مجلة بغداد للعلوم **مجلد 7(1) 2009**

انتخاب عزلة خميرة ذات انتاجية عالية من الايثانول الحيوي

فوزية جاسم شلش* ***فوزي رشيد علي**** ***حسين حسن خانقاه****

تاريخ قبول النشر 1 /3 /2010

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، أعتمد التشخيص على الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيمياوية. أظهرت نتائج إختبار حساسية عزلات الخميرة لتراكيز الكحول الأثيلي. إنّ العزلة Sy18 تتحمل أعلى تراكيز للكحول الأثيلي حيث كان التركيز الأدنى المثبط للنمو من الكحول الأثيلي (16%) والتركيز القاتل (17%). كما أظهرت نتائج إختبار العزلات في إنتاج الكحول الأثيلي ان العزلة Sy18 بلغت أعلى كمية كحول منتج بطريقة مزرعة الدفعة الواحدة مقارنة مع بقية العزلات. أنّ إنتاجية هذه العزلة من وسط عصير التمر بتركيز 24% كانت 9.36%(ح/ح).

تم تحديد الظروف المثلى لإنتاج الايثانول اذ شملت درجة الحرارة، الرقم الهيدروجيني وتركيز المواد الصلبة الكلية لوسط التخمر وفترة الحضن وتأثير تراكيز مختلفة من فوسفات الامونيوم المضاف إلى وسط التخمر مما أدى إلى تحسين إنتاجية العزلة Sy18 لتصل إلى 10.32%(ح/ح) كحول اثيلي. استخدام تقنية تثبيت خلايا الخميرة ***S. cerevisiae*** على الاوساط الساندة في الإنتاج المستمر للكحول الأثيلي وتم الحصول على معدل إنتاجية عالية للكحول الأثيلي 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 الأثيلي.

الكلمات المفتاحيه: ***Saccharomyces cerevisiae*** **, Ethanol , productivity**

المقدمة :

أستخدمت الخميرة ونواتجها الأيضية منذ القدم ، فتخمر الفواكة 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 المؤذية لطبقة الاوزون و كوكبنا بشكل عام [2].. ان الخميرة ***Saccharomyces cerevisiae*** الكائن المجهري التقليدي المستخدم في التخمرات الصناعية لإنتاج الكحول الأثيلي وذلك لقدرتها الواسعة في النمو في مدى واسع من الأوساط الغذائية الطبيعية والتركيبية وكونها أمينة 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 [5,4] .

يتم إنتاج الكحول الصناعي عادة بتقنيتين:

الاولى 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] .

والثانية تقنية يتم تقيد الخلايا بتثبيتها على أوساط خاصة في أجهزة أسطوانية تعرف بالمفاعلات الحيوية (Bioreacters) 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 هذة التقنية اقصاديا 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 هذة الدراسة الى ايجاد عزلات كفوءة في انتاج الكحول الاثيلي من مصادر محلية باستخدام اوساط اقتصادية وتحديد الظروف المثلى لانتاج الكحول الاثيلي ,واستخدام تقنية الخلايا المثبتة في عمليات التخمر لغرض الحصول على انتاج مستمر للكحول الاثيلي.

المواد وطرائق العمل :

1. *عزلات الخميرة* ***S. cerevisiae*** *ومصادرها:*

استعملت عدة مصادر مختلفة لعزل الخميرة مثل العنب والتين والتفاح والتمر وكذلك من

* وزارة العلوم والتكنولوجيا ,دائرة البحوث الزراعية وتكنولوجيا الغذاء ,مركز الهندسة الوراثية

الخل والعجين وانواع من الخميرة الجافة والطرية المضغوطة. وقد اتبعت طريقة التخافيف 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 30مْ، ويؤخذ مسحة من المستعمرات النامية لتلقيح 50مل من وسط مستخلص الخميرة السائل وتحضن لمدة يومين بدرجة حرارة 30مْ

3. حساسية الخمائر للكحول الأثيلي: طريقة قياس تركيز الكحول الاثيلي الادنى المثبط والقاتل للخميرة **Minimum inhibitory and Lethal concentration (MIC)** اتبعت الطريقة التي استعملها الزيدي [8]

