تأثير إضافة خميرة Saccharomyces cerevisiae إلى أوساط التخمير على خفض تركيز الميثانول لبعض الصناعات التخميرية

أ د. رامز محمد[1]

د. شيم سليمان[2]

م. يحيى إسماعيل[3]

الملخص

يُعتبر الميثانول من أهم السموم التي تتشكل في وسط التخمير كناتج ثانوي ضار لنشاط الأحياء الدقيقة، وكنتيجة للتحلل الأنزيمي للبكتين بواسطة أنزيم بكتين ميثيل استراز PME، يهدف هذا البحث إلى تحديد مدى تأثير إضافة خميرة S. cerevisiae لأوساط تخمير العنب كوسيلة في خفض تركيز الميثانول، وذلك بعد إجراء معاملة حرارية لعصير العنب المعد للتخمير، حيث تم تحليل العينات باستخدام الطريقة اللونية (كطريقة مرجعية) التي تعتمد على القياس بمجال الأشعة المرئية عند طول موجة (575 nm) باستخدام مقياس الطيف الضوئي (spectrophotometer)، ثم تمت مقارنة النتائج مع المواصفة القياسية السورية رقم /2478/ لعام /2003/، حيث تم اختبار 12 عينة محضرة بالطرق المحلية التقليدية. أظهرت هذه النتائج أنَّ إضافة الخميرة بنسب 1-2%(w/v) أدى إلى انخفاض معنوي لتركيز الميثانول في المهروس المخمر بمقدار 17.9-20.7% مقارنةً بالشاهد، ولم يُلاحظ أي تأثير لنسبة إضافة الخميرة على تركيز الميثانول.

الكلمات المفتاحية: أنزيم بكتين ميثيل استراز PME، الطيف الضوئي، الميثانول، مشروب كحولي.

[1] أستاذ، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية. (dr.gobranramz@gmail.com)

[2] مدرسة، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

[3] طالب ماجستير في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

1. المقدمة:

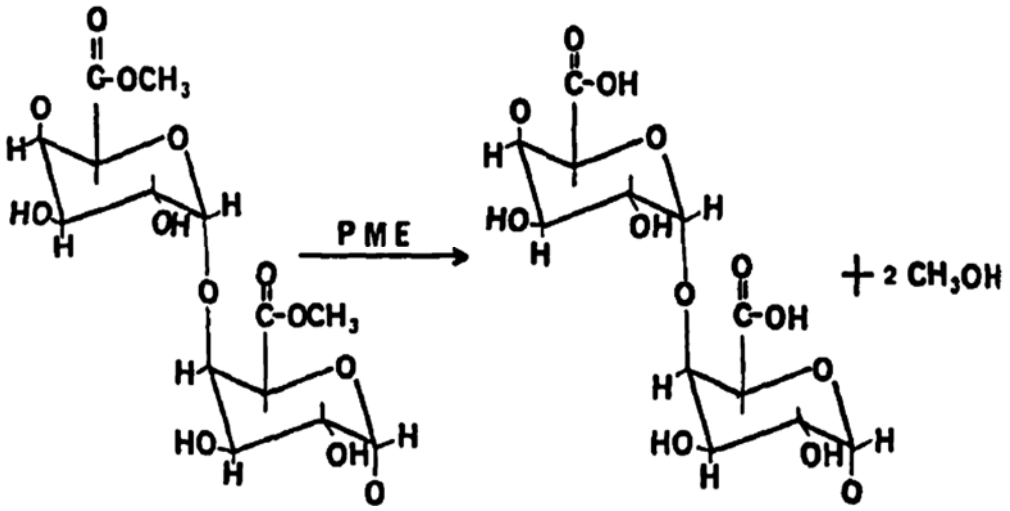
تقدر منظمة الصحة العالمية (WHO) أن هناك حوالي 2 مليار شخص في جميع أنحاء العالم يستهلكون المشروبات الكحولية و76.3 مليون يعانون من اضطرابات تعاطي الكحول القابلة للتشخيص، بالإضافة إلى الأمراض المزمنة التي قد تُصيب من يشربون الخمر بعد سنوات عديدة من التعاطي المفرط، فإن يؤدي الكحول إلى نتائج مؤلمة تقتل أو تشكل عوارض خطرة في سن مبكرة نسبيًا، هناك أدلة متزايدة على أنه بالإضافة إلى حجم الكحول، فإن نمط الشرب وثيق الصلة بالنتائج الصحية، بشكل عام، هناك علاقة سببية بين استهلاك الكحول وأكثر من 60 نوعًا من الأمراض والإصابات، تشير التقديرات إلى أن الكحول يسبب حوالي 20–30% من سرطان المريء وسرطان الكبد وتليف الكبد، ونوبات الصرع وحوادث السيارات في جميع أنحاء العالم، يتسبب الكحول في 1.8 مليون حالة وفاة (2004، WHO).

تُعرّف الخميرة المسببة للتّخمر بأنّها عبارة عن فطر حقيقي، وتقضي معظم حياتها بشكل خلية واحدة، وتتكاثر بالّتبرع أو بالانشطار، حيث عزلت أنواع متعددة من الخمائر المساهمة في صناعة النبيذ ومن أهمّها جنس Saccharomyces (Sicard *et al.*, 2011) الذي تعتبر أنواعه مخمّرة وأكثر أنواعه أهميةً هو S.cerevisia الذي يتميز بأهميته الصّناعية في صناعة الكحول (2000، Pretorios).

تنتج S. cerevisiae الإيثانول مع كميات متفاوتة من المواد الأخرى، مثل الميثانول والألدهيدات والكحوليات الأعلى (كحول fusel) والأحماض العضوية (حمض الأسيتيك وحمض اللاكتيك)، تقلل هذه المنتجات المشتركة من جودة الإيثانول وتعزز تكلفة تقطير الإيثانول (Arshad *et al., 2008*).

يرتبط تركيزات الميثانول في المشروبات الروحية ارتباطًا وثيقًا بالأنشطة الأنزيمية في الفاكهة وأثناء عملية التخمير الكحولي، حيث إنَ نشاط البكتين ميثيل استيراز قد يُشتق داخليًا من الثمار نفسها أو أثناء التخمير الكحولي أيضًا بواسطة بكتين ميثيل استيراز المتكون من الخميرة أو من الكائنات الحية الدقيقة الأخرى، قد يتم أيضًا إدخال البكتين ميثيل استيراز خارجيًا عن طريق إضافة بعض المستحضرات الإنزيمية البكتينية. (Blumenthal *et al.,* 2021)

تُفكك أنزيمات البكتين أستراز (بكتين ميثيل استراز) البكتين إلى حمض البكتيك والميثانول وفق المعادلة التّالية الموضحة بالشكل(1)



الشكل (1) تشكل الميثانول من البكتين(Bindler *et al.*, 2009)

هناك مسار آخر لتكوين الميثانول في الفواكه الغنية بالبروتين مثل العناب الصيني (Ziziphus Jujube Mill) وهو نزع أمين الجلايسين، متبوعًا بنزع الكربوكسيل والتفاعل مع النتريت من استخدام الأسمدة. (Xia *et al.*, 2017)

