

الخميرة لإنتاج الإيثانول كوقود

Yeasts for production of fuel ethanol

(١، ٤) مقدمة Introduction

إن أحد الحلول الجزئية لمواجهة الحاجة المتزايدة من الطاقة، وارتفاع أسعار البترول، والتوافق مع قوانين البيئة التي تهدف إلى الحصول على هواء نظيف هو البحث عن مصادر جديدة للطاقة، ولذلك فقد ازدادت في السنوات الأخيرة، الأبحاث الخاصة باستخدام الخميرة في إنتاج كحول الإيثانول ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)، بغرض استخدامه كوقود. وقد أتاح هذا المصدر الجديد للوقود الفرصة أمام المزارعين لتنويع اهتماماتهم، وتوفرت أسواق جديدة للحبوب الفائضة، وازدادت أسعارها بعد ما أصبحت مواد خام لإنتاج الإيثانول، بغرض مزجه مع البنزين ليستعمل كوقود لوسائل النقل.

يعتبر إنتاج الإيثانول بغرض استخدامه كوقود مجالاً جديداً من مجالات التكنولوجيا، حيث أن الإنتاج الكلي من الإيثانول في أستراليا على سبيل المثال يبلغ حوالي ١٣٥ مليون لتر إلا أن حوالي ٥٠ مليون لتر منها فقط مستعملة للمزج بالبنزين، لتستعمل كوقود لوسائل النقل، علماً بأن هذه النسبة تقل عن ذلك كثيراً في معظم بلدان العالم بل إن هناك بلاد لم تبدأ بعد في تنفيذ هذا النظام.

وقد ظهرت في الأشهر الأخيرة من سنة ٢٠٠٢م، تعليقات سلبية كثيرة خاصة باستعمال الإيثانول كوقود، وركزت هذه التعليقات على ادعاءات الضرر الذي يمكن أن يحدث لمحركات وسائل النقل من جراء استعمال المزيج المحتوي على أكثر من ١٠ بالمائة إيثانول. لكن الدراسات التي كلفت الحكومة الأسترالية عدد من المختصين بإجرائها في سنة ٢٠٠٤م، أكدت أن استعمال الإيثانول كوقود يتضمن منافع بيئية وتطوير للصناعات الإقليمية، وأن مصادر المواد الخام اللازمة لتصنيعه متوافرة ومتجددة، وبالنسبة لمحركات السيارات فلا يحدث لها أي ضرر كما أنها ليست بحاجة إلى أي تعديل عندما يستعمل البنزين مع الإيثانول بحدود ٢٤٪.

وعلى ذلك فقد أصبح هناك عدد كبير من الولايات في أمريكا يخلط الإيثانول بنسبة ١٠٪ مع الجازولين (بنزين) للاستعمال كوقود للسيارات، وفي البرازيل يضاف الإيثانول بنسبة ٢٤٪ مع البنزين.

ومن المتوقع أن تزداد في المستقبل نسبة الإيثانول المضافة للبنزين حتى تصل إلى ١٠٠٪. وقد بدأت الآن برامج لإنتاج الإيثانول كوقود في كثير من البلدان مثل أستراليا، نيبال، كولومبيا، بولندا، السويد الخ.

وفي الماضي كان نجاح المصانع التي تنتج الإيثانول كوقود، يتأثر بنقص المعلومات عن أي مشكلة تواجه المنتجين، ونقص المعلومات عن اقتصاديات عملية الإنتاج، كما كان يتأثر بعدم وجود تدريبات بيولوجية للفنيين، وبعدم القدرة على استعمال الإيثانول إلا إذا كان نقياً. كذلك فإن تداول منتجات هذه المصانع وطرق تخزينها كانت من الصعوبات التي تواجه عمليات الإنتاج. وقد فشلت مصانع كثيرة بسبب سوء تصميم المعمل ونقص المعرفة البيولوجية والتقنية الخاصة بعملية الإنتاج.

أما الآن فإن الوضع أصبح مختلف، بعد أن بدأت الدول الكبرى في اتباع برامج مطورة لإنتاج الإيثانول كوقود.

ورغم أن معظم طرق إنتاج الإيثانول على مستوى تجاري المتبعة الآن ما زالت طرق قديمة ومعروفة منذ أكثر من ٦٠ سنة ماضية، إلا أن الدراسات الاقتصادية التي أجريت على محاصيل الحبوب مثل الذرة أوضحت أن استخدامها في إنتاج الإيثانول يعتبر عملية مربحة. وقد أظهرت هذه الدراسات أن اقتصاديات إنتاج الإيثانول تتوقف تنازلياً على تكلفة المادة الخام، قيمة المنتجات الوسيطة المصاحبة للمنتج الرئيسي، سعر الإيثانول المنتج، تكاليف الطاقة، الأيدي العاملة، وأسعار المواد المنافسة مثل البترول ومشتقاته.

وعلى أية حال فإن هناك ثلاث اعتبارات هي التي تؤثر إلى حد بعيد على نجاح عملية إنتاج الإيثانول عند تطبيق التقنيات التقليدية وهي:

- كفاءة تحويل السكر إلى إيثانول.
- كمية الطاقة المستهلكة.

- التحكم في المخلفات الناتجة من ناحية حماية البيئة من التلوث.

ويتوقع العلماء أن يستمر تصاعد إنتاج الإيثانول عن طريق التخمر، وذلك بعد تطبيق التقنيات الحديثة في عملية الإنتاج التي تقلل من تكلفة الإنتاج، كما أن استمرار زيادة أسعار البترول هي سبب آخر من أسباب اعتقاد العلماء بذلك.

وهناك جانب من المهتمين بإقامة مصانع جديدة والممولين لأبحاث إنتاج الإيثانول، يعتقدون أن إنتاج الإيثانول من الحبوب أصبح عملية معروفة بشكل جيد وأنه لا يوجد تقدم يمكن انتظاره في هذه النقطة. وهذا بعيد تماماً عن الحقيقة، وذلك

لأن الأبحاث في مجال هندسة إنتاج الإيثانول، والتحليل الإنزيمي للمواد الخام قبل تخميرها، والتخمير، والتقطير، والاستخلاص، ومدى استهلاك الطاقة، ومعالجة المخلفات السائلة والغازية، وكيفية استثمار التواتج الوسيطة ما زالت تملأ المجالات العالمية، وما زالت تأتي بجديد كل يوم.

وتقع المسؤولية على عاتق وزارات الصناعة التي يجب أن تنسق مع المهندسين، والعلماء، للتأكد من أن تصميم الأدوات المساعدة الجديدة التي يتم إدخالها على مصانع إنتاج الإيثانول، قد تم بشكل جيد، كما أنها مسؤولة الحكومات والمنظمات العلمية أن تتأكد أن أبحاث تقنية تحويل الحبوب إلى إيثانول يجب أن تستمر لتتحول إلى تقنيات تستخدم مستقبلاً لتحقيق حلم البشرية، ألا وهو تحويل السليولوز إلى إيثانول.

(٤٠٢) المواد الأولية Substrates

إن صلاحية أي مادة لإنتاج الإيثانول تعتمد على توفرها بسعر اقتصادي، ونوع وتركيز المواد الكربوهيدراتية بها، ومدى سهولة مهاجمتها بواسطة الميكروبات، ونوع المواد الوسيطة التي يمكن أن تنتج مع الإيثانول. وينتج الإيثانول المستعمل وقوداً لوسائل النقل حالياً بصورة تجارية من سكر القصب (والدولة الرائدة في هذا ذلك البرازيل) أو من الذرة (في الولايات المتحدة الأمريكية). وهناك اختلاف كبير بين المواد الأولية وذلك بالنسبة لاحتوائها على السكريات القابلة للتخمير كما يتضح من الجدول رقم (٤٠١).

الجدول رقم (٤٠١). إنتاج العالم من المحاصيل التي يمكن أن تكون مواد خام لإنتاج الإيثانول.

المحصول	إنتاج العالم (مليون طن / سنة)	السكريات القابلة للتخمير (%)
قصب السكر	١٠٣٢٤	١٣
الذرة السكرية	-	١٤
بنجر السكر	٢٤٩	١٥
الذرة الشامية	٧٢١	٧٤-٦٧
القمح	٦٢٧	٦٥-٦١
الأرز	٦٠٥	٧٦
الشعير	١٥٤	٦٤-٦٠
الكاسافا	٥٠٠	٣٠
خرشوف القدس	-	١٧
البطاطس	٣٢٨	١٨
البطاطا	١٩٠	٢٧
البطاطا الحلوة	٤٠	٣١-١٦

المصدر: بيانات سنة ٢٠٠٤ م لمنظمة الأغذية والزراعة (الفاو)

(٤,٢,١) السكريات Sugars

للخمائر قدرة عالية على استخدام سكريات مختلفة لإنتاج الإيثانول تناولها فيما

يلي :

Sugar cane قصب السكر (٤,٢,١,١)

قصب السكر محصول استوائي هام، يتطلب درجة رطوبة عالية ودرجة حرارة عالية نسبياً (٣٥°م)، ولذلك فإن نجاح زراعته يكون قاصراً على جهات محدودة في العالم. يبلغ الإنتاج العالمي من قصب السكر حوالي ٦٠ مليون طن سنوياً، ويزيد إنتاج الهكتار عن ٢٠٠ طن سنوياً، ويمكن أن يصل محصول الإيثانول إلى ٧٠-٩٠ لتر/طن. يحتوي عصير القصب على ١٢-١٦٪ سكر، ولذلك فإن كل طن من القصب يحتوي على حوالي ١٢٥ كجم سكر. أما المخلفات الصلبة، بعد استخلاص العصير والتي تعرف بالمصاصة Bagasse، فإنها تنتج بمعدل حوالي ٢ كجم من المصاصة لكل كجم سكر يتم إنتاجه وتستخدم في صناعة الورق أو قد تستخدم كوقود للغلايات داخل مصانع السكر.

ورغم أن قصب السكر يزرع أساساً لإنتاج السكر والمولاس، إلا أنه أيضاً مفضل جداً كمادة أولية لإنتاج الإيثانول، حيث ينتج عنه عصير يحتوي على مكونات مرغوبة جداً لإنتاج الكحول، كما أن محصول القصب يمكن أن يستمر حصاده على مدار فترة طويلة من السنة، وذلك بسبب طول موسم النمو.

يمكن أن يستخدم عصير القصب مباشرة أو المولاس المتخلف عن صناعة السكر في إنتاج الكحول. ويتم تحضير عصير القصب عن طريق الاستخلاص بواسطة العصر الميكانيكي، ثم غسيل المواد الصلبة بالماء الساخن، ثم العصر مرة أخرى، ويتم تكرار ذلك حوالي خمس مرات. بعد ذلك يتم الترويق باستخدام هيدروكسيد الكالسيوم وحامض الكبريتيك لترسيب المكونات غير العضوية فينتج

عن ذلك سائل لزج لونه أخضر يحتوي على حوالي ١٣٪ سكروز. ويمكن عن طريق التبخير زيادة تركيز السكر في العصير واستخدامه مباشرة في إنتاج الكحول. والعيب الرئيسي في استخدام العصير كمادة أولية لإنتاج الكحول هو عدم ثبات خواصه عند تخزينه لفترة طويلة.

أما المولاس فهو عبارة عن المخلفات غير المتبلورة المتبقية بعد بلورة السكر من عصير القصب. ويتكون المولاس من سكروز وجلوكوز وفركتوز لتعطي كربوهيدرات بتركيز كلي من ٥٠ إلى ٦٠٪ (وزن|حجم). ويمكن بسهولة تخزين المولاس لفترات طويلة، وقبل استخدامه يخفف إلى التركيز المطلوب. وعالمياً يعتبر المولاس أكثر المواد السكرية استخداماً لإنتاج الإيثانول وخصوصاً في البلاد التي لا يوجد فيها أسواق منظمة لعلائق الحيوانات (حيث أنه أحد مكونات العلائق الهامة) ولكنه لا يستخدم بدرجة كبيرة في البلاد النامية. ولا توجد مصانع لإنتاج الإيثانول من المولاس في الولايات المتحدة الأمريكية وذلك لأن كمية المولاس المنتجة سنوياً تكفي فقط لإنتاج ١٢٠ ألف متر مكعب من الإيثانول ولذلك فإن سعره لا يناسب استخدامه كمادة خام لإنتاج الإيثانول في الولايات المتحدة الأمريكية.

وعلى الرغم من أن المولاس يحتوي على كثير من المواد الضرورية لنمو الخميرة ، كما يحتوي على حوالي ٣-٦٪ بروتين إلا أنه غالباً ما يكون به نقص في المواد النيتروجينية القابلة للتمثيل بواسطة الخميرة، ولذلك تضاف أيونات الأمونيوم، أو اليوريا، أو بعض الأحماض الأمينية أثناء عملية الإنتاج. كما يضاف الفوسفور

والكبريت عادة كجزء من الإضافات النيتروجينية أو في صورة أحماض لضبط الـ pH إلى رقم ٥ وذلك لتقليل نمو الميكروبات الملوثة لبيئة التخمر.

وهناك اختلاف كبير في تركيب المولاس من مكان إلى آخر. ويحتوي المولاس أحياناً على مواد مختزلة غير قابلة للتخمر بواسطة الخميرة، حيث وجد العلماء أن بعض أنواع المولاس تحتوي على ١٧٪ سكريات غير قابلة للتخمر نتيجة درجة الحرارة العالية أثناء عمليات التبخير في صناعة السكر ونتيجة استمرار تفاعل ميلارد Maillard reaction (وهو تفاعل السكريات مع الأحماض الأمينية) أثناء التخزين.

(٤٠٢، ١٠٢) بنجر السكر وبنجر العلف Sugar beets and fodder beets

تنمو محاصيل بنجر السكر وبنجر العلف في كل من المناطق ذات المناخ الاستوائي، والمناخ المعتدل. وإنتاج الهكتار من بنجر السكر وبنجر العلف، حوالي ٤٠-٥٠ طن، و ٥٠-١٠٥ طن، على الترتيب. ويتج عن كل طن من بنجر السكر ١٤٠-١٩٠ كجم سكر، و ٧٠-١٠٠ كجم من المواد السليولوزية الجافة، التي تستخدم في تغذية الأبقار والأغنام، وحيوانات أخرى. يحتوي بنجر العلف من السكر أقل بالمقارنة مع بنجر السكر، ولكن ارتفاع كمية المحصول لكل هكتار من بنجر العلف بالمقارنة بمحصول بنجر السكر، تعوض انخفاض نسبة السكر في بنجر العلف. عصير كل من بنجر السكر وبنجر العلف، غني بالعناصر الغذائية، وليس من الضروري التدعيم بأية عناصر غذائية للمحصول على تخمير ذو كفاءة عالية. ويمكن أن يكون إنتاج الإيثانول من كل هكتار من بنجر السكر أو بنجر العلف يفوق

إنتاج هكتار الذرة بنحو خمسة أضعاف. وهذا يبين مدى أهمية التركيز على زراعة هذه المحاصيل، بغرض إنتاج الإيثانول، خصوصاً بنجر العلف الذي يكاد ألا يكون معروفاً بالنسبة لمزارعي البلاد العربية. وقد استخدم عصير بنجر العلف المنتج في أيرلندا كمادة خام لإنتاج الإيثانول ووجد أنه يحتوي على حوالي ١٥٪ سكريات سهلة التخمير جداً بواسطة الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* التي أمكنها أن تخمر كل السكريات إلى إيثانول في خلال ٣٦ ساعة فقط (Zayed and Foley, 1987).

ينتشر بنجر السكر بدرجة أكبر من قصب السكر حيث تناسبه ظروف بيئية متباينة وأنواع كثيرة من الأراضي مما ساعد على نجاح زراعته تقريباً في نصف الولايات المتحدة الأمريكية، وأوروبا وأفريقيا وأستراليا ونيوزيلندا. وكما هو الحال في قصب السكر ينتج عن بنجر السكر كميات كبيرة من المولاس الذي يحتوي على سكريات كلية بتركيز ٤٨-٥٢٪ ويحتوي على كميات كافية من النيتروجين ومن باقي العناصر الغذائية العضوية وغير العضوية حتى أنه قد لا يلزم إضافة أي عناصر غذائية قبل التخمر. وفي نيوزيلندا استخدمت الهندسة الوراثية في إنتاج صنف جديد من بنجر العلف، إنتاجية وحدة المساحة منه بالنسبة للكربوهيدرات القابلة للتخمير تفوق نظيرتها في بنجر السكر كما أن السكر في هذا النوع من البنجر له مقاومة عالية ضد التحلل عندما يتم تخزينه لفترات طويلة.

(٤،٢،٢) النشا Starch

إن تحويل النشا إلى محاليل سكرية ودكستريانات أو عصائر، يعتبر الأساس بالنسبة للحصول على مصدر للكربون في عمليات التخمر. وفي الماضي كان الحصول

على محاليل النشا يتم عن طريق التحليل بالحامض إلا أن التحليل الإنزيمي أصبح هو السائد الآن نظراً لأن له عدة مميزات بالمقارنة بالتحليل الحامضي وهذه المميزات تتلخص فيما يلي:

- التحليل الإنزيمي ينتج عنه نواتج وسطية أقل بالمقارنة بالتحليل الحامضي.
- الإنزيمات متخصصة ولذلك فإن النواتج النهائية تكون متجانسة.
- دائماً ما تكون كمية الناتج النهائي للتحلل الإنزيمي أعلى بكثير من كمية الناتج النهائي للتحلل الحامضي، حيث أن التحلل الإنزيمي لا ينتج عنه سكر محروق أو غير صالح.

وقد مورس التطبيق الصناعي لتحليل النشا بالإنزيمات منذ سنوات عديدة. ينتج في الولايات المتحدة الأمريكية ينتج أكثر من ٨٠٪ من الشراب والدكستروز الجاف عن طريق التحلل الإنزيمي. وقد أصبحت إنزيمات α -amylase المقاومة لدرجة الحرارة المرتفعة متاحة على المستوى التجاري حيث تنتج تجارياً من البكتيريا *Bacillus licheniformis*. كما أصبح إنزيم الـ Pullulanase المقاوم لدرجة الحرارة المرتفعة والذي يقوم بتحليل الرابطة ألفا ١-٦ جلوكوسيدية عند نقاط تفرع الأميلوبكتين (أحد مكونات النشا) متاح أيضاً تجارياً، حيث ينتج من البكتيريا *Enterobacter aerogenes*. ويوجد الآن اهتمام شديد بالتطبيق الصناعي لإنزيم الـ Amyloglucosidase المثبت على حامل غير ذائب. ومنذ اكتشاف إنزيمات الأميليز الميكروبية بواسطة العالم Fogarty في قسم الميكروبيولوجيا الصناعية بجامعة دبلن بأيرلندا، زاد الاهتمام باستخدامها تجارياً في كل أنحاء العالم.

يوجد النشا في شكل حبيبات غير قابلة للذوبان في الماء ، ويتحدد شكل وحجم هذه الحبيبات حسب النبات المأخوذ منه النشا ، ويكون النشا معظم الكربوهيدرات التي تخزنها النباتات الراقية ، كما يتم إنتاجه تجارياً من البذور أو الدرناات أو الجذور. المصدر الرئيسي للنشا في الدول الغربية هو الذرة ، وفي بعض البلاد النامية درناات الكاسافا وسيقان نبات الساجو Sago .

يتكون النشا من مركبين لهما وزن جزيئي عالي وهما الأميلوز، والأميلوبكتين، وهذين المركبين يختلفان في عدة خصائص فيزيائية وخصوصاً درجة الذوبان في الماء، وحجم الجزيء، فالأميلوز هو سلسلة مستقيمة تتكون من حوالي ٣١٠ وحدة جلوكوز ترتبط بالرابطة ألفا-١-٤ وهو قليل الذوبان في الماء ، أما الأميلوبكتين فهو متفرع بدرجة كبيرة ويتكون من حوالي ٤١٠-٥١٠ وحدة جلوكوز مرتبطة بالروابط ألفا-١-٤ وألفا-١-٦ وتوجد الروابط ألفا-١-٦ عند نقط التفرع ولذلك فإن جزيء الأميلوبكتين المحتوي على ٤-٥٪ من هذه الروابط يكون ذائب في الماء ويشكل حوالي ٧٥٪ من النشا حسب مصدر المادة التي أخذ منها.

والنشا سواء أكان من الذرة أو الشعير أو القمح أو الشوفان أو الراي أو البطاطس أو الكاسافا أو من الحبوب السكرية أو أي مصدر آخر، يمكن أن يستخدم لإنتاج الإيثانول . ويعتبر الذرة أحد أهم الحبوب التي تحتوي على نسبة عالية من النشا ويتميز الذرة بأنه سهل التخزين ويمكن طحنه بسهولة قبل تحويله إنزيميا إلى سكريات قابلة للتخمير. كذلك فإن الشعير يعتبر مصدر آخر جيد بالنسبة للنشا ولكنه يحتوي على نسبة عالية من البيتا جلوكان (β -glucan) التي تؤدي إلى مشاكل خاصة

باللزوجة أثناء عملية استخلاص الجلوكوز، ولذلك فلا بد من معالجة الشعير باستخدام إنزيم بيتا جلوكانيز (β -glucanase) لتحليل مادة البيتاجلوكان وتقليل اللزوجة .

إن القمح الذي يحتوي على ٦١-٦٥٪ نشا، والشوفان (٥٣٪) والراي (٥٣٪) والأرز (٧٠-٨٠٪)، تعتبر من المحاصيل الغنية بالنشا وتعتبر مصادر جيدة له لسهولة إنتاجه . أما بالنسبة للبطاطس، والبطاطا ومخلفاتها فإن محتواها من النشا (١٠-٢٥٪) يعتبر منخفض وذلك لارتفاع نسبة الماء فيها. كما أن هذه الدرنات، بالإضافة إلى الكاسافا التي تحتوي على أكثر من ٣٠٪ نشا، تكون متاحة موسمياً فقط لأنها لا تُحزن بسهولة ويجب استخدامها بدون تأخير بعد الحصاد. وعلى أية حال فإن حوالي ١٠٪ من الإيثانول المنتج في البرازيل يكون مصدره الكاسافا، ومن المتوقع أن يزداد استخدام البرازيل للكاسافا حيث تطمح هذه الدولة إلى إنتاج حوالي ١٥ مليون طن من الإيثانول سنوياً لاستخدامه كوقود.

ويتميز الكحول المصنع من الذرة كحماة خام بعدم وجود رائحة غريبة ولذلك يستخدم في أغراض خاصة مثل صناعة الأدوية. ويتم استقبال الكميات الضخمة من ثاني أكسيد الكربون التي تنتج مع الإيثانول وتحويلها إلى ثاني أكسيد الكربون صلب.

(٤،٢،٣) محاصيل الفاكهة Fruit crops

تستطيع الخميرة أن تخمر سكر الفاكهة التي تحتوي عادة على ٦-١٢٪ فركتوز بدون معاملة سابقة للتخمير. والفاكهة التي تحتوي على كميات كبيرة من الفركتوز و

السكروز هي العنب، والخبز، والشمس، والكمثرى، والأناناس. ظهرت منذ حوالي عشرة أعوام آراء تنادي بعدم استخدام هذه الفواكه كمواد خام لإنتاج الكحول نظراً لارتفاع ثمنها، كما أن الفاكهة قابلة للفساد بسرعة مما يجعلها تفقد سكرها القابل للتخمير أثناء تخزينها. ولكن الوضع اختلف الآن بعد زيادة أسعار الطاقة فهناك جهود كبيرة تبذل لبحث إمكانية الاستفادة من فاكهة المناطق الاستوائية والمناطق ذات المناخ شبه الجاف في إنتاج الكحول على المستوى الصناعي. وهناك أنواع من هذه الفاكهة مثل البلح وثمار شجرة المطر أعطت نتائج مبشرة في هذا الصدد.

وبالفعل تستخدم عصائر الموز والبلح والأناناس والفانكس من العنب أو العنب زائد النضج، كمواد خام محلية لإنتاج الإيثانول، كما تستخدم سكريات الذرة السكرية والمشروبات الرطبة ومخلفات صناعة الحلويات وسكريات خرشوف القدس. ونظراً لأن هذه المواد قابلة للتلف فيجب أن تستخدم بدون تأخير. ويحتوي عصير الذرة السكرية على حوالي ١٦٪ سكريات في صورة مثالية للتحويل إلى إيثانول ولا تتطلب معاملة إنزيمية أو طبخ حراري مما يوفر ٥٠٪ من الطاقة اللازمة لإنتاج الإيثانول واستخلاصه، كما أن المخلفات السليلوزية المتبقية تصلح عليقة جيدة للحيوانات. كذلك فإن الخرشوف أو ما يعرف بخرشوف القدس هو محصول سكري آخر يسود في شمال أمريكا، وتعطي سيقانه أكثر من ٢ طن سكريات لكل هكتار كما تعطي درناته أكثر من ١٥ طن من الإنيولين لكل هكتار، وقد أمكن استخدام سيقانه ودرناته معاً كمواد خام لإنتاج الإيثانول بواسطة الخميرة *Kluyveromyces marxianus*

وقدرت كمية الإيثانول المنتجة بأكثر من طن من السيقان وحوالي ٧ طن من الدرنات بالنسبة لكل هكتار في السنة بدون القيام بتحليل السليولوز.