4. غربلة العزلات لاختيار العزلة الاكفأ في إنتاج الكحول الأثيلي:-

حضر لقاح كل عزلة وذلك بتنميتها على وسط المائل (YEPD) بدرجة حرارة 30مْ لمدة 24ساعة. زرعت في دوارق زجاجية سعة 500 مل حاوية على 100مل من وسط غذائي من عصير التمر المعقم بتركيز 4بركس ومدعم بالاملاح كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2\ SO_4$ بتركيز 0.6% وزن/حجم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين $KH_2\ PO_4$ بتركيز 0,31% وزن/حجم حضنت في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 30مْ لمدة 24ساعة وبعدد دورات 150 دورة في الدقيقة، بعد الحضن اخذ 40 مل من اللقاح الناتج لتلقيح دوارق زجاجية سعة لتر واحد حاوية على 760مل عصير تمر معقم بتركيز 24بركس، مدعم بالاملاح نفسها السابقة، حضنت بدرجة حرارة 30مْ لمدة يومين. بعدها تم تقدير النسبة المئوية للكحول الناتج كما تم اجراء 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 40مْ وحرارة المحقن 150مْ .

5. **تنفيذ تجربة التخمر بطريقة مزرعة الدفعة الواحدة :** استعملت طريقة مزرعة الدفعه الواحدة لإنتاج الكحول الأثيلي 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 .

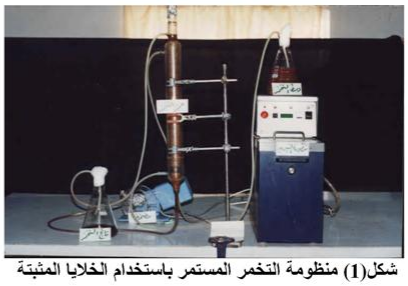
حيث نفذت تجارب درست كافة العوامل لتعين الظروف المثلى لانتاج الكحول الاثيلي : أستخدمت فيها الدرجات الحرارية: 20م° ، 25م° ، 30م° ، 35م°والرقم الهيدروجيني 4 ، 4.5، 5، 5.5، 6 وتراكيز مختلفة من المصدر النتروجين والفوسفات $(NH_4)2HPo_4$ وكذلك تأثير قيم البركس 8، 12، 17، 20، 42 على الناتج الكحولي كما درس تأثير فترات حضن 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 الأثيلي بطريقة التخمر المستمر Continuous fermentation في المفاعل الحيوي المؤلف من عمود زجاجي مزدوج الغلاف بطول 50سم وقطر الأنبوب الداخلي 2.5سم بحجم شغال 450سم^3 وبمعدل جريان (36 ملليتر/ساعة). ويرتبط العمود بمنظومة تبريد ومضخة لضخ وسط التخمر .(شكل1)

استخدمت مادة الطابوق الناري (Fire bricks) كوسط ساند في المفاعل الحيوي. حضرت قطع من الطابوق المحلي وذلك بتكسير قطعة الطابوق إلى قطع صغيرة ثم تنحل بوساطة منخلين أحدهما فوق الاخر، العلوي قطر الثقوب فيه 5ملم والسفلي قطر الثقوب فيه 1ملم وتحجز القطع المطلوبة التي تتراوح ابعادها بين 5-1ملم في المنخل السفلي. ثم تغسل بشكل جيد ولمرات متعددة في الماء وذلك لتخليصها من الغبار العالق والمواد الذائبة تجفف جيدا 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 بوساطة المضخة الطبية الدافعة من أسفل العمود إلى أعلى وتركت الخلايا لمدة 24 ساعة للوصول إلى حالة الاستقرارية Stabilization. يضخ عصير التمر المعقم بعدها بشكل مستمر من اسفل العمود ويستلم المحلول المتخمر من أعلى العمود. وكان زمن بقاء الوسط الزرعي في المخمر ما يقارب 12ساعة.



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 peristatic 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) ولاختبار معنوية الفروق للمعاملات استخدم اختبار دانكن .

