



الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الهندسة الزراعية

قسم علوم الأغذية

إنتاج حمض الغلوكونيك من عزلات محلية من فطر *Aspergillus*

***niger* باستخدام المولاس وتفل العنب**

Production of Gluconic Acid From Local Isolates Of

***Aspergillus niger* Fungus Using Molass and Grape- must**

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية (علوم الأغذية)

إعداد

شيماء إبراهيم وادي

إشراف

المشرف المشارك

د.نسرين نقشو

الباحثة في الهيئة العامة

للتقانة الحيوية

المشرف العلمي

أ.د. صباح اليازجي

الأستاذ في قسم علوم الأغذية

كلية الزراعة - جامعة دمشق

دمشق 2022 م

فهرس المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
الملخص باللغة العربية	
المقدمة وأهداف البحث	
1- المقدمة	2
2- مبررات البحث وأهدافه	4
الفصل الأول: الدراسة المرجعية	
1. حمض الغلوكونيك	6
2.1 الخواص الفيزيوكيميائية لحمض الغلوكونيك	8
3.1 استخدامات حمض الغلوكونيك	8
1.3.1 الصناعات الغذائية	8
2.3.1 الصناعات الصيدلانية	8
3.3.1 صناعة المنظفات	9
4.3.1 صناعة البناء	9
4.1 طرائق إنتاج حمض الغلوكونيك	9
2. الركائز المستخدمة لإنتاج حمض الغلوكونيك	12
1.2 المولاس	12
2.2 قيم البريكس	13
3.2 ركائز أخرى	14
3. الأحياء الدقيقة المنتجة لحمض الغلوكونيك	14

14	1.3 الفطريات
18	2.3 البكتيريا
18	3.3 الخمائر
18	4. الغربلة
19	5. العوامل المؤثرة في إنتاج حمض الغلوكونيك
19	1.5 درجة الحرارة
19	2.5 درجة الحموضة (pH)
20	3.5 نسبة السكر
20	4.5 التهوية
20	5.5 مدة التحضين
21	6. طرائق تقدير حمض الغلوكونيك
الفصل الثاني: مواد البحث وطرائقه	
23	1. مواد البحث
23	1.1 مكان تنفيذ البحث
23	2.1 الأوساط والمواد الكيميائية والأجهزة المستخدمة
25	3.1 الركائز المستخدمة
25	4.1 الكائن الحي الدقيق المستخدم
25	2. طرائق البحث
25	1.2 تحضير المعلق البوغي
26	2.2 غربلة عزلات الفطر
27	3.2 المنحى القياسي لحمض الغلوكونيك

27	3. دراسة الظروف المثلى لإنتاج حمض الغلوكونيك
28	1.3 تصميم التجربة
31	2.3 تحليل التجربة
32	4. إنتاج حمض الغلوكونيك بتطبيق الظروف المثلى على المولاس بالمخمر الرباعي
32	5. إنتاج حمض الغلوكونيك بتطبيق الظروف المثلى على نفل العنب
33	6. تقدير حمض الغلوكونيك المنتج
34	7. دراسة مردود الحمض
34	8. التحليل الإحصائي
الفصل الثالث: النتائج والمناقشة	
36	1. التركيب الكيميائي للمولاس
36	2. نتائج الغربلة
38	3. أمثلة ظروف إنتاج حمض الغلوكونيك
38	1.3 تصميم التجربة
41	2. 3. تحليل التجربة
43	3. 3. أمثلة ظروف إنتاج الحمض
43	3. 3. 1 تأثير سرعة التهوية في إنتاج الحمض
43	3. 3. 2 تأثير درجة الحرارة في إنتاج الحمض
44	3. 3. 3 تأثير درجة الحموضة في إنتاج الحمض
44	3. 3. 4 تأثير مدة التحضين في إنتاج الحمض
45	3. 3. 5 تأثير تركيز السكر في إنتاج الحمض

46	4. دراسة مردود حمض الغلوكونيك
49	1.4 تأثير المتغيرات المدروسة في مردود حمض الغلوكونيك
54	5. تطبيق الظروف المثلى باستخدام المخمر على المولاس وتقل العنب والمقارنة بين الركائز
الفصل الرابع: الاستنتاجات والتوصيات	
55	الاستنتاجات
55	التوصيات
المراجع	
57	المراجع العربية
58	المراجع الأجنبية
الملحق	
الملخص باللغة الإنكليزية	

فهرس الجداول

رقم الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
23	الأوساط والمواد المستخدمة	جدول رقم 1
24	الأجهزة والمستلزمات المستخدمة	جدول رقم 2
28	المتغيرات المدروسة ومستوياتها	جدول رقم 3
29	تصميم التجربة	جدول رقم 4
36	التركيب الكيميائي للمولاس	جدول رقم 5
37	نتائج الغربلة	جدول رقم 6
38	كمية الحمض في المعاملات المدروسة	جدول رقم 7
42	تأثير العوامل المدروسة في إنتاج حمض الغلوكونيك	جدول رقم 8
43	التحليل الإحصائي لتباين المتغيرات المدروسة في إنتاج حمض الغلوكونيك	جدول رقم 9
46	دراسة مردود الحمض والإنتاجية	جدول رقم 10
53	تطبيق الظروف المثلى على المخمر الرباعي للمولاس وتقل العنب	جدول رقم 11

فهرس الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
شكل رقم 1	D.Gluconic acid	7
شكل رقم 2	D-Glucono-1,5-Lactone	7
شكل رقم 3	Calcium gluconate	7
شكل رقم 4	Sodium gluconate	7
شكل رقم 5	أكسدة الغلوكوز بواسطة فطر A.niger	12
شكل رقم 6	<i>Aspergillus niger</i>	16
شكل رقم 7	دورة حياة فطر A.niger اللاجنسية	17
شكل رقم 8	عد الأبواغ الفطرية تحت المجهر	26
شكل رقم 9	المعلق البوغي	26
شكل رقم 10	المنحنى القياسي لحمض الغلوكونيك	27
شكل رقم 11	رسم تخطيطي مختصر للمخمر رباعي الأوعية	33
شكل رقم 12	نماذج لتحليل بعض العينات على جهاز HPLC	40
شكل رقم 13	الظروف المثلى لإنتاج الحمض	45
شكل رقم 14	تأثير pH ودرجة الحرارة في مردود الحمض المنتج	49
شكل رقم 15	تأثير التهوية ودرجة الحرارة في مردود الحمض المنتج	50
شكل رقم 16	تأثير تركيز السكر ودرجة الحرارة في مردود الحمض المنتج	50
شكل رقم 17	تأثير التهوية و pH في مردود الحمض المنتج	51
شكل رقم 18	تأثير تركيز السكر و pH في مردود الحمض المنتج	52
شكل رقم 19	تأثير تركيز السكر و التهوية في مردود الحمض	52

قرار لجنة الحكم

نوقشت الرسالة في يوم الثلاثاء الواقع في 31 / 5 / 2022 في كلية الهندسة الزراعية - جامعة دمشق وأقرت من قبل لجنة الحكم المؤلفة من:

أ.د عبد الوهاب مرعي الأستاذ في قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة - جامعة دمشق عضواً

أ.د عبد الحكيم عزيزية الأستاذ في قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة - جامعة دمشق عضواً

أ.د صباح يازجي الأستاذ في قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة - جامعة دمشق عضواً مشرفاً

تصريح

أصرح بأن العمل الموصوف في هذه الأطروحة المعنون بـ " إنتاج حمض الغلوكونيك من عزلات محلية من فطر *Aspergillus niger* باستخدام المولاس وتفل العنب " لم يسبق أن قُدم من قِبل للحصول على أي شهادة ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى، وأن كافة الأعمال، والنتائج المذكورة هي نتاج جهودي الشخصية، وبتوجيه من المشرفين العلميين، وجميع المراجع التي ذكرت في الأطروحة نُسبت إلى مصادرها ضمن النص، وفي قائمة المراجع.

المرشحة

شيماء إبراهيم وادي

Declaration

I declare that the present work entitled “**Production of Gluconic Acid From Local Isolates of *Aspergillus niger* Fungus Using Molass and Grape-must**” is new work and has never been studied by any other researchers for any other degree, and currently, it is not submitted by anyone for any degree. All the mentioned results are my own efforts and done by the direct supervisors of my guides. All the referred literature is cited and well documented in the list of references.

Candidate

SHaimaa Ibraheem Wadi

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الأطروحة " إنتاج حمض الغلوكونيك من عزلات محلية من فطر *Aspergillus niger* باستخدام المولاس وتفل العنب " هو نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة شيماء إبراهيم وادي بإشراف الأستاذة الدكتورة صباح يازجي من قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة، جامعة دمشق، والدكتورة نسرين نقشو من الهيئة العامة للتقانة الحيوية وبأن المراجع المستعملة في هذه الأطروحة موثقة أصولاً في النص .

المشرف المشارك

المشرف الرئيسي

المرشحة

الدكتورة نسرين نقشو

الأستاذة الدكتورة صباح يازجي

شيماء ابراهيم وادي

Certification

It is hereby certified that the work described in this thesis: “**Production of Gluconic Acid From Local Isolates of *Aspergillus niger* Fungus Using Molass and Grape-must**” is the result of the scientific research done by Candide **SHaimaa Ibraheem Wadi** under supervision of **Prof. Dr. Sabah Yazgi** Department of Food Science, Faculty of Agricultural, Damascus University and **Dr. Nsreen Naksho** Researcher in National Commission for Biotechnology and any references to any research works has been duly acknowledged in the text.

Candidate

Majora

Co-Supervisor

SHaimaa Ibraheem

Prof. Dr. Sabah

Dr. Nsreen Naksho

Wadi

Yazgi

الإهداء

إلى من تجرع الكأس فارغاً ليسقيني قطرة حب

إلى من حصد الأشواك عن دربي ليمهد لي طريق العلم

والدي الحبيب

إلى تلك المرأة العظيمة التي مربت وعلمت التي لطالما نظرت لعينيها لاستمد منها قوتي لإكمال مسيرتي العلمية

تقف كلماتي عاجزه عن شكر يا حبيبة

والدتي الغالية

إلى من كان لي عوناً في كل خطوة من خطواتي ومرفيق دربي

نروحي

إلى من مرادوا فرحة نجاحي بوجودهم في حياتي

أولادي كرم ولىا

إلى من شدّ المولى عضدي بهم، جبالتي التي أستند إليها، فلا أقع

إخوتي

إلى الذين كانوا خير شعلة أضاءت لي طريق العلم والمعرفة

أساتذتي

إلى الذين كانوا دائماً كالإخوة الذين لم تلدهم أمي

أصدقائي

إلى الذين كانوا معي في كل وقتي عوناً

المخلص

غربلت 20 عزلة من عزلات الفطر *Aspergillus niger* المأخوذة من مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية من حيث قدرتها على إنتاج حمض الغلوكونيك من خلال تنميتها في وسط المولاس تركيز 176 غ/ل سكر، بدرجة حرارة 30°C، pH 6، تهوية 200 دورة/دقيقة لمدة 7 أيام، ثم قدر إنتاج الحمض باستخدام جهاز HPLC. أظهرت النتائج الكشف عن 10 عزلات لها القدرة على إنتاج الحمض وتميزت العزلة (An6) بأعلى إنتاج للحمض مقارنة بباقي العزلات، حيث بلغ تركيز الحمض 122.3 غ/ل.

حددت بعد ذلك الظروف المثلى لإنتاج الحمض بالطريقة السائلة باستخدام ركيزة المولاس، وباعتماد على برنامج التحليل الإحصائي Optimization Method Minitab، وكانت الظروف المثلى كالاتي : بدرجة حرارة 30°C، pH 6، سرعة دوران 150 دورة/دقيقة، مدة التحضين 6 أيام، تركيز السكر 234 غ/ل سكر. أجريت مقارنة بين ركيزتي المولاس وتقل العنب لإنتاج الحمض ضمن الظروف المثالية باستخدام المخمر الرباعي، كما استخدم تقل العنب بتركيز السكر الطبيعي دون إضافة الغلوكوز للوصول إلى التركيز المثالي فكانت ركيزة تقل العنب بتركيز السكر المثالي أعلى كفاءة في الإنتاج من تقل العنب العادي والمولاس، وقد لوحظ وجود فروق معنوية بين الركائز، إذ بلغ متوسط تركيز الحمض 193.9 غ/ل عند استخدام تقل العنب بعد إضافة سكر الغلوكوز، و115.06 غ/ل عند استخدام تقل العنب دون إضافة السكر، في حين كان متوسط تركيزه 105.07 غ/ل عند استخدام المولاس .