(٤,٢,٤) مخلفات الصناعة والأغذية Industrial and food wastes

إن مخلفات الصناعة والأغذية تحتاج لمعاملات لتقليل خطر تلويثها للبيئة قبل التخلص منها. وبالإضافة إلى الحصول على الكحول، فإن تخمير هذه المخلفات يؤدي إلى خفض محتواها من المادة العضوية بحيث لا تكون خطراً على البيئة عند التخلص منها.

(٤,٢,٤,١) الشرش Whey

الشرش سائل ينتج من صناعة الجبن والكازين. وإنتاج العالم من هذا المنتج الثانوي يزيد على ١٠٠ مليون طن في السنة ويشكل الشرش مشكلة بيئية خطيرة إذا تم التخلص منه بدون معاملة نظراً لارتفاع قيمة الـ BOD الخاصة به. (الـ BOD هو اختصار للمصطلح Biological Oxygen Demand ويعني كمية الأكسجين التي تستهلكها الميكروبات خلال مدة محددة لكي تؤكسد كمية معينة من المادة العضوية الموجودة في منتج ما عند درجة حرارة معينة وهذا يعني أنه كلما كانت قيمة الـ BOD عالية، كلما كان تركيز المادة العضوية عالي، كلما كان هذا المنتج ملوث للبيئة) والقليل من الدول استطاعت أن تستفيد من كل الشرش الذي تنتجه. أمكن الاستفادة من حوالي ٦٠٪ من الشرش المنتج في الولايات المتحدة الأمريكية وكندا.

ويجب نزع بروتينات الشرش قبل تخميره وذلك لتجنب حدوث الرغوة الشديدة التي تحدث نتيجة وجود بروتينات الشرش (الأليومين واللاكتوجلوبولين). وبعد نزع البروتين يمكن زيادة تركيز اللاكتوز عن طريق التبخير دون أن يكون لذلك تأثير سلبي على تركيب الشرش أو ثبات اللاكتوز، وبعد التركيز يخزن الشرش لفترات طويلة. وقبل التخمير يخفف الشرش المركز إلى التركيز المرغوب فيه، وتضاف بعض العناصر الغذائية مثل النيتروجين والفوسفور والفيتامينات.

ويجدر الإشارة إلى أن معظم كميات الشرش في مصر والدول العربية تنتج من تصنيع الجبن الدمي المالح ولا يستفاد منه بسبب ارتفاع نسبة الملح به حيث تصل إلى ١٠-١٢٪، كما أنه لنفس السبب لا يصلح كغذاء للحيوان وبالتالي يتم صرفه في المصارف الطبيعية دون معالجة مما يسبب مشاكل بيئية كبيرة بسبب ارتفاع قيمة BOD. وقد قام (Zayed and Hunter, 1991) بتخمير الشرش المملح إلى إيثانول باستخدام تقنية الخلايا المثبتة والتي سيأتي شرحها وأعطت هذه التجارب نتائج جيدة حيث استطاعت الخميرة *Kluyveromyces fragilis* المثبتة على الأجاروز تمثيل كل اللاكتوز الموجود في الشرش المحتوي على ١٠٪ ملح كلوريد صوديوم إلى إيثانول.

(٤٠٢، ٤٠٢) مخلفات التصنيع الغذائي Food industrial wastes

إن استخدام مخلفات التصنيع الغذائي في إنتاج الكحول ليس شائعاً وله مشاكل كثيرة وذلك للأسباب الآتية :

- إنتاج معظم هذه المخلفات موسمي وليس على مدار العام.

- وجود اختلافات شديدة في كل من تركيب وخصائص هذه المخلفات.
 - الحاجة الشديدة إلى إضافة النيتروجين والعناصر الغذائية إلى هذه المخلفات مما يزيد من تكلفة عملية الإنتاج.
 - انخفاض محتوى هذه المخلفات من السكر حيث لا يزيد عادة عن ٤٪ مما يجعل عملية استقبال الكحول غير اقتصادية.
 - المنافسة الشديدة الناتجة من جانب استخدام هذه المخلفات كعلائق الحيوانات مما يعود على منتجها بربح أوفر من استخدامها في إنتاج الكحول.
 - هامش الربح الناتج من استخدام هذه المخلفات في إنتاج الكحول لا يتعدى ٣-٤٪ وذلك قبل دفع الضرائب.
- ولهذه الأسباب فإن هناك مخاطرة برأس المال إذا تم التفكير في إنتاج الكحول من مخلفات التصنيع الغذائي، ولكن تلك المخلفات تمثل مشكلة بيئية، لذلك فإن معالجتها واستخدامها لإنتاج الكحول قد يكون أمراً حتمياً للتوافق مع قوانين البيئة.

(٤,٣) عملية إنتاج الإيثانول Process of ethanol production

(٤,٣,١) مسارات التفاعل Reaction pathways

في هذا الجزء وقبل الدخول في خطوات إنتاج كحول الإيثانول سوف نعطي فكرة مبسطة جداً للقارئ عن التفاعلات الكيموحيوية التي تقوم بها الخمائر بغرض تحويل السكر إلى كحول الإيثانول.

المرحلة الأولى في هذه التفاعلات دخول سكر الجلوكوز إلى داخل خلية الخميرة. تقوم الخميرة في المرحلة الثانية بعملية تسمى الجلوكزة Glycolysis وهي تحول أو تحلل الجلوكوز إلى جزيئين حامض بيروفيك وهي أول مرحلة في تمثيل المواد الكربوهيدراتية وتتم داخل السيتوبلازم في جميع الكائنات الحية ويطلق عليها أيضاً مسار إيميدن مايرهوف (Embden-Meyerhof Pathway). وتتم عملية تحلل الجلوكوز في خطوات عديدة وتشمل كثير من الإنزيمات ولكنها ببساطة شديدة عبارة عن انشطار جزيء سكر الجلوكوز ذو الست ذرات كربون إلى جزيئين متشابهين كل منهما عبارة عن سكر ذي ثلاث ذرات كربون. وتتأكسد جزيئات كل من السكرين ذو الثلاث ذرات كربون إلى حامض بيروفيك. أي أنه خلال عملية تحلل الجلوكوز ينتج لكل جزيء جلوكوز ٢ جزيء حامض بيروفيك. ينتزع الهيدروجين في هذه العملية من الجليسرالدهيد ٣ فوسفات الناتج من انشطار الجلوكوز وتستقبله مرافقات الإنزيم NDA فتختزل إلى الصورة $NADH_2$. ومن المهم أيضاً الإشارة إلى أن عملية تحلل الجلوكوز لا يمكن أن تستمر إلا إذا حدث إعادة أكسدة للصورة المختزلة من مرافق الإنزيم NAD والتي نتجت من خطوات نزع الأيدروجين. بعد إنتاج حامض البيروفيك وفي المرحلة الثانية يقوم إنزيم Carboxylase الذي يسود في الخمائر بنزع مجموعة الكربوكسيل من حامض البيروفيك لينتج عن ذلك أسيتالدهيد وثاني أكسيد الكربون كما يلي :



حامض بيروفيك

أسيتالدهيد

تتحد الأسيتالدهيد الناتجة في وجود الماغنسيوم (Mg^{++}) مع مركب Thiamine pyrophosphate ويتكون مركب وسطي أمكن تعريفه حديثاً وأطلق عليه اسم الأسيتالدهيد النشطة Active acetaldehyde.

وعندما تكون ظروف التفاعل هوائية تماماً يستمر هذا التفاعل بشكل غير عكسي في اتجاه تكون ثاني أكسيد كربون و Acetyl coenzyme A ($\text{CH}_3\text{CO}\sim\text{S}\cdot\text{CoA}$) الذي يدخل في سلسلة متعددة من التفاعلات من خلال دورة كربس ليتأكسد تماماً في نهاية التفاعل إلى ثاني أكسيد الكربون وماء. وهذا يحدث فقط في الظروف الهوائية.

ولكن مع سيادة إنزيم Carboxylase في الخمائر وسيادة الظروف اللاهوائية لا يكتمل تفاعل الأسيتالدهيد النشطة في اتجاه دورة كربس وإنما تتحلل الأسيتالدهيد النشطة مرة أخرى معطية أسيتالدهيد حرة تختزل إلى كحول الإيثانول عن طريق ذرتي أيروجين يتم الحصول عليهما من إعادة أكسدة NADH_2 الناتجة من عملية تحلل الجلوكوز التي تقوم بها الخميرة بشكل جيد.



أسيتالدهيد

إيثانول

وعلى ذلك ومن الناحية الفسيولوجية فإن تكون كحول الإيثانول يخدم
غرضين مهمين لحياة الخلية وهما :

- ١- إزالة الأستيتالدهيد المتكونة أول بأول حيث أنها سامة لخلايا الميكروبات.
- ٢- يسمح باستمرار عملية الـ Glycolysis وإلا يمكن أن تفشل نظراً لتراكم NADH₂ بدون إعادة أكسدة.

(٤٠٣٠٢) خطوات التصنيع Manufacturing steps

يوضح الشكل رقم (٤٠١) الخطوات الرئيسية المتبعة عند إنتاج الإيثانول من
الذرة على سبيل المثال.



الشكل رقم (٤٠١). رسم تخطيطي مبسط للخطوات الرئيسية لإنتاج الإيثانول من الذرة.

وفيما يلي نتناول تفاصيل هذه الخطوات:

(٤٠٣٠٢٠١) تحضير المهروس Preparation of mash

لتحضير ما يعرف بالمهروس يمكن أن يستخدم كل من مطحون الذرة الجاف والمطحون الرطب. والنواتج الرئيسية النهائية لمطحون الذرة الجاف هي الإيثانول، ثاني أكسيد الكربون، ونواتج تقطير الحبوب، ولكن رأس المال المستثمر في مجال استخدام مطحون الذرة الجاف أقل من ذلك المستثمر في مجال استخدام مطحون الذرة الرطب وذلك لأن الغرض الأساسي من استخدام مطحون الذرة الجاف هو الحصول على النشا بهدف إنتاج الإيثانول أما في حالة مطحون الذرة الرطب فهناك نواتج أخرى يهدف المستثمرون إلى الحصول عليها فيما يسمى بالمصانع المتكاملة حيث يكون الهدف هو الحصول على الإيثانول، وزيت الذرة، وعلائق الجلوتين، والنشا النقي، وبعض عصائر أو أشربة النشا، وسائل منقوع الذرة، وكذلك الخميرة.

وعلى أية حال فإن تحضير المهروس من الذرة الجاف يبدأ بعملية الإسالة، وهي عملية تشتيت لحبيبات النشا غير الذائبة في وسط سائل، يتبعها تحلل جزئي باستخدام إنزيمات الـ α -Amylases المقاومة لدرجات الحرارة المرتفعة، فحبيبات النشا غير ذائبة ولكن عندما تسخن في محلول سائل فإنها تتشرب كمية كبيرة من الماء وتنتفخ ويتغير بنائها حيث تنفجر الحبيبات وتشتت النشا في المحلول. والحرارة اللازمة لكي يتم تشتت كامل للنشا ويصبح في صورة معلق أو هلام هي $105-110^{\circ}\text{C}$ بالنسبة لمعظم أنواع النشا. وفي العمليات الصناعية فإن هذا المعلق يكون محتواه من النشا أكثر من

٣٥٪ (وزن/حجم) ولذلك فإن لزوجته تكون عالية جداً. وتستخدم إنزيمات α -Amylases المقاومة للحرارة المرتفعة لتخفيض هذه اللزوجة وتحليل المعلق جزئياً. ويجب أن يتم هذا التحليل الجزئي قبل تبريد المحلول، لأن التبريد يؤدي إلى ترسيب النشا وتجميعه مرة أخرى. وقد كانت الطريقة التقليدية في تخفيض اللزوجة وتحليل النشا جزئياً تتم باستخدام حامض الهيدروكلوريك أو الأوكساليك عند درجة حرارة من ١٤٠-١٥٠°م لمدة ٥ دقائق ولكن منذ اكتشاف إنزيمات الـ α -Amylases المقاومة للحرارة لم يعد يستخدم الحامض في تكنولوجيا النشا حيث أن استخدام هذه الإنزيمات يعني ظروف معتدلة وعدم تكون نواتج وسطية وتكاليف أقل.

تبدأ الخطوات العملية لمرحلة الإسالة بتنظيف الذرة ثم طحنه بغرض الحصول على حبيبات صغيرة ذات مساحة سطح كبيرة حتى تسهل عملية تحويل الذرة إلى مادة جيلاتينية وحتى يسهل عمل الإنزيمات الهادمة.

تضاف بعد عملية الطحن كمية قليلة من الماء إلى الذرة المطحون ويتم التقليب الجيد ثم تستخدم هيدروكسيد الكالسيوم أو الأمونيوم لضبط درجة الـ pH (من ٦ إلى ٧).

يضاف بعد ذلك إنزيم ألفا-أميليز (α -amylase) المقاوم لدرجات الحرارة المرتفعة والمتحصل عليه من البكتيريا *Bacillus licheniformis* بنسبة ٠.٠٥٪ (حجم/حجم). وعلى الرغم من أن درجة حموضة هذه العملية ليست هي المثلى لإنزيم ألفا-أميليز إلا أن ميزة هذا الإنزيم أنه يظل نشط عند درجة حرارة الطبخ والتي يكون الغرض منها هو إسالة النشا وتقليل اللزوجة.

وقد وجد أن إضافة أيونات الكالسيوم بتركيز حوالي ٦٠ مجم/ لتر ضرورية لنشاط الإنزيم. ويمكن لعملية الإسالة أن تتم بشكل متقطع Batch أو بشكل مستمر Continuous.

يجب أن تكون قيمة مكافئ الدكستروز (Dextrose equivalent (DE) في نهاية عملية الإسالة ما بين ١٢ إلى ٢٠ حتى يتم تجنب عملية عودة النشا من الحالة السائلة إلى حبيبات أو بلورات غير ذائبة. ولتوضيح معنى مكافئ الدكستروز نذكر أن نواتج تحلل النشا تقسم حسب محتواها من السكريات المختزلة ويمثلها سكر الجلوكوز، فبالنسبة للجلوكوز النقي، يعبر عنه بالمصطلح DE100 أي أنه إذا كان لدينا مادة ولها DE مقدارها ١٠٠ فهذا يعني أن هذه المادة عبارة عن جلوكوز نقي أما النشا النقي فقيمة DE الخاصة به تكون قريبة من الصفر.

تبدأ بعد مرحلة الإسالة مرحلة التسكر وهي عملية يمكن أن تختلف باختلاف المنتج المراد الحصول عليه. يتم تبريد النشا المسال (الدكسترين) ثم يضاف إنزيم جلوكوأميليز Glucoamylase المتحصل عليه من فطر *Aspergillus niger* على درجة حرارة ٦٠°م وذلك لتسكر الدكسترين إلى سكريات قابلة للتخمر. يقوم إنزيم جلوكوأميليز في هذه الخطوة بتحليل الروابط ألفا (١-٦) في الأميلوبكتين وكذلك الروابط ألفا (١-٤) في كل من الأميلوبكتين و الأميلوز وبذلك تنتج السكريات القابلة للتخمر والتي تتوقف نسبتها إلى نسبة الدكسترين المتبقي على كمية وجودة إنزيمات الأميليز المستخدمة. يسمى هذا المخلوط الأخير المحتوي على السكريات

القابلة للتخمير وبعض من الدكستريين المتبقي بدون تسكير "المهروس" "Mash". بعد يبرد بعد ذلك المهروس إلى ٣٠-٣٥ م° ثم ينقل إلى المخمر ويلقح بالخميرة. سوف يستمر في المخمر هدم وتسكير الدكستريين المتبقي بواسطة الإنزيمات المضافة حتى تصبح كل أو معظم الكربوهيدرات قابلة للتحويل إلى إيثانول. وبلا شك فإن تركيب المهروس يختلف اختلافاً كبيراً من مصنع إلى آخر. وقد وجد أن المهروس المحتوي على نسبة عالية من الدكستريين غير المتحلل تحتاج إلى فترة تخمير طويلة وذلك لأن درجة حرارة التخمير (أقل من ٣٥ م°) لا تناسب عملية التسكير بواسطة إنزيم جلوكو أميليز الذي ينشط جيداً عند درجة حرارة ٦٠ م°.

(٤٠٣٠٢٠٢) التخمير Fermentation

لا يمكن على مستوى الإنتاج التجاري أن ينظر لعملية التخمير على أنها فن فقط ولكن هي بالدرجة الأولى علم، فإجراء التخمير ليس مجرد وضع المحلول المراد تخميره في المخمر ثم تلقيحه بالخميرة ثم تركه مدة زمنية حتى يتم إنتاج الإيثانول، ولكن بالإضافة إلى العمليات الروتينية الخاصة بتنظيف وتعقيم المخمرات والأجهزة الملحقة بها هناك عمليات مهمة لا بد من أخذها في الاعتبار حتى يتم التخمير بنجاح وهي كما يلي:

Expected yield حسابات المحصول المتوقع

الخميرة من الكائنات غير الهوائية اختياريًا وفي وجود الهواء فإنها تنمو حتى تعطي وزن جاف من خلايا الخميرة يصل إلى ٥٠٪ من وزن السكر الذي تم تمثيله.

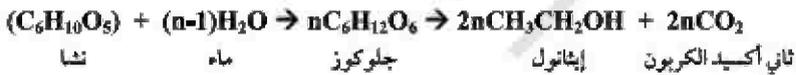
ويجب أن يظل تركيز السكر منخفض أثناء تكاثر الخميرة وذلك عن طريق الإمداد المتزايد به وذلك لتجنب التأثير المثبط للسكر والمعروف بتأثير الجلوكوز " Glucose effect" (التأثير المثبط للسكر يرجع إلى وجود كمية كبيرة أي دفعة واحدة من السكر سهل التمثيل ونتيجة سهولة تمثيله في المراحل الأولى تتراكم نواتج وسطية لأن الخلية لا تستطيع ملاحقة هذه لنواتج وبالتالي تتسبب النواتج الوسيطة المتراكمة في توقف التفاعل). العملية المتبعة في التخمر هي الحفاظ على تركيز منخفض من السكر، عندما يكون المقصود هو إنتاج خميرة جافة نشطة (Active-dried yeast (ADY أو عندما يكون المقصود هو إنتاج البروتين الحيوي ولكن لا يتم ذلك في عملية إنتاج الإيثانول حيث تكون الخميرة تحت ظروف شبه لا هوائية.

تكون كمية الأكسجين المطلوبة في عملية إنتاج الإيثانول قليلة وعادة ما يتم إدخال حوالي ٨-٢٠ مجم أكسجين ذائب/ لتر وذلك قبل التلقيح بالخميرة. وعلى الرغم من وجود بعض الأكسجين المضاف والضروري لنمو الخميرة تبدأ الخميرة في تصنيع الإيثانول من السكريات القابلة للتخمر وعادة ما يكون وزن خلايا الخميرة المتكونة تحت هذه الظروف أقل من ٥٪ من وزن السكر الذي يتم تمثيله.

تقوم الخميرة بتخمير السكر من خلال مسار إيميدين مايرهوف (Embden-Meyerhof pathway) أو الجليكوليسز Glycolysis الذي سبق الإشارة إليه. يتحول في هذه العملية كل جزئ من السكريات السداسية ومعظمها جلوكوز بواسطة الخميرة في وجود تركيز منخفض من الأكسجين أو في عدم وجوده إلى جزيئين من حامض البيروفيك ثلاثي ذرة الكربون.

تتكون في هذا التفاعل مركبات كربونية وتنتج طاقة لازمة لنمو الخلايا وتصبح مركبات مثل ATP و NADH₂ ميسرة لتستخدم في تفاعلات أخرى، فعلى سبيل المثال عندما يتكون مركب الأسيتالدهيد ويتوفر مرافق الإنزيم الـ NADH₂ فإن الأسيتالدهيد يختزل إلى إيثانول آخذاً الهيدروجين من NADH₂ الذي يتأكسد إلى NAD⁺ ليلعب دوراً من جديد في دورة الجليكوليسز.

وفي العملية التي نحن بصدد شرحها وهي حسابات المحصول المتوقع، نذكر بأننا نتحدث عن الذرة (على سبيل المثال) كمصدر للكربوهيدرات تحتوي على نسبة عالية من النشا. وكما ذكرنا فإن النشا يتم تحلله بواسطة الإنزيمات المضافة إلى جلوكوز الذي يصبح جاهزاً للتخمر بواسطة الخميرة. وعندما يكون عدد وحدات الجلوكوز (n) كبير في جزئ النشا فإن التفاعل الذي عن طريقه يتحول الجزء الأعظم من النشا إلى إيثانول وثاني أكسيد الكربون يمكن التعبير عنه بالمعادلة الآتية :



وبالأخذ في الاعتبار أن الوزن الجزيئي للجلوكوز هو ١٨٠ و الإيثانول ٤٦ وأن كل جزئ جلوكوز يعطي ٢ جزئ إيثانول كما في المعادلة السابقة، فمن الناحية النظرية كل جزئ جلوكوز يعطي ٢ جزئ إيثانول، أي أنه يمكن القول أن كل ١٠٠ جرام جلوكوز تعطي ٥١.١ جرام إيثانول، وبنفس الطريقة نجد أن كل ١٠٠ جرام من النشا تعطي ٥٦.٧ جرام إيثانول.

هذا من الناحية النظرية ولكن في الواقع لا يمكن لأي ميكروب أن ينتج إيثانول بنسبة ١٠٠٪ من القيمة النظرية بسبب استهلاك بعض من السكر في نمو الخميرة وكذلك بسبب تحول بعض من السكر إلى نواتج وسطية أخرى. وعلى أية حال فإن هناك اختلاف كبير في كفاءة سلالات الخميرة المستخدمة في عملية الإنتاج وهناك جهود كبيرة تبذل في مجالات علوم البيولوجي والهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للحصول على سلالات تعطي نسبة عالية من القيمة النظرية .

بناءً على ما سبق ، يمكن حساب كفاءة عملية التخمير من المعادلة الآتية :

$$\frac{\text{وزن الإيثانول المنتج} \times 100}{\text{القيمة النظرية للإيثانول}} = \text{النسبة المئوية لكفاءة التخمير}$$

وهناك طريقة أخرى لحساب الكفاءة وتطبق في كثير من حسابات صناعة الإيثانول وتعتمد على محتوى الحبوب من النشا ولكن يجب أن يكون الحساب على أساس محتوى الحبوب الجافة من النشا وليس الحبوب الرطبة. ففي القمح على سبيل المثال، فإن كمية مقدارها واحد طن عند مستوى رطوبة ١٢٪ تحتوي على ٨٨٠ كيلو جرام من الحبوب ، وبما أن القمح يحتوي على نسبة نشا تساوي ٦٣٪ فإن كل طن يحتوي على ٥٥٤ كيلو جرام من النشا. وعندما يتحلل النشا يزداد الوزن الجزئي لنواتج التحلل بسبب تحلل الروابط ويكون الناتج مساوياً ٥٥٤ × الوزن الجزئي للجلوكوز/الوزن الجزئي لوحدة تكوين سلسلة النشا ،

أي $554 \times 162/180$ أي ٦١٦ كيلوجرام من السكر ، وكما ذكرنا فإن القيمة النظرية لإنتاج الإيثانول من السكر تساوي ٥١.١% مما يعني أن القيمة النظرية لإنتاج الإيثانول من واحد طن قمح تساوي $616 \times 51.1/100$ أي ٣١٥ كيلو جرام من الإيثانول . وإذا كان من المعلوم أن معظم سلالات الخميرة المستخدمة تعطي محصول من الإيثانول يساوي من ٩٠ إلى ٩٣% من القيمة النظرية فهذا معناه أن كل طن قمح يعطي ناتج نهائي من كحول الإيثانول مقداره ٣٦٠-٣٧٢ لتر مع الأخذ في الاعتبار كثافة الكحول.

