

تأثير

ايونات الكالسيوم في الاستجابة للإجهاد الكحولي في الخميرة

Saccharomyces cerevisiae

*فوزية جاسم شلش ، *فوزي رشيد العاني ،**إيمان هندي كاطع ،**نبال خليل موسى،

**سناء خواش مايد

*وزارة العلوم والتكنولوجيا – دائرة البحوث الزراعية.

**وزارة العلوم والتكنولوجيا دائرة تكنولوجيا وبحوث البيئة والمياه.

الخلاصة :

الايثانول الحيوي التخميري يدخل في الصناعات الكيميائية المهمة إضافة الى استخدامه كوقود حيوي بديل عن الوقود الاحفوري والخميرة *Saccharomyces cerevisiae* الكائن المجهرية التقليدي المستخدم في إنتاج الايثانول. ان حساسية الخميرة للكحول المنتج تؤدي الى قلة إنتاجيتها له ، هذا البحث يحدد تأثير مستويات مختلفة من ايونات الكالسيوم في استجابة الخميرة *S.cerevisiae* المعزولة من مصادر محلية للإجهاد الكحولي ، بعد تحديد التركيز الأدنى المثبط والقاتل من الايثانول بتعريضها الى تراكيز مختلفه من الايثانول 2,4,6,8,10,12 % . انتخبت العزلات المقاومة لاعلى تركيز 8% ايثانول ، وبقياس النمو للعزلات من خلال قراءات الكثافة الضوئية بطول موجي 600 نانومتر ولفترات حضن 24 ، 48 ، 72 ساعة وبوجود ايثانول 8% ، انتخبت العزلات التي اظهرت افضل نمو في فترات الحضن المختلفة و استخدمت في اختبار تأثير الكالسيوم حيث استخدمت تراكيز من ايونات الكالسيوم بهيئة كلوريد الكالسيوم فوجد ان مدى التركيز (1- 1.2 ملي مول) له تاثيرات ايجابية في نمو الخميرة ومقاومتها للإجهاد الكحولي .وتتفاوت العزلات فيما بينها في تحديد التركيز الامثل لاحداث التاثيرات الايجابية ليتراوح بين (0,8- 1,6ملي مول).

المقدمة :

ان الطلب المتزايد للايثانول لاستخدامه في مختلف الأغراض الصناعية كمصدر بديل للطاقة و صناعة المذيبات والمنظفات والمواد الحافظة ، استوجب زيادة انتاجه وتطوير عزلاته تجارية ذات إنتاجية عالية^(1,2) . ان الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* من أهم الكائنات المجهرية المستخدمة في الصناعات الحيوية وان تحملها للايثانول من الخصائص الأساسية لاستخدامها في التخميرات الحيوية⁽³⁾ في صناعة أنتاج الايثانول فمن العوامل التي تؤخذ بنظر الاعتبار هي تحمل العزلات لتراكيز لسكر الكلوكوز والايثانول والفعالية الإنزيمية لتحويلها الى المركبات المطلوبة . ويستمر البحث عن سلالات جديدة ذات خصائص متميزة وقابلية لاستخدامها في تقنيات التخمير المشترك والمستمر لتحسين الإنتاجية على صعيد الإنتاج التجاري^(4,5) .

يسود الاعتقاد إن تحمل الخمائر للكحول يعتمد بدرجة كبيرة على المكونات التركيبية للأوساط المستخدمة في التخميرات الصناعية ، حيث إن بعض المكونات تؤدي إلى تحسين التحمل الكحولي واستمرار عملية التخمير مثل الأحماض الدهنية غير المشبعة والستيرول والبروتينات والأحماض الأمينية والفيتامينات والايونات المعدنية كما ان الأوساط المعقدة مثل عصير الخرشوف والمدعمات المعقدة كطحين الصويا والبيتون وجد أنها تحسن التخمير الكحولي بزيادة التحمل الكحولي ولغرض التحمل الأمثل والتخمير الأمثل تتطلب الخميرة تراكيز متدنية من الايونات اللاعضوية المختلفة وهذه العناصر Trace elements يمكن تصنيفها الى ثلاث اصناف :

Macroelements-1 ($K^{+1}, Mg^{+2}, Ca^{+2}, Zn^{+2}, Fe^{+2}, Cl^{-}$)

Microelements-2 ($Co^{+2}, B^{+2}, Cd^{+2}, Cr^{+3}, Cu^{+2}, I^{+}, Mo^{+2}, Va^{+2}$)

3- المثبطات Inhibitors ($Ag^{+}, As^{+2}, Hg^{+2}, Li^{+}, Ni^{+2}, Pd^{+2}, Se^{+4}, Te^{+4}$)

وهذه العناصر تلعب دور مهم في تحديد الفعالية الانزيمية في الخمائر من خلال مشاركتها في التركيبية الانزيمية في المواقع الفعالة ودورها في الثباتية الانزيمية والمحافظة على القطبية السلبية للدهون الفوسفاتية في اغشية جدار الخلية⁽⁶⁾ .

