلة الخلايا تبلغ حدها الأقصى عند الدرجة 15 ˚م وبعد هذه الدرجة لا يحدث أي تغيير أو زيادة أو نقصان، واستطاعت كل من السلالات *Candida stellata , Candida pulcherrima , Candida apiculeta Kloeckera*, *colliculosa* النمو بسرعة أكبر من *Saccharomyces cerevisiae* وهذا ما يدل على تطورها المبكر في التخمر الكحولي (Charoenchai *et al.*, 1998).

2-7-4- تأثير السلالة ونسبة البادئ:

من المفيد أن نعرف أنه لا يوجد حتى الآن نوع واحد من الخميرة يمكنه أن يستخدم كل المواد الخام الصالحة لإنتاج الكحول، فعلى سبيل المثال فإن الخميرة *Saccharomyces spp* لا تمتلك الجينات التي تنتج الإنزيمات المسؤولة عن تحويل المواد الخام إلى سكريات قابلة للتخمر مثل إنزيمات الأميليز أو إنزيمات السليوليز أو إنزيمات بيتا جلوكوسيديز (إنزيمات اللاكتيز) كما أنها أيضاً لا تستطيع إنتاج الإنزيمات التي تهدم السكريات الخماسية(Noble, 1999). ولذلك فإن الاتجاه السائد الآن في أبحاث الخمائر هو تطوير أو إنتاج سلالات من الخميرة لها القدرة على الاستفادة من عدد متنوع من المواد الخام بمعدلات سريعة عند درجات حرارة مرتفعة ولها القدرة أيضاً على تحمل تركيزات عالية من السكر ومن الكحول الذي تنتجه، يعد تحمل درجات الحرارة المرتفعة صفة هامة جداً بالنسبة للخميرة المستخدمة في إنتاج الكحول لأن تخمر الكحول ينتج عنه كمية كبيرة من الحرارة، ومشكلة عدم تحمل درجات عالية من الحرارة تعتبر مشكلة خطيرة جداً في مناطق من العالم يتوفر فيها معظم وأرخص المواد الخام المستخدمة في إنتاج الكحول ولكن ترتفع فيها درجات الحرارة الطبيعية أو البيئية. وقد تمكنت إحدى الشركات في كندا وهي شركة Labatt Brewing أن تطور سلالة من الخميرة تستطيع أن تقوم بالتخمر الكحولي عند درجة حرارة أعلى من 40°م. وقد تم إنتاج هذه السلالة عن طريق تقنيات التهجين Hybridization وعزلت في البرازيل خمائر تتحمل درجات عالية من الضغط الأسموزي ولها إنتاجية عالية من الكحول كذلك عزلت خمائر متحملة لدرجات الحرارة العالية حيث كان يتم التخمر على درجة حرارة أعلى من 44°م.

وعلى الرغم من ذلك لا توجد أبحاث كثيرة على إنتاج الكحول بكميات كبيرة باستخدام هذه الميكروبات. ولذلك تركزت الأبحاث حالياً على استخدام الخمائر التي تتحمل درجات حرارة عالية في إنتاج الكحول، ومن حسن الحظ أن الخمائر التي تتحمل درجات حرارة عالية تتوزع في أجناس مختلفة مثل جنس *Saccharomyces*و *Kluyveromyces* و *Fabospora* التي وجد أنها يمكن أن تقوم بالتخمر في درجات حرارة 40 و43 و46°م على الترتيب مع إنتاجية عالية من الكحول. (Mobini-Dehkordi *et al*., 2007).

إن البحث عن خمائر تتحمل درجات حرارة عالية يعتبر عامل هام جداً في تقليل تكاليف تبريد المخمرات خلال أشهر الصيف في البلاد شبه الاستوائية والاستوائية. كذلك يقلل إنتاج تركيز عالي من الكحول في درجات الحرارة العالية من تكاليف عمليات التقطير، ولذلك فإن هناك محاولات دائمة للحصول على سلالات من الخمائر تنتج الكحول عند درجات حرارة أعلى من 40°م. ومن هذه المحاولات، نقل صفات تحمل الحرارة العالية من بعض الميكروبات المحبة لدرجات الحرارة العالية إلى سلالات الخميرة ذات الكفاءة العالية في إنتاج الكحول، ولكن تظل عملية الاختيار التقليدية للسلالات من بيئات مختلفة هي الطريقة الرئيسية لاختيار الخمائر المحبة للحرارة المرتفعة(Killian and Ough, 1979). تتحدد مصادر العينات التي يحتمل أن يوجد بها خمائر تتحمل درجات حرارة عالية في مصدرين الأول هو الاختيار من خزانات التخمير في مصانع المشروبات الكحولية والثاني هو العزل من البيئات الطبيعية وخصوصاً المناطق الحارة، تمكن العلماء من عزل سلالات من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* قادرة على النمو عند 52°م وقادرة على التخمير عند 50°م من أحد مصانع المشروبات الكحولية في الهند، وعزل ثمانية سلالات من الخميرة *Candida* المحبة لدرجات الحرارة المرتفعة من أحد الينابيع الحارة (Gerbaux *et al*., 2002) ووجد أن ثلاث من هذه السلالات لها نشاط تخمري عالي عند درجات حرارة 48-55°م. ولذلك فإن هذا هو العمل الأول الذي يجد خمائر يمكن أن تقوم بالتخمر الكحولي فوق 51°م. كذلك فإن هناك أبحاث مستمرة للحصول على طفرات من الخميرة *Saccharomyces spp* معدلة الحامض النووي DNA الموجود في الميتوكوندريا بحيث أن الإنزيمات الضرورية للنمو الهوائي تكون غير كافية أي أن الخميرة يمكن أن تنمو في ظروف غير هوائية. مثال آخر وهو ما يعرف بالخميرة السوبر Super yeast وهي الخميرة *Schwanniomyces alluvius* أو الخميرة .*Schw.castellii* هذه الخمائر السوبر تمكن العلماء من إنتاجها وهي تمتلك صفة نادرة وهي احتوائها على إنزيمات ألفا أميليز وجلوكو أميليز، وبالتالي فإن هذه الخمائر قادرة على تخمير النشا بشكل مباشر إلى كحول دون الحاجة إلى تحويله إلى سكريات قابلة للتخمر أولاً. وقد حاول العلماء استخدام هذه الخميرة السوبر في إنتاج الكحول بشكل تجاري إلا أنهم اكتشفوا أن هناك مشكلة أخرى وهي أن هذه الخميرة لا تتحمل الكحول الذي تنتجه عند تركيز أعلى من4.7% (حماد، 2010). جرت محاولات للدمج الوراثي بين الخميرة السوبر وسلالة من الخميرة *Saccharomyces spp* التي تتحمل تراكيز عالية من الكحول

وكانت النتيجة هي الحصول على سلالة لها قدرات متوسطة. وعلى أية حال لا يمكن حتى الآن استخدام الخميرة السوبر في إنتاج الكحول كوقود وربما يحتاج الأمر إلى بضعة سنوات حتى يتم ذلك، ولكن قد تستخدم هذه الخميرة في المستقبل القريب في إنتاج أنواع من البروتين تستخدم في النواحي الصحية.

لا يمكن لكل سلالات الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* المستخدمة حاليا أن تنمو أو تخمر السكريات الخماسية، ولذلك أجريت أبحاث كثيرة على الخمائر *Candida* و *Pichia* وأعطت نتائج واعدة لاستخدام هذه السكريات في المستقبل. كذلك تمت دراسات لنفس الغرض على الخميرة *Pachysolen tannophilus* (هذه الخميرة لا تتحمل تركيزات عالية من الإيثانول) وأعطت أيضاً نتائج جيدة (بريشة ، 2011).

تأتي الـ *Saccharomyces cerevisiae* في مقدمة الخمائر القادرة على القيام بالتخمر الكحولي(Moss and Long, 2002) وتعتبر هي المسؤولة عن التخمر الكحولي حيث تحول السكر إلى كحول إيتيلي وهي تسيطر في المراحل الأولى من عملية التخمر الكحولي

(Selvakumar and Pandey, 1999) وعزلت الخمائر التابعة لـ *Metschenkowia pulcherrima var.zitae* من سائل التخمر أيضا وكانت أقل تحملا للكحول المنتج وغير قادرة على إتمام تخمير السكر الموجود في سائل التخمر(Pandey *et al*., 2000). أثبت (Berisha, 1987) أن خميرة الـ *Saccharomyces spp* تكون متحملة لتركيز عالي من الكحول عندما يكون الأكسجين ومصادر النيتروجين القابل للتمثيل عند مستويات مثلى، لأن هذه الظروف تؤدي إلى الوصول إلى أعلى عدد من الخميرة بحيث يكون هذا العدد كافي لتخمير الكربوهيدرات الزائدة وبذلك لا يتوقف التخمر، هذه التقنية تسمح بإنتاج كميات أكبر من الكحول في نفس المصنع وبنفس العمالة، أمكن تخمير محلول سكري يحتوي على 35% سكروز إلى 16% كحول وذلك عن طريق تغذية الخميرة بشكل دقيق أثناء التخمر وإمدادها بكميات من النيتروجين تتناسب مع تركيز السكر وبكميات محسوبة من الأكسجين فقط أثناء الإثني عشرة ساعة الأولى من التخمر، ومن ناحية أخرى فإن تحمل خلايا الخميرة للكحول يقل عندما تزيد الحرارة، فعند حرارة قريبة أو أعلى من 30°م فإن الوصول إلى هذه المستويات من الكحول غير ممكن. إلا أن العلماء وجدوا أنه من المؤكد أن هذه الدرجات من الحرارة لن تؤثر سلباً على التخمر إذا توفرت المواد الغذائية الميسرة للخميرة. يجب أن يلم بهذه المعلومة كل منتجي الكحول سواءً أكان بغرض استخدامه كوقود أو في المشروبات الكحولية، وما زال تحمل الخميرة لتركيزات عالية من الكحول حقلاً جيداً للبحث العلمي ويسترعى انتباه العلماء ويمكن القول أن مجمل رأي العلماء في زيادة مقدرة الخميرة على تحمل تركيزات عالية من الكحول تتلخص أيضاً في توفير المواد الغذائية الميسرة للخميرة، ويعتقد أن سمية الكحول بالنسبة للخميرة ترجع إلى تأثير الكحول على الغشاء الخلوي. وعلى أية حال فإن تحمل الخميرة لتركيزات عالية من الكحول يتحكم فيه بصفة عامة مغذيات الخميرة، ومستوى الكربوهيدرات في المادة الخام، ودرجة الحرارة، ودرجة الـpH ، والضغط

الأسموزي، وبعض النواتج النهائية الأخرى لعملية التخمر، وكل سلالة من الخميرة قد تتفاعل مع هذه العوامل بطريقة تختلف عن السلالات الأخرى
.(Mallouchos *et al*., 2003) في دراسة أخرى تبين أنه يمكن لعدد كبير من الخمائر القيام بالتخمر الكحولي وتأتي في مقدمتها *Saccharomyces cerevisiae* حيث تحول السكر إلى كحول وتشاركها الخمائر الأخرى في تعدد نكهات النبيذ، ومن هذه الخمائر والتي يمكن عزلها السلالات التابعة .(Kim and Rhee, 1999) *Metschnikowi pulcherrima* var. *zitsae*.

أضيف البادئ بنسبة حجمية 2-4-6-8-10% من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* وطبق أفضل pH=6، وأفضل درجة حرارة وهي 32.5 °م لزمن من التخمر بلغ 24 ساعة فكان أقصى تركيز كحول (8.8%) عند نسبة بادئ 10%(Campos *et al*., 2002).

أجريت دراسة أخرى وبنفس الشروط السابقة فكان أعلى تركيز كحول 7.64 %

(Szambelan *et al*., 2004). بينت دراسة أجريت لتحديد قدرة خميرة *S.cerevisiae* على تحويل السكر الموجود في العصير فكانت كفاءة التخمير 84.7 ± 4.2 ، ومعدل الكحول في مهروس التفاح 38.9 ± 1.9 غ/ل وكان الحجم الإنتاجي 6.3 ±0.5 غ/ل/سا (Dallman *et al*., 2005).

2-7-5- عوامل أخرى :

يلعب المحتوى النتروجيني دورا في التخمر إذ يعتبر عندها عامل نمو محدد للخمائر، ولذلك يتوجب إضافة النتروجين بشكل متكرر إلى وسط النمو(Fleet, 1996) تستعمل الفوسفات ثنائية الأمونيوم بشكل واسع من أجل زيادة محتوى النتروجين والفوسفور ليضمن محتوى نتروجيني كافي لنمو الخميرة، وتستعمل اليوريا وعدة خمائر تجارية كبديل لإضافة النتروجين، وأوصي بإضافة
200مغ نتروجين/ل بحيث يعتبر ذلك ملائم لنمو الخميرة وحدوث التخمر
.(Ebeler *et al*., 2000)

أضيفت في تجربة عدة كميات من النتروجين 200-250-300-350 مغ نتروجين/ل إلى سائل التخمر لتحديد الكمية الأفضل مع تطبيق الشروط المثلى لنمو الخميرة فكان تركيز الكحول
12.6- 13.5- 15.2- 16.45% على التوالي (Bisson and Butzke, 2000).

تسبب درجة حرارة التخمر والمستويات غير المناسبة من النتروجين عرقلة في عملية التخمر وهذا ما يدل على الدور الذي تلعبه المركبات النتروجينية في إتمام نجاح عملية التخمر
(Matthew *et al*., 2007)، وأشار آخرون إلى أن المستويات المنخفضة من المركبات النتروجينية مرتبطة مع معدلات التخمر المنخفضة وأزمنة التخمر الطويلة (Mallouchos *et al*., 2003) وتعتبر الأمونيا أفضل مصدر نتروجيني للخمائر، وتشير الدراسات إلى أن الأحماض الأمينية تزيد معدل التخمر وتنقص زمنه (Albers *et al*., 1996)، وأن مزج الأمونيا مع الأحماض الأمينية له تأثير أكبر على زيادة نمو الخمائر ومعدل التخمر (Ribereau Gayon *et al*., 2000)، وفي

دراسة أ خرى (Yadira *et al.,* 2005) تبين أنه لا يوجد ضرورة لإضافة مصادر نتروجينية لأن التخمر بدون مصادر نتروجينية يستمر 7 أيام لكي يتخمر كل السكر وهذا توافق مع (Torija *et al.*, 2003b) حيث احتاج السكر إلى 8 أيام ليتحول إلى كحول على الرغم من إضافة سلفات الأمونيوم كمصدر نتروجيني غلى سائل التخمر.

تحتاج عملية التخمير إلى الرج حيث تلعب سرعة الرج دورا في الحفاظ على تجانس الوسط خلال النظام التخمري، وتضمن توزيع مناسب للحرارة في الوسط، وتوفير تماس مناسب بين الكائنات الحية الدقيقة وموادها الأساس، ويقلل الرج من تأثير التراكيز العالية للكحول في نمو الخلايا.

(نعمة وعبدالواحد، 2010) .

2-8- تأثير التلقيح بالبكتريا والخمائر على نجاح عملية التخمر:

تم تلقيح مزيج من *Yeast and Lactic acid bacteria (LAB)* داخل سائل التخمر ولم يتبين أي تأثير سلبي لتزامن *Alcohol fermentation (AF)/Malolactic fermentation (MLF)* على نجاح عملية التخمر أو على كمية النبيذ أو نوعيته، ولم يكن هناك أي فرق معنوي للقيم النهائية لـ pH ، الحموضة الكلية، تركيز الكحول، غليسرين، حمض الستريك واللاكتيك، مركبات النتروجين، الأمونيا، اليوريا، الأسيت ألدهيد، الستيرولين، أورنيانين، وعلى كل حال أدى التلقيح المتزامن إلى إنخفاض كبير في مدة التخمر، وازدادت فعالية المالولاكتيك وهذا عائد إلى التركيز العالي من الكحول(13%) في النبيذ (Tonon *et al.*, 2001)، تزامن التلقيح بين الخمائر والبكتريا يؤثر على لون النبيذ الأحمر حيث تخمر الخميرة الحمض الأميني وتتشكل مركبات الكراباميل (اليوريا والسيترولين) بواسطة الخميرة والبكتريا وهذه المركبات تؤدي إلى تشكيل إيتيل الكربامات المسرطن في الخمائر مع الوقت (Liu and Pilone , 2000).

