تأثير ايونات الكالسيوم في الاستجابة للإجهاد الكحولي في الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*

إيمان هندي كاطع** ونبال خليل موسى***فوزية جاسم شلش* و فوزي رشيد العاني* و

و سناء خواش مايد**

* وزارة العلوم والتكنولوجيا – دائرة البحوث الزراعية.

** وزارة العلوم والتكنولوجيا دائرة تكنولوجيا وبحوث البيئة والمياه.

المستخلص:

الايثانول الحيوي التخميري يدخل في الصناعات الكيميائية المهمة إضافة الى استخدامه كوقود حيوي بديل عن الوقود الاحفوري والخميرة *Saccharomyces cerevisiae* الكائن المجهري التقليدي المستخدم في إنتاج الايثانول. تؤدي حساسية الخميرة للكحول المنتج الى قلة إنتاجيتها له وهذا البحث يحدد تأثير مستويات مختلفة من ايونات الكالسيوم في استجابة الخميرة *S.cerevisiae* المعزولة من مصادر محلية للاجهاد الكحولي. يتم بعد تحديد التركيز الأدنى المثبط والقاتل من الايثانول وتعريضها الى تراكيز مختلفة من الايثانول ٢ و ٤ و ٦ و٨ و ١٠ و١٢%. انتخبت العزلات المقاومة لاعلى تركيز ٨% ايثانول وبقياس النمو للعزلات من خلال قراءات الكثافة الضوئية بطول موجي ٦٠٠ نانومتر ولفترات تحضين ٢٤ و ٤٨ و ٧٢ ساعة وبوجود ايثانول ٨%. انتخبت العزلات التي اظهرت افضل نمو في فترات التحضين المختلفة و استخدمت في اختبار تاثير الكالسيوم حيث استخدمت تراكيز من ايونات الكالسيوم بهيئة كلوريد الكالسيوم فوجد ان مدى التركيز (١- ١.٢ ملي مول) له تاثيرات ايجابية في نمو الخميرة ومقاومتها للاجهاد الكحولي. وتتفاوت العزلات فيما بينها في تحديد التركيز الامثل لاحداث التاثيرات الايجابية ليتراوح بين (٠,٨- ١,٦ملي مول).

المقـــــدمة

ان الطلب المتزايد للايثانول لاستخدامه في مختلف الإغراض الصناعية كمصدر بديل للطاقة و صناعة المذيبات والمنظفات والمواد الحافظة ، استوجب زيادة انتاجة وتطوير عزلات تجارية ذات إنتاجية عالية (١،٢). ان الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* من أهم الكائنات المجهرية المستخدمة في الصناعات الحيوية وان تحملها للايثانول من الخصائص الأساسية لاستخدامها في التخمرات الحيوية (٣) 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 التخمر المشترك والمستمر لتحسين الإنتاجية على صعيد الإنتاج التجاري (٤،٥).

يسود الاعتقاد إن تحمل الخمائر للكحول يعتمد بدرجة كبيرة على المكونات التركيبية للأوساط المستخدمة في التخمرات الصناعية ، حيث إن بعض المكونات تؤدى إلى تحسين التحمل الكحولي واستمرار عملية التخمر مثل الأحماض الدهنية غير المشبعة والستيرول والبروتينات والأحماض الامينية والفيتامينات والايونات المعدنية كما ان الأوساط المعقدة مثل عصير الخرشوف والمدعمات المعقدة كطحين الصويا والببتون وجد أنها تحسن التخمر الكحولي بزيادة التحمل الكحولي ولغرض التحمل الامثل والتخمر الأمثل تتطلب الخميرة تراكيز متدنية Micro&millolarمن الايونات اللاعضوية المختلفة.وهذة العناصر Trace elements يمكن تصنيفها الى ثلاث اصناف :

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

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

٣- المثبطات Inhihibitors Ag^{+},As^{+2},Hg^{+2},li^{+},Ni^{+2} ,Pd^{+2} , (Se^{+4},Te^{+4})

وهذة العناصر تلعب دور مهم في تحديد الفعالية الانزيمية في الخمائر من خلال مشاركتها في التركيبة الانزيمية في المواقع الفعالة ودورها في الثباتية الانزيمية والمحافظة على القطبية السلبية للدهون الفوسفاتية في اغشية جدار الخلية (٦).

