دور المغنيسيوم في تحسين الفعالية التخميرية لعزلات محلية من الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* المنتجة للايثانول الحيوي

Role of magnesium ions on Improvement of Fermentative activity of local yeast isolates *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production

فوزية جاسم شلش فوزي رشيد علي شيماء رجب فرحان
صفاء عبد الرحيم محمود علي مدلول مرعي
وزارة العلوم والتكنولوجيا
F. J. Shalesh F. R. Ali S. R. Frahan
S. A. Mahmood A. M. Mari
Ministry of Sciences and Technology

المستخلص

يتزايد الاهتمام بالايثانول الحيوي كوقود حيوي بديل عن الوقود الاحفوري، يتأثر نمو الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* وقدرتها التخميرية وحيويتها بالمغذيات الدقيقة من الايونات . أجريت هذه الدراسة لتقييم تأثير ايون المغنيسيوم كمساعدات إنزيمية في النمو و الفعالية التخميرية لعزلات محلية من الخميرة *S. cerevisiae* . استخدمت طريقة تخمر الدفعة الواحدة للوسط التخميري من الكلوكوز المدعم بتراكيز مختلفة من ايونات المغنيسيوم بهيئة كلوريد المغنيسيوم وبفترة حضن 48 ساعة بدرجة حرارة 30م ودالة حموضة4.5، فكان افضل تركيز حقق اعلى تخمير هو 1.25 غم/ لتر بقياس كتلة ثاني اوكسيد الك اربون المتولدة، كما ان دعم الاوساط التخميرية بالمغنيسيوم يطيل فترة النمو الوغارتمي ويقلل من الانخفاض في فعالية التخمر وبذلك يقلل من الوقت المطلوب لتحويل السكر الى ايثانول.

Abstract

The interest in bio-ethanol increase as biofuel, it seems to be a good alternative for fossil fuels. The growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae* is influence in micronutrient like ions. This research aims to evaluate the influence different amount of magnesium as co-enzyme in growth and fermentation of yeast *S. cerevisiae* which isolated from different local sources. The batch fermentation process was followed at different magnesium concentrations as magnesium chloride at incubation temperature 30C° and pH 4.5, best supplement concentration was 1.25 gm/l by measuring the mass of the released carbon dioxide. Supplement media with magnesium prolonged exponential growth, reduced the decline in fermentation activity resulting in reduced the time required for the conversion glucose into ethanol.

المقدمة

يتزايد الطلب العالمي للايثانول الحيوي كمصدر من مصادر الطاقة المتجددة والصديقة للبيئة ، إضافة الى استخداماته الطبية والصناعية المتعددة [1]، حيث شهد الانتاج التجاري للايثانول الحيو ي تصاعدا كبيرا من 1.63بليون غالون عام 2000 الى 3.6بليون غالون عام 2004 والى مايقارب 4 بليون كالون 2005. يشكل الايثانول الحيوي 99% من الوقود الحيوي المستخدم في الولايات المتحدة الى جانب Biodiesel. ويتوقع ان يصل حجم استخدام الوقود الحيوي الممزوج بوقود الكازولين كمحسنات للوقود الى 7.5 بليون كالون عام 2012 [2]. تنتج الخميرة *S.cerevisiae* الايثانول بالتخمر اللاهوائي وهي عملية معقدة بمشاركة العديد من الإنزيمات ويمكن زيادة أنتاجه من خلال تحفيز تلك الانزيمات بطرق متعددة منها استخدام المساعدات الانزيمية اوالتحكم بالظروف البيئية من درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني. ايون المغنيسيوم من المساعدات الانزيمية لانزيمات عملية الكلايكولسيس وهي المرحلة اللاهوائية التي يتكون فيها وحدات ATP، حيث يؤثر ايون المغنيسيوم على انزيم Kinases وهو المسؤول عن ربط مجموعة الفوسفيت بجزيئة الكلوكوز وهي خطوة ضرورية لبداية العملية برمتها [3]. يدخل المغنيسيوم في العديد من المهام

الكلمات المفتاحية: الايثانول الحيوي، الفعالية التخميرية، الوقود الحيوي

الفسلجية للخلية منها النمو وتكامل العمليات الايضية ويسيطر على عملية انقسام الخلية. وكذلك يلعب دور اساسي في مواجهة الخميرة للاجهاد البيئي مثل الصدمة الحرارية وسمية الايثانول كما له دور مهم في ثباتية الاغشية الخلوية ونضوحيتها , حيث يزيد من نضوحية الاغشية البلازمية للايونات والبروتونات عن طريق تداخلها مع الدهون الفوسفاتية للاغشية وبالتالي تحديدها لثباتية طبقات الاغشيةالبلازمية [4 ,5].

يتاثر نمو الخميرة بالعديد من المغذيات الدقيقة، أضافة الى ايون المغنيسيوم و ايونات الكالسيوم والزنك والبوتاسيوم والنحاس. يعد المغنيسيوم من اكثر المعادن التي تعتبر من العوامل المنظمة للفعاليات الايض ية في النمو والتخمر ، اضافة الى عمليات التلبد Foluccculation وانقسام الخلية وان معدل دخولها للخلية وستهلاكها يعتمد على تركيزها في الوسط وقابليه الذوبان لمركباتها الايونية وتجمعها داخل الخلية وطرحها في وقت لاحق خلال عملية التخمر الايثانولي فهي عملية ديناميكيةٍ ترتبط بالمحتوى السكري والكحولي للوسط [6]، حيث إن بعض المكونات تؤدى إلى تحسين التحمل الكحولي ومقاومة الخميرة لظروف الاجهاد البيئي واستمرار عملية التخمر ومن هذة المركبات الأحماض الدهنية غير المشبعة والستيرول والبروتينات والأحماض الامينية والفيتامينات [7] و نظرا لحاجة الخميرة الى مصدر نتروجيني فان دعم وسط التخمر بفوسفات الامونيوم خلال التخمر يزيد من عدد الخلايا ومعدل التخمر[8].