وليس من الشائع وجود عملية إنتاج إيثانول بكفاءة أكثر من ٩٣% من القيمة النظرية وخصوصاً على المستوى التجاري. وعلى أية حال فإن كفاءة التخمير تختلف عن كفاءة الخميرة حيث أن كفاءة التخمير تتكون من كفاءة الخميرة ، وكفاءة عملية التقطير ، وكفاءة التسكير. وربما تكون كفاءة التسكير من العوامل الهامة جداً حيث أن وجود نسبة عالية من النشا غير المتحلل في المهروس يؤدي إلى فقد كبير في إنتاج الإيثانول بالنسبة للقيمة النظرية. ومن النادر أن يقاس هذا العامل عند إنتاج الإيثانول على المستوى التجاري رغم أن كثير من العلماء ومنذ وقت مبكر نسبياً مثل Wallace سنة ١٩٨٦م ذكروا حقيقة علمية مؤداها أن الفقد في إنتاج الإيثانول قد يصل إلى ٢٠% من القيمة النظرية أو أكثر وأن أسباب ذلك على الترتيب هي الفشل في استخلاص كامل للنشا من الحبوب، وعدم اكتمال تسكير الدكسترين ، وتكون سكريات غير قابلة للتخمير، واستخدام الخميرة للسكريات في عملية التكاثر والنمو،

وتكون نواتج وسطية غير مرغوب فيها بواسطة الخميرة أو بواسطة ميكروبات التلوث إن وجدت.

ومن المهم هنا أن نشير إلى أن الخميرة المتنامية، أي التي يزداد عددها باستمرار حتى ولو بقيمة قليلة أثناء عملية التخمر، تنتج إيثانول بطريقة أكفأ وأسرع من الخميرة التي تنمو إلى حد معين ثم تتوقف عن النمو. وقد وجد أن الخميرة المتنامية تعطي طاقة ونواتج تمثيل ضعف ما تعطيه الخميرة التي تتوقف عن النمو، ولذلك فإن كل الجهود تبذل لجعل ظروف التفاعل مناسبة لكل من إنتاج الإيثانول ونمو الخميرة في نفس الوقت. وفي هذا الصدد لا بد من الأخذ في الاعتبار توافر المواد الغذائية للخميرة في بيئة إنتاج الإيثانول، ولا بد من المعرفة الدقيقة لتركيب المادة الخام للتأكد من أنها تحتوي على كل العناصر الغذائية اللازمة لحياة الخميرة وإضافة العناصر الناقصة، فعلى سبيل المثال فإن المولاس ينقصه مادة البيوتين اللازمة لحياة الخميرة كما أن المولاس والفاكهة ينقصهما النيتروجين الميسر الذي تحتاجه الخميرة لتخليق البروتين والأحماض النووية. كما أن محاليل الجلوكوز ينقصها النيتروجين والكبريت والفوسفات وهي كلها عناصر ضرورية لحياة الخميرة.

التلقيح وكمية العناصر الغذائية المطلوبة والاستخلاص

Inoculation, requested nutrients and extraction

يتم التلقيح بمقدار ٥ إلى ١٠ مليون خلية/مل، ويعني هذا العدد أن كمية اللقاح المطلوبة لكل كيلو لتر (متر مكعب) من الميروس حوالي ٠,٢٤ كجم من

الخميرة الجافة النشطة. وبما أن عدد الخمير في التخمر المتقطع التقليدي يزداد بمقدار ٣-١٠ أضعاف فإن كمية الخميرة الجديدة المنتجة لكل كيلو لتر من المهروس هي من ٠.٧ إلى ٢.٤ كيلو جرام . وبما أن محتوى خلايا الخميرة من النيتروجين يتراوح من ٣ إلى ٨٪ من وزن الخلية الجاف فيجب توفر مادة مناسبة تمد الخميرة بهذه الكمية. ويمكن حساب كمية مصدر النيتروجين المطلوبة لكل متر مكعب من المهروس من المعادلة الآتية :

$$A = \frac{BC-D}{100} \times \frac{E}{14n}$$

حيث A هي الكمية المطلوبة من مصدر النيتروجين الذي تم اختياره (كجم/ كيلو لتر من المهروس)، B هي الكمية العادية أو المطلوبة للخميرة من النيتروجين (جرام نيتروجين/ ١٠٠ جرام خلايا جافة)، C هي كمية خلايا الخميرة الجافة المتوقعة (كيلو جرام/ كيلو لتر)، BC/ 100 هي كمية النيتروجين المطلوبة لنمو الخلايا الجديدة (كيلو جرام/ كيلو لتر)، D هي كمية النيتروجين الموجود بالفعل في المهروس (كيلو جرام/ كيلو لتر)، E هي الوزن الجزيئي لمصدر النيتروجين الذي تم اختياره وأخيراً n هي عدد ذرات النيتروجين لكل جزيء من المصدر الذي تم اختياره، 14 هو الوزن الذري للنيتروجين .

ويجب أن يعلم المنتجين أن المواد النيتروجينية في المهروس ليست كلها قابلة للتمثيل بواسطة الخميرة بنسبة ١٠٠٪ ولذلك فلا بد من إضافة كمية أكثر من الكمية

المحسوبة بواسطة المعادلة السابقة وخصوصاً في التخمرات التي تجرى على مستوى كبير جداً.

وبالمثل يمكن حساب كميات الفوسفور والكبريت المطلوبة من مصادرها المناسبة ولكن بتركيزات أقل بكثير من تركيز النيتروجين، ويرى البعض ضرورة الأخذ في الاعتبار مستخلص خلايا الخميرة التي تتحلل ذاتياً أثناء عملية التخمر وما تحتويه من عناصر غذائية.

وقد يكون التخمر بطيء في بدايته ولذلك يجب تحضير اللقاح من الخميرة الجافة النشطة وذلك بتنميتها في كمية من المهروس المعقمة والتي تم إمدادها جيداً بالمواد الغذائية اللازمة للخميرة. في هذه الحالة يزداد نمو ونشاط الخميرة التخمرية خلال الساعات الأولى بعد التلقيح ويبدأ تكون الرغوة التي قد تكون ضارة بعملية التخمر وخصوصاً مع المواد الحام المحتوية على زيوت مثل الذرة ولذلك يجب إمداد بيئة التخمر بمواد مضادة للرغوة، ويقل معدل التخمر بعد ٣٠ ساعة وينخفض رقم الـ pH إلى أقل من ٤ ويستهلك كل السكر القابل للتخمر وبذلك تكتمل دورة التخمر لتبدأ دورة جديدة فيها يعرف بالتخمر المتقطع.

وبعد ذلك تبدأ مرحلة استقبال واستخلاص الإيثانول والنواتج الوسطية عن طريق التقطير وعلى أية حال فإن عمليات التقطير، التقطير الاستخلاصي Extractive distillation، استخلاص المذيبات وثاني أكسيد الكربون، التجفيف، وتحضير النواتج الوسطية لن يتم مناقشتها في هذا الكتاب حيث أن علاقتها ليست كبيرة بعلم الميكروبيولوجي، ولكن كمثال فقط على كميات النواتج الأخرى المنتجة مع

الإيثانول ، نذكر أن مصنع الإيثانول الذي ينتج ٦٠٠٠٠ طن إيثانول سنويا من الذرة، سوف ينتج أيضاً ٦٢٠٠٠ طن من منتجات تقطير الحبوب الجافة والقابلة للذوبان والمحتوية على ٢٨-٣٥٪ بروتين خام وتباع كعلائق للحيوانات (البنسلين المضاف أثناء التخمر بواسطة بعض المصانع للتحكم في التلوث البكتيري يمكن أن يكون مشكلة إذا تغذت حيوانات اللبن على هذه العلائق) ، و ٤٥٠٠٠ طن من ثاني أكسيد الكربون المعبأ ، و ٢٣ طن من الألدهيدات والكتونات . من ناحية أخرى فإن هذا المصنع سوف يتطلب ١٠١ طن من المواد الغذائية للخميرة و ١٨٠ طن من الخميرة الجافة النشطة و ٢٠٣٠٠٠ طن من الذرة.

(٤,٤) الخمائر المستخدمة Used yeasts

بشكل تقليدي تستخدم خمائر الجنس *Saccharomyces* لإنتاج الإيثانول كوقود. ويستخدم بعض منتجي الإيثانول سلالات تم اختيارها بعناية ولها براءة اختراع مسجلة ولا يسمح لأحد باستخدامها إلا بتصريح منهم. كما أن كثير من مصانع الإيثانول في الدانمارك والبرازيل يستخدمون خميرة الخببز العادية في إنتاج الإيثانول كوقود. ومن المدهش أن القليل قد كتب عن الخمائر المستخدمة لإنتاج الإيثانول كوقود وربما يكون ذلك بسبب السرية التي تحيط بهذه السلالات وكذلك بسبب حقوق الملكية.

تعتمد معايير اختيار الخمائر المستخدمة لإنتاج الكحول لاستخدامه كوقود، على قدرتها على الاستفادة من المواد الأولية و معدل النمو ومعدل التخمر وقدرتها

على النمو عند pH منخفض ، وعند درجة حرارة مثل مرتفعة، ومدى مقاومتها للظروف الفيزيائية غير المناسبة، ومحصول الإيثانول ، وعدم وجود نواتج وسطية غير مرغوب فيها، ومدى تحملها لتركيزات عالية من الجلوكوز و الإيثانول .

وضع Maiorella وآخرون في وقت مبكر نسبياً، أي في سنة ١٩٨١م عوامل محددة لا بد من توفرها في الخمائر المستخدمة في إنتاج الإيثانول كوقود. هذه العوامل يمكن إيجازها فيما يلي :

١- يجب ألا يكون هناك نواتج ثانوية أخرى غير الإيثانول ، حيث أن وجود نواتج أخرى يؤدي إلى زيادة تكاليف الإنتاج ، وإلى خفض المنتج أو جودته أو كلاهما معاً.

٢- يجب أن يكون للخمائر قدرة على تحمل الضغط الأسموزي المرتفع، والتركيزات المرتفعة من الإيثانول، مما يزيد من الإنتاجية ، ويقلل التكاليف . تسمح هذه الخواص أيضاً بإعادة استخدام بعض النواتج الوسطية التي قد تحتوي على تركيزات عالية من الأملاح.

٣- يجب أن تتميز خمائر الإنتاج بالنمو السريع وبمعدل التخمر السريع.

٤- يجب أن تتحمل خمائر الإنتاج تركيزات عالية من الحموضة ، حيث إن هذه الخاصية تساعد على منع التلوث .

٥- يجب أن تتحمل خمائر الإنتاج درجات حرارة عالية ، حيث إن هذه الخاصية تقلل من تكاليف عملية الإنتاج .

٦- يجب أن تتميز الخمائر المستخدمة بخواص تلبند Flocculation جيدة، حيث إن هذه الخواص تسهل عملية فصل الخلايا قبل الاستخلاص .

٧- يجب أن تتميز الخمائر بالقدرة على الاستفادة من عدد كبير من المواد الأولية ، كمواد خام لإنتاج الإيثانول ، حيث أن المادة الخام المتاحة ، قد تحدد نوع الخميرة المستخدمة. فعندما تسود السكريات الخماسية على سبيل المثال، في المادة الخام ، يجب أن تستخدم خمائر لها القدرة على تمثيل هذه السكريات مثل خميرة Pachysolen tannophilus ، لكن قد يكون النشاط التخميري لهذه الخميرة ضعيف ، لذلك فإن البحث عن خمائر لها مدى واسع من المواد الخام، بالإضافة إلى المميزات التي سبق ذكرها، يمثل حلاً لمشكلة الاضطرار إلى استخدام ميكروب له نشاط تخميري ضعيف.

(١، ٤، ٤) طين الخميرة Yeast slurry

تستخدم الخمائر النقية غير المجففة لإنتاج الإيثانول بغرض استخدامه كوقود. ومن الممكن استخدام الخمائر الناتجة المتخلفة عن صناعة المشروبات الكحولية لهذا الغرض، حيث أن تواجدها يعتبر ميسر على مدار السنة. وقد كانت فكرة استخدام خمائر المشروبات الكحولية غير مقبولة بسبب اعتقاد العلماء أن هذه الخمائر ليس لها القدرة على التكيف مع تركيزات الإيثانول العالية وأن لها حيوية منخفضة، ولكن الأبحاث كشفت أن انخفاض حيوية خمائر المشروبات الكحولية وكذلك انخفاض تكيفها مع تركيز الإيثانول العالي يرجع إلى طبيعة تركيب بيئة إنتاج

المشروبات الكحولية وليس إلى سبب وراثي أو فسيولوجي في هذه الخمائر. وعلى أية حال فقد أكد العلماء أنه بسهولة يمكن إعادة تنشيط هذه الخمائر حتى ولو كانت منهكة بعد قيامها بإنتاج المشروبات الكحولية. ومن ناحية أخرى فإن هناك عدد قليل من مصانع إنتاج الإيثانول تقوم بإكثار خمائرها الخاصة كما تقوم بتنميتها لبضعة ساعات قبل بداية التخمير وذلك بغرض أقلمتها على ظروف التخمير.

وهذا الإكثار الخاص الذي تقوم به بعض المصانع يتطلب عناية شديدة من حيث التعقيم، ومراعاة ظروف التنمية وخصوصاً الأكسجين، والتأكد من مدى نقاء اللقاح نفسه، أي أنه لا بد من الأخذ في الاعتبار التحكم الشامل في جودة إنتاج اللقاح. وحيث أن تكلفة استخدام الخمائر الجافة النشطة هي بضعة سنتات بالنسبة لكل جالون إيثانول يتم إنتاجه فإنه من المتوقع أن المصانع الكبيرة فقط هي التي يمكن أن توفر مبالغ ذات قيمة من عملية تنمية لقاحاتهم بأنفسهم، وبالطبع لا بد من استخدام بيئة معقمة في المراحل الأولى لعملية الإكثار بالإضافة إلى توفر تكنولوجيا النظافة الداخلية للمكان وتعقيم الخزانات وخطوط النقل. أي أنه لا بد من توفر خبرات مدربة جيداً في مجال الميكروبيولوجي للقيام بهذا العمل.

يتراوح معدل التلقيح في كل الأحوال من ١ إلى ٥٪ (حجم/ حجم) ولذلك فإن أطنان عديدة من الخمائر قد تكون مطلوبة بالنسبة لمصانع الإيثانول الكبيرة. وعند استخدام مزارع خمائر نقية يتم تحضيرها بواسطة المتجين فهناك نقاط أخرى غير التي ذكرت يجب أن تؤخذ في الاعتبار وهي :

١- تركيز الخلايا في اللقاح يجب أن يكون في حدود 10×10^5 / مل.

- ٢- تركيز الملوثات سواء أكانت خمائر برية أو بكتيريا يجب أن يكون أقل من خلية /١٠٠٠ خلية خميرة.
 - ٣- يجب ألا يقل عدد خلايا الخميرة الحية في اللقاح عن ٨٥٪.
 - ٤- يجب أن يكون هناك إمكانية تعبئة اللقاح في عبوات خاصة.
 - ٥- يجب أن تتوفر إمكانية غسيل الأوعية التي يصعب تعقيمها حرارياً بالحامض.
 - ٦- يجب تدريب العاملين في هذا المجال مع ضمان وجود أخصائي ميكروبيولوجي.
- وليس من الشائع إعادة استخدام اللقاح مرة أخرى في مشاريع إنتاج الإيثانول للوقود وذلك بسبب عدم التأكد من ارتفاع نسبة الحيوية في الخلايا التي تنخفض بسبب درجات الحرارة المرتفعة وبسبب احتواء الخلايا على كمية من الإيثانول.

(٢,٤,٤) الخمائر النشطة الجافة Activated-dried yeasts

أصبحت الطرق المستخدمة لإنتاج الخميرة الجافة النشطة الآن معروفة بالتفصيل. وهناك عدد من الشركات المتخصصة تنتج خمائر الخبثيز والخمائر المستخدمة في صناعة المشروبات الكحولية في صورة جافة كما أن هناك شركة Universal Foods بالولايات المتحدة الأمريكية وشركة Lallemand Inc. في كندا تنتجان الخمائر المعدلة وراثياً في صورة جافة وتمتازان بالسلالات الجديدة المكتشفة من الخمائر أو الميكروبات الأخرى. ولا تتوفر معلومات توضح ما إذا كان هنالك سلالات معينة من الخميرة يوصى باستخدامها في إنتاج الإيثانول كوقود أو تم أقلمتها بطريقة تفيد صناعة

الإيثانول. وعلى أية حال فإن مميزات استخدام الخميرة الجافة النشطة بالمقارنة بالخميرة المنتجة طازجة تتلخص فيما يلي:

١- تعيش فترة طويلة (أكثر من سنة) في عبوات مغلقة تحت ظروف تخزين يتوفر فيها غاز النيتروجين أو ثاني أكسيد الكربون أو تحت تفريغ (بعد فتح أي عبوة يجب أن تحفظ في الثلاجة).

٢- حيوية الخلايا تتراوح من ٢٠٥ إلى ٤٠٦ × ١٠^٦ خلية خميرة/ جرام وزن جاف وتفقد تحضيرات الخلايا الجافة النشطة أقل من ٠,٣٪ من نشاطها كل شهر.

٣- إمكانية استخدامها فقط عندما يتم ترطيبها (١٠٠ جرام من مسحوق الخميرة إلى لتر من الماء أو المهروس عند ٣٩°م لمدة ٢٠ دقيقة)، ويمكن أيضا استخدامها عن طريق الرش بدون ترطيب.

٤- سهولة وثبات حساب معدل التلقيح بما مقداره حوالي ٠,٢٤ كيلو جرام / متر مكعب (هذه الكمية يجب زيادتها في حالة التخمرات الضخمة أو نقص الحيوية). ولضمان الحد الأدنى المطلوب للتخمر الناجح يجب أن يكون عدد الخلايا في اللقاح ٣ × ١٠^٦ خلية/ مل. وبالاعتماد على المواد الغذائية الميسرة في المهروس يزداد عدد الخلايا ليصل إلى ١٠٥ × ١٠^٦ خلية / مل بعد ٢٤ إلى ٣٦ ساعة.

٥- يقلل استخدام الخمائر الجافة النشطة الوقت والمشاكل التي تنشأ من عزل وتنقية وتحضير لقاح جديد.

٦- يكون التلوث الميكروبي في حالة استخدام الخمائر الجافة النشطة قليل أو قد يكون معدوماً. وقد تم اختبار ١٤ نوع من الخمائر الجافة النشطة المستخدمة على

نطاق تجاري بواسطة Hazen و Ingledew سنة ١٩٨٦م ووجدوا أنها تحتوي على أقل من ٠.٠٠٠٠٤٪ خمائر برية وأقل من ٠.٠٠٠٠٢٪ بكتيريا. ومن المتوقع أن تكون معظم الخمائر الجافة النشطة المستخدمة على نفس هذا المستوى من الجودة.

٧- استخدام الخمائر الجافة النشطة غير مكلف نسبياً بالمقارنة بالبدائل.

٨- المعالجة الحرارية المطلوبة للمهروس في حالة استخدام الخمائر الجافة النشطة تكون أقل منها في حالة استخدام البدائل.

وعلى كل حال فإنه أصبح من المؤكد الآن أن معدل إنتاج الإيثانول يعود بشكل مباشر إلى أعداد خلايا الخميرة النشطة أثناء عملية التخمير. كما أن استخدام مستوى عالي من اللقاح يؤدي إلى تخمر أسرع ويقلل الوقت اللازم للوصول إلى الحد الأقصى من عدد الخلايا.

(٤,٥) تغذية الخميرة Yeast nutrition

لا بد من إمداد الخميرة أثناء إنتاج الإيثانول بقليل من الأكسجين، حيث أنه ضرورياً للتخليق الحيوي للأحماض الدهنية الغير مشبعة والليبيدات. وقد وجد أن الكمية اللازمة تتراوح من ٠.٥، إلى ١، مم زئبق وأي كمية من الأكسجين زيادة عن ذلك سوف تؤدي إلى نمو الخلايا على حساب إنتاج الإيثانول. والعناصر الغذائية الرئيسية التي تحتاجها خلايا الخميرة هي الكربون، والأكسجين، والنيتروجين، والهيدروجين، أما العناصر التي تليها في الأهمية فهي الفوسفور، والكبريت،

والمغنسيوم، أما المعادن مثل المنجنيز، والكوبالت، والنحاس، والزنك، وعوامل النمو العضوية مثل الأحماض الأمينية والأحماض النووية والفيتامينات فهي مطلوبة بكميات ضئيلة جداً. تضاف في عملية إنتاج الإيثانول على مستوى صناعي العناصر السابقة منفردة في صورة أملاح مثل أملاح الأمونيوم، والبوتاسيوم، والفوسفات، أو قد يكون لها مصدر واحد رخيص مثل منقوع الذرة. إن تقديم الغذاء للخميرة في كل أنواع التخمرات التي تقوم بها هو أمر هام وتمت التوصية به منذ أكثر من ٥٠ سنة وذلك لضمان الحصول على نمو كافي من الخميرة وتجنب التخمر البطيء، وكذلك توفير بيئة ذات سعة تنظيمية عالية. تشمل العناصر الغذائية التي قد تحتاجها بيئات الخميرة على مصادر النيتروجين ذات الوزن الجزيئي المنخفض، والفيتامينات، والعناصر المعدنية مثل الزنك والفوسفور والكبريت والمغنسيوم والكالسيوم. ويبدو أن مصادر النيتروجين منخفضة الوزن الجزيئي مثل أيونات الأمونيوم، هي الوحيدة التي لها تأثير حقيقي على معدل تكون ثاني أكسيد الكربون أثناء التخمر. وقد خلص العلماء إلى أن إضافة المواد الغذائية تعتبر أساسية عندما يكون محتوى المهرس من السكر أكثر من ١٦٪ (وزن/حجم).

وكثير من التركيبات المحتوية على العناصر الغذائية اللازمة للخميرة المستخدمة في تخمرات الإيثانول، متاحة في الأسواق. وبصفة عامة فإن منتجي هذه التركيبات يزودونها بما يشبه النشرة الداخلية التي توضح تركيبها وفوائدها. وللأسف فإن كثيراً من الموظفين الذين يعملون في مصانع الإيثانول غالباً لا يهتمون بتركيب مغذيات

الخميرة ولا بالغرض التي صنعت من أجله ولا بكيفية إفادتها للخميرة ولا حتى بمستوى أمان وقانونية هذه المواد.

وحتى عندما تكون أسباب إضافة المواد الغذائية للخميرة معروفة فإن الجرعات المثلى الاقتصادية ليس من السهل على الشخص غير المتخصص تقديرها. فعلى الرغم من أن تركيز النيتروجين المطلوب إضافته للتخمرات بصفة عامة يكون في حدود ١٥٠ مليجرام/ لتر فإن هذا التركيز قد يتراوح في تخمرات معينة من ١٠٠ إلى ٢٥٠ مليجرام/ لتر بل ذكر بعض العلماء أن وجود كمية كبيرة من النيتروجين القابل للتمثيل (أكثر من ٥٠٠ مليجرام/ لتر) وفي وجود الأكسجين تؤدي إلى زيادة سرعة تخمر البيئات المحتوية على تركيزات عالية جداً من السكر. وخلاصة القول أن تركيز مغذيات الخميرة في بيئة التخمر يختلف باختلاف تركيب وظروف بيئة التخمر ولا يوجد تركيز ثابت لكل أنواع التخمر.

تعتبر أيونات الأمونيوم هي أحد أهم مصادر النيتروجين التي تستفيد بها الخميرة *Saccharomyces spp*، أما اليوريا فلا توجد حتى الآن في أي خليط يباع على المستوى التجاري كغذاء للخميرة على الرغم من أن اليوريا تستخدم كمصدر للنيتروجين بالنسبة للخميرة المستعملة في إنتاج الإيثانول كوقود. أما بالنسبة لاستخدام اليوريا كمصدر للنيتروجين للخميرة المستخدمة في إنتاج المشروبات الكحولية فإن هناك أسئلة كثيرة تتعلق بمدى أمان استخدام اليوريا كأحد مكونات التخمر. والسبب في ذلك هي تلك الأبحاث التي أجريت بواسطة Ingledew سنة ١٩٩٣م والتي جعلته يعتقد أن هناك تفاعل يتم بين اليوريا والإيثانول في وجود

حرارة مرتفعة ليتكون المركب إيثايل كاربامات Ethyl carbamate. وقد ثبت أنه مسرطن وهذه تعتبر مشكلة كبيرة بالنسبة لصناعة المشروبات الكحولية وخصوصاً أنه لا يوجد ضمان يؤكد إمكانية فصل هذا المركب بالكامل بعد إتمام عملية التخمير.

ولعله من المعروف جيداً أن الخمائر لا تستطيع تمثيل البيبتيدات (فيما عدا عدد قليل من ثنائيات البيبتيدات) وهذا هو السبب في أن مصادر النيتروجين اللازمة لخميرة التخمير لا بد أن تكون مركبات نيتروجينية منخفضة الوزن الجزيئي، حيث أن المركبات النيتروجينية المعقدة غير صالحة. وتركيز النيتروجين الميسر في كثير من المواد الخام قد يكون كافياً لعملية التخمير، فقد وجد على سبيل المثال أن عصائر العنب تحتوي على مصادر ميسرة للنيتروجين تزيد عن حاجة الخميرة.