الكلمات المفتاحية: حمض الغلوكونيك، *Aspergillus niger*، طريقة التخمير السائلة، HPLC

المقدمة وأهداف البحث

Introduction And Objectives Research

1- المقدمة

يعدُّ علم الأحياء الدقيقة في الأغذية من العلوم الحديثة، وقد تطور هذا العلم تطوراً سريعاً في السنوات الأخيرة، وأصبح له أهمية كبرى في حياة الإنسان، فقد أمكن استغلال هذه الأحياء في كثير من الصناعات كصناعة المنتجات اللبنية والغذائية والتخميرات المختلفة، كما أمكن إنتاج الفيتامينات والأنزيمات والأحماض العضوية المهمة اللازمة لكثير من الصناعات، وبات الإنسان يسعى في خطى حثيثة ومستمرة في البحث عن أنواع جديدة من الأحياء الدقيقة ذات إنتاجية عالية لهذه المركبات، أو مركبات جديدة أخرى، فقد أصبحت أغلب الأحماض العضوية المعروفة مثل حمض الخليك وحمض الستريك وحمض لاكتيك وحمض الغلوكونيك وغيرها تنتج تجارياً بعمليات التخمير الصناعي باستخدام الفطريات وغيرها من الأحياء الدقيقة وذلك عند تنميتها في أوساط غذائية مناسبة.

تشكل المنتجات الثانوية الصناعية والمخلفات الزراعية خاصة تلك التي تحتوي على نسبة عالية من السكريات أوساط نمو مثالية، حيث يمكن لهذه المنتجات والمخلفات أن توفر مواد ممتازة لنمو الأحياء الدقيقة المستخدمة للحصول على منتجات ذات قيمة أو منتجات جديدة ذات خصائص محددة، والتي تستخدم في الكثير من المجالات الصناعية والغذائية والطبية.

يعد حمض الغلوكونيك من الأحماض العضوية المهمة المنتجة بواسطة الأحياء الدقيقة ولا سيما الفطريات بعملية التخمير عن طريق استخدام المنتجات الثانوية والمخلفات الزراعية كركائز أساسية، وذلك لما له من أهمية كبيرة في الكثير من المجالات الغذائية والصناعية والصيدلانية نتيجة الخصائص الفيزيائية والوظيفية العديدة التي يتمتع بها.

تمتاز الأحياء الدقيقة بقدرتها على إنتاج حمض الغلوكونيك وبسرعة النمو والتكاثر، ورخص المواد الأولية لتنميتها، فضلاً عن إمكانية تحسين الإنتاج من خلال التحكم بالظروف المزروعية للوصول

إلى الظروف البيئية والتغذية المثلى للإنتاج، إضافة إلى ذلك فإنه يمكن تحسين الإنتاج من الأحياء الدقيقة كماً ونوعاً من خلال عمليات التطهير لزيادة الإنتاج .

إن استخدام المخلفات الصناعية والزراعية في إنتاج حمض الغلوكونيك واستخدامه في العديد من المجالات الصناعية كالصناعات الغذائية والصيدلانية والبناء والمنظفات له أهمية اقتصادية كبيرة، إضافة إلى تخليص البيئة من هذه المخلفات.

لذلك ركزت هذه الدراسة في الفصل الأول من البحث على أهمية حمض الغلوكونيك وخصائصه واستخداماته في المجالات الصناعية، وطرق الحصول عليه، والأحياء الدقيقة المنتجة له. لتحقيق هذا الهدف تم في الفصل الثاني من البحث غربة عزلات الفطر المستخدم في إنتاج الحمض والحصول على العزلة ذات الإنتاج الأعلى ومن ثم أمثلة ظروف الإنتاج، وتطبيق الظروف المثلى على المولاس ونقل العنب باستخدام المخمر الرباعي للمقارنة بين الركيزتين. وبينت أهم النتائج في الفصل الثالث تميز العزلة (An6) بأعلى إنتاج للحمض مقارنة بباقي العزلات، وكانت الظروف المثلى للإنتاج كالاتي : درجة حرارة 30°C، pH 6، سرعة دوران 150 دورة/دقيقة، مدة التحضين 6 أيام، تركيز السكر 234 غ/ل سكر، كما كانت ركيزة نقل العنب بتركيز السكر المثالي أعلى كفاءة في الإنتاج من نقل العنب العادي والمولاس عند المقارنة بين الركائز.

2- مبررات البحث وأهدافه

مبررات البحث :Research Justification:

تتبع أهمية إنتاج حمض الغلوكونيك من الخصائص التي يتمتع بها كمادة مضافة متعددة الاستخدامات في الصناعات الغذائية والصيدلانية والمنظفات والمنسوجات والبناء، إضافةً إلى إمكانية الحصول على الحمض باستخدام المخلفات الزراعية والصناعية ذات المحتوى العالي من السكر من خلال التخمير بواسطة الأحياء الدقيقة والتقليل من ضرر هذه المخلفات على البيئة، وقلة الدراسات المحلية التي تعنى بإنتاج هذا الحمض.

أهداف البحث :Objectives Research:

- 1- إنتاج حمض الغلوكونيك باستخدام عزلات من فطر *Aspergillus niger*.
- 2- أمثلة ظروف الإنتاج (درجة الحرارة- درجة الحموضة- درجة التهوية- تركيز السكر-مدة التحضين).
- 3- تقدير حمض الغلوكونيك المنتج.
- 4- دراسة مردود الحمض.
- 5- مقارنة النتائج بين المولاس وتقل العنب.

الفصل الأول

الدراسة المرجعية

Literature Review

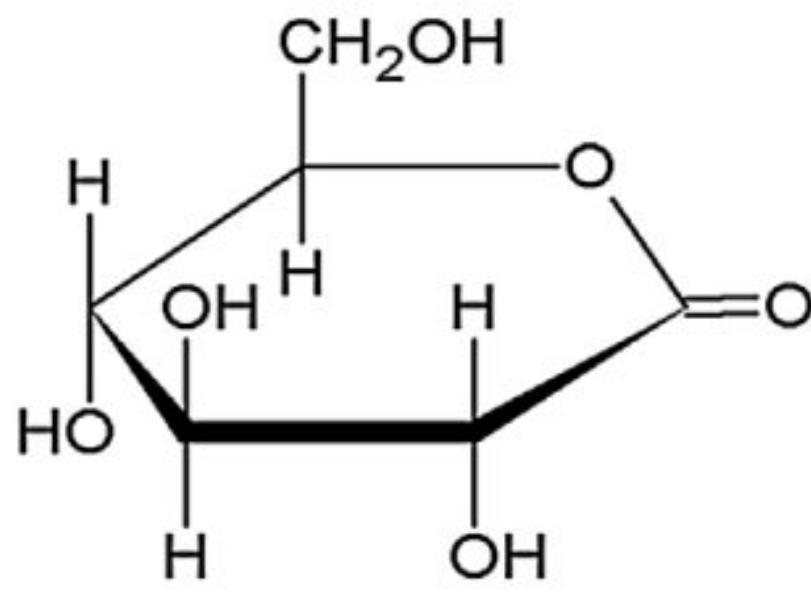
الدراسة المرجعية Literature Review:

1. حمض الغلوكونيك:

اكتسب حمض الغلوكونيك، ومشتقاته اهتماماً متزايداً بالصناعات الغذائية والأدوية والمنسوجات والبناء خلال السنوات الخمسين الماضية، حيث قدر إنتاجه السنوي بحوالي 100000 طن و هو في معظمه إنتاج حيوي (Climent وزملاؤه، 2011)، مع تكاليف الإنتاج تصل إلى 1.20 دولار أمريكي/كغ لحمض الغلوكونيك، و 8.50 دولار أمريكي/ كغ لغلوكونات الكالسيوم وغلوكونو-لاكتون (Singh و Kumar، 2007). يعود إنتاج حمض الغلوكونيك إلى عام 1870 عندما تم اكتشافه من قبل Hlasiwetz و Habermann (Rohr، 1983).

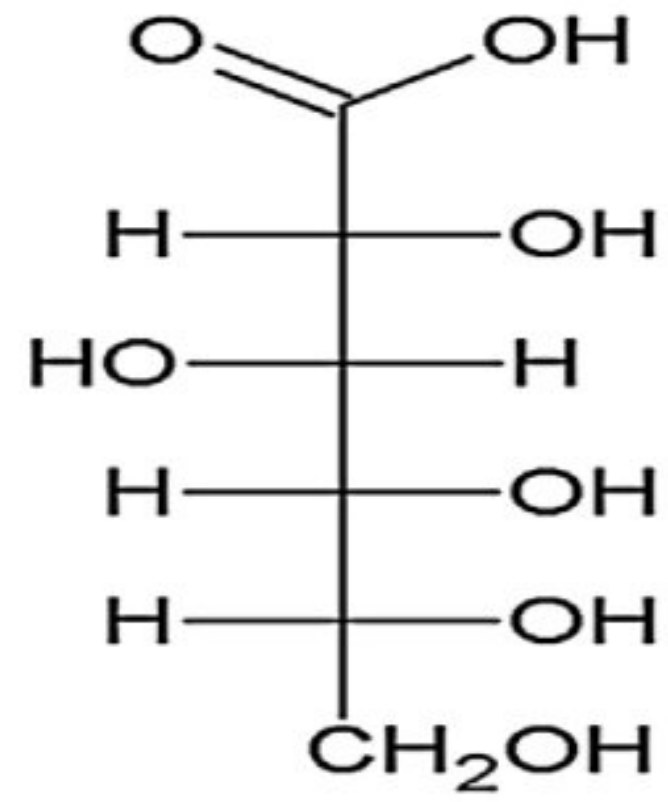
حمض الغلوكونيك ($C_6H_{12}O_7$) حمض سكري ينتمي إلى عائلة ألدونيك الحمضية له مشتقات عدة (غلوكونات الصوديوم، غلوكونات الكالسيوم، غلوكونو لاكتون). يوجد هذا الحمض ومشتقاته بشكل طبيعي في العسل واللحوم و بعض الأطعمة مثل النبيذ والخل وثمار الفاكهة مثل العنب والتفاح والنباتات مثل الأرز (Ramachandran وزملاؤه، 2006). يستخدم كمنتج مهم في صناعة النسيج والأعلاف والصناعات الغذائية والمعالجات الطبية (Roehr وزملاؤه، 1996؛ Roukas، 2000).

تجدر الإشارة إلى أنه في عام 1986 اعترفت إدارة الغذاء والدواء الأمريكية بحمض الغلوكونيك ومشتقاته كمادة مضافة آمنة، وأذنت باستخدامها غير المقيد كمكونات غذائية، حيث أدرجت في دستور المواصفة القياسية للمضافات الغذائية تحت الأرقام (E574-E580). وبالتوازي مع ذلك، قامت منظمة الأغذية والزراعة (FAO) ومنظمة الصحة العالمية بتنظيم استخدام الحمض ومشتقاته كمضافات غذائية من خلال ممارسات التصنيع الجيدة (Food Chemicals Codex، 2010).



