انتاج خلاصة الخميرة (Yeast extract) من الشرش باستخدام عزلة محلية من خميرة *Kluyveromyces marxianus*

Yeast extracts production from Whey by utilization of local isolate *Kluyveromyces marxianus*

اكرم ثابت الراوي نادية حنون سلمان اسوان حمدالله عبود البيار

كلية الزراعة / جامعة بغداد

Akram T. AL-Rawi Nadia H. Selman Aswan H. A. AL-Bayar

College of Agriculture/ Baghdad University

المستخلص

استخدمت العزلة المحلية *Kluyveromyces marxianus* المعزولة من مصادر محلية (لبن رائب) في انتاج خلاصة الخميرة . حددت الظروف الكيميائية والفيزيائية المثلى للنمو وانتاج الكتلة الحيوية من هذه العزلة اذ كانت درجة الحرارة المثلى 30م والاس الهيدروجيني 5.0 وسرعة دوران الحاضنة 200 دورة/دقيقة وكان حجم اللقاح 1×10^6 وحدة تكوين مستعمرة/مل ، واشتمل وسط التخمر الامثل على الشرش المزال منه البروتين والمدعم بـ 10% اللاكتوز ، 0.2% فوسفات الامونيوم $(NH_4)_2HPO_4$ ، 2% فوسفات الصوديوم احادي الهيدروجين Na_2HPO_4 ومتحلل الخميرة الحراري 2% حيث حصل على كتلة حيوية تقدر بـ 0.52غم/100مل وكفاءة تخمر تساوي 16.7% . وظفت الكتلة الحيوية (Biomass) المنتجة تحت الظروف المثلى المشار اليها اعلاه لانتاج خلاصة الخميرة وذلك بتعريضها لجهاز الموجات الصوتية الفائقة (Sonicator) وتجفيفها بالفرن الكهربائي متخلخل الضغط (Vacuum oven) وكان التركيب الكيميائي لخلاصة الخميرة المنتجة هو : بروتين 50% ، الكربوهيدرات الكلية 31.6% ، الكلوكان (Glucan) 6.8%، الرطوبة 5.4% . ادخلت خلاصة الخميرة قيد الدراسة في تركيبة بعض الاوساط الغذائية وجرت مقارنتها مع خلاصة خميرة قياسية وكانت حصيلة النمو في الاوساط الغذائية التي احتوت في تركيبها على خلاصة الخميرة قيد الدراسة والمقدرة بقياس الكثافة الضوئية مقاربة لحصيلة النمو في الاوساط المستخدمة فيها خلاصة الخميرة القياسية اذ بلغت 0.539 و 0.552 على الترتيب في وسط MRS ، 1.05 ، 1.15 على الترتيب في وسط Davis's yeast salt السائل .

Abstract

A local isolated *Kluyveromyces marxianus* from local sources (yoghurt) was used for yeast extract production. Optimum conditions of chemical and physical properties of this isolate were identified for the optimal growth and biomass production, so the optimum temperature and pH were 30°C, 5.0, respectively, the speed of shaker incubator was 200 rpm, the inoculum size was 1×10^6 CFU/ml. The optimum fermentation medium was included the non-protein whey which fortified with 10% lactose, 0.2% $(NH_4)_2HPO_4$, 2% Na_2HPO_4 and 2% of heated hydrolyzed yeast, the obtained biomass was about 0.52 g/100 ml, fermentation efficiency was 16.7%.The produced biomass under optimum conditions referred above was applied for yeast extract production by using sonicator and electric vacuum oven for drying the biomass. The chemical composition of the resulted yeast extract was: 50% protein, 31.6% total carbohydrate, 6.8% glucan, 5.4% moisture. The resulted yeast extract was involved in the composition of some culture media, and comprised with standard yeast extract. The growth yield in these media which was determent by measuring optical density was estimated to those of media with standard yeast

extract, which were 0.539, 0.552 respectively in MRS and 1.05, 1.15 respectively in Davis's yeast salt broth.

المقدمة

يعرف الشرش (whey) بأنه مصل الحليب او هو السائل الذي ينفصل عن الحليب اثناء عمليات تخثر الحليب (تخثر البروتينات) انزيمياً او بواسطة الحامض [1] تختلف نوعية الشرش تبعاً للتركيب الكيميائي للحليب المنتج منه ويتألف معظمه من الماء مع وجود نسب من البروتينات هي بروتينات الشرش ونسبة ضئيلة جداً من الدهون فضلاً عن احتوائه على اللاكتوز والفيتامينات الذائبة في الماء ، وهناك دراسات عديدة بخصوص استخدام الشرش في تصنيع العديد من المواد الغذائية للانسان والحيوان فقد استعمل الشرش كوسط لتنمية الخمائر وانتاج انزيم β-galactosidase [2] .

استعمل الشرش في انتاج الفيتامينات الذائبة مثل الرايبوفلافين B_2 وانتاج الكحول الاثيلي وحامض اللاكتيك فضلاً عن وجود استخدامات عديدة للشرش في انتاج الكتلة الحيوية بالتخمر سواء كان ذلك باستعمال بواديء مفردة او مختلطة [6,5,4,3] اقترح [7] وآخرون استعمال الشرش في تنمية *Kluyveromyces marxianus* للحد من مشكلة التلوث البيئي ومنها Chemical Oxygen Demand (COD) والتي تعد من المشاكل البيئية المهمة.

هناك العديد من العوامل الفيزيائية والكيميائية التي تؤثر في انتاج الكتلة الحيوية ومن بين هذه العوامل مصادر الكاربون والمصدر النتروجيني ودرجة الحرارة والأس الهيدروجيني والتهوية . هدفت الدراسة الحالية الى تعيين افضل الظروف بغية الوصول الى اعلى انتاج للكتلة الحيوية وتوظيفها في انتاج خلاصة الخميرة وامكانية ادخالها في تركيبة بعض الأوساط الغذائية المستعملة لتنمية الأحياء المجهرية .

المواد وطرائق العمل

وسط التخمر العام

استخدم الشرش الناتج من صناعة الجبن الطري والمجهز من معمل البان كلية الزراعة / جامعة بغداد وتم ازالة البروتين (Deproteinization) من الشرش المحمض باستخدام الحرارة وعلى النحو الاتي:

حمض الشرش باضافة lactic acid 10% وخفض الاس الهيدروجيني الى pH5 ثم تم تسخين الشرش الى درجة حرارة (90-95)م لمدة 15 دقيقة وترك بعدها لمدة زمنية كافية حتى تركد الخثرة المتكونة ثم تم ترشيح الشرش باستخدام عدة طبقات من ورق الترشيح وجمع السائل الرائق اذ اعتمد هذا الوسط لاجراء التجارب اللاحقة كما اعتمدت درجة الحرارة 30م ، pH5 ، حجم اللقاح 10^6 وحدة تكوين مستعمرة/مل واستعملت الحاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة وكان حجم وسط التخمر 100مل موضوعة في دورق حجم 300مل لجميع التجارب باستثناء ما اشر ازاءه .