النتائج والمناقشة :

1. عزل وتشخيص خميرة *Saccharomyces cerevisiae* أمكن الحصول على (75) عزلة تعود لخميرة ***S.cervisiae*** 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*** اعتمادا على الصفات المظهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية[11,12]

2. **حساسية الخمائر للكحول الاثيلي:**

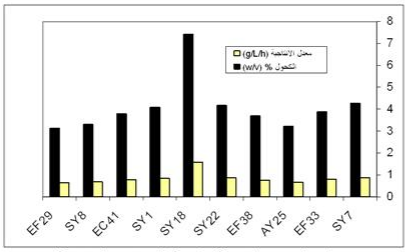
يظهر جدول (1)قيم تركيزالكحول الاثيلي الادنى المثبط للنمو والقاتل لعزلات الخمائر المستخدم في هذه الدراسة في وسط مستخلص الخميرة السائل(YEL) 10^6 خلية / مل و 10^7خلية / مل. وتتفق هذه النتائج مع ما جاء به الكثير من الباحثين بخصوص زيادة عدد الخلايا المستعملة في وسط التفاعل. كما تتفق مع ما اشار اليه الباحث[13] بخصوص زيادة التركيز الادنى للمواد المثبطة للنمو والقاتلة عند زيادة حجم اللقاح.

جدول (1) التركيز الادنى المثبط والقاتلمن الكحول الاثيلي لعزلات الخميرة

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

3. **انتاج الكحول الاثيلي بطريقة الدفعة الواحدة**:

اعتمادا على اختبارات حساسية العزلات اعلاة لتراكيز الكحول الاثيلى تم انتقاء (10) عزلات لانتاج الكحول الاثيلى حيث تفضل العزلات ذات التحمل العالى للكحول للاثيلى وتستبعد عزلات الخمائر الحساسة للتراكيز الواطئة [14].



شكل رقم (9) الغربلة الكمية للعزلات المنتخبة

4. **تحديد الظروف المثلى لإنتاج الكحول الاثيلي**:

تأثير درجة الحرارة: اظهرت النتائج جدول (2) ظهور فروق معنوية في الإنتاج الكحولي للعزلة Sy18 في الدرجة الحرارية 30مْ مقارنة مع الدرجات الحرارية الاخرى. ففي درجة حرارة 30مْ بلغ متوسط الناتج الكحولي 9.47%(ح/ح) وكمية السكر المتبقي 4.65% سكر تليها الدرجات الحرارية 20,35,25مْ بمتوسطات9.03 % (ح/ح) و 8.71%(ح/ح) و 7.01% (ح/ح) على التوالي. وهذا يتفق مع ما أشار اليه[15] من أنّ معدل التخمر يزداد بارتفاع درجة الحرارة عند الخميرة ***S.cerevisiae*** لغاية 30مْ بعد هذا يبدأ معدل التخمر بالانخفاض. ويعزى ذلك إلى أنّ إنخفاض درجة الحرارة يقلل التأثير السمي للكحول [16] في حين وجد[17] باجراء التخمر تحت درجات حرارية مختلفة (20,25,30,35مْ) إنّ الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج الكحول الاثيلي هي 25مْ بمتوسط ناتج كحولي 14.63%(ح/ح) تليها الدرجات الحرارية 35,20,30مْ. إنّ للدرجات الحرارية علاقة كبيرة بالفعاليات الايضية للخميرة لما لها

من دور فاعل في الانظمة الانزيمية المشتركة في عمليات التخمر الكحولي[18]. إنّ درجة الحرارة المثلى لإنتاج الكحول الاثيلي تكون بين 35,25 مْ وإنّ إرتفاع درجة حرارة التخمر 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	6.97[a]	7.01[a]
25	4.87[c]	9.03[b]
30	4.65[c]	9.47[a]
35	5.81[b]	8.71[b]

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

تأثير الرقم الهيدروجيني:-

أظهرت نتائج قيم الناتج الكحولي باستخدام أرقام هيدروجينية مختلفة أنّ قيمة الرقم الهيدروجيني 4.5 أعطت أفضل ناتج كحولي بظهور فروق معنوية مع القيم الاخرى (جدول3). فقد أشار[20] إلى أنّ الوسط الحامضي هو الافضل في إنتاج الكحول الاثيلي من خميرة ***S.cerevisiae*** لأن الانزيمات المشتركة في عملية التخمر الكحولي تكون اكثر نشاطا في الوسط الحامضي. وبين [21] أنّ إرتفاع 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 6.3-6.2 مما يؤدي إلى عدم تخليق ATPوانخفاض معدلات النمو.