التخمير الكحولي هو أشهر عمليات التخمير المعروفة، ويعد من أهم عمليات الحفظ للركائز الغنية بالسكر، مثل الفاكهة وعصائر الفاكهة والخضروات، يتم التخمير الكحولي بواسطة الخمائر وبعض الفطريات والبكتيريا الأخرى، تتفاوت مستويات الميثانول في المشروبات الكحولية المختلفة حيث تتراوح من 6–27مغ/لتر في البيرة وفي النبيذ من 96–321 مغ /لتر في حين أن المشروبات الكحولية المقطرة احتوت على10–220مغ/ لتر (Greizerstein, 1981; WHO, 1997) حيث يصل محتوى المشروبات الروحية من الميثانول الى 1500مغ/لتر (Taucher *et al.*, 1995)، والكونياك الفرنسي يحتوي على ميثانول من 410–700 مغ/لتر، نواتج التقطير الإسبانية بشكل عام 180–500 مغ/لتر، ونواتج التقطير الألمانية (Weinbrands)، 390–920 مغ/لتر، أبلغ Reinhard أنَّ متوسط محتوى الميثانول لشركة Weinbrands مع نسبة كحول 38–41% v/v هي 298–520 مغ/لتر وذلك لعدة دول.(KANA *et al.*, 1991)

وفقًا لنظام تحليل المخاطر ونقاط التحكم الحرجة (HACCP) في صناعة النبيذ، يعد محتوى الميثانول أحد معايير نقاط التحكم الحرجة التي يجب التحكم فيها أثناء مرحلة التخمير الكحولي لإنتاج نبيذ آمن للاستهلاك البشري (Cabaroglu ،2005)، حددت كل الدول المنتجة للمشروبات الكحولية الحدود المسموح بها من الميثانول، وهيئة المواصفات في سورية حددت وفق المواصفة القياسية السورية للعرق رقم 2478 لعام 2003 الحد الأقصى المسموح به من الميثانول (200 مغ/100 مل كحول مطلق).

كذلك نظمَّ الاتحاد الأوروبي (EU) الحد الأقصى لمحتويات الميثانول في المشروبات الروحية اعتمادًا على المواد الخام المستخدمة، بالنسبة للكحول الإيتيلي ذي الأصل الزراعي (من دبس السكر والحبوب)،

يكون الحد الأقصى لمستوى الميثانول هو 30 مغ/لتر في 100%v/v كحول مطلق، بينما بالنسبة للفودكا هو 10مغ/لتر، وأقل مستوى محدد لمشروب الجن في لندن بـ 5 مغ/لتر، تكون الحدود أعلى بالنسبة للمواد التي أساسها الفاكهة: بالنسبة لروح النبيذ 200 مغ/لتر، ولتفل العنب وعصير التفاح 1000 مغ/لتر، ولتفل الفاكهة 1500 مغ/لتر، لأرواح الفاكهة بشكل عام 1000 مغ/ لتر، باستثناء 1200 مغ/ لتر للتفاح، والمشمش، والخوخ، والدراق، والكمثرى، والتوت الأسود، و1350 مغ/ لتر للسفرجل. (Blumenthal *et al.*, 2021)

أما بالنسبة للمشروبات الكحولية التركية وفقًا للائحة (2005/11)، يجب أن يحتوي الراكي التركي على مستوى ميثانول أقل من 150 مغ/لتر كحول المطلق. (Cabaroglu, Yilmaztekin, 2011)

إنَّ تخفيض محتوى الميثانول في مشروبات الفاكهة المخمرة والمشروبات الكحولية القوية الأخرى هي المشكلة التي تمت دراستها في أجزاء مختلفة من العالم، حيثُ هناك العديد من الدراسات التي اهتمت بالميثانول ولقد بينت الدراسات والأبحاث أنَّ تركيز الميثانول خلال التخمير يتباين بدرجة كبيرة، ولأسباب عديدة ونذكر من هذه الأبحاث ما يلي:

بيَّن Nikićevićl *et al.*, (2005) أنَّ اختلف تركيز الميثانول في المنتج النهائي يكون سببه اختلاف انواع الخمائر المسببة للتخمر، كذلك أشار إلى أنَّ تركيز الميثانول يزداد عند زيادة الفترة الزمنية بين التخمير والتقطير، حيث أن الزمن المثالي للتقطير هو بعد انتهاء التّخمير مباشرة، اذ تؤدي اطالة هذه الفترة إلى حدوث تغيرات كيميائية وتغيرات بيوكيميائية تؤثر سلباً على جودة المشروب الكحولي الناتج.

وفي دراسةٍ أجراها Kana *et al.*, (1991) تبينَّ أنَّه يقل محتوى الميثانول في المنتج النهائي عند إجراء المعالجة الحرارية في حال طبقت على العصير الذي لا يحتوي على قشور العنب.

في حين أكدَّ Xia *et al.*, (2017) أن التعقيم بحقن البخار لمهروس العناب قلل من محتوى الميثانول في الروح بشكل ملحوظ بمقدار ثمانية أضعاف، وأشارَّ Miljic *et al.*, (2016) إلى الأساليب التكنولوجية الأخرى لتعطيل أنزيم بكتين ميثيل استراز وهي التثبيط بالحرارة والأمواج فوق الصوتية thermosonication (أدّت الأمواج فوق الصوتية ودرجة الحرارة 70درجة مئوية إلى تقليل الميثانول بنسبة 30% في نبيذ الخوخ)، كذلك يوجد تأثير غير حراري إضافي لكل من الموجات فوق الصوتية والميكروويف في تحسين الخصائص الحسية للمنتج.

وفي دراسة أجراها Hang *et al.*, (2010) على روح عصير التفاح، قللت البسترة (30 دقيقة عند 50 درجة مئوية ، ثم تسخينها إلى حوالي 85 درجة مئوية) لعصير التفاح قبل التخمير من محتوى الميثانول بنسبة 34-46%.

وأشارَّ Satora & Tuszynski, (2010) إلى أنَّ البكتين ميثيل استراز المنتج من الخميرة يمتلك قيم pH مثالية تتراوح من 3.75 إلى 6.

يمكن أيضًا استخدام التحكم الميكروبيولوجي في العملية لمنع تكوين الميثانول في المشروبات المخمرة. على سبيل المثال، يجب إجراء التلقيح بمزارع نقية باستخدام الخميرة التجارية على عكس التلقيح التلقائي بواسطة الخمائر البرية. (Liang *et al.*, 2014)

الهريس المخمر بدون مزارع الخميرة النقية يؤدي عمومًا إلى ارتفاع مستويات الميثانول، يمكن أن يؤدي اختيار مزرعة الخميرة إلى تقليل محتوى الميثانول في نواتج التقطير بنسبة تصل إلى 20%. (Bartels *et al.,* 1998) كما وجد Liang *et al.*,(2014) أنَّ استخدام سلالة S. cerevisiae S12 المتحولة أدى إلى خفض محتوى ميثانول أثناء تخمير النبيذ بنسبة 73% مقارنةً بالسلالة البرية.

2. أهمية البحث وأهدافه:

يصعب على المستهلكين تحديد جودة المنتجات التي يتناولونها فيما يتعلق بالقيمة الغذائية والتغيرات التي تؤدي لإنخفاضها وأحياناً أخرى لتلاشيها بحيث تصبح هذه المنتجات سامة، ويعتبر كحول الميثانول من السموم الخطرة جداً وخصوصاً في المشروبات الكحولية لصعوبة كشفهِ فيها، وهذا ما يؤكد ضرورة إخضاع إنتاجها للمراقبة الشديد وإجراء التحاليل الكيميائية على المنتج النهائي لضمان جودة المنتج.