تتعرض الخمائر الى الاجهاد المختلف مثل الاجهاد الكحولي واجهاد الدرجات الحرارة العالية والضغط الازموزي الناجم من المنتجات والمواد السكرية في الاوساط التخميرية (٧،٨) . وتواجة دراسة الآلية الفيزيائية لسمية الأيثانول (ethanol toxicity) في خلايا الخميرة الكثير من الصعوبات بسبب تأثيراته المعقدة والمتعددة . حيث يؤدي إلى تثبيط معدل النمو والتخمر فضلاً عن تأثيره على حيوية الخلية .إنّ 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 (٩) , 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 (١٠,١١). 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, (٩).

أن الكحول الأثيلي 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 (١٢).

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 (٦). ان الايثانول والحرارة يؤديان الى زيادة نضوحية الايونات والمكونات الايضية وتثبيط انتقال المغذيات ،لذلك فان زيادة الثباتية الحرارية بوجود التركيز الامثل من ايونات الكالسيوم يزيد من تحمل الخلايا للايثانول في عملية التخمر(١٣) . وفي دراسة أثر الكحول الأثيلي في النمو والتخمر لبكتريا المنتجة للأيثانول Ethanologenic *Escherichia coli* ، أكد على ميكانيكيتين رئيسيتين في سمية الكحول . الأولى التثبيط المباشر في توليد الطاقة بعملية التخمر وتحلل السكر والثانية تحطيم الغشاء البلازمي بزيادة فقدان الجزيئات الصغيرة مثل المغنسيوم (١٤).

ان تحمل الخميرة للايثاول ليس حادث منعزل عن وانما حالة متداخلة ضمن مجموعة من الجينات في شبكة معقدة على مستوى جيني (١٥) 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 [١٦]. هناك جينات تظهر فعالية تحت ظروف الاجهاد وتنتج اوامر ومسارات انزيمية معينة مثل ROM2,BEM2,ADA2 (١٧).

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

المواد وطرق العمل

١. 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 التخافيف في العزل والتشخيص من جميع المصادر (١٨).

٢. إعداد المنحنى القياسي لحساب عدد الخلايا :- تعمل تخافيف 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.

٣. تحضير لقاح عزلات خميرة: تم تنشيط عزلات الخميرة بتنميتها على وسط مستخلص الخميرة المائل Yeast extract agar (YEA) حضر هذا الوسط بإضافة ٢٠غم/لتر من الاكار إلى وسط مستخلص الخميرة السائل. استعمل هذا الوسط لتنمية الخميرة على سطح صلب والحصول على مستعمرات منفردة. وتحضن لمدة يومين بدرجة حرارة ٣٠مْ، ويؤخذ مسحة من المستعمرات النامية لتلقيح ٥٠مل من وسط مستخلص الخميرة السائل (حضر هذا الوسط من إذابة ٥غم مستخلص الخميرة و ٣٠غم D.glucose في لتر ماء مقطر وضبط الاس الهيدروجيني ٤.٥ واستعمل هذا الوسط لتنمية الخميرة. وتحضن لمدة يومين بدرجة حرارة ٣٠ ^{o} م.

حساسية الخمائر للكحول الأثيلي:

طريقة قياس تركيز الكحول الاثيلي الادنى المثبط والقاتل للخميرة Minimum inhibitory and Lethal concentration (MIC) باستخدام وسط مستخلص الخميرة السائل ذو التركيز المضاعف . Double (DYEL) concentration yeast extract liquid حضر من إذابة ضعف مكونات وسط مستخلص الخميرة السائل في الحجم نفسه من الماء المقطر وزع في انابيب بحجم ٥ مل من كل انبوب واستعمل كوسط اساس عند قياس التركيز الادنى للكحول الأثيلي المثبط لنمو الخميرة. وذلك بأخذ أنابيب إختبار معقمة وضع فيها ٥مل مستخلص الخميرة السائل (DYEL) ذو التركيز المضاعف. اضيف اليها تراكيز متدرجة من الكحول الأثيلي واكمل الحجم إلى ٩.٩ مل بإضافة الماء المقطر المعقم. ثم لقحت الانابيب بـ ٠,١ مل من تخافيف مناسبة من لقاح الخمائر للحصول على $10^{6},10^{7}$ce11/ml. ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة ٣٠مْ لمدة خمسة ايام وقرأت النتائج يوميا. حيث عد اقل تركيز من الكحول الأثيلي ذلك الذي لا يعطي نموا ضمن سلسلة التراكيز المتدرجة من الكحول الأثيلي هو التركيز الادنى المثبط للنمو (19).