تعيين الظروف المثلى لانتاج الكتلة الحيوية

استخدمت العزلة A_1 لدراسة الظروف المثلى للانتاج والتي شملت كل من: تراكيز مختلفة من اللاكتوز (المصدر الكربوني) ، نوع وتركيز المصدر النتروجيني ، نوع وتركيز المصدر الفوسفاتي ، تاثير درجة الحرارة ، تاثير حجم اللقاح الابتدائي ، تاثير الاس الهيدروجيني ، تاثير سرعة دوران الحاضنة الهزازة (r.p.m) وكما ياتي:

1- تركيز المصدر الكربوني: اللاكتوز Lactose

لبيان مدى تاثير تركيز اللاكتوز في انتاج الكتلة الحيوية فقد اضيف بتركيز (2.5، 5، 10)غم /100مل الى وسط التخمر العام واعتمد التركيز الامثل في التجارب اللاحقة .

2- نوع وتركيز المصدر النتروجيني:

اختبر عدد من مصادر النتروجين وشملت مصادر عضوية ولا عضوية هي البيتون ، اليوريا ، NH_4NO_3 ، $(NH_4)_2HPO_4$ ، $(NH_4)_2SO_4$ اذ اضيف كل مصدر على حدة وبالتراكيز الاتية (0.2، 0.5، 1)غم /100مل ، واعتمد المصدر والتركيز الامثل في التجارب اللاحقة.

3- تدعيم وسط التخمر بخلاصة الخميرة وتحلل الخميرة الحراري:

دعم وسط التخمر بخلاصة الخميرة ومتحلل الخميرة الحراري بالتراكيز (0.2 ، 0.5 ، 1)غم /100مل (1 ، 2، 2.5) مل /100مل على الترتيب واعتمد التركيز الامثل في التجارب اللاحقة.

تحضير متحلل الخميرة الحراري:

حضر متحلل الخميرة الحراري بمزج خلايا خميرة الخبز الجافة (Instant dry yeast) مع الماء بنسبة 5:1 (وزن/حجم) جرى بعدها تعقيم الخليط بالمؤصدة في درجة حرارة 121م ولمدة 15 دقيقة لاتمام عملية تحليل الخلايا ومن ثم استخلاصها ، ثم اخضع المحلول الناتج لعمليات ترشيح ونبذ مركزي (3000xg) لمدة 15 دقيقة بهدف التخلص من الراسب والحصول على الرائق الذي عقم في درجة 121م ولمدة 15 دقيقة اذ اضيف الى وسط التخمر العام بتراكيز (1، 2، 2.5) مل/100مل .

4- نوع وتركيز المصدر الفوسفاتي:

درس تاثير نوعين من المصادر الفوسفاتية في كفاء انتاج الكتلة الحيوية شملت Na_2HPO_4 ، KH_2PO_4 كل على حدة بتراكيز (1، 2، 4) غم/100مل ، (0.5، 1، 2) غم/100مل على التوالي واعتمد المصدر والتركيز الامثل في التجارب اللاحقة.

5- درجة الحرارة:

لتعيين درجة حرارة التخمر المثلى لانتاج الكتلة الحيوية من خميرة A_1 فقد اختبرت درجات الحرارة (25، 28، 30، 35) م واعتمدت الدرجة الحرارة المثلى في التجارب اللاحقة.

6- الأس الهيدروجيني:

لتعيين الأس الهيدروجيني الأمثل لانتاج الكتلة الحيوية فقد تم اختبار تأثير قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني (4.5 ، 5 ، 6.5 ، 7) . واعتمد الأس الهيدروجيني الأمثل في التجارب اللاحقة.

7- حجم اللقاح الابتدائي:

لتقدير تأثير حجم اللقاح الابتدائي في انتاج الكتلة الحيوية استعملت حجوم لقاح مختلفة من عزلة الخميرة المنتخبة والمتمثلة بـ 10^4 ، 10^5 ، 10^6 ، 10^7 وحدة تكوين مستعمرة/ مل من وسط التخمر العام ، واعتمد حجم اللقاح الأمثل في التجارب اللاحقة .

8- سرعة دوران الحاضنة الهزازة:

لتعيين سرعة دوران الحاضنة الهزازة المثلى لانتاج الكتلة الحيوية فقد اختبرت السرع (50 ، 100، 150، 200) دورة/ دقيقة واعتمدت السرعة المثلى لانتاج الكتلة الحيوية من العزلة المنتخبة.

انتاج خلاصة الخميرة (Yeast extract)

جمعت الكتلة الحيوية المنتخبة والمنماة باعتماد الظروف المثلى المحددة على ضوء النتائج المحصل عليها في الدراسات السابقة اذ لقحت دوارق زجاجية سعة 300 مل حاوية 100 مل من وسط التخمر {شرش+ اللاكتوز10% + المصدر النيتروجيني الامثل $(NH_4)HPO_4$ 0.2%) + المصدر الفوسفاتي الامثل (Na_2HPO_4 2%) + التركيز الامثل لمتحلل الخميرة الحراري 2%} ذوالأس الهيدروجيني 5.0 وبحجم لقاح 1×10^6 وحدة تكوين مستعمرة/مل من الوسط وحضنت الدوارق بدرجة حرارة 30م لمدة 48 ساعة بسرعة 200 دورة/دقيقة ثم فصلت الكتلة الحيوية عن الوسط بالنبذ المركزي المبرد بسرعة 4000xy لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 4 م ثم اخضعت الكتلة الحيوية المفصولة للموجات الصوتية الفائقة لمدة زمنية قدرها 30 دقيقة اجري بعدها نبذ مركزي بسرعة 10000xg لمدة 20 دقيقة بهدف فصل الاجزاء الصلبة عن السائلة ثم جفف كل جزء باستخدام الفرن الكهربائي متخلخل الضغط (Vacuum oven) بدرجة حرارة 45 م لمدة 24 ساعة ثم طحنت باستعمال طاحونة كهربائية.

الفحوصات الجارية على خلاصة الخميرة المنتجة

اجريت الفحوصات الاتية لتوصيف خلاصة الخميرة قيد الدراسة :

1- تقدير الكربوهيدرات الكلية

تم تقدير الكربوهيدرات الكلية بطريقة (الفينول-حامض الكبريتيك) الموصوفة من قبل [8] .

2- تقدير البروتين

قدر البروتين بطريقة كلدال (Kjeldahl method) وحسب ما جاء في [9] .

3- تقدير نسبة الرطوبة

جرى تقديرها تبعا للطريقة المذكورة في [9] .