تحقق ان اضافة ايونات المغنيسيوم له تأثير في زيادة مقاومة الخميرة للجفاف واستعادة فعاليتها عند عودة المحتوى المائي للبيئة [9]، كما ان تدعيم هذه الاضافة بالكالسيوم يعزز من الزيادة المعنوية لمقاومة الخميرة ولهذا اهمية في عملية تصنيع الخميرة الجافة الفعالة المحضرة لاغراض التغدية او التخمرات الصناعية [10].

تختلف كمية املاح المغنيسيوم المضاف الى وسط تنمية الخميرة عن تلك المضافة ل وسط التخمر اعتمادا على متطلبات الخميرة، فيعتبر تركيز 0.35غم /لتر من ايون المغنيسيوم بهيئة كبريتات المغنيسيوم $MgS0_4$ افضل تركيز للنمو، في حين ان حاجتها الى كلوريد الكالسيوم وكبريتات النحاس $CuSO_4$ بتركيز 0.0555غم /لتر و o.004 غم/لتر على التوالي وهذا الاختلاف في كمية التراكيز يعزى الى متطلبات الخميرة لايون المغنيسيوم في العديد من الفعاليات الايضية وعملية النمو والانقسام واثبت ذلك من تحليلات المحتوى الايوني للكتلة الحيوية للخميرة وامكانية ارتباط المغتيسيوم وقابلية الخميرة على الادمتصاص لمركبات المغنيسيوم على الجدار الخلوي [11].

يهدف هذا البحث الى تقييم دور المغنيسيوم في الفعالية التخميرية لعزلات محلية من الخميرة *S.cerevisiae* وتحديد التراكيز المناسبة منه لانتاج الايثانول الحيوي.

المواد وطرق العمل

1- عزلات الخمائر ومصادرها

استخدمت عزلة *S.cerevisiae* المعزولة من مصادر محلية والمشخصة من دراسة سابقة ومنتخبة لكفائتها في انتاج الايثانول الحيوي [12] .

2- تحضير المنحنى القياسي للنمو

عملت تخافيف للقاح الخميرة واخذت قراءات الكثافة الضوئية عند طول موجي 600 نانومتر، كما تم حساب عدد الخلايا لكل تخفيف بطريقة العد بالأطباق CFU بتنمية التخافيف على وسط صلب مكون من 2% كلوكوز،1% بيبتون، 0.5 % مستخلص الخميرة و 2% اكار وحضنت الاطباق في درجة حرارة 30م لمدة 2-3 يوم [13]، ورسمت العلاقة بين الكثافة الضوئية الممتصة وعدد الخلايا بشكل منحنى قياسي كما رسمت العلاقة بين قراءات الكثافة الضوئية المؤخوذة لعالق الخميرة وفترات الحضن المختلفة وذلك لغرض تحديد مرحلة الطور اللورغاريتمي لاختيار حجم لقاح الخميرة المستخدم بقيمة كثافة ضوئية ممتصة 2.0.

3- تحضير لقاح عزلات خميرة

تم تنشيط عزلات الخميرة بتنميتها على وسط مستخلص الخميرة المائل(Yeast extract agar slant (YEA حضر هذا الوسط بإضافة 20غم/لتر من الاكار إلى وسط مستخلص الخميرة السائل. استعمل هذا الوسط لتنمية الخميرة على سطح صلب والحصول على مستعمرات منفردة. تحضن لمدة يومين بدرجة حرارة 30م، أخذت مسحة من المستعمرات النامية لتلقيح 50مل من وسط مستخلص الخميرة السائل حضر هذا الوسط من إذابة 5غم مستخلص الخميرة و30غم D. Glucose في لتر ماء مقطر وضبط الاس الهيدروجيني 4.5 واستعمل هذا الوسط لتنمية الخميرة. وحضنت بنفس ظروف الحضن اعلاه [14].

4- تجارب التخمر

استخدمت تقنية تخمر الدفعة الواحدة Batch culture لاجراء تجارب دراسة تاثير ايونات المغنيسيوم على فعالية التخمر الكحولي باستخدام وسط تخميري يحتوي على كلوكوز نسبة 18% كمصدر وحيد للكاربون والطاقة، واضافة المغنيسيوم بهيئة كلوريد المغنيسيوم بتراكيز مختلفة 0.5،0.75،1.0،1.25،1.5غم/ لتر. وتم تلقيح الوسط بلقاح الخميرة المحضر بحجم 10% من حجم وسط التخمر. تم تحديد فعالية التخمر من قياس كمية ثاني اوكسد الكاربون المتحرر، حيث ان كمية مولات الايثانول المتكون من عملية التخمر يمكن قياسها من خلال قياس كمية ثاني اوكسيد الكاربون المتولد [9]. ويمكن متابعة حركية التخمر Fermentation Kinetics من خلال ملاحظة كمية ثاني اوكسيد الكاربون المتولد في مختلف فترات التخمر حيث أخذت القراءات كل 20 دقيقة.

