# تعيين الظروف المثلى لإنتاج الايثانول من الشرش باستعمال خميرة *kluyveromyces* Sp المعزولة محليا

# Determination of the optimum conditions for ethanol production from whey by utilization the local isolate *Kluyveromyces* sp.

**أكرم ثابت الراوي ، رعد عبد الله القصيري ، عبد المجيد حماد السامرائي**

قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية /كلية الزراعة / جامعة بغداد

**Akram T. Alrawi , Raad A. Alkusairy , Abdulmajed AL-Samarraie**

Dept. of food science and Biotechnology / College of Agriculture / Baghdad University

**المستخلص**

**درست بعض الظروف المثلى لانتاج الايثانول بوساطة العزلة المحلية *kluyveromyces* Sp. اذ اشارت النتائج الى ان افضل الظروف هي مدة تخمر 8 ايام ودرجة حرارة تخمر 30 م وحجم لقاح 1.15 × $10^6$ وحدة تكوين مستعمرة / مل وأس هيدروجيني ابتدائي 5.0 وكانت التركيبة المثلى لوسط التخمر متمثلة بالشرش الذي يحتوي على لاكتوز ابتدائي 9.3 % والمدعم بكبريتات الامونيوم 0.015 % وخلاصة الخميرة 0.01 % و K2HPO4 0.015 % وحققت اضافة عصير التمر بنسبة 0.5 % زيادة ملحوظة في نسبة الايثانول المنتج مقدارها 1.22 % مقارنة بتلك المتحققة باستعمال وسط تخمر لايحتوي على عصير التمر . وباستعمال هذه الظروف مجتمعة كانت نسبة الايثانول المنتج واللاكتوز المتأيض وكفاءة التخمر تساوي 4.48 % ، 70.96 % ، 132.36 % على التوالي.**

**Abstract**

**A series of experiments were conducted to explore the optimum conditions for ethanol production from cheese whey. The optimum conditions were: incubation period, 8 days, fermentation temperature, 30°c, Size of inoculum, 1.15 x $10^6$ C.F.U/ml, initial pH of medium, 5.0. The optimum composition of the fermentation medium were : Whey containing 9.3% lactose and fortified with ( NH4)SO4, 0.015 % , Yeast Extract, 0.01% , K2HPO4, 0.015% and it was found that the addition of date Syrup at a level of 0.5% noticeably increased ethanol yield compared with the medium which contain no date Syrup. By collective utilization of all the optimum conditions mentioned above, the following results were obtained, metabolized lactose 70.9%, ethanol production 4.48% and fermentation efficiency 132.36%.**

**المقدمة :**

ينتج من اغلب العمليات الصناعية مخلفات مائية تحوي كميات متفاوتة من الاملاح والمواد العضوية ويتم التخلص من هذه المخلفات بطرحها مباشرة الى المجاري او الانهر وغيرها من مجمعات الصرف الصحي متسببة في حدوث انخفاض في الاوكسجين الذائب في الماء مما ينتج عنه حدوث حالة اختناق لبعض الاحياء المائية فضلا عن تشجيع انواع غير مرغوب فيها من الاحياء وانتاج روائح كريهة ويعد الشرش احد اهم مصادر التلوث هذه اذ ينتج عرضيا بكميات كبيرة من صناعة الجبن وينتج في الولايات المتحدة الامريكية وحدها 36 بليون طن سنويا من الشرش [1]

وجاء في دراسة مسحية لعام 2000 ان كمية مايطرح الى المياه الثقيلة من الشرش من معامل حكومية واهلية في العراق يقدر بـ 30765.96 طن سنويا [2] .

لقد استقطبت القيمة الغذائية العالية للشرش ( 4.5 % لاكتوز ، 0.8 % بروتين ، 1 % رماد فضلا عن بعض الفيتامينات والاحماض الدهنية ) اهتمام العديد من الدراسات ومنها الدراسة الحالية بهدف الاستفادة من الشرش في انتاج مواد حيوية مفيدة ومنها الايثانول وبذلك فقد هدفت هذه الدراسة الى تحقيق هدفان رئيسان هما التخلص من التلوث البيئي وتوفير التكاليف الخاصة بمعالجة الشرش قبل طرحه في مجمعات الصرف المختلفة والثاني هو انتاج الايثانول الذي يتصدر قائمة استعمالات الشرش كوسط انتاجي لما للايثانول من فوائد في المجالات الطبية والصناعية والعلمية وكبديل واعد لمصادر الطاقة التقليدية .

**المواد وطرائق العمل :**

مصدر العزلة : قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية – كلية الزراعة - جامعة بغداد .

تحضير وسط التخمر العام : استعمل الشرش الناتج من صناعة جبن طري فرز والمجهز من معمل البان كلية الزراعة – جامعة بغداد اذ تم ازالة البروتين ( Deproteinization ) من الشرش المحمض باستعمال الحرارة [3] وعلى النحو الاتي : خفض الاس الهيدروجيني للشرش الى 5.0 ( باستعمال حامض اللاكتيك 10 % ) ثم عرض الى درجة حرارة 90 – 95 م لمدة 15 دقيقة ، ترك بعدها لتركيد الخثرة المتكونة ثم سحب السائل الرائق بطريقة السيفون ودعم بعدها بالمواد الاتية وبالنسب المؤشرة ازاء كل منها ، 0.005 K2HPO4 % ، 0.005 (NH4)2 SO4 % ، 0.01 Yeast Extract % ولاكتوز 9 % ثم وزع في دوارق زجاجية سعة 500 مل وبواقع 200 مل من الوسط لكل دورق وعقمت بالمؤصدة بدرجة 121 م لمدة 15 دقيقة ، واعتمد وسط تخمر عام لانتاج الايثانول كما اعتمد حجم لقاح $1.2 \times 10^6$ خلية / مل ودرجة حرارة حضن 30 م ومدة تخمر 5 ايام لهذا الغرض .