يعتبر عنصرا الكبريت والفوسفور من العناصر المهمة جداً لنمو ونشاط الخميرة ولكن التركيز المطلوب منهما يجب أن لا يزيد عن ١ و ٤٪ على الترتيب من وزن الخميرة الجاف المتوقع الحصول عليه. أما بالنسبة لتركيزات العناصر الأخرى فهي صغيرة جداً على الرغم من أن مستويات عنصري الكالسيوم والماغنسيوم تختلف اختلاف كبير من غذاء إلى آخر. ولكن بصفة عامة وجد العلماء أن الماغنسيوم ضروري للحصول على إنتاج أمثل من الإيثانول كما أن نقص الماغنسيوم والكالسيوم يؤدي إلى بطء عملية التخمير.

والاتجاه السائد في صناعة الكحول هو مراعاة الناحية الاقتصادية، فمصانع التخمير الكبيرة التي تستخدم تركيز عالي من السكر القابل للتخمير تسمح بإنتاج تركيز عالي من الإيثانول في نفس الظروف الطبيعية ونفس العمالة تقريباً ونفس الخدمات

التي توجد في المصانع الصغيرة. وقد يكون الفرق الوحيد هو تغذية الخميرة، هذا العامل الذي يهمله كثير من المنتجين الذين لا تتوفر لديهم الخبرة الكافية. ومعنى ذلك أنه لا بد من الاهتمام الشديد بتغذية الخميرة عند تطبيق تقنية متقدمة تمكن من الاستفادة من تركيز عالي من السكر، ولا بد من تحليل مغذيات الخميرة ومعرفة محتواها الكمي من العناصر الغذائية، ومعرفة حاجات الخميرة الحقيقية من مختلف العناصر، وحساب الكميات المطلوبة على حسب كمية الخميرة المتوقع الحصول عليها. إن تركيز غذاء الخميرة في إنتاج الإيثانول بغرض استخدامه كوقود ليس محدد بالقانون لحسن الحظ كما هو في حالة إنتاج الإيثانول في المشروبات الكحولية.

ولا بد أن تستمر الأبحاث في مجال الاستفادة من العناصر الغذائية السائدة في المواد الخام كمغذيات للخميرة. فعلى سبيل المثال في مهروس بعض الحبوب وفي عصير العنب فإن الحامض الأميني السائد في صورة حرة هو البرولين Proline. ونظراً لأن هذا الحامض لا يستفاد منه عادة في التخمرات فإنه يعتبر من مصادر النيتروجين الفاقدة، ولذلك توجهت الأبحاث في الفترة الأخيرة تجاه تعريف الظروف التي تجعل الخميرة تستفيد من هذا الحامض في مراحل النمو الأولى وقد أظهرت نتائج بعض الأبحاث أن الخميرة يمكن أن تستفيد من هذا الحامض ولكن فقط عندما يكون الأكسجين ميسر. أما بالنسبة لمهروس القمح فعلى الرغم من أنها تحتوي على كل الأحماض الأمينية التي تكفي الخميرة كمصدر للنيتروجين، إلا أن الأبحاث أثبتت أن وجود الحامض الأميني ليسين Lysine والحامض الأميني جليسين Glycine يسبب فقد حيوية الخميرة. ومعنى كل ذلك أنه في حالة استخدام القمح كمادة خام لا بد من

مراعاة مصدر النيتروجين جيداً فقد يكون المصدر متوفر ولكن قد يكون غير صالح، أو قد يؤدي إلى ضرر، ولذلك فإن إضافة النيتروجين القابل للتمثيل يجنب المنتج هذا الضرر، ويتم ذلك بإضافة إنزيم البروتياز الذي يتفاعل مع بروتينات القمح أو الببتيدات لتوفير النيتروجين اللازم للخميرة.

(٤,٦) العوامل التي تؤدي إلى خفض الإنتاج Yield-reducing factors

(٤,٦,١) نمو الخلية Cell growth

إن الهدف من إضافة الخميرة إلى المهروس في عملية التلقيح هو نموها وتكاثرها واحتفاظها بحيويتها. ولكن بالنسبة لإنتاج الإيثانول يجب ألا يزيد نمو الخميرة عن الحد الذي يسمح بالإنتاج الأمثل من الإيثانول لأن الزيادة عن هذا الحد سوف تستهلك المواد الكربوهيدراتية لصالح تكوين خلايا جديدة من الخميرة. كما أن نمو الخميرة يجب ألا يقل أيضاً عن الحد الذي يسمح بالإنتاج الأمثل من الإيثانول لأن عدم وجود عدد كافي من الخميرة سوف يتسبب أيضاً في نقص إنتاج الإيثانول وفي عدم قدرة الخميرة على مقاومة أي ظروف صعبة داخل المخمر. ونظراً لأن ظروف إنتاج الإيثانول تكون غير هوائية فإن كمية الطاقة المنتجة لكل وحدة جلوكوز مستهلكة تكون قليلة مما يحد من نمو الخميرة ويجعل معظم الكربون الموجود في الكربوهيدرات يتحول إلى إيثانول وثاني أكسيد الكربون. ويحتاج نمو الخميرة في نفس الوقت إلى ظروف هوائية. إنها معادلة صعبة تحتاج إلى دقة في التعامل وخبرة في مجال الميكروبيولوجي بحيث تتوفر ظروف شبه لا هوائية ولكنها فعالة وتسمح ببعض

التحولات في مسارات التفاعل بحيث تتكون خلايا جديدة كافية فقط لإنتاج الإيثانول.

ولتوضيح ذلك بالحسابات فإن وزن خلايا الخميرة الجافة في التخمرات الهوائية يزداد من ٠.٥ مليجرام/مل (حوالي ٢ × ١٠٦ خلية/مل) إلى ٥ مليجرام/مل أي أن هناك صافي زيادة في وزن الخلايا مقداره ٤.٥ مليجرام/مل. وعلى افتراض أن تركيبة الخميرة من العناصر كما قدرها العلماء هي $C_{3.72}H_{6.11}O_{1.95}N_{0.61}$ فقد توصل العلماء إلى أن الكربون يكون ٤٩.٣٪ من وزن الخلية وعلى ذلك فإن الزيادة في الخميرة أثناء التخمر والتي مقدارها ٤.٥ مليجرام/مل كما أشرنا تحتوي على ٢.٢ مليجرام كربون. وعلى افتراض أن كل الكربون المستخدم في تكوين خلايا جديدة يأتي من الجلوكوز فإن هذه الكمية من الخميرة النامية سوف تحتاج إلى ٥.٥ مليجرام جلوكوز/مل (٢.٢ × ١٨٠ / ٧٢). وهذه الكمية من الجلوكوز التي استهلكت في نمو الخميرة كان يمكن أن تعطي كمية من الإيثانول مقدارها ٠.٧٢ جرام/١٠٠ مل. أي أن تنشيط عملية التخمر عن طريق إمداد المخمر بكم كبير من أغذية الخميرة والأكسجين يمكن أن يؤدي إلى نمو غزير للخمير زائد عن الحد المطلوب مما يؤدي بدوره إلى فقد في كمية الإيثانول المنتجة تقدر بحوالي ٠.٧٢٪ (وزن/حجم).

أما في تخمرات مهروس الذرة والشعير بفرض إنتاج الإيثانول كوقود فإن صافي كمية الخميرة النامية المطلوب يجب ألا يزيد عن حوالي ١.٩ إلى ٢.١ جرام (وزن جاف) / لتر وهذه الكمية تعادل حوالي ٥٠٪ من الكمية النامية في التخمرات

العادية التي أوضحناها في المثال السابق، مما يعني تقليل نسبة الفاقد بحوالي ٥٠٪. وهذا الفقد الناتج من النمو الزائد للخميرة لا يكون واضحاً في التجارب العملية بقدر ما يكون واضحاً في المصانع.

وعلى ذلك يجب إضافة مغذيات الخميرة بحيث تكون محسوبة وتؤدي إلى تحول كل الجلوكوز إلى إيثانول تحت مستوى من الأكسجين محسوب أيضاً بحيث يؤدي إلى النمو المطلوب فقط من خلايا الخميرة (انظر توقف التخمر).

(٤،٦،٢) تكوين المنتجات الوسيطة By-product formation

تكون النواتج الثانوية يعتبر من العوامل الهامة التي تقلل محصول الإيثانول، ولكن كمية الفقد تتوقف على تركيز هذه النواتج التي نتناولها فيما يلي :

(٤،٦،٢،١) الأحماض العضوية Organic acids

الأحماض العضوية التي تتكون عن طريق دورة حامض الستريك تحت الظروف غير الهوائية تتراوح من ٠،٥٤ إلى ١،٠٤ جرام / لتر (حوالي ٠،٤-١٤ جرام/ كيلوجرام جلوكوز) على حسب مصدر النيتروجين المضاف. وقد وجدت أحماض المالك والفيوماريك والسكسينيك والأوكسالوأسيتك والجلوتاميك بتركيزات صغيرة في البيئة المتخمرة وقبل عملية التقطير. وعادة فإن أكثر من ١٪ من الجلوكوز تستهلك في تكوين هذه الأحماض. ولكن وجد بعض الباحثين أن تفاعل جانبي لتكوين الجليسرول والسكسينات يمكن أن يستهلك ٥٪ من المادة الخام، وإذا

أمكن تجنب ذلك فإنه يمكن الحصول على زيادة في محصول الإيثانول تقدر بحوالي ٢٠٧٪. يمكن أن يؤثر تغيير بعض العوامل في التخمر بدرجة كبيرة على تركيز هذه النواتج. فعلى سبيل المثال فقد وجد أن تكوين حامض البيروفيك يزداد إذا أضيف للبيئة ثاني أكسيد الكبريت، كذلك فإن مستوى حامض الخليك يزداد بزيادة الملح في البيئة وزيادة هذه الأحماض إلى درجة أكثر من معدل تفاعلها في اتجاه تكوين الإيثانول يمكن أن تثبط عملية التخمر. كذلك فإن مستويات هذه المركبات تزداد بزيادة الحرارة.

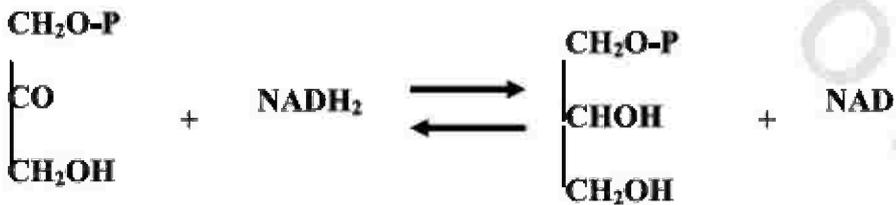
وقليلاً ما يحدث نقص في إنتاج الإيثانول لانخفاض الـ pH نتيجة الأحماض المتكونة ولكن انخفاض الـ pH أكثر من اللازم يؤثر على إنزيم الجلوكوأميليز الذي يحلل بقايا الدكسترين الموجودة في المحمر ولم تتحلل في مرحلة إعداد المهرس.

(٤٠٦٠٢٠٢) الجليسرول Glycerol

رغم أن إنتاج الجليسرول عن طريق الخميرة يعتبر غير اقتصادي بالمقارنة بعملية إنتاجه كإيواياً التي تعتمد على التصبن القلوي للدهون، إلا أن الطريقة الميكروبيولوجية تستحق إلقاء الضوء عليها لأنها إحدى أمثلة استخدام الخميرة في عمليات التخمرات الميكروبيولوجية منذ زمن قديم، حيث استخدمت هذه العمليات على نطاق واسع في ألمانيا لإنتاج الجليسرول بغرض استخدامه في صناعة المفرقات أثناء الحرب العالمية الأولى عندما كان يوجد نقص في الدهون اللازمة لإنتاج

الجليسرول، كما أنها أيضاً إحدى العمليات الهامة جداً التي تسبب خسارة في عملية إنتاج الإيثانول.

ولتوضيح كيفية إنتاج الجليسرول فلتذكر أن الناتج النهائي لعملية تحلل الجلوكوز هو حامض البيروفيك كما ورد شرحه في هذا الفصل. وكما هو معروف فإن حامض البيروفيك يدخل في عدة تفاعلات تختلف باختلاف الظروف البيئية والميكروب الذي يقوم بالتفاعل. ومن هذه التفاعلات دخول حامض البيروفيك في تفاعلات التخمر الكحولي، وأول خطوة هي نزع مجموعة الكربوكسيل منه ليتحول إلى أستالدهيد. ولكي يتم إنتاج الجليسرول لابد من التدخل لتعديل مسار التخمر الكحولي بحيث لا يستمر في اتجاه إنتاج الكحول ويتم هذا التعديل بإيقاف التفاعل عند نقطة الأستالدهيد بمجرد تكونها في الخطوة الأولى ويتم ذلك بعدة طرق منها إضافة مادة بيكبريتيت الصوديوم التي تكون مركب مع الأستالدهيد لا يدخل في التفاعل. وبذلك لا يعمل الأستالدهيد كمستقبل للأيدروجين في عملية إعادة أكسدة $NADH_2$ ويختزل إلى كحول، وبدلاً من ذلك يصبح السكر الثلاثي ثنائي هيدروكسي أستون فوسفات هو مستقبل الأيدروجين ويتكون الجليسرول كما يلي:



وفي عملية إنتاج الجليسرول عن طريق التخمر والتي كانت هي المتبعة في الماضي، يضاف ميكروب الخميرة إلى بيئة إنتاج الجليسرول التي تتكون من ١٠-٢٠٪ سكروز، ٥، ٪ نترات أمونيوم (NH₄NO₃) ، ٠،٧٥، ٪ فوسفات ثنائي البوتاسيوم (K₂HPO₄) ، ٤، ٪ كبريتيت صوديوم (Na₂SO₃) وآثار من كبريتات الماغنسيوم المائية (MgSO₄ · 7H₂O) ويتم التخمر في مخمرات تصل سعة كل منها إلى ١٢٥٠٠٠ جالون عند درجة حرارة ٣٠م° لمدة ٤٨-٦٠ ساعة ويتكون غاز ثاني أكسيد الكربون الذي يؤدي إلى تكوين الكبريتيت وذلك طبقاً للمعادلة الآتية :



والبكبريتيت المتكون يثبت الأستالدهيد في شكل المركب CH₃CH(OH)SO₃Na الذي يعمل في نفس الوقت كمادة مانعة لنمو أي ميكروبات أخرى ملوثة للبيئة ويجب التحكم ألياً في درجة الـ pH بحيث تظل ثابتة عند ٦،٨ بإضافة ثاني أكسيد الكبريت حتى لا تتكون تركيزات عالية من الأيونات غير العضوية. وعندما يستهلك السكر الموجود في البيئة يتم حصاد بيئة التخمر ثم يروق السائل الذي تم حصاده ويقطر لإزالة الكميات القليلة من الكحول والأستالدهيد وغازات الأمونيوم التي قد تتكون. لا يزيد محتوى سائل بيئة التخمر من الجليسرول عن ٤، ٪ ، ثم يعد ذلك يركز هذا السائل ويبرد لإزالة كبريتيت الصوديوم المتبقي عن طريق البلورة. قد يحتوي هذا المحلول المركز الخام على ١٨، ٪ جليسرول. وتسمى هذه الطريقة المستخدمة في إنتاج

الجليسرول بطريقة الكبريتيت الذائب. وتوجد طريقة أخرى لإنتاج الجليسرول تسمى الطريقة القلوية والتخمير فيها مشابه للطريقة السابقة ولكن يتم فيها الحفاظ على قلوية البيئة عن طريق إضافة كربونات الصوديوم الصلبة بشكل منتظم خلال الأربعة وعشرين ساعة الأولى (الكمية المضافة تصل إلى ٣.٥٪ وزن/حجم) وهذه القلوية تضمن تثبيت الأستالدهيد عن طريق تفاعل Cannizaro وبالتالي لا تكون هناك حاجة لإضافة الكبريتيت الذائب. ودرجة القلوية الشديدة هذه تجعل من المهم اختيار سلالات من الخميرة قادرة على هدم الكربوهيدرات تحت هذه الظروف. ويمكن بهذه الطريقة الحصول على سائل متخمير يحتوي على ٢٥٪ جليسرول ولكن لا تزال هناك مشاكل في هذه الطريقة لم تحل بعد من حيث استخلاص الجليسرول من السائل المتخمير.

عندما يرتفع رقم الـ pH (الجدول رقم ٤٠٢) في المهروس يحدث نقص في إنتاج الإيثانول حيث يتحول سكر الداى هيدروكسي أستون فوسفات Dihydroxyacetone phosphate (أحد نواتج عملية تحلل الجلوكوز التي يبدأ بها مسار إنتاج الإيثانول) إلى جليسرول كما سبق شرحه. وقد وجد العلماء أن مستويات الجليسرول في التخمرات العادية لمهروس الذرة قد تصل إلى ٧.٢٪ (وزن/وزن) من السكر المستهلك (على افتراض أن كل جرام جلوكوز ينتج عنه جرام جليسرول). كما أوضح علماء آخرون أن الجليسرول قد ينتج بمقدار ٧-٨ كيلو جرام أثناء التخمرات التي ينتج عنها ١٠٠ كيلو جرام إيثانول. وفي الأعمال التي قام بها Wallace سنة ١٩٨٦م وجد أن كل ١٠٠

كيلوجرام من السكر المستهلك قد ينتج عنها ٣,٤ كيلو جرام جليسرول. وعلى أية حال فإن مستويات الجليسرول المتكون أثناء تخمر الإيثانول يتحكم فيها عدد من العوامل أهمها:

- ١- تركيز السكر القابل للتخمير.
- ٢- درجة حرارة التخمر.
- ٣- قيمة رقم pH التخمر.
- ٤- سلالة الخميرة المستخدمة في إنتاج الإيثانول.
- ٥- مستويات الأكسجين.
- ٦- مستويات الأملاح والكبريتيت في المهروس.

ويتكون الجليسرول بواسطة الخميرة في وجود أيونات البيكبريتيت Bisulphite كما سبق توضيحه عند مستويات عالية من رقم الـ pH أو عندما تزال البيروفات من مسار التخمر لتستخدم كمصدر للكربون اللازم للنمو أو لتكوين نواتج نهائية أخرى غير الإيثانول. عندما يحدث ذلك لا تتوفر كمية كافية من الأستالدهيد المطلوبة لكي تتحد مع هيدروجين مرافق الإنزيم NADH₂ حتى تتم إعادة توليد مرافق الإنزيم في الصورة المؤكسدة NAD⁺ ليستمر مسار إنتاج الإيثانول في اتجاهه الصحيح. ونتيجة لذلك فإن عملية إعادة توليد مرافق الإنزيم في الصورة المؤكسدة NAD⁺ تكون

مصحوبة باختزال لسكر الداي هيدروكسي أسيتون فوسفات Dihydroxyacetone phosphate الذي يتحول إلى جليسرول.

الجدول رقم (٤٠٢). تأثير قيم رقم الـ pH على كمية نواتج تخمر الجلوكوز بواسطة الخميرة

Saccharomyces cerevisiae

قيمة رقم الـ pH						المنتج (ملي مول / ١٠٠ ملي مول جلوكوز)
٧,٦	٧	٦	٥	٤	٣	
١٣٠	١٥٠	١٦١	١٧٣	١٧٧	١٧١	الإيثانول
١٤٩	١٦١	١٧٧	١٨٨	١٩٠	١٨١	ثاني أكسيد الكربون
٣٢,٣	٢٢,٢	١٦,٢	٧,٨	٦,٧	٦,٢	الجليسرول
١٥,١	٨,٧	٠,٤	٠,٨	٠,٧	٠,٥	حامض الخليك
١,٤	١,٩	١,٦	٠,٥	٠,٤	٠,٨	حامض اللاكتيك
٠,٧	٠,٢	٠,٥	٠,٣	٠,٣	٠,٥	حامض السكسينيك

المصدر: (Rose and Harrison 1993)

الكحولات العالية Higher alcohols

قد تتكون الكحولات العالية مثل ن-بروبانول n-propanol والأيزوبيتانول Isobutanol و كحول الأمايل Amyl alcohol و كحول الأيزوأمايل Isoamyl alcohol أثناء التخمر.

وقد تتكون هذه الكحوليات إما من خلال مسارات الهدم Catabolic pathways وفيها تتحول الأحماض الأمينية إلى أحماض ألفا كيتونية α -keto acids والتي تنزع منها مجموعة الكربوكسيل ثم تتحول إلى كحوليات عالية، وإما من خلال مسارات البناء. وقد وجد العلماء أن مستويات تكون هذه الكحوليات أثناء إنتاج الإيثانول تكون في حدود ١٠٤-٢٠٥ جرام لكل كيلو جرام من المادة الخام. كما وجد العلماء أن تركيب المادة الخام وخصوصاً المواد المستخدمة كمصادر للنيتروجين أثناء التخمر تؤثر بدرجة كبيرة على مستوى الكحوليات العالية المتكونة، فعلى سبيل المثال فإن وجود مستوى منخفض من النيتروجين القابل للتمثيل بواسطة الخميرة يؤدي إلى انخفاض معدل نمو الخميرة وارتفاع معدل تكوين هذه الكحوليات وعندما يرتفع مستوى النيتروجين في البيئة يتوقف مسار بناء هذه الكحوليات. يؤثر كذلك نوع مصدر النيتروجين على طريقة تكوين الكحوليات العالية، فعلى سبيل المثال عندما تكون أيونات الأمونيوم هي مصدر النيتروجين فإن الكحوليات العالية تتكون عن طريق مسارات البناء وليس الهدم. تختلف كذلك مستويات تكوين الكحوليات العالية اختلافاً كبيراً باختلاف سلالة الخميرة المستخدمة في إنتاج الإيثانول، كما تختلف باختلاف درجة الحرارة حيث أن ارتفاع درجة الحرارة أكثر من اللازم يؤدي إلى تكوين الكحوليات العالية. كما تؤثر أيضاً درجة التهوية على تكوين هذه الكحوليات حيث أن التهوية المكثفة تؤدي إلى زيادة مستوياتها.

الإسترات Esters

قد يزداد إنتاج الإسترات مثل أسيتات الإيثايل Ethyl acetate وأسيتات

الأيزو إماميل Isoamyl acetate في تخمرات الإيثانول نتيجة التغيرات في درجات الحرارة، والخميرة المستخدمة، والتهوية (التهوية المنخفضة أثناء التخمر تثبط تكون الاسترات)، وإضافة الأحماض الدهنية غير المشبعة (توجد في حبوب الذرة وتنتج أثناء الطحن)، وتركيب بيئة التخمر.

بالنسبة لإنتاج الإيثانول كوقود وهو موضوع هذا الفصل فلا يعتقد أن كمية الاسترات المنتجة تنقص من إنتاج الإيثانول بدرجة معنوية.

(٤,٦,٣) الإصابة بالبكتيريا Bacterial infections

إن تلوث المخمرات بالميكروبات غير المرغوب فيها من أهم العوامل التي تؤدي إلى الحصول على منتجات غير مرغوب فيها وتكون النتيجة هي انخفاض محصول الإيثانول مما يؤدي إلى خسارة اقتصادية كبيرة. ولذلك فإنه من الأهمية بمكان بالنسبة للمنتجين أن يتم التنبؤ بحدوث التلوث واتخاذ الاحتياطات التي تضمن علاج المشكلة قبل ظهورها. إن وجود كمية يمكن قياسها من حامض الخليك في المخمر قد تكون مؤشر على حدوث تلوث بكتيري شديد. ومن المعروف أن حامض الخليك يؤثر على نمو الخميرة وعلى نشاطها التمثيلي حتى أن العلماء اعتبروا أن حامض الخليك هو أحد العوامل الرئيسية لتثبيط التخمر. ولكن وجود حامض الخليك لا يعني دائما التلوث البكتيري لأن الخميرة نفسها تنتج هذا الحامض بكميات قليلة. وعلى ذلك فإذا وجد حامض الخليك بكميات كبيرة قبل انتهاء التخمر فهذا دليل على حدوث التلوث البكتيري.

وقد قام Thomas وآخرون سنة ٢٠٠١م، بدراسة أثر التلوث بمختلف أنواع بكتيريا اللاكتوباسيلاي على التخمر الكحولي لمهروس الذرة. كان التلوث في هذه الدراسة يقصد أي أن الباحثين قاموا بإجراء تلوث محدد. ولكي يتم تنشيط التلوث قام هؤلاء الباحثون بإضافة بكتيريا اللاكتوباسيلاي إلى مهروس الذرة قبل بدأ التخمر. أي أنهم أعطوا فرصة للبكتيريا أن تنمو بعدد كبير قبل أن تبدأ الخميرة في النمو. ثم قاموا بعد ذلك بدراسة تأثير الخميرة على هذا النمو البكتيري في حالة التخمر المتقطع وفي حالة التخمر شبه المستمر.