4- استخلاص البيتاكلوكان

قدر البيتا كلوكان (β- Glucan) وفقا للطريقة المذكورة من قبل [10] .

التطبيقات العملية لخلاصة الخميرة المنتجة من العزلة *Kluyveromyces marxianus* A_1

للتأكد من خلاصة الخميرة قيد الدراسة وامكانية ادخالها في تركيبه عدد من الاوساط الزرعية المستعملة لتنمية انواع معينة من الاحياء المجهرية وبالتراكيز المعتمدة والمقارنة مع خلاصة خميرة منتجة من احدى الشركات المعنية بانتاج الاوساط الغذائية وكما ياتي:

أ. وسط MRS السائل واستعملت بهذا الخصوص البكتريا Lactobacillus acidophilus المحصل عليها من مختبرات قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية / كلية الزراعة / جامعة بغداد . لقح الوسط MRS السائل بحجم معين من عالق بكتريا Lb. acidophilus المنشطة وقيست الامتصاصية (O.D) في وقت الصفر (مباشرة بعد تلقيح الوسط) وبعد مرور 24 ساعة من الحضن في درجة حرارة 37م مع المقارنة بالامتصاصية المحصل عليها باستعمال الوسط ذاته الذي يحتوي على خلاصة الخميرة القياسية (وتحت الظروف التنموية) .

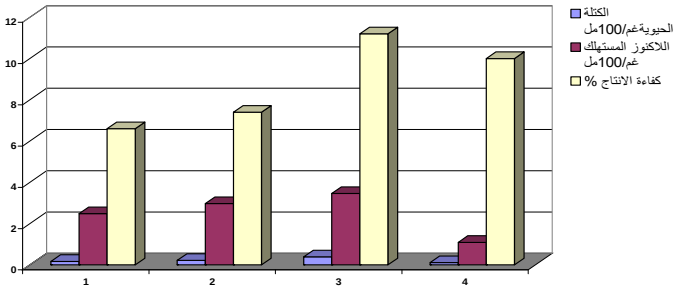
ب. وسط Davis's Yeast Salt السائل واستعمل خميرة Saccharamyces cerevisiae تم الحصول على عزلة نقية من هذه الخميرة من المسحوق التجاري (instant yeast) من المنشأ التركي . لقح الوسط بحجم معين من عالق الخميرة S. cerevisiae المنشطة وقيست الامتصاصية (O.D) في وقت الصفر (مباشرة بعد تلقيح الوسط) وبعد مرور 48 ساعة من الحضن في درجة حرارة 25م مع المقارنة بالامتصاصية المحصل عليها باستعمال الوسط ذاته الذي يحتوي على خلاصة الخميرة القياسية (وتحت نفس الظروف التنموية) .

النتائج والمناقشة

تعيين الظروف المثلى لانتاج الكتلة الحيوية

1- تحديد التركيز الأمثل لسكر اللاكتوز

أظهرت النتائج شكل (1) ان افضل انتاج للكتلة الحيوية واعلى كفاءة انتاج تم الحصول عليها عند اضافة 10% لاكتوز إذ بلغت (0.388 غم/100 مل ، 11.2%) على الترتيب ، في حين اظهرت نتائج استعمال الشرش بدون تدعيم انخفاضاً واضحاً للكتلة الحيوية المنتجة وكذلك الحال فيما يتعلق بكفاءة الانتاج ، ويلاحظ انخفاض نسبة اللاكتوز المستهلك بارتفاع تركيزه في وسط التنمية الى اكثر من 10% وهو مماثل تقريباً للنسبة المستهلكة عند استخدام الشرش بدون تدعيم . هناك اختلاف في النتائج المحصل عليها بهذا الخصوص إذ حصل [11] اعلى انتاج باستعمال *K. fragilis* وباستخدام شرش مدعم بـ 5% لاكتوز ، كما لاحظ [12] ان افضل انتاج للكتلة الحيوية كان باستخدام الشرش مع تدعيمه بنسبة لاكتوز تراوحت بين 5-12% مع حصول انخفاض ملحوظ في الكتلة الحيوية عند تجاوز التركيز لهذه النسبة وتحديداً باستخدام 15% لاكتوز . من المعروف ان ذائبية الأوكسجين تكون عاملاً محدداً في سرعة وكمية مصادر الكاربون المتأيضة ومنها اللاكتوز والذي ينعكس بدوره على عدم جدوى زيادة تركيز مصدر الطاقة دون زيادة المتطلبات الخلوية للأوكسجين .



شكل (1) :تأثير استخدام تراكيز مختلفة من اللاكتوز في انتاج الكتلة الحيوية من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* A_1

1- 2.5 غم/100 مل + شرش 4.6% لاكتوز **2- 5 غم/100 مل + شرش 4.6% لاكتوز**

3- 10 غم/100 مل + شرش 4.6% لاكتوز **4- شرش فقط 4.6% لاكتوز**

2- تحديد مصدر النتروجين الأمثل لانتاج الكتلة الحيوية

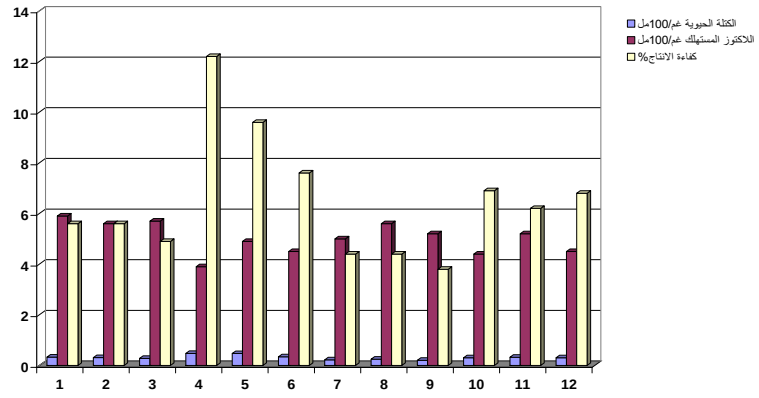
درس عدد من المصادر العضوية وغير العضوية للنتروجين للوقوف على المصدر الأكثر ملاءمة في انتاج الكتلة الحيوية من خميرة *Kluyveromyces marxianus* A_1 قيد الدراسة ، هذه المصادر هي كل من (NH_4NO_3 ، $(NH_4)_2HPO_4$ ، NH_4SO_4 ، يوريا ، ببتون) ، إذ اضيفت كل على حدة بتركيز (0.2، 0.5، 1) %الى وسط التخمر العام المتمثل بالشرش المدعم بـ 10% لاكتوز مع استخدام الشرش الذي كان يحتوي على اللاكتوز بنسبة 4.9% .