**استخلاص الكحول وتقديره** : اجريت عملية الاستخلاص بعد انتهاء مدة التخمر وباستعمال جهاز التقطير البسيط قيست بعدها النسبة المؤية للكحول الناتج باعتماد اسلوبين :

1. استعمال المكثاف الكحولي ( Gay – lussae TP15 ) المدرج من 0 – 100 وفي درجة حرارة 15 م .
2. استعمال جهاز انكسار الضوء ( ABBE – Refractometer ) ووفقا لجداول خاصة [4] وعلى اساس العلاقة مع معامل الانكسار وفي درجة حرارة النموذج عند وقت القياس ثم حسبت نسبة الكحول الناتج على ضوء المعادلة الاتية :

Ethanol ( W/ V%) = 0.7938 x Ethanol ( V / V%)

**تقدير اللاكتوز :** استعملت الطريقة اللونية الموصوفة من قبل [5] واستخرجت النسبة المئوية للاكتوز على ضوء المنحنى القياسي والذي تمثل قيم الامتصاصية مقابل تراكيز اللاكتوز .

**تشخيص الكحول الناتج :** استعمل جهاز التحليل الكروماتوغرافي الغاز – سائل ( G.L.C ) المجهز من شركة HEWLETE PACKARD الامريكية في تشخيص الكحول الناتج باستعمال العمود المصنوع من الحديد غير القابل للصدأ والمعبأ بالطور الثابت SP2100 ( Mesh120 – 100 ) وبابعاد 6 قدم / 4 ملم$^2$ .

**وكانت ظروف التشغيل هي :** درجة حرارة الفرن 60 م ، منطقة الحقن 100 م ، منطقة المكشاف 200 ومعدل سريان غاز N2 20 مل / دقيقة وغاز H2 30 مل / دقيقة وغاز O2 300 مل / دقيقة

**اختيار الظروف المثلى لانتاج الكحول من العزلة *kluyveromyces* Sp.** :

درست المعايير الاتية لتعيين الظروف المثلى لانتاج الكحول وهي :

مدة التخمر حيث استعملت مدة حضن ( 1 ، 3 ، 5 ، 8 ، 10 ، 15 يوم ) وكانت درجة حرارة التخمر ( 20 ، 25 ، 30 ، 35 ، 40 م ) وكان الاس الهيدروجيني الابتدائي (3.5، 4.0 ، 4.5 ، 5.0 ، 5.5 ، 6.0) وحجم لقاح ( $10^3$ ، $10^4$ ، $10^5$ ، $10^6$ ، $10^7$ ، $10^8$ وحدة تكوين مستعمرة / مل ) وبتركيز لاكتوز ( 4.9 ، 7.25 ، 9.3 ، 12.28 ، 15.8 ، 19.1 % ) وكانت تراكيز مستخلص الخميرة ( 0.005 ، 0.010 ، 0.025 ، 0.030 % ) وتراكيز K2HPO4 ( 0.005 ، 0.010 ، 0.015 ، 0.020 ، 0.025 ، 0.30 ) .

واستعملت المصادر النيتروجينية اليوريا والببتون ونترات الصوديوم وكبريتات الامونيوم بنسبة 0.25 % لكل منها كما درس استعمال مستويات مختلفة من كبريتات الامونيوم والمتمثلة بالتراكيز الاتية (0.010،0.005، 0.015، 0.020 ، 0.025 ، 0.030 % ) واستعمل عصير التمر وبالتراكيز الاتية(0.5 ، 1.5، 2.5 ،5 % ح / ح ) .

حسبت النسبة المئوية للاكتوز المتايض والنسبة المئوية للكفاءة التخمرية كما ياتي

1 . حساب النسبة المئوية للاكتوز المتايض ( و/ ح % ) ( Metabolized lactose W/V% )

$$M.L = \frac{IL - RL}{IL} X100$$

IL = اللاكتوز الابتدائي (initial lactose)، RL = اللاكتوز الباقي (Residual lactose)

2 . حساب النسبة المئوية للكفاءة التخمرية ( EF Efficiency of Fermentation

$$EF = \frac{E\ (W/V\ \%)}{IL - RI\ (W/V.)} 1.95\ X\ 100$$

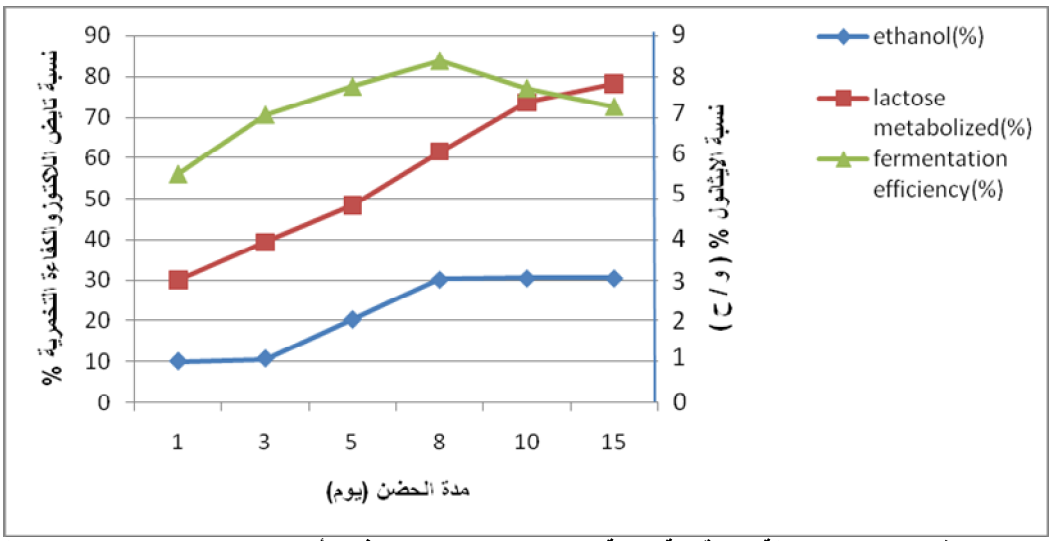
E = نسبة الكحول الاثيلي الناتج (و / ح %) ، IL = نسبة اللاكتوز الابتدائي (و/ح %)