وقد اتضح من الدراسة أن تلوث مهروس الذرة بمختلف أنواع بكتيريا اللاكتوباسيلاي في حالة التخمر المتقطع قد أدى إلى :

- ١- انخفاض محصول الإيثانول .
- ٢- زيادة تحول المواد الكربوهيدراتية إلى إنتاج الجليسرول وحامض اللاكتيك.
- ٣- فقد سريع في حيوية الخميرة بعد نفاذ السكريات.
- ٤- انخفاض تكاثر الخميرة في المهروس الذي يحتوي بالفعل على أعداد كبيرة من بكتيريا اللاكتوباسيلاي.
- ٥- تثبيط نمو بكتيريا اللاكتوباسيلاي في المهروس الذي يحتوي على عدد أكبر من الخميرة أو في المهروس الذي لقح بأعداد متساوية من الخميرة واللاكتوباسيلاي.

ولكن تحت ظروف التخمر شبه المستمر فإن أعداد البكتيريا الملوثة انخفضت حتى عندما كان عددها الابتدائي عالياً وذلك بعد عدد من دورات التخمر المتتالية

ووصلت إلى عدد لا يسبب مشكلة بالنسبة لإنتاج الإيثانول أو حيوية الخميرة. فبعد الانخفاض الأولي في عدد الخميرة فإن عددها يزداد مع توالي دورات التخمر ويصاحب ذلك انخفاض متناسب في أعداد اللاكتوباسيلاي، أي أنه وبصفة عامة يمكن القول إذا لم يكن المهروس التي تم إدخاله إلى المخمر أثناء التخمر شبه المستمر ملوثة بأجيال جديدة من البكتيريا وإذا لم تكن أنابيب النقل ملوثة فإن نظام التخمر شبه المستمر (ومن باب أولى النظام المستمر) يكون قادراً على إعادة تنظيم عدد الخميرة بحيث تغطي على نمو بكتيريا التلوث الابتدائي وتقلل عددها وتظل عملية التخمر بدون فقد في الإيثانول أو في حيوية الخميرة. والأعمال التي تم نشرها والخاصة بتأثير تلوث مصانع الإيثانول ببكتيريا الجنس *Lactobacillus* تتناول بالتفصيل تأثير نواتج نشاط هذه البكتيريا على نمو الخميرة ونشاطها التمثيلي. فخطورة بكتيريا اللاكتوباسيلاي هي أنها ليس فقط لديها المقدرة على تحمل درجات عالية من الحموضة وتحمل تركيزات عالية نسبياً من الإيثانول ولكن أيضاً يمكن أن تتكاثر تحت ظروف التخمر الكحولي. وقد خلصت هذه الدراسة وغيرها إلى أنه إذا كان عدد الخميرة أعلى أو على الأقل مساوياً لعدد بكتيريا اللاكتوباسيلاي فإن الأخيرة يتم تثبيط نموها. ويرجع ذلك إلى سببين على الأقل، الأول هو انخفاض العناصر الغذائية المتاحة بالنسبة للبكتيريا بسبب التنافس بينها وبين الخميرة، وحيث أن حجم خلية الخميرة يزيد عن حجم خلية بكتيريا اللاكتوباسيلاي بحوالي ٢٠٥٠ مرة فإن كمية أكبر من المواد الغذائية سوف تستهلك بواسطة الخميرة مما يجعل التنافس ينتهي لصالحها. أما السبب الثاني فهو أن الإيثانول المنتج بواسطة الخميرة يسبب تثبيط

لتكاثر البكتيريا.

أما إذا كان التلوث بعدد كبير من البكتيريا أو إذا أخذت البكتيريا فرصة للنمو قبل نمو الخميرة فإن الفقد في محصول الإيثانول يصل إلى ٢٢٪. أي أن نسبة الفاقد في محصول الإيثانول تتوقف على مدى شدة التلوث.

وعلى الرغم من أن بكتيريا اللاكتوباسيلاي لا تنتج الجليسرول في غياب الخميرة إلا أن إنتاج الجليسرول بواسطة الخميرة يزداد في وجود بكتيريا اللاكتوباسيلاي. والسبب في ذلك غير معروف. ويبدو أن هناك علاقة بين إنتاج حامض الخليك بواسطة البكتيريا وإنتاج الجليسرول بواسطة الخميرة ولكن لا توجد معلومات كافية لتأكيد ذلك. ولسنوات عديدة كان العمل الرئيسي في مقاومة تلوث بيئة التخمر بالبكتيريا هو الضبط الروتيني لرقم الـ pH ليكون ٥ أو أقل. ولكن بدأ المنتجون بعد ذلك في إضافة البنسلين إلى المخمرات لكي يثبط من نمو بكتيريا حامض اللبن الموجبة لجرام. والحقيقة أن هناك أضرار عديدة تنتج عن تلوث تخمر الإيثانول بالبكتيريا وتؤدي إلى إطالة وقت التخمر، ففي تخمرات إنتاج الإيثانول كوقود فإن ملوثات التخمر من البكتيريا تنافس الخميرة على السكر القابل للتخمر وتنتج نواتج أخرى تنقص من إنتاج الإيثانول كما تحدث اضطراب في كل مراحل الإنتاج. كما أن الملوثات من البكتيريا قد تنتج مواد تثبط من نمو الخميرة ونشاطها التمثيلي أو تثبط من نشاط إنزيم الجلوكو أميليز الهام في إنتاج السكريات القابلة للتخمر. كذلك فإن البكتيريا الملوثة لبيئة تخمر الإيثانول قد تنتج إنزيمات بكتيرية تغير نوع التخمر بالكلية. كما أن بعض العلماء وجدوا أن التلوث الشديد قد ينتج عنه ارتفاع في درجة الحرارة

تزيد عن سعة التبريد الخاصة بالمخمر. وقد أوضح العلماء منذ فترة طويلة مثل Dolan سنة ١٩٧٦م أن التلوث بالبكتيريا بمعدل ١٠-١٠ خلية/مل يمكن أن يسبب فقد في إنتاج الإيثانول بمقدار ١-٣٪ وأن التلوث بمستوى من البكتيريا يزيد عن ١٠ خلية/مل يسبب فقد في إنتاج الإيثانول مقداره ٥٪. ويجب أن يعي القارئ أن هذه الكميات المفقودة هي كميات كبيرة فعلى سبيل المثال فإن فقد مقداره ٣٪ بالنسبة لمصنع ينتج ٢٠٠ كيلو إيثانول في اليوم يعني فقد مقداره ٢٢٠٠ كيلو سنوياً. أما بالنسبة للتلوث ببكتيريا حامض اللبن بالذات فقد وجد العلماء أنها تحدث فقد في إنتاج الإيثانول قد يزيد عن ٢٠٪. كل هذا يوضح أهمية كل من درجات التحكم في عملية التخمير ومهارة العاملين في مثل هذه المصانع.

ويوضح الشكل رقم (٤٠١) بعض النواتج الوسيطة بواسطة بعض البكتيريا التي قد تلوث عملية تخمر إنتاج الإيثانول كوقود. وفي هذا الشكل يلاحظ أن كل ميكروب يسلك طريق مختلف لتمثيل حامض البيروفيك الناتج من الجلوكوز وبالتالي فإن الناتج النهائي يختلف عن الناتج النهائي للخميرة التي تحول حامض البيروفيك إلى إيثانول وغاز ثاني أكسيد الكربون.

وكبديل لذلك فإن بكتيريا حامض اللبن المقاومة للحرارة والتي قد تلوث مصانع إنتاج الإيثانول كوقود تقوم بتحويل الجلوكوز إلى حامض اللبن. وإذا وجدت هذه البكتيريا بأعداد كبيرة فإنها تنتج كمية معنوية جداً من حامض اللبن وتخفض رقم pH المهروس إلى أقل من ٤ وينتج عن ذلك تثبيط لإنزيم الجلوكو أميليز مما ينتج عنه نقص شديد في إنتاج الإيثانول. كما قد يحدث تلوث أيضاً ببكتيريا مجموعة القولون

(ليست مبينة بالشكل رقم ٤٠١). وتقوم هذه المجموعة من البكتيريا بتحويل الجلوكوز إلى خليط من الهيدروجين وثنائي أكسيد الكربون وحامض الفورميك وحامض الخليك والإيثانول والأسيتون بنسب تختلف باختلاف نوع البكتيريا الموجودة. وهذه البكتيريا تفسد عملية التخمير وخصوصاً إذا كانت أعداد الخميرة منخفضة ولا تستطيع أن تنجز التخمير بدرجة سريعة. وتنمو بكتيريا القولون بسرعة وتقلل من إنتاج الإيثانول ولكنها تموت عندما ينخفض رقم الـ pH إلى أقل من ٥ ولا توجد حية أو نشطة في المنتج النهائي للمهروس المتخمير.

تعتبر بكتيريا الكلوستريديوم سائدة في الحبوب نظراً لأن جراثيمها تتحمل درجات حرارة عالية. وتستطيع هذه البكتيريا أن تحول الجلوكوز إلى أسيتون و حامض خليك و بيوتانول و حامض بيوتيريك و هيدروجين و ثنائي أكسيد الكربون. والسبب الرئيسي للتلوث بهذه البكتيريا هو أن جراثيمها تعيش في درجات حرارة عالية ولذلك تتحمل درجات حرارة إعداد المهروس أي تحويل نشأ الحبوب إلى سكريات قابلة للتخمير، كما أن الظروف غير الهوائية التي غالباً ما تتوفر في بعض مراحل التخمير تساعد على نشاط هذه البكتيريا.

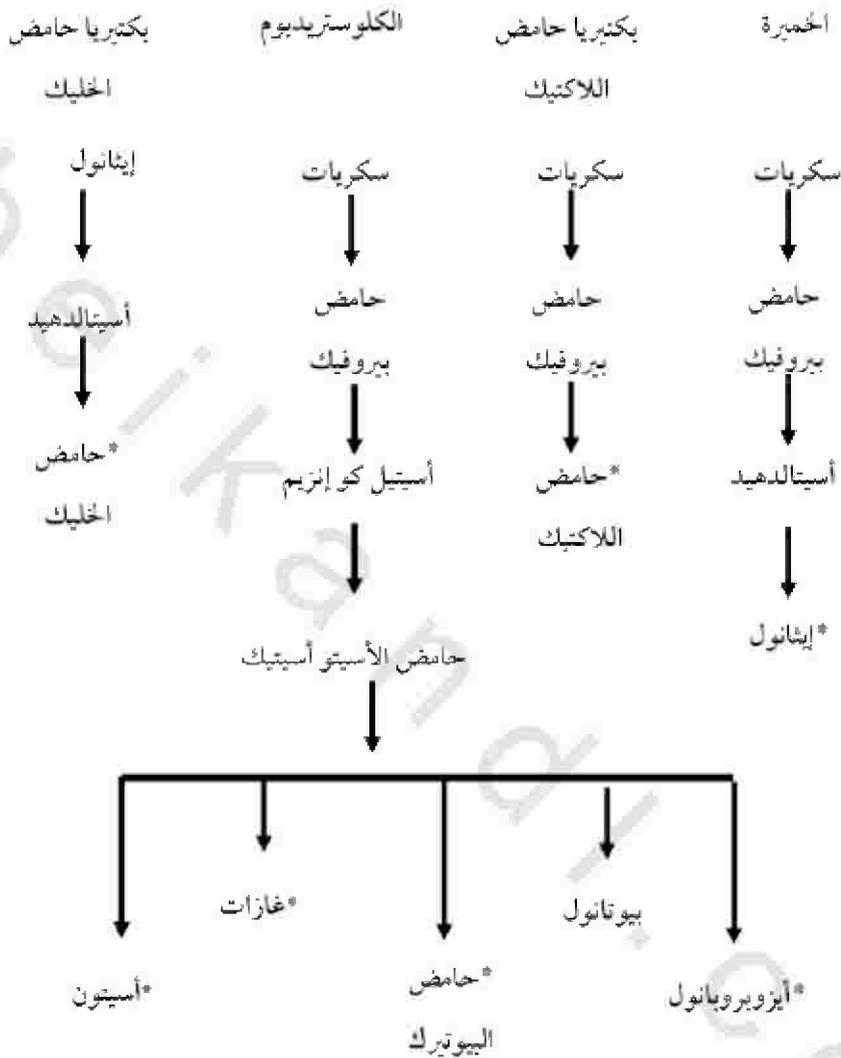
قد يؤدي التلوث ببكتيريا حامض الخليك أيضاً إلى نقص معنوي في كمية الإيثانول المنتجة . ذلك لأن المادة الخام لبكتيريا حامض الخليك هي الإيثانول المنتج بواسطة الخميرة، فإذا ما تواجدت بكتيريا حامض الخليك فإنها تقوم بتحويل الإيثانول إلى أسيتالدهيد ثم إلى حامض خليك . ومن المعروف أن بكتيريا

حامض الخليك تحتاج إلى هواء ولذلك فإن التفاعل الذي تقوم به يحدث عندما لا يتم استخلاص الإيثانول المنتج بعد انتهاء عملية التخمير مباشرة دون الانتظار لبعض الوقت كما يحدث في المصانع التي تدار بواسطة موظفين ليس لديهم خبرة ميكروبيولوجية.

وبصفة عامة فإن الفقد في إنتاج الإيثانول الذي يحدث نتيجة التلوث بالبكتيريا يتوقف على نوع هذه البكتيريا وعددها والوقت المتاح لها لكي تقوم بتمثيل الجلوكوز أو الإيثانول. وقد قدر العلماء أن العدد الذي يمكن أن يسبب فقد في الإيثانول يجب أن يكون أكثر من ١٠/١ مل وأن الوقت اللازم لكي يكون الفقد معنوي هو عدة ساعات.

(٤, ٦, ٤) التثبيط بالمنتج Product inhibition

الخمائر حساسة جداً للإيثانول الذي تنتجه حتى أن بعض السلالات يتأثر نموه عند تركيز ٢٪ إيثانول كما وجد أن ١٠٪ إيثانول تقريباً يوقف نمو معظم خلايا الخمائر. وقد وجد أن تأثير الكحول يكون أشد عندما تكون الخمائر في طور التأقلم حيث يمنع تخليق بروتين الخلية ويحدث دنثرة للإنزيمات وبالتالي يمنع تكاثرها وعلى ذلك فإن الحصول على سلالات تتحمل تركيزات عالية من الكحول يعتبر من أهم العوامل التي تؤدي إلى إنتاج عالي من الكحول وذلك على المستوى الصناعي.



الشكل رقم (٤٠٢) النواتج الوسيطة بواسطة مجموعات مختلفة من الميكروبات التي قد تتواجد أثناء تخمر الإيثانول.

*نواتج نهائية ، وكل سهم يمكن أن يمثل تفعل أو عدة تفاعلات إنزيمية.

(٤, ٦, ٥) توقف التخمر Stuck fermentation

المقصود بتوقف التخمر هو أن يكون معدل تمثيل السكر بطيء جداً خصوصاً في المراحل الأخيرة للتخمر. ويسبب هذا مشكلة كبيرة في إنتاج الإيثانول بفرض استخدامه كوقود. وقد أوضحت الأبحاث أن نقص العناصر الغذائية الخاصة بنمو الخميرة في المهوروس هي السبب الرئيس لما يسمى بتوقف التخمر. أهم العناصر التي تسبب توقف التخمر هو نقص النيتروجين الصالح للخميرة ولذلك فقد أوضح Ingledew سنة ١٩٨٦ م، أنه يجب إضافة النيتروجين القابل للتمثيل بواسطة الخميرة إلى المهوروس الذي ينقصه هذا العنصر. ويجب أن يعلم المنتجين أن الخميرة المستخدمة في الإنتاج الصناعي للكحول ليست ميكروبات هادمة للبروتين ولكنها تستطيع فقط الاستفادة من المواد النيتروجينية منخفضة الوزن الجزيئي. ويقدر العلماء كمية النيتروجين القابلة للتمثيل والمفروض إضافتها للتخميرات التي تعاني من مشكلة توقف التخمر بحوالي ١٥٠ مليجرام/ لتر ولكن يجب أن يكون معلوماً أن هذه الكمية تعتمد على تركيز السكر في البيئة، فكلما زاد تركيز السكر كلما زادت الكمية المطلوبة من النيتروجين القابل للتمثيل.

وقد وجد أنه من الممكن تجنب مشكلة توقف التخمر في المهوروس الذي ينقصه العناصر الغذائية للخميرة نهائياً إذا أمكن زيادة أعداد خميرة اللقاح لتصل إلى حوالي ٨ × ١٠ خلية/ مل حيث فسّر العلماء ذلك بأن العناصر الغذائية اللازمة لنمو الخميرة تتحرر من الخلايا الميتة وتصبح ميسرة للخلايا النشطة. ولكن من ناحية أخرى فإن هذا المستوى المرتفع من اللقاح يعتبر غير عملي، كما أن استخدام لقاح من

الخميرة الجافة النشطة ليعطي هذا العدد يعتبر مكلف ، ولذلك فإن استخدام تقنيات أخرى مثل تقنية إعادة تدوير الخميرة Yeast-recycling technique يمكن أن تكون مفيدة وعملية. وعلى أية حال فإن هناك أبحاث كثيرة تتناول المتطلبات النيتروجينية للخميرة الجافة النشطة التي تستخدم كلقاح في إنتاج الإيثانول كوقود وهذه الأبحاث تتناول العلاقة المعقدة بين العناصر الميسرة وبين مقدرة الخميرة على أن تخمر كميات كبيرة من السكر بكفاءة عالية وهي كلها علاقات فسيولوجية لا تدخل في الغرض من هذا الكتاب.

الأكسجين من العناصر الهامة الأخرى التي تدخل تحت العوامل المسئولة عن توقف التخمر. فلا بد أن يدرك المنتج أن عملية إنتاج الإيثانول هي عملية غير هوائية ولكن من المدهش أن الخميرة أيضاً لا يمكن أن تنمو في غياب كامل للأكسجين فهو عنصر شديد الأهمية (بكميات صغيرة) بالنسبة للخميرة حتى يمكنها أن تصنع الأحماض الدهنية غير المشبعة والإسترولات وهي مواد أساسية في تركيب الغشاء الخلوي للخميرة. ومستحيل أن تنمو الخميرة بدون وجود تركيزات معينة من هذه المواد التي لا تستطيع تصنيعها إلا في وجود الأكسجين ولو بكمية قليلة. ولذلك فإن الضخ الروتيني لكمية من الأكسجين مقدارها ٨ مليجرام/ لتر هي عملية ضرورية خصوصاً في الإنتاج الصناعي للإيثانول والذي فيه يعاد استخدام الخميرة التي تنتجها عملية التخمر. وقد أوضحت أبحاث O'Connor-Cox و Ingledew سنة ١٩٩٠م، أن الوقت الأمثل لضخ كمية من الأكسجين هو ١٠-١٤ ساعة بعد بداية التخمر، حيث

أن الخميرة في هذه المرحلة تكون قد نمت واستهلكت الأكسجين الموجود في المخمر في تصنيع الغشاء الحيوي.

وفي تخمرات عصير العنب يحدث أيضاً بطيء أو توقف عندما ينفد الأكسجين أثناء تحضير العصير وأثناء التخمر ويصبح هذا التأثير أكثر وضوحاً عندما لا يتوفر النيتروجين القابل للتمثيل، وهذا هو السبب في أن الخميرة الجافة النشطة هي التي يوصي بها العلماء لكي تستخدم كلقاح في الإنتاج الصناعي للكحول، ذلك لأن هذه الخميرة تنتج تحت مستوي عالي جداً من التهوية ولذلك تحتوي خلاياها على كميات كبيرة من الأحماض الدهنية غير المشبعة والإستروولات والتي تساعد على الاستمرار في التكاثر تحت الظروف التي يقل فيها الهواء حيث تستطيع الخلية الجديدة مشاركة الخلية الأم في هذه المركبات. وعلى أية حال فقد وجد العلماء أن إضافة الإرجوسترول Ergosterol وحامض الأوليك Oleic acid يمكن أن تغني عن إضافة الأكسجين. كما وضح العلماء أن الأكسجين ضروري فقط حتى الوصول إلى عدد كافي من الخلايا يكون قادراً على تحويل تركيزات عالية من السكر إلى إيثانول في وقت معقول.

(٤,٧) ضبط الإنتاج والجودة Process and quality control

هناك طرق متاحة في كثير من النشرات والكتب العملية خاصة بالاختبارات العملية والتي تشمل قياس كمية السكريات القابلة للتخمر، والرطوبة، وتحليل كامل للحبوب، ونسبة المواد الصلبة، وقياس كمية النشا والسكريات المختزلة والمواد الصلبة الذائبة، وأعداد الخميرة، وقياس الإيثانول. وعلى الرغم من أن التخمر يعتبر

أقدم عملية تكنوحيوية تم معرفتها إلا أنه في حالات كثيرة ما زال ينظر إليها على أنها فن أكثر منها علم. وبصفة عامة فإن العوامل التي يجب أن تؤخذ في الاعتبار عند إنتاج الإيثانول بغرض استخدامه كوقود هي كما يلي :

١- التحكم في الجودة: وتشمل التحكم في مستوى المعادن الثقيلة، الحالة الحيوية للحبوب، ومستوى الرطوبة في الحبوب، ومدى التلف، و كمية المواد الغريبة في الحبوب، ووجود أو عدم وجود فطريات على الحبوب ، ومحتوى الحبوب من النشا، واللزوجة أثناء عملية الطبخ ، واستخلاص المنتج ، والمواد المضافة للمادة الخام، واستخدام أجهزة حديثة للقيام بالتحليلات السريعة، ثم بعض العوامل المتخصصة مثل الإنزيمات وسلالة الخميرة .. الخ .

٢- يجب الاهتمام الشديد باختيار مواد خام أولية بها نسبة عالية من السكريات القابلة للتخمير، فوجود سكريات قابلة للتخمير هو أساس نجاح عملية إنتاج الكحول، كذلك يجب استخدام أجهزة خلط جيدة تسمح بتعرض كل المادة الخام لإنزيمات التسكر.

٣- التحكم في كمية المواد الصلبة بالجرام/ ١٠٠ جرام من المحلول وتعرف بدرجة البريكس Brix وتقاس بها يعرف بالبلاطو Plato ويتبع هذه النقطة التأكد من استمرار تحول المتبقي من الدكسترين إلى جلوكوز بعد بدأ التخمير.

٤- درجة الـ pH : درجة الـ pH الشائعة في تخمرات الإيثانول هي ٥,٦ وتنخفض إلى ٣,٨-٤,٢ وأي انخفاض أقل من ٣,٨ يعتبر مؤشر لإمكانية التلوث بالبكتيريا المنتجة للأحماض مثل بكتيريا حامض اللاكتيك . ويتم معايرة الحامض باستخدام

هيدروكسيد الصوديوم ٠.١ عياري وذلك في عينة من المهروس المضاف إليه دليل الفينولفثالين.

٥- التلوث : يجب أن يكون العدد الكلي للبكتيريا أقل من ١٥٠٠١٥٪ من عدد الخميرة ويمكن قياس عدد البكتيريا بسهولة باستخدام البيئات الغذائية الموصى بها والتي تحتوي على مشبطات للخميرة حتى لا تدخل ضمن عدد البكتيريا. يمكن خفض أعداد الملوثات من البكتيريا إلى حد كبير عن طريق تعقيم الأدوات وتسخين الأوعية وأنايب الربط بين وحدات التخمير إلى أكثر من ٧٠ م. كما يجب أن تكون عينات البيئة المتخمرة التي يتم سحبها للتحليل نقية وومثلة للوسط التي سحبت منه وليست ملوثة بمواد من خارج المخمر.

٦- عدد الخميرة: يجب التأكد من تكاثر الخميرة داخل المخمر ، وقد يتم تقدير أعداد الخميرة باستخدام الزرع المباشر على أطباق بتري المحتوية على بيئات غذائية مناسبة أو باستخدام شرائح مصبوغة.

٧- الإيثانول : يمكن قياس الإيثانول عن طريق عملية التقطير أو إنزيمياً بواسطة إنزيم الكحول دي هيدروجينيز Alcohol dehydrogenase أو بواسطة جهاز GLC (Gas-liquid chromatography) أو جهاز HPLC (High Pressure Liquid Chromatography).