تتعرض الخمائر الى الاجهاد المختلف مثل الاجهاد الكحولي واجهاد الدرجات الحرارة العالية والضغط الازموزي الناجم من المنتجات والمواد السكرية في الاوساط التخمرية^(7,8) . وتواجه دراسة الآلية الفيزيائية لسمية الأيثانول (ethanol toxicity) في خلايا الخميرة الكثير من الصعوبات بسبب تأثيراته المعقدة والمتعددة . حيث يؤدي إلى تثبيط معدل النمو والتخمير فضلاً عن تأثيره على حيوية الخلية . إن تأثيرات الأيثانول تتمثل بكونه يقلل من حجم الخلية ويحفز الهلاك الحراري (Thermal Death) ويؤدي إلى تحلل البروتينات (Denaturation of intracellular proteins) وتحلل الدهون الفوسفاتية Phospholipids وانزيمات تحلل السكر Glycolysis enzyme ويزيد من تكون الجذور الحرة Free radicals⁽⁹⁾ , أن ميكانيكية قتل الايثانول لخلايا الخميرة غير واضحة وقد يكون التفسير المناسب هو أن الايثانول يسبب تمسخ البروتينات داخل الخلية خلال مروره عبر الغشاء البلازمي^(10,11) . وهذه الميكانيكيات تكشف سبب التباين في قدرة الخلايا على البقاء حية بوجود الايثانول إلى تفاوت خصائص نفاذية الغشاء البلازمي . ان تأثير الايثانول يظهر في زيادة نضوحية الغشاء البلازمي في خميرة *S. cerevisiae* حيث يؤدي إلى فقدان العوامل المساعدة والمساعدات الانزيمية كما يحفز (النضوحية الايونية Ionic permeability) وأنخفاض فعالية الانزيمات التي تحتاج لتلك المساعدات الانزيمية مثل , glucose -6- phosphate dehydrogenase , phosphoglycerate kinase, Gluokinase,⁽⁹⁾ .

أن الكحول الأيثلي والحرارة كلاهما يؤثران على الدهون في الغشاء البلازمي ويلعبان دوراً رئيسياً في الاجهاد الفيزيائي physiological stress لخلايا الخميرة *S. cerevisiae* . كما أن التراكيز العالية للأيثانول تحفز الصدمة الحرارية Heat Shock⁽¹²⁾ . وجد ان وجود الكالسيوم بتركيز 2.5-10 ملي مول يزيد من الثباتية الحرارية في *Bacillus stearothermophilus*

.حيث تزداد درجة حرارة النمو القصوى وتظهر زيادة في ثباتية الاغشية عند اضافة الايونات الى عالق الخلية في حرارة 60 م⁽⁶⁾ . ان الايثانول والحرارة يؤديان الى زيادة نضوحية الايونات والمكونات الايضية وتنشيط انتقال المغذيات ، لذلك فان زيادة الثباتية الحرارية بوجود التركيز الامثل من ايونات الكالسيوم يزيد من تحمل الخلايا للايثانول في عملية التخمير⁽¹³⁾ . وفي دراسة أثر الكحول الأيثلي في النمو والتخمير لبكتريا المنتجة للأيثانول Ethanologenic *Escherichia coli* ، أكد على ميكانيكيتين رئيسيتين في سمية الكحول . الأولى التنشيط المباشر في توليد الطاقة بعملية التخمير وتحلل السكر والثانية تحطيم الغشاء البلازمي بزيادة فقدان الجزيئات الصغيرة مثل المغنسيوم⁽¹⁴⁾ .

ان تحمل الخميرة للايثانول ليس حادث منعزل عن وانما حالة متداخلة ضمن مجموعة من الجينات في شبكة معقدة على مستوى جيني⁽¹⁵⁾ حيث ان العديد من الجينات التي تحفز بواسطة الايثانول تكون مشتركة مع جينات اخرى محفزة بعوامل بيئية مثل الضغط الازموزي والصدمة الحرارية وسمية المواد الكيميائية والاجهاد التاكسدي⁽¹⁶⁾ . هناك جينات تظهر فعالية تحت ظروف الاجهاد وتنتج اوامر ومسارات انزيمية معينة مثل ROM2,BEM2,ADA2.

(17)

تهدف هذه الدراسة في معرفة تأثير ايونات الكالسيوم في تحمل الخميرة للاجهاد الكحولي ومقارنتها مع الفرضيات المعروفة في دور الكالسيوم في التأثير على ايض ونمو الاحياء المجهرية .