RL = نسبة اللاكتوز المتبقي (و/ح %)

**النتائج والمناقشة :**

تحتاج الخمائر كغيرها من الاحياء المجهرية الى ظروف مثلى للقيام بفعالياتها الحيوية المختلفة كتايض اللاكتوز وانتاج الكحول الاثيلي الذي يعتمد بشكل رئيس على تركيب الوسط الغذائي وعلى كفاءة النظام الناقل للاكتوز عبر الغشاء البلازمي ( Lactose transporting System ) وكذلك على مستوى انتاج فعالية انزيم ( B- galactosidase ) وعوامل اخرى .

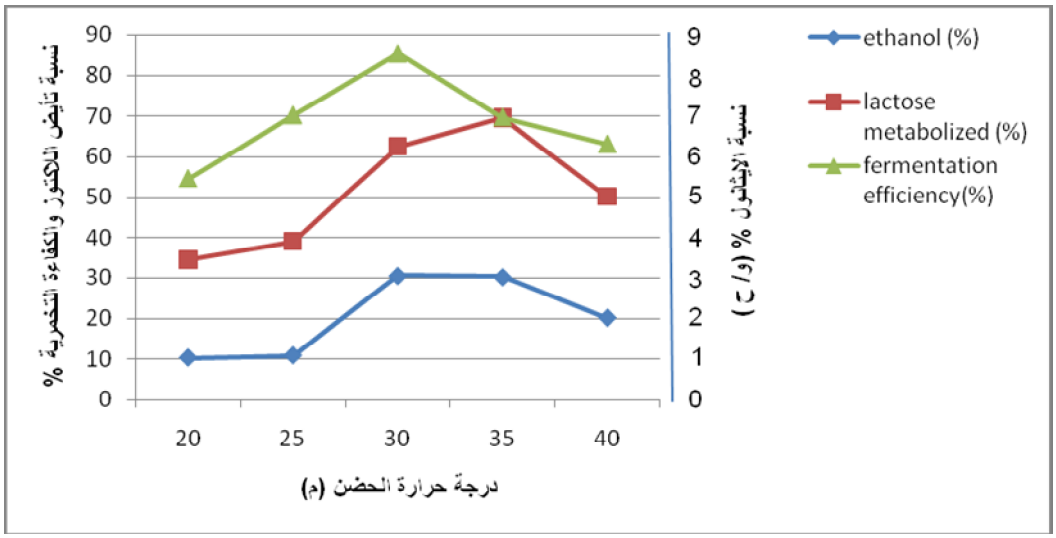
اظهرت النتائج الشكل (1) ان نسبة اللاكتوز المتايض تزداد بازدياد مدة التخمر اذ بلغت اقصاها ( 78.33 % ) في اليوم الخامس عشر في حين بلغت نسبة الايثانول اقصى قيمة لها ( 3.5 % و / ح ) في اليوم العاشر . ان عدم تجاوز هذه النسبة من الايثانول بالرغم من توافر اللاكتوز في وسط الانتاج على ضوء ماشارت اليه التحليلات يعزى الى تحسس العزلة المستعملة بالنسبة المئوية هذه للايثانول وعدم قدرتها في تحمل النسب الاعلى .




**الشكل (1) : تاثير مدة حضن مختلفة على قابلية العزلة *Kluyveromyces sp.* في تأيض اللاكتوز والكحول المنتج والكفاءة التخمرية . الظروف المستخدمة : درجة حرارة الحضن ( 30 )م ، اس هيدروجيني (5 ) ، حجم لقاح $1.2 \times 10^6$ ، 200 مل وسط تخمر عام .**

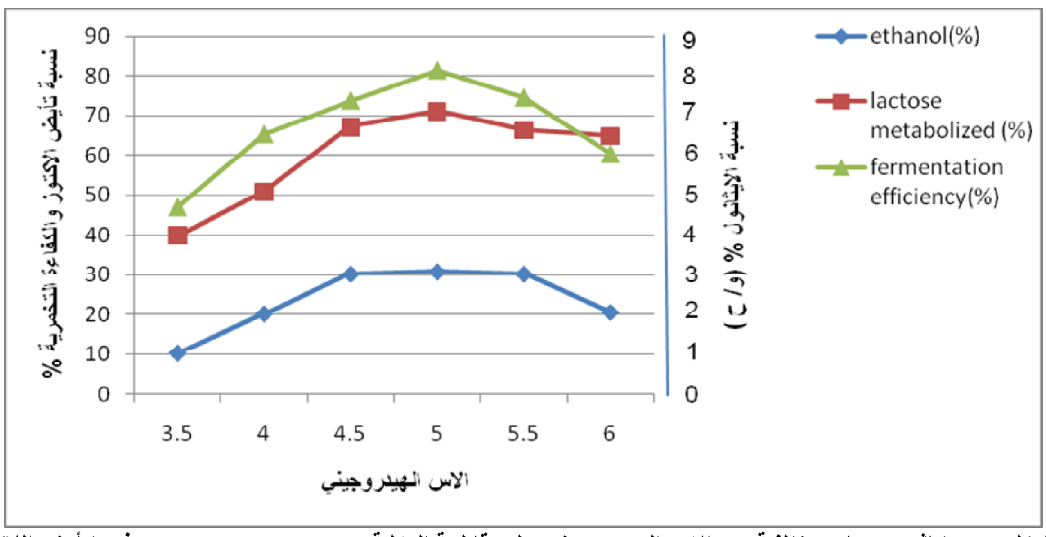
ويوضح الشكل (2) ان درجة الحرارة المثلى لانتاج الايثانول كانت 30 م اذ بلغت النسبة المئوية للاكتوز المتايض ونسبة الكحول المنتج والكفاءة التخميرية 62.5 ، 3.5 ، 85.31 % على التوالي . وانخفضت هذه النسب عند استعمال درجات حرارة تخمر اخرى واشار [6] الى ان درجة الحرارة المثلى لانتاج الايثانول تختلف باختلاف السلالة ، وذكر [ 7 ] الى ان انخفاض درجة الحرارة يقلل من التاثير السمي للكحول وبهذا الخصوص ذكرت [8] ان درجة الحرارة