2-9- المنتجات الثانوية للتخمر:

تنتج الخمائر أكثر من 400 مركب خلال التخمر الكحولي لعصير التفاح ويأتي في مقدمتها الكحول الإيتيلي، ثم الأستر، أحماض عضوية، ألدهيدات، كيتونات، التربينات والتي تزيد من الصفات الحسية للنبذ الناتج (Pandey *et al.*, 2000). يعتبر الكحول المنتج الأساسي خلال التخمر الكحولي للسكر حيث يبدأ التخمر خلال 1-2 يوم ويستمر لعدة أسابيع إلى أن ينضج الخمر خلال 5-6 أسابيع ولنواتج التخمر تطبيقات صناعية وعلاجية، وبالإضافة إلى الكحول و Co_2 هناك بعض المنتجات الثانوية المرافقة ومنها : الريبوفلافين(Williamson *et al.*, 1994) وحمض الفوماريك

(Maicas *et al.*, 2002)، ويعتبر الأسيت ألدهيد أهم مركب كربونيلي يتشكل خلال التخمر والذي يكسب النبيذ النكهة ويلعب دور في حماية النبيذ من التأكسد (Mira *et al.*, 2001)، بالإضافة إلى المركبات المتطايرة النهائية والتي تتشكل بواسطة الخميرة ويعود منشأها إلى السكر، الأحماض الإمينية والتأييض الكبريتي بواسطة الخميرة (Fujii *et al.*, 1997).

ثالثا: مواد وطرائق البحث

MATERIALS AND METHODS

3-1- المواد وأوساط الزرع :

بيئة دكستروز البطاطا من شركة Scharlau Chemie S.A – SPAIN

Potato peptone 4 g/L , Glucose 20 g/L , Agar 15 g /L

بيئة مستلخص المولت من شركة (Sisco Research Labs – INDIA)

(Malt Protein substances < 5 % , Loss on drying <5% , Nacl < 1 %)

بيئة اغار مستلخص المولت من شركة (Scharlau Chemie S.A – SPAIN)

(extract 13 g /L , Dextrine 2.5 g/L , Gelatin peptone 5 g/L, Agar 15 g/L)

بيئة تمثيل السكريات (كبريتات الأمونيوم 5غ ، فوسفات البوتاسيوم الحامضية 1 غ ، كبريتات المغنزيوم المائية 0.5 غ ، كلوريد الكالسيوم المائي 0.1 غ ، كلوريد الصوديوم 0.1 غ ، محلول فيتامين 0.5 مل يحتوي :بيوتين 0.2 مغ ، بنتوثيانات الكالسيوم 40 مغ ، حمض الفوليك 0.2 مغ ، انزويت 200 مغ ، 5غ من السكر المدروس)، بيئة خالية من النتروجين (غلوكوز 10 غ ، فوسفات البوتاسيوم الحامضية 1 غ ، كبريتات المغنزيوم المائية 0.5 غ ، كلوريد الكالسيوم المائي 0.1 غ ، كلوريد الصوديوم 0.1 غ ، 0.75 غ KNO_3 كمصدر وحيد للنترات)، مستخلص الخميرة من شركة(USB Corporation – USA)، غلوكوز – يوريا – مركز عصير التفاح .

3-2- الأجهزة:

غرفة مزودة بالأشعة فوق البنفسجية Laminar flow(من شركة Bio Air - Italy)- حاضنة هزازة Rotary shaker (من شركة New Brunswick Scientific – U.S.A) – جهاز الطرد المركزي المبرد Bio Fuge (من شركة Heraeus – Germany) – مقياس الرقم الهيدروجيني pH-meter (من شركة Hanna – Romania)– حاضنة (من شركة Lab Tech – Koria)–– ميزان حساس Sensitive balance (من شركة Mettler Toledo – Taiwan)

مسخن مع محرك مغناطيسي(من شركة Boeco – Germany)- ميزان Balance(من شركة Mettler Toledo – Taiwan)- جهاز تقطير الماء (من شركة G F L – Germany)- رفراكتومتر – امبولات – ماصات – شرائح زجاجية – أغطية – أغطية بلاستيكية – المجهر الضوئي- دفتر الشيكات – الدليل الملحق بالـ API – شرائح API من شركة Bio Merieux، دوارق سعة(250- 500- 1000 مل).

- وقد تم إجراء البحث في مخابر كلية الزراعة في قسم علوم الأغذية في جامعة دمشق- مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية بجامعة دمشق- مخابر كلية الهندسة الكيميائية والبترولية في جامعة البعث.

3-3- طرائق البحث:

3-3-1- جمع عينات العصير: أحضر مركز عصير التفاح من معمل عصير الجبل في محافظة السويداء وذلك في شهر نيسان من عام2010، وأجريت التمديدات المناسبة بأخذ 1مل منه ووضعه في 9 مل ماء مقطر ومعقم .

3-3-2-عزل الخمائر على الاغار المائل:

أحضرت عينات عصير التفاح وعزلت منها 20 عزلة من الخمائر، أجريت على العينات الاختبارات الميكروبية اللازمة بإجراء التخفيفات وتوزيعها على أطباق بتري وإضافة بيئة دكستروز البطاطا لتنمية الخمائر بعد تعقيمها وتحضينها على درجة حرارة28°م لمدة 3 أيام، بعد انتهاء التحضين فحصت الأطباق وحددت الخمائر المختلفة بتمييزها عن بعضها حسب خصائص المستعمرات (الشكل والحجم واللون) عزلت الخمائر بطريقة التخطيط على الاغار المائل لبيئة دكستروز البطاطا، وحضنت على درجة حرارة 28°م لمدة تراوحت بين 24إلى 48 ساعة

3-3-3- تصنيف الخمائر:

3-3-3-1- تصنيف الخمائر مورفولوجياً :

أ- **تم التعرّف على أشكال مستعمرات الخمائر النامية** وتحديد صفاتها حسب (الحجم – الشكل – اللون – اللمعان – طبيعة الحافة – طبيعة المستعمرة سطحية أو عميقة) .

كما وصفت الخلايا مجهرياً حسب الشكل :(بيضوية – كروية – اسطوانية)– طبيعة البرعمة – إمكانية تشكيل الميسيليوم حقيقي أم كاذب حسب طريقة (Barnett *et al.,* 2000) .

ب- اختبار النمو في أوساط سائلة :

– حضّر وسط مستخلص المولت السائل وضبط تركيز السكر عند 8 % ووزّع الوسط ضمن زجاجات صغيرة معقمّة سعتها 20 مل ذات غطاء، لقحّت الزجاجات بالخميرة المراد تصنيفها بإبرة التلقيح وتمت متابعة المراقبة لهذه الزجاجات لمدة (3 – 7 – 14– 21) يوم مع ملاحظة ما يلي :

الراسب (خفيف – سميك – سميك جداً)

العكارة (خفيفة – كثيفة)

الحلقة (موجودة – غير موجودة)

الغشاء (سميك – خفيف – مرتفع أو منخفض عن السطح – قوامه – لونه).

ج- اختبار النمو في أوساط الزراعة الصلبة :

حضّر وسط آغار مستخلص المولت وضبط تركيز السكر عند 8 % ووزّع ضمن الأنابيب وتم تخطيط الخميرة على الآغار المائل، وحضّنت على درجة حرارة 28 مْ لمدة 4 أيام وتم الاحتفاظ بها كعزلة احتياطية نقيّة.

د- اختبار تشكّل الأبواغ الأسكية:

حضّر وسط آغار مستخلص المولت مع تغيير نسبة السكر إلى 4 %، وذلك لتحفيز الخميرة على التبوّغ في مثل هذه الظروف ، وخطّطت الخميرة على الآغار المائل وحضنّت على درجة حرارة 28 مْ، وتمت المراقبة لمدة (3- 7- 14-21) يوم، وأجري الفحص المجهري لمعرفة ما يلي:(عدد الأبواغ – شكلها – لونها – هل هي داخل الكيس الأسكي أم خارجه).

3-3-3-2- تصنيف الخمائر فيزيولوجيا :

- اختبار تخمر السكاكر بواسطة ال API:

تم توزيع 5 مل من الماء المقطر في العلبة البلاستيكية ذات الحفر وذلك من أجل خلق جو رطب، فتحت أمبولة suspension medium ذات ال 5 مل وتم التخلص من 3 مل والإبقاء على 2 مل عن طريق ماصة ميكروليترية، ثم أخذ جزء من مستعمرة الخميرة بواسطة إبرة التلقيح وذلك بعد تنشيط الخميرة لمدة 24 ساعة، وضعت الخميرة ضمن الأمبولة وأخذ منه 100 ميكروليتر بعد المزج الجيد ووضعت ضمن أمبولة أخرى c medium الحاوية على 7 مل ورجت، ثم أخذ 100 ميكروليتر من الأمبولة وملئت الحفر الموجودة في شريحة الـ API الحاوية على السكاكر بحيث تملأ كل حفرة بـ 100 ميكروليتر من الوسط ثم غلفت الشريحة بغطائها ووضعت في الحاضنة لمدة 24إلى 72 ساعة، أخذت النتائج ودونت الأرقام في دفتر الشيكات وجرت مقارنة تسلسل الأرقام بدليل ال API الملحق وذلك للتعرف على جنس ونوع الخميرة المختبرة .

- اختبار تخمر السكريات :

السكاكر المدروسة هي :غلوكوز، غالاكتوز، مالتوز، سكروز، رافينوز، ميليبيوز، لاكتوز، تحضر بيئة ماء الخميرة ويضاف لها السكر المدروس بنسبة 2% وتوزع في أنابيب اختبار مضاف لها أنبوبة درهام بعد ضبط الـ pH =6 ثم تعقم على درجة حرارة 100°م مدة 30 دقيقة (تندلة) ثم تلقح بالخمائر المدروسة وتحضن على درجة حرارة 25°م وتراقب عملية التخمر 3-7-14-21 يوم وتسجل نتيجة التخمر +: قدرة ضعيفة على التخمر ، ++: قدرة متوسطة على التخمر ، +++: قدرة عالية على التخمر ، - : لا يوجد تخمر .

- **اختبار تمثيل السكريات:**

حضرت أنابيب اختبار تحوي 5 مل من بيئة تمثيل السكاكر ولقحت بالخميرة المدروسة وضبط الـ pH=6 ثم حضنت البيئات على درجة حرارة 25°م وتم مراقبة النمو 3-7-14-21 يوم وذلك برج الأنبوبة ووضعت قطعة كرتونية مخططة بالأسود خلفها وسجلت النتائج حسب درجة العكارة +: قدرة ضعيفة على التمثيل، ++: قدرة متوسطة على التمثيل ، +++: قدرة عالية على التمثيل -: لا يوجد قدرة على التمثيل.

- **اختبار تمثيل النترات من أصل معدني:**

حضرت أنابيب اختبار تحوي 5 مل من بيئة خالية من النتروجين ولقحت بالخميرة المدروسة وضبط الـ pH=6 ثم حضنت البيئات على درجة حرارة 25°م وتم مراقبة النمو 3-7-14-21 يوم وذلك برج الأنبوبة ووضع قطعة كرتونية مخططة بالأسود خلفها وسجلت النتائج حسب درجة العكارة

+: قدرة ضعيفة على التمثيل ، ++ قدرة متوسطة على التمثيل ، +++قدرة عالية على التمثيل ،

- لا يوجد قدرة على التمثيل .

3-3-4- الغربلة screening:

أجريت الغربلة من أجل انتخاب أفضل الخمائر من حيث قدرتها على تخمير عصير التفاح وإنتاج الكحول الإيتيلي بناء على اختبار تخمر الغلوكوز حضرت بيئة ماء الخميرة وأضيف لها الغلوكوز بنسبة 2% ووزعت في أنابيب اختبار مضاف لها أنبوبة درهام بعد ضبط الـ pH =6 ثم عقمت على درجة حرارة 100°م مدة 30 دقيقة (تندلة) ثم لقحت بالخمائر المدروسة وحضنت على درجة حرارة 25°م وتمت مراقبة عملية التخمر 3-7-14-21 يوم وسجلت نتيجة التخمر +: قدرة ضعيفة على التخمر، ++ قدرة متوسطة على التخمر، +++ قدرة عالية على التخمر، - : لا يوجد تخمر.

3-3-5- دراسة القدرة التخميرية وأمثلة ظروف التخمر:

أجريت عمليات التخمير على درجات حرارة 27 ، 31 ، 35°م عند درجات pH 4.5 ، 5.5 ، 6. 5 ، باستخدام تراكيز مختلفة من السكر (TSS) 8 - 10 - 12% وكانت نسبة البادئ 6% لكل العينات، وحضر العصير بتمديده بالماء المقطر وبعدها تم ضبط TSS حسب التراكيز المحددة سابقا بواسطة جهاز الرفراكتومتر وتم ضبط الـ pH بإضافة HCL(0.1 نظامي) ، NaoH (0.1 نظامي) حسب الحاجة ووزعت تلك الكمية من العصير في دوارق سعة 500 مل بحجم 250 مل عصير في كل دورق وأجريت لها عملية تعقيم بالأوتوغلاف (121°م /20 دقيقة)، ومن جانب آخر حضر مستخلص الخميرة بإذابة 10 غ من *Yeast Extract Powder* و 12.5 غ من سكر الغلوكوز في 1000 مل ماء مقطر وسخن على النار مع التحريك (بوضع محرك مغناطيسي) حتى الغليان وعقم المستخلص بالأوتوغلاف 121°م \21 دقيقة، ونشطت الخميرة على المستخلص السابق لمدة 24 ساعة في الحاضنة الهزازة من نوع (New Brunswick Scientific) في درجة حرارة 30°م (Mariam *et al.,* 2009). ولقح العصير المجهز انفا بالبادئ بنسبة تلقيح 6% و وضعت الدوارق الملقحة بالحاضنة الهزازة بعد أن تم ضبط درجة الحرارة وسرعة الدوران 150 دورة في الدقيقة وكانت مدة التخمير 50 ساعة، وأخرجت الدوارق من الحاضنة و وزعت على أنابيب التثفيل سعة 50 مل، ثم ثفلت بالمثفلةependorff بسرعة 3000 دورة /15 دقيقة لفصل الكتلة عن السائل، ثم قيس تركيز الكحول الناتج كنسبة مئوية(V\V) باستخدام جهاز ملحق بالمخمر وكان يتم ذلك بغمس الكترود في 10 مل

من السائل المثقل بعد رفع درجة حرارته إلى 30°م بوضعه في حمام مائي طيلة فترة القياس ويشترط في ذلك أن يبقى الضغط 4 ضغط جوي وكانت تظهر القراءة على الشاشة وتؤخذ عند ثباتها.

3-3-6- تصميم التجربة لأمثلة ظروف التخمر :

درست الظروف المثلى لإنتاج الكحول الإتيلي من عصير التفاح المخمر بواسطة خميرة *Saccharomyces cerevisiae -Candida gulliermondi-*

Kluyveromyces lactis من حيث (درجة الحرارة – درجة الحموضة– تركيز السكر TSS) باستخدام البرنامج الإحصائي Minitab والتصميم الإحصائي (RSM) Response Surface Methology كل متغير درس عند 3 مستويات (1+ , 0 , 1-) كما يلي :

درجة الحرارة 27-31-35°م.

درجة الحموضة pH : (4.5-5.5-6.5).

تركيز السكر(%):(8-10-12).

