

انتخاب عزلة خميرة ذات انتاجية عالية من الايثانول الحيوي

فوزية جاسم شلش*

فوزي رشيد علي*

حسين حسن خانقاه*

تاريخ قبول النشر 2010/ 3/ 1

الخلاصة

شخصت (75) عزلة من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* عزلت من مصادر محلية مختلفة شملت الفواكه والخضروات المتحللة والخميرة الجافة والمضغوطة والخل واحد معامل إنتاج الكحول، اعتمد التشخيص على الفحوصات الزرعية والمجهريّة والكيميائية. أظهرت نتائج اختبار حساسية عزلات الخميرة لتراكيز الكحول الأيثلي. إن العزلة Sy18 تتحمل أعلى تراكيز للكحول الأيثلي حيث كان التركيز الأدنى المثبط للنمو من الكحول الأيثلي (16%) والتركيز القاتل (17%). كما أظهرت نتائج اختبار العزلات في إنتاج الكحول الأيثلي ان العزلة Sy18 بلغت أعلى كمية كحول منتج بطريقة مزرعة الدفعة الواحدة مقارنة مع بقية العزلات. أن إنتاجية هذه العزلة من وسط عصير التمر بتركيز 24% كانت 9.36% (ح/ج). تم تحديد الظروف المثلى لإنتاج الايثانول اذ شملت درجة الحرارة، الرقم الهيدروجيني وتركيز المواد الصلبة الكلية لوسط التخمر وفترة الحضان وتأثير تراكيز مختلفة من فوسفات الامونيوم المضاف إلى وسط التخمر مما أدى إلى تحسين إنتاجية العزلة Sy18 لتصل إلى 10.32% (ح/ج) كحول ايثلي. استخدام تقنية تثبيت خلايا الخميرة *S. cerevisiae* على الاوساط الساندة في الإنتاج المستمر للكحول الأيثلي وتم الحصول على معدل إنتاجية عالية للكحول الأيثلي بلغت (5.83 غرام / لتر / ساعة) بالمقارنة مع طريقة مزرعة الدفعة الواحدة التي كان معدل انتاجيتها (1.95 غرام / لتر / ساعة) باستخدام الظروف المثلى لإنتاج الكحول الأيثلي.

الكلمات المفتاحية: *Saccharomyces cerevisiae*, Ethanol, productivity

المقدمة :

والثانية تقنية يتم تقيد الخلايا بتثبيتها على أوساط خاصة في أجهزة أسطوانية تعرف بالمفاعلات الحيوية (Bioreactors) حيث يتم ضخ الاوساط الغذائية بصورة مستمرة للحصول على المواد المنتجة دون انقطاع خلال مدة التشغيل. الغرض من هذه التقنية المحافظة على فعالية الخلايا وحيويتها لأطول فترة ممكنة والتقليل من نسبة تكون الكتلة الحيوية وبالتالي خروجها مع المادة المنتجة خارج المفاعل الحيوي، وبذلك يتم الاستفادة من الخلايا المثبتة على المواد الساندة لمدة قد تمتد لأسابيع في الإنتاج المستمر بدون تبديل وبذلك تتفوق هذه التقنية اقتصاديا في الاستخدام الصناعي عن تخمر الدفعة الواحدة (7). استخدمت مجموعة كبيرة من الخمائر في هذه التقنية لكونها تمتلك خاصية التثبيت على السطوح الساندة أهمها خميرة *S. cerevisiae* (5). هدفت هذه الدراسة الى ايجاد عزلات كفوءة في انتاج الكحول الايثلي من مصادر محلية باستخدام اوساط اقتصادية وتحديد الظروف المثلى لانتاج الكحول الايثلي، واستخدام تقنية الخلايا المثبتة في عمليات التخمر لغرض الحصول على انتاج مستمر للكحول الايثلي.

استخدمت الخميرة ونواتجها الأيضية منذ القدم ، فتخمر الفواكه ومستخلصات الحبوب يعد أول استخدام للخمائر في التخمرات الصناعية (1). وان التخمر الكحولي أكبر قطاعات التخمرات الصناعية بالنسبة لكمية الإنتاج الهائلة وذلك لاستخدام الايثانول الحيوي بالوقت الحالي في مجال الطاقات البديلة الهادفة لتخفيف كميات الغازات السامة المتصاعدة من المراكب السيارة، و المؤدية لطبقة الاوزون و كوكبنا بشكل عام (2). ان الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* الكائن المجهرى التقليدي المستخدم في التخمرات الصناعية لإنتاج الكحول الأيثلي وذلك لقدرتها الواسعة في النمو في مدى واسع من الأوساط الغذائية الطبيعية والتركيبية وكونها آمنة الاستخدام غير مرضية وامكانية التحكم بها واحداث تغيرات وراثية (3) باستخدام التقنيات الحياتية والهندسة الوراثية في إنتاج خميرة مهندسة وراثيا ذات خصائص و فعالية تخميرية عالية كما انها ذات إنتاجية عالية وبنصف الوقت اللازم وهذا مهم للإنتاج الصناعي (4,5).