المثلى لانتاج الايثانول تكون بين 25 ، 35 م وان ارتفاع درجة حرارة التخمر فوق 35 م يفضي الى تحطيم الانزيمات وانخفاض حيوية الخلايا .



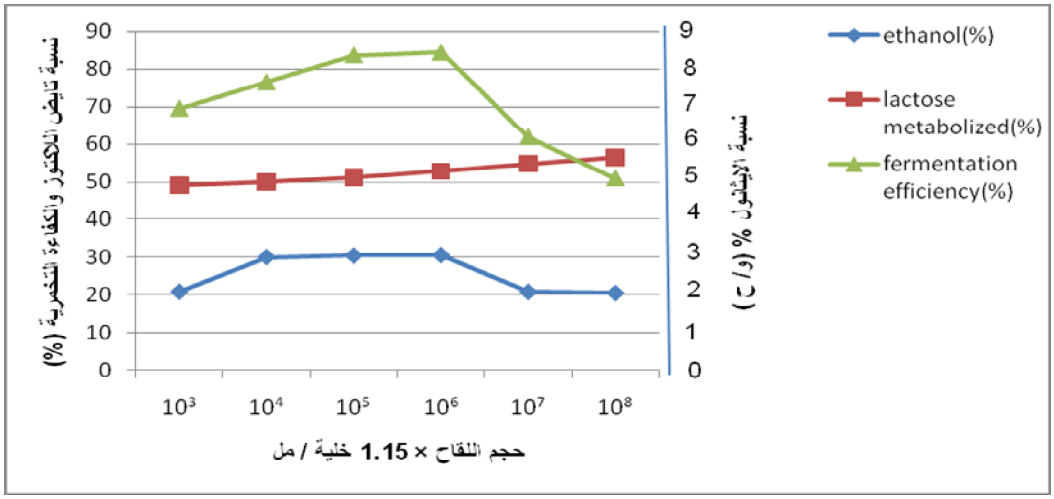

**الشكل (2) : تاثير درجات حرارة مختلفة على قابلية العزلة *Kluyveromyces sp.* في تأيض اللاكتوز والكحول المنتج والكفاءة التخمرية . الظروف المستخدمة : مدة حضن (8) ايام ، اس هيدروجيني (5 ) ، حجم لقاح 1.2 x $10^6$ ، 200 مل وسط تخمر عام .**

ويتضح من الشكل ( 3 ) ان الاس الهيدروجيني الابتدائي الامثل لانتاج الايثانول من قبل العزلة قيد الدراسة هو 5.0 حيث كانت نسبة اللاكتوز المتايض والايثانول المنتج والكفاءة التخميرية هي ( 70.09 ، 3.8 ، 81.42 %) على التوالي وانخفضت هذه النسب عند الابتعاد ارتفاعا وانخفاضا عن هذه القيمة للاس الهيدروجيني ووجد [ 1 ] ان خفض الهيدروجيني من 7.0 الى 4.0 يؤدي الى رفع انتاج الايثانول من 16.5 الى 26.5 غم / لتر .




**الشكل (3) : تاثير درجات مختلفة من الاس الهيدروجيني على قابلية العزلة *Kluyveromyces sp.* في تأيض اللاكتوز والكحول المنتج والكفاءة التخمرية . الظروف المستخدمة : مدة حضن (8 ) ايام ، درجة حرارة الحضن ( 30 )م ، حجم لقاح x1.2 $10^6$ ، 200 مل وسط تخمر عام .**

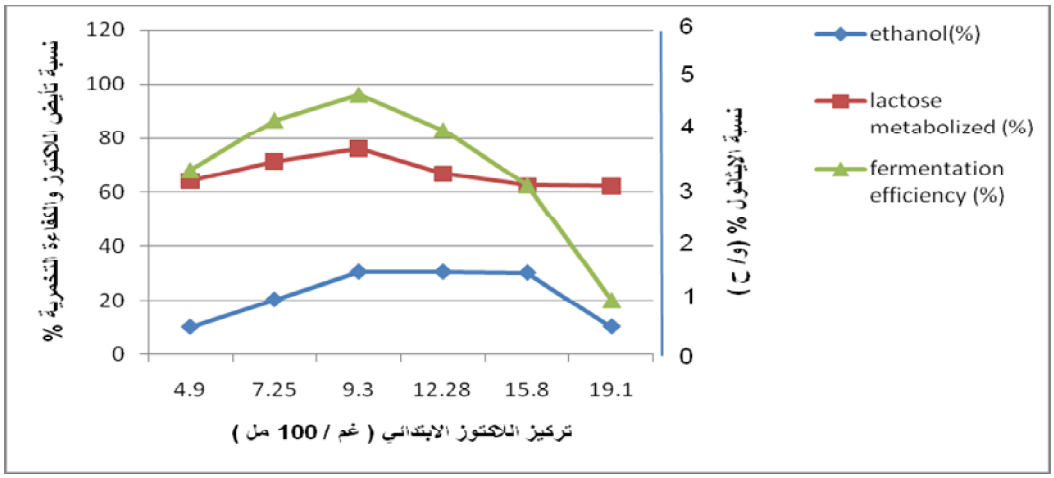
ان اعلى انتاج للايثانول واعلى كفاءة تخمرية والبالغة 3.57 و 84.58 % على التوالي عند استعمال حجم لقاح 1.15 × $10^6$ وحدة تكوين مستعمرة / مل الشكل( 4 )