يتضمن التصميم 20 معاملة لكل خميرة موضحة في الجدول(1) :

جدول(1) تصميم التجربة حسب RSM

%TSS	pH	الحرارة °م	القطاعات
8	4.5	27	1
8	4.5	35	1
8	6.5	27	1
8	6.5	35	1
12	4.5	27	1
12	4.5	35	1
12	6.5	27	1
12	6.5	35	1
10	5.5	31	1
10	5.5	31	1
10	5.5	31	1
10	5.5	31	1
10	5.5	27	2
10	5.5	35	2
10	4.5	31	2
10	6.5	31	2
8	5.5	31	2
12	5.5	31	2
10	5.5	31	2
10	5.5	31	2

3 -3-7- تحليل التجربة :

يعبر عن العلاقة بين تركيز الكحول الإتيلي الناتج Response (Y) والمتغيرات الثلاث المدروسة Independent variables ($X_1-X_2-X_3$) بمعادلة من الدرجة الثانية كما يلي :

$$Y=a+bX_1+cX_2+dX_3+gX_1^2+hX_2^2+iX_3^2+LX_1X_2+mX_1X_3+pX_2X_3$$

حيث Y : العامل المدروس Response

$X_1 - X_2 - X_3$:المتغيرات Independent variables

constant : a

Linear coefficients : b,c, d

square coefficients : G,h,I

Interaction coefficients : L,m,p

رابعا: النتائج والمناقشة

RESULTS AND DISSECTION

4-1- الوصف المورفولوجي للخمائر:

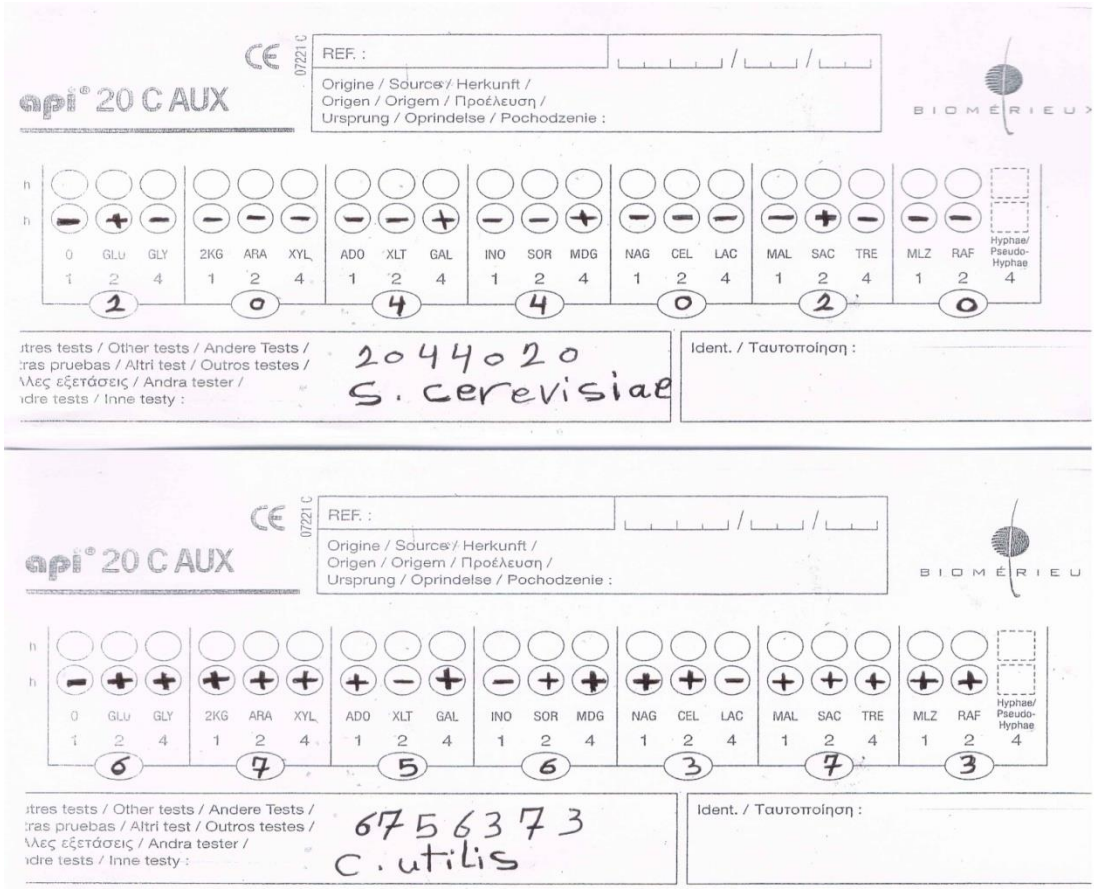
أجريت جميع التجارب الخاصة بتحديد هوية الخمائر مورفولوجيا بعد الرجوع إلى ما جاء في ملخص (Barnett, 2000) ودونت النتائج في الجدول (2) :

جدول (2) الوصف المورفولوجي للخمائر المعزولة من عصير التفاح

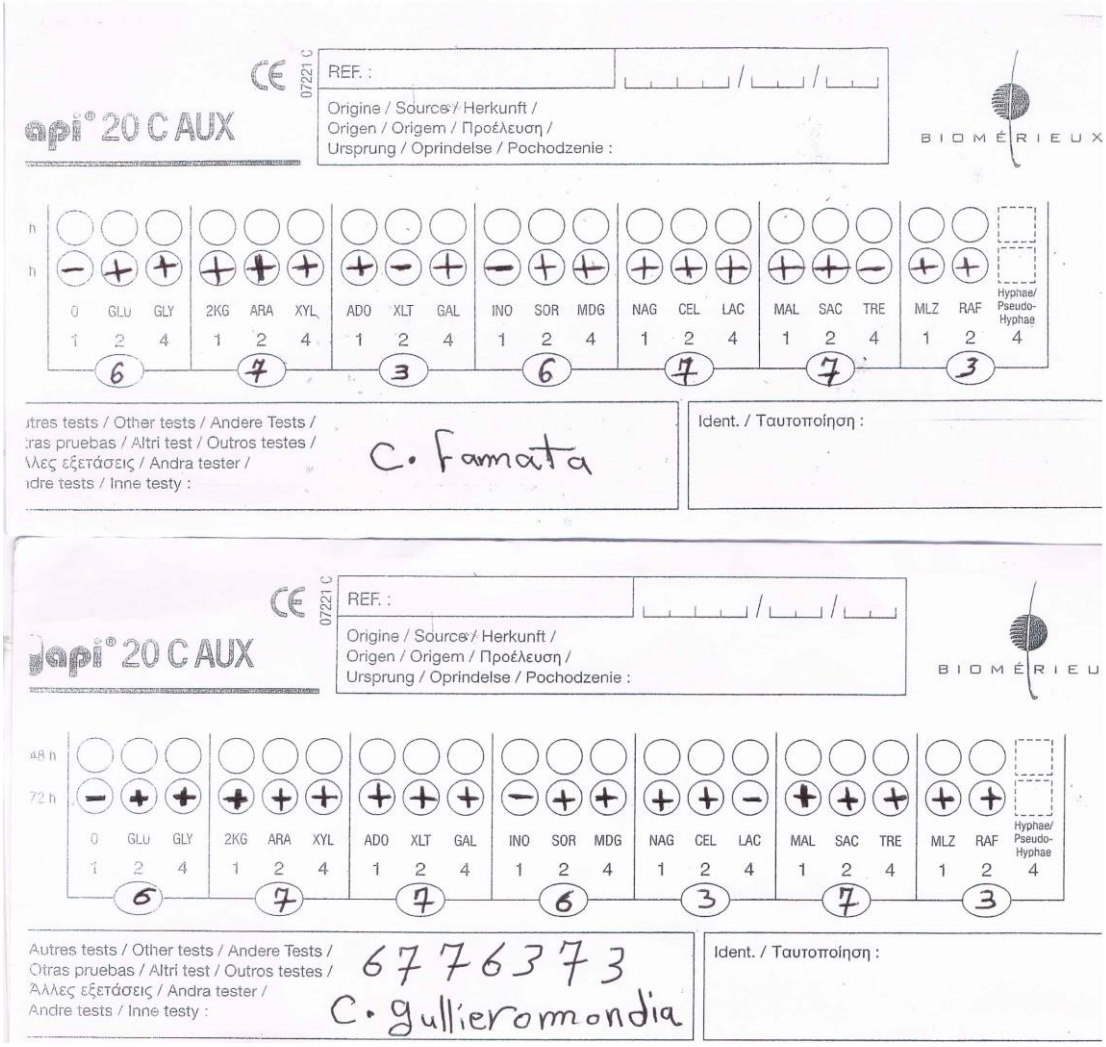
عدد العزلات	تصنيف حسب Barnett	شكل الخلية	طبيعة البرعمة	إمكانية تشكيل الميسيليوم	نوع الأبواغ	الراسب	العكارة	الحلقة	الغشاء
8	*Saccharmyces*	بيضوية إلى دائرية	محيطية	–	أسكية (2-4) بوغ	+	+	–	–
9	*Candida*	بيضوية إلى أسطوانية	محيطية	ميسيليوم كاذب	بالاستية وكلاميدية	–	+	+	+
3	*Kluyveromyces*	بيضوية إلى أسطوانية	محيطية	ميسيليوم كاذب	أسكية (1-70)بوغ	–	+	+	+

4-2- الوصف البيوكيميائي للخمائر بواسطة الـ API لتحديد النوع :

يبيّن الشكل (1) كيفية تصنيف بعض الخمائر عن طريق الـ API لتحديد جنس ونوع الخميرة بالاعتماد على المجموع الرقمي لكلّ من السكاكر المخمّرة ذات الرمز موجب (+) في كل خانة، مع إهمال المجموع الرقمي للسكاكر غير المخمّرة ذات الرمز سالب (–) في كل خانة، ومع ترتيب الأرقام من اليسار إلى اليمين، ويلاحظ من الشكل التالي ما يلي : بمقارنة هذه النتائج مع ما ذكر من أجناس الخمائر المصنّفة موروفولوجياً نجد بأنها كانت متطابقة مع ما ذكر في أجناس الخمائر للباحث (Barnett, 200).



الشكل (1-أ) تصنيف الخمائر باستخدام شريحة API



الشكل (1–ب) تصنيف الخمائر باستخدام شريحة API

أما الجدول (3) فيبيّن أنواع السكاكر المستقلبة من قبل الخمائر المصنّفة بواسطة الـ API والرموز المستخدمة في هذا الجدول تعبّر عن السكاكر التالية :

GLU: D– GLUCOSE

GLY : GLYCEROL

2KG : calcium 2 Keto – Gluconate

ARA : L – ARABINOSE

XYL : D– XYLOSE

ADO: ADONITO

XLT :XYLITOL

GAL : D– GALACTOSE

INO : INOSITOL

SOR : D– SORBITOL

MDG : Methyl–a D – Glucopyranoside

NAG : N– Acetyl–Glucosamine

CEL : D– CELLOBIOSE

LAC : D– LACTOSE

MAL : D– MALTOSE

SAC : D– SACCHAROSE (sucrose)

TRE : D–TREHALOSE

MLZ: D– MELEZITOSE

RAF : D– RAFFINOSE

جدول(3) يبين أنواع السكاكر المستقلبة حسب الخمائر المصنفّة بواسطةAPI .

C. utilis	*C. gullerondi*	*C. famata*	*s.cerevesiae*	السكاكر والخمائر
–	–	–	–	0
+	+	+	+	GLU
+	+	+	–	GLY
+	+	+	–	2KG
+	+	+	–	ARA
+	+	+	–	XYL
+	+	+	–	ADO
–	+	–	–	XLT
+	+	+	+	GAL
–	–	–	–	INO
+	+	+	–	SOR
+	+	+	+	MDG
+	+	+	–	NAG
+	+	+	–	CEL
–	–	+	–	LAC
+	+	+	–	MAL
+	+	+	+	SAG
+	+	+	–	TRE
+	+	+	–	MLZ
+	+	+	–	RAF

4-3- التشخيص الفيزيولوجي لخميرة *Kluyveromyces* حسب Barrnet:

يبين الجدول(4) كيفية تصنيف خميرة ***Kluyveromyces*** لتحديد نوعها بالاعتماد على القدرة على اختبار تخمر السكاكر واختباري تمثيل السكريات والنترات :

جدول (4) التشخيص الفيزيولوجي لخميرة *Kluyveromyces*

أنواع السكاكر	تخمر السكاكر	تمثيل السكاكر	تمثيل النترات
غلوكوز	+	+	-
غالاكتوز	+	+	
مالتوز	-	+	
سكروز	+	+	
رافينوز	+	-	
مليبوز	-	-	
لاكتوز	+	+	

وحسب Barrnet فإن خميرة *Kluyveromyces lactis* تأخذ الرمز Gal\05\2A حيث:Gal:اختبار تخمر السكريات ، 0: تمثيل النترات ، 5: تمثيل السكريات ، 2A: التشخيص المورفولوجي.

وبناء عليه أمكننا تشخيص تلك الخمائر حيث يبين الجدول (5) الخمائر التي عزلت من عصير التفاح بعد زراعتها على وسط دكستروز البطاطا ونسب وجودها.

جدول (5)الخمائر المعزولة ونسب وجودها

الخميرة	عدد العزلات	نسبة وجودها%
Saccharomyces cerevisiae.	8	40
Candida utilis .	3	15
Candida gulliermondi.	2	10
Candida famata	4	20
Kluyveromyces lactis	3	15

4-4- نتائج الغربلة:

بينت النتائج أن *Saccharomyces cerevisiae* ، *Candida gulliermoni* ، *Kluyveromyces lactis* هي الأفضل واختيرت لعملية الأمثلة لأنها تمتعت بسرعة وقدرة عالية على التخمر وتمثل ذلك بكمية CO_2 المتشكلة بأنبوبة درهام (اختبار تخمر الغلوكوز).

4-5-أمثلة ظروف إنتاج الكحول الإيتلي من عصير التفاح باستخدام التصميم الإحصائي(RSM):

4-5-1- خميرة *Saccharomyces cerevisiae* :

يبين الجدول (6) تركيز الكحول الناتج من تخمر عصير التفاح بوساطة خميرة *S. cerevisiae* حيث يلاحظ تباين تركيز الكحول (في هذه الدراسة) تبعا لشروط التخمر فقد بلغت أدنى قيمة لها في المعاملة 1 بينما ارتفعت قليلا في المعاملات 2-3-4-13 وازدادت بشكل ملحوظ في المعاملات 5-7-9-14-15 وبلغ تركيز الكحول 6.59 % في المعاملة 8 حيث كانت الظروف مناسبة للتخمر ونشاط الخميرة، و7.36% في المعاملة 18، بينما بلغ تركيز للكحول 7.42% في المعاملة 6 حيث كانت الظروف مثالية للتخمر كما هو موضح في الجدول (6).

جدول (6) تركيز الكحول الناتج من تخمر عصير التفاح بوساطة خميرة ***S. cerevisiae***

المعاملات	الحرارة °م	pH	%TSS	تركيز الكحول % (v\v) *S.cervisiae*
1	27	4.5	8	3.40
2	35	4.5	8	4.64
3	27	6.5	8	4.28
4	35	6.5	8	4.52
5	27	4.5	12	5.87
6	35	4.5	12	7.42
7	27	6.5	12	5.23
8	35	6.5	12	6.59
9	31	5.5	10	5.83
10	31	5.5	10	5.83
11	31	5.5	10	5.83
12	31	5.5	10	5.83
13	27	5.5	10	4.87
14	35	5.5	10	5.58
15	31	4.5	10	5.76
16	31	6.5	10	5.35
17	31	5.5	8	4.85
18	31	5.5	12	7.36
19	31	5.5	10	5.83
20	31	5.5	10	5.83

يبين الجدول (7) تأثير العوامل المدروسة (كل عامل على حدة، ومربع العوامل، والعلاقة بين العوامل) في تركيز الكحول كمايلي :

1- **Linear effect وتعني تأثير كل عامل لوحده في تركيز الكحول :**

تحتوي المعادلة على 3 متغيرات (درجة الحرارة – pH – تركيز السكر)، نلاحظ من الجدول أن قيمة P لكل من درجة الحرارة وpH وتركيز السكر أقل من 0.05 (P<0.05) وبالتالي هناك تأثير خطي معنوي لكل من هذه المتغيرات الثلاثة في تركيز الكحول.

2- **Squares effect وتعني تأثير العوامل مربعة في تركيز الكحول :**

تحتوي المعادلة على 3 متغيرات مربعة (Temperature*Temperature، pH*pH ، TSS*TSS) ونلاحظ من الجدول أن قيمة P لكل من T^2، TSS^2 كانت أقل من 0.05 (P<0.05) وهذا يعني أن هناك تأثير معنوي لهذين العاملين في تركيز الكحول، والعلاقة بين كل من هذين العاملين وتركيز الكحول على شكل قطع مكافئ بينما كانت قيمة P للـ pH^2 أكبر من 0.05 (P>0.05) وهذا يعني أن العلاقة بين pH وتركيز الكحول غير معنوية .

3- Interraction effect وتعني تأثير العوامل المترابطة (المتداخلة) في تركيز الكحول:

تحتوي المعادلة على 3 علاقات تداخل بين المتغيرات الثلاث وهي

(pH*TSS ،Temperature*TSS،Temperature*pH)

نلاحظ من الجدول (7) أن علاقة درجة الحرارة كانت معنوية مع TSS وغير معنوية مع pH وكانت علاقة pH و TSS أيضا معنوية وهذا يدل على أن تأثير درجة الحرارة يتغير بتغير تركيز السكر ولا يتغير بتغير pH كما أن pH يتغير بتغير تركيز السكر.