٨- الحرارة : عادة ما تكون درجات حرارة التخمير ما بين ٣٠-٣٥ م، والطاقة الحرارية التي تنتجها الخميرة من تخمير ٩ جرام جلوكوز هي حوالي ١,٧٩ كيلو كالوري، وهذه الكمية من الطاقة كافية لرفع درجة حرارة البيئة المحتوية على

- ١٠٪ جلوكوز (وزن/حجم) بمقدار ١٧,٩ درجة مئوية. وما يفقد بالتبخير من هذه الحرارة هو جزء صغير (٥٪) ولذلك فإن ٣٠٪ على الأقل من هذه الحرارة يجب التخلص منها وخصوصاً عندما تكون الخميرة في حالة نشاط تمثيلي عالي .
- ٩- تغذية الخميرة لا بد من التحكم في مغذيات الخميرة كما سبق شرحه .
- ١٠- الحسابات الخاصة بمحصول الإيثانول وكفاءة التخمير.. الخ وقد سبق شرحها.

(٤,٨) تقنيات جديدة New technologies

تتعلق التقنيات الجديدة في صناعة الكحول بثلاثة أقسام رئيسية وهي المواد الخام ، والخمائر ، والعملية الإنتاجية . وقبل تناول هذه الأقسام الرئيسية يجدر الإشارة إلى أن تطوير وتحسين إنتاج الإيثانول كوقود لم يكن سهلاً فقد كان وما زال عملية صعبة لأسباب أهمها ما يلي :

- ١- استخدام الإيثانول كوقود مازال يلقي منافسة شديدة من جانب الصناعات البترولية.
- ٢- العمليات غير الصحيحة المتبعة بشكل تقليدي في المصانع الصغيرة لإنتاج الإيثانول كوقود.
- ٣- لا يتوفر من المواد الخام الصالحة لإنتاج الإيثانول كوقود سوى قصب السكر (في المناطق الاستوائية) والمولاس والحبوب (في المناطق المعتدلة). وسوف يظل هذا العامل عائقاً لإنتاج الإيثانول كوقود حتى تتوفر التقنيات التي تحلل السليلوز إلى سكريات قابلة للتخمير بتكلفة منخفضة.

وسوف يستمر التغيير في التقنيات بغرض خفض تكاليف إنتاج الإيثانول كوقود. ومنذ سنة ١٩٩٢م بدأ الحديث عن التكلفة المستقبلية للإيثانول والتي قدرت بنحو ٣٠ سنتاً (كندي) لكل واحد لتر.

وفيما يلي نلقي الضوء على التقنيات الجديدة في مجال الأقسام الثلاث التي سبق الإشارة إليها.

(١، ٨، ٤) السليلولوز كمادة أولية Cellulose as a substrate

إن الحصول على الإيثانول كوقود من خلال المواد السليلوزية يساهم إلى حد كبير في نظافة البيئة، لأن إنتاج الإيثانول من المواد الحيوية Biomass أي المواد ذات الأصل النباتي واستخدامه في وسائل النقل لا ينتج عنه ملوثات للبيئة.

وهناك أعداد رهيبية من الأبحاث تركز الآن على استخدام المواد السليلوزية كمواد خام لإنتاج الإيثانول مما جعل العلماء يوقنون أن هذه هي مواد المستقبل غير البعيد لإنتاج الإيثانول كوقود، إلا أنه لا توجد حتى الآن مصانع لإنتاج الإيثانول من السليلولوز نظراً لأن بعض الصعوبات الخاصة باقتصاديات عملية التسكير (تحويل المواد السليلوزية إلى سكريات قابلة للتخمير) ما زالت قائمة.

وقد أوضحت جميع الدراسات الاقتصادية أن التكلفة الكلية لإنتاج الإيثانول تعتمد بشكل أساسي على سعر المادة الخام التي تشكل ما بين ٦٠-٧٠٪ من التكلفة الكلية. ولذلك فإن عمليات جديدة لا بد من تطويرها للحصول على هذا الإيثانول من مواد رخيصة الثمن مثل المواد الليجنوسليلوزية.

Composition of cellulose (٤٠٨٠١٠١) تركيب السليولوز

معظم المواد السليولوزية تتكون من ثلاث مكونات عضوية رئيسية وهي السليولوز والهيميسليولوز واللجنين. ويختلف التركيب باختلاف مصدر المادة ويصاحب ذلك اختلاف في سهولة تحلل المواد. تتكون المواد السليولوزية من ٤٠٪ سليولوز، ٣٠٪ هيميسليولوز، و ٢٠-٣٠٪ لجنين. ولا يمكن الاستفادة التامة من المواد السليولوزية بدون الاستفادة من الهيميسليولوز الذي يتكون من الزيلان والذي يمكن أن يتحلل بسهولة نسبية إلى وحدات من الزيولوز. ونظراً لأن الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* المستخدمة تقليدياً في إنتاج الإيثانول لا يمكنها تمثيل الزيولوز بشكل مباشر إلى إيثانول فإن كثير من العلماء مثل Lee وآخرون سنة ٢٠٠١م و Eliasson وآخرون سنة ٢٠٠١م، يعتقدون أن إنتاج سلالات من الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* لها القدرة على تخمير الزيولوز سيكون له فائدة أكبر وذلك لأن هذه الخميرة تتحمل تركيزات عالية من الإيثانول المنتج على المستوى الصناعي كما أن المعلومات الخاصة بتركيبها الوراثي معروفة بشكل جيد.

أما البقايا النباتية المتحللة جزئياً أو نصف المتحللة والمدفونة في الأرض والتي تسمى Peat فهي مواد سليولوزية سائدة ولم يتم الاستفادة منها حتى الآن. ويوجد أكثر من ٢٥٠ بليون طن من هذه المواد منها ٦٠٪ في دول الاتحاد السوفيتي سابقاً و ٨٪ في فنلندا وكندا. ويعتمد تركيب ال Peat على الأصل الذي تكون منه ويختلف تركيب النوع الواحد باختلاف العمق الذي يوجد عليه في الأرض. وعادة ما تحتوي

الطبقة العليا منه على أكثر من ٢٠٪ سليولوز وعلى كمية كبيرة أيضاً من الهيميسليولوز.

(٤٠٨٠١٠٢) معالجة المواد السليولوزية قبل عملية التحلل

Pretreatment of cellulosic materials

قبل تحويل المواد الليجنوسليولوزية إلى إيثانول فإن الجزء السليولوزي في هذه المواد يجب تحليله، بحيث يتحول إلى جلوكوز قابل للتخمر بواسطة الميكروبات. والمعالجة ذات الكفاءة العالية يجب أن تفقد المادة السليولوزية بنائها البلوري. تعتبر إزالة اللجنين أيضاً ضرورة حيث وجد أن إزالة ثلث لجنين الخشب الصلب أو ثلثي لجنين الخشب الطري أدت إلى زيادة قابلية هذه المواد للهدم بمقدار ٦٠٪.

ومعالجة المواد السليولوزية في الحقيقة هي المشكلة الرئيسية التي تعترض استخدامها كمادة خام لإنتاج الإيثانول، بسبب الثبات الكيماوي لسلسلة السليولوز وبسبب حماية الأنسجة النباتية بواسطة اللجنين مما يجعل العملية مكلفة وغير اقتصادية.

وبصفة عامة هناك ثلاث طرق رئيسية للحصول على السكريات القابلة للتخمر إلى إيثانول من المواد السليولوزية وهي المعاملة بالحامض والمعاملة الإنزيمية أو المعاملة بالحامض والإنزيم معاً والمعاملة البيولوجية و يسبق كل ذلك المعالجة الفيزيائية.

Physical pretreatment (٤٠٨، ١٠٣) المعالجة الأولية الفيزيائية

المعالجة الفيزيائية لها أهمية كبيرة في تجهيز المواد السليلوزية لعمل الميكروبات. ويعتبر طحن المواد السليلوزية بوسائل كثيرة ومختلفة من طرق المعالجة الفيزيائية الواعدة خصوصاً على المستوى الصناعي، وعمليات الطحن التي تسبق التحلل تشتمل على تقليل حجم الجزيئات، بغرض زيادة مساحة السطح المعرض للإنزيمات. كما أن المعالجة بالبخار (١٨٠ إلى ٢٢٠م) تعتبر طريقة هامة من طرق المعالجة الفيزيائية، حيث تعمل على هدم مجموعات الأستابل وتساعد على التحلل، حيث وجد الباحثون أن تحلل الخشب والمواد الشبيهة مثل القش تتحسن بدرجة شديدة بالمعالجة بالبخار، وقد اكتشفها الأسبان ويتم فيها استخدام البخار على درجة حرارة ٢٠٠-٢٥٠م في مفاعل مغلق لمعالجة المواد التي سبق طحنها ثم يسمح للمفاعل أن يبرد حتى يصل إلى درجة الحرارة الطبيعية .

ورغم أن هذه الطريقة أدت إلى تحسين قابلية المواد للهجوم الإنزيمي فإن تطوير هذه الطريقة إلى ما يسمى طريقة انفجار البخار Steam explosion تعتبر هي أكفأ طريقة في تسهيل مهمة الإنزيمات المحللة للسليلوز. طريقة انفجار البخار هي طريقة حرارية ميكانيكية كيميائية حيث يندمج فيها استخدام الحرارة في صورة بخار والقوة الميكانيكية في صورة تقطيع وفرم المواد ثم الفعل الكيماوي في صورة التحلل. والجديد في هذه الطريقة هو تخفيف الضغط الواقع على المواد السليلوزية وهي معرضة لبخار درجة حرارته عالية بشكل مفاجئ. إن نتيجة ذلك هي تمزيق الألياف الصغيرة التي توجد داخل الجدار الخلوي للمواد الليجنوسليلوزية مما يزيد من فعالية

هجوم الإنزيمات السليولوزية على هذه المواد. وتختلف درجة الحرارة المستخدمة باختلاف المواد الليجنوسليولوزية المستخدمة.

وقد استمرت بعض الإضافات البسيطة لطريقة انفجار البخار مثل استخدام البخار عند ضغط جوي عالي جداً كما يفعل الأمريكيان في التقنية التي تسمى STAKE وفيها يتم فرم الخشب أولاً، ثم تعريضه لبخار على درجة حرارة ٢٣٠° وضغط جوي ٥٠٠ رطل على البوصة المربعة وبمجرد الانتهاء من ذلك يتم سحب المواد بشكل فجائي وسريع من المفاعل مع استمرار التقطيع الميكانيكي. هذه العملية تؤدي إلى جعل الإنزيمات تعمل بكفاءة عالية جداً.

وفي تطبيق جديد لهذه التقنية في السنوات القليلة الماضية استخدمت تقنية انفجار البخار لزيادة فعالية التحلل الإنزيمي الميكروبي في عمليات تسكير ثم تخمير متعاقبة. وقد اعتبرت هذه طريقة جديدة حيث تعالج المواد الليجنوسليولوزية أولاً بطريقة انفجار البخار ثم تعرض المواد لعمليات متعاقبة من التسكير الإنزيمي ثم تخمير السكريات الناتجة.

الهدف الأساسي لهذه الطرق تقليل درجة تبلور السليولوز وتحليل المعقدات المكونة من السليولوز والهيميسليولوز. وقد وجد أن قابلية السليولوز للهضم تزداد كلما زادت شدة هذه المعالجة الأولية أي كلما زادت درجة الحرارة والضغط وقوة التقطيع الميكانيكية وسرعة إجراء هذه العمليات وإخراج المواد بشكل فجائي من هذا الضغط المرتفع إلى الضغط العادي. وترجع الزيادة في قابلية السليولوز للهضم إلى

الزيادة المتاحة (ASA) *Available surface area* من ألياف السليلوز. وهذه الزيادة في مساحة السطح المعرض هي نتيجة لإزالة جزء أو كل الهيميسليلوز واللجنين.

(٤٠٨٠١٠٤) المعالجة الأولية بالحامض *Acid pretreatment*

اخترع العلماء منذ ما يقرب من مائة عام معالجة المواد الليجنوسليلوزية بالقلويات أي هيدروكسيد الصوديوم ، وقد أدى ذلك إلى تحسين قابلية القش للهضم ثم توالت الطرق المتبعة في معالجة المواد الليجنوسليلوزية. وقد بدأ استخدام التحليل الحامضي للمواد السليلوزية بشكل واسع بغرض الحصول على الجلوكوز أثناء الحرب العالمية الثانية حيث أن الأحماض يمكن أن تؤدي إلى تفكيك السليلوز والهيميسليلوز واللجنين ولكن يمكن القول أن اقتصاديات هذه العمليات ما زالت غير جيدة .

تسبب المعالجة بالأحماض غير العضوية مثل حامض الهيدروكلوريك وحامض الكبريتيك انتفاخ وذوبان للسليولوز. أما المشكلة في هذه الأجزاء فتكمن في تحول السكريات الخماسية إلى *Furfural* والسكريات السداسية إلى *Hydroxymethyl furfural* إذا تمت المعالجة بالأحماض عند درجات حرارة عالية. ومعنى ذلك أن المعالجة بالأحماض قد تؤدي إلى فقد السكريات القابلة للتخمر، كما أن الـ *Furfural* في حد ذاته مثبط لنمو الميكروبات مما يمنع عمليات التخمر التي تلي المعالجة الكيماوية.

وعلى أية حال فإن المعالجة بالأحماض بشرط أن تكون مخففة واستخدام المواد المستخلصة تعتبر من الطرق التي ما زالت تحتاج إلى مزيد من البحث.

Enzymatic pretreatment المعالجة الأولية الإنزيمية (٤٠٨،١٠٥)

لا شك أن استخدام الإنزيمات المحللة للسليولوز مستقبلاً سيركز على التحلل الكلي للمواد السليولوزية بغرض إنتاج الجلوكوز لاستخدامه في عمليات التخمر. وأحد أهم الأبحاث والبرامج المتطورة لإنتاج الإيثانول من المواد السليولوزية هو ما قام به Katzen سنة ١٩٨٤م. هذا البحث أثمر عن بناء مصنع صغير سعته ١ طن يومياً من المواد الخام. وقد كانت المادة الخام الرئيسية لهذا المصنع هي المخلفات المنزلية الصلبة ولكن تم اختبار عدة مواد أخرى. وقد تم تجربة عدد مختلف من المعالجات التي تتم قبل التحلل شملت معالجات ميكروبية وميكانيكية وكيميائية. أما تحلل المواد السليولوزية فقد تم باستخدام الإنزيمات. وهذا البرنامج يعتبر ملائم من الناحية التقنية إلا أن هناك بعض العوامل تحتاج إلى بعض المعالجات الاقتصادية قبل أن يصبح هذا المشروع منافساً لإنتاج الإيثانول من المواد النشوية. وتعتمد مدى ملائمة التحلل الإنزيمي إلى حد كبير على طبيعة المادة السليولوزية ومعالجتها قبل التحلل. والتحليل الإنزيمي للمواد النباتية له على الأقل ثلاث مميزات بالمقارنة بالتحليل الحامضي:

- ١- محصول السكر الناتج بواسطة الإنزيمات يكون أعلى.
- ٢- تكلفة الأجهزة المستخدمة أقل حيث أن العملية تتم عند الضغط الجوي العادي وعند درجات حرارة منخفضة.
- ٣- لا يحدث هدم للسكريات الناتجة ولا ينتج عنها مواد سامة نتيجة هدم السكريات والتي قد تعوق عملية التخمر فيها بعد.

وهناك بعض التقارير التي تشير إلى تحسين إنتاج إنزيمات السليوليز وهذا بلا شك سوف يحسن من اقتصاديات الاستفادة من المخلفات السليولوزية.

على كل حال ما زالت التكلفة حتى الآن هي العامل المحدد الرئيسي لتصميم نظام تحلل إنزيمي للمواد السليولوزية. وأحد العوامل الرئيسية في تكلفة العملية هو تكلفة إنتاج الإنزيمات المحللة للسليولوز حيث أن مختلف التقديرات أوضحت أن خطوة إنتاج الإنزيمات تشكل ٤٠-٥٠٪ من التكلفة الكلية للعملية. وهذه التكلفة العالية لخطوة إنتاج الإنزيم يمكن اختزالها بعدد من الطرق مثل:

١- تطوير سلالات ميكروبية جديدة قادرة على إنتاج كميات أكبر من الإنزيمات المحللة للسليولوز.

٢- جعل ظروف إنتاج الإنزيم ظروف مثل .

٣- جعل ظروف التحلل الإنزيمي ظروف مثل .

٤- تدوير أو إعادة استخدام الإنزيم أكثر من مرة .

لجعل ظروف التحلل الإنزيمي مثل فيجب أولاً أن تكون المعالجة التي تتم قبل التحليل الإنزيمي معالجة مثل. ومن المهم تركيز الجهود على الخطوات المحددة لمعدل التفاعل. فعادة يكون نشاط إنزيم β -glucosidase هو العامل المحدد عند الرغبة في إنتاج سكر من السليولوز.

وإذا أمكن تدوير الإنزيم أي إعادة استخدامه أكثر من مرة في خطوة التحليل فسوف يؤدي ذلك إلى تقليل التكلفة الخاصة بالإنزيم بشكل كبير. ويمكن إعادة استخدام الإنزيم في حالة واحدة فقط وهي أن يكون التحلل كامل نسبياً لأن

الإنزيمات ترتبط بالمواد الأولية غير الذائبة ولا يمكن تحريرها إلا إذا تحللت هذه المواد الأولية وأصبحت ذائبة. وقد وجد أنه عندما يكون التحلل كامل فإن إنزيم الـ Endoglucanase يتحرر بالكامل تقريباً في محلول البيئة. ويمكن بعد ذلك إضافة مادة أولية جديدة لهذا الإنزيم وإعادة استخدامه أو يمكن فصله عن طريق الطرد المركزي الفائق وإعادة استخدامه. كما وجد أيضاً أن استقبال إنزيم الـ Cellobiohydrolase يكون أيضاً جيد عندما يكون التحلل كامل، ولكن عندما لا يكون التحلل كامل فغالباً ما يفقد هذا الإنزيم. وهذا يرجع إلى الارتباط الشديد بين الـ Cellobiohydrolase والسيلولوز. أما إنزيم الـ β -glucosidase فإنه يتحرر بكميات كبيرة فقط عندما تتحلل المادة الأولية بما يزيد عن ٩٠٪. ولذلك فمن الضروري أن يكون التحلل كاملاً عند الرغبة في إعادة تدوير الإنزيمات المحللة للسيلولوز وهذا شيء له أهمية شديدة من الناحية الاقتصادية. كما يمكن أيضاً أن يثبت الإنزيم على مادة غير ذائبة ويشحن في مفاعل مما يسهل فصل الإنزيم عن ناتج التفاعل (السكريات) واستخدامه بطريقة مستمرة مما يحسن من اقتصاديات الصناعة

(٤٠٨٠١٠٦) التحليل الإنزيمي للسيلولوز وإنتاج الإيثانول في خطوة واحد

One step enzyme pretreatment and ethanol production

تضاف إنزيمات السيلولوز في الطرق التقليدية لإنتاج الإيثانول من المواد الليجنوسيلولوزية إلى المواد التي سبق معالجتها في أحد المفاعلات بغرض تسكير السيلولوز أي إنتاج سكر الجلوكوز، وبمجرد انتهاء هذا التفاعل فإن الجلوكوز يتم

تخميره إلى إيثانول في مفاعل أو مخمر ثاني. وهذه الطريقة تسمى طريقة التسكر والتخمير المنفصلة حيث ينتج الإيثانول على مرحلتين. وباستخدام هذه الطريقة فإن معدل تحول السيلولوز إلى جلوكوز يكون بطيء بسبب التثبيط الذي يحدث للإنزيمات نتيجة تراكم الجلوكوز والسليوبوز وبالتالي فإن كمية كبيرة من المواد السيلولوزية غير المتحللة تبقى في المفاعل وتكون النتيجة النهائية هي انخفاض محصول الإيثانول. حقيقة وطبقاً لأراء الخبراء فإن هذا التثبيط للمنتج النهائي أهم عيب في طريقة التسكر والتخمير المنفصلة كما أنها أحد العوامل الرئيسية في ارتفاع تكلفة عملية الإنتاج حيث أن المنتجين يضطرون إلى استخدام كميات كبيرة من الإنزيمات لحل هذه المشكلة.

وصف البريطانيون طريقة مكونة من عدة مراحل منفصلة من التسكر والتخمير للحصول على الإيثانول من المواد الليجنوسليلوزية. تشمل هذه المراحل تجنيس المواد النباتية ، ثم تحليل هذه المواد بطريقة غير عضوية ، ثم إضافة إنزيم الـ Beta-cellulase إلى المواد التي سبق معالجتها، ثم ترشيح بيئات التفاعل، ثم تخمير الراشح بالميكروبات، ثم فصل الإيثانول الناتج. وإحدى النقاط الهامة في هذه الطرق طريقة التسكر والتخمير المتعاقب. لا يتم في هذه الطريقة إنتاج الإيثانول على مرحلتين منفصلتين وإنما توجد الخمائر مع الإنزيمات المحللة للمواد التي سبق معالجتها في نفس الوقت. ميزة هذه الطريقة هي أن وجود الخميرة مع الإنزيمات تقلل من تراكم السكريات في المفاعل ولذلك يمكن الحصول على محصول عالي من الإيثانول بالمقارنة بالطريقة ذات المراحل المنفصلة. ومن مميزات هذه الطريقة أيضاً

استخدام مفاعل واحد للتسكير والتخمير معاً مما يؤدي إلى تقليل التكلفة. كذلك فإن وجود الإيثانول في الوسط يجعله غير قابل للتلوث بالميكروبات غير المرغوب فيها وذلك كما ذكر Wyman سنة ١٩٨٠ م.

يجب أن تكون عملية التسكير في طريقة التحليل والتخمير المتعاقب متوافقة مع عملية التخمير من حيث درجة الـ pH ودرجة الحرارة. ولذلك فإن اختلاف درجة الحرارة المثلى لعملية التسكير عن درجة الحرارة المثلى لعملية التخمير هي إحدى المشاكل التي تصاحب هذه الطريقة حيث أن درجة الحرارة المثلى لعملية التسكير تتراوح ما بين ٤٥ إلى ٥٠ م° فإن الحل هو استخدام خمائر تتحمل درجات الحرارة العالية أثناء عملية التخمير.

تم استخدام طريقة انفجار البخار ثم التسكير والتخمير المتعاقب باستخدام إنزيمات السليوليز التجارية واستخدام سلالة خميرة جديدة تتحمل درجة حرارة عالية في براءة اختراع لـ Pedices وآخرون سنة ٢٠٠٥ م للحصول على الإيثانول من المواد الليجنوسليلولوزية. هذه السلالة الجديدة التي تم اكتشافها هي *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 وقد أمكن لهذه السلالة أن تقوم بالتخمير بكفاءة عند درجة حرارة ٤٢ م° وتم التخمير في ٧٢ ساعة وكان عدد لفات المقلب في المخمر مساوياً ١٥٠ لفة/دقيقة. تم في براءة الاختراع هذه وبعد المعالجة الحصول على السليلوز القابل للتحلل من ١٠٠٠ جرام من المادة المحتوية على ٣٠-٤٠٪ سليولوز غير قابل للتحلل بالإنزيمات. وتم تحويل هذه الكمية إلى إيثانول بواسطة السلالة الجديدة وأعطت ٩٠-١٢٠ جرام من الإيثانول. وتم تجفيف المادة الخام التي

استخدمت والمحتوية على السليولوز هوائيا ثم طحنها وتراوح حجم الحبيبات من ١٥-٣٠ مم وهذا يعتبر حجم كبير ويقلل من تكلفة الطحن إلى حجم أقل.

(٤٠٨٠١٠٧) المعالجة الأولية بالحامض والإنزيم Acid-enzyme pretreatment

هناك نظام تحلل للمواد السليولوزية يجمع بين التحلل الحامضي والتحلل الإنزيمي ويتكون من ثلاث خطوات كما يلي :

- ١- إذابة المواد السليولوزية في محلول حامض الفوسفوريك .
- ٢- تحليل حامضي متجانس باستخدام حامض الهيدروكلوريك .
- ٣- تحليل إنزيمي للـ Cellodextrins الذائب إلى جلوكوز .

وقد استخدم في هذه التجربة سليولوز نقي متبلور في صورة مسحوق. ورغم أن نتائج هذه التجربة كانت ممتازة إلا أنه قد تظهر بعض التعقيدات إذا استخدمت مادة خام غير نقية مثل الخشب الذي يحتوي على لجنين على سبيل المثال، ولكن من جهة أخرى يعتقد كثير من العلماء أن التقنية المعتمدة على استخدام كل من التحليل الحامضي والإنزيمي معاً قد تكون بديلاً من استخدام التحليل الحامضي للمواد السليولوزية للحصول على سكريات صالحة للتخمير إلى كحول الإيثانول .