ولغرض التعرف فيما إذا كان التركيز المستعمل من الكحول الأثيلي قاتلا او مثبطا فقد تم نقل ٠.١ مل من الوسط الملقح بخلايا الخميرة والذي لم يظهر نموا بعد اربعة ايام إلى ١٠مل من وسط الخميرة السائل الخالي من الكحول الأثيلي وحضن الوسط بدرجة حرارة ٣٠مْ وتمت مراقبة النمو يوميا لمدة خمسة ايام.

تحضير أنابيب سيطرة للتركيز الادنى المثبط للنمو: (MIC control tubes)

أضيف أعلى تركيز من تراكيز الكحول الأثيلي المستعملة إلى أنابيب إختبار معقمة

تحوي على ٥ مل من مستخلص الخميرة واكمل الحجم بالماء المقطر لغاية ١٠ مل للتأكد من عدم تلوث المواد المستعملة. وللتأكد من
كفاءة المزرعة المعقمة لقحت انابيب الاختبار المعقمة المحتوية على ٥مل من مستخلص الخميرة السائل (YEL) بـ ٠.١ مل من التخافيف المناسبة للقاح الخمائر المستخدمة بعمر ٢٤ساعة واكمل الحجم بالماء المقطر المعقم إلى ١٠مل ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة ٣٠مْ مدة خمسة أيام.

غربلة العزلات: اجراء اختبار حساسية عزلات الخمائر لتراكيزمتدرجة من الكحول الاثيلي ٢ و ٤ و ٦ و٨ و ١٠ و١٢% وقياس التركيز المثبط ولقاتل للخميرة .

– قياس الكثافة الضوئية لاوساط نمو العزلات المنتخبة عند طول موجي 600 nm بفترات حضن 72 48, 24 ساعة.

– انتخاب العزلات المتحملة لاعلى تركيزكحولي ،وتهيئة وسط نمو مكون MgSO4.7H20(١غم /لتر)و 5غم/لتر (NH4) 2SO4 و KH2PO4 ٥غم/لتروكلوكوز ٣٥٠غم/لتر. ويدعم هذا الوسط بتراكيز متدرجة من الكالسيوم 0.4,0.8,1.2,1.6,2.0mM بهيئة كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$.

– قياس الكثافة الضوئية لاوساط نمو العزلات المنتخبة المدعمة بالكالسيوم عند طول موجي 600 nm .

النتائج والمناقشة

يظهر جدول ١ قيم تركيزالكحول الاثيلى الادنى المثبط والقاتل لنمو العزلات الخمائر المستخدم في هذه الدراسة في وسط (YEL) مستخلص الخميرة السائل حجم لقاح 10^6خلية / مل و 10^7 خلية / مل.فمن ٦٤عزلة اظهرت ٢٢ عزلة مقاومة ونمو بتركيز كحول ٧%عند استخدام لقاح حجم 10^6خلية / مل وبتركيز ٨% عند استخدام لقاح حجم و 10^7 خلية / مل وتتفق هذه النتائج مع ما جاء به الكثير من الباحثين (٢٠) بخصوص زيادة عدد الخلايا المستعملة في وسط التفاعل زيادة التركيز الادنى للمواد المثبطة للنمو والقاتلة عند زيادة حجم اللقاح انتخبت المجموعة المقاومة واستبعدت العزلات الحساسة (٢١).

اظهرت الفحوصات المجهرية لشرائح ماخوذة من تراكيز مختلفة من الايثانول تاثيره على العدد الكلي للخلايا من خلال مقارنتها بشرائح السيطرة.

جدول ١. التركيز الادنى المثبط والقاتل من الكحول الاثيلى لعزلات الخميرة.