معامل التحديد R^2 = 98.2 % وهذا يدل على أن العوامل الثلاثة (درجة الحرارة – pH – تركيز السكر) مسؤولة عن 98.2 % من مقدار التغير في تركيز الكحول الناتج .

واعتماداً على الجدول (7) يمكن كتابة المعادلة كما يلي :

$$Y=-23.7024+1.8154X_1+3.0315X_2-2.1146X_3-0.0328X_1^2-$$
$$0.1918X_2^2+0.0964X_3^2-0.0089X_1X_2+0.0366X_1X_3-0.0834X_2X_3$$

جدول(7) معامل الانحدار للكحول المنتج من خميرة *S. cerevisiae*

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-23.7024	5.72324	-4.141	0.002
Temperature	1.8154	0.38987	4.657	0.001
Ph	3.0315	1.18763	2.553	0.029
Brix	-2.1146	0.55466	-3.812	0.003
Temperature × Temperature	-0.0328	0.00605	-5.416	0
pH×Ph	-0.1918	0.0968	-1.982	0.076
Brix × Brix	0.0964	0.0242	3.984	0.003
Temperature ×pH	-0.0089	0.01419	-0.628	0.544
Temperature × Brix	0.0366	0.00709	5.165	0
pH× Brix	-0.0834	0.02838	-2.94	0.015

يبين الجدول (8) أنه يوجد متغير واحد (Linear) على الأقل من المتغيرات المفردة الثلاث معنوي لأن ($P < 0.05$)، كما يوجد متغير مربع واحد (Square)على الأقل من المتغيرات المربعة الثلاث معنوي ($P < 0.05$)، ويوجد علاقة ترابط واحدة (Interraction) على الأقل من علاقات الترابط الثلاث معنوية حيث ($P < 0.05$) .

Lack–of–Fit : ويعبر عن مدى التطابق بين تركيز الكحول الناتج بشكل عملي (إجراء التجارب) وتركيز الكحول الناتج بشكل نظري (تطبيق المعادلة السابقة) وكانت قيمة $P<0.05$ وهذا يدل على أن المعادلة تشرح بشكل جيد التغير في تركيز الكحول .

جدول(8) تحليل التباين للكحول المنتج من خميرة *S. cerevisiae*

Source	DF	Seq ss	Adj ss	Adj Ms	F	P
Regression	9	13.7957	13.79565	1.53285	59.48	0
Linear	3	11.6268	1.01004	0.336679	13.06	0.001
Square	3	1.2485	1.24851	0.41617	16.15	0
Interaction	3	0.9203	0.92031	0.30677	11.9	0.001
Residual Error	10	0.2577	0.2577	0.02577		
Lack-of-Fit	5	0.2577	0.2577	0.05154	0	0
Pure Error	5	0	0	0		
Total	19	14.0534				

4-5-1-1- تأثير درجة الحرارة في تركيز الكحول الإيتيلي :

بلغ أعلى تركيز للكحول عند درجة الحرارة 27°م:5.87 % حيث كان الـ pH= 4.5 وتركيز السكر 12%، وبلغ أعلى تركيز للكحول عند درجة الحرارة 31°م:7.36 % حيث كان الـ pH=5.5 تركيز السكر 12%، وبلغ أعلى تركيز للكحول عند درجة الحرارة 35°م: 7.42 % حيث كان الـ pH= 4.5 وتركيز السكر 12%، كما هو موضح في الجدول (6)، حيث تتناسب سرعة النمو طردا مع درجة الحرارة في المجال 30-36°م، وعكسا في المجال الأعلى 45- 50 °م، أما انخفاض درجة الحرارة فيؤدي إلى توقف النمو مؤقتا، أشار التحليل الإحصائي إلى أن الدرجة 35°م هي درجة الحرارة المثلى حيث وصل تركيز الكحول إلى 7.44% كما هو موضح في الشكل (4) وهذا توافق مع (Eglinton *et al.*, 2000)، بينما أشار (Zhang *et al.*,2007) في دراسته إلى أن أعلى تركيز للكحول كان 8.53% عند درجة الحرارة 32.5°م خلال زمن التخمر 24 ساعة.

4-5-1-2- تأثير درجة الحموضة في تركيز الكحول الإيتيلي :

بلغ أعلى تركيز للكحول عند pH=4.5 :7.42 % وكانت الظروف المرافقة لدرجة الحموضة هذه هي درجة حرارة 35°م وتركيز سكر 12% وهذا ما أكده التحليل الإحصائي للتجربة .

بلغ أعلى تركيز للكحول عند pH=5.5 :7.36 % وكانت الظروف المرافقة لدرجة الحموضة هذه هي درجة حرارة 31°م وتركيز سكر 12% .

بلغ أعلى تركيز للكحول عند pH=6.5 :6.59 %وكانت الظروف المرافقة لدرجة الحموضة هذه هي درجة حرارة 35°م وتركيز سكر 12% .

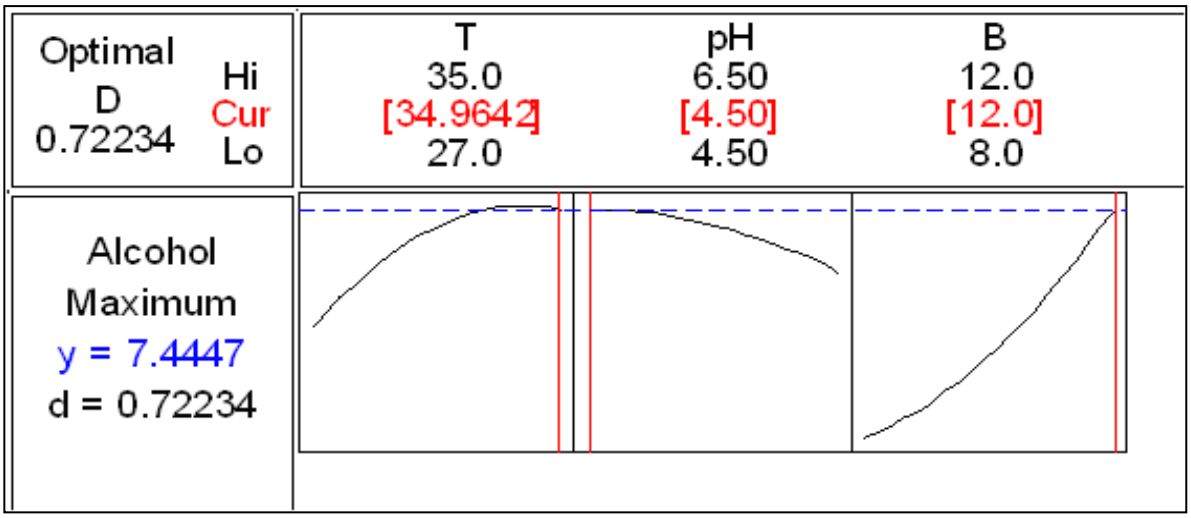
أشار التحليل الإحصائي للتجربة أن الـ pH المثالي لإنتاج الكحول هو pH=4.5 حيث بلغ تركيز الكحول 7.44% كما هو موضح في الشكل (2)، ويعد مجال الحموضة 5.5 – 4.5=pH هو الأمثل لنمو خلايا الخميرة وتكون أيضا قادرة على النمو في المجال الحمضي 3.5– 3 =pH إلا أن معدل نموها ينخفض، ويؤدي التذبذب في درجة الـ pH إلى وقف النمو بسبب تأثير هذا التذبذب على نشاط الأنزيمات وعلى انتقال المواد المغذية عبر الجدار الخلوي وعلى النشاط التنفسي، وهذا توافق مع (charoenchai *et al.*, 1998)، بينما أشارت دراسات سابقة مسجلة من قبل (Mobini Dehhkordi *et al.*,2007)، تم فيها تطبيق الشروط المثلى لعمل الخميرة ذاتها مع تغيير قيم الـ pH (4–5–6–7–8) فكان أعلى تركيز كحول عند 6 =pH حيث بلغ 6.91%.

4–5–1–3– تأثير تركيز السكر TSS في تركيز الكحول الناتج :

بلغ أعلى تركيز للكحول الناتج عند تركيز السكر 8% : 4.85 % وكان عندها الـ 5.5 = pH ودرجة الحرارة 31°م، وبلغ أعلى تركيز للكحول الناتج عند تركيز السكر 10% :5.83 %وكان عندها الـ 5.5 = pH ودرجة الحرارة 31°م، وبلغ أعلى تركيز للكحول الناتج عند تركيز السكر 12%:7.42 % كان عندها الـ 4.5 = pH ودرجة الحرارة 35 °م حيث يتناسب تركيز الكحول طردا مع ارتفاع تركيز السكر، وبين التحليل الإحصائي أن TSS=12% هي تركيز السكر الأمثل حيث بلغ تركيز الكحول 7.44% كما هو موضح في الشكل (2)، بينما أشارت دراسات مسجلة من قبل (Szambelan *et al.*,2004) أجراها لتحديد تركيز المحلول السكري الأمثل لنمو الخميرة تم تطبيق الشروط التالية : pH=6، ودرجة الحرارة 30°م، واستمر التخمير لمدة 24 ساعة باستخدام بادئ من *Saccharomyces cerevisiae* بينما طبقت عدة تراكيز من المحلول السكري كالتالي:

6–7–8–9–10% فكان أعظم معدل كحول هو 9.35% عند التركيز 10%.

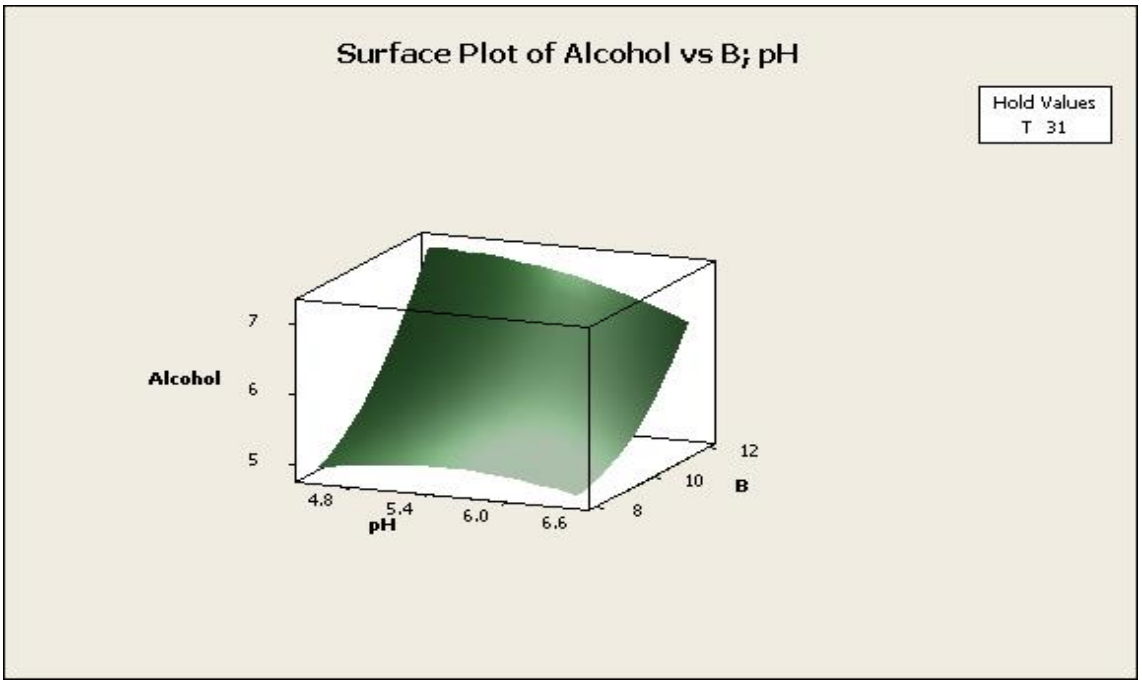
إذا الظروف المثلى لعمل خميرة *Saccharomyces cerevisiae* هي : درجة حرارة 35°م ، pH 4.5، تركيز السكر 12% حيث بلغ تركيز الكحول عند هذه الظروف 7.44% حيث تزايد تركيز الكحول بازدياد درجة الحرارة ووصل أعلى تركيز له عند35 °م وبعدها بدأ بالانحفاض تدريجيا، ووصل ذلك التركيز عند أول درجة حموضة مستخدمة 4.5 وبعدها بدأ بالانخفاض، بينما أخذ يتزايد بتزايد تركيز السكر تدريجيا وبلغ حده الأعلى عند أعلى تركيز سكر مستخدم(12%)، وهذا ما يوضحه الشكل (2):



شكل(2) أمثلة ظروف التخمر لـ خميرة *S. cerevisiae*

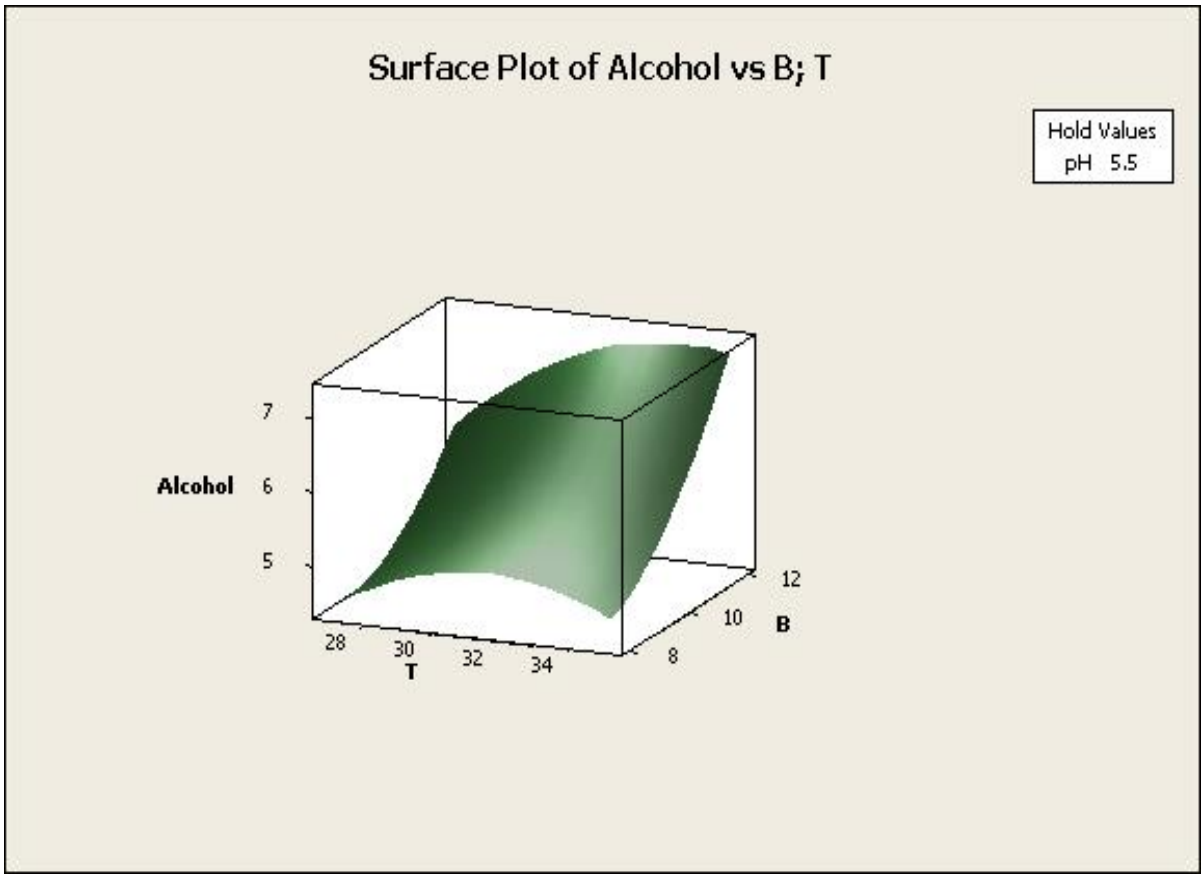
4-5-1-4- تأثير كل متغيرين معاً في تركيز الكحول الإيتيلي الناتج :

يبين الشكل (3) تأثير اثنين من المتغيرات (pH وتركيز السكر) في تركيز الكحول مع تثبيت درجة الحرارة على 31°م، حيث يلاحظ من الشكل أن تركيز الكحول لا يتأثر كثيرا بارتفاع قيمة الـ pH بينما يزداد بازدياد تركيز السكر حيث بلغ أعلى تركيز له عند تركيز سكر 12%، وكما أن تأثير تركيز السكر في تركيز الكحول الناتج يتغير بتغير pH والعكس صحيح وذلك لأن العلاقة بينهما معنوية.