كما يمكن حساب حالة التقدم في التخمر Fermentation progress (FP) من خلال احتساب كمية ثاني اوكسيد الكاربون المتولد في الاوساط الزرعية طبقا للمعادلة التالية

$$FP = CO2\ (t)/CO2\ max$$

حيث ان CO2(t) تعادل كمية ثاني اوكسيد الكاربون المتولد في الوقت t ، وتشير CO2 max الى كمية ثاني اوكسيدالكاربون المتولد في وقت اكتمال التخمر وهو الوقت الذي تقارب فيه مكونات المواد الاساسية للوسط من النفاذ. ويعتبر التخمر مكتملا عندما يكون محتوى الوسط الزرعي من السكر اقل من 2غم / لتر [16,15]. تم تحديد نسبة استهلاك الخميرة للسكر في هذه الدراسة من خلال اخذ قراءات البركس قبل وبعد عملية التخمر بوجود التراكيز المختلفة من كلويد المغنيسيوم. أجريت تجارب التخمر بتحديد قيم الرقم الهيدروجيني 4.5 ودرجة حرارة 30م باعتبارها ظروف مثلى للعزلة المحلية المستخدمة [12] وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة.

5- تشخيص الكحول المنتج

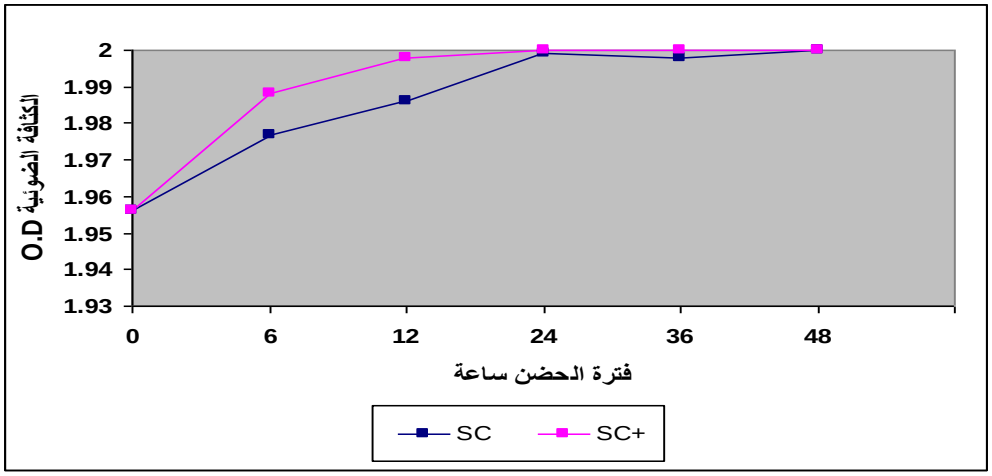
استخدم جهاز الغاز الكروماتوغرافي نوع G.C17A المجهز من شركة Shimadzu في تشخيص الكحول الناتج في مختبرات دائرة البحوث الزراعية/ وزارة العلوم والتكنلوجيا، حيث كان العمود المستخدم SE30 3% وكانت درجة حرارة العمود 40 م وحرارة المحقن 150مْ ومعدل سريان الغاز (Nitrogen) الناقل 40mL/min.

النتائج والمناقشة

1- الدراسة المجهرية

من خلال فحص الشرائح المجهرية لخلايا الخميرة المصبغة بصبغة الميثلين الزرقاء والمتعرضة لتراكيز من كلوريد المغنيسيوم يلاحظ جود اختلافات مظهرية في شكل خلايا الخميرة تباينت بين الشكل الكروي والبيضوي الى الشكل البيضوي المتطاول في مراحل من فترات الحضن تتجاوز 24 ساعة و بلغ حجم خلايا الخميرة2 -3 مايكرون في الطول وأما عرض الخلايا يتراوح بين 1.5 - 2.5مايكرون. وقد اشارت دراسة لسيطرة المغنيسيوم في دورة الخلية للخميرة *Schizosaccharmyces pomb* ان مرحلة Synchronization في انقسام الخلية تحفز بوجود المغنيسيوم في فترة الحضن القصيرة. ويلاحظ في مرحلة لاحقة استمرار الخلايا بالنمو والزيادة في الطول ولكنها تخفق في الانقسام وتكوين الصفيحة الخلوية وعدم حصول زيادة في عدد الخلايا ، وكان التعداد الكلي للخلايا 507 × 10^7 [CFU] في الوسط المدعوم بالمغنيسيوم و 480 x 10^7 CFU للوسط غير المدعم بالمغنيسيوم لفترة الحضن 24 ساعة و بدرجة حرارة 30م اي ان التعداد الكلي للكل منهما مايقارب 5 × 10^9 CFU، مما يشير الى عدم وجود فروق معنوية في تعداد خلايا الخميرة النامية في وسط مستخلص الخميرة السائل المدعم بالمغنيسيوم وتلك النامية في نفس الوسط غير المدعم بالمغنيسيوم بعد فترة حضن 24 ساعة [17،18].

يعتبر ايون المغنيسيوم من الايونات الموجودة داخل خلية الخميرة بوفرة، حيث يرتبط ايون المغنيسيوم اولا مع جدار الخلية وبالاخص مع المكونات ذات المجاميع السالبة المتواجدة في تركيب الجدار و يشكل جد ار الخلية من 51-30% من وزن الكتلة الحيوية و 25-50 %من حجم الخلية وبمعدل سمك من 70-10 نانومتر وبهذا الارتباط يمكنها من الانتقال الى داخل الخلية. حيث يلاحظ ان الكتلة الحيوية للخميرة الناتجة من عملية اكثار الخميرة تحتوي على كميات كبيرة من المغتيسيوم اكثر من الضعف مما هو عليه في الحالة الاعتيادية ، وهذا يعزى الى قابلية الخميرة على تجميع المغنيسيوم عندما تكون عملية الانقسام فعالة، حيث ان المغنيسيوم من الايونات الضرورية لعملية الانقسام مما يجعل الخميرة تتطلب كميات كبيرة منه عنها في الظروف اللاهوائية التخميرية . ففي بداية التخمر وجد ان محتوى خلية الخميرة لايون المغنيسيوم اكثر من 6ملغم /غم وزن كتلة حيوية جافة و ينخفض في مرحلة متقدمة من التخمر الى 3 ملغم/غم وزن كتلة حيوية جافة [6].