يتم إنتاج الكحول الصناعي عادة بتقنيتين:

الأولى تخمر الوجبة الواحدة حيث يلقح فيها حجم كبير من البيئة المغذية ثم يسمح لحدوث النمو لغاية الحصول على أكبر كمية ممكنة من الناتج. يستخدم في هذه التقنية مخمرات (Fermenters) باحجام مناسبة للإنتاج الصناعي أو لغرض الدراسات المختبرية (1,6).

المواد وطرائق العمل :

1. عزلات الخميرة *S. cerevisiae* ومصادرهما: استعملت عدة مصادر مختلفة لعزل الخميرة مثل العنب والتين والتفاح والتمر وكذلك من

حيث نفذت تجارب درست كافة العوامل لتعين الظروف المثلى لإنتاج الكحول الأيثلي: استخدمت فيها الدرجات الحرارية: 20م° ، 25م° ، 30م° ، 35م° والرقم الهيدروجيني 4 ، 4.5 ، 5 ، 5.5 ، 6 وتراكيز مختلفة من المصدر النتروجين والفوسفات $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ وكذلك تأثير قيم البركس 8 ، 12 ، 17 ، 20 ، 42 على الناتج الكحولي كما درس تأثير فترات حضانة مختلفة 36 ، 42 ، 48 ساعة على الناتج الكحولي.

6. طريقة التخمر المستمر باستخدام الخلايا المثبتة:- تم تقييد خلايا الخميرة على الأوساط الساندة لغرض استخدامها في إنتاج الكحول الأيثلي بطريقة التخمر المستمر Continuous fermentation في المفاعل الحيوي المؤلف من عمود زجاجي مزدوج الغلاف بطول 50سم وقطر الأنبوب الداخلي 2.5سم بحجم شغال 450سم³ وبمعدل جريان (36 ملليتر/ساعة). ويرتبط العمود بمنظومة تبريد ومضخة لضخ وسط التخمر. (شكل 1)

استخدمت مادة الطابوق الناري (Fire bricks) كوسط ساند في المفاعل الحيوي. حضرت قطع من الطابوق المحلي وذلك بتكسير قطعة الطابوق إلى قطع صغيرة ثم تتحل بواسطة منخلين أحدهما فوق الآخر، العلوي قطر الثقوب فيه 5ملم والسفلي قطر الثقوب فيه 1ملم وتحجز القطع المطلوبة التي تتراوح أبعادها بين 5-1ملم في المنخل السفلي. ثم تغسل بشكل جيد ولمرات متعددة في الماء وذلك لتخليصها من الغبار العالق والمواد الذائبة تجفف جيداً داخل الفرن في درجة 100م° لحين ثبات الوزن

تم وزن 350غم من قطع الطابوق المجففة ووضعت في دورق مخروطي سدت فوهة الدورق الزجاجي المخروطي بالقطن ووضع مع محتوياته من قطع الطابوق داخل الفرن لغرض التعقيم في درجة حرارة 160م° لمدة 90 دقيقة. برد الوعاء مع محتوياته إلى درجة حرارة الغرفة ثم عبأت في العمود الزجاجي المعقم وبظروف معقمة داخل غرفة الزرع.

حضر عالق الخميرة ونقل إلى عمود التخمر بواسطة المضخة الطبية الدافعة من أسفل العمود إلى أعلى وتركزت الخلايا لمدة 24 ساعة للوصول إلى حالة الاستقرار Stabilization. يضخ عصير التمر المعقم بعدها بشكل مستمر من أسفل العمود ويستلم المحلول المتخمر من أعلى العمود. وكان زمن بقاء الوسط الزرعي في المخمر ما يقارب 12 ساعة.

الخل والعجين وأنواع من الخميرة الجافة والطرية المضغوطة. وقد اتبعت طريقة التخفيف التي استعملها في العزل والتشخيص من جميع المصادر⁽⁶⁾.

2. تحضير لقاح عزلات خميرة تم تنشيط عزلات الخميرة بتنميتها على وسط مستخلص الخميرة المائل (YEA) وتحضن لمدة يومين بدرجة حرارة 30م°، ويؤخذ مسحة من المستعمرات النامية لتلقيح 50مل من وسط مستخلص الخميرة السائل وتحضن لمدة يومين بدرجة حرارة 30م°

3. حساسية الخمائر للكحول الأيثلي: طريقة قياس تركيز الكحول الأيثلي الأدنى المثبط والقاتل للخميرة Minimum inhibitory and Lethal concentration (MIC) اتبعت الطريقة التي استعملها الزبيدي⁽⁸⁾