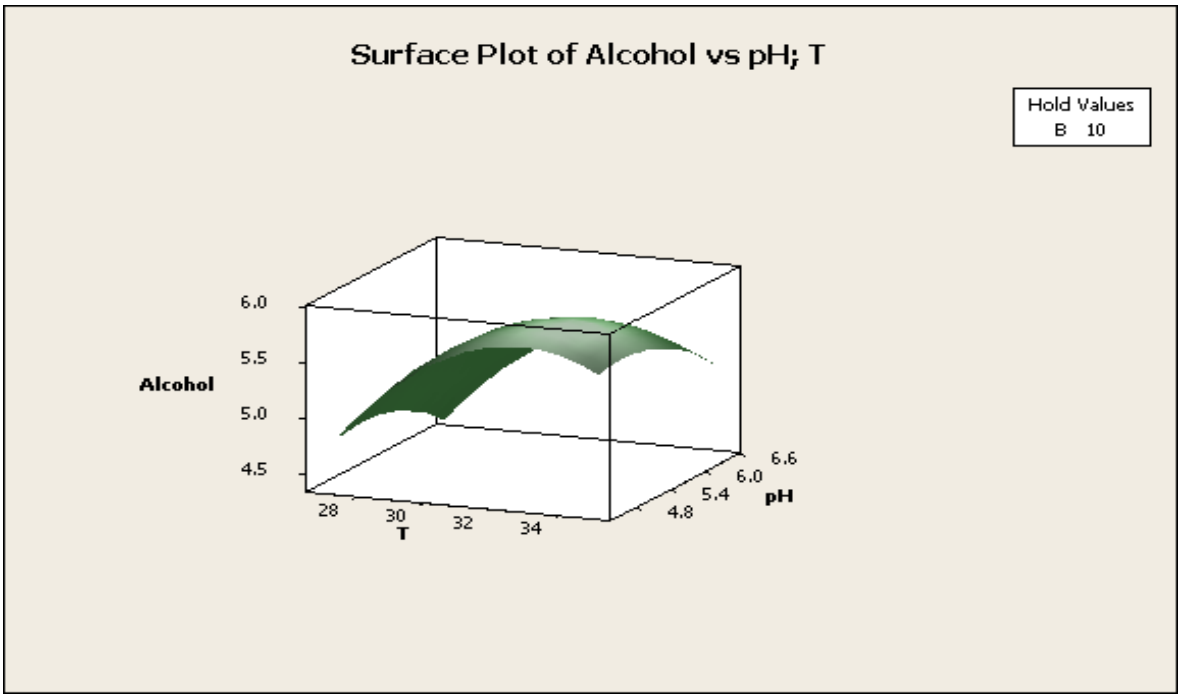
الشكل (3) تأثير تركيز السكر و درجة pH في تركيز الكحول(من*S.cerevisiae*)

يبين الشكل (4) تأثير كل من تركيز السكر ودرجة الحرارة في تركيز الكحول الناتج مع تثبيت الـ pH عند 5.5 فنلاحظ أن تأثير درجة الحرارة يتغير بتغير تركيز السكر ويزداد بزيادة كليهما حتى يصل أعلى قيمة له عند تركيز سكر 12% ودرجة حرارة 35°م.



الشكل (4) تأثير تركيز السكر ودرجة الحرارة في تركيز الكحول الناتج(من*S.cerevisiae*)

يبين الشكل (5) تأثير الـ pH ودرجة الحرارة في تركيز الكحول الناتج مع تثبيت تركيز السكر عند TSS=10% فنلاحظ أن تأثير درجة الحرارة في تركيز الكحول الناتج لا يتأثر بتغير pHلأن العلاقة بينها غير معنوية .



الشكل (5) تأثير درجة الحرارة والـ pH في تركيز الكحول الناتج من*S.cerevisiae*

4-5-2- خميرة *Kluyveromyces lactis*:

يبين الجدول (9) تركيز الكحول الناتج من تخمر عصير التفاح بوساطة خميرة *K.lactis* حيث *يبين* تباين تركيز الكحول تبعا لشروط التخمر فقد بلغ أدنى قيمة له في المعاملة 1: 2.26% بينما كان أعلى تركيز للكحول5.79% في المعاملة 6 حيث كانت الظروف مثالية للتخمر وتباينت ما بين هذين التركيزين في باقي المعاملات كما هو موضح في الجدول (9).

جدول(9) تركيز الكحول الناتج من تخمر عصير التفاح بوساطة خميرة K.l

المعاملات	الحرارة °م	pH	%TSS	تركيز الكحول %(v\v) *Kluyveromyces lactis*
1	27	4.5	8	2.26
2	35	4.5	8	3.32
3	27	6.5	8	3.19
4	35	6.5	8	3.21
5	27	4.5	12	4.43
6	35	4.5	12	5.79
7	27	6.5	12	4.17
8	35	6.5	12	5.25
9	31	5.5	10	4.41
10	31	5.5	10	4.41
11	31	5.5	10	4.41
12	31	5.5	10	4.41
13	27	5.5	10	3.43
14	35	5.5	10	4.72
15	31	4.5	10	4.34
16	31	6.5	10	4.41
17	31	5.5	8	3.98
18	31	5.5	12	5.50
19	31	5.5	10	4.41
20	31	5.5	10	4.41

يبين الجدول (10) تأثير العوامل المدروسة (كل عامل على حدة، ومربع العوامل، والعلاقة بين العوامل) في تركيز الكحول كمايلي:

1- Linear effect وتعني تأثير كل عامل لوحده في تركيز الكحول :

تحتوي المعادلة على 3 متغيرات (درجة الحرارة – pH – تركيز السكر)، نلاحظ من الجدول أن قيمة P لدرجة الحرارة أقل من 0.05 (P<0.05) وبالتالي هناك تأثير خطي معنوي بين درجة الحرارة وتركيز الكحول، بينما قيمة P لكل من الـpH وتركيز السكر كانت أكبر من 0.05 (P>0.05) اي أن العلاقة غير معنوية ما بين تركيز الكحول وكل من pH وتركيز السكر.

2- Squares effect وتعني تأثير العوامل مربعة في تركيز الكحول:

تحتوي المعادلة على 3 متغيرات مربعة (Temperature*Temperature، pH*pH ، TSS*TSS) ونلاحظ من الجدول(10) أن قيمة P لـ T^2 كانت أقل من 0.05 (P<0.05) وهذا يعني أن هناك تأثير معنوي لدرجة الحرارة في تركيز الكحول والعلاقة تكون على شكل منحني قطع مكافئ بينما كانت قيمة P لـ pH^2 و TSS^2 أكبر من 0.05 (P>0.05) وهذا يعني أن العلاقة بينهما غير معنوية .

3- Interaction effect وتعني تأثير العوامل المترابطة (المتداخلة) في تركيز الكحول:

تحتوي المعادلة على 3 علاقات تداخل بين المتغيرات الثلاث وهي

(pH*TSS ،Temperature*TSS،Temperature*pH)

نلاحظ من الجدول (10) أن علاقة درجة الحرارة كانت معنوية مع TSS و pH وكانت علاقة pH و TSS أيضا معنوية وهذا يدل على أن تأتير أي من هذه العوامل الثلاث في تركيز الكحول الناتج يتغير بتغير الاخر.

معامل التحديد R^2 = 97.8 % وهذا يدل على أن العوامل الثلاثة (درجة الحرارة – pH – تركيز السكر) مسؤولة عن 97.8 % من مقدار التغير في تركيز الكحول .

واعتماداً على الجدول (10) يمكن كتابة المعادلة كما يلي:

$$Y=-41.265+2.1343X_1+4.2292X_2-0.6401X_3-0.0322X_1^2-$$
$$0.1755X_2^2+0.0499X_3^2-0.0412X_1X_2+0.0213X_1X_3-0.1012X_2X_3$$

جدول(10) معامل الإنحدار للكحول المنتج من خميرة K.l

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-41.2650	6.10522	-6.759	0.000
Temperature	2.1343	0.41589	5.132	0.000
Ph	4.2292	1.26690	3.338	0.008
Brix	-0.6401	0.59168	-1.082	0.305
Temperature × Temperature	-0.0322	0.00645	-4.992	0.001
pH×pH	-0.1755	0.10326	-1.699	0.120
Brix × Brix	0.0499	0.02582	1.932	0.082
Temperature ×Ph	-0.0412	0.01514	-2.725	0.021
Temperature × Brix	0.0213	0.00757	2.808	0.019
pH× Brix	-0.1012	0.03027	-3.345	0.007

يبين الجدول (11) أنه يوجد متغير واحد (Linear) على الأقل من المتغيرات المفردة الثلاث معنوي لأن ($P < 0.05$)، كما يوجد متغير مربع واحد (Square)على الأقل من المتغيرات المربعة الثلاث معنوي ($P < 0.05$)، ويوجد علاقة ترابط واحدة (Interraction) على الأقل من علاقات الترابط الثلاث معنوية حيث ($P < 0.05$).

Lack–of–Fit : نلاحظ من الجدول أن ($P>0.05$) وبالتالي فهي معنوية التأثير وهذا دليل على أن المعادلة تشرح بشكل جيد التغير في تركيز الكحول.

جدول (11) تحليل التباين للكحول المنتج K.l

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	13.0212	13.02121	1.446801	49.34	0
Linear	3	10.8473	1.52442	0.508138	17.33	0
Square	3	1.3969	1.39691	0.465636	15.88	0
Interaction	3	0.777	0.77705	0.259017	8.83	0.004
Residual Error	10	0.2932	0.29325	0.029325		
Lack-of-Fit	5	0.2932	0.29325	0.05865	*	0
Pure Error	5	0	0	0		
Total	19	13.3145				

4-5-2-1 - تأثير درجة الحرارة في تركيز الكحول الإيتيلي :

بلغ أعلى تركيز للكحول عند درجة الحرارة 27°م : 4.43% وكان تركيز السكر 12% و pH=4.5
بلغ أعلى تركيز للكحول عند درجة الحرارة 31°م : 5.50% وكان تركيز السكر 12% و pH=5.5
بلغ أعلى تركيز للكحول عند درجة الحرارة 35°م : 5.79% وكان تركيز السكر 12% و pH=4.5
وبالتالي فإن أفضل درجة حرارة للتخمير وإنتاج الكحول الإيتيلي من عصير التفاح بوساطة خميرة *Kluyveromyces lactis* هي الدرجة 35°م كما هو موضح في الجدول (9)، وأشار التحليل الإحصائي إلى أن الدرجة 35°م هي درجة الحرارة المثلى حيث بلغ تركيز الكحول 5.9113%(v\v) وهذا ما أكده (Bilbao *et al.*, 2010) كما هو موضح في الشكل (6).

4-5-2-2- تأثير درجة الحموضة على تركيز الكحول الإيتيلي:

بلغ أعلى تركيز للكحول عند pH=4.5: 5.79% وكان تركيز السكر 12% ودرجة الحرارة 35°م
بلغ أعلى تركيز للكحول عند pH=5.5: 5.50% وكان تركيز السكر 12% ودرجة الحرارة 31°م
بلغ أعلى تركيز للكحول عند pH=6.5: 5.25% وكان تركيز السكر 12% ودرجة الحرارة 35°م
وبالتالي فإن أفضل درجة حموضة للتخمير وإنتاج الكحول الإيتيلي من عصير التفاح بوساطة خميرة *Kluyveromyces lactis* هي pH=4.5 وهذا ما توافق مع (Quoted *et al.*, 1996)، كما هو موضح في الجدول (9)، وأشار التحليل الإحصائي إلى أن الـ pH المثالي لإنتاج الكحول هو pH=4.5 حيث بلغ تركيز الكحول 5.91% كما هو موضح في الشكل (6).

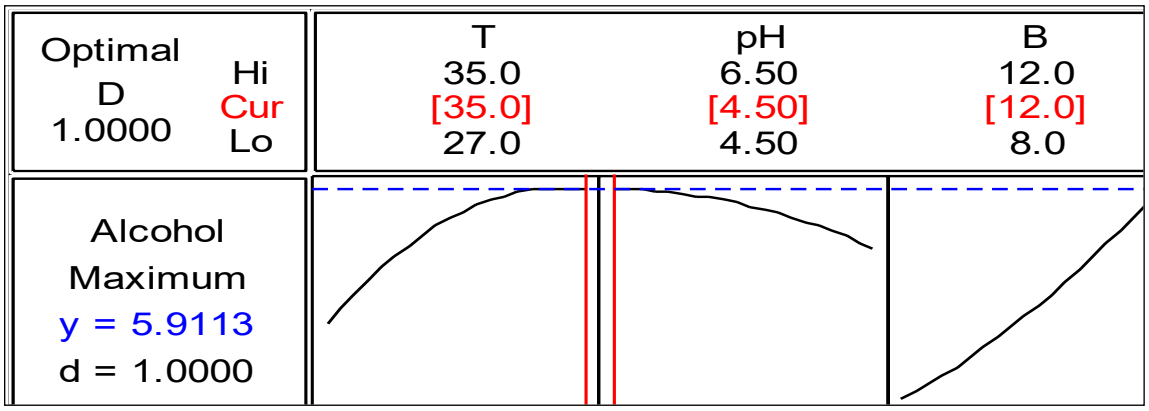
4-5- 2-3- تأثير تركيز السكر TSS في تركيز الكحول الناتج:

بلغ أعلى تركيز للكحول عند تركيز المحلول السكري 8%:3.98% وكانت درجة الحرارة عندها 31°م و الـpH=5.5.

بلغ أعلى تركيز للكحول عند تركيز المحلول السكري 10%:4.72% وكانت درجة الحرارة عندها 35°م و الـpH=5.5.

بلغ أعلى تركيز للكحول عند تركيز المحلول السكري 12%:5.79% وكانت درجة الحرارة عندها 35°م و الـpH=4.5، وهذا يدل على أن أعلى تركيز للكحول كان عند تركيز السكر 12% كما في الجدول (9)، وأشار التحليل الإحصائي إلى أن TSS=12% هي تركيز السكر الأمثل حيث بلغ تركيز الكحول 5.91% .

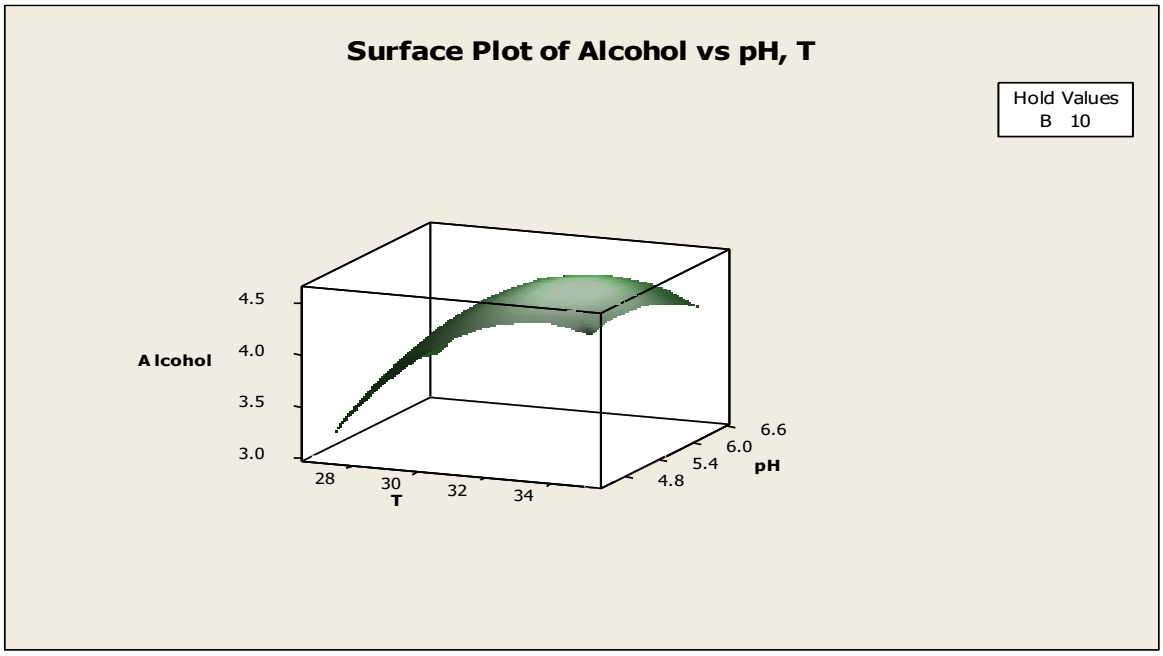
إذا الظروف المثلى لعمل خميرة K.I هي : درجة حرارة 35°م ، pH 4.5 ، تركيز السكر 12% حيث بلغ تركيز الكحول عند هذه الظروف 5.91% إذ تزايد تركيز الكحول بازدياد درجة الحرارة ووصل أعلى تركيز له عند 35°م وبعدها بدأ بالانحفاض تدريجيا، ووصل ذلك التركيز عند أول درجة حموضة مستخدمة 4.5 وبعدها بدأ بالانخفاض، بينما أخذ يتزايد بتزايد تركيز السكر تدريجيا وبلغ حده الأعلى عند أعلى تركيز سكر مستخدم(12%) وهذه النتائج تتوافق مع ما ذكره (أبو صالح والتل، 2009) كما في الشكل (6).