شكل (1): منحنى النمو للخميرة في الوسط المدعم بالمغنيسيوم + S.cمع الوسط غير المدعم بالمغنيسيومS.c
الوسط المستخدم Yeast extract,درجة الحرارة 30C° ,PH 4.5 ,فترة الحضن 48 ساعة ,حجم لقاح 10%

التحليل الاحصائي لمنحنى النمو

اظهر التحليل الاحصائي لقيم منحنى النمو شكل (1) الماخوذ من نمو الخميرة في وسط مدعم بالمغنيسيوم ومقارنتة مع منحنى النمو الخميرة في الوسط غير المدعم بالمغنيسيوم باستخدام البرنامج الاحصائي SPSS version [17] الى عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات وفترة الحضن والتداخل بينهما وذلك حيث كانت قيمة f الجدولية اعلى من قيمة f المحسوبة بمستوى اختبار LSD 0.05 وعلى درجة الحرية df= 11 .

ويلاحظ من منحنى النمو شكل (1) الخميرة في وسط مدعم بالمغنيسيوم ومقارنتة مع منحنى النمو الخميرة في الوسط غير المدعم بالمغنيسيوم ان الزيادة في عدد خلايا الخميرة يلاحظ في فترة الحضن 24 ساعة اكثر مما هو في الست ساعات الاولى كما لوحظ ان تاثير ايون المغنيسيوم يكون خلال 24 ساعة الاولى من النمو، كما لم يلاحظ في منحنى نمو الخميرة في الوسطين وجود طور تطبع مما يدل على ملائمة مكونات الوسطين لمتطلبات الخميرة ، ويعتقد ان الفترة 24 ساعة من الحضن انها نقطة النهاية من الطور اللوغاريتمي من النمو للخميرة، بما ان الهدف من البحث هو تقييم استفادة الخميرة من اقصى كمية من ايون المغنيسيوم الموجود بالوسط وهذا يحدث عندما تكون كمية الكتلة الحيوية المحصودة للخميرة في كميتها القصوى . ونظريا يتم ذلك في نهاية الطور اللوغاريتمي للنمو ولغرض تحديد نهاية الطور اللورغاريتمي من النمو للخميرة يتم عمل منحنى النمو . كما انها افضل فترة من الحضن لاضافة ايون المغنيسيوم لوسط التنمية، كما تمت متابعة التغير في قراءات الكثافة الضوئية لاختيار حجم لقاح 10% حاوي على كمية من خلايا الخميرة عند القراءة 2.0 [18].

2- تأثير المغنيسيوم في الفعالية التخميرية

يظهر جدول (1) ان فقدان الوزن الحاصل في وزن الوسط الزرعي قبل وبعد التخمر يشير الى ان الخميرة *S.cerevisiae* أنتجت ثاني اوكسيد الكاربون الذي يعتبر مؤشر لعملية التخمر . حيث ان كميات ثاني اوكسيد الكاربون المنتج خلال 30 ساعة الاولى من التخمر مؤشر لتقدير معدل التخمر الاولي . وتؤخذ القراءات في 48 ساعة التالية لحساب معدل التخمر [19]. كما يظهر الجدول ان كمية ثاني اوكسيد الكاربون المتحرر تزداد باضافة كلوريد المغنيسيوم حيث أظهرت النتائج ان اضافة مستويات مختلفة من تركيز المغنيسيوم الى وسط التخمريحسن عملية التخمر.

التحليل الاحصائي

تشير جدول (1) الى نتائج التحليل الاحصائي لاوزان ثاني اوكسيد الكاربون المتولد و قراءات قيم البركس المتبقي ومعدل نسبة التحويل باستخدام التصميم العشوائي التام Complete Random Design(CRD) ولاختبار معنوية الفروق للمعاملات استخدمت طريقة دانكنDuncan method عند مستوى احتمال 0.05، حيث وجد ان التركيز 1.25غم /لتر كلوريد المغنيسيوم يعطي فرق معنوي في وزن عدد مولات غاز ثاني اوكسيد الكاربون المتولد لجميع التراكيز المستخدمة من كلوريد المغنيسيوم ليصل الى 4.373.

جدول(1): تاثير تركيز المغنسيوم في مؤشرات عملية التخمر ثاني اوكسيد الكاربون واستهلاك الكلوكوز والتحليل الاحصائي