4. غربة العزلات لاختيار العزلة الأكثر إنتاج الكحول الأيثلي:-

حضر لقاح كل عزلة وذلك بتنميتها على وسط المائل (YEPD) بدرجة حرارة 30م° لمدة 24 ساعة. زرعت في دوارق زجاجية سعة 500 مل حاوية على 100مل من وسط غذائي من عصير التمر المعقم بتركيز 4بركس ومدعم بالأملاح كبريتات الأمونيوم $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ بتركيز 0.6% وزن/حجم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 بتركيز 0.31% وزن/حجم حضنت في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 30م° لمدة 24 ساعة وبعدها دورات 150 دورة في الدقيقة، بعد الحضانة أخذ 40 مل من اللقاح الناتج لتلقيح دوارق زجاجية سعة لتر واحد حاوية على 760مل عصير تمر معقم بتركيز 24بركس، مدعم بالأملاح نفسها السابقة، حضنت بدرجة حرارة 30م° لمدة يومين. بعدها تم تقدير النسبة المئوية للكحول الناتج كما تم إجراء التقدير الكيمياوي لسكر عصير التمر⁽⁸⁾ و التقدير الكمي للمحتوى الكحولي باتباع الطريقة الحجمية⁽⁹⁾. استخدم جهاز الغاز الكروماتوغرافي نوع (G.C9A) في تشخيص الكحول الناتج حيث كان العمود المستخدم SE30 3% و درجة حرارة العمود 40م° وحرارة المحقن 150م° .

5. تنفيذ تجربة التخمر بطريقة مزرعة الدفعة الواحدة : استعملت طريقة مزرعة الدفعة الواحدة لإنتاج الكحول الأيثلي وذلك بنقل لقاح الخميرة إلى دوارق زجاجية سعة 500 مل تحتوي 250 مل من وسط عصير التمر وتحضن في الحاضنة الهزازة لمدة 6 ساعات لغرض التهوية . ثم أوقفت عملية الرج لتبدأ عملية التخمر .

جدول (1) التركيز الأدنى المثبط والقاتل من الكحول الايثيلي لعزلات الخميرة

cell/mL 10 ⁶		cell/mL 10 ⁷		عدد العزلات
المثبط %	القاتل %	المثبط %	القاتل %	
6	8	7	9	27
7	9	8	10	41
8	10	10	11	2
8	12	11	13	1
10	13	12	14	3
14	16	17	16	1



شكل (1) منظومة التخمر المستمر باستخدام الخلايا المثبتة

تتألف منظومة التخمر المستمر من:

- 1- منظومة التبريد cooling unite
- 2- عمود التخمر fermentation column
- 3- مضخة دافعة peristaltic pump
- 4- وعاء وسط التخمر fermentation media flask
- 5- وعاء ناتج التخمر fermentation product flask

7. التحليل الاحصائي:

اتبعت طريقة التحليل الاحصائي باستخدام التصميم العشوائي التام (CRD) واستخدم لذلك البرنامج الاحصائي الجاهز (SAS 1992) واختبار معنوية الفروق للمعاملات استخدم اختبار دانكن .

النتائج والمناقشة :

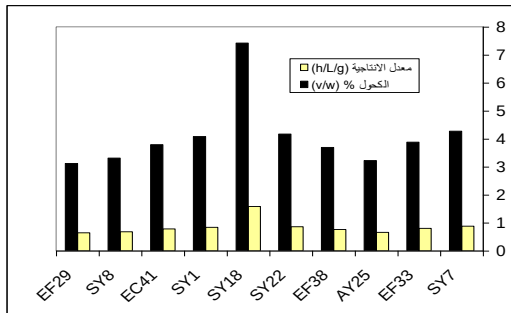
1. عزل وتشخيص خميرة *Saccharomyces cerevisiae* أمكن الحصول على (75) عزلة تعود لخميرة *S.cerevisiae* عزلت من الفواكه المتخمرة العنب والتين والتمر والتفاح وكذلك من الخميرة الجافة والمضغوطة والعصير والخل ومن أحد معامل إنتاج الكحول. وتم تشخيص الخمائر بكونها تعود إلى خميرة *Saccharomyces cerevisiae* اعتماداً على الصفات المظهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية^(11,12)

2. حساسية الخمائر للكحول الايثيلي:

يظهر جدول (1) قيم تركيز الكحول الايثيلي الأدنى المثبط للنمو والقاتل لعزلات الخمائر المستخدمة في هذه الدراسة في وسط مستخلص الخميرة السائل (YEL) 10⁶ خلية / مل و 10⁷ خلية / مل. وتتفق هذه النتائج مع ما جاء به الكثير من الباحثين بخصوص زيادة عدد الخلايا المستعملة في وسط التفاعل. كما تتفق مع ما اشار اليه الباحث⁽¹³⁾ بخصوص زيادة التركيز الأدنى للمواد المثبطة للنمو والقاتلة عند زيادة حجم اللقاح.