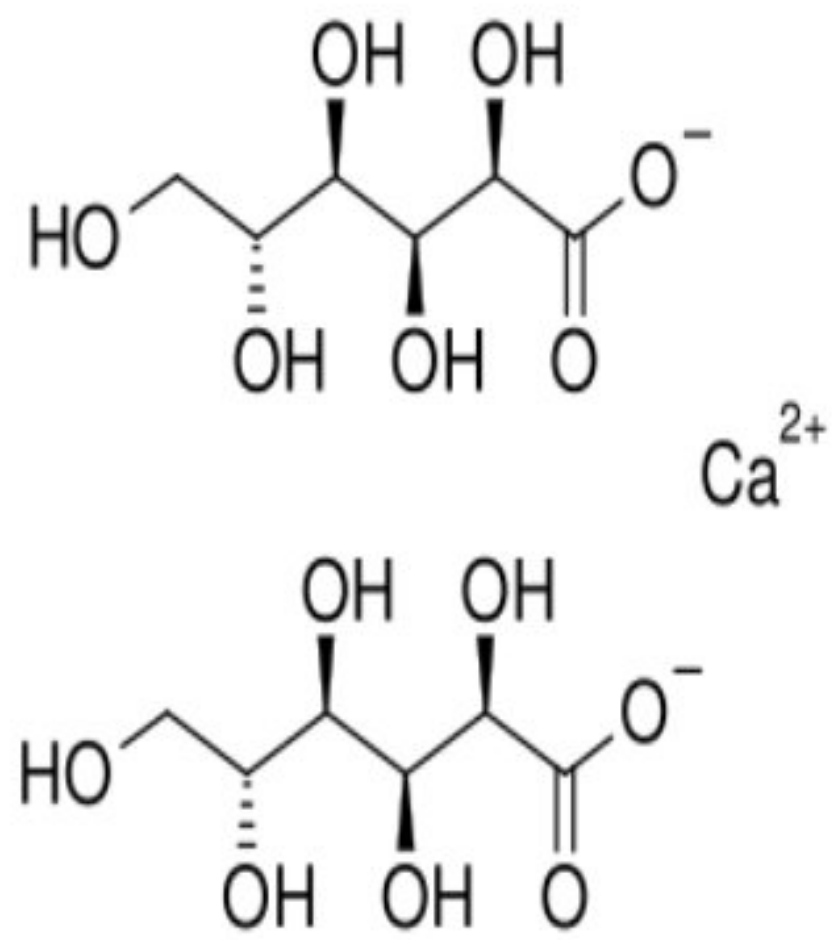
D-Glucono-1,5-lactone
(D-Glucono- δ -lactone)

الشكل (2)



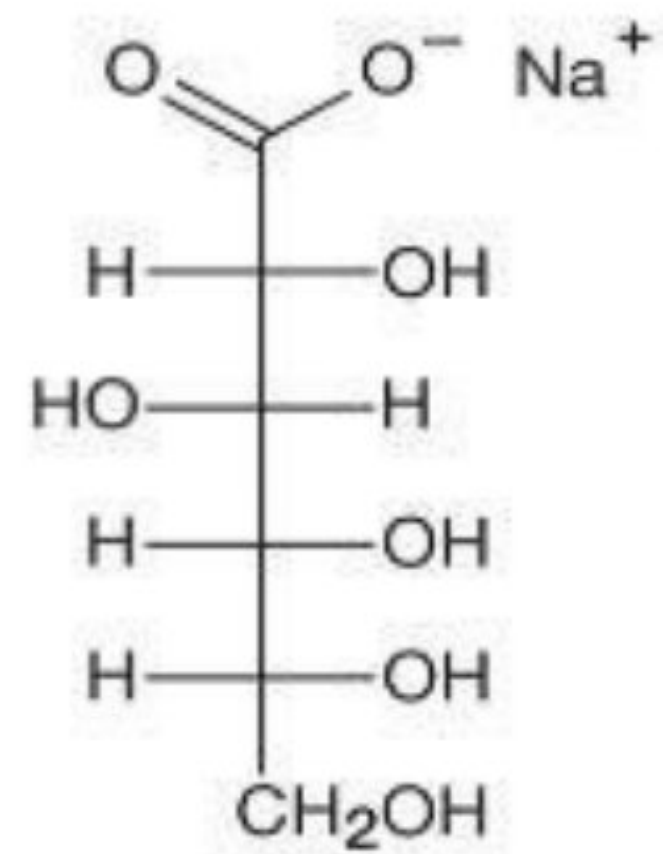
D-Gluconic acid

الشكل (1)



Calcium gluconate

الشكل (4)



Sodium gluconate

الشكل (3)

(Rodríguez *et al.*,2016)

2.1 الخواص الفيزيوكيميائية لحمض الغلوكونيك:

يتمتع حمض الغلوكونيك بالكثير من الخصائص فهو حمض ضعيف وغير متطاير، عديم الرائحة، غير قابل للتآكل غير سام، سهل الانحلال في الماء وغير قابل للذوبان في المذيبات غير قطبية، صيغته الجزيئية ($C_6H_{12}O_7$)، الكتلة الجزيئية 196,16 غ/مول كثافته 1,24 غ/سم³ درجة الانصهار $131^\circ C$ (Ramachandran وزملاؤه، 2006).

3.1 استخدامات حمض الغلوكونيك:

يدخل الحمض ومشتقاته في العديد من المجالات الصناعية أهمها:

1.3.1 الصناعات الغذائية:

أدى حمض الغلوكونيك ومشتقاته دوراً كبيراً في مجال الصناعات الغذائية، حيث استخدم في منتجات الألبان والمشروبات الغازية للحفاظ على الخصائص الحسية و تعزيزها، كما استخدم لمنع تشكل الترسبات في عصائر الفاكهة عن طريق ربط بعض الشوارد والمعادن التي يمكن أن تكون موجودة فيها ، مثل Ca و Fe (Rogers وزملاؤه، 2006). بالإضافة إلى ذلك استخدم كمادة حافظة للأطعمة المخلة، واستخدم غلوكونو-لاكتون كمادة حافظة للنقانق واللحم المقدد، كما استخدمت بعض مصانع الأغذية مشتقات الحمض في خدمات تنظيف مرافقها الصناعية (Milsom و Meer، 1985).

2.3.1 الصناعات الصيدلانية:

يستخدم الحمض في تصنيع مستحضرات العناية بالبشرة، ومواد فعالة في المستحضرات الدوائية؛ فمثلاً غلوكونات الكالسيوم تستخدم لعلاج نقص الكالسيوم عن طريق الفم أو الحقن الوريدي، غلوكونات الحديد لعلاج نقص الحديد، غلوكونات الزنك لعلاج نزلات البرد (Ramachandran وزملاؤه، 2006).

3.3.1 صناعة المنظفات:

يمكن استخدام حمض الغلوكونيك كونه حمضاً ضعيفاً في إذابة مجموعات من الكاتيونات متعددة التكافؤ (أكاسيد، هيدروكسيدات أو الكربونات) دون مهاجمة السطوح المعدنية أو غير المعدنية وتشكيل معقدات قابلة للذوبان في الماء مع الكاتيونات، لذلك يعد الغلوكونيك مفيداً للغاية في إزالة طبقات الجير والصدأ من السطوح المصنوعة من النحاس والألمنيوم وغيرها من المعادن (Husted وزملاؤه، 2012). كما استخدمت المحاليل القلوية من غلوكونات الصوديوم لتنظيف الأوعية الزجاجية فعلى سبيل المثال، تستخدم معامل الألبان مشتقات الحمض لمنع ترسب أملاح الكالسيوم على معدات المعالجة وأوعية التخزين الزجاجية (Ramachandran وزملاؤه، 2006).

4.3.1 البناء:

استخدمت غلوكونات الصوديوم مع الأسمت لزيادة الصلابة ومقاومة الظروف البيئية القاسية في صناعة البناء (Husted وزملاؤه، 2012).

4.1 طرائق إنتاج حمض الغلوكونيك:

يتم إنتاج الحمض بواسطة ثلاث طرائق مختلفة:

الأكسدة الكيميائية للجلوكوز (Kundu و Das، 1984)، والأكسدة الكهربائية لمحلول الجلوكوز المحتوي على قيمة معروفة من البروميد (Amberkar وزملاؤه، 1965)، أو عملية التخمير، ويعرف التخمير على أنه تقنية تحويل بيولوجي للركائز المعقدة إلى مركبات بسيطة بواسطة أنواع مختلفة من الأحياء الدقيقة، بكتيريا، خمائر، فطريات. وينتج خلال عمليات التخمير واستقلاب هذه الركائز مواد أخرى إضافة إلى المواد المعتادة مثل غاز ثاني أوكسيد الكربون، والكحول، هذه المواد يطلق عليها اسم نواتج الاستقلاب الثانوية، حيث تشمل المضادات الحيوية، الإنزيمات، الحموض العضوية (Robins وزملاؤه، 2001 ؛ Machado وزملاؤه، 2004). إن إنتاج حمض

الغلوكونيك بواسطة فطر *Aspergillus niger* هو تخمير هوائي يتطلب كمية كبيرة من الأكسجين. وبشكل عام تتم عملية التخمير لإنتاج الغلوكونيك على النحو الآتي:

Cell growth: $C_6H_{12}O_6 + O_2 \rightarrow$ الكتلة الحيوية المتشكلة + البادئ

Glucose oxidation : $C_6H_{12}O_6 + O_2 \xrightarrow{GOD} C_6H_{10}O_6 + H_2O_2$

Gluconolactone hydrolysis: $C_6H_{10}O_6 + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_7$ (Gluconic Acid)

أولاً يتأكسد الجلوكوز إلى جلوكونو-لاكتون بوجود أنزيم الجلوكوز أوكسيداز (GOD) الناتج عن *Aspergillus niger*. يتكون حمض الغلوكونيك من التحلل المائي للجلوكونو-بيتا-لاكتون (Fatmawati وزملاؤه، 2009).

تستخدم في التخمير حاويات كبيرة الحجم تعرف بالمخمرات fermentors تتراوح سعة المخمر بين 5000-20000 غالون، حيث يضاف إلى المخمر المواد الغذائية الأساسية مثل المولاس أو مستخلص منقوع الذرة أو غير ذلك من المواد المستخدمة في الصناعة للحصول على الخلايا أو نواتج الاستقلاب، كما يلزم استخدام أوساط غذائية عبارة عن مواد كيميائية نقية، ويلقح المخمر بحجم معين من المزرعة يبلغ 5-10% من حجم خزان التخمير، عندها يجب المحافظة على جميع الظروف المناسبة لنمو الكائن الدقيق وتكاثره، والتي هي درجة الحرارة، درجة الحموضة، إضافة إلى توفير مصدر هوائي مناسب في حالات التخمير الهوائي وذلك بإدخال هواء معقم إلى المخمر من خلال فتحة في أسفله، ويساعد في عملية التهوية وإذابة الأوكسجين التقليب المستمر باستخدام مقلبات موجودة داخل المخمر، وينتج عادة عن التقليب تكوين رغوة تصعد إلى سطح الوسط المغذي السائل، ولتلافي ذلك تضاف مواد مانعة لتشكل الرغوة. يختلف تصميم المخمر تبعاً للطريقة المتبعة في تنمية الكائن الدقيق، وللمادة الخام المستخدمة، وأيضاً تبعاً للمنتج المراد الحصول عليه.

يوجد نوعان من المخمرات تستخدم في التخمرات الميكروبيولوجية عامةً:

- مخمرات الدفعة الواحدة Fermentors of batch culturing: وهنا يضاف الكائن الدقيق

(اللقاح) إلى كمية محددة من الوسط الغذائي السائل، ومن ثم إكمال عملية التخمر دون إضافة

جديدة للمواد الغذائية أو سحب لنواتج التخمر.

- المخمرات المستمرة Continuous fermentors: وتعتمد هذه الطريقة على الحفاظ على المزرعة

في طور اللوغاريتمي وبذلك يسمح للكائن الدقيق أن ينمو مدة أطول بالمعدل نفسه حتى يتم إيقاف

العملية. وتستخدم هذه الطريقة لإنتاج المضادات الحيوية والأحماض العضوية (Cout و

Sanroman، 2005).

دُرس إنتاج الحمض مخبرياً باستخدام الدوارق أو المخمرات لتحديد الظروف المثلى لإنتاجه وتطوير

طرائق الإنتاج للوصول إلى أعلى إنتاج بأقل التكاليف الممكنة.