تركيز المغنيسيوم المضاف غم / لتر	وزن قبل الحضن غم	الوزن بعد الحض غم	الفرق بين الوزنين	معدل القراءات	البركس بعد التخمر	معدل البركس بعد التخمر	نسبة السكر المتحول %	معدل نسبة التحويل %
0	99.42	97.01	2.41	a 2.47	10.8	b 10.467	38.24	a 39.02
	110.14	107.92	2.22		10.2		40.0	
	108.13	105.33	2.80		10.4		38.82	
0.5	102.74	99.72	3.02	ab 2.95	9	ab 9.433	47.0	ab
	102.46	99.55	2.91		9.5		44.11	44.48
	102.83	99.44	2.94		9.8		42.35	
0.75	108.47	105.37	3.1	ab	9.8	ab	42.35	ab
	110.49	107.68	2.81	2.96	9	9.400	47.05	44.7
	109.32	106.44	2.98		9.4		44.70	
1.0	102.82	99.92	2.90	b 3.15	9.8	ab 9.267	42.35	ab
	102.45	99.13	3.32		8.8		48.23	45.48
	104.48	101.24	3.24		9.2		45.88	
1.25	104.02	99.70	4.32	c 4.37	7.8	a 8.067	54.11	b 52.54
	110.21	105.61	4.6		7.4		56.47	
	108.20	104.0	4.2		9.0		47.05	
1.5	110.63	107.52	3.11	b 3.44	9.8	b 9.867	42.35	a 41.95
	110.48	107.48	3.02		11.0		35.29	
	109.24	105.04	4.2		8.8		48.23	

الاحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات عند احتمال اقل 0.05

يلاحظ عدم وجود فروق معنوية بين اوزان الكاربون المتولدة عند استخدام التركيزين 0.5 و 0.75 غم /لتر من كلوريد المغنيسيوم وكذلك بين التركيزين 1.0 و 1.5 غم/ لتر كلوريد المغنيسيوم ,في حين ان التركيز 1.25 غرام يعطي فرق معنوي في وزن عدد مولات غاز ثاني اوكسيد الكاربون المتولد لجميع التراكيز المستخدمة من كلوريد المغنيسيوم ليصل 4.373 مما يشير الى دور ايون المغنيسيوم في تقليل الضرر الناجم عن سمية الايثانول والصدمة الحرارية حيث ان كل من الاجهاد الكحولي والحراري يعطل التوازن الايوني الخلوي في الخميرة مما يخفض الفعاليات الايضية وبالتالي موت الخلية [5]، في حين ليس هناك فروقات معنوية بين التركيزين 0.5 و0.75 والتركيزين 1.0 و1.5 غم/ لتر كلوريد المغنيسيوم مما يشير الى وجود مستوى معين لحاجة الخميرة لهذا الايون في عملية التخمر وتاثره بالظروف من درجة حرارة والرقم الهيدروجيني ومكونات الوسط التخميري . وان الزيادة عن هذه الكمية يؤدي الى التقليل من كمية ثاني او كسيد الكاربون المتولد، حيث ان المغنيسيوم من المساعدات الانزيمية لاكثر من 300 انزيم من انزيمات التحلل السكري منها hexo kinases, phosphofruto kinase ,pyruvate kinase enolase phosphofruto kinase [20]، مما يتطلب اضافتها بكميات مثلى، وتعمل بجرع قليلة وعند زيادتها تؤدي الى خلل في المستوى الازموزي وهبوط فعالية الانزيم. حيث ان زيادة التراكيز يخفض الانتاجية حيث اشارت دراسة ان تجمع ايونات المغنيسيوم وزيادتة عن التراكيز الاولية في الاوساط التخميرية MgSO4.7H20 1.3غم /لتر يؤدي الى انحدار معدل التخمر [21] .

وفي قراءات قيم البركس المتبقي من تخمر البركس الاولي بالقيمة 18% لوحظ عدم وجود فروق معنوية في قراءات البركس لوسط التخمر الناتج من استخدام تراكيز 0.5،0.75،1.0 غم /لتر كلوريد المغنيسيوم. واظهر التركيز 1.25 كلوريد المغنيسيوم فروق معنوية عن التراكيز الاخرى المستخدمة . في حين لم تعطي اكبر تركيز من المغنيسيوم المستخدم 1.5 غم/لتر اي فروق معنوية مع وسط السيطرة في قيم البركس الناتج من تخمر القيم الاولية 18%. وهذا ينطبق على النسبة المئوية للسكر المتحول حيث اظهر التر كيز 1.25 من المغنيسيوم المدعم لوسط النمو فروق معنوية واضحة عن التراكيز الاخرى وهذا يعزى الى التداخل بين تاثير ايون المغنيسيوم وتركيز المواد الصلبة في وسط التخمر المتمثلة بقيمة البركس للوسط وتاثير الضغط الازموزي على خلايا الخميرة.

هناك علاقة بين كمية ثاني اوكسيد الكاربون المنتج عند نمو الخميرة في اوساط مدعمة بتراكيز مختلفة من المغنيسيوم والايثانول الحيوي المنتج في كل عينة من المحاليل جدول (2) ويمكن الاستدلال منها على التركيز الذي يعطي

افضل نمو للخميرة وافضل انتاجية للايثانول (22). حيث كان معدل كميات ثاني اوكيسد الكاربون المنتج في عملية التخمر باضافة 1.25 غم/لتر كلوريد المغنيسيوم هي 4.37 غم وبمعرفة الوزن الجزيئي له 44.01 فان مولات ثاني اوكسيد الكاربون تكون حسب المعادلة

$$\mathbf{4.37/44.01\ u = 0.099\ mol\ CO_2}$$

وطبقا لمعادلة تخمر الكلوكوز فان نسبة CH_3CH_2OH:CO_2 هي 2.2 أي 1:1

ففي عملية التخمر اللاهوائي يتحطم الكلوكوز الى ايثانول و ثاني اوكسيد الكاربون ، وان عدد مولات الايثانول تساوي عدد مولات ثاني اوكسيد الكاربون المتولدة . حيث يتكون 2 مول ايثانول و 2 مول ثاني اوكسيد الكاربون من مول واحد من الكلوكوز[16].

$$\mathbf{C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3CH_2OH + 2\ CO_2}$$

كلوكوز ايثانول ثاني اوكسيد الكاربون

فان انتاج 0.099mol ثاني اوكسيد الكاربون وبذلك يتم حساب كمية الايثانول الحيوي المنتج

$$\mathbf{1x0.099mol = 0.099mol\ CH_3CH_2OH}$$

ويظهر جدول (2) قيم الايثانول لكل تركيز مستخدم م المغنيسيوم بحساب معدل القراءات لثلاث معاملات.