**الشكل (4) : تاثير حجوم مختلفة من اللقاح على قابلية العزلة *Kluyveromyces sp.* في تأيض اللاكتوز والكحول المنتج والكفاءة التخمرية . الظروف المستخدمة : مدة حضن (8 ) ايام ، درجة حرارة الحضن ( 30 )م ، اس هيدروجيني (5) ، 200 مل وسط تخمر عام .**

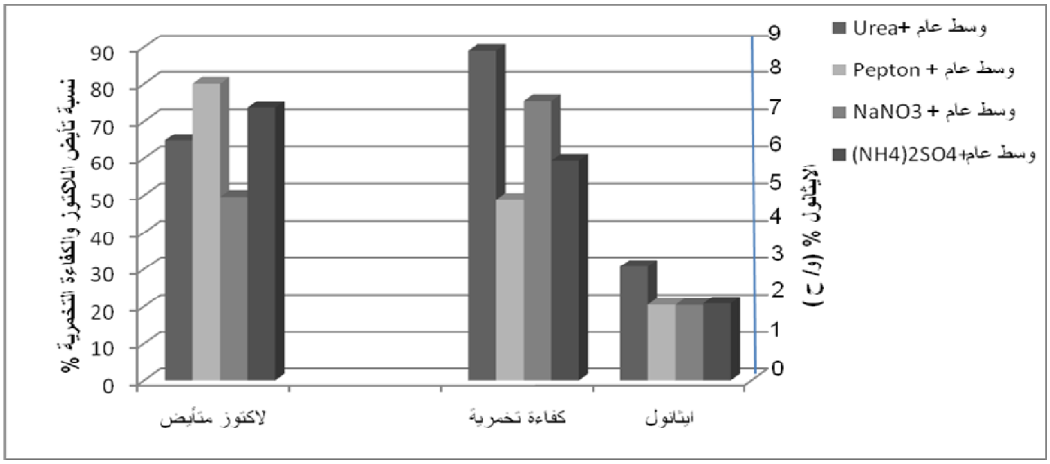
وجد [9] في دراسته المتعلقة بحجم اللقاح ان استعمال حجم لقاح عالي ( اكثر من $10^7$ خلية / مل) قد يتسبب في زيادة استهلاك اللاكتوز لصالح الفعاليات الحيوية الاخرى على حساب انتاج الايثانول .

تعد النسبة الطبيعية للاكتوز في الشرش والتي تبلغ 45 – 50 غم / لتر غير عملية في انتاج كميات يعول عليها من الايثانول لذا يعمد الباحثون الى رفع هذه النسبة بوسائل وتقنيات مختلفة ، واشار [10] الى ان التركيز المنخفض للسكر في وسط التخمر ( اقل من 3 غم / لتر ) يؤدي الى جوع خلايا الخمائر وانخفاض نشاطها الحيوي وتشير النتائج المستحصل عليها الشكل( 5 ) الى ان اعلى نسبة مئوية لتأيض اللاكتوز واعلى انتاج للايثانول وكفاءة تخمرية والمتمثلة بالقيم ( 76.2 ، 3.5 ،96.12) % على التوالي كانت بتدعيم الشرش باللاكتوز لتصبح نسبته الابتدائية 9.3 % وحصل[11] على انتاج للايثانول يقدر بـ 0.442 غم / لتر وبكفاءة تخمرية تساوي 93.54 % عند استعمال لاكتوز ابتدائي بما يساوي 100 غم / لتر .



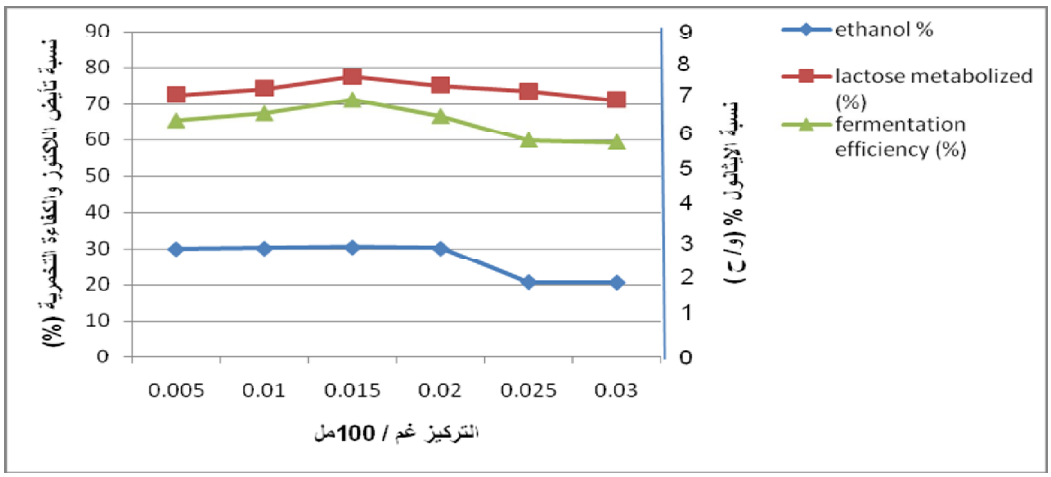

**الشكل (5) : تاثير حجوم مختلفة من سكر اللاكتوز الابتدائية على قابلية العزلة *Kluyveromyces sp.* في تأيض اللاكتوز والكحول المنتج والكفاءة التخمرية . الظروف المستخدمة : مدة حضن (8 ) ايام ، درجة حرارة الحضن ( 30 )م ، اس هيدروجيني (5) ، حجم لقاح 1.2 x $10^6$ ، 200 مل وسط تخمر عام**