الشكل (6) أمثلة ظروف التخمر K.I

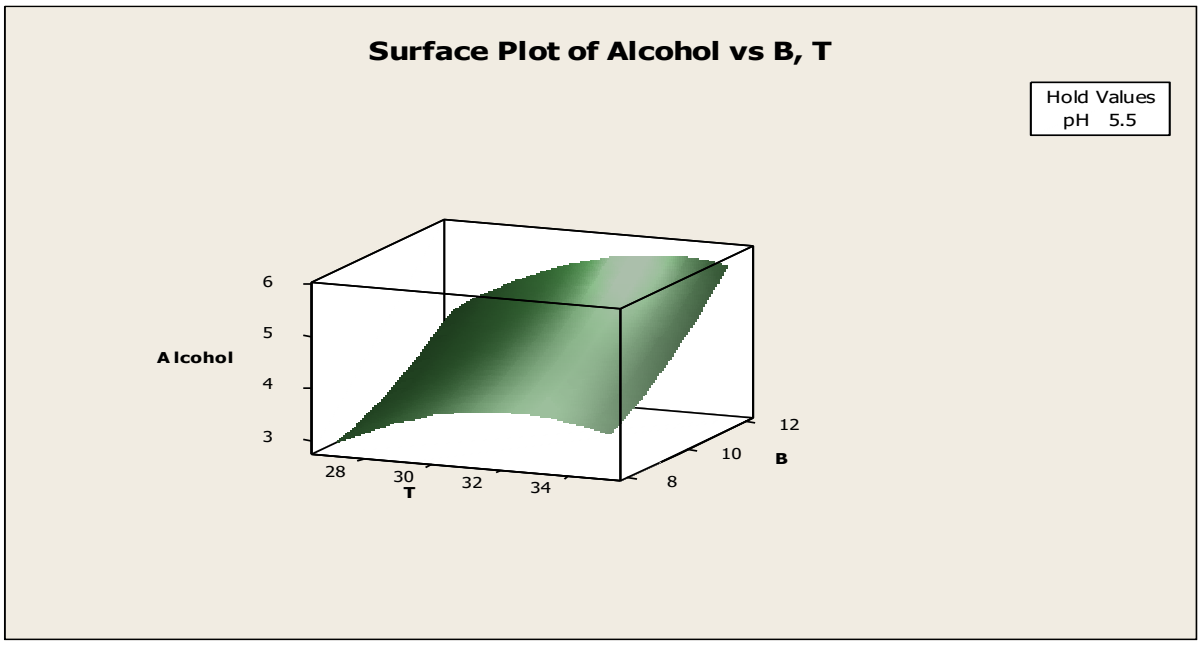
4-5-2-4- تأثير كل متغيرين معاً في تركيز الكحول الإتيلي الناتج :

يبين الشكل (7) تأثير اثنين من المتغيرات (pH ودرجة الحرارة) في تركيز الكحول الناتج مع تثبيت تركيز السكر عند TSS=10%، حيث يلاحظ من الشكل أن تركيز الكحول يتغير تبعا للتغير الذي يطرأ على كل من درجة الحرارة و pH (العلاقة معنوية).



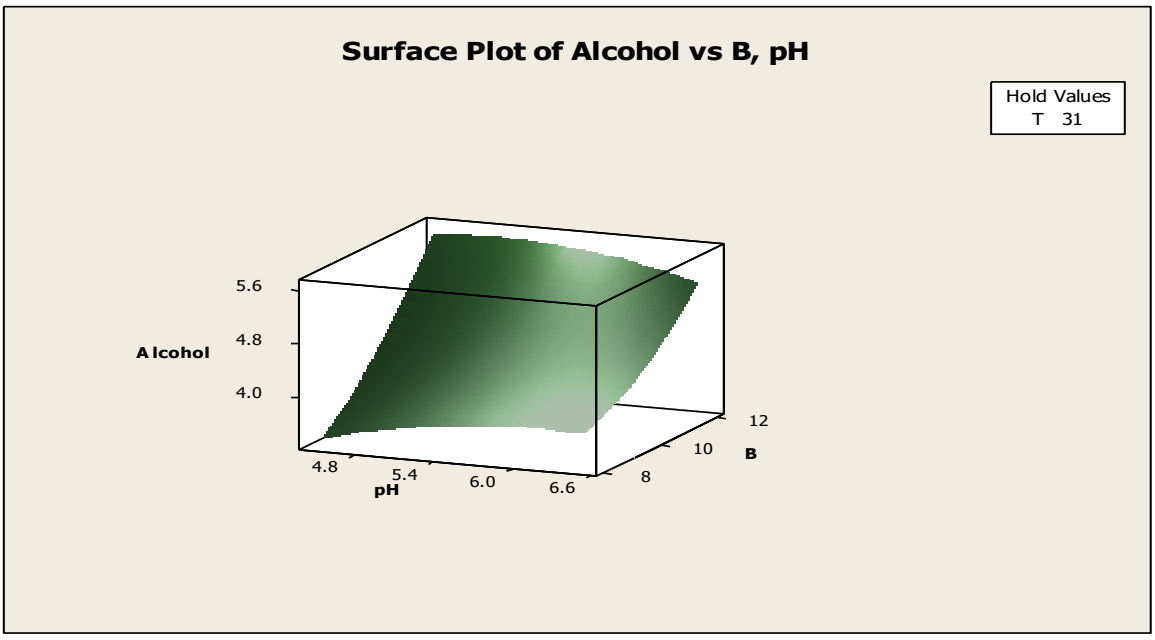
الشكل (7) تأثير كل من درجة الحرارة والـ pH في تركيز الكحولK.I

يبين الشكل (8) تأثير اثنين من المتغيرات (تركيز السكر ودرجة الحرارة) في تركيز الكحول مع تثبيت الـ pHعند 5.5 حيث يلاحظ من الشكل أن أي تغير في تركيز السكر يعقبه تأثير متغير لدرجة الحرارة في تركيز الكحول الناتج.



الشكل (8) تأثير كل من تركيز السكر ودرجة الحرارة في تركيز الكحول الناتجK.I

يبين الشكل (9) تأثير اثنين من المتغيرات (تركيز السكر والـpH) في تركيز الكحول الناتج مع تثبيت درجة الحرارة عند31°م حيث يلاحظ من الشكل أن تأثير تركيز السكر يتغير بتغير pH ويصل تركيز الكحول أعلى مستوى له عند تركيز سكر 12%.



الشكل (9) تأثيرالـ pH وتركيز السكر في تركيز الكحول الناتج

4-5-3- خميرة *Candida gulliermondi*

يبين الجدول (12) تركيز الكحول الناتج من تخمر عصير التفاح بوساطة خميرة *C.gulliermondi* حيث *نلاحظ* تباين تركيز الكحول تبعا لشروط التخمر فقد بلغ أدنى قيمة له في المعاملة 1 حيث بلغ 2.25% بينما كان أعلى تركيز للكحول5.35% في المعاملة حيث كانت الظروف مثالية للتخمر وتباين ما بين هذين التركيزين في باقي المعاملات كما هو موضح في الجدول (12).

جدول(12) تركيز الكحول الناتج من تخمر عصير التفاح بواسطة خميرة C.g

تركيز الكحول %(v\v) *C.g*	%TSS	pH	الحرارة °م	المعاملات
2.25	8	4.5	27	1
3.71	8	4.5	35	2
2.97	8	6.5	27	3
3.01	8	6.5	35	4
3.92	12	4.5	27	5
5.35	12	4.5	35	6
3.97	12	6.5	27	7
4.87	12	6.5	35	8
4.35	10	5.5	31	9
4.35	10	5.5	31	10
4.35	10	5.5	31	11
4.35	10	5.5	31	12
2.77	10	5.5	27	13
4.8	10	5.5	35	14
4.19	10	4.5	31	15
4.22	10	6.5	31	16
4.12	8	5.5	31	17
5.28	12	5.5	31	18
4.35	10	5.5	31	19
4.35	10	5.5	31	20

يبين الجدول (13) تأثير العوامل المدروسة (كل عامل على حدة، ومربع العوامل، والعلاقة بين العوامل) في تركيز الكحول كمايلي :

1- Linear effect وتعني تأثير كل عامل لوحده في تركيز الكحول :

تحتوي المعادلة على 3 متغيرات (درجة الحرارة – pH – تركيز السكر)، نلاحظ من الجدول أن قيمة P لكل من درجة الحرارة والـpH أقل من 0.05 ($P<0.05$) وبالتالي هناك تأثير خطي معنوي بين كل من درجة الحرارة والـ pH مع تركيز الكحول، بينما قيمة P لـ تركيز السكر كانت أكبر من 0.05 ($P>0.05$) .

2- Squares effect وتعني تأثير العوامل مربعة في تركيز الكحول :

تحتوي المعادلة على 3 متغيرات مربعة (Temperature*Temperature، pH*pH ، TSS*TSS) ونلاحظ من الجدول(13) أن قيمة P لـ T^2 كانت أقل من 0.05 ($P<0.05$) وهذا يعني أن هناك تأثير معنوي لدرجة الحرارة في تركيز الكحول والعلاقة تكون على شكل منحني قطع مكافئ بينما كانت قيمة P للـ pH^2 و TSS^2 أكبر من 0.05 ($P>0.05$).

3- Interaction effect وتعني تأثير العوامل المترابطة (المتداخلة) في تركيز الكحول:

تحتوي المعادلة على 3 علاقات تداخل بين المتغيرات الثلاث وهي

(Temperature*pH،Temperature*TSS، pH*TSS)

نلاحظ من الجدول (13) أن علاقة درجة الحرارة كانت معنوية مع pH وباقي العلاقات كانت غير معنوية، بلغ R^2 **=97.2%** أي أن العوامل الثلاث (درجة الحرارة ودرجة الحموضة وتركيز السكر) مسؤولة عن 97.2% من مقدار التغير في تركيز الكحول.

جدول(13) معامل الإنحدار للكحول المنتج من الخميرة C.g

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-53.9131	.814366	-6.620	0.000
Temperature	3.2436	0.55474	5.847	0.000
Ph	3.9448	1.68989	2.334	0.042
Brix	-1.3551	0.78923	-1.717	0.117
Temperature × Temperature	-0.0468	0.00861	-5.432	0.000
pH×Ph	-0.1732	0.13774	-1.257	0.237
Brix × Brix	0.0742	0.03444	2.155	0.057
Temperature ×pH	-0.0412	0.01514	-2.725	0.021
Temperature × Brix	0.0213	0.00757	2.808	0.019
pH× Brix	-0.1012	0.03027	-3.345	0.007

واعتمادا على الجدول (13) يمكن كتابة المعادلة التالية :

$$Y=-53.9131+3.2436X_1+3.9448X_2-1.3551X_3-0.0468X_1^2-0.1732X_2^2+0.0742X_3^2-0.0412X_1X_2+0.0213X_1X_3-0.1012X_2X_3$$

بيين الجدول (14) أنه يوجد متغير واحد (Linear) على الأقل من المتغيرات المفردة الثلاث معنوي لأن ($P < 0.05$)، كما يوجد متغير مربع واحد (Square)على الأقل من المتغيرات المربعة الثلاث معنوي ($P < 0.05$)، وتوجد علاقة ترابط واحدة(Interraction) على الأقل بين علاقات الترابط الثلاث معنوية حيث ($P <0.05$) .

Lack−of−Fit : نلاحظ من الجدول أن ($P>0.05$) وبالتالي فهي معنوية التأثير وهذا دليل على أن المعادلة تشرح بشكل جيد التغير في تركيز الكحول.

جدول (14) تحليل التباين للكحول المنتج C.g

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	11.5705	11.57046	1.285607	24.64	0
Linear	3	8.5125	2.62928	0.876428	16.8	0
Square	3	2.5259	2.52591	0.84197	16.14	0
Interaction	3	0.532	0.53205	0.17735	3.4	0.40
Residual Error	10	0.5218	0.52176	0.052176		
Lack-of-Fit	5	0.5218	0.52176	0.104352	*	0
Pure Error	5	0	0	0		
Total	19	12.0922				

4-5-3-1- تأثير درجة الحرارة في تركيز الكحول الإيتيلي :

وصل أعلى تركيز للكحول الإيتيلي المنتج من عصير التفاح المنتج بفعل خميرة *Candida gulliermondi* عند درجة الحرارة 27°م : 3.97% حيث كانت درجة الحموضة 6.5 وتركيز المحلول السكري 12%.

وصل أعلى تركيز للكحول الإيتيلي المنتج عند درجة الحرارة 31°م : 5.28% حيث كانت درجة الحموضة 5.5 وتركيز المحلول السكري 12%.

وصل أعلى تركيز للكحول الإيتيلي المنتج عند درجة الحرارة 35°م : 5.35% حيث كانت درجة الحموضة 4.5 وتركيز المحلول السكري 12%.

أشار التحليل الإحصائي إلى أن الدرجة 35°م هي درجة الحرارة المثلى حيث وصل تركيز الكحول إلى 5.45% كما هو موضح في الشكل (10)، بينما أشار (Kourkoutas *et al.*, 2001) أن الدرجة 25 °م هي الأفضل.

4-5-3-2- تأثير درجة الحموضة في تركيز الكحول الإيتيلي :

بلغ أعلى تركيز للكحول الإيتيلي الناتج عند pH=4.5 :5.35% وكانت عندها درجة الحرارة 35°م وتركيز المحلول السكري 12%.

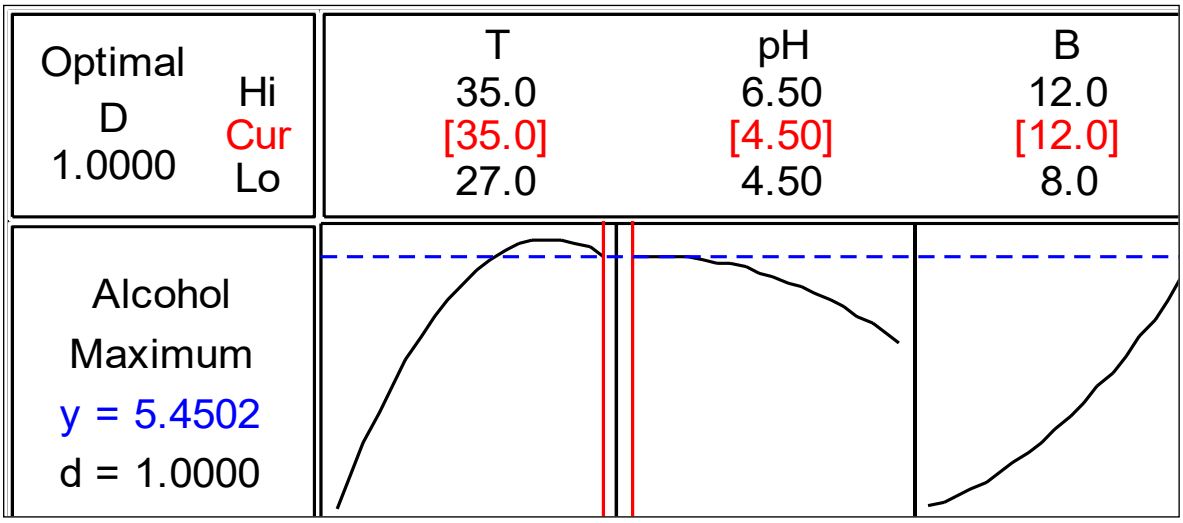
بلغ أعلى تركيز للكحول الإيتيلي الناتج عند pH=5.5 : 5.28% وكانت عندها درجة الحرارة 31°م وتركيز المحلول السكري 12%.