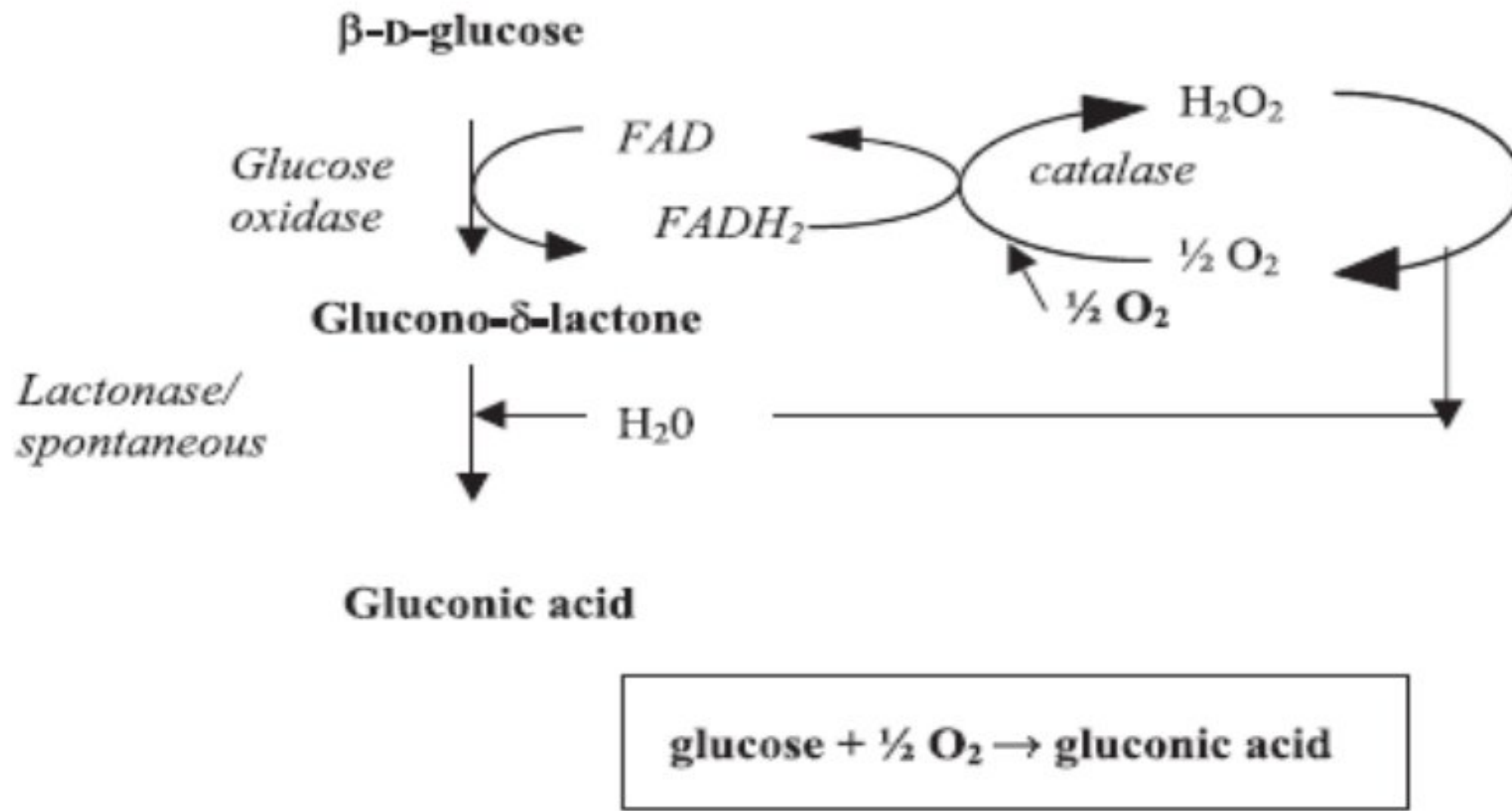
إن إنتاج الحمض بطريقة الأكسدة الكيميائية والكهربائية أكثر تكلفة وأقل كفاءة مقارنة بعمليات

التخمير، وبالتالي كان التخمر واحداً من التقنيات الفعالة والمهيمنة لتصنيع حمض الغلوكونيك.

يتطلب إنتاج حمض الغلوكونيك توفر الظروف المثلى للإنتاج والتي تتضمن:

تركيز الغلوكوز، مصادر للنيتروجين والفوسفور و قيمة pH بالإضافة إلى معدل التهوية (سرعة

الدوران) (Rohr وزملاؤه، 1983).



الشكل (5) أكسدة الجلوكوز بواسطة فطر *A.niger* (Ramachandran *et al.*,2006)

2.الركائز المستخدمة لإنتاج حمض الغلوكونيك:

1.2 المولاس:

المولاس منتج ثانوي صناعي عبارة عن سائل لزج سميك القوام ذي لون بني غامق، حيث غالبية محتواه على شكل سكروز، يتجزأ السكروز بسهولة إلى جلوكوز وفركتوز (Bubnik وHinkova،2001). وكلمة مولاس مشتقة من الاسم اللاتيني ومعناها (شبيه العسل)، كما تعني الكلمة نفسها Melac باللغة الإغريقية (أسود). والمولاس إما أن يكون ناتجاً عن الشوندر السكري وإما ناتجاً عن قصب السكر (طحلة والمصري، 1993)، حيث يأتي 57% من مولاس العالم من قصب السكر الذي يزرع في المناطق المدارية الدافئة في آسيا وأمريكا الجنوبية، بينما يأتي الباقي من الشوندر السكري الذي ينمو في أقاليم ذات مناخ معتدل في أوروبا وأمريكا الشمالية (Piggot،2005)، أما في سوريا فإن الشوندر السكري هو المصدر الأساسي للمولاس (Cazetta وزملاؤه، 2007). يحتوي مولاس الشوندر وسطياً على 80% مادة جافة و20% ماء. تتكون المواد الجافة من سكروز 60%، ويمكن أن يتغير في حدود 48-62% حسب صنف الشوندر السكري وظروف إنتاجه والمواد العضوية غير الآزوتية (16.7%) والمواد الآزوتية (14.8%) والرماد (8.5%). تتذبذب كمية السكر المحول من 0.4 حتى 1.5% (والسكر المحول يحوي

كميات متساوية من الغلوكوز والفركتوز الناتجة عن تفكك جزئي السكر (سكروز)، ويمكن أن يزداد محتواه بشكل كبير عند تخزين المولاس في شروط غير مناسبة (Murtagh, 1999).

يتشابه المولاس الناتج من سكر القصب مع الشوندر السكري إلا أنهما يختلفان بالتركيب، فالمولاس الناتج من الشوندر أقل محتوى من السكريات من مولاس القصب وسكره يتكون تقريباً من السكروز. إن درجة pH لمولاس الشوندر معتدلة أكثر من مولاس القصب وهي تقريباً 7، بينما في مولاس القصب هي 5.5 - 5 (Borzani, 2001). يتميز المولاس باحتوائه على نسبة عالية من السكروز والغلوكوز والفركتوز، وتصل نسبة السكر إلى 50%، كما يحتوي على تركيزات عالية من العناصر المعدنية مثل الكالسيوم والمغنيزيوم والحديد والزنك والنحاس والفوسفور والبوتاسيوم، وبعض الفيتامينات مثل البيوتين وحمض البانتوثينيك بالإضافة إلى الريبوفلافين والثيامين وحمض الفوليك (طه وجمال، 2005). لذلك يمكن استخدامه بفعالية في صناعات متعددة أهمها: إنتاج الكحول والجليسرول، وصناعات التخمر (حمض الليمون - حمض الغلوكونيك - صناعة الخميرة)، والأعلاف (Purane وزملاؤه، 2012)، بالإضافة إلى استخلاص السكر من المولاس، حيث تتراوح نسبة السكروز فيه بين 40-50% (طحلة والمصري، 1993).

2.2 قيم البريكس:

تزيد عمليات التبخير والتنقيط المتكررة من لزوجة المولاس وتركيز الأملاح لتحويله إلى سائل بني ذي قوام سميك ولزج. يقاس تركيز المولاس عادة بدرجة Brix وهو مقياس بالينغ نفسه، حيث يقيس محتوى السكر في السائل كما لو كانت جميع الأجسام الصلبة المنحلة والمعلقة هي السكر. وتعبير آخر فإن محتوى السكر في المحلول السكري له الوزن النوعي نفسه للعينة. وهكذا فإن مولاس بدرجة 80 بريكس له وزن نوعي 1.416 وهو الوزن النوعي نفسه لمحلول سكري يحوي 80 % سكر وزناً (Kiss وزملاؤه، 1999).

يقاس البريكس عادةً باستخدام مقياس الانكسار Refractometer، وهو معد فقط للمحاليل السكرية، ولسوء الحظ فإن وجود أجسام صلبة أخرى منحلة في المولاس يؤثر على قراءة البريكس ويحرفها قليلاً عن قراءة كمية السكر الحقيقية الموجودة. وبريكس المولاس غالباً ما يكون حوالي 80 درجة. تبلغ نقاوة المولاس الخام ما بين 85-90 %، هذا يعني أن حوالي 90-85 % سكريات و-10 15% مواد غير سكرية في المادة الجافة. وللمولاس ثلاثة نماذج: الأسود والتكرير وعالي الجودة (Wang وزملاؤه، 1985).

3.2 ركائز أخرى:

إضافة إلى المولاس هناك العديد من المخلفات التي يمكن استخدامها في إنتاج حمض الغلوكونيك على سبيل المثال: الورق، قشور الموز وتقل الشاي الخ (Ikeda وزملاؤه، 2006؛ Singh وزملاؤه، 2005).

3. الأحياء الدقيقة المنتجة لحمض الغلوكونيك:

يستطيع عدد كبير من الكائنات الحية الدقيقة المجهرية من فطور وبكتريا وخمائر إنتاج حمض الغلوكونيك.

1.3 الفطريات :

تعرف الفطريات بأنها مخلوقات حقيقية النواة، غير متحركة، ولاتحتوي على صبغة اليخضور، معظمها عديد الخلايا ومنها ماهو وحيد الخلية. تختلف في أشكالها وتركيبها، فبعضها يتكون من خلية واحدة كالخميرة والكثير منها عديد الخلايا تنتظم في خيوط فطرية مفردة (الخيوط الفطرية) ومجموع هذه الخيوط يشكل الغزل الفطري، وهذا إما أن يكون مقسماً بجدر عرضية (septa) ويحتوي كل قسم (خلية) على نواة واحدة أو أكثر، وإما أن يكون مدمجاً خلويًا حيث يحتوي البروتوبلازم على أنوية بدون حواجز، وتحتوي جدر خلايا الفطريات على السللوز والكييتين أو

أحدهما. تعتمد الفطريات في تغذيتها على المواد العضوية، حيث تقوم بهضم هذه المواد خارج الخلايا وذلك بإفراز أنزيمات هاضمة، ويمكن تقسيمها من حيث تغذيتها (الرحمة، 1998) إلى:

- فطريات مترمة وهي الفطريات التي تعيش على مواد عضوية متحللة سواء كانت بقايا نباتية أو حيوانية، مثل فطر البنيسيليوم وعفن الخبز.
- فطريات متطفلة وهي الفطريات التي تعيش متطفلة على مخلوقات حية، حيث تمتص الغذاء منها وتسبب أمراضاً مختلفة مثل البياض الزغبي.
- فطريات متكافلة وهي فطريات تعيش بطريقة التكافل (تبادل المنفعة) مع مخلوقات حية أخرى، ومن أمثلتها الأشنيات وهي عبارة عن فطر وطحالب.

تعد الفطريات مثل *Aspergillus niger* و *Penicillium variable* الكائن المفضل لإنتاج الأحماض العضوية كحمض الليمون وحمض الغلوكونيك (Pandey وزملاؤه 2013؛ Anastassiadis وزملاؤه، 2003)، ولا سيما الفطر *Aspergillus niger* الذي يعد المنتج الرئيسي له لكونه سريع النمو وعالي الإنتاجية (Schuster وزملاؤه، 2002) إضافة إلى امتلاكه نظاماً أنزيمياً متطوراً (Navaratnam وزملاؤه، 2000).