1.2 أهمية البحث:

يعتبر الميثانول من أخطر السموم التي تتشكل نتيجة التحلل الأنزيمي للبكتين، حيث إنَّ لمستويات الميثانول المرتفعة في المشروبات الكحولية تأثيراً مباشراً على صحة المستهلك، ونظراً لزيادة استهلاك الأغذية المتخمرة وبخاصة المشروبات منها، ولتكرار حالات التسمم بمادة الميثانول حيث كان لحادثة طرطوس عام 2003 التي تعرض فيها 43 فرداً من مختلف الأعمار للتسمم الكحولي الحاد، أهيمه بالغة لإدراك حجم المشكلة ومنع تكرار هذه الحادثة من حيث مراقبة مستوى الميثانول في هذه المشروبات.

2.2 أهداف البحث:

-دراسة تأثير إضافة خميرة *S.cerevisiae* بنسب مختلفة (1% - 2% w/v من الحجم النهائي لعصير العنب المعد للتخمير)بشكل نشط جاف على تشكل الميثانول والإيثانول خلال مرحلتي التخمير والتقطير، وذلك بعد إجراء المعاملة الحرارية باستخدام حمام مائي 100 درجة مئوية واجراء المقارنة مع عينات حدث لها تخمير طبيعي دون التلقيح بخلايا الخميرة، ولم يحصل لها معاملة حرارية (شاهد).

-تحديد أفضل نسبة إضافة للخميرة أدت إلى تقليل الميثانول المتشكل في مرحلتي التخمير والتقطير.

-دراسة تأثير التخزين للناتج النهائي من مرحلة التقطير، وأختيار الشرط الأكثر ملائمة لحفظ المنتج النهائي.

3.طرائق البحث ومواده:

1.3 مواد البحث:

تم في هذه الدراسة استخدام الأجهزة المتوفرة في مخابر كلية الزراعة، قسم علوم الأغذية وتضم هذه التجهيزات ميزان حساس ذو حساسية 0.0001 غ، مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer (Jasco v-530)، حمام مائي، براد، ميزان حرارة، المبخر الدوار Rotavapor، مقياس الـPH، مجهر ضوئي Microscope، اوتوغلاف Autoclave

استخدمت المواد الكيميائية التالية: الملح الصودي لحمض الكروموتروبي، برمنغنات البوتاسيوم، ميتا بيسلفيت الصوديوم، ميثانول عياري، حمض الكبريت، حمض الفوسفور، إيثانول، ديكرومات البوتاسيوم، كبريتات الحديد النشادرية، سيانيد الحديد، كاشف أورثو فينانثرولين، ماء مقطر

وتم استعمال صنف واحد خلال العملية التصنيعية (كوارتز ترامیناز) صنف أجنبي تصنيعي، العنقود أسطواني الشكل، كثيف جداً، الحبات كروية الشكل، لونها أصفر، اللب عصيري، غير ملون.

وتم استخدام بادئ تجاري مجفد ومحدد التركيب الميكروبي، وهو عبارة عن خلايا الخميرة S.cerevisiae المعدة للتخمير الكحولي، تم أخذ الكمية المطلوبة من العنب وفق الصنف المحدد وَحولت إلى مرحلة الهرس حيث تم الهرس باستخدام الأرجل وتم أخذ كمية من المهروس لمعاملة الشاهد، تعرضت باقي الكمية إلى معاملة حرارية (حمام مائي) لمدة 30 دقيقة حتى الغليان، بعد التبريد لدرجة حرارة الغرفة تم التلقيح باستخدام خلايا الخميرة النشطة الجافة وفق معاملتين 1% و2% w/v، حيث حولت لمرحلة التخمير كلٍّ على حدًّا لمدة 40 يوم، بعد انقضاء فترة التخمير أُجريَّ لها تقطير باستخدام جهاز تقطير تقليدي (كركة) بعد إضافة بذور اليانسون بنسبة 10% w/v لكلٍّ منها بحيث تمَّ استخدام حمام مائي 100 درجة مئوية لإبعاد تأثير الحرارة على عملية التقطير، خزنَّ ناتج التقطير عن كل معاملة بواسطة عبوات بلاستيكية من البولي ايتلين في شرطين لمدة شهرين ، الشرط1: في ظروف تبريد بمعزل عن الحرارة والضوء(داخل البراد). الشرط2: معرض للحرارة وكذلك للضوء (خارج البراد).

تم إجراء نفس الخطوات السابقة لمعاملة الشاهد دون إجراء تعقيم حراري وكذلك دون إضافة لخلايا الخميرة، وإنما تركَّ أمر التخمير للسلالات البرية (ميكروفلورة طبيعية).

تمَّ أخذ 12 عينة خلال الدراسة وكل عينة ثلاث مكررات حيث كانت موزعة على ثلاث معاملات (شاهد 0%، 1%، 2% إضافة خميرة) وخلال ثلاث مراحل 1-مرحلة التخمير 2-مرحلة التقطير 3-مرحلة التخزين

2.3 طرائق البحث:

✓ **تحديد نسبة الإيثانول في العينات باستخدام طريقة الأكسدة الكيميائية:**

المواد الكيميائية المطلوبة:

1. حمض كبريت مركز H_2SO_4.
2. ديكرومات ثنائية البوتاسيوم $K_2Cr_2O_7$.
3. كبريتات الحديد النشادرية الثنائية $FeSO_4(NH_4)_2SO_4$.
4. كاشف أورثو فينانثرولين $C_{36}H_{24}FeN_6^{+2}$.

تمَّ استخدام طريقة الأكسدة الكيميائية لحساب نسبة الإيثانول في العينات حيث تعتمد هذه الطريقة على تقطير الإيثانول في العينات واستقبال الناتج المقطر في وسط محمض (بواسطة حمض الكبريت) وحجم معلوم من ديكرومات ثنائية البوتاسيوم حيث يتأكسد الايثانول الى حمض استيك

$$EtOH \rightarrow HOAc$$

ثم يتم تقدير الحجم غير المتفاعل من الديكرومات بالمعايرة بواسطة كبريتات الحديد النشادرية الثنائية (محلول مور) بوجود كاشف أورثو فينانثرولين، يمكن حساب تركيز الإيثانول% بتطبيق المعادلة التالية: (Caputi, *et al.,* 1968)

$$\%EtOH\ by\ vol. = 25.00 - (25 \times sample\ titer/blank\ titer).$$

✓ **تحديد نسبة الميثانول في العينات باستخدام الطريقة اللونية:**

المواد الكيميائية المطلوبة:

1. الملح الصودي لحمض الكروموتروبي $C_{10}H_6Na_2O_8S_2.2H_2O$.
2. برمنغنات البوتاسيوم $KMnO_4$.
3. ميتا بيسلفيت الصوديوم$NaHSO_4$.
4. حمض الكبريت H_2SO_4.
5. ميثانول عياري CH_3OH.
6. ماء مقطر H_2O.
7. حمض الفوسفور H_3PO_4.

تستخدم الطريقة اللونية لتحديد الميثانول والتي تعتمد على استخدام جهاز spectrophotometer وقياس الامتصاصية عند طول موجة 575 نانومتر، ثم يتم حساب تراكيز الميثانول مقدرة بالغرام/ليتر كحول مطلق بتطبيق المعادلة التالية.(Dhar *et al.*, 2013)

(Indian standard alcoholic drinks methods of test, 2005)

$$\textbf{Methanol}_{\text{(gr/100L of absolute ethanol))}} = \frac{A2 \times C \times D \times 1000 \times 100}{A1 \times S} \times 100$$

حيث:

A_2 :امتصاصية محلول العينة القياسية .