المواد وطرق العمل :

- 1- عزلات الخمائر ومصادرها: استعملت عدة مصادر مختلفة لعزل الخميرة شملت الفواكة والخضروات المتحللة و من الخل والعجين وانواع من الخميرة الجافة والطرية المضغوطة. وقد اتبعت طريقة التخفيف في العزل والتشخيص من جميع المصادر.⁽¹⁸⁾
- 2- إعداد المنحنى القياسي لحساب عدد الخلايا :- تعمل تخفيف للقاح الخميرة وتؤخذ قراءات الكثافة الضوئية عند طول موجي 600nm كما تم حساب عدد الخلايا لكل تخفيف بطريقة العد بالأطباق ورسمت العلاقة بين الكثافة الضوئية الممتصة وعدد الخلايا بشكل منحنى قياسي.
- 3- تحضير لقاح عزلات خميرة :- تم تنشيط عزلات الخميرة بتنميتها على وسط مستخلص الخميرة المائل Yeast extract agar (YEA) حضر هذا الوسط بإضافة 20غم/لتر من الاكار الى وسط مستخلص الخميرة السائل. استعمل هذا الوسط لتنمية الخميرة على سطح صلب والحصول على مستعمرات منفردة. وتحضن لمدة يومين بدرجة حرارة 30م°، ويؤخذ مسحة من المستعمرات النامية لتلقيح 50مل من وسط مستخلص الخميرة السائل (حضر هذا الوسط من إذابة 5غم مستخلص الخميرة و 30غم D.glucose في لتر ماء مقطر وضبط الاس الهيدروجيني 4.5 واستعمل هذا الوسط لتنمية الخميرة. وتحضن لمدة يومين بدرجة حرارة 30م° .

حساسية الخمائر للكحول الأيثلي:

طريقة قياس تركيز الكحول الايثلي الادنى المثبط والقاتل للخميرة Minimum inhibitory and Lethal concentration (MIC) باستخدام وسط مستخلص الخميرة السائل ذو التركيز المضاعف . (DYEL) Double concentration yeast extract liquid حضر من

إذابة ضعف مكونات وسط مستخلص الخميرة السائل في الحجم نفسه من الماء المقطر وزرع في أنابيب بحجم 5 مل من كل أنبوب واستعمل كوسط أساس عند قياس التركيز الأدنى للكحول الأثيلي المثبط لنمو الخميرة. وذلك بأخذ أنابيب اختبار معقمة وضع فيها 5 مل مستخلص الخميرة السائل (DYEL) ذو التركيز المضاعف. أضيف إليها تراكيز متدرجة من الكحول الأثيلي واكمل الحجم إلى 9.9 مل بإضافة الماء المقطر المعقم. ثم لقت الأنابيب بـ 0.1 مل من تخافيف مناسبة من لقاح الخمائر للحصول على $10^6, 10^7$ ce11/ml. ثم حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 30م لمدة خمسة أيام وقرأت النتائج يوميا. حيث عد اقل تركيز من الكحول الأثيلي ذلك الذي لا يعطي نموا ضمن سلسلة التراكيز المتدرجة من الكحول الأثيلي هو التركيز الأدنى المثبط للنمو. (19).

ولغرض التعرف فيما إذا كان التركيز المستعمل من الكحول الأثيلي قاتلا او مثبطا فقد تم نقل 0.1 مل من الوسط الملقح بخلايا الخميرة والذي لم يظهر نموا بعد اربعة ايام إلى 10 مل من وسط الخميرة السائل الخالي من الكحول الأثيلي وحضن الوسط بدرجة حرارة 30م وتمت مراقبة النمو يوميا لمدة خمسة ايام.

2 - تحضير أنابيب سيطرة للتركيز الأدنى المثبط للنمو: (MIC control tubes)

أضيف أعلى تركيز من تراكيز الكحول الأثيلي المستعملة إلى أنابيب اختبار معقمة تحوي على 5 مل من مستخلص الخميرة واكمل الحجم بالماء المقطر لغاية 10 مل للتأكد من عدم تلوث المواد المستعملة. وللتأكد من كفاءة المزرعة المعقمة لقت أنابيب الاختبار المعقمة المحتوية على 5 مل من مستخلص الخميرة السائل (YEL) بـ 0.1 مل من التخافيف المناسبة للقاح الخمائر المستخدمة بعمر 24 ساعة واكمل الحجم بالماء المقطر المعقم إلى 10 مل ثم حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 30م لمدة خمسة أيام.

غربة العزلات :- اجراء اختبار حساسية عزلات الخمائر لتراكيز متدرجة من الكحول الاثيلي %2, 4, 6, 8, 10, 12 وقياس التركيز المثبط والقاتل للخميرة .
6 - قياس الكثافة الضوئية لايوساط نمو العزلات المنتخبة عند طول موجي 600 nm بفترات حضن 24, 48, 72 ساعة.

7- انتخاب العزلات المحتملة لاي تركيز كحولي ، وتهيئة وسط نمو مكون من $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1غم / لتر) و 5غم/لتر $(NH_4)_2SO_4$ و KH_2PO_4 و 5غم/لتر و كلوكوز 350غم/لتر. ويدعم هذا الوسط بتراكيز متدرجة من الكالسيوم $CaCl_2$ 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0mM .