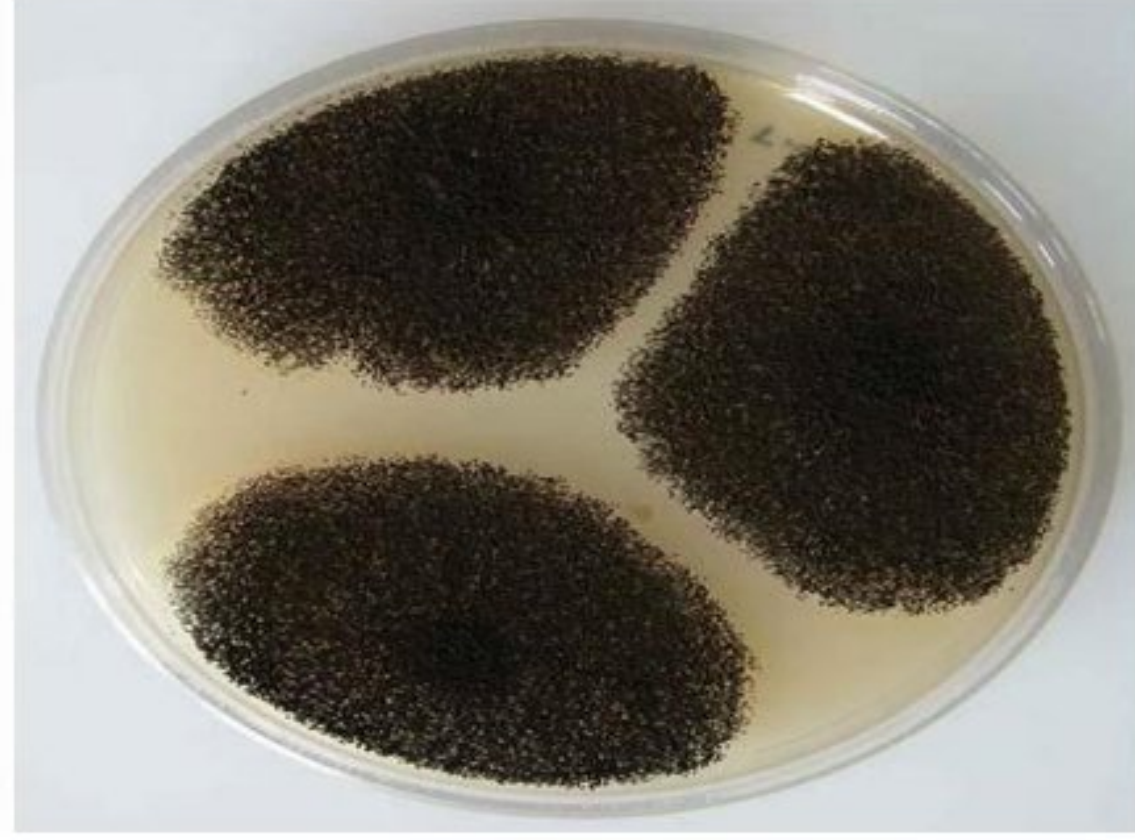
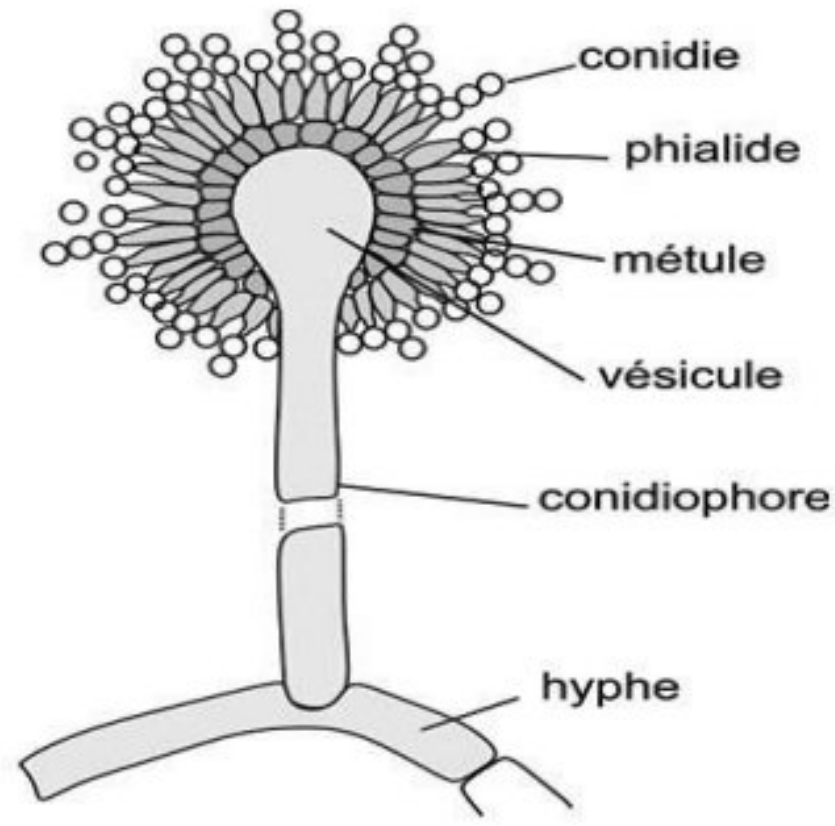
يتبع *Aspergillus niger* أو ما يعرف بالعفن الأسود التصنيف التالي حسب (Weber و Webster، 2007)

شعبة	صف	رتبة	عائلة	جنس
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Eurotioceae	Aspergillus

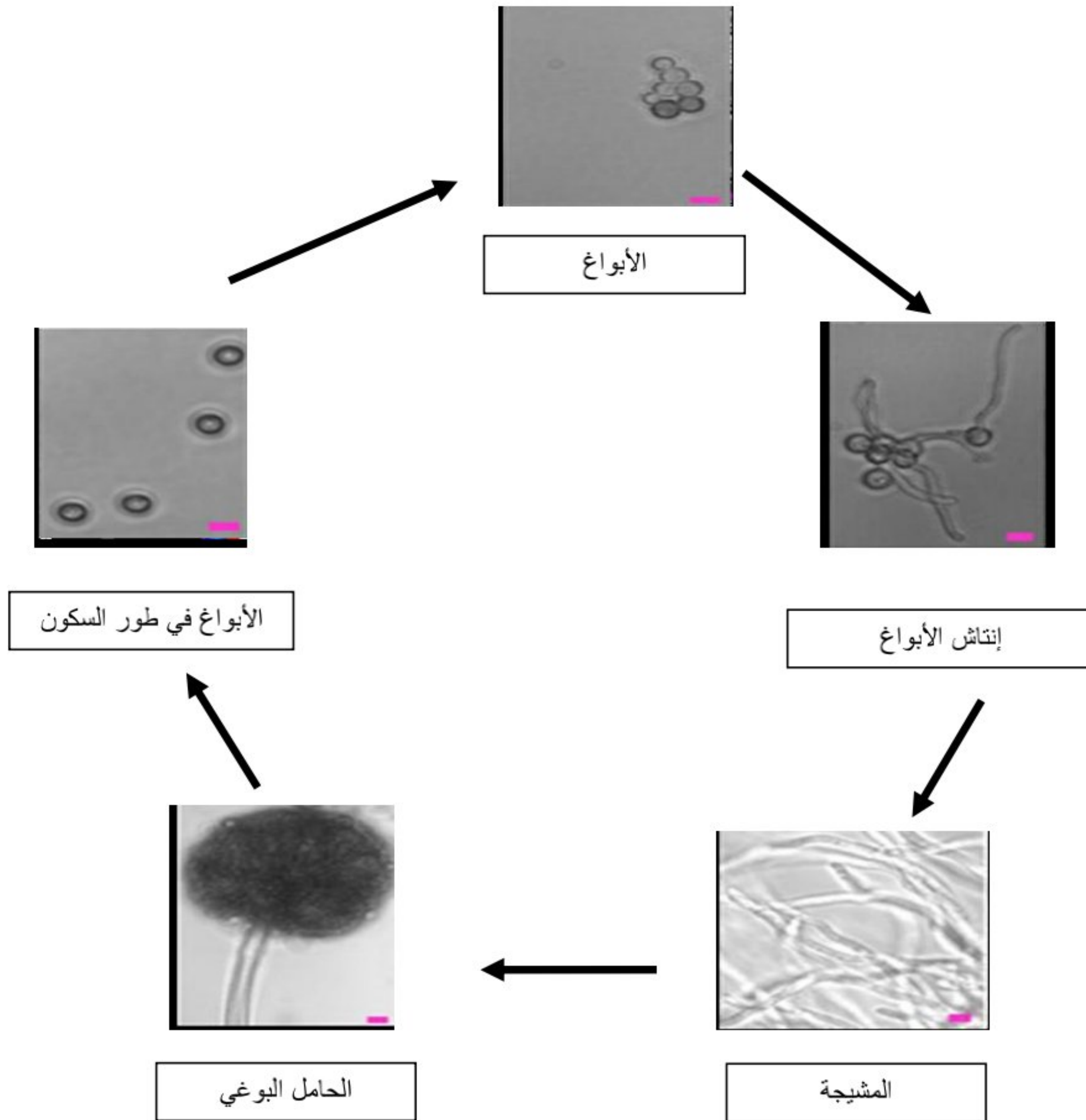
يعد جنس *Aspergillus* من أكثر الأجناس شيوعاً، وهي فطريات خيطية فردية تظهر على بعض الفواكه والخضروات مثل العنب والمشمش والبصل والبقول السوداني، كما يتواجد في كل مكان في

التربة (Samson وزملاؤه، 2001). تم تصنيفه لأول مرة عام 1729 من قبل العالم الإيطالي بيير أنطونيو ميشيلي عند عرض الفطر تحت المجهر (Bennett ، 2010).

يعد هذا الفطر سريع النمو متحملاً للحموضة ودرجات الحرارة العالية معاً، فهو قادر على النمو في مجال درجات pH بين 1.4-9.8، وفي مجال درجات حرارة يتراوح بين 6-47 °C (Schuster وزملاؤه، 2002)، كما يملك القدرة على النمو في وسط ذي تركيز عالٍ من السكر والملح، ويعدّ شديد الحاجة للأوكسجين، حيث ينمو على سطح الركيزة الغنية بالكربون مثل السكريات الأحادية (الغلوكوز) والسكريات المتعددة (الأميلوز)، وبالإضافة إلى ذلك يمكنه النمو في البيئات الفقيرة بالعناصر المغذية (Latge، 1999) .



الشكل (6) *Aspergillus niger* (Hayer and Kimran ,2014)



الشكل (7) دورة حياة فطر *Aspergillus niger* اللاجنسية

(Hayer and Kimran, 2014)

يتم استغلال *A. niger* على نطاق واسع في المجال التجاري كمصنع للخلايا، وذلك بسبب قدرته على إنتاج الأنزيمات والأحماض العضوية مثل حمض الستريك وحمض الغلوكونيك. يستخدم حمض الستريك في صناعة المواد الغذائية كمادة حافظة وإعطاء النكهة والتحكم في درجة الحموضة في الأغذية والمشروبات، سنوياً يتم إنتاج أكثر من مليون طن مع تحويل 95% (بالوزن) من ركيزة السكر، وهذا يجعل عملية التخمير شديدة الفعالية على المستوى الصناعي (Karaffa وKubicek، 2003)، كما يتم تنمية فطر *A. niger* لإنتاج الأنزيمات المفيدة، مثل غلوكوز أوكسيداز، والذي يستخدم في التفاعلات الحيوية، ويستخدم الغلوكومايلاز في إنتاج الشراب من

النشاء، البكتينازات تستخدم في صناعة الفاكهة والنبيد، بينما تستخدم الببتيدات الأمينية والكربوكسية لتعزيز النكهة (Archer وآخرون، 2008).

2.3 البكتيريا:

تستقلب البكتيريا مجموعة واسعة من الكربوهيدرات بما في ذلك الغلوكوز والكحوليات الأولية أو الثانوية، لتكوين أحماض عضوية مؤكسدة جزئياً، وألدهيدات وكيثونات تميل إلى التراكم في الوسط (Gullo وزملاؤه، 2014؛ Gullo و Giudici، 2008).

يوجد العديد من الأنواع البكتيرية التي لها القدرة على إنتاج حمض الغلوكونيك، من أهمها:

Pseudomonas ovalis, *Acetobacter methanolicus*, *Zymomonas mobilis*, *Gluconobacter oxydans*, حيث تقوم هذه البكتيريا بإنتاج الحمض بتحويل سكر الغلوكوز إلى غلوكونيك إلى جانب أكسدة الكحول إلى حمض الخل (Bekers وزملاؤه، 2000).

3.3 الخمائر:

فصلت الخمائر كمجموعة بمفردها منذ بداية دراسة علم الأحياء الدقيقة لأهميتها الاقتصادية ومن المعروف أن الخمائر Yeastes تتبع الفطريات Fungi أساساً لكنها تدرس في قسم منفصل لأهميتها الخاصة، وهي عبارة عن فطريات وحيدة الخلية لا تكون ميسليوم مثل الفطريات الأخرى وإنما توجد كخلايا بمفردها. تستطيع بعض أنواع الخمائر إنتاج حمض الغلوكونيك مثل *pullulans* *Aureobasidium* (Anastassiadis وزملاؤه، 2005).

4.الغربة Screening:

يقصد بعملية الغربة إجراء مقارنة بين عدد كبير من العزلات الفطرية في صفة محددة كصفة إنتاج حمض الغلوكونيك بهدف تحديد أي منها أكثر فعالية وقدرة على التعبير عن تلك الصفة، وذلك من خلال اختبارات معينة لانتقاء العزلة الأكثر إنتاجاً، واستكمال الدراسة المخبرية عليها واستخدامها لاحقاً على نطاق تجاري (عمر، 2006).

5. العوامل المؤثرة في إنتاج حمض الغلوكونيك:

يحتاج إنتاج الحمض إلى توفر ظروف محددة ليكون أفضل ما يمكن، وتشمل هذه الظروف:

1.5 درجة الحرارة:

تؤثر درجة الحرارة في مختلف الفعاليات الحيوية للخلية، لذلك فإن تكون منتجات الاستقلاب في الأحياء الدقيقة يعتمد بشكل كبير على درجة الحرارة، وبالتالي تؤثر في إنتاج حمض الغلوكونيك. وقد أجريت دراسات عديدة لإنتاج الحمض عند درجات حرارة مختلفة، حيث قام (Ahmed وزملاؤه، 2015) بدراسة إنتاج الحمض عند درجات حرارة تراوحت بين (25-40°C)، وكانت درجة الحرارة 30°C هي المثلى، حيث بلغ الإنتاج 69.87 غ/ل، كما أعطى فطر *niger* أعلى إنتاج للحمض عند درجة حرارة 30°C (Sing وزملاؤه، 2005)، في حين وجد (Purane وزملاؤه، 2012) أن درجة الحرارة المثالية كانت 28°C، وكانت كمية الحمض المنتجة 86.97 غ/ل.