بلغ أعلى تركيز للكحول الإيتيلي الناتج عند pH=6.5: 4.87% وكانت عندها درجة الحرارة 35°م وتركيز المحلول السكري 12%.

وأشار التحليل الإحصائي إلى أن الـ pH المثالي لإنتاج الكحول هو pH=4.5 حيت وصل تركيز الكحول إلى 5.45% وهذا توافق مع (charoenchai *et al.*, 1998)، كما هو موضح في الشكل (10) .

4-5-3-3- تأثير تركيز السكر TSSفي تركيز الكحول الناتج :

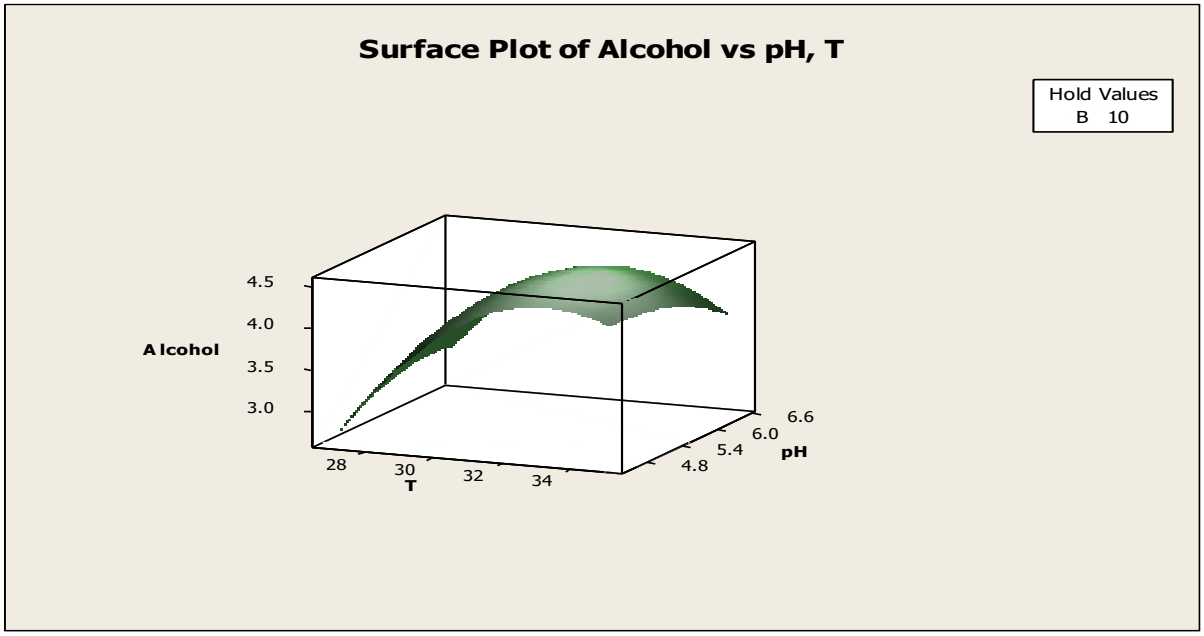
بلغ أعلى تركيز للكحول الإيتيلي الناتج عند تركيز المحلول السكري 8% :4.12% وكانت عندها درجة الحرارة 31°م ودرجة الحموضة 5.5، وبلغ أعلى تركيز للكحول الإيتيلي الناتج عند تركيز المحلول السكري10% :4.8 % وكانت عندها درجة الحرارة 35°م ودرجة الحموضة 5.5، وبلغ أعلى تركيز للكحول الإيتيلي الناتج عند تركيز المحلول السكري12% :5.35% وكانت عندها درجة الحرارة 35°م ودرجة الحموضة 4.5، وبالتالي فإن أفضل تركيز سكر هو 12% كما موضح في الجدول (12)، وأشار التحليل الإحصائي إلى أن TSS=12% هي تركيز السكر الأمثل حيت وصل تركيز الكحول إلى 5.45% كما هو موضح في الشكل (10) إذ نلاحظ أن علاقة تركيز الكحول بكل من درجة الحرارة و الـpH أخذت شكل منحني وذلك لأن العلاقة معنوية، بينما كانت غير معنوية مع تركيز السكر فأخذت العلاقة شكل خط مستقيم تقريبا، إذا الظروف المثلى لعمل خميرة C.g هي : درجة حرارة 35°م ، pH 4.5 ، تركيز السكر 12% إذ بلغ تركيز الكحول عند هذه الظروف5.45 % حيث تزايد تركيز الكحول بازدياد درجة الحرارة ووصل أعلى تركيز له عند 35°م وبعدها بدأ بالانحفاض تدريجيا، ووصل ذلك التركيز عند أول درجة حموضة مستخدمة 4.5 وبعدها بدأ بالانخفاض، بينما أخذ يتزايد بتزايد تركيز السكر تدريجيا وبلغ حده الأعلى عند أعلى تركيز سكر مستخدم(12%)، وهذا ما يوضحه الشكل (10) .



الشكل (10) أمثلة ظروف التخمر C.g

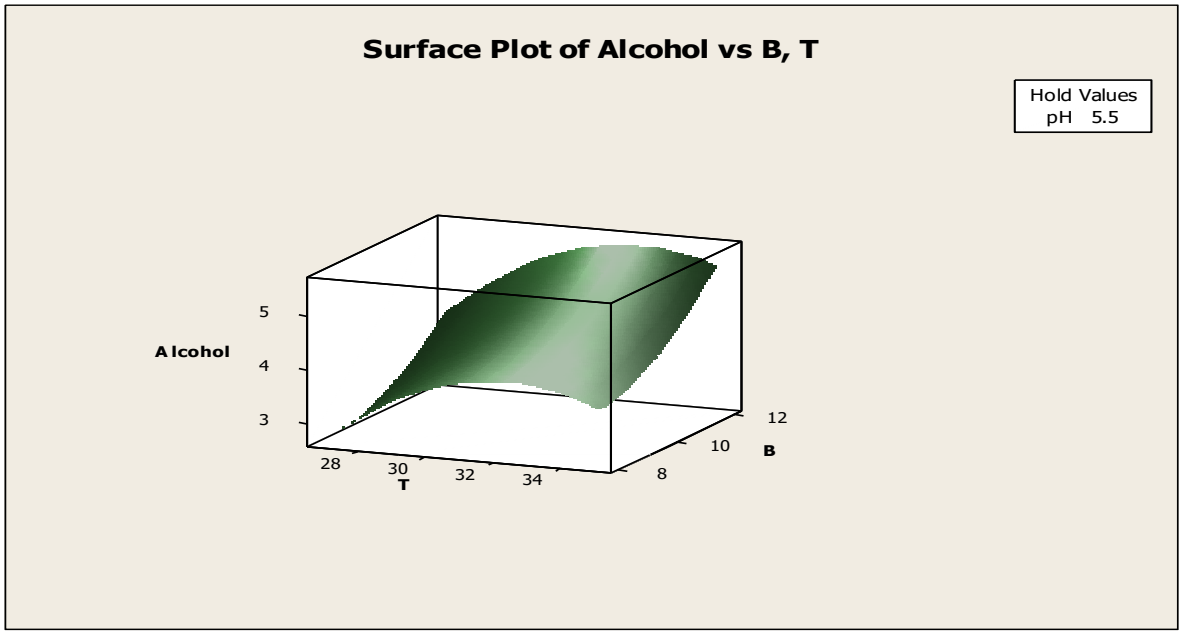
4-5-3-4- تأثير كل متغيرين معاً في تركيز الكحول الإتيلي الناتج :

يبين الشكل (11) تأثير اثنين من المتغيرات (pH ودرجة الحرارة) في تركيز الكحول الناتج مع تثبيت تركيز السكر عند TSS=10%، حيث يلاحظ من الشكل أن تركيز الكحول لايتأثر كثيرا بارتفاع قيمة الـ pH بينما يزداد بشكل ملحوظ بتغير درجة الحرارة حيث بلغ أعلى تركيز عند درجة حرارة 35°م.



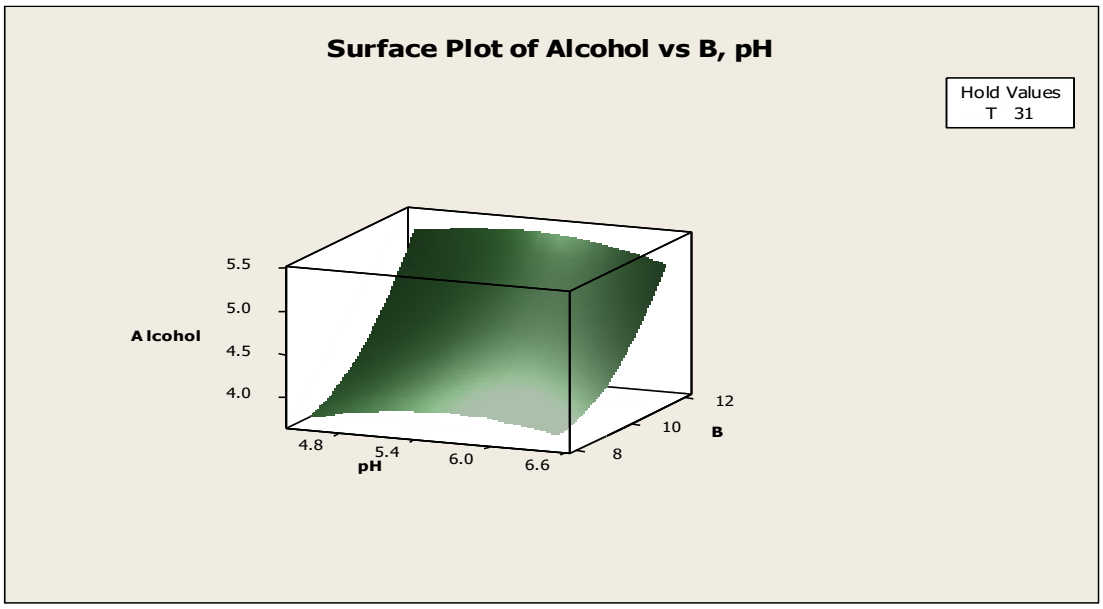
الشكل (11) تأثير كل من درجة الحرارة و الـpH في تركيز الكحولC.g

يبين الشكل (12) تأثير اثنين من المتغيرات (تركيز السكر ودرجة الحرارة) في تركيز الكحول الناتج مع تثبيت الـ pHعند 5.5 حيث يلاحظ من الشكل أن أي تغير في كليهما معا يؤدي إلى تغير في تركيز الكحول الناتج .



الشكل (12) تأثير درجة الحرارة و تركيز السكر في تركيز الكحول الناتجC.g

يبين الشكل (13) تأثير اثنين من المتغيرات (تركيز السكر وpH) في تركيز الكحول الناتج مع تثبيت درجة الحرارة عند31°م حيث يلاحظ من الشكل أن تركيز الكحول يتأثر قليلا بارتفاع الpH بينما يزداد بشكل ملحوظ بتغير تركيز السكر حيث بلغ أعلى تركيز له عند TSS=12% وأن تأثير تركيز السكر في تركيز الكحول الناتج يتغير بتغير pH (معنوية).



الشكل (13) تأثير تركيز السكر و pH في تركيز الكحول الناتجC.g

خامسا:الاستنتاجات

5-الاستنتاجات:

خلصت نتائج هذا البحث إلى :

1- ظهرت 5 أنواع من الخمائر في عصير التفاح وهي
(Can*dida utilis*-*Candida famata* - *Saccharomyces cerevisiae*-
Candida gulliermondi - *Kluyveromyces lactis*).

2- توزعت نسب وجود الخمائر في العصير كالتالي: *Saccharomyces cerevisiae* بنسبة 40%، Can*dida utilis* (15%)، *Candida gulliermondi* (10%)، *Candida famata* (20%)، *Kluyveromyces lactis* (15%).

3- تميزت الخمائر الثلاث (*Saccharomyces cerevisiae* - *Candida gulliermondi* - *Kluyveromyces lactis*) بالقدرة العالية على تخمير عصير التفاح وإنتاج الكحول الإيتيلي ويعود الاختلاف في القدرة على التخمير إلى فيزيولوجية الخميرة (الأنزيمات).

4- تميزت خميرة *Saccharomyces cerevisiae* عن باقي الخمائر في إنتاجها للكحول حيث بلغ تركيز الكحول عندها 7.44%(V\V) لأنها كانت الأكثر قدرة على تحمل الكحول الإيتيلي بينما بلغت 5.91- 5.45%(V\V) لكل من ال*Kluyveromyces lactis* و *Candida gulliermondi* على التوالي.

5- كانت الظروف المثلى لعمل الخمائر الثلاث واحدة هي: درجة الحرارة 35°م، و pH 4.5 وتركيز سكر 12% بيركس، وتباينت في تركيز الكحول الناتج.

6- يؤدي وجود هذه الخمائر في مركزات عصير التفاح إلى إفساد العصير وإنتاج الكحول الإيتيلي، وتتم عملية الإفساد هذه ببطء نتيجة الارتفاع في الضغط الأسموزي .

7- أثبتت هذه الخمائر القدرة على تحمل الضغط الأسموزي المرتفع (مركز العصير 73.4%).

8- لا يمكن الاعتماد على عصير التفاح في إنتاج الكحول الإيتيلي نظرا لارتفاع ثمنه وقلة المردود المتمثل بكمية الكحول المنتج .

سادسا:المقترحات

6-المقترحات:

1- تخزين عصير التفاح ضمن ظروف وشروط صحية سليمة .

2- متابعة البحث في عزل وتصنيف الخمائر الأسموفيلية التي تسبب فساد عصير التفاح ومركزاته.

3- الاستفادة من فاكهة المناطق الاستوائية والمناطق ذات المناخ شبه الجاف في إنتاج الكحول على المستوى الصناعي بسبب زيادة أسعار الطاقة وتوفرها بكميات كبيرة.

سابعا: المراجع العربية والأجنبية

6-1- المراجع العربية:

إبراهيم باشا، سهيل (1992) . ميكروبيولوجيا الأغذية والألبان – منشورات جامعة حلب- كلية الزراعة – سوريا.

أكرم التل ، جهاد و ابراهيم أبو صالح ، محمد (2009) . تكنولوجيا التخمرات – مكتبة المجتمع العربي للنشر والتوزيع ، عمان – الأردن .

بريشة ، جابر (2011).تقنيات الخمائر – استخدام الخميرة لإنتاج الإيتانول كوقود –منشورات جامعة عين شمس ،كلية الزراعة – مصر.

حسن, مختار محمد والزناتي، محمد راغب(1990) . زراعة وإنتاج الفاكهة في الأراضي الجديدة – الطبعة الأولى- الدار العربية للنشر والتوزيع.

حماد ، عادل (2010) . الميكروبيولوجيا الصناعية –التخمرات الميكروبية – جامعة أم القرى ، كلية الزراعة – السعودية.

دباغ ، أحمد (2004)- فساد الأغذية – منشورات جامعة حلب ، كلية الزراعة – سوريا.

الشاذلي، سعيد عبد العاطي(1999). تكنولوجيا تغذية وتسميد وري أشجار الفاكهة في الأراضي الصحراوية- منشورات جامعة عين شمس – كلية الزراعة – المكتبة الأكاديمية- مصر.

الشرابي ، نجم الدين وهابيل ، منير (2001) . الأحياء الدقيقة – منشورات جامعة دمشق ، كلية الزراعة- سوريا.

صادق ، شريف (2005) . الأحياء الدقيقة الصناعية – منشورات جامعة البعث ، كلية الهندسة الكيميائية والبترولية – سوريا.

العيسى ، عبد الله (2005) . الأحياء الدقيقة – منشورات جامعة البعث ، كلية الزراعة – سوريا.

كردوش ، محمد والشيخ ، عبد الرحمن (1993) . إنتاج الفاكهة- منشورات جامعة حلب، كلية الزراعة- سوريا.

نعمة، جاسم وعبد الواحد، همسة (2010).إنتاج الإيتانول من الشرش بوساطة مزيج من الخمائر، مجلة الهندسة والتكنولوجيا ،المجلد 28، العدد 18- العراق.