(٤٠٨٠١٠٨) المعالجة الأولية الحيوية Biological pretreatment

الأبحاث مستمرة أيضاً من أجل تطوير عمليات تعتمد على الميكروبات القادرة على الاستفادة من المواد السليولوزية بشكل مباشر. فقد وجد أن الميكروب *Monilla*

spp قادر على إنتاج إنزيمات خارجية سليولوزية وإنزيمات الـ Xylanases القادرة على تحليل عديدات السكر الخثاسي. كما وجد أن هذا الميكروب يمكنه أيضاً أن يخمر سكري الجلوكوز والزيلوز إلى إيثانول، حيث يستطيع أن يحول أكثر من ٦٠٪ من المادة الأولية إلى إيثانول.

وقد ذكر Wayman وآخرون سنة ١٩٩٢م أن مجموعة من الخبراء في مجال الهندسة والأحياء والكيمياء الحيوية نجحوا في عملية التحويل الحيوي للورق من مخلف صلب إلى إيثانول.

وقد قام المؤلف (Zayed and Meyer, 1996) بتطوير طريقة حيوية لتسكير قش القمح، اعتمدت على نزع اللجنين من القش بطريقة كيميائية بعد طحنه، ثم استخدام فطر محلل للسليولوز (*Trichoderma veridi*) في التسكير، ثم فصل الفطر عن البيئة بواسطة الطرد المركزي في الوقت المناسب وقبل أن يتغذى الفطر على السكريات التي أنتجها، ثم بستره الراشح، ثم تخميره إلى إيثانول بواسطة الخميرة *Pachysolen tannophilus* التي لها القدرة على تخمير السكريات السداسية والخثاسية الناتجة إلى إيثانول. ومن المشاكل الرئيسية التي واجهت هذه الطريقة أن الفطر كان يستهلك كمية كبيرة من السكر الذي ينتجه وذلك قبل أن يتم فصله.

كما درست أيضاً عملية التخمير المباشر للمواد السليولوزية باستخدام مزرعة مختلطة من البكتيريا *C. thermocellum* وبكتيريا أخرى لا هوائية تنتج الإيثانول. لكن هذه العمليات ما زالت تحتاج إلى مزيد من التطوير حيث أنها ليست جاهزة بعد للتطبيق الصناعي.

سوف تكون اقتصاديات عملية تسكير السليولوز أي تحويله إلى سكر قابل للتخمير مربحة في المستقبل القريب نتيجة التقدم في علوم الهندسة الوراثية، حيث سوف يتمكن العلماء على سبيل المثال من استنساخ الجينات المسؤولة عن إنتاج إنزيمات السليوليز Cellulases والإنزيمات المحللة للبتوزات (السكريات الخماسية) والتي سوف تمكنهم من الحصول على كائنات لها قدرة فائقة على إنتاج هذه الإنزيمات اللازمة لتسكير السليولوز.

(٤,٨,٢) استخدام الحبوب التالفة وحبوب الغريلة كمواد خام

Use of distressed grains and screenings

تقدر كمية الذرة منخفضة الجودة والتي لا تصلح كغذاء للإنسان بنحو ٥٪ من محصول الذرة في الولايات المتحدة الأمريكية. كما أن كمية القمح والشعير المتبقية بعد الفرز أو الغريلة في دولة مثل كندا تقدر بنحو ٨٧٠٠٠٠ طن سنوياً. ويتراوح محتوى هذا القمح من النشا من ٤٢-٥٩,٨٪ على أساس الوزن الجاف. أما مستوى النشا في شعير الفرز فيختلف من ٢٦,١ إلى ٥٤,١٪. ويقدر الإيثانول الذي يمكن إنتاجه من هذه الحبوب بنحو ٢٠٨٠٠٠ متر مكعب. وهناك ما يعرف أيضاً بمحاصيل البراري والتي تشمل بذور بعض الحشائش وكذلك حبوب بعض المحاصيل التي لا تستعمل في الغذاء الآدمي، بالإضافة إلى الحبوب التالفة وحبوب القمح التي مازالت تحتفظ بأغلفتها بعد الحصاد وبعض المواد النباتية الأخرى التي تشمل قشور الحبوب وأوراق النباتات والقش. يمكن أن تستخدم جميع هذه المواد كمواد خام لإنتاج الإيثانول

كوقود. وقد وجد أن ٦٦٪ من القمح الناتج عن الغريلة يمكن أن يستخدم لإنتاج الإيثانول وترتفع هذه النسبة في الشعير إلى ٨٠٪.

(٤,٨,٣) إعادة استخدام بعض النواتج Backset

عندما يتم إنتاج لتر من الإيثانول ٩٥٪ المقطر يقابل ذلك إنتاج نواتج تقطير أخرى كميتها تتراوح من ٧ إلى ٢٠ لتر وذلك بعد عملية الترشيح أو الطرد المركزي. وقد وجد أن قيمة ال-BOD لهذه المواد تتراوح من ١٥٠٠٠ إلى ٢٥٠٠٠ مليجرام/لتر. وهذا يعني أن هذه المواد تحتوي على كميات كبيرة من المادة العضوية وتعتبر عقبة في طريق إنتاج الإيثانول لأنها نواتج وسطية ملوثة للبيئة. وعلى الرغم من أن هذه النواتج تستخدم في علائق الحيوانات إلا أن ذلك لا يتم إلا بعد تكلفة عالية خاصة بإزالة الماء منها عن طريق التبخير. ويوجد الآن عمليتان تجاريتان رئيسيتان من خلالها يمكن الاستفادة من النواتج الوسطية لتقطير الإيثانول. العملية الأولى هي استخدام بعض نواتج التقطير الوسطية في تغذية الخميرة حيث أن القيمة الغذائية لنواتج تقطير الإيثانول معروفة بشكل جيد كما أنه من المعروف أيضاً أن المواد الغذائية التي تنطلق من الخميرة إلى البيئة الغذائية في نهاية التخمر وتتركز في نواتج التقطير لها قيمة غذائية مفيدة لخلايا الخميرة الجديدة التي تنتج أثناء تكاثر الخميرة كما تحسن هذه المواد أيضاً من عملية تكيف الخميرة مع تركيزات عالية من الإيثانول.

العملية الثانية هي إعادة استخدام جزء أو كل نواتج التقطير السائلة كماء لتخفيف المهروس الذي سوف يدخل في التخمر التالي، ولكن يجب أن تتم هذه

العملية بحذر نظراً لإمكانية حدوث إصابة ببكتيريا التلوث من هذه النواتج أو من الخطوط التي تربط بين الأوعية المختلفة والخمرات. يمكن تجنب مشكلة التلوث عن طريق بستر نواتج التقطير على 70°C وعن طريق الغسيل اليومي وتمهير البخار في مختلف الخطوط. وهناك عدد من التقارير تحذر من خطورة تكوين مواد معدنية أو مستويات من أحماض اللاكتيك والخليلك بواسطة بكتيريا التلوث والتي تكون مشبعة لعملية إنتاج الكحول. وبالنسبة لهذه العملية فقد ورد في التقارير أن بعض المصانع التي تستخدم المولاس تعيد استخدام ٦٠ إلى ٨٠٪ من نواتج التقطير بدون أي تأثير سلبي على إنتاج الإيثانول. ومن ناحية أخرى فيجب معرفة أن المواد الذائبة يزداد تركيزها في بعض حالات إعادة استخدام هذه النواتج وأن أملاح البوتاسيوم قد تزداد لتصل إلى أكثر من ٣٠٪ من الوزن الكلي للرماد وهذا يوضح أهمية أن تكون سلالة الخميرة لديها القدرة على التكيف مع تركيزات عالية من الأملاح.

وجدير بالذكر أنه في حالات خاصة فإن إعادة استخدام المواد الناتجة عن التخمر قد يسبب مشاكل معينة. فعلى سبيل المثال فإن مستويات حامض الكبريتيك والفيورفيورال قد تكون عالية في المواد التي يعاد استخدامها في تخمرات المخلفات المحتوية على كبريتيت، كذلك فإن أملاح الكالسيوم تسبب مشاكل في إعادة استخدام بعض نواتج تخمر أنواع معينة من المولاس الأسود. ووجود تركيز عالي من الأملاح يساعد على اتجاه التخمر نحو إنتاج الجليسرول وليس نحو إنتاج الإيثانول. أدت هذه المشاكل إلى أن إعادة استخدام بعض النواتج ليست عملية في بعض التخمرات ولكن في البعض الآخر وكما ذكرنا فلا توجد أي مشاكل في إعادة استخدام هذه النواتج فعلى

سبيل المثال ذكر العلماء أن إعادة استخدام نواتج التقطير في تخمر القمح بنسبة ١٠٠٪ لمدة خمسة دورات تخمير متتالية لم تؤد إلى ظهور أية مشاكل .

وحيث إن التخمرات تستخدم كميات كبيرة من الماء وأن المخلفات المائية عالية في محتواها من المادة العضوية فإن إعادة تدوير هذه المياه تعتبر مفيدة في تقليل التكاليف وخصوصاً في تخمرات إنتاج الإيثانول. وتعتبر هذه التقنية ناجحة في التخمر المتقطع لإنتاج الإيثانول، أما في التخمرات المستمرة فإن إعادة استخدام ماء المخلفات المائية قد يؤدي إلى تكون مواد مثل الجليسرول وحامض الخليك وبعض المثبطات غير المتطيرة

(٤,٨,٤) استخدام التخمر المستمر Use of continuous fermentation

لقد كان التخمر المتقطع هو المفضل على مدى السنين وذلك لسهولة القيام به وإمكانية استخدام عمالة ليست على قدر كبير نسبياً من المهارة وانخفاض تكاليفه وسهولة تقنيته نسبياً. إلا أن التخمر المستمر يجتزل الوقت كثيراً ويزيد كثيراً من إنتاجية الإيثانول. وعلى الرغم من أن عمليات التخمر المستمر للمولاس استخدمت في روسيا منذ الستينيات إلا أن المراجع تذكر أن هناك فقط أربعة مشاريع ضخمة تستخدم التخمر المستمر (في الواقع تخمر شبه مستمر) في الولايات المتحدة لإنتاج الإيثانول، جميعها تستخدم الذرة لإنتاج الإيثانول ويتم فيها الحصول على مهروس التخمر حالياً من المواد الصلبة ويصل عدد خلايا الخميرة فيها إلى 6×10^8 /مل كما أن

معدل إنتاج الإيثانول يفوق معدل الإنتاج في حالة التخمير المتقطع بمقدار ثلاثة إلى أربعة مرات.

أما التخمير المستمر الحقيقي فحتى الآن لم يتم استخدامه بشكل شائع في إنتاج الإيثانول على الرغم من ثبوت أفضليته على التخمير المتقطع. وتستخدم في البرازيل تقنية تدوير خلايا الخميرة في التخمير المتقطع حيث يتم الحصول على خلايا الخميرة عن طريق الطرد المركزي ثم يعاد تلقيح مخمرات أخرى بهذه الخلايا. كذلك تستخدم تقنية تدوير خلايا الخميرة في التخمير المستمر حيث تكون الخلايا المضافة متكيفة مع البيئة ولا تحتاج إلى فترة التكيف أو ما يسمى بالطور التأقلمي في نمو الكائنات الدقيقة. وبالإضافة إلى ذلك فإن استخدام نظام التخمير المستمر يقلل أو قد يمنع التلوث بميكروبات أخرى كما أنه قد لا يكون من الضروري إضافة مغذيات الخميرة. وفي التخمير المستمر يمكن استخدام تركيزات عالية من السكر في المادة الخام مما يؤدي إلى زيادة معدل التخمير لكل وحدة حجم. وفي هذه الحالة ومع زيادة تركيز الإيثانول فإن حجم المخمر المطلوب يكون أقل كما أن تكلفة عملية استخلاص الكحول عن طريق التقطير تكون أيضاً أقل. وقد وجد أن إنتاجية الإيثانول عن طريق التخمير المستمر تزيد بمقدار ٢٠٠٪ عن مثيلتها في التخمير المتقطع.

(٤,٨,٥) استخدام تقنية الخلايا المثبتة Use of cell immobilization technology

للحصول على معلومات تفصيلية عن نظم تثبيت الخلية يمكن الرجوع إلى كتب المؤلف "أساسيات الميكروبيولوجيا الصناعية" أو "الإنزيمات الميكروبية

وتطبيقاتها في الصناعة والطب". ولكن في هذا الجزء سوف نعطي معلومات عن تثبيت الخلايا التي تتناسب مع موضوع هذا الكتاب.

يتم تثبيت الإنزيمات المنتجة على حوامل صلبة في مجال تقنية الإنزيمات وذلك لزيادة كفاءتها ولتسهيل نقلها وتخزينها وتسمى هذه العملية تثبيت الإنزيمات Enzyme immobilization ولكن وجد أن هناك مشاكل كثيرة لا يمكن حلها عن طريق تثبيت الإنزيمات. وأهم هذه المشاكل هي أن الإنزيمات الداخلية تظل محتجزة داخل الخلية ولكي يتم تثبيتها على حوامل صلبة لابد من استخلاصها وتنقيتها أولاً، وقد وجد أن هذه الإنزيمات المستخلصة تكون في أغلب الأحيان غير ثابتة وغير مناسبة من الناحية العملية، كما أن عمليات الاستخلاص والتنقية هي عمليات مكلفة وغير اقتصادية وبالتالي فإن حل هذه المشكلة يكون في تثبيت الخلية ككل. هذا هو السبب الرئيسي في ظهور ما يسمى بتثبيت الخلية Cell immobilization. وعملية التثبيت يمكن تعريفها على أنها أي نظام يتم فيه حجز أو حبس خلايا الخميرة داخل المخمر بغرض إعادة استخدامها بنفس الدرجة من الكفاءة. واستخدام هذه التقنية على المستوى التجاري يجب أن يؤدي إلى معدلات عالية في تحول الجلوكوز إلى إيثانول. وزيادة هذا النشاط تعود إلى وجود عدد كبير من الخلايا بالنسبة لكل وحدة مساحة من المخمر مما يساعد في تحول المادة الخام إلى إيثانول بدرجة أسرع. لا توجد حاجة لعملية التقليب في تقنية استخدام الخلايا المثبتة حيث أن المخمرات التي تستخدم هذا النظام يسمح فيها بدوران البيئة السائلة بشكل مستمر من المخمر إلى عمود يحتوي على الخلايا المثبتة ثم إلى المخمر مرة أخرى وهكذا. ولكن يجب إمداد البيئة بمغذيات الخميرة وذلك لضمان

استمرار الحصول على معدلات عالية من إنتاجية الإيثانول. وكثيراً من التطبيقات الصناعية التي تستخدم التفاعلات الإنزيمية أصبحت الآن تستخدم الخلايا الميكروبية المثبتة كبديل لاستخدام الإنزيمات النقية. ويمكن تلخيص مميزات الخلايا المثبتة بمواد صلبة فيما يلي :

- ١- نشاط الخلايا يكون عالياً جداً مقارنة بالخلايا الحرة (الخلايا غير المثبتة).
- ٢- ثبات نشاط الخلايا يكون عالياً جداً لأن الخلايا المثبتة تتحمل الظروف البيئية غير المناسبة بدرجة كبيرة.
- ٣- تكاليف إنتاج الإيثانول باستخدام الخلايا المثبتة منخفضة كثيراً بالمقارنة بالخلايا الحرة.
- ٤- يمكن استخدام هذا النظام في عمليات التفاعلات الحيوية التي تحتاج إلى أكثر من إنزيم.
- ٥- الاستغناء عن عمليات استخلاص أو تنقية الإنزيمات.
- ٦- الخلايا المثبتة يمكن إعادة استخدامها أكثر من مرة لإنتاج الإنزيم وقد يصل عدد مرات الاستخدام إلى أكثر من خمس مرات.

وبالإضافة إلى ما سبق فهناك ميزة مهمة جداً وهو أن حجم بيئة التخمر في حال استخدام نظم الخلايا المثبتة يكون أصغر بكثير منه في حال استخدام الخلايا الحرة وذلك لأن الخلايا المثبتة يمكنها أن تنشط في تركيز عالي جداً من المادة الأولية بالمقارنة بالخلايا الحرة وهذا يؤدي إلى تقليل فرصة التلوث، ويجعل عملية الإنتاج ناجحة اقتصادياً. ففي التخمرات الميكروبية وعلى سبيل المثال إذا فرض أن هناك محلول

يحتوي على ٥٪ سكر و أن هناك ميكروب يمكنه أن ينتج كحول من هذا المحلول بما يوازي ٩٠٪ من القيمة النظرية فإن الكحول الناتج يكون تركيزه حوالي ٢٠٢٥٪ وإذا كان تركيز السكر مثلاً ٣٠٪ فإن نفس الميكروب ينتج حوالي ١٣٠٥٪ كحول وعلى ذلك فإن زيادة تركيز السكر تعتبر مهمة جداً في عملية إنتاج الكحول من الناحية الاقتصادية ولكن المشكلة هي أن الميكروب المستخدم في عملية الإنتاج لا يستطيع أن يعيش في تركيز عالي من السكر وقد وجد أن حل هذه المشكلة هو التلقيح بميكروبات مثبتة على مواد صلبة وبهذه الطريقة يمكن للميكروب أن يتحمل تركيز سكر قد يصل إلى ٤٠ أو ٤٥٪.

وعلى أي حال يمكن القول أنه خلال السنوات القليلة الماضية تطورت طرق ربط أو تثبيت الخلايا بمواد تزيد من نشاطها تطوراً شديداً ومعظم إن لم يكن كل عمليات التخمر الميكروبي بها فيها محطات معالجة مياه المجاري، سوف تستخدم مستقبلاً نظام الخلايا الميكروبية المربوطة أو المثبتة على مادة صلبة.

وقد نشرت في الآونة الأخيرة أبحاث كثيرة جداً عن طرق تحميل أو ربط أو تثبيت الخلايا الميكروبية، إلا أنه يمكن القول أنه لا توجد طريقة واحدة حتى الآن يمكن تعميمها على كل أنواع الخلايا الميكروبية، ولذلك فمن المهم في الصناعات الميكروبية اختيار الطريقة التي تناسب الميكروب المستخدم وتناسب ظروف التفاعل.

(٤٠٨٠٥٠١) طرق تثبيت الخلايا Methods of cell immobilization

هناك عدد كبير من طرق تثبيت الخلايا ولكن التقنيات المستخدمة على المستوى

التجاري حتى الآن يمكن تقسيمها إلى قسمين رئيسيين :

١- طرق الربط على حامل Carrier binding methods

تعتمد هذه الطرق على الربط المباشر للخلايا على حوامل غير ذائبة في الماء عن طريق الادمصاص الفيزيائي أو الروابط الأيونية أو الروابط التساهمية. قد تكون الحوامل المستخدمة عديدة التسكر مثل السيلولوز والدكستران ومشتقات الأجاروز، أو بروتينات مثل الجيلاتين والألبومين أو مواد محضرة صناعياً مثل المواد الراتنجية والـ polyvinylchloride أو قد تكون مواد غير عضوية مثل الرمل والزرجاج. وادمصاص الخلايا على الحوامل يعتمد في المقام الأول على تفاعل القوة الكهربائية الساكنة Electrostatic interactions وعلى الروابط الأيونية والهيدروجينية بين سطح الخلية والمادة الحاملة. وبالنسبة للارتباط الكيماوي فهو عبارة عن ارتباط تساهمي مباشر للخلايا على الحامل وفي هذه الحالة لا بد من إحداث تعديل كيماوي لسطح الحامل بحيث يصبح نشط ويرتبط بالمجموعات الكيماوية الموجودة على سطح الخلية مثل مجموعة الكربوكسيل أو الفينول أو الهيدروكسيل.

٢- طرق الحبس Entrapping methods

درست هذه الطرق بشكل واسع جداً وهي عبارة عن حبس الخلايا داخل مادة صناعية نسيجية تكون جل مثل ألجينات الكالسيوم Calcium alginate والبولي أكريلاميد و الكاراجينين k-Carrageenan

أ) ألجينات الكالسيوم Calcium alginate: هي أكثر المواد شيوعاً واستخداماً في عملية تثبيت الخلايا وتستخرج من الأعشاب البحرية وتتحول إلى جل عن طريق

بعض الأيونات وخصوصاً الكالسيوم. ويمكن تلخيص أسباب شيوع استخدام الألبينات في تثبيت الخلايا فيما يلي :

- ١- يمكن استخدام الألبينات مختلفة الأوزان الجزيئية ومختلفة التركيب الكيماوي .
- ٢- تركيز الألبينات المستخدمة يمكن أن يتراوح من ٠.٥-١٠٪ .
- ٣- تركيز كلوريد الكالسيوم المستخدم في تكوين الجل يتراوح من ٠.٠٥٪ إلى ٢٪ .
- ٤- درجة الحرارة المستخدمة تتراوح من صفر إلى ٨٠ درجة مئوية .
- ٥- يمكن الحصول على خرز Beads يتراوح قطر كل واحدة من ٠.١ إلى ٥ ملليمترات .
- ٦- يمكن الحصول على خرز به أعداد هائلة من الخلايا الحية النشطة والتي تظل محتفظة بحيويتها ونشاطها لفترة طويلة .
- ٧- عملية التثبيت تتم في خطوات بسيطة جداً وغير مكلفة .

وفيما يلي خطوات عملية تثبيت خلايا الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*

كمثال عملي لهذه الطريقة بغرض استخدامها في إنتاج كحول الإيثانول :

- ١- تحضر ألبينات الصوديوم ٤ - ٥٪ (وزن/ حجم) ثم تعقم ثم تترك لتبرد حتى ٤٠-٤٥°م.
- ٢- يخلط حجم من محلول ألبينات الصوديوم مع حجم مماثل من معلق الخلايا النامية في بيئة صناعية سائلة والتي تحتوي على عدد ضخم من الخلايا / مل.
- ٣- يرج الخليط جيداً ثم ينقط من خلال أنبوبة ضيقة في محلول ٠.٠٥ مول كلوريد كالسيوم عند درجة حرارة ٣٧°م فتتكون في الحال كرات تشبه الخرز يتوقف

حجمها على قطر فتحة الأنبوبة المستخدمة في التنقيط .

٤- يترك الخرز لمدة ساعة ليتماسك وذلك على درجة ٢٠-٢٢م ثم يغسل بالماء ويترك لليوم التالي في محلول ٠,٠٥ مول كلوريد كالسيوم على درجة حرارة ٤م .

٥- يمكن استخدام الخلايا المثبتة بهذا الشكل مباشرة في عملية الإنتاج .

يتم تنفيذ المثال السابق على مستوى المعمل وفي معظم الأبحاث التي ما زالت تحسن وتطور في عملية التثبيت. ولكن على المستوى الصناعي يتم إنتاج الخلايا المثبتة بأشكال كثيرة وتقنيات مختلفة ولكن لها نفس الأساس الذي تم شرحه. قد تكون الخلايا المثبتة في صورة غير نشطة ولا تستمر في النمو بعد التثبيت وقد تكون نشطة وتستمر في النمو بعد التثبيت وقد وجد أن الخلية المثبتة النشطة تنتج إيثانول بدرجة أسرع من الخلايا غير النامية وذلك في التخمر المتقطع مما جعل العلماء يعتقدون أن بعض من مغذيات الخميرة قد يكون ضروري بالنسبة للخلايا المثبتة. وقد أكد العلماء على حدوث إنتاج سريع للإيثانول بواسطة الخلايا المثبتة عندما أضيف مستخلص فول الصويا إلى البيئة وهذا ربما يرجع إلى وجود مشتقات البروتين والليبيدات في مستخلص فول الصويا، ويجب أن يكون هناك حذر من تراكم ثاني أكسيد الكربون في المخمر للتأكد من أن إنتاجية الإيثانول ستظل ثابتة. وقد فسر العلماء أن زيادة كفاءة التخمر عند استخدام الخلايا المثبتة قد تعود في أحد أسبابها إلى أن هذه الخلايا لا تتعرض بشكل مباشر لتأثير الإيثانول المنتج وبالتالي لا توجد مشكلة عدم تحمل الإيثانول المنتج.

وفي مجال تطوير طرق تثبيت خلايا الخميرة قام (Zayed, 1997) بإدخال بعض

الزيوت النباتية مثل زيت الزيتون وزيت الذرة وزيت عباد الشمس على نظام التثبيت بالألجينات فيصبح هذا النظام قادراً على جعل الخلايا مقاومة للمواد السامة. وذلك لأن الخرز المحتوي على الخميرة يكون له وجهان، وجه مائي تتركز فيه المواد الغذائية وبالتالي تتركز فيه خلايا الخميرة ووجه زيتي وهو مغلف لكل خزرزة من ناحية السطح ولذلك إذا ما وضعت الخزرزة الجيلاتينية المحتوية على الخلايا في بيئة تحتوي على كيمائيات سامة فإن هذه الكيمائيات تدمص على الطبقة الزيتية قبل أن تتغلغل داخل الخزرزة وتصل إلى الخلايا. وعلى ذلك فقد أمكن استخدام هذه الكيمائيات السامة في تعقيم البيئات كبديل للحرارة مع استخدام هذا النظام كلقاح لا يتأثر بوجود هذه المواد السامة.