يلاحظ من الشكل (6) ان افضل مصدر نايتروجيني كان اليوريا اذ تفوق على بقية المصادر النيتروجينية فيما يتعلق بنسبة الكحول المنتج والكفاءة التخمرية والبالغة 3.7،89 % على التوالي ولم يكن البيتون مصدرا نيتروجينيا مفضلا بالنسبة للعزلة قيد الدراسة اذا كانت نسبة الكحول المنتج والكفاءة التخمرية منخفضة 2.5 ، 48.8 % على التوالي بالرغم من ارتفاع نسبة اللاكتوز المتايض ( 80.0 % ) وتتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه [12] اذ وجد ان اضافة 1 % ببتون الى وسط التخمر نتج عنها اعلى نسبة لاكتوز متايض واقل نسبة كحول منتج في الوقت ذاته .



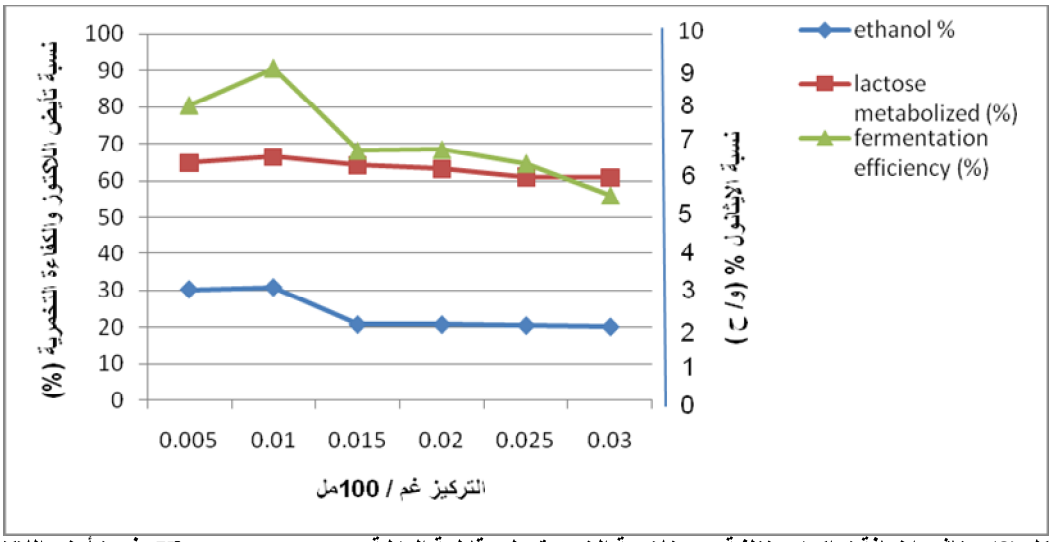

**الشكل (6) : تاثير اضافة مصادر نايتروجينية مختلفة على قابلية العزلة *Kluyveromyces sp.* في تأيض اللاكتوز والكحول المنتج والكفاءة التخمرية . الظروف المستخدمة : مدة حضن ( 8 ) ايام ، درجة حرارة الحضن ( 30 )م ، اس هيدروجيني (5) ، حجم لقاح $1.2 \times 10^6$ ، 200 مل وسط تخمر عام .**

وان مقارنة كفاءة المصادر النيتروجينية المستعملة في هذه الدراسة ( يوريا ، النترات ، البيتون) بكبريتات الامونيوم كمصر نايتروجيني لاعضوي في انتاج الايثانول تبين ارجحية الاخيرة بالرغم من تفوق اليوريا وذلك لسهولة استعمالها وعدم سميتها وذائبيتها العالية فضلا عن سرعة استهلاكها من قبل خلايا الخميرة [ 9 ،13 ] . وكان افضل تركيز لها في وسط الانتاج هو 0.015 غم / 100 مل حيث اسهم في الحصول على افضل النتائج مقارنة بالمستويات الاخرى المستعملة اذ بلغت نسبة اللاكتوز المتايض والكحول المنتج والكفاءة التخمرية 77.4 ، 3.5 ، 71.1 على التوالي الشكل (7) .