6-2- المراجع الأجنبية:

Albers, E., Larsson, C., Liden, G., Niklasson, C. and Gustafsson (1996). Influence of the nitrogen source on *Saccharomyce* s *cerevisiae* anaerobic growth and product formation. Applied and Environmental Microbiology **(62)** 3187–3195.

Aleksandra,D; Pawel,S and Tomasz, T(2008), The profile of volatile compounds and polyphenols in wines produced from dessert varieties of apples Food Chemistry, 111**(2):** 513-519.

Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C. and Carnacini, A. (1999). influenceon volatile composition of wines. J. Agric. Food Chem. 47 **(3):** 1139-1144.

Barnett, j.a.,Payne,R.W.,and Yarrow,D.(2000). Yeasts :characteristics and identification ,3 rd edition , Cambridge, university press ,England.

Bell, S.-J.; Henschke, P.A. (2005) Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. Aust. J. Grape Wine Res. 11**(3)**: 242- 295 .

Bernal ,S., Martin , E., Coronilla , J., and Valverda , A. (1998). Evaluation of the new API Candida system for identification of the Most clinically important yeast species . Diagn Microbial Infect Dis **.(32):** 217- 221.

Bilbao , A; Irastorza , A; Dueñas, M& Fernandez, K (2010) .The effect of temperature on the growth of strains of Kloeckera apiculata and *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice fermentation. Letters in Applied Microbiology 24 **(1)** : 37–39.

Bisson,L.F.Butzke,C.E.(2000).Diagnosis and rectifications of stuck and sluggish fermentations. Am. J. Enol. Vitc**.(51)** :168-177.

Boulton, B. R., Singleton, L. V., Bisson, F. L. and Kunkee , E. R. (1996). Principles and practices of winemaking. New York: Chapman & Hall.

Breisha, G. Z. (1987) Microbiological studies on ethanol production from certain waste materials. Ph.D. theses, UCC, Cork, Ireland

B rugnon , L; C ubitto ,M.A and Lozano ,J.E (2009). Chemical composition of reconstituted apple jui View Within Art biofilm fermentation under laminar conditions of yeast isolated from an apple juice processing plant Journal of Food Process Engineering 23 **(2)** :312-317.

Burns, J., Gar dner, P. T., Matthews, D., Duthie, G. G., Lean, M. E. and Crozier, A.(2001).Extraction of phenolics and changes in antioxi activity of red wines during vinification. J. Agric. Food Chem. 49**(12)** :5797-5808.

Cabroglu, T., Selli, S., Canbas, A., Lepoutre, J-P., and GÜnata, Z. (2003). Wine66flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. Enzyme Microb .Technol**.(33):**581-587.

Campos, D.C.P., A.S. Santos, D.B. Wolkoff and S Couri.,(2002). Cashew apple juice stabilization by microfiltration. . J. Agric. Food Chem 148: 61-65.

Carrau F. M.; Medina, K.; Boido, E.; Farina, L.; Gaggero, C.; Dellacassa, E.; Versini, G.; Henschke, P.A. (2005) De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. FEMS Microbiol. Lett.243:107-115 .

Charoenchai, C., Fleet, G. H. and Henschke, P. A. (1998). Effect of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. Am. J. Enol. Vitic. 49**(3):** 283-287.

Covadonga R.,Arias,K.,Lorrie,M., and Renee (2002) yeast species associated with orange juice: Evolution of different identification methods. Applied and Environmental microbiology Journal**.(68):**1955-1961.

Dallman,A.,Damar, S., Balaban, M.O.,(2005). Review of dense phase CO2 technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. Journal of Food. . 47 **(1):** 102-114 .

Ebeler, J. M., McWilliam, S. J., Fogarty, M. W., Francis, I. L. Kwiatkowski, MJ.,HØj P. B. and Henschke, P. A. (2000).The effect of *Saccharomyces bayanus* mediated fermentation on the chemical composition and aroma profile of Chardonnay wine. Aust. J. Grape Wine Res**.(6):** 190-196.

Eglinton, J. M., McWilliam, S. J., Fogarty, M. W., Francis, I. L., Kwiatkowski, M. J.,HØj P. B. and Henschke, P. A. (2000). The effect of *Saccharomyces bayanus* mediated fermentation on the chemical

composition and aroma profile of Chardonnay wine. Aust. J. Grape Wine Res.**(6):** 190-196.

Espinel , A. , Stockman, L., Roberts , G. , Pincus , D., Pollack, D. , and Marler , J. (1998) Comparison of RAPID yeast plus system with API 20C system for identification of common new , and emerging yeast Pathogens. Journal of clinical Microbiology.**(36):**883-886.

Esteve , B., Peris ,M.J., Garcia , E., Uruburu, F., and Querol , A. (2001). Yeast population dynamics during the fermentation and biological Aging of sherry wines . Applied and Environmental Microbiology **.(67):** 2056-2061.

Ethirj, S., Onkayya, H. and Suresch, E., R (1983). high pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods , the past, the present, and the future. International journal of food microbiology **(117)** :1-28.

Fisher, U. and Noble, A. C. (1994). The effect of ethanol, catech in concentration, and pH on sourness and bitterness of wine. Am. J. Enol. Vitic**.(45):** 6-10.

Fleet, G. H. (1996). Wine microbiology and biotechnology. Sydney: Harwood academic .

Fregonesi,A.,Moran-Paulo,J.,Joekes,I.,Augusto,J.,R.,Tonella,E.,and Althoff,K.(2007).Continuous fermentation of sugar cane syrup using immobilized yeast cells.Bioresourc.Bioengin .**(97)**:48-52.

Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimato, H., Furukawa, S. and Tamai, Y. (1997). Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol Acetyl-transferase gene. Appl. Environ. Microbiol**. (63):** 910-915.

Gawel, R. (1998). Red wine astringency: A review. Aust. J. Grape Wine Res. 4**(2):** 47-95.

Gerbaux, V., Béatrice, V. and Alain, B. (2002). Influence of marceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot Noir wines. Am. J. Enol. Vitic**.(53):** 131-137.

Girard, B., Kopp, T. G., Reynolds, A. G. and Cliff, M. (1997). Influence of vinification treatments on aroma constituents and sensor descriptors of Pinot Noir wines. Am. J. Enol. Vitic. 48**(2):** 198-206.

Herrero,M;Roza,L ;Garcia, A ; and Díaz, M(1999). Simultaneous and sequential fermentations with yeast and lactic acid bacteria in apple juice. J.Of Industrial Microbiology and Biotechnology.22 **(1)** :48-51.

Jackson S. R. (2000). Wine Science: Academic Press. Ontario.

Jian-ke Li, Ri-na Wu, Qiu-hui Hu, Jian-hua Wang(2007). Solid- phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate, Food Control. 18 **(5):** 530-534.

John, W., Yoshioka, K. and Hashimoto, N. (1983). Cellular fatty acid and ester formation by brewer's yeast. Agric. Biol. Chem. **(47):** 2287-2297.

John,P.,lansing,M and donald, A (1996).The fungi slime molds and water mold. microbilogy Agric. Biol. Chem**(46):**506-507.

Kato, T; Shimoda, M; Suzuki, J and Hayakawa,i (2003). Changes in the odors of squeezed apple juice during thermal processing. Food Research International, 36**(8):** 777-785.

Kim CH,and Rhee SK.(1999). Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin. Biotechnol Lett **(11):**201–6.

Killian, E. and Ough, C. S. (1979). Fermentation esters-formation and retention as affected by fermentation temperature. Am. J. Enol. Vitic **. (30):** 301-305.

Kourkoutas, y, m; komaitis,A,A and Kanellak,M (2001). Wine production using yeast immobilizied on apple pieces at low and room temperatures .j. Agric food chem .49**(3):** 1417-1425.

Liu, S.-Q., and Pilone, G. J., (2000). An overwiew of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications.Int. J. Food Sci. Technol**.(35):**49–61.

Lilly, M., Lambrechts, G. M. and Pretorius, S. I. (2000). Effect of increased yeastacetyl-transferase activity on flavor profiles of wine and distillates. Appl. Environ. Microbiol**.(66):** 744-753.

Lonvaud-Funel, A. (1995). Microbiology of the malolactic fermentation Molecula aspects. FEMS Microbiol. Lett. **(126):** 209-214.

Luis ,A;Mónica ,H and Mario, D. (2004).Malolactic bioconversion using a Oenococcus oeni strain for cider production: effect of yeast extract supplementation. J. Industrial Microbiology and Biotechnology.30**(12)** :699-704.

Maicas, S., S. Ferrer, and I. Pardo. (2002). NAD(P) H regeneration is the keyfor heterolactic fermentation of hexoses in Oenococcus oeni.Microbiology**(148)**:325–332.

Matthew C. Coleman., Russell Fish.,and David E.Block(2007). Temperature-Dependent Kinetic Model for Nitrogen-Limited Wine fermentations, applied and environmental microbiology**. 73**,.(18). 5875–5884.

Mallouchos, M., Komaitis, M., Koutina, A. and Kanellaki, M. (2003). Wine fermentation by immobilized and free cells at different temperatures. Effect of immobilization and temperature on volatile by-products. J. Food Chem. **(80):** 109-113.

Mariam,I.,Manzoor,K.,Ali,S.,UI-haq,I.(2009).Enhanceo production of ethanol from free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* under stationary culture.pak.J.Bot.41**(2):**821-833.

Merai,A.(1991).Stadia and Mikrobiologicznymi I Chemiczymi Zmianam Przechowy Wania Koncentratow Soku Jablkawego. Rozprawa Dokotoska Wykonanw, Warszawa-Poland.

Mira de Ordun˜a, R., M. L. Patchett, S.-Q. Liu, and G. J. Pilone. (2001). Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria Lactobacillusbuchneri and Oenococcus oeni at different pH values and argininеconcentrations. Appl. Environ. Microbiol.**(67):**1657–1662.

Mobini-Dehkordi, M., I. Nahvi, K. Ghaedi and M. Tavassoli,(2007) .Isolation of high resistant species of *Saccharomyces cerevisiae*. Res.Pharmacol. Sci., **(2):** 10-28..5.

Moss,m ,o; Long .m.t(2002) .Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* food additives and contaminates 19**(4):** 387-399.

Noble A. C. (1999). Why do wines taste bitter and feel astringent? In Waterhouse,Ough, C.S.,and Amerine, M. A. (1988). Experiments with controlled fermentations.Am. J. Enol. Vitic.(**11):** 5-14.

Ough, C. S., and Amerine, M. A. (1988). Experiments with controlled fermentations.Am. J. Enol. Vitic**. (12):** 50-60.

Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT.(2000) . Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugar-cane bagasse. Bio-resour Technol **.(74):**69–80.

Peng , Q; Wang, L and Pan Shao-hong.(2009). Evaluation of Cashew Apple Juice for Surfactin Production by Bacillus subtilis LAMI008. Applied Biochemistry and Biotechnology115 **(2)** :34-40.

Pretorius,L.S.(2000).Tailoring wine yeast for the new millennium in ovel broaches to the ancient art of winemaking yeast . Applied Biochemistry and Biotechnology **(16):**675-729.

Quoted in Girard, B., Kopp, T. G., Reynolds,A.G., Cliff, M. (1996). Influence of vinification treatments on aroma constituents and sensory descriptors of pinot noir wines. Am. J. Enol. Vitic**.(48):** 198-206.

Rajko,V.,and Janes,H.,(1999). By product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae .F*ood chemistry.67**(3):**287-294.

Renolds, A., Cliff, M., Girard, B., and Kopp, T. G. (2001). Influence of fermentation temperature on composition and sensory properties of Semillon and Shiraz wine. Am. J. Enol. Vitic. **(52):**235-240.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B. and Lonvaud, A. (2000). Handbook of enology . Academic press. Sandiago

Ron, S. J. (2000). Wine science; principle, practice, perception (2nd ed.): Academic press. Sandiago

Selvakumar P., and Pandey, A(1999). Solid state fermentation for the syntesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Klyveromyces marxianus*. Process Biochem **(34):**851–858.

Shin, F., Sendo , Y., Nakaguchi , S.H. , and Hashimoto , T.(2001) Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for Rapid detection and identification of yeast strains . Journal of Clinical Microbiology. **(39)** : 3617 -3622 .

Simon , J-P; Durieux, A; Pinnel, V; Garré, V and Vandegans , J (1996) .Organoleptic profiles of different ciders after continuous fermentation (encapsulated living cells) versus batch fermentation (free cells) Progress in Biotechnology, 11**(3)** 615 - 621.

Siuchnmska, V and Sobczak,E.(1983). Wplywmikrofloryl temperatury m.Ferm.Lowoc.Warzyw.,4:30.

Sobczak, E.(1991). Teorial Cwiczenia z mikrobologii ogolnej technicznej Wydawnictwi . SGG W-AR Warszawa-Poland.

Spilimbergo, S; Mantoan,D and Dalser ,A(2007). Supercritical gases pasteurization of apple juice Journal of Supercritical Fluids, 40 **(3)** :485-489.

Sun, B., Spranger, I., Roque-do-Vale, F., Leandro, C. and Belchior, P. (2001). Effect of different winemaking technologies on phenolic composition in Tinta Miúda red wines. J. Agric. Food Chem. **(49):** 5809-5816.

Swiegers, J.H.; Bartowsky, E.J.; Henschke, P.A.; Pretorius, I.S. (2005) .Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. Aust. J. Grape Wine Res. **(11):** 139- 173.

Szambelan, K., J. Nowak and K.J. Chrapkowska (2004). Comparison of bacterial and yeast ethanol fermentation yield from Jerusalem artichoke juices (Helianthus tuberosus L.) and cashew apple juices. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment, 3**(1):** 45-53.

Tonon, T., J. P. Bourdineaud, and A. Lonvaud-Funel. (2001). Arginine degradation by Oenococcus oeni: energetic and genetically aspects. Lait **(81):**139–150.

Torija, M.J, Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Roze s, N. Guillamo n, J.M. and Mas, A.(2003a). Effect of the nitrogen source on the fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology**(20):** 255 – 258.

Torija ,M.J., Rozes,Poblet,M.,Guillamon, J.M.,Mas ,A .(2003b). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyce scerevisiae* .Int. J .Food Microbiol**.(80):**47- 53.

Thornton, R.J. & Rodriguez, S.B. (1996). Deacidification of red and white wines by a mutant of *Schizosaccharomyces malidevora* under commercial winemaking conditions. Food Microbiology**(13):**475-482.

Ugliano, M.; Rinaldi, A.; Gambuti, A.; Moio, L.; Bartowsky, E.J Pretorius, I.S.; Henschke, P.A. (2006). Role of yeast in the hydrolysis of lycosidically bound volatile compounds during winemaking. Yeast's contribution to the sensory profile of wine: maintaining typicality and biodiversity in the context of globalization: proceeding sof Les XVIIes Entireties Scientificues Lallemand La Rioja. Blagnac Cedex, France: Lallemand 47-53.

Valdramidisa V.P; McKayb, A.M; and. Pattersonb M.F(2008) .Defining the stability interfaces of apple juice: Implications on the optimization and design of High Hydrostatic Pressure treatment, Journal of Chromatography A, 815**(1):** 99-102.

Valois, S.and Padilla-Zakour ,O.I(2004). Effects of apple juice processing on the quality of fermented cider , Food Science & Technology Cornell Univ., New York State Agricultural Experiment Station, 630 W. North St., Geneva, NY 14456-1371 .

Verweij, P.E., Breuker, I.M., Rij S, A. J., and Meis,J.F.(1999).Comparative study of seven commercial yeast identification system. Journal of clinical pathology **.(52):**271-273.

Walker, M. G. (1998). Yeast ; phisiology and biotechnology. London Washington DC: American Chemical Society.

White , T. J. , Burns , T., Lee , S., and Taylor , J. (1990). In PCR protocols A guide to methods and application, Academic Press , San Diego ,California 315 – 352

.

Williamson, Kenneth.(1994). Macro scale and Micro scale Organic Experiments.2nd Ed. D.C. Health and Company., California: 594- 604.

Yadira Rivera-Espinoza, Elsa Valdez-Lo pez ,and Humberto Herna ndez-Sa nchez (2005).Characterization of a wine-like beverage obtained from sugarcane juice. World Journal of Microbiology& Biotechnology**(21):**447–452.

Zhang X. ,Yu, J., and Tan,T(2007). A novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum baggase for ethanol production. J. biotechnol**.(129):** 415-420

.

Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H. and Nury, F. S. (1995).Wine analysis and production. New York: Champman and Hall.