عدد العزلات	cell/mL 107		cell/mL 106	
	المثبط %	القاتل %	المثبط %	القاتل %
١٧	٧	٨	٦	٨
٢٢	٨	٩	٧	٨
٢٥	٥	٧	٤	٦

المجموع ٦٤	

يعرف الايثانول بانه من المثبطات لنمو الاحياء المجهرية، حيث يحطم DNA الميتوكوندريا ويعطل فعالية بعض الانزيمات hexokinase وانزيم dehdrogenase (٢٢)، وعند مرور الايثانول عبر الخلايا يودي الى انكماشها بسب نضوب الماء وبالتالي موتها كما ان نضوب الماء يرافقه فقدان المعادن المهمة للخلية مثل الكالسيوم والمغنيسيوم وتقوم الخلايا بزيادة انتاج الكلسيرول في خطوة لتكيف تفادي نضوب الماء (١٦). على الرغم من ذلك اظهرت بعض العزلات مقاومة لتراكيز من الايثانول ٨% .حيث شخصت العديد من الدراسات تكيف الخميرة للاجهاد الكحولي من العلاقة بين المحتوى الدهني للاغشية الخلوية ومقاومتها للايثانول فلوحظ زيادة محتوى الاغشية من الاحماض الدهنية الغير مشبعة عند تعرضها للايثانول [٢٣]. كما وجد ان العزلات المقاومة للاجهاد الكحولي تظهر كذلك مقاومة للاجهاد من انماط اخرى مثل الاجهاد بسب الضغط الازموزي والتاكسدي والحرارة.

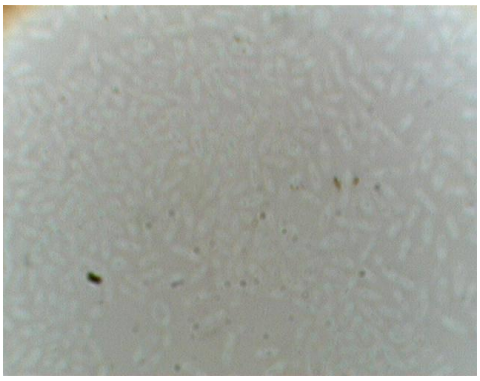
دراسة تاثير الايثانول بفترات النمو المختلفة:

بعد الغربلة الاولية للعزلات بتحديد التركيز الادنى المثبط والقاتل تم انتخاب (٩) عزلات لاجراء غربلة ثانوية بتعريضها لتراكيز متدرجة من الايثانول وبفترات الحضن المختلفة.

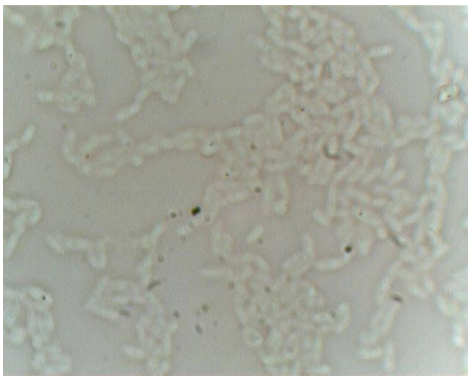
١. تاثير تراكيز الايثانول لفترة حضن ٢٤ساعة:

يظهر شكل ١ ان جميع العزلات المنتخبة تتأثر بادنى التراكيز من الايثانول ٤%. في حين اظهرت العزلة رقم (٤) و العزلة (٩) المعزولة من الخل ومن عصير الحليب على التوالي قيم نمو متفوقة عند تركيز ٨% . أنّ الايثانول المضاف إلى الوسط الزرعي أقل سمية من الايثانول المنتج من قبل الخلايا في عملية التخمر . وان تجمع الكحول الأثيلي داخل خلايا الخميرة *S. cerevisiae* يؤدي إلى قتلها باعداد كبيرة(٢٤) .