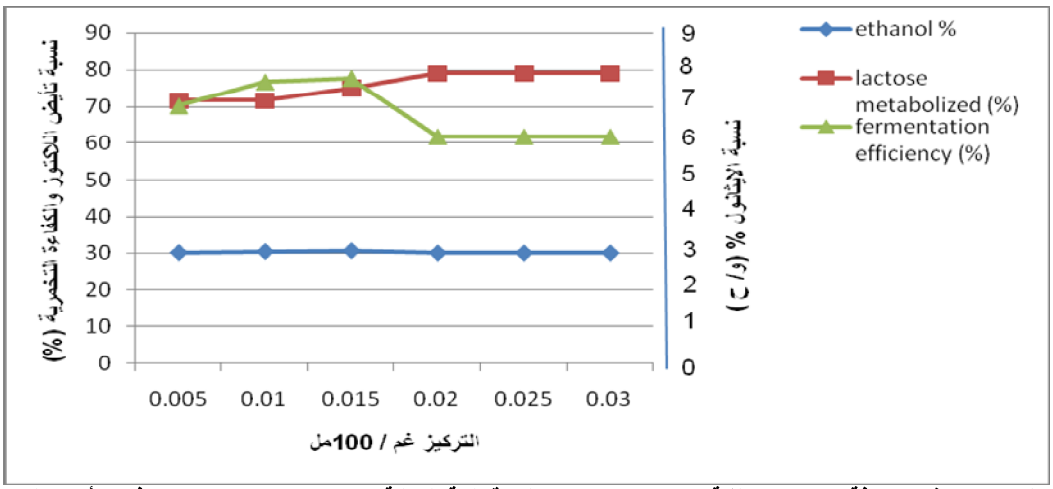

**الشكل (7) : تاثير اضافة تراكيز مختلفة من (NH4)2SO4 على قابلية العزلة *Kluyveromyces sp.* في تأيض اللاكتوز والكحول المنتج والكفاءة التخمرية . الظروف المستخدمة : مدة حضن ( 8 ) ايام ، درجة حرارة الحضن ( 30 )م ، اس هيدروجيني (5) ، حجم لقاح $1.2 \times 10^6$ ، 200 مل وسط تخمر عام .**

يتضح من الشكل ( 8 ) ان لاضافة نسب مختلفة من خلاصة الخميرة الى الشرش تاثيرا واضحا في نسبة اللاكتوز المتايض والكحول المنتج والكفاءة التخميرة حيث اعطى استعمال 0.01 % من خلاصة الخميرة افضل النتائج والبالغة 66.4 ، 3.83 ، 90.6 % على التوالي وتعد خلاصة الخميرة مصدرا مهما لعوامل النمو فضلا عن كونها مصدرا نيتروجينيا [8] .




**الشكل (8) : تاثير اضافة تراكيز مختلفة من خلاصة الخميرة على قابلية العزلة *Kluyveromyces sp.* في تأيض اللاكتوز والكحول المنتج والكفاءة التخمرية . الظروف المستخدمة : مدة حضن ( 8 ) ايام ، درجة حرارة الحضن ( 30 )م ، اس هيدروجيني (5) ، حجم لقاح 1.2 x $10^6$ ، 200 مل وسط تخمر عام .**

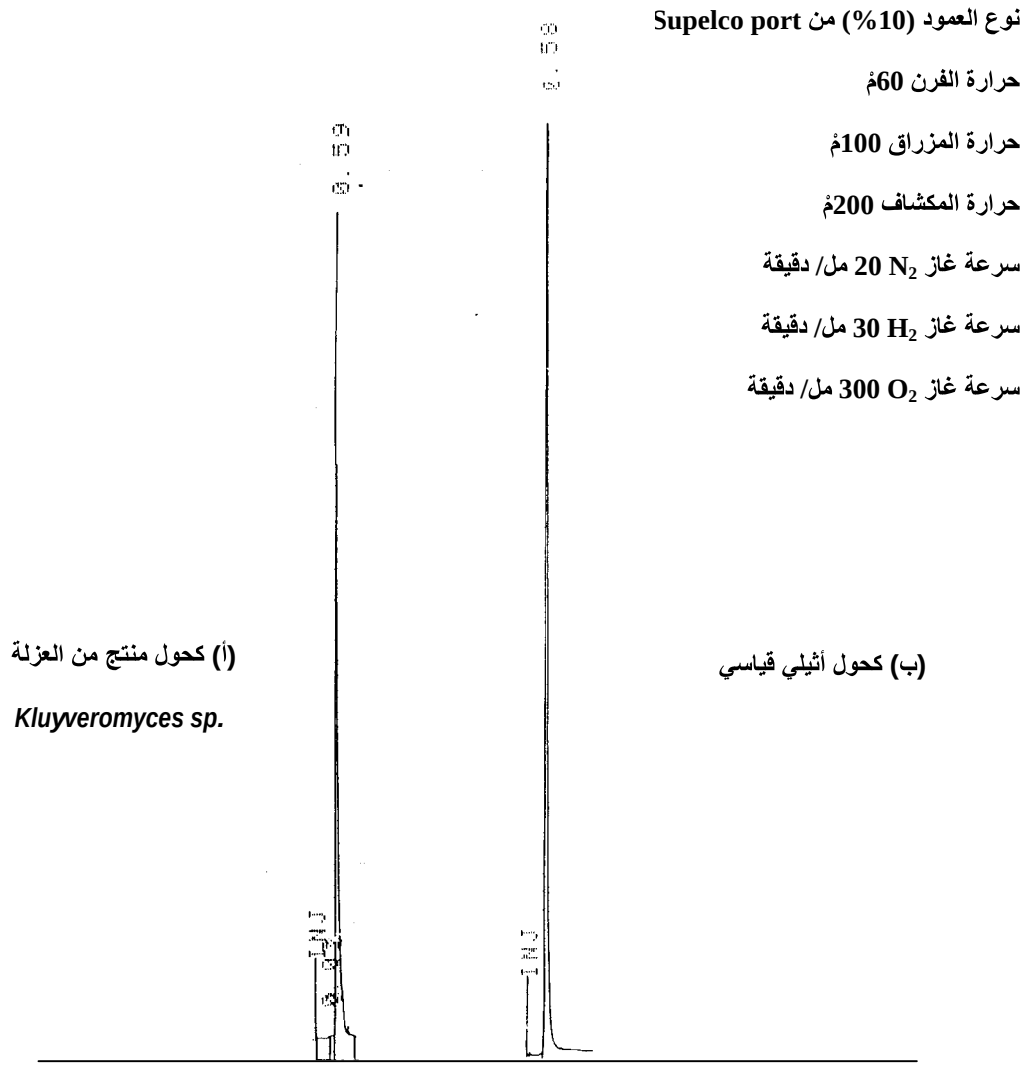
اشارت نتائج استعمال مستويات مختلفة من K2HPO4 الشكل (9) الى ان اعلى نسبة لاكتوز متايض وكحول منتج وكفاءة تخمرية والتي قدرت بـ 75.0 ، 3.7 ، 77.6% تم بلوغها باضافة 0.015 غم / 100 مل من K2HPO4 الى وسط التخمر وادى استعمال تراكيز اعلى من ذلك الى انخفاض في نسبة الايثانول المنتجة وكذلك الامر بالنسبة الى الكفاءة التخمرية وقد يعزى ذلك الى التداخل الناشئ نتيجة للتفاعل بين كبريتات الامونيوم و K2HPO4 والذي يفضي الى تكوين مركبات معقدة تمتلك تاثيرا تثبيطيا في وسط الانتاج [14] .