6 - قياس الكثافة الضوئية لايوساط نمو العزلات المنتخبة المدعمة بالكالسيوم عند طول موجي 600 nm .
النتائج والمناقشة:-

يظهر جدول (1) قيم تركيز الكحول الاثيلي الأدنى المثبط والقاتل لنمو العزلات الخمائر المستخدم في هذه الدراسة في وسط (YEL) مستخلص الخميرة السائل حجم لقاح 10^6 خلية / مل و 10^7 خلية / مل. فمن 64 عزلة اظهرت 22 عزلة مقاومة ونمو بتركيز كحول 7% عند استخدام لقاح حجم 10^6 خلية / مل و بتركيز 8% عند استخدام لقاح حجم 10^7 خلية / مل وتتفق هذه النتائج مع ما جاء به الكثير من الباحثين (20) بخصوص زيادة عدد الخلايا المستعملة في وسط التفاعل زيادة التركيز الأدنى للمواد المثبطة للنمو والقاتلة عند زيادة حجم اللقاح انتخبت المجموعة المقاومة واستبعدت العزلات الحساسة (21).

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

cell/mL 106		cell/mL 107		عدد العزلات
القاتل %	المثبط %	القاتل %	المثبط %	
8	6	8	7	17
8	7	9	8	22
6	4	7	5	25
				المجموع الكلي 64

واظهرت الفحوصات المجهرية لشرائح مأخوذة من تراكيز مختلفة من الايثانول تأثيره على العدد الكلي للخلايا من خلال مقارنتها بشرائح السيطرة .



شريحة مجهرية لنمو



1-شريحة السيطرة

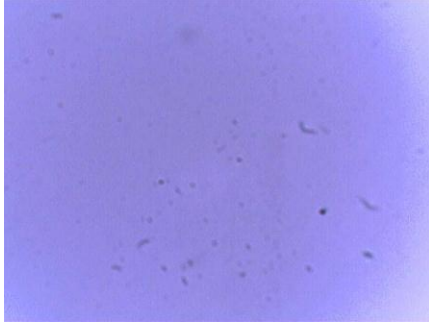
الخميرة بوجود 4% ايثانول



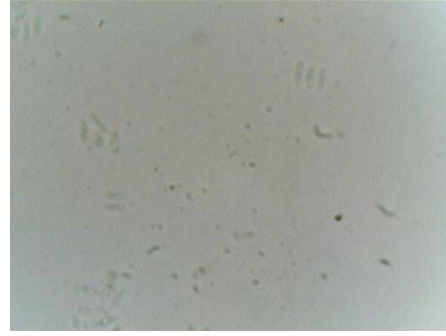
ايثانول 8%



ايثانول 6%



ايثانول 12%



ايثانول 10%

شكل (1) تأثير الايثانول على العدد الكلي لخلايا الخميرة في الشرائح المجهرية بوجود تراكيز متدرجة من الايثانول

يعرف الايثانول بانه من المثبطات لنمو الاحياء المجهرية، حيث يحطم DNA الميتوكوندريا ويعطل فعالية بعض الانزيمات hexokinase وانزيم dehydrogenease⁽²²⁾، وعند مرور الايثانول عبر الخلايا يؤدي الى انكماشها بسبب نضوب الماء وبالتالي موتها كما ان نضوب الماء يرافقه فقدان المعادن المهمة للخلية مثل الكالسيوم والمغنيسيوم وتقوم الخلايا بزيادة انتاج الكليسيرول في خطوة لتكيف تفادي نضوب الماء⁽¹⁶⁾. على الرغم من ذلك اظهرت بعض العزلات مقاومة لتراكيز من الايثانول 8%. حيث شخّصت العديد من الدراسات تكيف الخميرة للاجهاد الكحولي من العلاقة بين المحتوى الدهني للاغشية الخلوية ومقاومتها للايثانول ف لوحظ زيادة محتوى الاغشية من الاحماض الدهنية الغير مشبعة عند تعرضها للايثانول⁽²³⁾. كما وجد ان العزلات المقاومة للاجهاد الكحولي تظهر كذلك مقاومة للاجهاد من انماط اخرى مثل الاجهاد بسبب الضغط الازموزي والتأكسدي والحرارة.

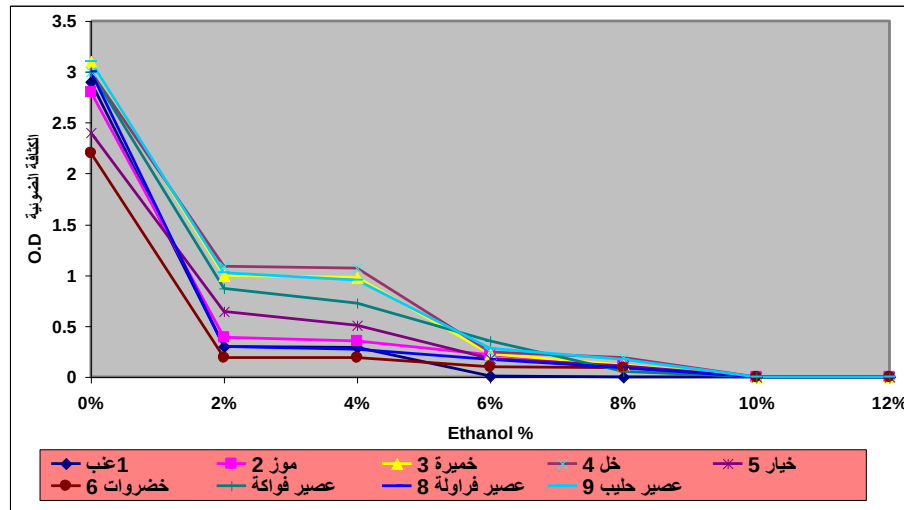
دراسة تأثير الايثانول بفترات النمو المختلفة

بعد الغرلة الاولى للعزلات بتحديد التركيز الادنى المثبط والقاتل تم انتخاب (9) عزلات لاجراء غرلة ثانوية بتعريضها لتراكيز متدرجة من الايثانول وبفترات الحضانة المختلفة .