3. انتاج الكحول الايثيلي بطريقة الدفعة الواحدة:

اعتماداً على اختبارات حساسية العزلات اعلاة لتراكيز الكحول الايثيلي تم انتقاء (10) عزلات لانتاج الكحول الايثيلي حيث تفضل العزلات ذات التحمل العالي للكحول للايثيلي وتستبعد عزلات الخمائر الحساسة للتراكيز الواطئة (14).



شكل رقم (9) الغرلة الكمية للعزلات المنتخبة

4. تحديد الظروف المثلى لإنتاج الكحول الايثيلي:

تأثير درجة الحرارة: اظهرت النتائج جدول (2) ظهور فروق معنوية في الإنتاج الكحولي للعزلة Sy18 في الدرجة الحرارية 30م مقارنة مع الدرجات الحرارية الاخرى. ففي درجة حرارة 30م بلغ متوسط الناتج الكحولي 9.47% (ح/ج) وكمية السكر المتبقي 4.65% سكر تليها الدرجات الحرارية 20,35,25م بمتوسطات 9.03 % (ح/ج) و 8.71% (ح/ج) و 7.01 % (ح/ج) على التوالي. وهذا يتفق مع ما أشار اليه⁽¹⁵⁾ من أنّ معدل التخمر يزداد بارتفاع درجة الحرارة عند الخميرة *S.cerevisiae* لغاية 30م بعد هذا يبدأ معدل التخمر بالانخفاض. ويعزى ذلك إلى أنّ انخفاض درجة الحرارة يقلل التأثير السمي للكحول⁽¹⁶⁾ في حين وجد⁽¹⁷⁾ بإجراء التخمر تحت درجات حرارية مختلفة (20,25,30,35م) إنّ الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج الكحول الايثيلي هي 25م بمتوسط ناتج كحولي 14.63% (ح/ج) تليها الدرجات الحرارية 35,20,30م. إنّ للدرجات الحرارية علاقة كبيرة بالفعاليات الايضية للخميرة لما لها

تأثير تركيز المواد الصلبة الكلية:-

تبين من النتائج (جدول 7) ظهور فروق معنوية في الإنتاج الكحولي للعزلة Sy18 باستخدام تركيز برقس 17 مقارنة مع قيم البرقس الأخرى. فقد بلغ متوسط الناتج الكحولي 9.47% (ح/ح) في قيمة برقس 17. يليه القيم 12,24,20 التي لم يلاحظ ظهور فروق معنوية واضحة في الناتج الكحولي. إن زيادة تركيز المواد الصلبة الذائبة يزيد من الناتج الكحولي إلى حد معين ثم يتناقص بسبب ارتفاع تركيز السكر الذي يؤدي إلى زيادة الضغط الأزموزي لخلايا الخميرة مما يؤثر على فعاليتها الحيوية. (24,23). وقد ذكر أن التراكيز العالية للسكر في الوسط ينتج عنها حدوث صدمة Hyperosmotic shock جراء ارتفاع الضغط التناظري (25).

جدول (7) تأثير تراكيز مختلفة من المواد الصلبة الكلية (برقس) لعصير التمر على الناتج الكحولي

تركيز برقس	الكحول الناتج % (ح/ح)
8	^d 4.90
12	^c 7.92
17	^a 9.47
20	^b 8.71
24	^{bc} 8.19

الاحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروق معنوية في المعاملات على احتمال اقل من 0.01

تأثير المصدر النتروجيني والفوسفاتي:-

اظهرت النتائج زيادة في كمية الكحول المنتج باضافة فوسفات الامونيوم $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ تركيز 0.1% إلى وسط عصير التمر المستخدم في التخمير. فقد ارتفع متوسط الناتج الكحولي من 9.47% (ح/ح) عند التركيز صفر إلى 10.32% (ح/ح) عند التركيز 0.1% فوسفات الامونيوم المضاف إلى الوسط. حيث يلاحظ من (جدول 5) ظهور فروق معنوية في قيم الناتج الكحولي عند التركيز 0.1% فوسفات الامونيوم. وعدم ظهور فروق معنوية عند زيادة تركيز فوسفات الامونيوم 0.14%. الخميرة تحتاج إلى النيتروجين في عملية النمو والتكاثر كما أن لأيون الامونيوم الموجب تأثير تحفيزي لإنتاج الكحول (27). كما أن للفسفور دوراً مهماً مهم في عملية التخمير الكحولي في فسفرة الكلوكوز عند دخوله في عملية التحلل السكري التي تبدأ بها عملية التخمير الكحولي. كما يدخل في تركيب مركبات الطاقة (ATP) والاحماض النووية ذات الأهمية في خلايا الخميرة (27).