C : تركيز محلول الميثانول القياسي مقدراً بالغرام / مل .

D : معامل التمديد للعينة .

A_1 :امتصاصية محلول الميثانول القياسي.

S: النسبة المئوية للإيثانول في العينة (v/v).

4. التحليل الإحصائي للتجربة:

تم استخدم برنامج Excel وبرنامج SPSS في معالجة البيانات النسخة 20، واستخدم في البحث الاختبارات الآتية:

-اختبار Kolmogorov – Smirnov للتحقق من مطابقة البيانات للتوزيع الطبيعي.

-اختبار Levene's Test للتحقق من تجانس البيانات.

-اختبار Independent sample t-test للتحقق من وجود فروق معنوية بين عينتين مستقلتين.

-اختبار تحليل التباين Two way anova لمعرفة مدى تأثر نسبة الميثانول بإضافة الخميرة(1%-2%، الشاهد دون إضافة) و شروط التخزين وكذلك التأثير المتبادل لهذه المتغيرات المستقلة على المتغير التابع، في مرحلة التقطير والتخزين وذلك عند مستوى المعنوية$\alpha = 0.05$.

-One way anova لمعرفة مدى تأثر نسبة الميثانول بإضافة الخميرة (1%-2%، الشاهد دون إضافة) في مرحلتي التخمير والتقطير

5. النتائج والمناقشة:

- **تحديد نسبة الميثانول والإيثانول خلال مرحلتي التخمير والتقطير.**

يُلاحظ من الشّكل (2) أنَّ تركيز الميثانول مغ/100مل كحول مطلق في مرحلة التّخمير تجاوزَ في جميع العيّنات الحد الأعلى المسموح به من قبل المواصفة القياسيّة السوريّة لعام 2003، حيث كانت أقل نسبة في العيّنة المضاف لها 1% خميرة(16.4±981.83)، ومن ثمّ يليها العيّنة المضاف لها 2% خميرة(50.42±1015.93)، وكانت أعلى نسبة في عيّنة الشّاهد(35.25±1237.9) يفسّر ذلك أنَّ عيّنة الشّاهد لم تتعرّض لمعالجة حراريّة بعد هرس الثّمار، حيث أنَّ أنزيم بكتين ميثيل استيراز المشتق من الثّمار لم يتعرّض للتّثبيط وإنَّ الميكروفلورا الطّبيعيّة (بكتيريا، فطريات، خميرة) هي من قامت بالتّخمير وبدورها أنتجت مجموعة من الأنزيمات الحالة للبكتين (بكيتن ميثيل استيراز) حيثُ أنَّ كميّة الأنزيم PME أكبر في عيّنة الشّاهد وبالتّالي ميثانول بشكل أكبر، (Blumenthal *et al.*, 2021) وهذا يتفق

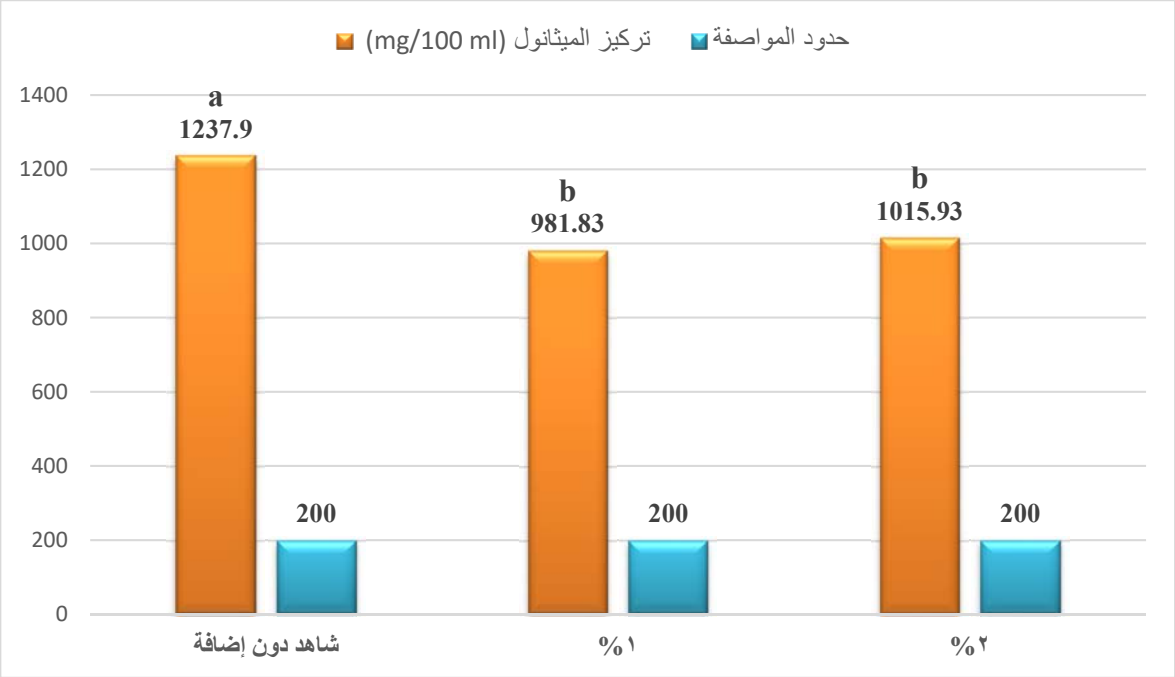
مع Bindler ايضاً حيث يرتبط معدّل إنتاج الميثانول ارتباطًا مباشرًا بطبيعة وكميّة المواد البكتينية الموجودة في الفاكهة وكذلك بكميّة الإنزيم الملامس لمثل هذه الرّكيزة. (Bindler *et al* ., 2009)

أمّا في العيّنات المُضاف لها خميرة(1%–2%)، تعرّضت بعد مرحلة هرس الثّمار إلى معاملة حراريّة أدّت لقتل جميع الميكروفلورا وتثبيط أنزيم PME الطّبيعيّ، وبالتّالي لم يعد هنالك مصدر لأنزيمات البكتين سواء الخميرة المضافة، وبالتّالي كميّة أقل من الإنزيم، يؤدّي بدورة لكميّة أقل من الميثانول.

وبالتّحليل الإحصائي تبينَّ وجد فروق معنويّة بين تركيز الميثانول في العيّنة المضاف لها 1% خميرة، مقارنة بتركيز الميثانول في عيّنة الشّاهد، وكذلك وجود فروق معنويّة بين تركيز الميثانول في العيّنة المضاف لها 2% خميرة، مقارنة بتركيزه في عيّنة الشّاهد، بينما أظهرت النّتائج عدم معنويّة الفروق بين تركيز الميثانول في العيّنة المضاف لها 1% وتركيزه في العيّنة المضاف لها 2% خميرة، حيث تفوّقت عيّنة الشّاهد معنويّاً على باقي المعاملات.