2.5 درجة الحموضة (pH):

تؤدي درجة الحموضة لوسط التخمر دوراً بالغ الأهمية في نمو الكائن الحي الدقيق، إذ يؤثر تأثيراً مباشراً في فيزيولوجيا الكائن الحي الدقيق عن طريق تأثيره في انحلالية المواد المغذية في الوسط وجاهزيتها، الأمر الذي ينعكس على نمو الأحياء الدقيقة وفعاليتها وبالتالي قدرتها على إنتاج الحمض. بينت العديد من الدراسات أن pH الأمثل لإنتاج حمض الغلوكونيك بواسطة الفطريات يتراوح بين (4.5-7)، حيث وجد (Znad وزملاؤه، 2004) أن إنتاج الحمض عند pH يتراوح بين (4.5-6.5) وكان الإنتاج أفضل ما يمكن عند pH 5.5، في حين وجد (Ahmed وزملاؤه، 2015) أن الإنتاج باستخدام pH 6 أعطى أعلى قيمة، بينما كان 5.5 عند (Purane وزملاؤه، 2012)، حيث بلغ الإنتاج 86.97 غ/ل.

3.5 نسبة السكر:

تؤدي نسبة السكر في وسط التخمير دوراً مهماً في إنتاج حمض الغلوكونيك، وقد وجد (Ramachandran وزملاؤه، 2006) أن نسبة السكر المثلى للإنتاج تراوحت بين (110-250 غ/ل)، وكانت نسبة السكر المثلى عند دراسة الإنتاج من قبل (Sing وزملاؤه، 2005) (250 غ/ل، والتي أعطت إنتاج 12 غ/ل حمض غلوكونيك، في حين وجد كل من (Znad وزملاؤه، 2004) و (Ahmed وزملاؤه، 2015) أن نسبة السكر كانت 120-150 غ/ل على التوالي، وهذا توافق مع (Botros وزملاؤه، 2012).

4.5 التهوية:

تعد التهوية والتحرك من العوامل الأساسية في التخمرات الهوائية وذلك لتأمين الأوكسجين اللازم لنمو الفطر وإتمام عملية التخمير (Klein وزملاؤها، 2002)، وبالتالي فهي تؤدي دوراً مهماً في إنتاج الحمض كونه يحتاج إلى معدل تهوية عالٍ.

وجد Znad وزملاؤه (2004) أن إنتاج الحمض كان أعلى ما يمكن عند الإنتاج بسرعة دوران 300 دورة/د، أما (Purane وزملاؤه، 2012) فقاموا بدراسة الإنتاج عند سرعة الدوران 180 دورة/د، في حين بلغ إنتاج الحمض بالدراسة التي قام بها (Sing وزملاؤه، 2005) أعلى قيمة عند سرعة دوران 150 دورة/د وذلك عند استخدام فطر *Aspergillus niger*.

5.5 مدة التحضين:

تعد مدة التحضين من العوامل المهمة التي تؤثر في عملية التخمير، وقد اختلفت الدراسات في فترة التحضين المثلى لإنتاج الحمض، فقد وجد (Ahmed وزملاؤه، 2015) أن التحضين لمدة 10 أيام أعطى أعلى نسبة إنتاج للحمض، أما (Purane وزملاؤه، 2012) فقد كانت مدة التخمير المثلى بالدراسة التي قاموا بها 44 ساعة.

6. طرائق تقدير حمض الغلوكونيك:

تعددت الطرائق المستخدمة في تقدير حمض الغلوكونيك منها:

- طريقة المعايرة:

حسب (Herrick وزملاؤه، 1928) يتم تقدير الحمض باستخدام كاشف الفينول فتالئين والمعايرة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم (N0.1)، وحمض الكبريتيك (N0.1) لحين الوصول إلى نقطة التعادل.

- طريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (HPTLC):

تعد هذه الطريقة من أسرع طرائق الفصل وأبسطها، حيث يتم في هذه الطريقة استخدام طبقة رقيقة من السيليكا أو الألومينا (أكسيد الألمنيوم) أو السليلوز على مادة خاملة ومسطحة (بلاستيك أو زجاج) والتي تمثل الطور الثابت، بينما الطور المتحرك يكون على شكل سائل مذيب، بحيث يظهر كل لون على حدة، ويبين مكونات الخليط الأساسية بشكل أفضل، وقد استخدمت هذه الطريقة في تقدير العديد من المركبات ومنها حمض الغلوكونيك (Purane و Lohar، 2016)

- طريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC):

تعد هذه الطريقة واحدة من أحدث الطرائق في الكيمياء التحليلية، لديها القدرة على فصل المركبات وتحديداتها والتي تكون موجودة في أي عينة يمكن حلها في سائل، والمركبات ذات التركيزات المنخفضة جداً، ويتم الفصل عن طريق توزيع العينة مابين طورين أحدهما ثابت والآخر متحرك. يقوم جهاز HPLC بفصل مكونات العينة ثم التعرف عليها وتقديرها كمياً. وقد تم تطبيقها مؤخراً على الأدوية والمواد الغذائية ومستحضرات التجميل والمواد الكيميائية الصناعية (Singh وزملاؤه، 2005) .

الفصل الثاني

مواد البحث وطرائقه

MATERIALS AND METHODS

1. مواد البحث:

1.1 مكان تنفيذ البحث:

نُفذ البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية (مخبر التخمير) ومخابر قسم علوم الأغذية-كلية الهندسة الزراعية في جامعة دمشق في الفترة من 2018-2021.

2.1 الأوساط والمواد الكيميائية والأجهزة المستخدمة:

جدول رقم(1) الأوساط والمواد المستخدمة

الأوساط والمواد المستخدمة	المصدر	الاستخدام
مولاس ناتج عن صناعة السكر	معمل السكر(حمص)	وسط للتخمير
تقل العنب	السوق المحلي بدمشق	وسط للتخمير
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	SURECHEM PRODUCTS LTD	مواد مغذية للفطر
$\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{KCl} - \text{MSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	SCHARLAU	مواد مغذية للفطر
حمض كلور الماء ماءات الصوديوم	SCHARLAU TEKIM	تعديل حموضة وسط التخمير
ماء مقطر		تحضير وسط التخمير ووسط PDA
ماء مقطر خاص ب HPLC		تحضير الطور المتحرك
وسط PDA (آغار دكستروز البطاطا)	TM MEDIA	تنشيط عزلات الفطر
مضاد تشكيل رغوة من استيرات حموض دهنية	معمل السكر(حمص)	منع تشكل الرغوة أثناء التخمير
حمض الغلوكونيك Standard	ALDRICH CHEMISTRY	تحديد كمية الحمض المنتج
اسيتونتريل	LICHROSOLV	تحضير الطور المتحرك

جدول رقم (2) الأجهزة والمستلزمات المستخدمة

الأجهزة المستخدمة	مصدر الجهاز	المستلزمات المستخدمة
مخمر رباعي نوع BIOTECH- 4GBR-5	الصين	دوارق زجاجية بأحجام مختلفة
جهاز HPLC نوع KNAUER	ألمانيا	أنابيب زجاجية بأحجام مختلفة
حاضنة هزازة نوع New Brunswick Scientific	USA	أطباق بتري
حجرة زرع ميكروبي نوع BIO AIR	E.U	بياشر زجاجية
جهاز pH meter نوع Sartorius	الصين	ماصات زجاجية
مجهر نوع Olympus	يابان	فلتر قطر 0,45 ميكرومتر
محرك مغناطيسي نوع Scientifical	أوروبا	قطن - قفازات
ميزان حساس نوع Mettler Toledo	Taiwan	سيرينغات - إبر تلقيح
أوتوغلاف نوع Jsac-40	كوريا	ميكروبيت-تيبسات
رفراكتوميتر نوع Kruss	ألمانيا	بوالين معايرة زجاجية
مثقلة Eppendorff نوع MiniSpin	ألمانيا	أنابيب ependorff
التراسونيك نوع J.P.SELECTA	E.U	سلندرات زجاجية
شريحة العد نوع Marienfeld	ألمانيا	سدادات قطنية

3.1 الركائز المستخدمة:

استُخدم نوعان من الركائز، المولاس الناتج عن صناعة السكر (في معمل السكر بحمص للموسم 2018)، وقد أُجري تحليل كيميائي لمعرفة تركيب المولاس في المختبر.

أما الركيزة الثانية المستخدمة فهي ثقل العنب حيث تم الحصول على العنب من السوق المحلي بدمشق والقيام بعصره للحصول على الثقل، حيث يتميز ثقل العنب باحتوائه على تركيز جيد من السكريات اللازمة لإنتاج الحمض.

4.1 الكائن الحي الدقيق المستخدم:

استخدمت 20 عزلة من عزلات فطر *Aspergillus niger* معزولة ومصنفة محلياً مصدرها مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية. حفظت العزلات على وسط آغار دكستروز بطا (PDA) بشكل مائل داخل أنابيب زجاجية في الثلاجة بدرجة 4°C، نشطت العزلات الفطرية وذلك بتجديد زراعتها كل أسبوعين.

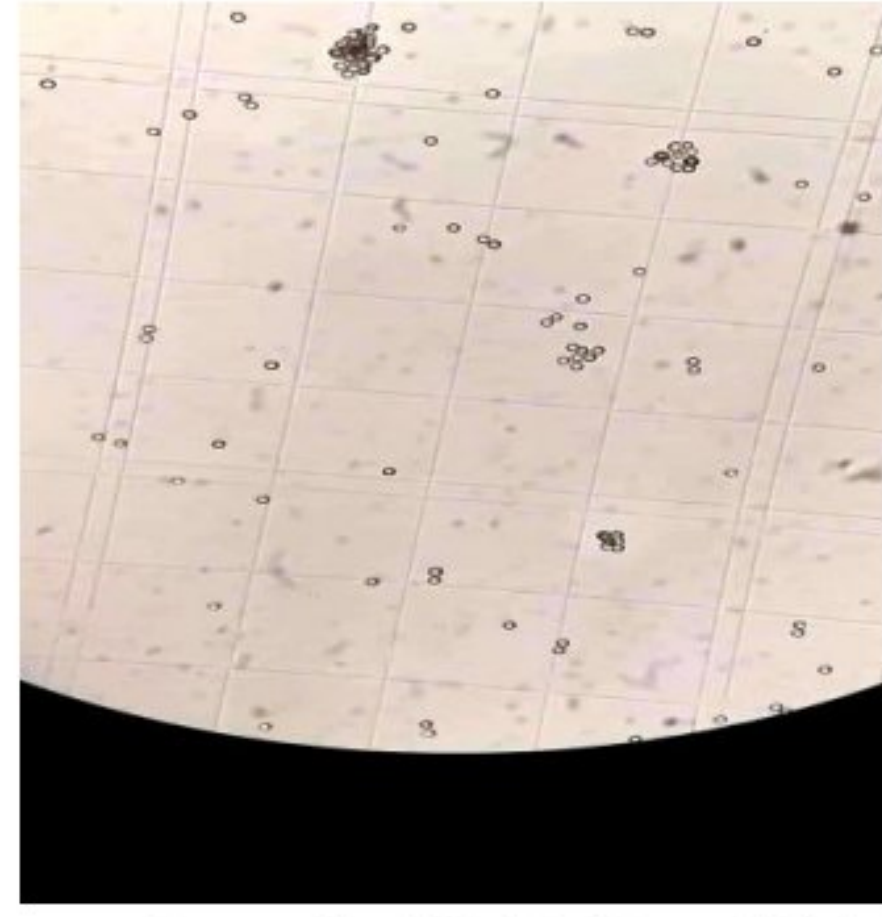
2. طرائق البحث:

1.2 تحضير المعلق البوغي:

حضر المعلق البوغي بإضافة 5 مل من الماء المقطر المعقم إلى الأنابيب الزجاجية الحاوية على العزلات المنشطة بعمر أسبوعٍ كلٍّ على حدا ورجت الأنابيب جيداً لفصل الأبواغ ، ثم افرغ محتوى الأنابيب في بياشر زجاجية تحتوي على 95 مل ماء مقطراً معقماً. بعد تحريك المعلق أخذ حجم منه على شريحة العد (Neubauer improved – Marienfeld) وذلك لعد الأبواغ تحت المجهر للحصول على تركيز 10×2^6 بوغة/مل.



شكل (9) المعلق البوغي



شكل (8) عد الأبواغ الفطرية تحت المجهر

2.2 غربلة عزلات الفطر:

نشطت عزلات الفطر في أنابيب زجاجية تحتوي على وسط PDA في الحاضنة بدرجة حرارة 30°C لمدة 7 أيام، ثم حضر المعلق البوغي (Ahmed وزملاؤه، 2015) .