من دور فاعل في الانظمة الانزيمية المشتركة في عمليات التخمير الكحولي (18). إن درجة الحرارة المثلى لإنتاج الكحول الأثيلي تكون بين 35,25 م° وإن ارتفاع درجة حرارة التخمير فوق 35 يؤدي إلى تفكك الانزيمات وقلة حيوية الخلايا (19).

جدول (5) تأثير قيم مختلفة من الدرجات الحرارية على الناتج الكحولي واستهلاك السكر للعزلة Sy18

درجة الحرارة	السكر المتبقي %	الكحول المنتج % (ح/ح)
20	^a 6.97	^a 7.01
25	^c 4.87	^b 9.03
30	^c 4.65	^a 9.47
35	^b 5.81	^b 8.71

الاحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروقات معنوية بين المعاملات على احتمال اقل من 0.01.

تأثير الرقم الهيدروجيني:-

أظهرت نتائج قيم الناتج الكحولي باستخدام أرقام هيدروجينية مختلفة أن قيمة الرقم الهيدروجيني 4.5 أعطت أفضل ناتج كحولي بظهور فروق معنوية مع القيم الأخرى (جدول 3). فقد أشار (20) إلى أن الوسط الحامضي هو الأفضل في إنتاج الكحول الأثيلي من خميرة *S.cerevisiae* لأن الانزيمات المشتركة في عملية التخمير الكحولي تكون أكثر نشاطاً في الوسط الحامضي. وبين (21) أن ارتفاع الرقم الهيدروجيني خارج الخلايا عن 9.0 يؤدي إلى تغير في طبيعة الغشاء الخلوي وبالتالي نفاذيته للبروتون (H^+) حيث تصبح ضعيفة وبالتالي يتأثر الرقم الهيدروجيني الداخلي للخلايا (Intercellular PH) الذي يتراوح بين 6.2-6.3 مما يؤدي إلى عدم تخليق ATP وانخفاض معدلات النمو. ينخفض الإنتاج الكحولي عند الوسط المتعادل لزيادة النواتج العرضية مثل الكليسيول (22)، وأن بالامكان إنتاج الكحول الأثيلي بصورة جيدة في رقم هيدروجيني ابتدائي يتراوح بين 4.0-6.0. وإن خفض الرقم الهيدروجيني ما بين (4.0-3.0) يؤدي إلى إنتاج الكليسيول بدلاً من الكحول (19).

جدول (6) تأثير قيم مختلفة من الاس الهيدروجيني على الناتج الكحولي واستهلاك السكر.

قيم الاس الهيدروجيني	السكر المتبقي	الكحول المنتج %
4	^c 5.81	^b 8.49
4.5	^d 4.41	^a 9.47
5	^c 6.04	^b 8.26
5.5	^b 8.13	^c 7.13
6	^a 8.83	^c 6.90

الاحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروق معنوية في المعاملات على احتمال اقل من 0.01

جدول (8) تأثير قيم تراكيز مختلفة من فوسفات الامونيوم على الناتج الكحولي وإستهلاك السكر.

تركيز فوسفات الامونيوم%	السكر المتبقي %	الكحول المنتج % (ح/ح)
0	^a 4.87	^b 9.47
0.1	^c 3.72	^a 10.32
0.14	^b 4.41	^a 10.22

الاحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروق معنوية في المعاملات على احتمال اقل من 0.01.

تأثير فترات حضان مختلفة

باجراء التخمر في فترات حضان مختلفة وبوجود فوسفات الامونيوم بتركيز 0.1% وجد أن أفضل فترة حضان 42 ساعة بمتوسط ناتج كحولي 10.32% (ح/ح) والسكر المتبقي 4.18% . حيث يلاحظ من (جدول6) ظهور فروق معنوية في قيم الكحول المنتج عند فترة 42 ساعة مقارنة مع الفترات 36. 48 ساعة.

كما يلاحظ عند امتداد فترة التخمر إلى 48 ساعة إنخفاضاً في كمية الكحول المنتج حيث انخفض متوسط الناتج الكحولي إلى 8.98% (ح/ح) في حين لم تظهر فروق معنوية في معدل استهلاك السكر في تلك الفترة وفترة 42 ساعة. وقد يعود ذلك إلى استهلاك الخميرة للكحول المنتج كمصدر كاربوني، فقد اشار (14) إلى مسارات انزيمية متعددة تستهلك فيها الخميرة *S.cerevisiae* الكحول المنتج قبل خروجه من خلية الخميرة وتحوله ثانية إلى استبدالديهايد acetaldehyde الذي يتحول بخطوات انزيمية إلى مركب acetyl- COA الذي يدخل في العمليات الأيضية لخلية الخميرة.

جدول (9) تأثير فترات حضان مختلفة على الناتج الكحولي واستهلاك السكر.