تأثير تراكيز الايثانول لفترة حضانة 24 ساعة

يظهر الشكل رقم (1) ان جميع العزلات المنتخبة تتأثر بادننى التراكيز من الايثانول 4%. في حين اظهرت العزلة رقم (4) و العزلة (9) المعزولة من الخل ومن عصير الحليب على التوالي قيم نمو متفوقة عند تركيز 8%. أن الايثانول المضاف إلى الوسط الزراعي أقل سمية

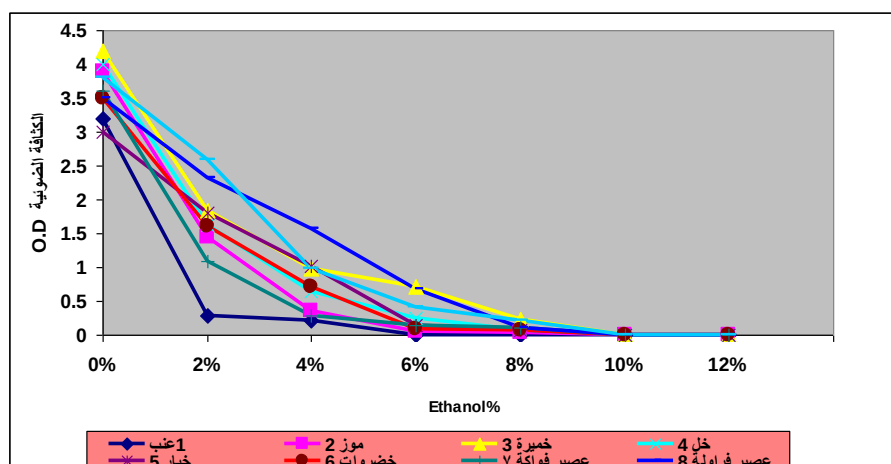
من الايثانول المنتج من قبل الخلايا في عملية التخمر . وان تجمع الكحول الأيثلي داخل خلايا الخميرة *S. cerevisiae* يؤدي إلى قتلها باعداد كبيرة⁽²⁴⁾ .



الشكل (2) تأثير تراكيز الايثانول في فترة حضن 24 ساعة

2- تأثير تراكيذ الايثانول لفترة حضن 48 ساعة

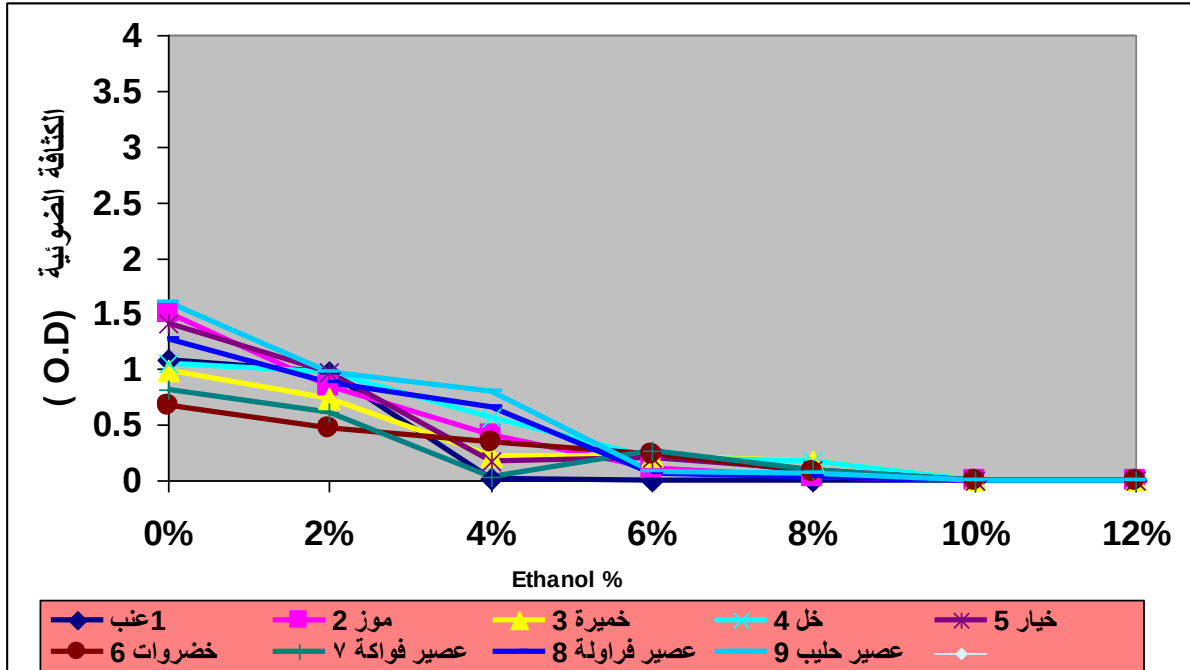
واظهرت العزلة (4) والعزلة (7) المعزولة من الخل والخيارعلى التوالي قيم نمو متفوقة بوجود ايثانول تركيز 8%. كما يلاحظ ان في الفترة 48 ساعة افضل فترة حضن للحصول على اكبر كتلة حيوية⁽²⁵⁾، اظهرت جميع العزلات قيم نمو وكتلة حيوية عنها في الفترتين 24 و72 ساعة ويعزى ذلك الى حجم اللقاح المستخدم ومكونات الوسط الغذائية ومعدل استهلاكها من قبل الخميرة وعلاقة ذلك بزمان الحيل للخميرة⁽²⁶⁾.