وبتفوّق عيّنة الشّاهد معنويّاً يُستنتج أنّه ليس لنسبة إضافة الخميرة أي تأثير معنوي على تركيز الميثانول، ويكن إرجاع الفروق المعنويّة بين العيّنات والشّاهد لعمليّة التّعقيم، وكذلك إلى سلالة الخميرة المضافة من حيث قدرتها على إنتاج الـPME ، وهذا يتّفق مع Bartels *et al.*, (1998)

وبذلك يمكن أن يؤدّي اختيار مزرعة الخميرة إلى تقليل محتوى الميثانول في نواتج التّقطير بنسبة تصل إلى 20%.



الشّكل (2) تركيز الميثانول (مغ/100مل كحول مطلق) في مرحلة التّخمير بالنّسبة لإضافة الخميرة%. اختلاف الأحرف الصّغيرة يعني وجود فروق معنويّة عند مستوى الدلالة $\propto = 0.05$

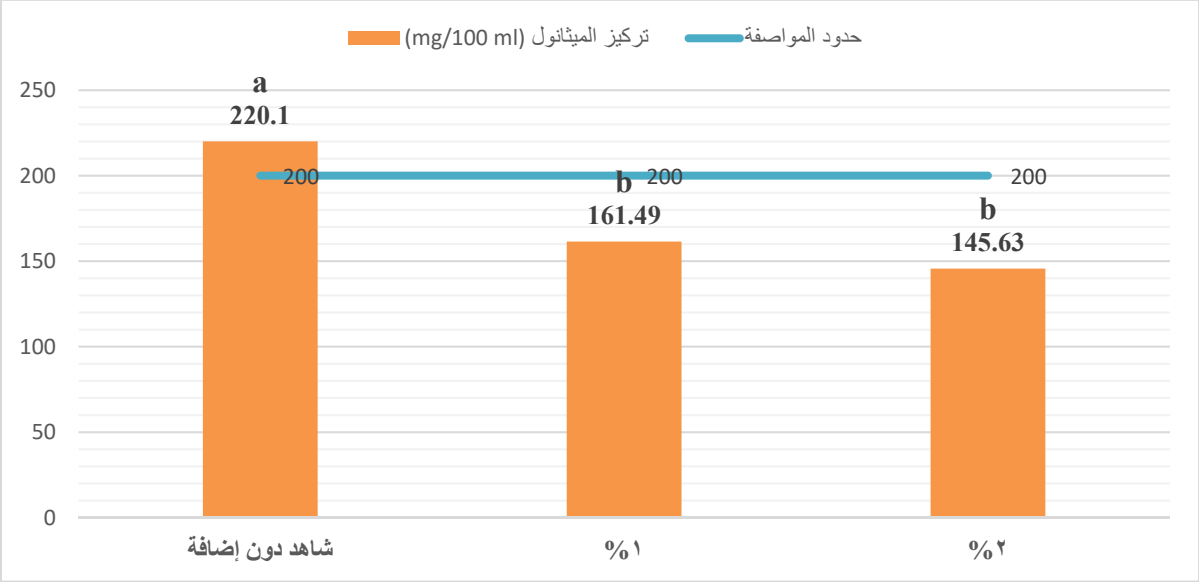
$$\sigma_{1\%} = 16.4, \quad \sigma_{2\%} = 50.42, \quad \sigma_{\text{شاهد}} = 35.25$$

يلاحظ من الشّكل (3) أنَّ تركيز الميثانول مغ/100مل كحول مطلق في مرحلة التقطير، انخفض بشكل كبير مقارنةً بمرحلة التّخمير، حيثُ تجاوزت فقط عيّنة الشّاهد (17.4±220.1) الحد الأعلى المسموح به من قبل المواصفة القياسيّة السوريّة لعام 2003، أمّا عيّنة 1% خميرة(1.56±161.49) وعيّنة 2% خميرة (3.4±145.63) كانتَّ ضمن حدود المواصفة.

يعود انخفاض نسبة الميثانول بعد تقطير العصير المتخمر إلى الخصائص الفيزيائية للميثانول فمن الصعب فصله عن خليط الإيثانول والماء الأزيوتروبي، وهذا أمكن تفسيره باختلاف القطبية بين الإيثانول والميثانول حيث أن الإيثانول الأقل قطبية والأكثر درجة غليان (78,3 °C) يتقطر أولاً بينما الميثانول الأكثر قطبية والأقل درجة غليان (64,8 °C) يبقى مع الماء (Spaho، 2017)، كذلك بيَّن Alcarde *et al* ., (2011) أنَّ محتوى الميثانول يقل بتكرار عملية التقطير.

وبالتحليل الإحصائي تبينَّ وجد فروق معنوية بين تركيز الميثانول مغ/100مل كحول مطلق في العينة 1% خميرة، مقارنة بتركيز الميثانول في عينة الشاهد، وكذلك وجود فروق معنوية بين تركيز الميثانول في عينة 2% خميرة، مقارنة بتركيزه في عينة الشاهد، بينما أظهرت النتائج عدم معنوية الفروق بين تركيز الميثانول في عينة 1% وتركيزه في عينة 2%، حيث تفوقت معاملة الشاهد معنوياً على باقي المعاملات، ارتفاع تركيز الميثانول في عينة الشاهد يعود إلى ارتفاع تركيز الميثانول في مرحلة التخمير بالتالي زادَّ تركيز الميثانول في ناتج التقطير وهذا يتفق مع نتائج (Bartels *et al.*, 1998)، الهريس المخمر بدون

مزارع الخميرة النقية يؤدي عمومًا إلى ارتفاع مستويات الميثانول، ويمكن أن يؤدي اختيار مزرعة الخميرة إلى تقليل محتوى الميثانول في نواتج التقطير بنسبة تصل إلى 20%.



الشّكل (3−9) تركيز الميثانول (مغ/100مل كحول مطلق) في مرحلة التّقطير بالنّسبة لإضافة الخميرة%. اختلاف الأحرف الصّغيرة يعني وجود فروق معنويّة عند مستوى الدّلالة $\propto = 0.05$

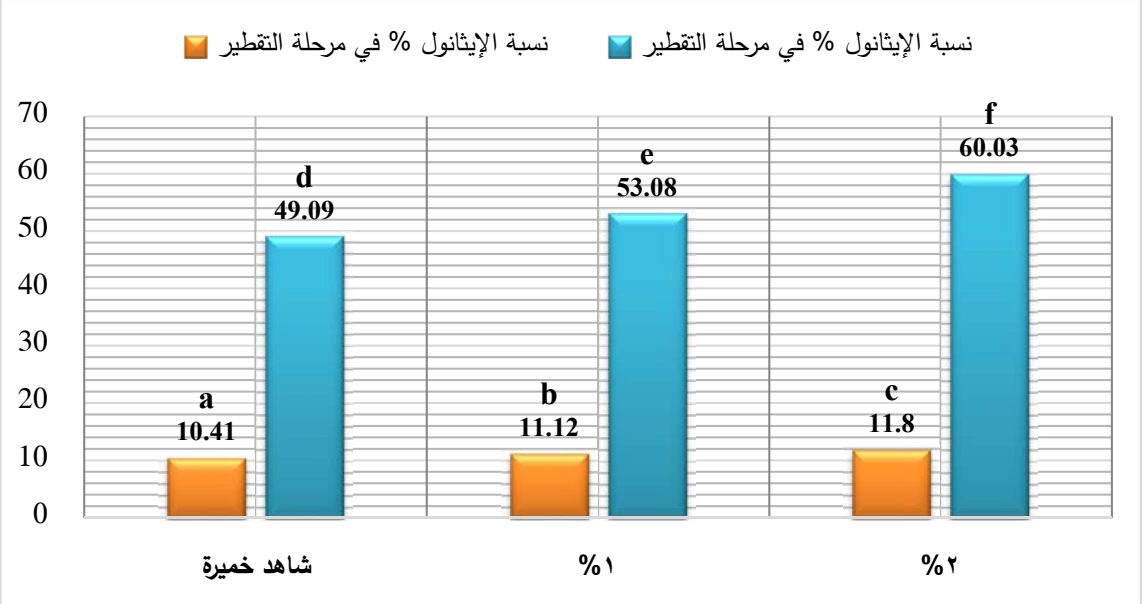
$$\sigma_{1\%} = 1.56, \quad \sigma_{2\%} = 3.4, \quad \sigma_{\text{شاهد}} = 17.4$$