يبين شكل (2) ان افضل تلك المصادر كان فوسفات الأمونيوم وبتركيز 0.2% إذ بلغت الكتلة الحيوية واللاكتوز المستهلك والكفاءة الانتاجية 0.478 غم/100 مل ، 3.9 غم/100مل ، 12.2% على الترتيب ، وقد يكون مرد ذلك الى ان هذا الملح يلعب دوراً مزدوجاً في توفير النتروجين فضلاً عن الفسفور ، في حين حصل انخفاض في الكتلة الحيوية وكفاءة الانتاج عند استخدام نترات الأمونيوم وهذا يعود الى ضعف قدرة الخميرة في استهلاك النترات إذ يتم تحويلها الى ايونات الأمونيوم مما يؤدي الى كبح جماح استخدام كميات اضافية من النترات ، اما الأمونيوم فان الخميرة تستطيع استخدامها لامكانية ادماجه بسهولة في الأنظمة الحيوية من قبل الخلايا [13] .

3- تحديد المصدر الفوسفاتي الأمثل لانتاج الكتلة الحيوية

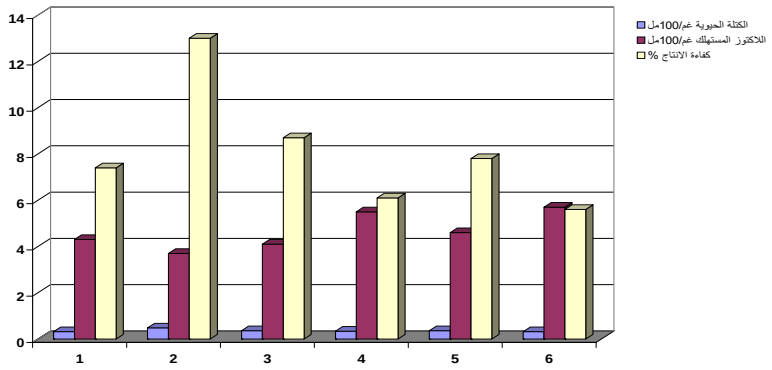
درس تأثير مصدرين من المصادر الفوسفاتية وهي فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين KH_2PO_4 وبتركيز (0.5 ،1، 2)% وفوسفات الهيدروجين ثنائية الصوديوم Na_2HPO_4 وبتركيز (1 ، 2 ، 4)% وباعتماد وسط التخمر العام المحتوي على أفضل مصدر كاربوني ونتروجيني أفرزته نتائج الدراسات السابقة ويلاحظ من شكل (3) ان اعلى انتاج للكتلة الحيوية واعلى كفاءة انتاج كانت باستخدام Na_2HPO_4 وبتركيز 2% إذ بلغت 0.48 غم/100 مل ، 13% على الترتيب ، وان أوطأ نسبة للاكتوزالمستهلك هي باستخدام هذا المصدر الفوسفاتي .

تعد املاح الفوسفات من العوامل المهمة في انتاج الكتلة الحيوية من قبل الخميرة *Kluyveromyces marxianus* لدورها في تنظيم الأس الهيدروجيني لوسط التخمر فضلاً عن كونها تلبي حاجة الخلايا من الفوسفور والبوتاسيوم . أوضح كل من [15,14] ان أفضل نمو لخميرة *K. marxianus* في الأوساط الزرعية يتطلب توفير فوسفات الصوديوم ثنائي الهيدروجين NaH_2PO_4 او فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين Na_2HPO_4 .



شكل (2): تأثير نوع المصدر النتروجيني في انتاج الكتلة الحيوية من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* A_1

1- كبريتات الأمونيوم :0.2غم/100 مل + شرش 4.9% لاكتوز+10% لاكتوز
2- كبريتات الأمونيوم :0.5غم/100 مل + شرش 4.9% لاكتوز+10% لاكتوز
3- كبريتات الأمونيوم :1غم/100 مل + شرش 4.9% لاكتوز+10% لاكتوز
4- فوسفات الأمونيوم :0.2غم/100 مل + شرش 4.9% لاكتوز+10% لاكتوز
5- فوسفات الأمونيوم :0.5غم/100 مل + شرش 4.9% لاكتوز+10% لاكتوز
6- فوسفات الأمونيوم :1غم/100 مل + شرش 4.9% لاكتوز+10% لاكتوز
7- نترات الأمونيوم :0.2غم/100 مل + شرش 4.9% لاكتوز+10% لاكتوز
8- نترات الأمونيوم :0.5غم/100 مل + شرش 4.9% لاكتوز+10% لاكتوز
9- نترات الأمونيوم :1غم/100 مل + شرش 4.9% لاكتوز+10% لاكتوز
10- ببتون :0.2غم/100 مل + شرش 4.9% لاكتوز+10% لاكتوز
11- ببتون :0.5غم/100 مل + شرش 4.9% لاكتوز+10% لاكتوز
12- ببتون :1غم/100 مل + شرش 4.9% لاكتوز+10% لاكتوز

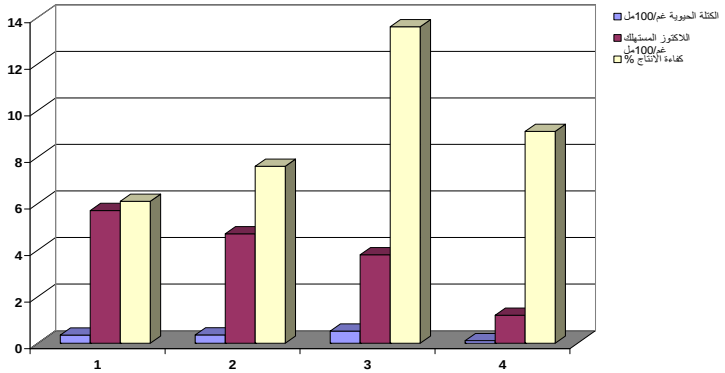


شكل (3) :تأثير نوع المصدر الفوسفاتي في انتاج الكتلة الحيوية من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* A_1

1- Na_2HPO_4 : 1غم/100 مل+ شرش 5% لاكتوز+10% لاكتوز+0.2 % $(NH_4)_2HPO_4$
2- Na_2HPO_4 : 2غم/100 مل+ شرش 5% لاكتوز+10% لاكتوز+0.2 % $(NH_4)_2HPO_4$
3- Na_2HPO_4 : 4غم/100 مل+ شرش 5% لاكتوز+10% لاكتوز+0.2 % $(NH_4)_2HPO_4$
4- KH_2PO_4 : 0.5غم/100 مل+ شرش 5% لاكتوز+10% لاكتوز+0.2 % $(NH_4)_2HPO_4$
5- KH_2PO_4 : 1غم/100 مل+ شرش 5% لاكتوز+10% لاكتوز+0.2 % $(NH_4)_2HPO_4$
6- KH_2PO_4 : 2غم/100 مل+ شرش 5% لاكتوز+10% لاكتوز+0.2 % $(NH_4)_2HPO_4$