بعد ذلك حضر وسط التخمر بأخذ وزن مناسب من المولاس بعد حسابه بمربع بيرسون، ومن ثم تمديده بالحجم المحسوب من الماء المقطر وذلك للحصول على تركيز 24 بريكس (176,13 غ/ل سكر)، ثم عدلت حموضة المولاس باستخدام حمض كلور الماء (N0.1) للوصول إلى pH 6، ثم أضيفت المواد المغذية بالتراكيز الآتية:

($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4: 0.95$, $\text{KCL-KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{MG SO}_4: 0.52$) غ/ل، بعد ذلك عقم الوسط في

الautoclave بعد توزيعه على دوارق مخروطية بحجم 250 مل عند درجة حرارة 121°C لمدة 15

دقيقة، وبعدها برّد لدرجة حرارة الغرفة، ومن ثم لقح الوسط بالمعلق البوغي بحجم (2%)

حجم/حجم. بعد تحضين الدوارق في الحاضنة الهزّاء بسرعة دوران 200 دورة/دقيقة ودرجة حرارة

30°C لمدة 7 أيام أخذت عينات بحجم 1,5 مل من كل دورق بأنابيب Ependorff، ومن ثم

نقلت الأنابيب بالمتلّة، وتم بعد ذلك فلترة العينات باستخدام فلاتر قطر 0,45 ميكرومتر، ثم

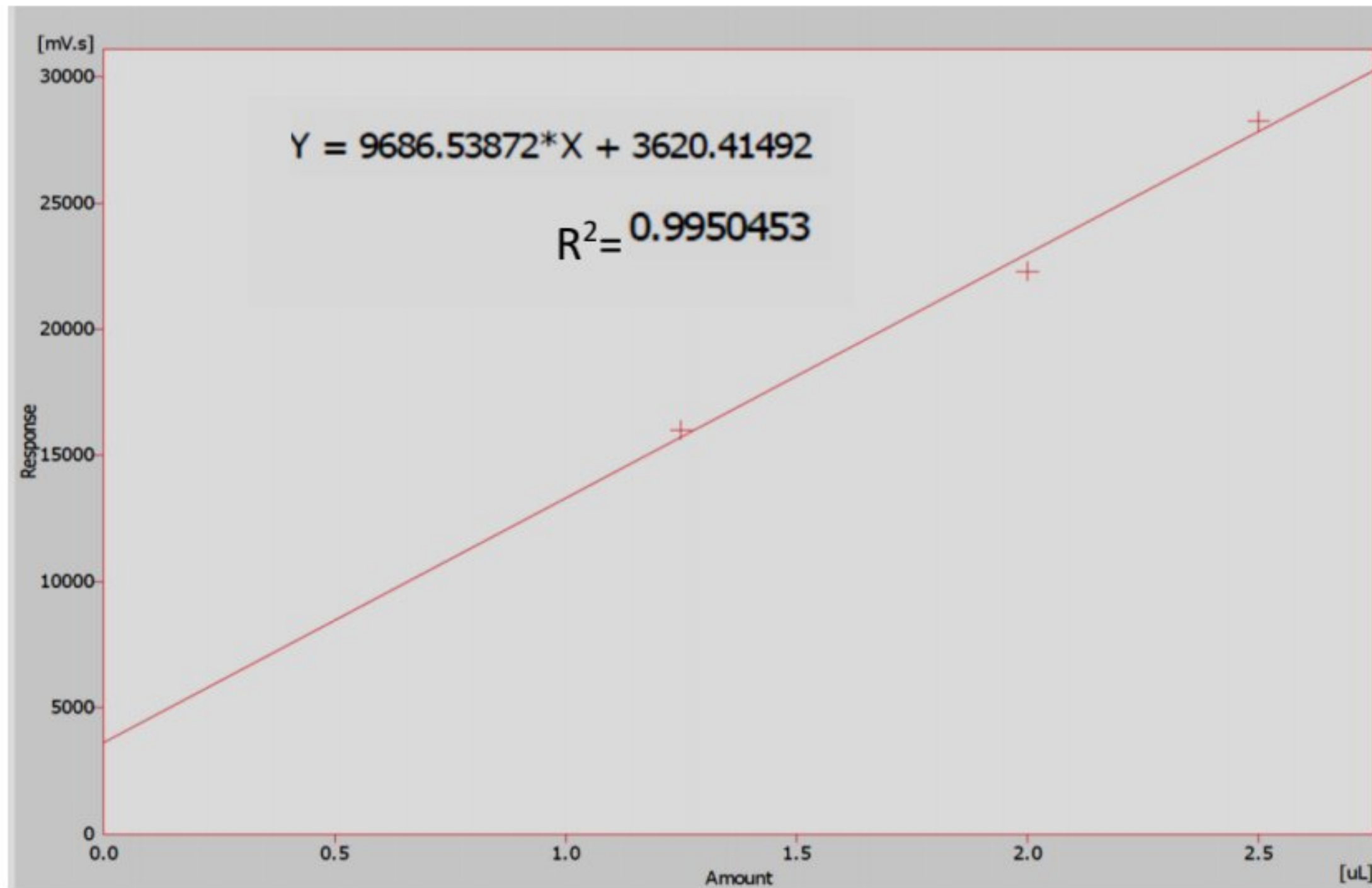
حقنت العينات بجهاز HPLC (KNAUER) باستخدام العمود C18، كاشف UV، طول موجة

210 نانومتر وتدفق 1 مل/د بعد حقن ستاندر حمض الغلوكونيك وذلك لتحديد العزلات التي لها

القدرة على إنتاج الحمض، وتحديد العزلة الأكثر كفاءة في الإنتاج، حيث سيتم استخدام هذه العزلة في دراسة الظروف المثلى لإنتاج الحمض والمردود .

3.2 تحضير المنحنى القياسي لحمض الغلوكونيك:

أخذ 3 مل من حمض الغلوكونيك النقي (ALDRICH CHEMISTRY) في دورق معياري حجم 100 مل وأكمل الحجم بماء مقطر خاص بـ HPLC للحصول على محلول تركيزه 3%، وأجريت ثلاثة تخفيف منه كالاتي (2.5- 2- 1.25%) للحصول على المنحنى القياسي من الحمض النقي كما هو مبين بالشكل (10).



الشكل (10) المنحنى القياسي لحمض الغلوكونيك

3. دراسة الظروف المثلى لإنتاج حمض الغلوكونيك:

تمت الدراسة باستخدام برنامج التحليل الإحصائي Minitab Optimization Method لدراسة تأثير كل عامل على حدا وتأثير العوامل المتفاعلة مع بعضها بعضاً.

1.3 تصميم التجربة:

درست الظروف المثلى لإنتاج الحمض (درجة الحرارة، درجة الحموضة، مدة التحضين، سرعة التهوية، تركيز السكر).

درس كل متغير عند خمسة مستويات كما يأتي:

الجدول (3) المتغيرات المدروسة ومستوياتها

مستويات المتغيرات بصورة رمز	المتغيرات				
	التهوية دورة/دقيقة	درجة الحرارة C°	درجة الحموضة	مدة التحضين يوم	تركيز السكر غ/ل
$a^- = -2$	150	25	4	5	146
-1	200	30	5	6	176
0	250	35	6	7	205
+1	300	40	7	8	234
$a^+ = +2$	350	45	8	9	264

وتضمن التصميم 96 معاملة موضحة بالجدول (4).

الجدول رقم(4) تصميم التجربة

Blocks	سرعة التهوية Aeration دورة/دقيقة	درجة الحرارة Temperature °C	درجة الحموضة pH	مدة التحضين Incubation time يوم	تركيز السكر غل غل
1	200	30	5	6	234
1	300	30	5	6	176
1	200	40	5	6	176
1	300	40	5	6	234
1	200	30	7	6	176
1	300	30	7	6	234
1	200	40	7	6	234
1	300	40	7	6	176
1	200	30	5	8	176
1	300	30	5	8	234
1	200	40	5	8	234
1	300	40	5	8	176
1	200	30	7	8	234
1	300	30	7	8	176
1	200	40	7	8	176
1	300	40	7	8	234
1	150	35	6	7	205
1	350	35	6	7	205
1	250	25	6	7	205
1	250	45	6	7	205
1	250	35	4	7	205
1	250	35	8	7	205
1	250	35	6	5	205
1	250	35	6	9	205
1	250	35	6	7	146
1	250	35	6	7	264
1	250	35	6	7	205
1	250	35	6	7	205
1	250	35	6	7	205
1	250	35	6	7	205
1	250	35	6	7	205
1	250	35	6	7	205
1	250	35	6	7	205
2	200	30	5	6	234
2	300	30	5	6	176
2	200	40	5	6	176
2	300	40	5	6	234
2	200	30	7	6	176
2	300	30	7	6	234
2	200	40	7	6	234
2	300	40	7	6	176
2	200	30	5	8	176
2	300	30	5	8	234
2	200	40	5	8	234
2	300	40	5	8	176
2	200	30	7	8	234

2	300	30	7	8	176
2	200	40	7	8	176
2	300	40	7	8	234
2	150	35	6	7	205
2	350	35	6	7	205
2	250	25	6	7	205
2	250	45	6	7	205
2	250	35	4	7	205
2	250	35	8	7	205
2	250	35	6	5	205
2	250	35	6	9	205
2	250	35	6	7	146
2	250	35	6	7	264
2	250	35	6	7	205
2	250	35	6	7	205
2	250	35	6	7	205
2	250	35	6	7	205
2	250	35	6	7	205
2	250	35	6	7	205
2	250	35	6	7	205
3	200	30	5	6	234
3	300	30	5	6	176
3	200	40	5	6	176
3	300	40	5	6	234
3	200	30	7	6	176
3	300	30	7	6	234
3	200	40	7	6	234
3	300	40	7	6	176
3	200	30	5	8	176
3	300	30	5	8	234
3	200	40	5	8	234
3	300	40	5	8	176
3	200	30	7	8	234
3	300	30	7	8	176
3	200	40	7	8	176
3	300	40	7	8	234
3	150	35	6	7	205
3	350	35	6	7	205
3	250	25	6	7	205
3	250	45	6	7	205
3	250	35	4	7	205
3	250	35	8	7	205
3	250	35	6	5	205
3	250	35	6	9	205
3	250	35	6	7	146
3	250	35	6	7	264
3	250	35	6	7	205
3	250	35	6	7	205
3	250	35	6	7	205
3	250	35	6	7	205
3	250	35	6	7	205
3	250	35	6	7	205
3	250	35	6	7	205

2.3 تحليل التجربة:

يعبر عن العلاقة بين إنتاج حمض الغلوكونيك والمتغيرات الخمسة المدروسة بمعادلة من الدرجة الثانية كما يأتي:

$$Y = a + bX_1 + cX_2 + dX_3 + eX_4 + fX_5 + gX_1^2 + hX_2^2 + iX_3^2 + jX_4^2 + kX_5^2 + lX_1 * X_2 + mX_1 * X_3 + nX_1 * X_4 + oX_1 * X_5 + pX_2 * X_3 + qX_2 * X_4 + rX_2 * X_5 + sX_3 * X_4 + tX_3 * X_5 + uX_4 * X_5$$

حيث:

Y: المعامل المدروس Response كمية الحمض.

a: المعامل الثابت Constant .

b, c, d, e, f: المعاملات الخطية Linear coefficient.

g, h, i, j, k: المعاملات المنحنية Square coefficient.

l, m, n, o, p, q, r, s, t, u: المعاملات المتداخلة Interaction coefficient.