ينخفض الإنتاج الكحولي عند الوسط المتعادل لزيادة النواتج العرضية مثل الكلسيرول[22],وأنّ بالامكان إنتاج الكحول الاثيلي بصورة جيدة في رقم هيدروجيني ابتدائي يتراوح بين 4.0-0. 6 وإنّ خفض الرقم الهيدروجيني ما بين (4.0-3.0) يؤدي إلى إنتاج الكلسيرول بدلا من الكحول[19].

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

قيم الاس الهيدروجيني	السكر المتبقي	الكحول المنتج %
4	5.81[c]	b8.49
4.5	4.41[d]	a9.47
5	6.04[c]	8.26[b]
5.5	8.13[b]	7.13[c]
6	8.83[a]	6.90[c]

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

تأثير تركيز المواد الصلبة الكلية:-

تبين من النتائج (جدول 7) ظهور فروق معنوية في الإنتاج الكحولي للعزلةSy18 باستخدام تركيز بركس 17 مقارنة مع قيم البركس الاخرى. فقد بلغ متوسط الناتج الكحولي 9.47%(ح/ح) في قيمة بركس 17. يليه القيم 12,24,20 التي لم يلاحظ ظهور فروق معنوية واضحة في الناتج الكحولي. إنّ زيادة تركيز المواد الصلبة الذائبة يزيد من الناتج الكحولي إلى حد معين ثم يتناقص بسبب ارتفاع تركيز السكر الذي يؤدي إلى زيادة الضغط الازموزي لخلايا الخميرة مما يؤثر على فعاليتها الحيوية. [24,23] . وقد ذكرأنّ التراكيز العالية للسكر في الوسط ينتج عنها حدوث صدمة Hyperosomatic shock جراء ارتفاع الضغط التنافذي[25].

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

تركيز بركس	الكحول الناتج %(ح /ح)
8	[d]4.90
12	[c]7.92
17	[c]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 (NH4)2HPO4 تركيز 0.1% إلى وسط عصير التمر المستخدم في التخمر. 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 (جدول5) 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 أنّ لأيون الامونيوم الموجب تأثير تحفيزي لإنتاج الكحول [27]. كما أنّ للفسفور دورا مهما مهم في عملية التخمر الكحولي في فسفرة الكلوكوز عند دخوله في عملية التحلل السكري التي تبدا بها عملية التخمر الكحولي. كما يدخل في تركيب مركبات الطاقة (ATP) والاحماض النووية ذات الاهمية في خلايا الخميرة [27] .

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 حضن مختلفة

باجراء التخمر في فترات حضن مختلفة وبوجود فوسفات الامونيوم بتركيز0.1% وجد أنّ أفضل فترة حضن 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 وتحويله ثانية إلى استيدالديهايد acetaldehyde الذي يتحول بخطوات انزيمية إلى مركب acetyl-COA الذي يدخل في العمليات الأيضية لخلية الخميرة.

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

فترات الحضن/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 الأثيلي بطريقة الخلايا المثبتة

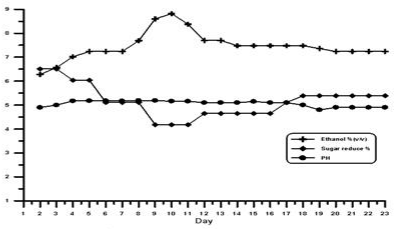
بينت نتائج تثبيت الخلايا على قطع الطابوق الناري باستخدام وسط عصير التمر بتركيز سكر (15.81%) أنّ أعلى كمية للكحول الأثيلي كانت في اليوم العاشر حيث بلغت (8.82%) وكمية السكر المتبقي (4.18%) والرقم الهيدروجيني 5.16 .شكل (2).

أشارت بعض الدراسات إلى إمكانية استخدام مادة الطابوق الناري (fire bricks) كمادة ساندة للخلايا بعد تفتيتها إلى أحجام مناسبة [29] حيث كانت الاحجام المستخدمة 0.4 – 1.4 ملم . وفي هذا المجال أشار(30) , إلى أنّ الفترة المناسبة للحصول على ناتج من الكحول الاثيلي لا تقل عن عشرة ايام 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 الساند. 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 أنّ خلايا الخميرة تحتوي شحنات سالبة على جدارها بسبب وجود المجاميع الكاربوكسيلية والفوسفاتية وعلى جانب اخر فان الشحنة على قطع الطابوق موجبة بالوسط الحامضي حيث ان مادة الطابوق عبارة عن مادة سليكونية ترتبط بها مجاميع هيدروكسيلية فعند وجودها في وسط زرعي ذو قيمة رقم هيدروجيني 4.5 فان الزيادة في ايون الهيدروجين H^{+} تعادل مجاميع الهيدروكسيل OH^{-} والتي تجعل سطح الطابوق موجب الشحنة وهذا يؤدي إلى زيادة في قيمة pH للوسط الزرعي من 4.5الى 5.2 .