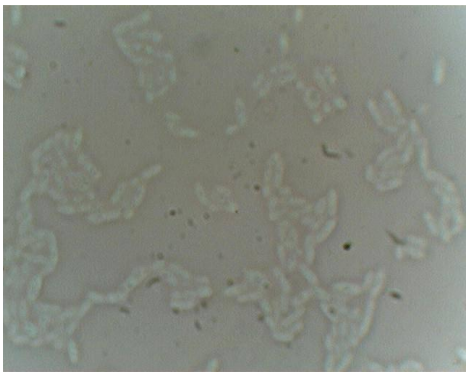
٢. **تأثير تراكيز الايثانول لفترة حضن ٤٨ ساعة:** واظهرت العزلة (٤) والعزلة (٧) المعزولة من الخل والخيارعلى التوالي قيم نمو متفوقة بوجود ايثانول تركيز ٨%.كما يلاحظ ان في الفترة ٤٨ساعةافضل فترة حضن للحصول على اكبر كتلة حيوية[٢٥]، اظهرت جميع العزلات قيم نمو وكتلة حيوية عنها في الفترتين ٢٤ و٧٢ساعة ويعزى ذلك الى حجم اللقاح المستخدم ومكونات الوسط الغذائية ومعدل استهلاكها من قبل الخميرة وعلاقة ذلك بزمن الجيل للخميرة (٢٦).