(ب) هلام البولي أكريلاميد **Polyacrylamide gel** : العيب الرئيسي في هذه الطريقة هو سمية مادة الأكريلاميد والمواد المسببة للبلعمة لبعض أنواع الميكروبات ، وبصفة عامة يجب تعريض الميكروبات لهذه المواد لأقل فترة زمنية ممكنة .

(ج) الكاراجينين **k-Carrageenan**: هذه المادة غير سامة وموجودة بكثرة حيث تعزل من بعض الأعشاب البحرية وتستخدم بشكل واسع في الصناعات الغذائية حيث تضاف كمادة مكونة للهلام أو مغلفة للقوام أو منظمة للضغط الأسموزي. وتصبح هذه المادة هلاماً بالتبريد أو بالخلط مع محلول يحتوي على المواد المحفزة لتكوين الهلام مثل أيونات البوتاسيوم أو الكالسيوم أو الماغنسيوم أو النحاس أو الحديد أو الأمونيوم. ويجب مراعاة الدقة في اختيار المادة المسببة للهلام، حيث لوحظ أنه إذا تم الاختيار الجيد لهذه المادة يمكن الحصول على تحضير له نشاط إنزيمي عالي

جداً. ويمكن تلخيص مميزات استخدام الكاراجينين فيما يلي :

١- عملية التثبيت تتم بدون استخدام كيمائيات التي يمكن أن تؤدي إلى تحطيم الخلايا .

٢- يمكن الحصول على أشكال مختلفة من الجل المحتوي على الخلايا مثل المكعبات أو الكرات أو Sheet يقطع حسب الرغبة .

٣- يمكن إذابة الكاراجينين مرة أخرى والحصول على الخلايا وهذا يساعد على دراسة خواص الخلايا بعد عملية التثبيت .

أما عيوب هذه الطريقة فهي :

١- عندما يتكون الهلام عن طريق التبريد وبدون استخدام المادة المحفزة لتكوينه فإن الخلايا تتحرر بسبب ذوبان الهلام.

٢- قد تثبط المواد المسببة لتكوين الهلام (الكالسيوم، البوتاسيوم، ... الخ) تخليق بعض الإنزيمات المرغوبة.

وقد وجد أن خلايا الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* المثبتة على الكاراجينين كانت لها كفاءة عالية جداً في إنتاج الإيثانول من الجلوكوز.

(٤,٨,٦) تخمر المواد الصلبة الذائبة عالية التركيز **Very high-gravity fermentation**

يحتاج كل مصنع لإنتاج الإيثانول إلى تحسينات مستمرة في عملية التخمر نفسها. وقد وجد العلماء أن الطريقة الابتدائية لتقليل تكلفة الإنتاج هي الآليات التي تؤدي إلى زيادة التركيز النهائي للإيثانول في المهورس المتخمرة، هذا الهدف بالإضافة

إلى زيادة معدل التخمر هما أساس التقنيات الحديثة في إنتاج الإيثانول. بمعنى آخر إذا أمكن زيادة تركيز الإيثانول عن طريق زيادة تركيز المادة الأولية (المادة الخام) وفي نفس الوقت زيادة معدل تصنيع الإيثانول بواسطة خلايا الخميرة وتقليل كمية الماء المستخدم ونتيجة ذلك يقل زمن التخمر، فإن كل ذلك سوف يؤدي إلى تقليل تكلفة عملية الإنتاج. إلا أن كثير من العلماء سنة ١٩٨٦م وجدوا أن تخمير البيئات التي تحتوي على أكثر من ١٨٪ سكر لم يكن ناجحاً على المستوى التجاري بسبب طول الوقت اللازم لاكمال التخمر. وكما ذكرنا من قبل فإن محتوى البيئة من المواد الصلبة الذائبة يعبر عنه بدرجة تسمى بلاتو (وهي كمية المواد الصلبة بالجرام/ ١٠٠ جرام من المحلول)، وقد وجد العلماء أن بيئات إنتاج المشروبات الكحولية المحتوية على أكثر من ٢٤° بلاتو لا يكتمل تخمرها.

ولكن تمكن (Zayed, 1987) من التوصل إلى تخمير بيئات تحتوي على تركيزات عالية جداً من المواد الصلبة الذائبة (أكثر من ٤٠° بركس) أي ٤٠ جرام من المواد الصلبة الذائبة/ ١٠٠ جرام من المحلول. وقد تم التوصل إلى ذلك من إدراك الحقيقة التي مؤداها أن خميرة الـ *Saccharomyces spp* تكون متحملة لتركيز عالي من الكحول عندما يكون الأكسجين ومصادر النيتروجين القابل للتمثيل عند مستويات مثلى، لأن هذه الظروف تؤدي إلى الوصول إلى أعلى عدد من الخميرة بحيث يكون هذا العدد كافي لتخمير الكربوهيدرات الزائدة وبذلك لا يتوقف التخمر. هذه التقنية تسمح بإنتاج كميات أكبر من الكحول في نفس المصنع وبنفس العمالة، وهذا بدوره يؤدي إلى استخدام المصنع لكميات أكبر من الحبوب ورطوبة أقل مع إنتاج كبير

للإيثانول. ويمكن باستخدام هذه التقنية أن ينتج الإيثانول بتركيز أكثر من ٢٢٪ من حبوب القمح في تخمر متقطع بدون استخدام خمائر معدلة وراثياً. ويصل عدد الخمائر في هذه التخمرات إلى حوالي $10^6 \times 10^8$ / مل.

ولكي تتم ترجمة هذه البحوث إلى مستوى تجاري لإنتاج الإيثانول بغرض استخدامه كوقود فإن مهروس التخمر الذي ينتج من المواد الخام لابد أن تحتوي على تركيز عالي من الكربوهيدرات. وفي دراسة حديثة للمؤلف (Zayed 2009) أمكن تخمير محلول سكري يحتوي على ٣٥٪ سكروز إلى ١٦٪ إيثانول وذلك عن طريق تغذية الخميرة بشكل دقيق أثناء التخمر وإمدادها بكميات من النيتروجين تتناسب مع تركيز السكر وبكميات محسوبة من الأكسجين فقط أثناء الإثني عشرة ساعة الأولى من التخمر.

بدون إزالة المواد غير الذائبة من الذرة أو الشعير عن طريق الطرد المركزي أو الترشيح قبل التخمر أو بدون ضبط السكريات الذائبة عن طريق الإضافة إلى المهروس لا يمكن الوصول إلى ظروف ما يسمى تخمر البيئة ذات المواد الصلبة الذائبة العالية جداً في التركيز *Very high-gravity fermentation* وذلك لإنتاج الإيثانول كوقود. ومن ناحية أخرى فإن تحمل خلايا الخميرة للإيثانول يقل عندما تزيد الحرارة، فعند حرارة قريبة من أو أعلى من ٣٠°م فإن الوصول إلى هذه المستويات من الإيثانول غير ممكن. إلا أن العلماء وجدوا أنه من المؤكد أن هذه الدرجات من الحرارة لن تؤثر سلباً على التخمر إذا توفرت المواد الغذائية الميسرة للخميرة. يجب أن يلزم بهذه المعلومة كل منتجي الإيثانول سواء أكان بغرض استخدامه كوقود أو في المشروبات الكحولية.

وما زال تحمل الخميرة لتركيزات عالية من الإيثانول حقلاً جيداً للبحث العلمي ويسترعى انتباه العلماء ويمكن القول أن مجمل رأي العلماء في زيادة مقدرة الخميرة على تحمل تركيزات عالية من الكحول تتلخص أيضاً في توفير المواد الغذائية الميسرة للخميرة. ويعتقد أن سمية الإيثانول بالنسبة للخميرة ترجع إلى تأثير الإيثانول على الغشاء الخلوي. وعلى أية حال فإن تحمل الخميرة لتركيزات عالية من الإيثانول يتحكم فيه بصفة عامة مغذيات الخميرة، ومستوى الكربوهيدرات في المادة الخام، ودرجة الحرارة، ودرجة الـ pH، والضغط الأسموزي، وبعض النواتج النهائية الأخرى لعملية التخمير. وكل سلالة من الخميرة قد تتفاعل مع هذه العوامل بطريقة تختلف عن السلالات الأخرى.

(٤,٨,٧) تكامل المصنع Plant integration

يعتبر التنوع أحد العوامل الهامة في اقتصاديات مصنع الإيثانول. يعد الإيثانول في بعض المصانع ناتج وسطي، فعلى سبيل المثال فإن شركة آرشر-دانيلز-ميدلاند Archer-Daniels-Midland تستخدم الذرة المطحون والمرطب والذي يتم فيه نقع الذرة ثم نزع القشرة ثم نزع الجنين وذلك لإنتاج عليقة بروتينية وزيت الذرة والنشا وبعض العصائر وثاني أكسيد الكربون ويستخدم النشا المتبقي في إنتاج الإيثانول. يحتاج هذا المشروع إلى رأس مال كبير وإلى طاقة كبيرة وينتج عنه كثير من النواتج النهائية ذات القيمة العالية ولكن ينتج عنه إيثانول أقل بالنسبة لكل كيلو جرام من الذرة.

Use of new microorganisms استخدام ميكروبات جديدة (٤,٨,٨)

لعل من المفيد أن نعرف أنه لا يوجد حتى الآن نوع واحد من الخميرة يمكنه أن يستخدم كل المواد الخام الصالحة لإنتاج الإيثانول . فعلى سبيل المثال فإن الخميرة *Saccharomyces spp* لا تمتلك الجينات التي تنتج الإنزيمات المسؤولة عن تحويل المواد الخام إلى سكريات قابلة للتخمر مثل إنزيمات الأميليز أو إنزيمات السليوليز أو إنزيمات بينا جلوكوسيديز (إنزيمات اللاكتيز) كما أنها أيضاً لا تستطيع إنتاج الإنزيمات التي تهدم السكريات الخماسية. ولذلك فإن الاتجاه السائد الآن في أبحاث الخمائر هو تطوير أو إنتاج سلالات من الخميرة لها القدرة على الاستفادة من عدد متنوع من المواد الخام بمعدلات سريعة عند درجات حرارة مرتفعة ولها القدرة أيضاً على تحمل تركيزات عالية من السكر ومن الإيثانول الذي تنتجه. يعد تحمل درجات الحرارة المرتفعة صفة هامة جداً بالنسبة للخميرة المستخدمة في إنتاج الإيثانول وذلك لأن تخمر الإيثانول ينتج عنه كمية كبيرة من الحرارة كما أوضحنا سابقاً. ومشكلة عدم تحمل درجات عالية من الحرارة تعتبر مشكلة خطيرة جداً في مناطق من العالم يتوفر فيها معظم وأرخص المواد الخام المستخدمة في إنتاج الإيثانول ولكن ترتفع فيها درجات الحرارة الطبيعية أو البيئية. وقد تمكنت إحدى الشركات في كندا وهي شركة Labatt Brewing أن تطور سلالة من الخميرة تستطيع أن تقوم بالتخمر الكحولي عند درجة حرارة أعلى من ٤٠ م° . وقد تم إنتاج هذه السلالة عن طريق تقنيات التهجين Hybridization. وعزلت في البرازيل خمائر تتحمل درجات عالية من الضغط الأسموزي ولها إنتاجية عالية من الإيثانول كذلك عزلت خمائر

متحملة لدرجات الحرارة العالية حيث كان يتم التخمر على درجة حرارة أعلى من ٤٤م. وعلى الرغم من ذلك لا توجد أبحاث كثيرة على إنتاج الإيثانول بكميات كبيرة باستخدام هذه الميكروبات، ولذلك تركز الأبحاث حالياً على استخدام الخمائر التي تتحمل درجات حرارة عالية في إنتاج الإيثانول، ومن حسن الحظ أن الخمائر التي تتحمل درجات حرارة عالية تنوع في أجناس مختلفة مثل جنس *Saccharomyces* و *Khuyveromyces* و *Fabospora* التي وجد أنها يمكن أن تقوم بالتخمر في درجات حرارة ٤٠ و ٤٣ و ٤٦م على الترتيب مع إنتاجية عالية من الإيثانول.

إن البحث عن خمائر تتحمل درجات حرارة عالية يعتبر عامل هام جداً في تقليل تكاليف تبريد المخمرات خلال أشهر الصيف في البلاد شبه الاستوائية والاستوائية. كذلك يقلل إنتاج تركيز عالي من الإيثانول في درجات الحرارة العالية من تكاليف عمليات التقطير. ولذلك فإن هناك محاولات دائمة للحصول على سلالات من الخمائر تنتج الإيثانول عند درجات حرارة أعلى من ٤٠م. ومن هذه المحاولات، نقل صفات تحمل الحرارة العالية من بعض الميكروبات المحبة لدرجات الحرارة العالية إلى سلالات الخميرة ذات الكفاءة العالية في إنتاج الإيثانول، ولكن نظراً لعملية الاختيار التقليدية للسلالات من بيئات مختلفة هي الطريقة الرئيسية لاختيار الخمائر المحبة للحرارة المرتفعة. تتحدد مصادر العينات التي يحتتمل أن يوجد بها خمائر تتحمل درجات حرارة عالية في مصدرين الأول هو الاختيار من خزانات التخمر في مصانع المشروبات الكحولية والثاني هو العزل من البيئات الطبيعية وخصوصاً المناطق الحارة. وقد تمكن العلماء من عزل سلالات من الخميرة

Kluyveromyces marxianus قادرة على النمو عند ٥٢°م وقادرة على التخمر عند ٥٠°م من أحد مصانع المشروبات الكحولية في الهند. كما أن Ueno وآخرون سنة ٢٠٠١م، كانوا أول من عزل ثمانية سلالات من الخميرة *Candida* المحبة لدرجات الحرارة المرتفعة من أحد الينابيع الحارة. ووجد أن ثلاث من هذه السلالات لها نشاط تخمري عالي عند درجات حرارة ٤٨-٥٥°م. ولذلك فإن هذا هو العمل الأول الذي يجد خمائر يمكن أن تقوم بالتخمير الكحولي فوق ٥١°م.

كذلك فإن هناك أبحاث مستمرة للحصول على طفرات من الخميرة *Saccharomyces spp* معدلة الحامض النووي DNA الموجود في الميتوكوندريا بحيث أن الإنزيمات الضرورية للنمو الهوائي تكون غير كافية أي أن الخميرة يمكن أن تنمو في ظروف غير هوائية. مثال آخر وهو ما يعرف بالخميرة السوبر *Super yeast* وهي الخميرة *Schwanniomyces alluvius* أو الخميرة *Schw.castellii*. هذه الخمائر السوبر تمكن العلماء من إنتاجها وهي تمتلك صفة نادرة وهي احتوائها على إنزيمات ألفا أميليز وجلوكو أميليز، وبالتالي فإن هذه الخمائر قادرة على تخمير النشا بشكل مباشر إلى إيثانول دون الحاجة إلى تحويله إلى سكريات قابلة للتخمير أولاً. وقد حاول العلماء استخدام هذه الخميرة السوبر في إنتاج الإيثانول بشكل تجاري إلا أنهم اكتشفوا أن هناك مشكلة أخرى وهي أن هذه الخميرة لا تتحمل الإيثانول الذي تنتجه عند تركيز أعلى من ٤٠٧٪.

وقد جرت محاولات للدمج الوراثي بين هذه الخميرة السوبر وسلالة من الخميرة *Saccharomyces spp* التي تتحمل تركيزات عالية من الإيثانول وكانت النتيجة

هي الحصول على سلالة لها قدرات متوسطة. وعلى أية حال لا يمكن حتى الآن استخدام الخميرة السوبر في إنتاج الإيثانول كوقود وربما يحتاج الأمر إلى بضعة سنوات حتى يتم ذلك، ولكن قد تستخدم هذه الخميرة في المستقبل القريب في إنتاج أنواع من البروتين تستخدم في النواحي الصحية.

استطاع Whitney وآخرون (١٩٨٥م) أن ينتجوا سلالة من الخميرة يمكن أن تخمر النشا في وجود ٥٠٪ فقط من مستوى إنزيم الجلوكو أميليز الذي يضاف في الحالات العادية، أي أن هذه السلالة تنتج كمية من الجلوكو أميليز وتوفر ٥٠٪ من الكمية المعتاد إضافتها. وهذه السلالة المعدلة هي إحدى سلالات الخميرة *Saccharomyces diastaticus* والتي تحتوي على جينات DEX1 و DEX2 و STA3 التي تجعل الخميرة قادرة على إنتاج الإنزيم الخارجي جلوكو أميليز. وبمنظرة اقتصادية يمكن تصور أن مصنع الإيثانول الذي ينتج ٥١٠ متر مكعب من الإيثانول في العام، يستخدم ٦١٠ x ٠٠١٩ طن من النشا، وهذه الكمية من النشا تحتاج إلى ٦١٠ x ٠٠١٩ لتر من إنزيم الجلوكو أميليز وسعر اللتر من هذا الإنزيم هو ٣٠٧٥ دولار، وعلى ذلك فإن استخدام الخميرة *Saccharomyces diastaticus* في إنتاج الإيثانول سوف يؤدي إلى توفير ٥٠٪ من كمية الإنزيم المضافة أي يؤدي إلى توفير ٣٥٠٠٠٠٠ دولار سنويا. ولكن للأسف فإن هذه الإنزيمات التي تنتجها الخميرة غير ثابتة عند درجات الحرارة العالية، مما دعا إلى استمرار الأبحاث في هذا المجال والتي بالتأكيد سوف تؤدي إلى الحصول على سلالات تنتج إنزيمات ثابتة عند درجات الحرارة المرتفعة.

كما استطاع العلماء أيضاً تعديل خائثر المشروبات الكحولية وخميرة الخبيز وراثياً وأدخلوا إليها الجين الوراثي MEL1 وهو جين بنائي لإنزيم الملبيباز Melibiase، بذلك أمكن للخميرة نتيجة إنتاجها لهذا الإنزيم أن تستفيد من ١-٢٪ من الرافينوز الموجود في مولاس البنجر، ولذلك فإن استخدام هذه السلالات سوف يكون مفيداً في إنتاج خميرة الخبيز وفي إنتاج الإيثانول كوقود من مولاس البنجر. وتوجد سلالات من الخميرة *Saccharomyces spp* مقاومة بطبيعتها لبعض مبيدات الحشائش مثل المبيد Sulphometuron methyl ويعتقد العلماء إن نقل جينات من هذه الخميرة إلى خائثر أخرى قد يكون له فائدة في أغراض خاصة في المستقبل. كذلك فإن هناك أبحاث بدأت منذ حوالي ٢٠ سنة، تقوم على فكرة هندسة الخائثر بمواد نشطة ضد التلوث بحيث تكون قادرة على إنتاج السموم القاتلة للملوثات أو إنتاج إنزيمات الليسوزايم Lysozyme المحللة لجدر الخلايا التي قد تلوث البيئة. وقد أمكن بالفعل إنتاج هذه الخميرة وأمكن التحسين من قدراتها وأصبحت متاحة في الأسواق في صورة جافة نشطة وتسمى الخميرة القاتلة Killer yeast.

لا يمكن لكل سلالات الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* المستخدمة حالياً أن تنمو أو تخمر السكريات الخماسية. ولذلك أجريت أبحاث كثيرة على الخائثر *Candida* و *Pichia* وأعطت نتائج واعدة لاستخدام هذه السكريات في المستقبل. كذلك تمت دراسات لنفس الغرض بواسطة (Zayed and Meyer 1996) على الخميرة *Pachysolen tannophilus* (هذه الخميرة لا تتحمل تركيزات عالية من الإيثانول) وأعطت أيضاً نتائج جيدة.

(٤,٩) المراجع

بريشة ، جابر زايد و حماد، عادل محمود (٢٠٠٢) أساسيات الميكروبيولوجيا الصناعية. الدار العربية للنشر والتوزيع، القاهرة، جمهورية مصر العربية
 زهران، أحمد شوقي، و بريشة، جابر زايد (٢٠٠٦) الإنزيمات الميكروبية وتطبيقاتها في الصناعة والطب. كلية الزراعة، جامعة الملك سعود، الرياض، المملكة العربية السعودية.

- Alan, R. and Derek, L. (1986a) Fermentation products formed from pyruvate by facultative anaerobes. In: Principles of Industrial Microbiology. Pergamon Press, New York.
- Alan, R. and Derek, L. (1986b) Fermentation products related to sugars. In: Principles of Industrial Microbiology. Pergamon Press, New York.
- Dolan, T. (1976) Bacterial contamination of alcohol fermentation processes. Journal of the Institute Brewing, 82: 177-183.
- Eliasson, A.; Hofmeyr, J.; Peddler, S. and Hahn-Hägerdal, B. (2001) The xylose reductase/xylitol dehydrogenase/xylulokinase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology, 29: 288-297.
- IngledeW, W. (1993) Yeasts for production of fuel ethanol. In: The Yeasts (A. H. Rose, and J. S. Harrison, eds), 2nd edn, Vol. 5, Academic Press, London.
- IngledeW, W. and Hazen, N. (1986) Optimum conditions for ethanol production by active dry yeast. New Brewer, 3: 1-14.
- Katzen, R. (1984) Cellulose analysis. Bioenergy World Conference, Gothenburg, 18-21 June.
- Lee , T.; Kim, M.; Park, Y.; Bae, M.; Ryu, Y. and Seo , J. (2003) Effects of xylulokinase activity on ethanol production from d-xylulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Microbiology, 95: 847-857.
- Lee, T.; Kim, M.; Ryu, Y. and Seo, J. (2001) Estimation of theoretical yield for ethanol production from d-xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using Metabolic Pathway Synthesis algorithm. Journal of Microbiology and Biotechnology, 11:384-388.
- Maiorella, B.; Wilke, C. and Blanch, H. (1981) Alcohol production and recovery. In: Advances In Biochemical Engineering. Fiechter, A. (ed), Vol 20, Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- O'Connor-Cox, E. and IngledeW, (1990) Effect of oxygen supplementation on alcoholic fermentation efficiency. American Society of Brewing Chemists Journal. 47: 102-107.

- Pedices, I.; Perdices, M.; Dominguez, J. and Garcia, J. (2005) Procedure for the production of ethanol from lignocellulosic biomass using a new heat-tolerant yeast. Patent Application Description, Agent: John Palmer C/o Ladas & Parry- Los Angeles, CA, US, Class: 435161000 (USPTO), C12P007/06 (Intl Class)
- Rose, A. and Harrison, J. (1993) Yeast Technology, Academic Press, New York, 5 5th ed.
- Thomas, K.; Hynes, S. and Ingledew, W. (2001) Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 819-827.
- Ueno, R.; Urano, N. and Kimura, S. (2001) Characterization of thermotolerant, fermentative yeasts from hot spring drainage. *Fisheries Science*, 67: 138-147.
- Wallace, T. (1986) Factors affecting ethanol yield by *S. cerevisiae*. International Conference on Fuel Alcohol and Chemicals from Biomass, Miami, November.
- Wayman, M. (1980) Saccharification of cellulose. Proceedings of the IVth International symposium on alcohol fuels technology, October, 1, 79-90.
- Wayman, M.; Chen, S. and Doan, K. (1992) Biological saccharification of paper. *Bio-joule*, 14, 8-14.
- Whitney, G.; Murray, C.; Russel, I. and Stewart, G. (1985) Partial saccharification of starch by modified *Saccharomyces diastaticus*. *Biotechnology Letters*, 7: 349-355.
- Zayed, G. (1987) Microbiological studies on ethanol production from certain waste materials. Ph.D. theses, UCC, Cork, Ireland.
- Zayed, G. (1997) Production of alcohol from sugar beet molasses without heat or filter sterilization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19: 39-42.
- Zayed, G. (2009) Pproduction of 16% ethanol from 35% sucrose. *Biomass & Bioenergy* (in press)
- Zayed, G. and Foley, J. (1987) The influence of the fermentation conditions on ethanol yields from whey permeate. *Irish J. Food Sc. Technol* 11, 109-118
- Zayed, G. and Foley, J. (1987) The influence of the fermentation conditions on ethanol yields from sugar beet molasses and fodder beet juice using *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Irish J. Food Sc. Technol* 11, 119-133
- Zayed, G. and Hunter, J. (1991) Ethanol production from salt whey using free and agar immobilized yeasts. *Milchwissenschaft*, 46: 1-7
- Zayed, G. and Meyer, O. (1996) The single-batch bioconversion of wheat straw to ethanol employing the fungus *Trichoderma viride* and the yeast *Pachysolen tannophylus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45: 551-555.
- Zayed, G. and Winter, J. (1995) Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of *Lactobacilli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44: 362-366.