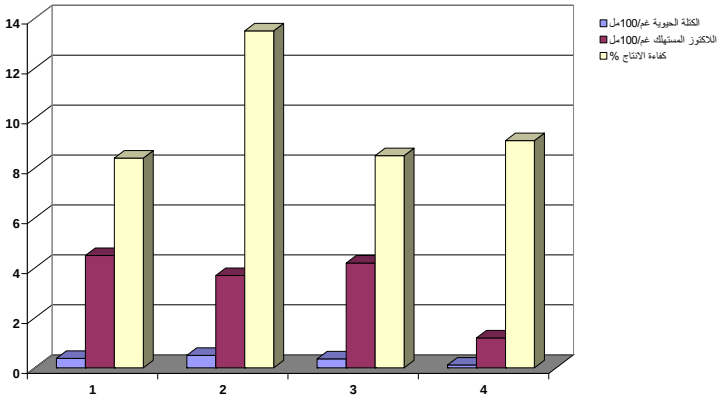
4- خلاصة الخميرة ومتحلل الخميرة الحراري

اضيفت خلاصة الخميرة ومتحلل الخميرة الحراري كل على حدة وبتركيز (0.2، 0.5، 1)% ، (1، 2، 2.5) % على الترتيب ، وباعتماد الظروف التي حددتها نتائج الدراسات السابقة . ان اضافة خلاصة الخميرة الى وسط التخمر وبتركيز 1% اعطى افضل النتائج فيما يتعلق بالكتلة الحيوية وكفاءة الانتاج واللاكتوز المستهلك والتي بلغت (0.52 غم/100 مل ، 13.6% ، 3.6 غم/100 مل) على التوالي ، واشارت نتائج تدعيم وسط التخمر بمتحلل الخميرة الحراري الى الحصول على كتلة حيوية وكفاءة انتاج مقدارها 0.50 غم/100 مل ، 13.5% باستعمال تركيز 2 مل من متحلل الخميرة الحراري وباجراء عمليات حسابية ومقارنة النتائج المحصل عليها مع خلاصة الخميرة (المستحضر التجاري الجاف) وبالرجوع الى الاشكال (4،5) وجد ان استعمال متحلل الخميرة الحراري يفضل خلاصة الخميرة وقد يعزى مرد ذلك الى كفاءة استخلاص بعض عوامل النمو واحتفاضها بخصائصها التركيبية . وجد [16] ان اضافة 0.5% من خلاصة الخميرة الى الشرش لتنمية خميرة *K. fragilis* يفضي الى زيادة الوزن الجاف بمقدار 3.27 ملغم/مل مقارنة بالمزارع غير المدعمة بخلاصة الخميرة .



شكل (4): تأثير استعمال تراكيز مختلفة من خلاصة الخميرة في انتاج الكتلة الحيوية من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* A_1

1- 0.2 غم/100 مل + شرش 5% لاكتوز+10% لاكتوز+0.2 % $(NH_4)_2HPO_4$+2%Na_2HPO_4
2- 0.5 غم/100 مل + شرش 5% لاكتوز+10% لاكتوز+0.2 % $(NH_4)_2HPO_4$+2%Na_2HPO_4
3- 1 غم/100 مل + شرش 5% لاكتوز+10% لاكتوز+0.2 % $(NH_4)_2HPO_4$+2%Na_2HPO_4
4- شرش فقط 5% لاكتوز



شكل (5): تأثير استعمال تراكيز مختلفة من متحلل الخميرة الحراري في انتاج الكتلة الحيوية من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* A_1

1- 1 مل/100 مل + شرش 5% لاكتوز+10% لاكتوز+0.2 % $(NH_4)_2HPO_4$+2%Na_2HPO_4

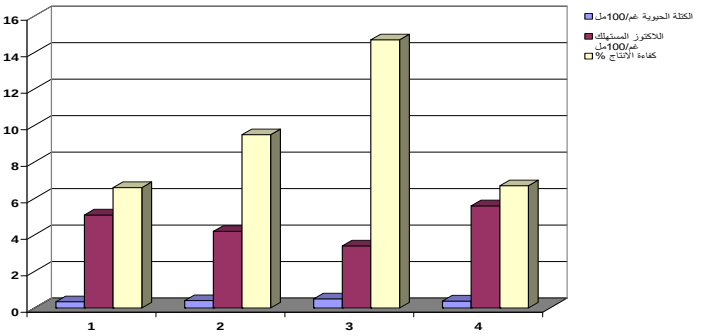
2- 2 مل/100 مل + شرش 5% لاكتوز+10% لاكتوز+0.2 % $(NH_4)_2HPO_4$+2%Na_2HPO_4

3- 2.5 مل/100 مل + شرش 5% لاكتوز+10% لاكتوز+0.2 % $(NH_4)_2HPO_4$+2%Na_2HPO_4

4- شرش فقط 5% لاكتوز

5- تحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج الكتلة الحيوية

تراوحت درجات الحرارة التي درس تأثيرها في انتاج الكتلة الحيوية بين (25-35)م فكانت درجة الحرارة المثلى 30م لانتاج الكتلة الحيوية وكفاءة الانتاج شكل (6) إذ اعطى استخدام هذه الدرجة الحرارية اعلى انتاج والذي يتمثل بالقيم 0.50 غم/100 مل ، 14.7% على الترتيب . لقد وجد [17] ان افضل درجة حرارة لانتاج الكتلة الحيوية من خميرة *K. marxianus* المنماة في الشرش هي 30م إذ حصل على كتلة حيوية تساوي 14.05 غم /لتر كما تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه العديد من الباحثين في دراساتهم لانتاج الكتلة الحيوية من خميرة *K. marxianus* وباستعمال الشرش وسطاً للتخمر[12] . في حين وجد باحثون آخرون ان درجتي الحرارة(34،35)م هي الأفضل لانتاج الكتلة الحيوية من خميرة *K. marxianus* المنماة في الشرش [6] .