شريحة السيطرة

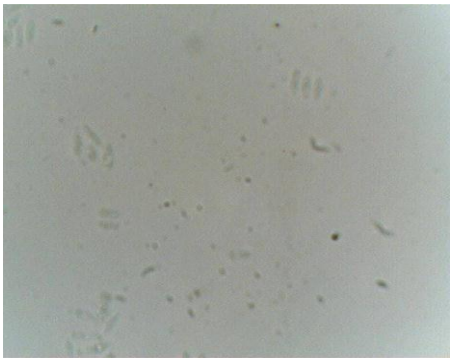


شريحة مجهرية لنمو الخميرة بوجود ٤% ايثانول

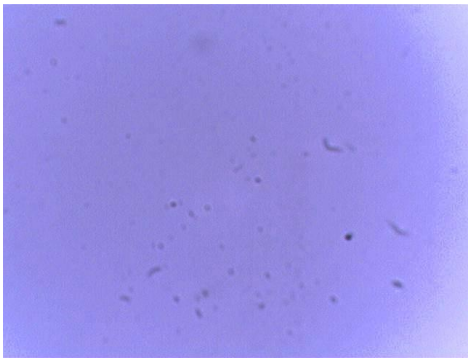


يثانول ٦%

ايثانول ٨%

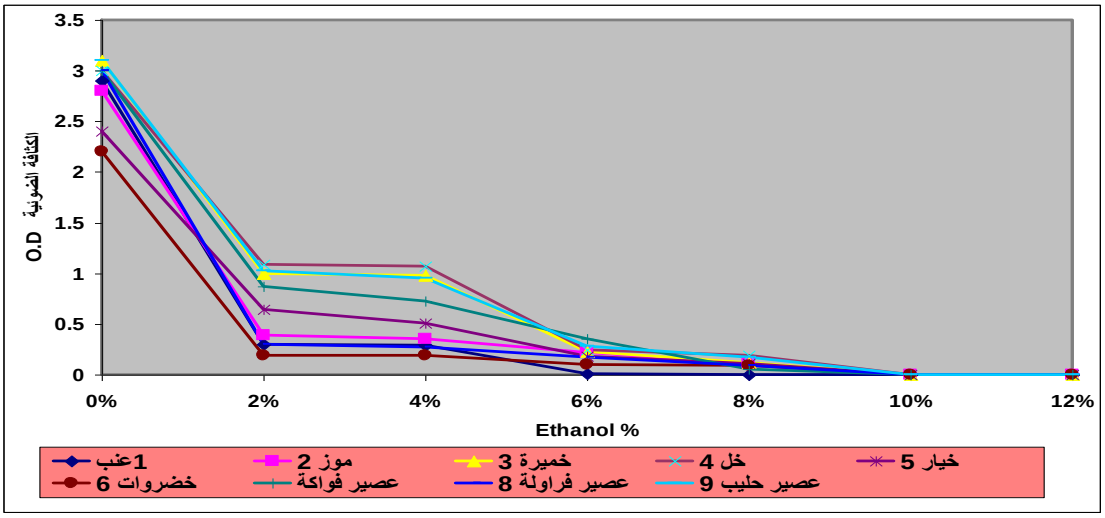


ايثانول ١٠%



ايثانول ١٢%

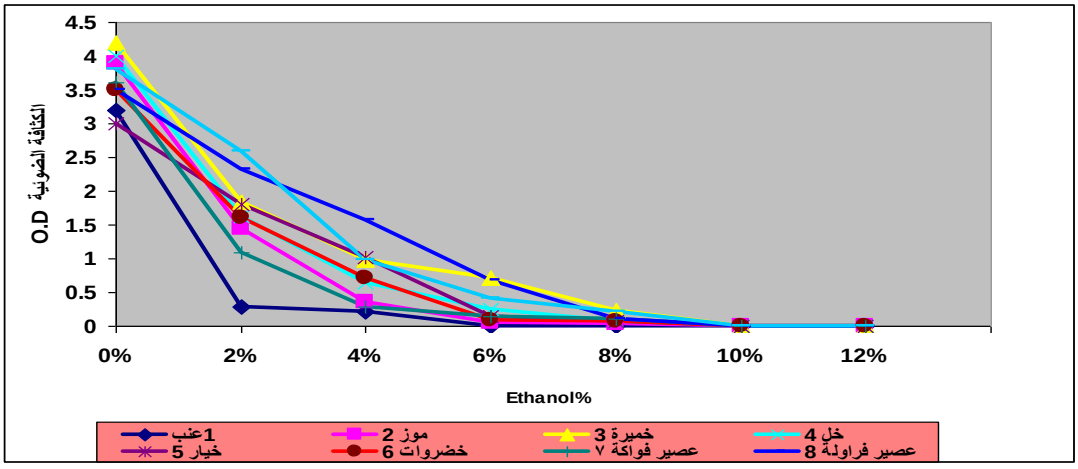
شكل ١. تاثير الايثانول على العدد الكلي لخلايا الخميرة في الشرائح المجهرية.بوجود تراكيز متدرجة من الايثانول.



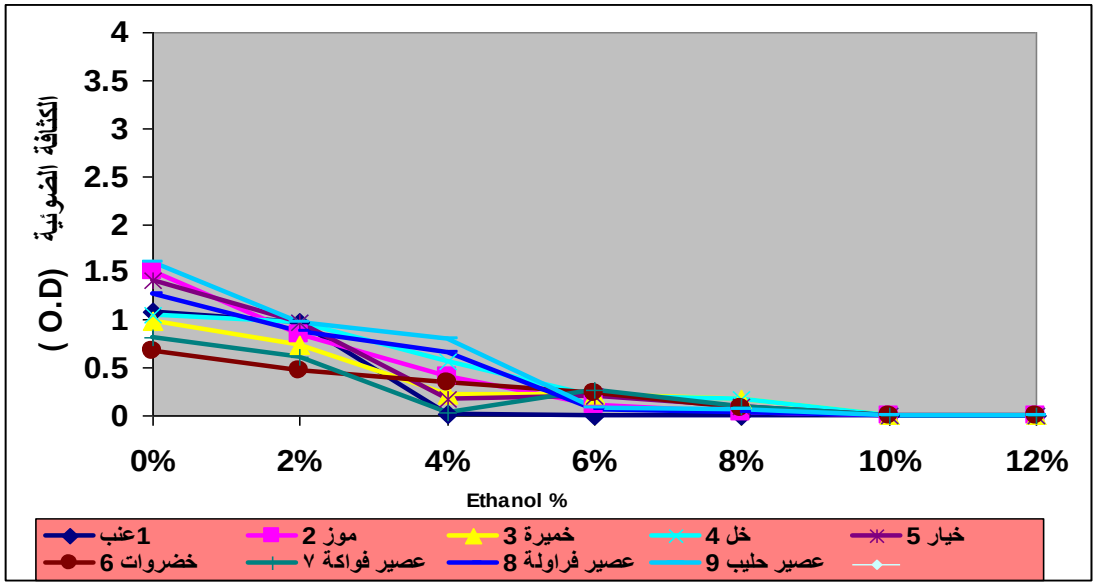
شكل ٢. تاثير تراكيز الايثانول في فترة حضن ٢٤ ساعة

تاثير تراكيز الايثانول لفترة حضن ٧٢ساعة:

اظهرت العزلة (٣) والعزلة (٤) والعزلة (٩) المعزولة من الخميرة والخل وعصير الحليب على التوالي قيم نمو متفوقة في تركيز كحول ايثانول ٨%. بينت العديد من الدراسات ان الفترة ٧٢ ساعة هي الفترة المثلى للتخمر ولكنها ليست كذلك لنمو الخميرة او الحصول على كتلة حيوية من الخميرة (٢٥) موضح في شكل ٤.