الشكل (3) تأثير تراكيز الايثانول في فترة حضن 48 ساعة

2- تأثير تراكيز الايثانول لفترة حضن 72 ساعة

اظهرت العزلة (3)و العزلة (4) والعزلة (9) المعزولة من الخميرة والخل وعصير الحليب على التوالي قيم نمو متفوقة في تركيز كحول ايثانول 8%. بينت العديد من الدراسات ان الفترة 72 ساعة هي الفترة المثلى للتخمير ولكنها ليست كذلك لنمو الخميرة او الحصول على كتلة حيوية من الخميرة⁽²⁵⁾ موضح في الشكل (4)



شكل (4) تأثير تراكيز الايثانول على نمو الخميرة في فترة حضن 72 ساعة

تأثير اضافة مستويات مختلفة من ايونات الكالسيوم في الاستجابة لتأثير الايثانول على نمو الخميرة .

انتخبت العزلة (رقم 4) لدراسة تأثير ايونات الكالسيوم لكونها اظهرت مديات نمو متفوقة في كل فترات الحضن المختلفة ،وعند اضافة مستويات من الكالسيوم (0,4-2,0 mM) وجد ان التركيز 1.2 mM اظهرت ارتفاعا في قيم النمو ليصل الى اقصاه في تركيز 1.6 mM للعزلة 4 المعزولة من الخل .

تحتاج خلايا الخميرة للمعادن في ايض وثباتية الانزيمات وبالتالي تحقيق التخمير الامثل. فقد شخصت حاجتها من الكالسيوم للمساعدة في تحفيز النمو ونضوجية جدار الخلية بتركيز امثل 4-8 ppb. وحاجتها من calcium pantothenate كفيتامينات في المساعدات الانزيمية coenzymes لانزيمات الاكسدة والاختزال وايض الدهون ووالاحماض الامينية والكاربوهيدرات بتركيز 45-60 ppm، لقياس الايثانول يتضمن تحديد تأثير الايثانول على نمو الخلايا وقابلية التخمير وحيوية الخلايا في المزارع. فمن اهم الخطوات متابعة فعالية انزيم

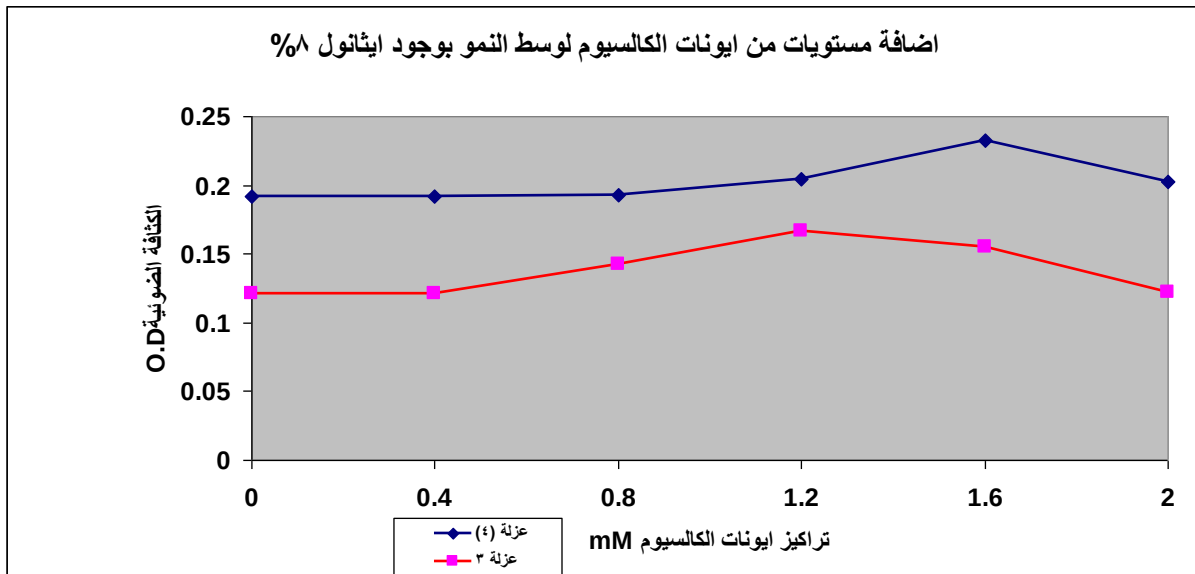
invertase وهو من الانزيمات الخارجية المسؤولة عن تحويل السكر من وحدات ثانوية كلوكوز وفركتوز (26).