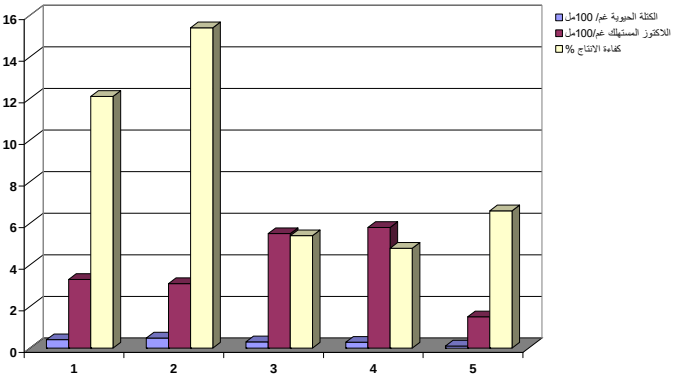
شكل (6) :تأثير درجة الحرارة في انتاج الكتلة الحيوية من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* A_1

1- 25م ، 2- 28م ، 3- 30م ، 4- 35م

6- تحديد الأس الهيدروجيني الأمثل لانتاج الكتلة الحيوية

درس تأثير الأس الهيدروجيني باستعمال قيم من الأس الهيدروجيني لوسط الانتاج تراوحت بين (4.5-7.0) مع اعتماد ظروف التخمر المثلى الأخرى المؤشرة في الدراسات السابقة . يبين شكل (7) ان الزيادة الحاصلة في الكتلة الحيوية تزامنت مع ارتفاع قيم الأس الهيدروجيني وصولاً للأس الهيدروجيني 5.0 ، حصل بعدها انخفاض تدريجي واضح في الكتلة الحيوية عند قيم الأس الهيدروجيني المتعادلة والقريبة من التعادل ، وقد يعزى ذلك الى ملائمة الأوساط الحامضية ذات القيم المنخفضة من الأس الهيدروجيني للعزلة *K. marxianus* A_1 قيد الدراسة . اتفقت بعض الدراسات على انتاج الكتلة الحيوية من خميرة *K. marxianus* باستخدام الأس الهيدروجيني الابتدائي 5.0

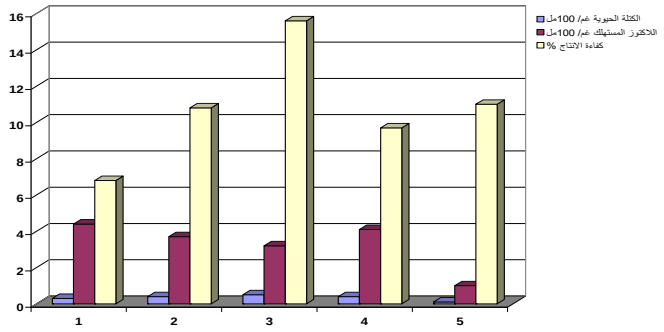
[17]، اما [12] فقد لاحظا ان انتاج الكتلة الحيوية من خميرة *K. marxianus* يزداد بارتفاع الأس الهيدروجيني الابتدائي وصولاً الى الأس الهيدروجيني 5.6 ثم تأخذ بعدها بالانخفاض التدريجي ، وقد يعزى التباين في النتائج الى اختلاف انواع الخمائر وسلالاتها المستخدمة في كل دراسة فضلاً عن اختلاف في تركيبة اوساط التنمية وظروفها .



شكل (7): تأثير الأس الهيدروجيني الابتدائي في انتاج الكتلة الحيوية من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* A_1
1- pH:4.5، 2- pH:5.0 ، 3- pH:6.5 ، 4- pH:7.0 ، 5- شرش 4.9%لاكتوز

7- تحديد حجم اللقاح الأمثل لانتاج الكتلة الحيوية

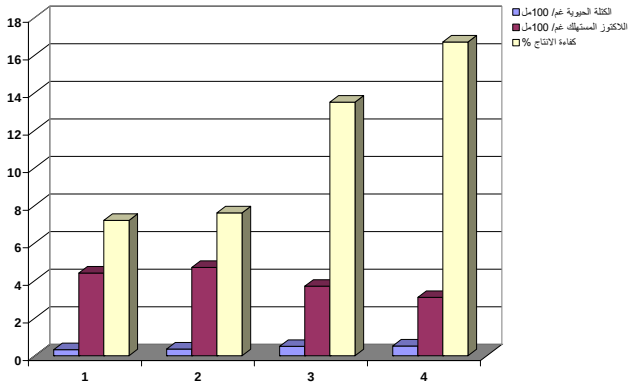
درس تأثير حجم اللقاح في انتاج الكتلة الحيوية وذلك باستخدلم حجوم لقاح متدرجة من خميرة *K. marxianus* A_1 قيد الدراسة للوقوف على حجم اللقاح الأمثل في الانتاج وشملت (1×10^4 و 1×10^5 و 1×10^6 و 1×10^7) حدة تكوين مستعمرة/ مل من وسط التخمر العام وباعتماد الظروف التي حددتها نتائج الدراسات السابقة ويلاحظ من شكل (8) ان افضل انتاج للكتلة الحيوية وكفاءة انتاج كانت باستعمال حجم لقاح 1×10^6 وحدة تكوين مستعمرة/ مل ، إذ بلغت 0.50 غم/100 مل ، 15.6% على الترتيب ، في حين حصل انخفاض واضح في كمية الكتلة الحيوية وكفاءة الانتاج عند استعمال 1×10^4 وحدة تكوين مستعمرة/ مل ويمكن تفسير هذا الانخفاض في ان حجم اللقاح المضاف قد لايتناسب وحجم وسط التخمر بعبارة اخرى تخفيف حجم اللقاح والذي يؤدي بدوره الى خسارة وذلك باطالة وقت التطبيع وتهيئة الأنزيمات اللازمة للخلايا كي تبدأ بفعالياتها الحيوية لذلك فانها تستعمل كميات كبيرة من مواد الأساس اللازمة للنمو والادامة ، كذلك حصل انخفاض في الكتلة الحيوية باستعمال حجم لقاح 1×10^7 وحدة تكوين مستعمرة/ مل والذي يمكن اعزاؤه الى نشوء حالة من التنافس الشديد في طلب المكونات الغذائية والأوكسجين في الوسط والذي بدوره يجعل الظروف غير ملائمة للنمو ، وهذا ما أشار اليه [19,18] إذ بينوا ان للعدد الابتدائي مساهمة كبيرة في زيادة العدد النهائي لخميرة *K. marxianus* ويعد هذا امراً عاماً للأنواع الأخرى من الأحياء المجهرية لما له من دور كبير في معدلات النمو اللاحقة والذي ينعكس على زيادة الكتلة الحيوية المنتجة .