**الشكل (9) : تاثير اضافة تراكيز مختلفة منK2HPO4 على قابلية العزلة *Kluyveromyces sp.* في تأيض اللاكتوز والكحول المنتج والكفاءة التخمرية . الظروف المستخدمة : مدة حضن ( 8 ) ايام ، درجة حرارة الحضن ( 30 )م ، اس هيدروجيني (5) ، حجم لقاح 1.2 x $10^6$ ، 200 مل وسط تخمر عام .**

لقد عملت اضافة عصير التمر بنسبة 0.5 % ( محتواه من المواد الصلبة الكلية 14.5 ) على تحفيز انتاج الايثانول اذ ارتفعت نسبته من 3.2% في معاملة المقارنة المتمثلة بوسط الانتاج الذي خلا منه الى 4.42% وبكفاءة تخمرية تقدر 144.6 % وقد ادى استعمال الظروف المثلى التي افرزتها التجارب التي تقدم ذكرها ( مدة الحضن 8 ايام ، درجة حرارة الحضن 30 م ، تركيز اللاكتوز 9.3% ، حجم لقاح $1.15 \times 10^6$ ، الاس الهيدروجيني 5.0 ، (NH4)2SO4 غم / 100 مل 0.015 ، خلاصة خميرة غم / 100 مل 0.010 ، K2HPO4 غم / 100 مل 0.015 ، عصير التمر ح / ح % 0.5 ) مجتمعة الى الحصول على نسبة تايض للاكتوز وايثانول منتج وكفاءة تخمرية هي 70.96 ، 4.48 ، 132.36 % على التوالي .

مما تجدر الاشارة اليه الى ان دراسة عينات من الكحول المقطر المنتج من العزلة قيد الدراسة باستعمال جهاز الغاز السائل الكروماتوغرافي ( G.L.C ) والمقارنة بالايثانول القياسي اكدت ان زمن ظهور القمة لكل منهما كان متقاربا جدا الشكل (10 ) مما يشير الى ان الكحول المنتج في هذه الدراسة من نوع الايثانول .




**الشكل (10) التحليل الكروموتوغرافي الغاز- السائل (GLC) للكشف عن (أ) الكحول الأثيلي في العينة المنتج من العزلة *Kluyveromyces sp.* (Ad- 1) بالمقارنة مع (ب) الكحول الاثيلي القياسي**

**المصادر :**


1. Zertuche, L. and Robert R. Z. 1985.Optimizing Alcohol Production from whey using computer technology, Biotechnical and Bioeng, Vol. 27, pp. 547-554.
2. عزيز، رغد اكرم.(2001). دراسة فعالية بروتين اللاكتوفيرين البايولوجية المفصول من لبأ الأبقار والجاموس . رسالة ماجستير- قسم الصناعات الغذائية - كلية الزراعة - جامعة بغداد.
3. Modler, H.W. and Emmons, D.B. (1977). Properties of whey protein concentrate prepared by heating under acidic conditions. J. Dairy Sci. 60(2) 177-184.
4. AOAC, Association of Official Analytical Chemists, (1975) Official Methods of Analysis, 12th ed, Washington, D.C.
5. Oser, B.L.(1965). Hawks Physiological Chemistry. 14th. ed . McGraw –Hill Book Co. New York.U.S.A.
6. Stokes, J.L. and Larsen. A.(1945). Amino acid requirements of *Acetobacter*. J.Bact. 49: 495- 501. (Cited from AL- Anni 1982).
7. Hayashida, S. and Ohata, K. (1981). Formation of high concentration of alcohol by various yeast. J. Inst. Brew. 87: 42.
8. الخفاجي، زهرة محمود.(1990). التقنية الحيوية.(تأليف). مطابع جامعة بغداد- العراق
9. Walker, M. G. (1999). Yeast Physiology and Biotechnology. John Wiley & Sons, Canada.
10. Lerenspiel, O. (1980). The Monod equation: and generalization to product inhibition situation Biotechnol. Bioeng., 22. 1671.
11. Ghaly. A.E, and EL. taweel, A. A.(1995). Effect Of micro- aeration on the growth of *Candida. pseudotropicalis* and production of ethanol during batch fermentation of cheese whey, Bioresource Tech .52. 203-217.
12. Mahmoud, M.M. and Kosikowski, F.V. (1982). Alcohol and single cell protein production by *kluyveromyces* is concentrated whey permeates with reduced ash. Dairy Sci 65. 2082-2087.
13. Berry, D. R.; Russell, I. and Stewart, G.G. (1987). Yeast Biotechnology. Labatt Brewing Co. London, Ontario.
14. Nagamune, T. I. Indo and. Inone,I.( 1981). The effects of medium composition on yeast physiological activities for ethanol production. In Advances in Biotechnology. II. Fuels. Chemicals, Foods and Waste Treatment, M, Moo-Yong (ed.), 219-24. Oxford: Pergamon press.Canada.