جدول (2): تراكيز المغنيسيوم المضاف لوسط التخمروكمية ثاني اوكسيد الكاربون المتولد وكمية الايثانول الحيوي المنتج

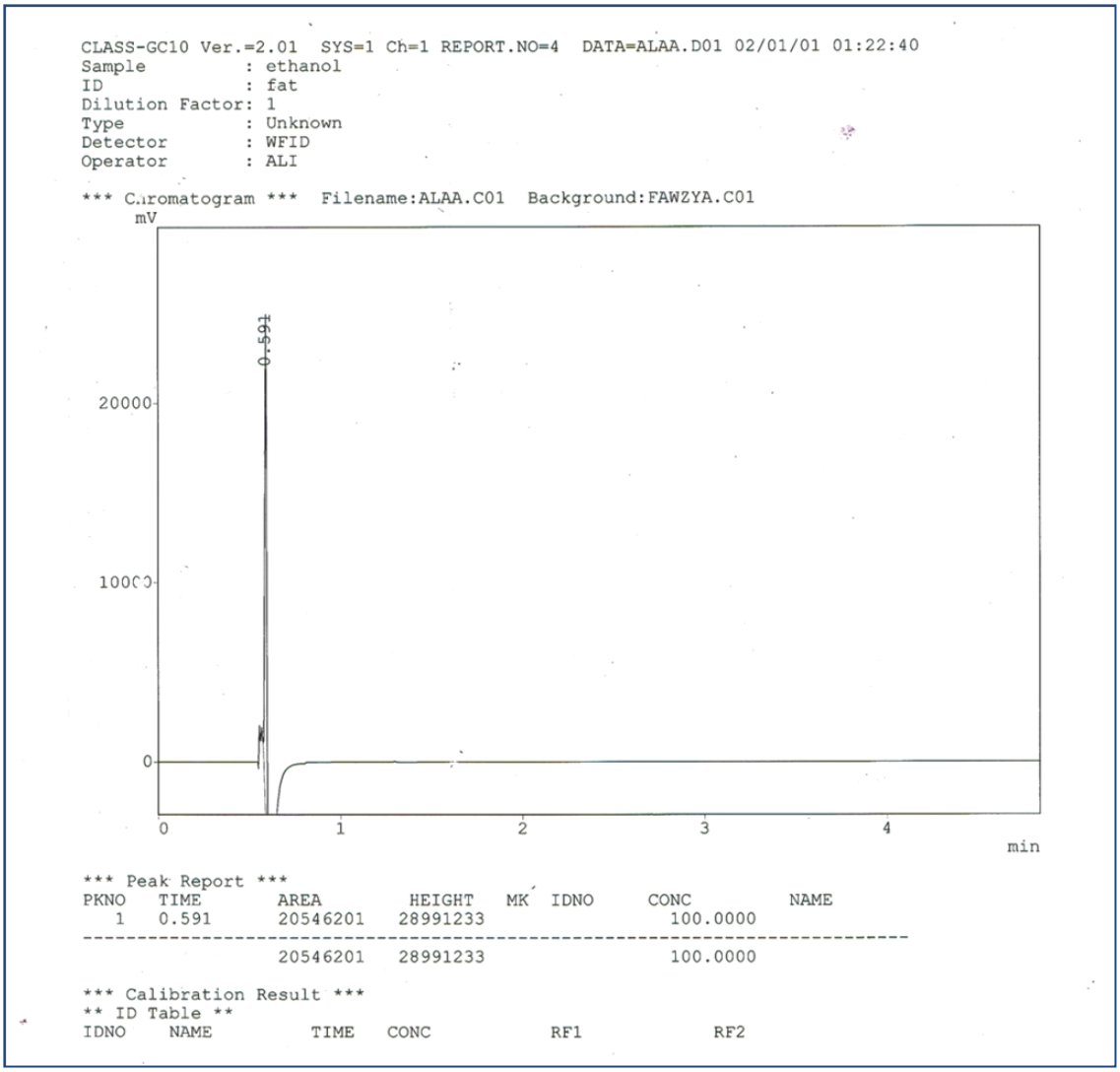
تركيز المغنيسيوم غم /لتر	ثاني اوكسيد الكاربون المتولد غم	ايثانول مول
0.0	**2.47**	**0.056**
0.5	**2.95**	**0.067**
0.75	**2.96**	**0.067**
1.0	**3.15**	**0.071**
1.25	**4.37**	**0.099**
1.5	**3.44**	**0.078**