فترات الحضان/ساعة	السكر المتبقي %	الكحول المنتج % (ح/ح)
36	^a 8.24	^c 7.36
42	^b 4.18	^a 10.32
48	^b 4.41	^b 8.98

إنتاج الكحول الأيثلي بطريقة الخلايا المثبتة

بينت نتائج تثبيت الخلايا على قطع الطابوق الناري باستخدام وسط عصير التمر بتركيز سكر (15.81%) أن أعلى كمية للكحول الأيثلي كانت في اليوم العاشر حيث بلغت (8.82%) وكمية السكر المتبقي (4.18%) والرقم الهيدروجيني 5.16. شكل (2).

أشارت بعض الدراسات إلى إمكانية استخدام مادة الطابوق الناري (fire bricks) كمادة سائدة للخلايا بعد تقطيعها إلى أحجام مناسبة (29) حيث كانت

الأحجام المستخدمة 0.4 – 1.4 ملم . وفي هذا المجال أشار (30) , إلى أن الفترة المناسبة للحصول على ناتج من الكحول الأيثلي لا تقل عن عشرة أيام على بدء التخمر عند استخدام رقائق الخشب لتثبيت خلايا الخميرة *S.cerevisia* STV89 . وقد يعود سبب ذلك إلى ضرورة وصول الخلايا إلى حالة الاستقرار على الوسط السائد. واستمرت عملية التخمر في هذه الدراسة 23 يوم .

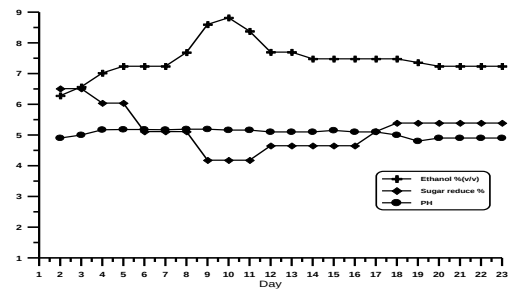
يلاحظ من النتائج حدوث زيادة في قيم الرقم الهيدروجيني لوسط التخمر من 4.5 إلى 5.19 وفي هذا الصدد أشار (31), إلى عدم حدوث انخفاض في قيم الرقم الهيدروجيني pH للوسط الزرعي المستخدم في عملية تثبيت خلايا الخميرة على مادة الطابوق الناري وأوعز ذلك إلى حدوث تجاذب الشحنات المختلفة. حيث أن خلايا الخميرة تحتوي شحنات سالبة على جدارها بسبب وجود المجاميع الكربوكسيلية والفوسفاتية وعلى جانب آخر فإن الشحنة على قطع الطابوق موجبة بالوسط الحامضي حيث أن مادة الطابوق عبارة عن مادة سليكونية ترتبط بها مجاميع هيدروكسيلية فعند وجودها في وسط زرعي ذو قيمة رقم هيدروجيني 4.5 فإن الزيادة في أيون الهيدروجين H^+ تعادل مجاميع الهيدروكسيل OH^- والتي تجعل سطح الطابوق موجب الشحنة وهذا يؤدي إلى زيادة في قيمة pH للوسط الزرعي من 4.5 إلى 5.2 .

ولوحظ انخفاض قدرة خلايا الخميرة في تحويل السكر إلى كحول أيثلي خلال الأيام الستة الأخيرة من عملية التخمر وقد يعود السبب إلى التعرض المستمر لظروف غير ملائمة للنمو مثل تعرضها للكحول الأيثلي المنتج والمنتجات الأيضية الأخرى داخل المفاعل الحيوي فقد أشار (33) أن بعض الخمائر قد تتأثر بالتراكيز القليلة من الكحول الأيثلي عند تعرضها لفترات طويلة مما يؤدي إلى انخفاض حيويتها. وتجدر الإشارة إلى أن كبر حجم المفاعل الحيوي المستخدم في هذه الدراسة أعطى ملائمة لاستخدام تراكيز عالية من السكر والحد من تأثير لزوجة عصير التمر المستخدم والتقليل من المشاكل الفنية في المفاعل الحيوي الناجمة من جريان الوسط التخمر وتولد غاز ثاني أوكسيد الكربون داخل المفاعل وبالتالي أمكن الحصول على إنتاجية متفوقة . فقد أشار (34) أن تركيز السكر الملائم للاستخدام داخل مفاعل بحجم 100 مل هو (5.6%) باستخدام خلايا الخميرة *S.cerevisiae* المثبتة على مادة الطابوق الناري حيث كانت أعلى إنتاجية للكحول الأيثلي (1.43% و/ح) في اليوم الحادي عشر لعملية التخمر التي استغرقت 22 يوم وفي هذه الدراسة كانت مدة بقاء الوسط الزرعي في المخمر 12 ساعة ومعدل الإنتاجية للاثانول 5.83 غرام /لتر/ ساعة وبذلك تتفوق هذه الطريقة في معدل إنتاجية الكحول الأيثلي على طريقة مزرعة الدفعة

المصادر :