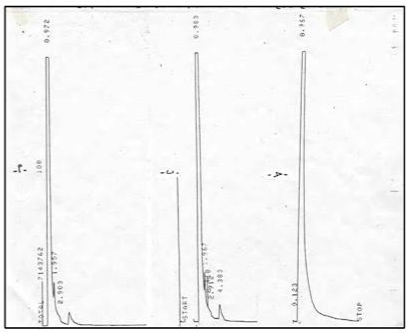
ولوحظ انخفاض قدرة خلايا الخميرة في تحويل السكر إلى كحول اثيلي خلال الأيام الستة الأخيرة من عملية التخمر وقد يعود السبب إلى التعرض المستمر لظروف غير ملائمة للنمو مثل تعرضها للكحول الأثيلي المنتج والمنتجات الأيضية الأخرى داخل المفاعل الحيوي فقد أشار[33]أنّ بعض الخمائر قد تتأثر بالتراكيز القليلة من الكحول الاثيلي عند تعرضها لفترات طويلة مما يؤدي إلى انخفاض حيويتها. وتجدر الإشارة إلى ان كبر حجم المفاعل الحيوي المستخدم في هذه الدراسة أعطى ملائمة لاستخدام تراكيز عالية من السكر والحد من تاثير لزوجة عصير التمر المستخدم والتقليل من المشاكل الفنية في المفاعل الحيوي الناجمة من جريان الوسط التخمري وتولد غاز ثاني اوكسيد الكربون داخل المفاعل وبالتالي أمكن الحصول على إنتاجية متفوقة . فقد أشار [34] ان 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 الاثيلي (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 للايثانول 5.83 غرام /لتر/ ساعة وبذلك تتفوق هذه الطريقة في معدل إنتاجية الكحول الاثيلي على طريقة مزرعة الدفعة

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



شكل (2) التخمر المستمر لإنتاج الكحول الأثيلي (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 (شكل4) ونلاحظ زيادة بعض المواد الايضية المنتجة بوساطة الخلايا المثبتة مقارنة مع مزارع الدفعة الواحدة حيث أشار [34] إلى حصول زيادة في بعض المواد الايضية بوساطة الخلايا المثبتة وتجدر الإشارة أنّ من مساوئ طرائق الخلايا المثبتة أنّ الحالة الفسيولوجية للكائنات الحية لا يمكن السيطرة عليها بسبب امتزاز الخلايا على أوساط قد تكون غيرملائمة 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 عن1-الكحول الاثيلي المنتج بمزرعة الدفعة الواحدة ب- الكحول المنتج بالتخمر المستمرللخلايا المثبتة ج-الكحول القياسي

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 بغداد-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 ,Pretorious IS 2006 The development of superior yeast strans for food and beverage industry:challenges,oppprtumities 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 forbeer 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. لبهادلي، نزار محسن علي. 1987 "دراسة مقارنة كفاءة عزلات الخميرة ***S. cerevisiae*** في إنتاج الكحول الأثيلي. 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.

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.

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 ". Biotechnal 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). Immobolized 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

31- Najafpour G, Younesi H, Syahidah K, Ismail K 2004. Ethanolfermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomycescereviae*, Bioresour. Technol. 92: 251-260.

32- Sakurai A, Nishida Y, Saito H, Sakakibara M 2000. Ethanol production by repated 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 Lmmobilized cell reactor. Biotech. Bioeng22:1735-1748.

28. Flikweert T.M. kuyper M. 1999. Steady-state and trasient-state. Anlysis of growth and metabolite production in ***Saccharomyces cerevisiae*** strain with Reduced pyruvate-decarboxylase Activity. Biotechol Bioeng. 66: 42-50

29-Junter G .A Coquet l,Viliain S,Jouenne T2002 lmmobilized- cell Physiology:current data and the potinteniaties of promoteries .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