شكل (8): تأثير حجم اللقاح الابتدائي في انتاج الكتلة الحيوية من الخميرة
***Kluyveromyces marxianus* A_1**
1- 1×10^4 وحدة تكوين مستعمرة/ مل ، 2- 1×10^5 وحدة تكوين مستعمرة/ مل ، 3- 1×10^6 وحدة تكوين مستعمرة/ مل 4- 1×10^7 وحدة تكوين مستعمرة/ مل ، 5- شرش 4.9%لاكتوز

8- تأثير التهوية في انتاج الكتلة الحيوية

اختيرت اربع سرع دوران للحاضنة الهزازة ودراسة مدى تأثيرها في انتاج الكتلة الحيوية وكفاءة الانتاج وهي (50 ، 100 ، 150 ، 200) دورة/ دقيقة ، ومن شكل (9) نجد ان افضل انتاج للكتلة الحيوية كان عند استخدام 200 دورة/ دقيقة إذ بلغت الكتلة الحيوية وكفاءة الانتاج 0.52 غم/100 مل ، 16.7% على الترتيب ، في حين أدى استخدام 50 دورة/ دقيقة الى خفض الكتلة الحيوية فكانت 0.32 غم/100 مل وكفاءة الانتاج 7.2% ، وقد يكون مرد ذلك انخفاض ذائبية الأوكسجين في وسط التخمر . لقد أشار [20] الى ان استعمال سرعة دوران مناسبة قد ساعد في زيادة ذائبية الأوكسجين وبالتالي زيادة في سرعة النمو وحصيلة أكبر من الكتلة الحيوية، وجاءت نتيجة الدراسة الحالية متوافقة مع ما توصل اليه [22,21] وهو ان اعلى انتاج للكتلة الحيوية لخميرة *K. marxianus* المنماة في الشرش كان باستعمال سرعة دوران 200 دورة/ دقيقة .



شكل (9): تأثير سرعة دوران الحاضنة الهزازة في انتاج الكتلة الحيوية من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* A_1

1- 50 دورة/ دقيقة ، 2- 100 دورة/ دقيقة ، 3- 150 دورة/ دقيقة ، 4- 200 دورة/ دقيقة

انتاج خلاصة الخميرة Yeast extract

انتجت خلاصة الخميرة من خميرة *Kluyveromyces marxianus* A_1 قيد الدراسة وباعتماد الظروف المثلى المحددة على ضوء النتائج المحصل عليها في الدراسات السابقة ، اخضعت الكتلة الحيوية بعد فصلها عن وسط التنمية للموجات فوق الصوتية الفائقة باستعمال جهاز (Sonicator) ولمدة زمنية قدرها 30 دقيقة لغرض تكسير الخلايا وانطلاق العناصر الغذائية الموجودة داخل الخلايا ، أجري بعدها نبذ مركزي بسرعة 10000 xg لمدة 20 دقيقة بهدف فصل الأجزاء الصلبة عن السائلة ثم جفف كل جزء بصورة منفصلة على حدة باستخدام الفرن الكهربائي متخلخل الضغط (Vacuum oven) وبدرجة حرارة 45م لمدة 24 ساعة ثم طحنت باستعمال طاحونة كهربائية ، وكانت الحصيلة لخلاصة الخميرة المنتجة والتي تقدر بحوالي 9-11 غم/50غم من الكتلة الحيوية الرطبة .

التركيب الكيميائي لخلاصة الخميرة قيد الدراسة

درس التركيب الكيميائي لخلاصة الخميرة المنتجة *Kluyveromyces marxianus* A_1 قيد الدراسة ، ويلاحظ من جدول (1) ان نسبة البروتين تشكل بحدود 50% والكربوهيدرات الكلية 31.6% محسوبة على أساس الوزن الجاف وكانت نسبة الرطوبة المقدرة لخلاصة الخميرة المنتجة تساوي 5.4% وتأتي نتائج الدراسة الحالية متماثلة مع ما توصل اليه [23] حيث بلغت نسبة البروتين لخلاصة الخميرة *K. marxianus* تساوي 50% والكاربوهيدرات الكلية 34.8% والرطوبة 5%. كما قدرت نسبة الكلوكان لخلاصة خميرة *K. marxianus* A_1 قيد الدراسة وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل [10] حيث تم الحصول على 6.8 غم/100 غم خلاصة خميرة . تعد هذه الطريقة هي الأكفأ من بين طرق التقدير الأخرى والمتمثلة بطريقة الطبخ تحت الضغط والتحلل بالتلوين والطريقة الآلية باستخدام الكرات الزجاجية [24] ، إذ ان القاعدة المستخدمة في الخطوة الأولى من الاستخلاص تعمل على ازالة طبقة المانوبروتين ويعمل الحامض المستخدم في الخطوة التي تليها على ازالة الكلايكوجين وفي المرحلة الأخيرة من الاستخلاص تزال الدهون باستخدام الكحول وبذلك تضمن هذه الطريقة الحصول على glucan قريب من النقاوة .

جدول (1): التركيب الكيميائي لخلاصة خميرة *Kluyveromyces marxianus* A_1

المكونات	%
الرطوبة	5.4
البروتين	50
الكربوهيدرات	31.6
الكلوكان	6.8

استعمال خلاصة الخميرة المنتجة من العزلة *Kluyveromyces marxianus* A_1 في تحضير بعض الأوساط الغذائية:

تم ادخال خلاصة الخميرة المنتجة في الدراسة الحالية في تركيبة عدد من الأوساط الغذائية للوقوف على مدى صلاحيتها في دعم نمو بعض الأنواع من الأحياء المجهرية حيث استخدمت في تحضير :

أ- الوسط MRS السائل المعد لتنمية بكتريا *Lactobacillus acidophilus*

اعتمد تقدير العكارة (Turbidity) كمقياس للنمو ، ويلاحظ من جدول (2) ان قيم الامتصاصية للوسط الذي يحتوي على خلاصة الخميرة قيد الدراسة مقارنة بتلك المحصل عليها باستعمال الوسط ذاته المحتوي على خلاصة خميرة مجهزة من احدى الشركات المعنية بانتاج الأوساط الغذائية كانت متقاربة جداً ويعد هذا مؤشراً لصلاحية خلاصة الخميرة المنتجة في الدراسة الحالية لدعم نمو بكتريا *Lb. acidophilus* والمعروفة بحاجتها الى متطلبات نمو معقدة وتحديداً بعض عوامل النمو (Growth factors) كفيتامينات مجموعة B .

استعمل [25] خلاصة خميرة منتجة من خميرة الخبز في تعزيز نمو بكتريا *Lactococcus lactis ssp lactis* و *Lactococcus lactis ssp cremoris* ، وحصل [26] على أعلى نمو لبكتريا *Lactobacillus acidophilus* عند استخدام خلاصة خميرة منتجة من خميرة البيرة في وسط MRS مقارنة مع خلاصة خميرة الخبز .

جدول (2) :مقارنة بين خلاصة الخميرة قيد الدراسة مع خلاصة خميرة الخبز القياسية في وسط MRS لتنمية بكتريا *Lactobacillus acidophilus* وبدرجة حرارة 37م

نوع خلاصة الخميرة	الامتصاصية في وقت الصفر على طول موجي 540 نانومتر	الامتصاصية بعد 24 ساعة على طول موجي 540 نانومتر
خلاصة الخميرة قيد الدراسة	0.08	0.539
خلاصة الخميرة القياسية	0.076	0.552

ب- الوسط Davis's Yeast Salt السائل المعد لتنمية خميرة *Saccharomyces cerevisiae*

اعتمد تقدير العكارة (Turbidity) كمقياس للنمو ، ويلاحظ من جدول (3) ان قيم الامتصاصية للوسط الذي يحتوي على خلاصة الخميرة قيد الدراسة مقارنة بتلك المحصل عليها باستعمال الوسط ذاته المحتوي على خلاصة خميرة مجهزة من احدى الشركات المعنية بانتاج الأوساط الغذائية كانت متقاربة جداً ويعد هذا مؤشراً لصلاحية خلاصة الخميرة المنتجة في الدراسة الحالية لدعم نمو خميرة *S. cerevisiae* والمعروفة بحاجتها الى متطلبات نمو معقدة وتحديداً بعض عوامل النمو (Growth factors) كفيتامينات مجموعة B .