وعند استخدام عزلة (3) المعزولة من الخميرة الجافة ولنفس التراكيز من الكالسيوم ولفترة حضانة 24 ساعة وجد ان التأثير يظهر عند تركيز 0.8 mM ليبلغ اقصاه عند تركيز 1.2 mM. ان الاختلاف في مديات التركيز الامثل لاحداث التأثيرات الايجابية على النمو يعود الاختلاف الى قابلية الخميرة على تحمل الاجهاد الكحولي ضمن نفس الجنس *Saacharomyces cerevisiae*.

الخمائر المقاومة لها القدرة على تطويل فترة التخمير وانتاج المنتجات بوجود الايثانول اضافة الى اظهار مقاومة للاجهادات من الانواع الاخرى. و للحد من التأثير السمي للكحول الأيثلي وزيادة تحمل الخميرة له يتم إضافة عناصر أو مركبات مثل أيونات المغنسيوم (Mg^{+2}). فقد لوحظ زيادة تأثير الكحول السمي بانخفاض نسبة المغنسيوم في الوسط ذو التركيز العالي من السكر كما أن أيونات المغنسيوم تعمل على حماية الخلايا من الإجهاد الفيزيائي Physiological Stress وجعل نقطة الجهد أقرب ما تكون لخدمة عمليات التخمير (27).

وتزداد مقاومة الخميرة *S. cerevisiae* لسمية الكحول الأيثلي بإضافة الحوامض الدهنية غير المشبعة مثل حامض الأوليك (18:1 Oleic acid) حيث تستخدمها الخميرة في بناء الغشاء البلازمي. وانخفاض هذه المقاومة عند إضافة الأحماض الدهنية المشبعة مثل حامض البالمنيك (16:0 Palmitic acid) (28,23).

إن التأثير المثبط للأيثانول لا يحفز بدرجات الحرارة العالية فقط وإنما في الأوساط المحددة (nutrient limitation) خاصة لأيونات الكالسيوم و المغنسيوم وبوجود النواتج العرضية Metabolic byproducts مثل الأحماض العضوية والألديهيدات والمركبات الفينولية كما تلجأ الخميرة *S. cerevisiae* إلى زيادة تخليق انزيم Superoxide dismutase Mitochondrial استجابة إلى تأثيرات الكحول الأيثلي (29).



الشكل (5) تأثير اضافة مستويات من ايونات الكالسيوم على نمو الخميرة *S. cerevisiae* بوجود ايثانول ٨%

ان تأثير الكالسيوم يعتمد على التركيز المضاف والتداخل مع مكونات الوسط المتخدم وتركيز الكلوكوز . عادة يضاف الكالسيوم بهيئة الكلس (Cao) في انتاج الايثانول من المولاس والمخلفات الزراعية ، حيث ان إضافته بمستويات تتراوح 0 (0-0.72% v/v) من الكالسيوم بهيئة كلوريد الكالسيوم تقلل من انتاج الايثانول عند وجود كلوكوز 20% (30، 31).

. Influence of calcium ions on alcohol stress responses of *Saccharomyces cerevisia*

F. J. Shalesh, F. R. Ali, Iman H.Katte, Nibal Kh.M., Sana'a Kh.M.

Abstract

Bioethanol is an important industrial chemical with emerging potential as a biofuel to replace fossil fuels. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is commonly used for ethanol production. The limited ethanol tolerance of the yeast results in low productivity. This search came to evaluate different levels of calcium ions in response to ethanol stress of yeast *S. cerevisiae*, which isolated from different local sources. The minimal inhibitory concentration and Lethal concentration of the isolates was evaluated by exposure to different concentration of ethanol, the resistant isolates to higher concentration 8% ethanol were selected. Growth determined by optical density at 600 nm to incubator period 24,48,72 h with ethanol 8%. Selected isolates which appeared best growth in different incubator period to experiments of addition different levels of calcium ions as calcium chloride concentration (1-1.2mM) have positive effect to growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and tolerance to alcohol stress the isolates different between them in evaluate the optimal concentration to make positive effect in range (0.8 – 1.6 mM).

المصادر:-

1- MaM,Liu ZL .(2010).Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*.Appl Microbiol Biotechnol .2010 Jul ;87(3):829-45.

2-Ding J,Huang X.Zhang L,Zhao N,Yang D (2009)Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* .Appl Microbiol .2009 Nov;85(2):253-63.

3- Zhao XQ, Bai FW. (2009) .Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production . J Biotechnol 2009 Oct 12 ; 144(1) :23-30.