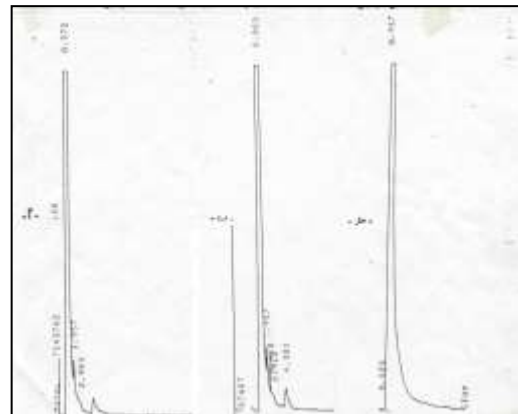
1. الساجدي، عادل جورج ومحمدعلي، علاء يحيى محمد. 1992. التخمرات الصناعية الجزء الأول. (تأليف) مطابع جامعة البصرة-العراق.
- 2 -Kevin R . 2009 Strategy for adapting wine yeasts for bioethanol production. Int J Mol Sci Jan ; 10 (1): 387-419 .
3. العكيدي، حسن خالد 1987. التقنية الحيوية المايكروبية للتمور ببغداد-العراق.
- 4-Pieter J. Verbelen . 2006 . Immobilized yeast cells systems for continuous fermentation application .Biotechnol Lett,28:1515-1525.
5. Nowak J.2000. Ethanol yield and productivity of *Zymomonas mobilis* in various Fermentation methods. Food science and Technology. 3(2): 1-9.
- 6- Verstepen KJ ,Pretorius IS 2006 The development of superior yeast strains for food and beverage industry:challenges,opportunities and potential benefits.The yeast hand book,vollum 8; yeast in food and beverage.Spring er-Verlag ,Heidelberg.Germany ,pp 399-444.
- 7_Bezbradica D, Obradovic B, Leskosek -Cukalovic I 2007. Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation, Proc. Biochem. 42: 1338-1351.6
- 8- Al- Zaidy H. M. 1975. Study of the antimicrobial activity of some alcohols. Ph. D. Thesis. Heriot-watt Univ. Edinb.
9. لبيهادلي، نزار محسن علي. 1987 "دراسة مقارنة كفاءة عزلات الخميرة *S. cerevisiae* في إنتاج الكحول الأيثلي. رسالة ماجستير. قسم علوم الحياة. كلية العلوم-جامعة بغداد.
- 10-AOAC 1982. Association of official analytical chemists official methods of analysis 12th ed. Washington DC, U.S.A.
- 11-Alexopoulos C.J. Mims C.W.and Blackwell,E 1996: Introductory Mycology. Fourth edition John wiley and Sons. New York.

الواحدة حيث كان معدل الإنتاجية 1.95 غرام /لتر/ ساعة. (كما في شكل 3)



شكل (2) التخمر المستمر لإنتاج الكحول الأيثلي (قيم الكحول المنتج والسكر)

تشخيص نوع الكحول المنتج (Ethanol) : فحصت عينات من الكحول الناتج من التخمر بطريقتي مزارع الدفعة الواحدة والخلايا المثبتة باستخدام جهاز الغاز كروماتوغرافي (G.C) وقورنت مع عينة الكحول القياسي وكان زمن ظهور القمة متقاربا (شكل 4) ونلاحظ زيادة بعض المواد الايضية المنتجة بواسطة الخلايا المثبتة مقارنة مع مزارع الدفعة الواحدة حيث أشار (34) إلى حصول زيادة في بعض المواد الايضية بواسطة الخلايا المثبتة وتجدر الإشارة أن من مساوئ طرائق الخلايا المثبتة أن الحالة الفسيولوجية للكائنات الحية لا يمكن السيطرة عليها بسبب امتزاز الخلايا على أوساط قد تكون غير ملائمة تماما لديمومتها من ظروف الإنتاج المستمر وقد يكون للظروف البيئية هذه تأثير على التوازن الطبيعي المعروف لإنتاج المواد الايضية.



الشكل رقم (4) التحليل الغاز كروماتوغرافي (G.C) للكشف عن 1-الكحول الأيثلي المنتج بمزرعة الدفعة الواحدة ب-الكحول المنتج بالتخمر المستمر للخلايا المثبتة ج-الكحول القياسي