جدول (3): مقارنة بين خلاصة الخميرة قيد الدراسة مع خلاصة خميرة الخبز القياسية في وسط Davis's Yeast Salt لتنمية خميرة *Saccharomyces cerevisiae* وبدرجة حرارة 25م

نوع خلاصة الخميرة	الامتصاصية في وقت الصفر على طول موجي 540 نانومتر	الامتصاصية بعد 24 ساعة على طول موجي 540 نانومتر
خلاصة الخميرة قيد الدراسة	0.133	1.05
خلاصة الخميرة القياسية	0.145	1.15

المصادر

1. Grba, S.; Stehlik-Toma, V.; Stanzer, D.; Vahcic, N. and Skrlin, A. (2002). Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. Chem. and Biochem. Eng. quarterly, 16 (1): 13-16.
2. Mozaffar, Z.; Nakanishi, K. and Matsuno, R. (2006). Formation of oligo Saccharides during hydrolysis of Lactose in mills using β-glactosidaes from Bacillus. J. Food sci., 50 (6): 1602-1606.
3. Ben. Hassan, R.M. and Ghaly, A.E. (1994).Aontinuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. Appl. Biochem. Biotechnol., 47; 89-104.
4. Papavasiliou, G.; Kourkoutas, Y.; Rapti, A.; Sipsas; V.; Soupioni, M. and Koutinas, A.A. (2008). Production of freeze-dried kefir cutture using whey. Inter. Dairy J., 18 (3): 247-254.
5. Athanasios, A. K.; Papa postolau, H.; Dimitr cllou, D.; Kopsahelis, N.; Katechaki, E.; Bekatorou, A. and Bosnea, L. A. (2009). Whey valor Sation : a complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. Bioresource Technol., 100 (15): 3734-3739.
6. Shinta, (2009).Single cell protein of cheese whey batch kluyveromyces maxianus fragilis. http:// pdf cast. Org/pdf/ single-cell-protein-Scp. Production-from-uf-cheese-whey-by-Kluyveromyces-marxianus.
7. Mrvcic,J.; Stehlik-Tomas, V. and Grba, S.(2008).Incorporation of copper ions by yeast *Kluyveromyces marxianus* during cultivation on whey. Acta Alimentar. 37(1): 133-139.
8. Dubois, M.; Hamilton, J. and Smith, F. (1956).Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Biochem. 28: 350-356.
9. A.O.A.C., (1980).Association of official analytical chemist's officinal methods of analysis.12th ed. Washington, DC.U.S.A.
10. Diluzio, N. R. (1991). A method of solubilization of a (1-3)-β-D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydr. Res. 219, 203-213.
11. Cutright, T.; Yun, H. and Lee, S. (1995). Effects of operating parameters on the growth of *Kluyveromyces fragilis* on cheese whey. Chem. Eng. Commun., 137(1): 47-51.
12. Kosikowski, F.V. and Giec, A. (2006). Activity of Lactose Fermenting yeasts in producing biomass from concentrated whey permeates. J. Food Sci., 47, 1892-1894.
13. الخفاجي ، زهرة محمود (1990) . التقنية الحيوية . مطابع دار الحكمة – جامعة بغداد .
14. Bellaver, L.H.; Carvalho, N. M. B.; Abrahao-Neto, J. and Gombert, A.K. (2006). Ethanol formation and enzyme activities around glucose- 6- Phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. FEMS yeast research, 4(7): 691-698.
15. Beausejour, D.; Leduy, A. and Ramaiho, R.S. (2009).Batch cultivation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey. Chem. Eng., 59 (4): 522-526.
16. Nourel - dien, H.; Halasz, A. (1983). Attemps utilize whey for the production of yeast protein effect of some vital growth factors. Acta. Al. mentaria, 11, 125-134.

17. Cazetta, M.L.; Monti, R. and Contiero, J. (2008).Effect of conditioning on the production of inulinase by *kluyveromyces marxianus* var. blugaricus through Fed-batch Fermentatin. Inter. J. food Eng. 94 (1): 5.

18. 18 - Medeiros, A.B.; Pandey, A.; Freitas, R.J.; christen, P. and Soccol, C., R. (2000). Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianu*s in solid-state fermentation using factorial densing and response surface methodology. Biochem. Eng. J., 6 (1): 33-39.

19. Castro, H.T.; Garibay, M.G.; castafieda, G.S. (2008).Lactose production by solid-state cultivation of *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 on an inert support: Effect of Inoculum, Buffer and Nitrogen Source. Appl. Biochem. Biotechnol., 151, 610-617.

20. Riaublance, A., Demuynck, M.; Moulin, G.; Ratomahenina, R. and Graille, J. (2006). Optimization of biomass production from palm oil in culture using candida rugosa. European J. Lipid Sci. and Technol., 94 (2): 46-51.

21. Hassan, M; Nahvi, I. and Tavassoli., M. (2004). Improvement of SCP production and BOD removal of whey with mixed yeast culture. Electron: J. Biotech., 7 (3).

22. Parrondo, J.; Garca, L.A. and Daz, M. (2009). Nutrient balance and metabolic analysis in kluyvermyces marxianus fermentation with lactose. Added whey. Braz. J. chem.. Eng., 26, 3.

23. Delaney, R. A.M.; Kennedy, R. and Walley, B.D. (1975).Composition of *Saccharomyces fragillies* biomass grown on lactose permeate. J. Sci. Food Agric., 26:1177-1186.

24. 24- الصبيحاوي ، هاشم محمد زهراوي (2006). دراسة تأثير بعض المستحضرات الجدارية لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* في بعض الاصابات الجلدية . رسالة ماجستير – الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية – جامعة بغداد .

25. 25- Berrette, J.; Champagne, C.P. and Goulet, J. (2001).Growth-Promoting properties of yeast extracts produced at different pH values with different autolysis promoters and bacterial populations. J. chem. Technol. And Biotech, 76 (2): 203-209.

26. 26- Champagne, C.P.; Gaudreau, H. and Conway, J. (2003). Effect of the production or use of mixtures of bakers or brewer's yeast extracts on their ability to promote growth of lactobacilli and pediococci. Electronic J. Biotechnol., 6(3).