شكل ٣. تاثير تراكيز الايثانول في فترة حضن ٤٨ ساعة.



شكل ٤. تاثير تراكيز الايثانول على نمو الخميرة في فترة حضن ٧٢ ساعة.

تاثير اضافة مستويات مختلفة من ايونات الكالسيوم في الاستجابة لتاثير الايثانول على نمو الخميرة:

انتخبت العزلة (رقم ٤) لدراسة تاثير ايونات الكالسيوم لكونها اظهرت مديات نمو اقصاه في تركيز ١.٦ mM للعزلة ٤ المعزولة من الخلية.

تحتاج خلايا الخميرة للمعادن في ايض وثباتية الانزيمات وبالتالي تحقيق التخمر الامثل. فقد شخصت حاجتها من الكالسيوم للمساعدة في تحفيزالنمو ونضوحية 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 تاثير الايثانول على نمو متفوقة في كل فترات الحضن المختلفة ،وعند اضافة مستويات من الكالسيوم (٠,٤-٢,٠) mM وجد ان التركيز ١.٢ mM اظهرت ارتفاعا في قيم النمو ليصل الى

الخلايا وقابلية التخمر وحيوية الخلايا في المزارع .فمن اهم الخطوات متابعة فعالية انزيم invertase وهو من الانزيمات الخارجية المسؤولة عن تحويل السكروز من وحدات ثانوية كلوكوز وفركتوز (٢٦). وعند استخدام عزلة (٣) المعزولة من الخميرة الجافة ولنفس التراكيز من الكالسيوم ولفترة حضن ٢٤ ساعة وجد ان التاثير يظهر عند تركيز 0.8 mM ليبلغ اقصاه عند تركيز 1.2 mM. ان الاختلاف في مديات التركيز الامثل لاحداث التاثيرات الايجابية على االنمو يعود الاختلاف الى قابلية الخميرة على تحمل الاجهاد الكحولي

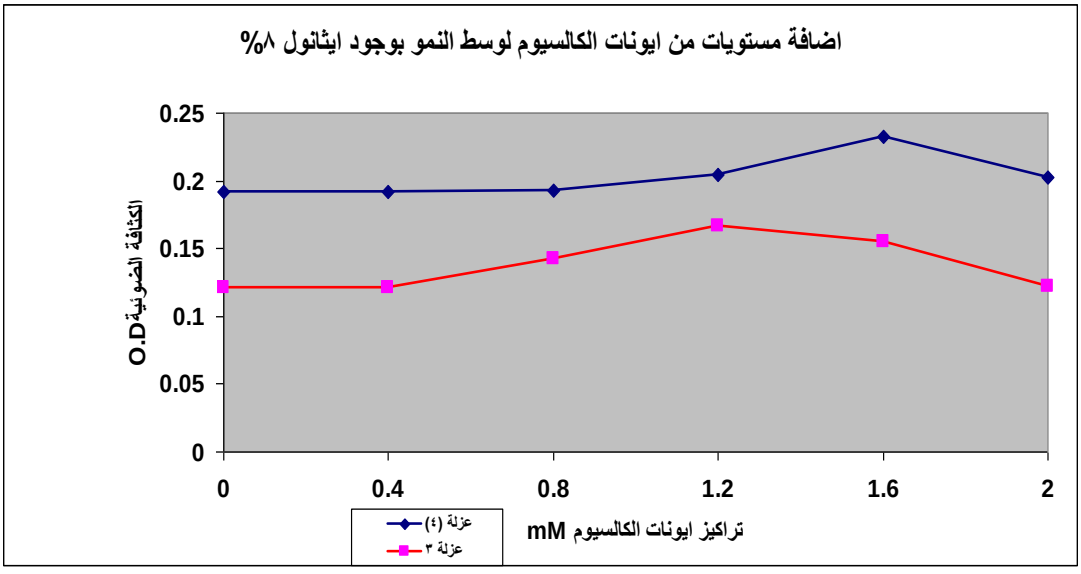
ضمن نفس الجنس *Saacharomyces cerevisiae* .