19. الخفاجي، زهرة محمود. 1990 التقنية الحيوية (تأليف) مطابع جامعة بغداد-العراق.
- 20 . Parsons R.V. McDuffe N. G. and Din G.A. 1984; "pH inhibition of yeast Ethanol Fermentation in continuous culture ". Biotechnol lett. 6:667-680
- 21-[Yu J](#), [Zhang X](#), [Tan T](#) .2007An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. [J Biotechnol](#). 2007 May 1;129(3):415-20. Epub 2007 Feb 25.
22. Baptista CMSG, Coias JMA, Oliveira ACM 2006. Naturalimmobilization of microorganisms for continuous ethanol production, Enzyme Microb. Technol. 40: 127-131.
23. Blomberg, A2000. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions:questions, some answers and a model. FEMS Microbiol. Lett. 182, 1- 8.
24. Richter E., Ehwald R. and conitz C. (1989). Immobilized of yeast cells in plant cell wall framework , Appl. Microbiol. Biotechnol . 32:309-312.
- 25.Walker , M.G 1999 Yeast Physiology and Biotechnology, John Wiley & Sons. Canada .
26. Plessas S, Bekatorou A, Koutinas AA, Soupioni M, 2007. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized onorange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation, Biores. Technol. 98: 860-865.
- 27-M arica R, Ljilijana M 2006 Bioethanol production by immobilized *Sacharomycescerevisiae* var. *ellipsoideus* cells African Journal of Biotechnology V. 8 (3), 464-471, 4 February, 2009
- 12-Barnett J.A, payne, R.W. and yarrow, D1985 yeast: charactristitc and Identification Combridge University press, p:467.12.
- 13-Bulger R., and washing J.A. 1980 effect of inoculum size and B. lactamase production on inuitro activity of new Cephalosorians against Haemphilus species. Antmicrob . Agents and chemothorpyl 7:393-396 .
- 14-[Siqueira PF](#), [Karp SG](#), [Carvalho JC](#), [Sturm W](#), [Rodríguez-León JA](#), [Tholozan JL](#), [Singhania RR](#), [Pandey A](#), [Soccol CR](#) [Bioresour Technol](#) .2008 Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratorya,pilot and industrial scales [Bioresour Technol](#). Nov;99(17):8156-63. Epub 2008 May 15
- 15-Abdel- Fattah .W.R, Fadil .M .Nigam.p ,Banat. M.I.2000. Isolation of thermotolerant Ethanologenic yeasts and use of selcted strins in industrial scale fermentrtion in an Egyption Distillery. Biotechol Bioeng 68: 531535.
- 16-Kourkoutas Y Bekatrou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas AA 2004 Immobilization technologies and support materials suitable in alcohobeverages production: a review, Food Microbiol. 21: 277-397.16.
17. Musleh, R.M. 2000. Increasing of ethanol production of local and imported strains of *Saccharomyces cerevisiae* by optimization of Fermentation conditions. Iraqi J.Microb 12: (2) 43-57.
18. Birch R.M, Walker G.M. 2000. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol strees responses of *Saccharomyces cerevisiae*. Enz Microb Technol 26: 678-687.

- 31- Najafpour G, Younesi H, Syahidah K, Ismail K 2004. Ethanolfermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*, Bioresour. Technol. 92: 251-260.
- 32- Sakurai A, Nishida Y, Saito H, Sakakibara M 2000. Ethanol production by repeated batch culture using yeast cells immobilized within porouscellulose carriers, J. Biosci. Bioeng. 90: 526-529.
33. Majeed. G.H.1992 study of ethanol by bakers using batch culture and immobilized cells.Ms.C.thesis College of Science university of Baghdad.
34. Sitton O.C. and Gaddy .L 1980. Ethanol production in Immobilized cell reactor. Biotech. Bioeng22:1735-1748.
28. Flikweert T.M. kuyper M. 1999. Steady-state and transient-state. Analysis of growth and metabolite production in *Saccharomyces cerevisiae* strain with Reduced pyruvate-decarboxylase Activity. Biotechnol Bioeng. 66: 42-50
- 29-Junter G .A Coquet I,Viliain S,Jouenne T2002 Immobilized- cell Physiology:current data and the potentialities of promoters .Enzyme Microb Technol 31:201-212
30. Kourkoutas Y, Bekatrou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas AA 2004 . Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review, Food Microbiol. 21: 277-397

Selection of highly ethanol productive yeast

F.J.SHALASH*

F.R.ALI*

H.H.KANAKAN*

* Ministry of Science &Technology,Genetic Engineering Center P,O,Box 765 Baghdad,Iraq.

Abstract:

Seventy five isolates of *Saccharomyces cerevisiae* were identified, they were isolated from different local sources which included decayed fruits and vegetables, vinegar, fermented pasta, baker yeast and an alcohol factory. Identification of isolates was carried out by cultural microscopical and biochemical tests. Ethanol sensitivity of the isolates showed that the minimal inhibitory concentration of the isolate (Sy18) was 16% and Lethal concentration was 17%. The isolate (Sy18) was most efficient as ethanol producer 9.36% (v/w). The ideal conditions to produce ethanol from Date syrup by yeast isolate, were evaluated, various temperatures, pH, Brix, incubation period and different levels of (NH₄)₂HP04. Maximum ethanol produced was 10.32% (v/v). Experimental production of ethanol using continuous methodology with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* showed that this method is superior by producing 5.83 g/L/h in comparison with 1.95 g/l/h produced by batch culture method