مما سبق فان اضافة كلويد المغنيسيوم بتركيز 1.25 غم /لتر يحسن انتاجية الايثانول بعملية تخمر الدفعة الواحدة وعند مقارنتها بعملية التخمر المستمر ,فانها تختلف مع نتائج دراسة لانتاج الايثانول من التخمر المستمر بخلايا الخميرة *S.cerevisiae* المثبتة على الجينات الكالسيوم بان يدعم وسط التخمر باملاح كبريتات ا لمغنيسيوم $MgS0_4.7H_2O$ بتركيز 3.8غم /لتر مع املاح النحاس $CuSO_4.5H_20$ للحصول على اقصى انتاجية للايثانول من الوسط التخمير ي المكون من عصير الذرة 44.3غم /لتر واليوريا 2.3 غم /لتر و باستخدام مخمرات ذات تصاميم متقدمة، للحصول على حد اقصى من الانتاجية تصل الى 18.6% ح/ح ايثانول، ممايشير الى التأثير الايجابي لخليط من المدعمات من املاح المغنيسيوم والنحاس واليوريا بتراكيز مثلى اضافة الى توظيف التقنيات التخميرية المتطورة في تحسين انتاجية المخمرات حيث ان في تقنية التخمر المستمر يتم اضافة الوسط المغذي وسحب الناتج بصورة مستمرة وبذلك يتم المحافظة على فعالية الخلايا وحيويتها لأطول فترة ممكنة والتقليل من نسبة تكون الكتلة الحيوية وبالتالي خروجها مع المادة المنتجة خارج المفاعل الحيوي اثناء عملية تزويده بالوسط الغذائي، وبذلك يتم الاستفادة من الخلايا المثبتة على المواد الساندة لمدة قد تمتد لأسابيع في الإنتاج المستمر بدون تبديل [14،23]. في حين ان استخدام المغنيسيوم بهيئة $MgSO_4$ و بتركيز 2غم/لتر ضمن خليط من الاملاح كبريتات الزنك وZnSO4 كلوريد النحاس CuCL2 بتركيز 0.3 غم /لتر ,1ملغم /لتر على التوالي وفيتامين Ca-pantothenate 1 غم /لتر و inositol بتركيز 1 غم /لتر، هذا الخليط المدعم للتخمر يرفع فعالية التخمر 20% مقارنة مع وسط السيطرة للعينات غير المدعمة [24] .

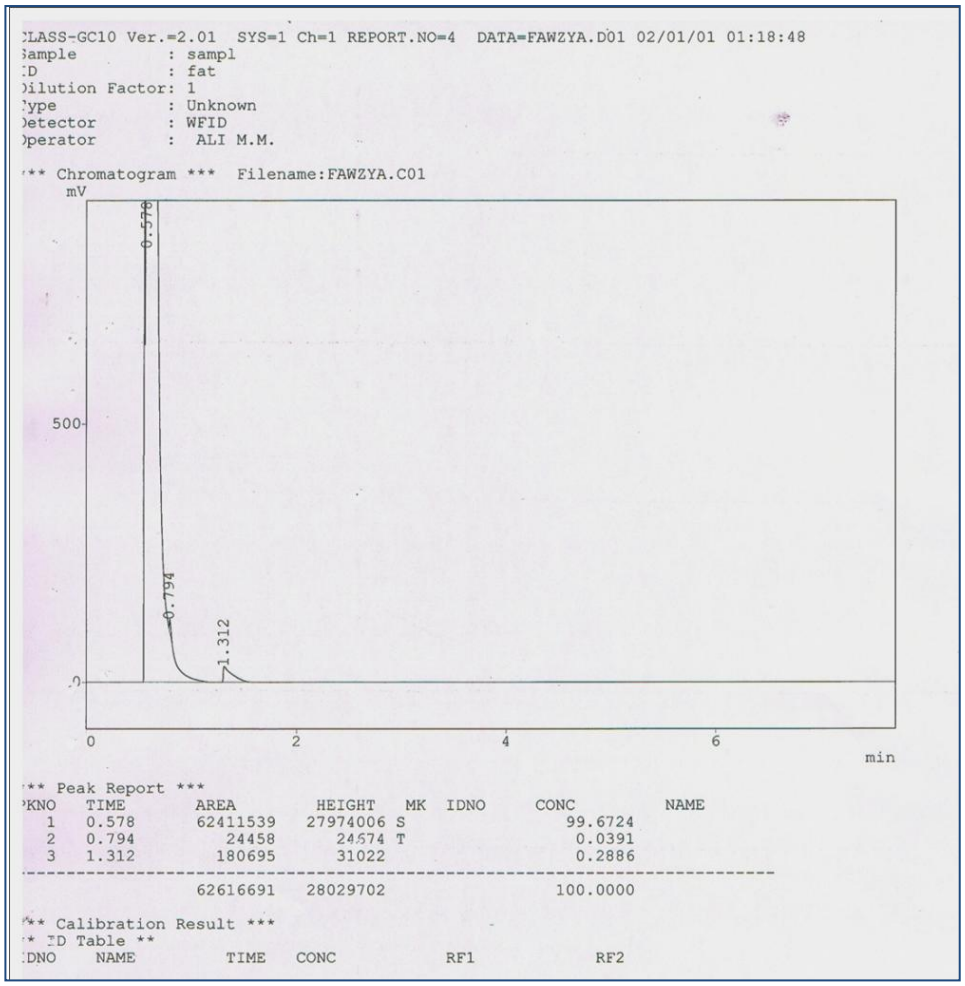
3- تشخيص الكحول المنتج

فحصت عينات من الكحول المنتج باستخدام جهاز الغاز كروماتوغرافي . يعتمد التحليل الكروماتوغرافي على اختلاف المواد عن بعضها عن بعض في ميلها للأمتزاز أو التجزئة أو التبادل خلال سطح مغلف بمذيب مناسب أو خلال مادة كيميائية . فيتضمن تحليل كرموتوغرافيا الغاز استخدا م غاز ناقل يقوم بحمل ابخرة المواد المحللة تبعا لدرجة غليانها وذلك بتمرير العينة في الحالة البخارية عبر عمود فصل يحتوي على وسط ساكن سائل أو مادة صلبة، فتتحرك مكوناتها بسرعات متفاوتة تبعاً لدرجة غليانها أو ذوبانيتها أو إدمصاصها. ويستخدم في هذا النمط الكروماتوجرافي وسط متحرك غازي وتدخل العينة عمود الفصل في الحالة الغازية أيضاً ومن هنا جاءت تسمية هذه