الخمائر المقاومة لها القدرة على تطويل فترة التخمر وانتاج المنتجات بوجود الايثانول اضافة الى اظهار مقاومة للاجهادات من الانواع الاخرى . و للحد من التأثير السمي للكحول الأثيلي 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 التخمر(٢٧).

تزداد مقاومة الخميرة *S. cerevisiae* لسمية الكحول الأثيلي 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 المشعة مثل حامض البالمنيك (16:0 Palmitic acid) (٢٨,٢٣) .

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 والألديهايدات والمركبات الفينولية كما تلجأ الخميرة *S. cerevisiae* إلى زيادة تخليق انزيم Superoxide dismutase Mitochondrial استجابة إلى تأثيرات الكحول الأثيلي (٢٩) .

ان تاثير 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 ٠ (0-0.72% v/v) من الكالسيوم بهيئة كلوريد الكاليسيوم تقلل من انتاج الايثانول عند وجود كلوكوز ٢٠% (٣٠، ٣١).



شكل ٥. تاثير اضافة مستويات من ايونات الكالسيوم على نمو الخميرة *S. cerevisiae* بوجود ايثانول ٨%.

Influence of calcium ions on alcohol strees 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 come 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 determent by optical density at 600 nm to incubator period 24,48,72 h with ethanol 8%. Selected isolates which appeared best growth in deferent 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 alchol strees the isolates deffernt between them in evaluate the optimal concentration to make positive effect in rang (0,8 – 1,6 mM) .

المصـــادر

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 O ct 12 ; 144(1) :23-30.

٤. شلش، فوزية جاسم . (٢٠٠٣) . 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 Pl,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 Membrance Lipid composition and Ethanol Tolerance in Saccharomyces Cervisiae "; 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 cervisiae 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 engereeing .Sheng Wu GONG Cheng Xue Bao.2009 Apr: 25 (4): 481-7.
16. Tan N, Nagahise K,Shimzu H.(2006). Responses of defferent strains of Saccharomyces cerevisiae to Osmotic stress.Sains Malaysiana 35 (2);9-15.
17. Takahashi T, Shimoi H, IT k. (2001).Identification of genes reguired for growth under ethanol stress Using transposon mutagenesis in Saccharomyces cerevisiae .Mol Genet GENOMIC .2001;265;1112-119.
18. 18- 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.

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 inuitro activity of new Cephalosorians against Haemphilus species. Antmicrob . Agents and chemothorpyl 7:393-396.

21. Siquera PF,Karp SG, Carvaiho JC,Sturm W.(2008) Production of bio-ethanol from soybean molasses by Saccharomyces cerevisiae at laboratorya,pilot and industrial scales.Bioresour Technol . Nov;99(17):8156-63.

22. Osho A. (2005) .Ethaol and sugar tolerance of wine yeasts isolaled form fermentation Cashew apple juice . African ,J Biotechnol .2005;4:660-662.

23. You KM,Rosenfield CL,knippple Dc, (2003) .Ethanol tolerance in the yeast Saccharomyces cerevisiae is depent on cellular oleic acid content . Appl. Environ Microbial 2003:69:1499-1503.

24. Nagodawithana T. W. and Steinkraus K. H. (1976); "Influence of the rate of ehanol production and Accumulation on the viability of Saccharomyces cerevisiae in Rapid fermentation" , Appl. Environ Microbiol. 31:158-162

25. Periyasay S, Venkatachlam S. (2009) Production of Bioethanol from sugar molasses Using Saccharomyce cerevisiae, Modern Applied Science vol. 3, No.8, August 2009.

26. Snyder C, Lngldew M. Nutrion in Fermention .TECHNICAL PROFIL. May 2009 .BIOFUEL BUSINESS

27. 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.

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

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