يظهر الشّكل(3−10) النسبة المئويّة للإيثانول في مرحلتي التّخمير والتّقطير، حيثُ يُلاحَظ زيادة النّسبة بشكل كبير بعد إجراء التّقطير على العيّنات المخمّرة حيث كانت نسبة الإيثانول% في عيّنة الشّاهد (0.14±10.41) وفي العيّنة المضاف لها 1% (0.12±11.12) وفي العيّنة المضاف لها 2%(0.14±11.8) وذلك في نهاية التّخمير، نستنتج أنّه بارتفاع التّركيز في مرحلة التّخمير ينعكس على النّسبة المئويّة للإيثانول في ناتج التّقطير حيث بزيادة نسبة الإيثانول في مرحلة التّخمير يزداد معه التّركيز في مرحلة التّقطير، حيث بلغت أعلى قيمة له في العيّنة المضاف لها 2% وثمّ في العيّنة المضاف لها 1% ثُمّ في عيّنة الشّاهد، يعود سبب في ارتفاع تركيز الإيثانول إلى زيادة حجم بادئ التّخمير المضاف (*S.cerevisiae*) وبالتّالي زيادة التخمّر وزيادة تركيز الإيثانول.

بينت الدراسة الإحصائية ارتباط قوي بين مرحلتي التخمير والتقطير بلغت قيمة معامل الارتباط R=0.96 وهو معنوي عند مستوى دلالة α=0.01.أي أنَّ تركيز الإيثانول في ناتج التقطير مرتبط بشكل مباشر بنسبة الإيثانول التي تتشكل خلال مرحلة التخمير.

وأظهرت نتائج تحليل التباين وجود فروق معنوية بين نسبة الإيثانول في كل من عينة 1% مقارنةً بعينة الشاهد، وكذلك وجود فروق معنوية بين نسبة الإيثانول في عينة 2% مقارنةً بعينة الشاهد، وكذلك الفروق داله إحصائياً بين نسبة الإيثانول في عينة 1% و2% خميرة. حيثُ تفوقت إضافة 2% معنوياً على باقي

المعاملات في مرحلة التخمير والتقطير. أي أنَّ لإضافة الخميرة بعد إجراء التعقيم للمهروس تأثير على نسبة الميثانول حيثُ أدت إضافة 2% خميرة إلى ناتج إيثانول أكبر بمعدل 11.8% في مرحلة التخمير و18.2% في مرحلة التقطير.

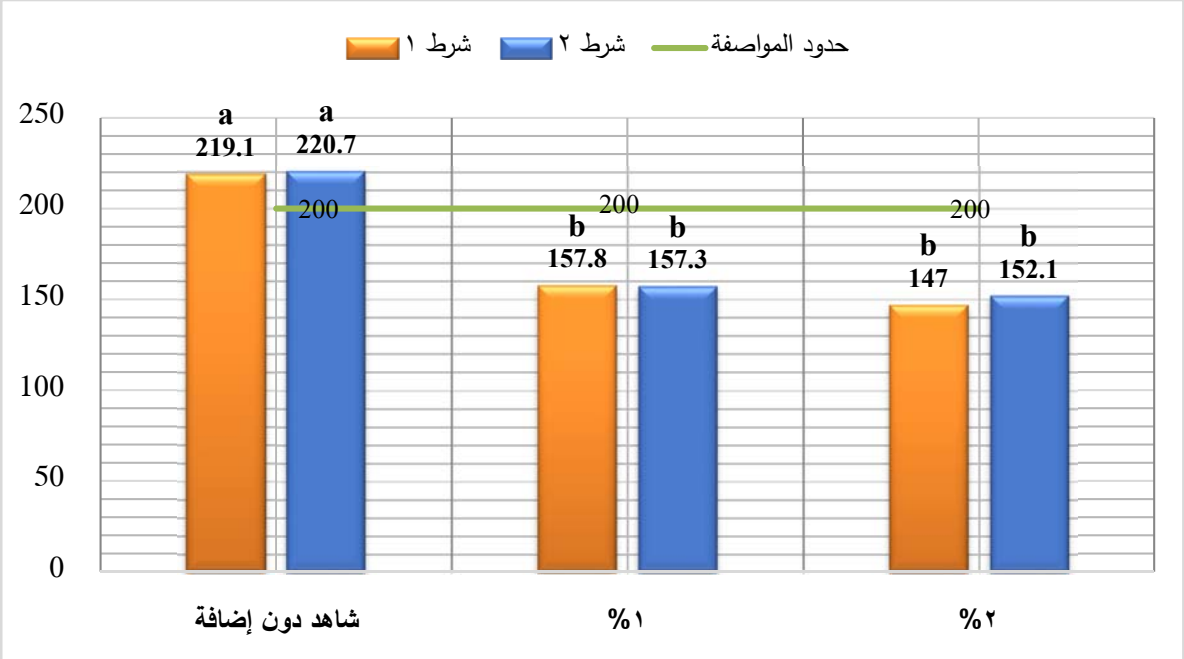


الشّكل (3-10) نسبة الإيثانول%v/v خلال مرحلتي التّخمير والتّقطير بالنّسبة لإضافة الخميرة%. اختلاف الأحرف الصّغيرة يعني وجود فروق معنويّة عند مستوى الدّلالة $\propto = 0.05$

$\sigma_{1\%} = 0.12, \quad \sigma_{2\%} = 0.14, \quad \sigma_{\text{شاهد}} = 0.14$

- **تحديد نسبة الميثانول خلال شرطي التخزين والمقارنة مع ناتج التقطير(قبل التخزين)**

يظهر الشكل (5) تركيز الميثانول مغ/100مل كحول مطلق بعد التخزين في ظروف الشرطين (داخل البراد وخارجه)، حيث أظهرت نتائج التحليل الإحصائية عند مقارنة تركيز الميثانول بين الشرطين، عدم وجود فروق معنوية بين تركيز الميثانول في التخزين داخل مقارنةً بالتخزين خارجه.