الطريقة بكروماتوجرافيا الغازات. وعندما يستخدم وسط ساكن سائل محمل على جسم صلب خامل تسمى الطريقة بالفصل الكروماتوجرافي للغازات بالتوزيع بين غاز وسائل GLC، وعندما يكون الوسط الساكن جسيمات مادة صلبة تسمى الطريقة بالفصل الكروماتوجرافي الإدمصاصي للغازات GSC. وبصفة عامة يجب أن تكون العينة المراد فصلها ثابتة تحت ظروف الضغط ودرجة الحرارة المستخدمة. وندخل العينة عادة بواسطة حقنها مباشرة عند قمة عمود الفصل من خلال سدادة مطاطية خاصة حيث يحملها الوسط المتحرك الغازي لتفصل على العمود وتصل مكوناتها المفصولة عند نهايتها ليكشف عنها بالكشاف المناسب. ويمكن توصيل الكشاف بمسجل تسجيل القمم الكروماتوجرافية الناتجة مباشرة. فحصت عينات من الكحول المنتج من الوسط التخميري المدعم بالم غنيسيوم وقونت مع عينة الكحول القياسي وكان زمن ظهور القمة لعينة الكحول القياسي وعينة الكحول المنتج من الوسط المدعم بالمغنيسيوم متقاربا وهي 0.591 و 0.570 على التوالي شكل (2،3).



شكل (2): مخطط عينة الكحول القياسي



شكل (3): مخطط عينة الكحول المنتج من الوسط التخميري المدعم بالمغنيسيوم

المصادر

1. Bai, F.W, Anderson, M., Young, M. M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnol. Adv. 26:89-105.
2. Farrel, A.E., Plevin, R. J,Turner, B.T.,Jones, A.D.O and Kammen, D.M. (2006). Ethanol can contribute to energy and environmental goals. Science. 311:506-508.
3. Walker, M.G. (1999). Yeast Physiology and Biotechnology, John Wiley & Sons. Canada.
4. 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.
5. Thanonke, P., Laopaiboon, P., Sootsuwan, K and Yamada, M. (2007). Magnisum Ions improve Growth and Production of *Zymomonas mobilis* under Heat or Ethanol Stress. Biotechnology. 6(1):112-119.
6. Aleksandar, P., PlotrTadeusz,T. and Makraewtcz, T. (2009). Accumulation and Release of Metal Ions by Brewer's Yeast During Successive Fermentation. J. Inst.Brew.115(1):78-83.
7. Blomberg, A. [2000]. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. FEMS Microbiol. 182, 1-8.

8. Mendes.A ,Leao.C .(2004). Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. Journal of Applied Microbology. 97:540-545

9. Trofimova,Y.Walker, G. (2010). Anhydrobiosis in yeast; influence of calcium and magnisium ions on yeast resistance to dehydration –rehydration FEMS. Microbiology Letters. 3039. (1):55

10. شلش، فوزية جاسم. (2011). تأثير الكالسيوم في الاستجابة للإجهاد الكحولي في الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*. مجلة مدينة العلم. (3)1:5-18.

11. Maueice, M.L. (2011). Factors Effecting Ethanol Fermentation Via Simultaneous Saccharification and fermentation Degree. Bachelor Science. Shanghai Jiao Tong University.

12. شلش، فوزية جاسم. (2010). انتخاب عزلة خميرة ذات انتاجية عالية من الايثانول الحيوي . مجلة بغداد للعلوم. [7] 1.354- 378.

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

14. 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.

15. Naoufel Cheraiti, Stephane Guezenec, and Jean, Michel Salmon. (2005). Redox Interaction between Saccharomyces uvarum in Mixed Culture under Enological Conditions. Appl Environ Microbiol, 71(1):255-260.

16. Slaa, J., Gnode, M. and Else, H. (2009). Yeast and fermentation: the optimal temperature. Journal of Organic Chemistry; Chem. Dut, Aspects. 134

17. Sablayrolles, J., MBarre, P. and Grenier, P. (1987). Design of laboratory automatic system for studying alcoholic fermentation in an isothermal enological conditions. Biotechnol Technol.1; 181-184.

18. Walker, G.M. and Duffus, J.H. (1980). Magnesium ions and the control of the cell cycle in yeast J. of Cell Sci. 42 (1): 329-356.

19. Francisco, B.P., Pedro, M.R., Guimar, J.A. (2010). Optimization of low –cost medium for very high gravity ethanol fermentation by *Saccharomycec cerevisiae* using statistical experimental designs. Bioresource Technology. 101:7856-7863.

20. kotarska, K., Czuprynski, B., Kosowski, G. (2006). Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation. J. Food Eng.77:965-971.

21. Rafael, A., Walter, B. [2009]. Influence of the accumlation of phosphate and magnesium ions in the yeast cells on the ethanol productivity in batch ethanol fermention. Braz.arch.biol.technol. 52 (1).

22. Braendstrup, C., Doderman,Y., lammertse, H.(2010). Yeast and Fermentation: the best monosaccharide for the production of ethanol. Ignatius Gymnasium, 5KC. April

23. Nikoli, S., Mojovic, L., Rakin, M. (2009). Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoid us*. Fuel. 88 (9):1602-1607.

24. Nikol, S. et.al. (2009). Improvement of ethanol Fermentation of corn Semolina Hydrolyzates with Immobilized Yeast by Medium Supplementation. Food Techol. Biotechol. 47(1)83-89.