4- شلش . فوزية جاسم . (2003) . دراسة كفاءة طفرات من خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* في إنتاج الكحول الصناعي بتقنيتي مزرعة الدفعة الواحدة والخلايا المثبتة . رسالة ماجستير . قسم علوم الحياة -كلية العلوم -الجامعة المستنصرية.

5- Mobini M, Nahvi I, Ghaedi K,Tauassoli M. (2007) .Isolation of high ethanol resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae* . RPS 2(2007) 85-91.

6- Jurado ,A, Santana,M ,S (1987). Influence of divalent cations on the growth and morphology of *Bacillus stearothermophilus* .J.Gen .Microbiol.133:507-513.

7-Kevin R . (2009) Strategy for adapting wine yeasts for bioethanol production. Int J Mol Sci Jan ; 10 (1): 387-419 .

8-Patt PI, Bryeejh, Stewart GG, (2003) The effects of Osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. *J Inustitue Brew* .2003;109:218-228.

9 - Walker, M.G (1999) *Yeast Physiology and Biotechnology*, John Wiley & Sons. Canada

10- Thomas D.S. Hossack J. and Rose A. H. (1978), "Plasma Membrane Lipid composition and Ethanol Tolerance in *Saccharomyces Cerevisiae* "; *Arch. Microbiol* 116: 239-2458.

11-Brook A A . (2008) .Ethanol production of local yeast strains isolation from ripe banana peels .*African Journal of Biotechnology* Vol.7(20) ,3749-3752 , 20 October , 2008 .

12- Piper Wp, Talreja K. panaretou B. Byrn K and Bouchene H. (1995) induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae* including Plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above critical threshold , *Msicrobiol . UK* 140:3031-3038.

13- Blomberg, A (2000). Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 1-8.

14- Zaldivar. J, Martinez A, Ingram Lo, (1999). Effect of Alcohol compounds Found in Hemicellulose Hydrolysate on the Growth and Fermentation of Ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 68(5): 525-530.

15- Zhang Q, Zhao X, Jiang R. (2009). Ethanol tolerance in yeast molecular and genetic engineering .*Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2009 Apr : 25 (4) : 481-7.

16-Tan N, Nagahise K, Shimzu H. (2006). Responses of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* to Osmotic stress. *Sains Malaysiana* 35 (2); 9-15.

17-Takahashi T, Shimoi H, Ito K. (2001) .Identification of genes required for growth under ethanol stress Using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* .*Mol Genet GENOMIC* .2001;265;1112-119.

- 18- Verstepen KJ ,Pretorious, 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.Springer-Verlag ,Heidelberg.Germany ,pp 399-444.
- 19 - Al- Zaidy H. M. (1975). Study of the antimicrobial activity of some alcohols. Ph. D. Thesis. Heriot- watt Univ. Edinb.
- 20-Bulger R., and washing J.A. (1980) effect of inoculum size and B. lactamase production on invitro activity of new Cephalosporins against Haemophilus species. Antimicrob . Agents and chemotherapy 7:393-396.
- 21-Siquera PF,Karp SG, Carvalho JC,Sturm W.(2008) Production of bio-ethanol from soybean molasses by Saccharomyces cerevisiae at laboratory,pilot and industrial scales.Bioresour Technol . Nov;99(17):8156-63.
- 22-Osho A. (2005) .Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermentation Cashew apple juice . African ,J Biotechnol .2005;4:660-662.
- 23-You KM,Rosenfield CL,Knipp DC, (2003) .Ethanol tolerance in the yeast Saccharomyces cerevisiae is dependent on cellular oleic acid content . Appl . Environ Microbiol 2003.;69 :1499-1503 .
- 24- Nagodawithana T. W. and Steinkraus K. H. (1976); "Influence of the rate of ethanol production and Accumulation on the viability of Saccharomyces cerevisiae in Rapid fermentation" , Appl. Environ Microbiol. 31:158-162
- 25 –Periyasay S,Venkatachalam S . (2009) Production of Bioethanol from sugar molasses Using Saccharomyces cerevisiae , Modern Applied Science .vol.3,No.8,,August 2009.
- 26- Snyder C, Ingledew M . Nutrition in Fermentation .TECHNICAL PROFILE. May 2009 .BIOFUEL BUSINESS

27- Birch R.M, Walker G.M. 2000. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enz Microb Technol* 26: 678-687.

28-Furu Kava , k,Kitano H, Mizoguchi,H,Hara,S 2004 .Effect of cellular inositol content on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in sake brewing *J Bioscience Bioengineering*. 2004:98:107

29-Costa . V, Reis E .Qulutancha A (1993) . Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* the key role of mitochondrial superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 608 –614.

30- Chatineerananat S ,Wansuksri R,2010. Effect of calcium ions on ethanol production from molasses by *Saccharomyces cerevisiae*.*SUGAR TECH* ,volum 12,(2);120-124.

31- GH,Fleel.(2009) .Wine yeast for the future. *FEMS Yeast Res*,8 (7):979-986