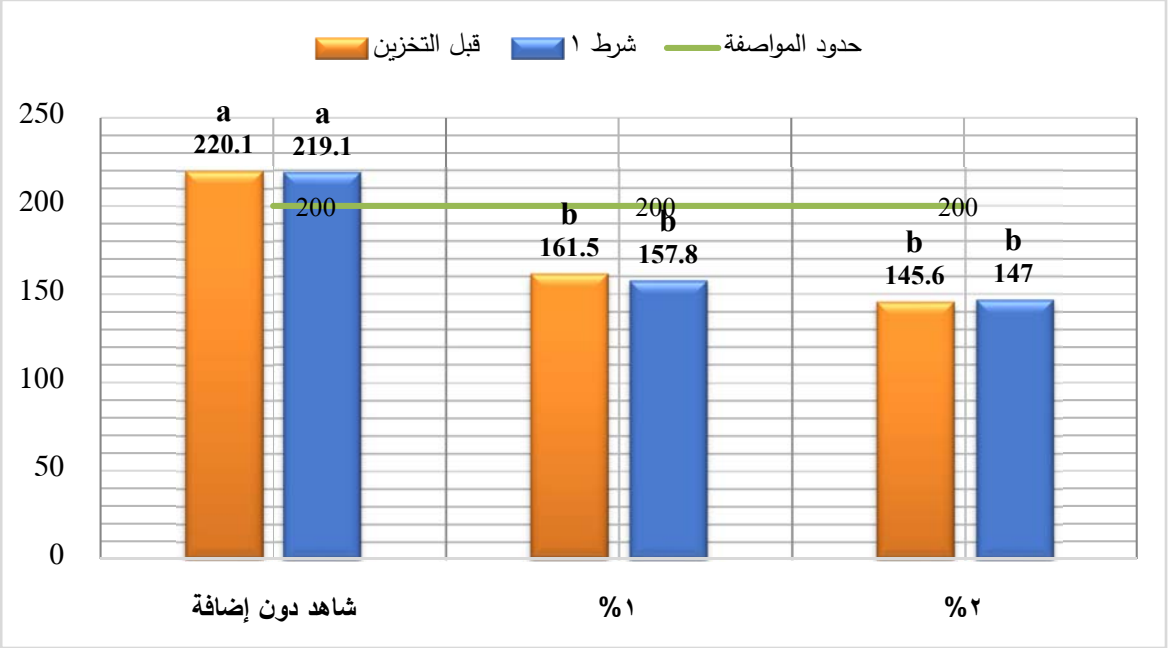
الشكل (5) تركيز الميثانول مغ/100مل خلال ظروف التخزين مختلف الشروط. الأحرف الصغيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى الدلالة $\propto = 0.05$

$$\text{2شرط } \sigma_{1\%} = 4.5, \qquad \sigma_{2\%} = 5.52, \qquad \sigma_{\text{شاهد}} = 6.01$$

وأظهر الشكل (6) والشكل (7) مقارنة بين تركيز الميثانول قبل التخزين وفي كل من الشرط1 (داخل البراد) والشرط 2(خارج البراد)، كلٍّ على حده. حيث أظهرت نتائج التحليل الإحصائي عند مقارنة تركيز الميثانول قبل التخزين وبعد التخزين في كلا من الشرطين1 و 2، أنه لا يوجد فروق معنوية بين تركيز الميثانول عند مقارنة شاهد قبل التخزين وشاهد بعد التخزين، ولا يوجد أي فروق ذات دلالة إحصائية عند مقارنة تركيز الميثانول في عينة 1% قبل التخزين مع عينة 1% بعد التخزين.

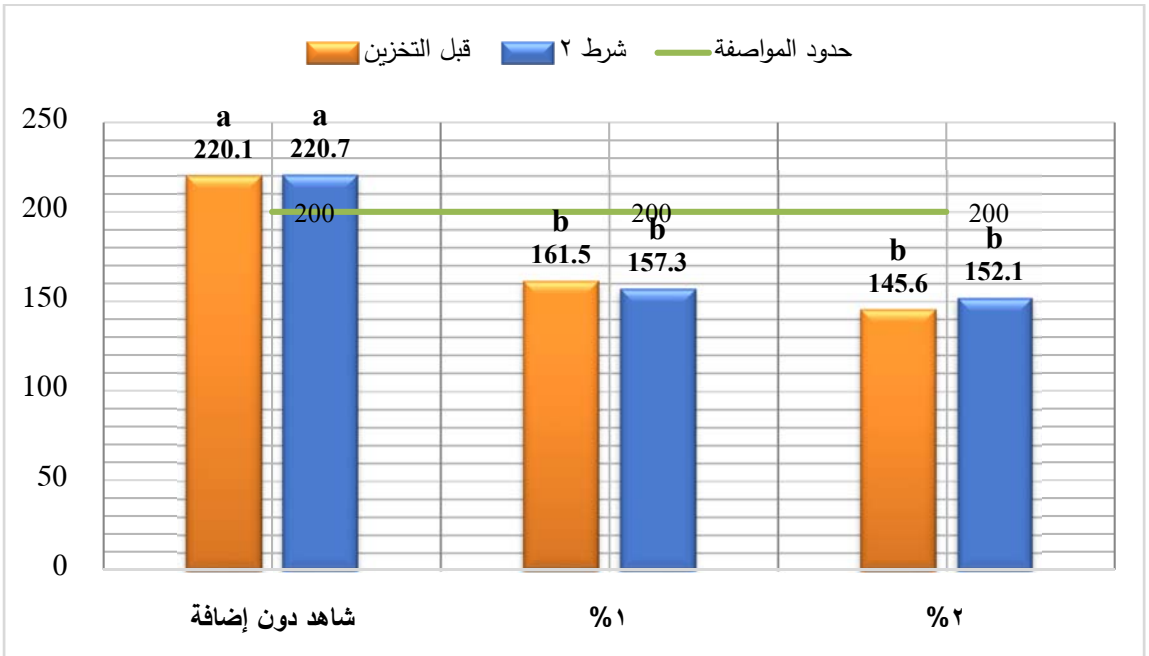
ولا يوجد فروق عند مقارنة تركيز الميثانول في عينة 2% قبل التخزين وعينة 2% بعد التخزين. فإنَّ عينة الشاهد تفوقت معنوياً على عينة 1% وعينة 2% في كلا الشرطين.

ومنه نستنتج أنه لا يوجد تأثير للتخزين في الشرطين (داخل البراد وخارجهُ) على محتوى الميثانول.



الشكل (6) مقارنة تركيز الميثانول مغ/100مل قبل التخزين وفي ظروف التخزين شرط 1. الأحرف الصغيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى الدلالة $\propto = 0.05$

$\sigma_{1\%} = 1.56,$ تقطير $\sigma_{2\%} = 3.4,$ $\sigma_{\text{شاهد}} = 17.4$



الشكل (7) مقارنة تركيز الميثانول مغ/100مل قبل التخزين وفي ظروف التخزين شرط2. الأحرف الصغيرة المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى الدلالة $\propto = 0.05$

$\sigma_{1\%} = 4.5,$ شرط2 $\sigma_{2\%} = 5.52,$ $\sigma_{\text{شاهد}} = 6.01$

$\sigma_{1\%} = 1.56,$ تقطير $\sigma_{2\%} = 3.4,$ $\sigma_{\text{شاهد}} = 17.4$

6. الاستنتاجات والتوصيات:

- **الاستنتاجات:**

-تراكيز الميثانول مغ/100مل كحول مطلق زادت في جميع العينات في مرحلة التخمير وتجاوزت الحد الأعلى المسموح به 200 مغ/100مل كحول مطلق وذلك وفق المواصفة القياسية السورية لعام 2003.

-تُعتبر طريقة التّعقيم للمهروس المعد للتّخمير وإضافة سلالات نقيّة من الخميرة عامل مهم جداً على محتوى الميثانول حيث أدّت الإضافة إلى انخفاض تركيز الميثانول بنسبه تتراوح بين (17.9-20.7)% مقارنةً بعيّنة تركت للتّخمير الطّبيعيّ.

-لم يُسجّل أيّ تأثير لنسبة إضافة الخميرة على تركيز الميثانول. كما لوحظ زيادة مردود الإيثانول بزيادة نسبة إضافة الخميرة.

-لا يوجد تأثير للتخزين داخل البراد أو خارجه على محتوى الميثانول بالنسبة للمنتج النهائي المقطر.

- **التوصيات:**

-إجراء تعقيم حراري لأوساط التخمير والتلقيح بخلايا الخميرة يعزّز من سلامة هذه المشروبات بالنسبة لصحة المستهلك.

-تطبيق نظام مراقبة الجودة وخصوصاً في المنتجات التي تتعرض للتخمير.

-متابعة الدراسة في ناتج التقطير باستخدام سلالات أخرى من الخميرة.

-دراسة تأثير عوامل أخرى على تركيز الميثانول في نفس الصناعة أو في صناعات مشابهة.

المراجع

ALCARDE, A.; SOUZA, P.; EDUARDO, A.; BELLUCO, S. *Chemical profile of sugarcane spirits produced by double distillation methodologies in rectifying still*. Ciência e Tecnologia de Alimentos. vol 31, 2011, 355-360.

ARSHAD, M.; KHAN Z.; REHMAN, K.; SHAH, F.; RAJOKA, M. *Optimization of process variables for minimization of byproduct formation during fermentation of blackstrap molasses to ethanol at industrial scale.* The Authors Journal compilation. vol 47, 2008, 410–414.

BINDLER, F.; VOGES, E.; LAUGEL, P. *The problem of methanol concentration admissible in distilled fruit spirits*. Food Additives and Contaminants. vol 5, No3, 2009, 343-351.

BLUMENTHAL, P.; STEGER, M.; EINFALT, D.; ZAPP, J.; BELLUCCI, A.; SOMMERFELD, K.; SCHWARZ, S.; LACHENMEIER, D. *Methanol mitigation during manufacturing of fruit spirits with special consideration of novel coffee cherry spirits*. Molecules, vol 26, 2021, 2-16.

BARTELS, W. *Reduction of methanol in fruit spirits with special reference to Williams-Christ,* plum and grape marc spirits. 1998, 30 Feb 2021, <https://www.landwirtschaft-bw.info/pb/,Lde/Startseite/Service/Reduzierung+von+Methanol+in+Obstbraenden>

BUREAU OF INDIAN STANDARDS. Indian standard alcoholic drinks methods of test. second revision. 2005

CABAROGLU, T. *Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing*. Food Control, vol 16, 2005, 177–181

CABAROGLU1, T.; YILMAZTEKIN, M. *Methanol and Major Volatile Compounds of Turkish Raki and Effect of Distillate Source*. Journal of the institute of brewing. vol 104, 2011, 98-105.

CAPUTI, A.; WRIGHT, D. Collaborative Study of the Determination of Ethanol in Wine by Chemical Oxidation. JOURNAL OF THE AOAC. Vol. 52, No. 1, 1969, 85-88.

DHAR, P.; DAS, C.; BANERJEE, S.; MAZUMDER, S. *Production of banana alcohol and utilization of banana residue*. IJRET. vol 2, 2013, 466-470.

GREIZERSTEIN, H. *Congener contents of alcoholic beverages.* Journal o.f Studies on Alcoho. vol 42, No 11, 1981, 1030-1037.

HANG, Y.; WOODAMS, E. *Influence of apple cultivar and juice pasteurization on hard cider and eau-de-vie methanol content. Bioresour*. Technol. vol 101, 2010, 1396-1398.

KANA, K.; KANELLAKI, M.; Papadimitriou, A.; Koutinas, A. *Cause of and methods to reduce methanol content of Tsicoudia, Tsipouro and Ouzo.* InternalionalJournal of Food Scienceand Technology, Greece. vol 26, 1991, 241-247.

LIANG, M.; LIANG, Y.; CHAI, J.; ZHOU, S.; JIANG, J. *Reduction of methanol in brewed wine by the use of atmospheric and room-temperature plasma method and the combination optimization of malt with different adjuncts.* J. Food Sci*. vol 79, 2014, M2308-M2314.*

MILJIC, U.; PUSKAS, V.; VUCUROVIC, V. *Investigation of technological approaches for reduction of methanol formation in plum wines*. J. Inst. Brew. vol 122, 2016, 635-643.

NIKIĆEVIĆ1, N.; TEŠEVIĆ, V. *Possibilities for methanol content reduction in plum brandyn*. Journal of Agricultural Sciences. vol 50, 2005, 49-62.

PRETORIOS, I. *Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking*. Yeast. vol 16, 2000, 675-729.

SATORA, P.; TUSZYNSKI, T. *Influence of indigenous yeasts on the fermentation and volatile profile of plum brandies.* Food Microbiol. vol 27, 2010, 418-424.

SICARD, D.; LUC LEGRAS, J. *Bread, beer and wine: Yeast domestication in the Saccharomyces sensu stricto complex.* C. R. Biologies. vol **334,** 2011, 229–236.

SPAHO, N. *Distillation techniques in the fruit spirits production. In Distillation-Innovative Applications and Modeling, Mendes*, M., Ed.; InTechOpen Limited: London, UK, 2017,129-152.

TAUCHER, J.; LAGG, A.; HANSEL, A.; VOGEL, W.; LINDINGER, W. *Methanol in*

human breath. Alcohol Clin Exp Res. vol 19, 1995, 1147-1150.

Turkish Food Codex, No: 2005/11. Distilled Alcoholic Beverages, Turkish Ministry of Agriculture, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Department of Mental Health and Substance Abuse. Global Status Report on Alcohol. 2004, 20 Feb. 2021. <https://www.who.int/substance_abuse/publications/global_status_report_2004_overview.pdf >

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health and Safety Guide Methanol. No 105, 1997, 20 feb 2021. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41944/9241511052_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

XIA, Y.; MA, Y.; HOU, L.; WANG, J. *Studies of boil treatment on methanol control and pilot factory test of jujube brandy*. International Journal of Food Engineering. vol 13, No 2, 2017.

Effect of addition *Saccharomyces cerevisiae* to the fermentation media on reducing methanol concentration for some industrial fermentations.

Dr. ramez mohammad[1]
Dr. sheiam sulaeman[2]
En. Yahia esmail[3]

□ ABSTRACT □

Methanol is one of the most important toxins that are formed in the fermentation medium as a harmful by-product of microorganism activity, and as a result of the enzymatic hydrolyze of pectin by the enzyme pectin methyl esterase PME. This research aims to determine the effect of addition S. cerevisiae to grape fermentation media to reduce methanol production. And after heat treatment of grape juice prepared for fermentation. The samples were tested by using colorimetric method as official methods depending on the measurement using spectrophotometer at (575 nm).In comperation with the standard Syrian specifications number /2478/ year (2003), Where 12 samples prepared by traditional local methods were tested. These results showed that addition of yeast at rates of 1-2% (w/v) led to a significant decrease in methanol concentration in the fermented mash by 20.7-17.9% compared to the blank sample, and no significant effect of yeast addition percentage on methanol concentration.

Keywords: pectin methyl esterase PME, spectrophotometer, methanol, alcoholic drink.

[1] **Professor, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tichreen University, Lattakia, Syria. (dr.gobranramz@gmail.com)**
[2] **Doctor, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
[3] **Masters Student, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**