حيث إنَّ X1 : سرعة التهوية

X2: درجة الحرارة

X3: درجة الحموضة

X4: مدة التحضين

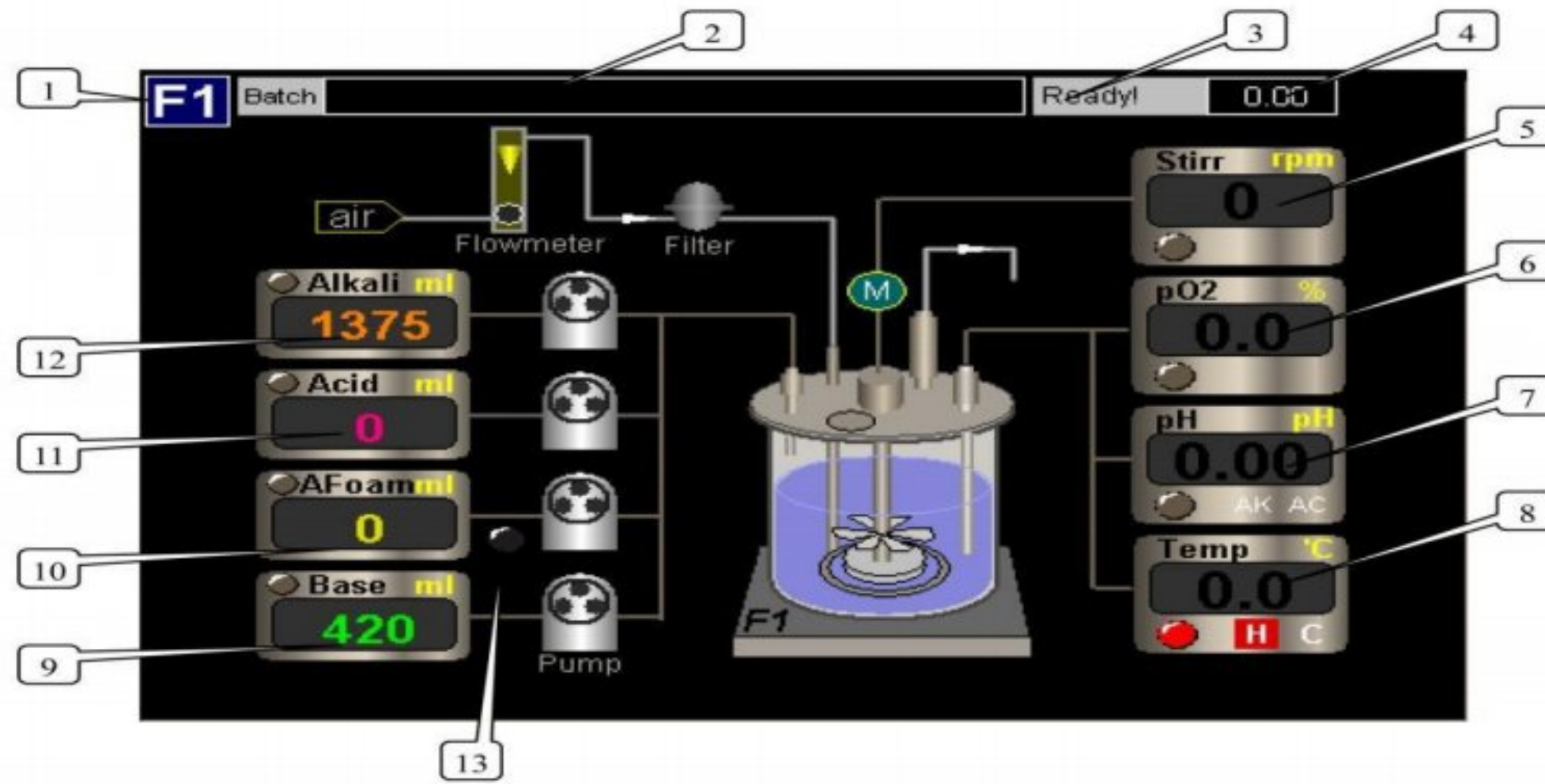
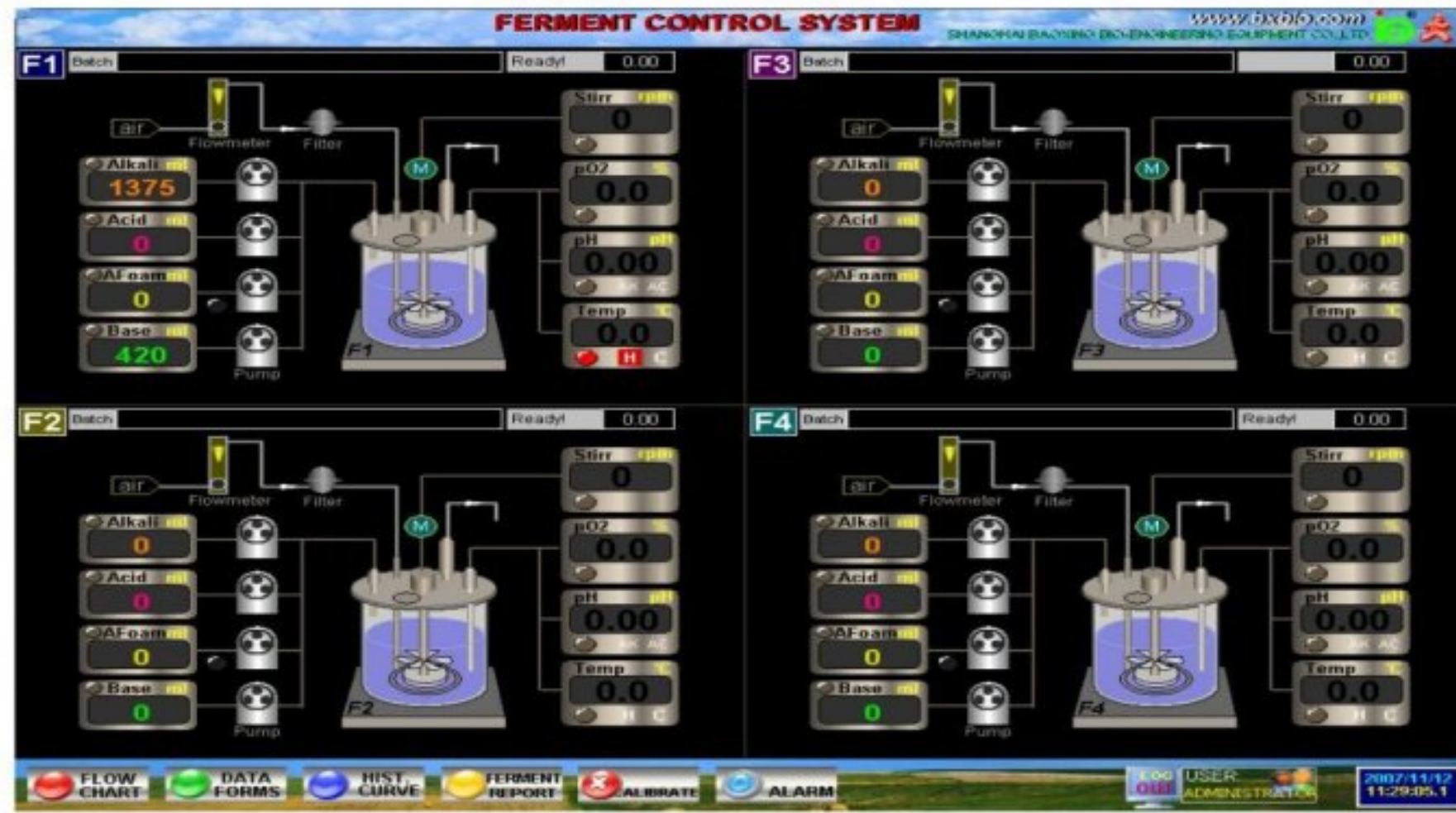
X5: تركيز السكر

4. إنتاج حمض الغلوكونيك بتطبيق الظروف المثلى باستخدام المخمر:

طبقت الظروف المثلى التي تم الحصول عليها لإنتاج الحمض في المخمر الرباعي (BIOTECH-4GBR-5)، حيث حضر وسط بحجم 2250 مل من المولاس المضاف إليه المواد المغذية المستخدمة سابقاً وقسم على ثلاثة مكررات، حيث وضع 750 مل في كل وعاء وتم تعقيمه، ومن ثم أضيف اللقاح وضبطت العوامل المثلى، وفي نهاية عملية التخمير أخذت عينات من الوسط وحللت على جهاز HPLC، وحدد تركيز الحمض المنتج .

5. إنتاج حمض الغلوكونيك بتطبيق الظروف المثلى على تفل العنب:

طبقت الظروف المثلى للإنتاج بالمولاس التي تم الحصول عليها من درجة حرارة، تركيز السكر، رقم pH، التهوية، والتهوية على تفل العنب بالمخمر كما في الفقرة رقم (4)، حيث حضر وسطان للتخمير من التفل، كان الوسط الأول بتركيز السكر الطبيعي للتفل والذي بلغ 139 غ/ل ، والوسط الثاني من التفل بعد إضافة 166 غ من سكر الغلوكوز/ل للوصول إلى تركيز السكر المثالي 234 غ/ل والمواد المغذية نفسها وذلك للمقارنة بين الركائز من حيث إنتاج الحمض.



شكل رقم (11) رسم تخطيطي مختصر للمخمر رباعي الأوعية

1- رقم وعاء التخمر، 2- طريقة التخمر (batch)، 3- حالة وعاء التخمر، 4- زمن التخمر، 5- سرعة دوران التحريك (rpm)، 6- التراكمية من القلوي (ml)، 13- لمبة إشارة الرغوة: تضيء عند ظهور رغوة

6. تقدير حمض الغلوكونيك المنتج:

قدر حمض الغلوكونيك الناتج في وسط التخمر باستخدام جهاز HPLC ماركة (KNAUER) من ألمانيا والمزود بمضخة واحدة طراز LC-20AT، وحجرة حقن Injection loop حجمها 20 ميكروليتر، وفرن طراز CTO-20A، وكاشف الأشعة فوق البنفسجية UV-PDA طراز SPD-M20A، وحاسوب لتخزين النتائج المتحصل عليها من الكاشف ومعالجتها وفق نظام LC-Soulution. ضبط الجهاز بتدفق 1 مل/دقيقة وزمن تحليل 10 دقائق وحجم الحقنة 20 ميكروليتر والعمود OD-C18 (250×4.6mm) من شركة تكنوكروما، وطول موجة 210 نانومتر، وطور متحرك مكون من الأسيتونتريل بنسبة 15% وماء HPLC بنسبة 85%، حيث أخذت عينة من كل

تجربة ووضعت في أنابيب Ependorff ومن ثم ثقلت العينات في المثقلة، بعد ذلك فلترت العينات باستخدام فلتر 0.45 مم، ثم أخذت العينات المفلترة وحقنت في جهاز HPLC بعد حقن ستاندر حمض الغلوكونيك وإجراء المنحنى القياسي، حيث تم الحصول على تركيز الحمض في العينات بعد إسقاطها على المنحنى القياسي (Singh وزملاؤه، 2005) .

7. دراسة مردود الحمض:

حسب المردود من خلال دراسة السكر المستهلك وكمية الحمض الناتجة بجهاز HPLC باستخدام عمود NH_2 -كاشف (Refractive Index Detector) RI-درجة حرارة 30°C - تدفق 2.4 مل/د وطور متحرك مكون من الأسيتونتريل بنسبة 85% وماء HPLC بنسبة 15%، حيث حسب مردود الحمض كنسبة مئوية غرام من 100 غرام سكر مستهلك (Davis وزملاؤه، 2006).

8. طريقة التحليل الإحصائي:

أجري التحليل الإحصائي باستخدام برنامج Minitab لدراسة الظروف المثلى للإنتاج والمقارنة بين الركائز المستخدمة.

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

RESULTS

and DISCUSSION

1. التركيب الكيميائي للمولاس المستخدم:

جرى تحليل عينة من المولاس المستخدم في البحث وفق طريقة ICUMSA رقم: (1994) GS4-13 (Bartens,2005) ICUMSA رقم: (1994) GS4/7-1 (Bartens,2005). وكانت النتائج كما هو موضح في الجدول (5).

جدول رقم (5) التركيب الكيميائي للمولاس

الوحدة	الكمية	التحليل
غ/سم ³	1,312	الكثافة عند درجة 25°C
درجة	47	الاستقطاب
%	82,2	المادة الجافة
%	10,5	الرماد
%	72	المادة العضوية
%	41	كربون عضوي
%	1,75	الآزوت
%	0,24	P ₂ O ₅
Ppm	1875	Na
Ppm	7190	K
Ppm	4	Mn
Ppm	22	Fe

2. نتائج الغربلة:

بينت نتائج الغربلة أنه من أصل 20 عذلة استخدمت، كان فقط 10 عزلات لديها القدرة على إنتاج الحمض، وذلك عند الكشف عنه بجهاز الـ HPLC. كما أظهرت النتائج الـ 10 تفوق العذلة رقم 4

(An 6) عن باقي العزلات حيث بلغت كمية الحمض 122.3 غ/ل، ويبين الجدول الآتي نتائج
الغربة:

جدول رقم (6) نتائج الغربة

تركيز الحمض غ/ل	رمز العزلة	رقم العزلة
69.8	An 3	1
121.7	An 4	2
112.2	An 5	3
122.3	An 6	4
120.1	An 8	5
102	An 10	6
116	An 12	7
118	An 13	8
120.2	An 14	9
105.8	An 18	10

3. أمثلة ظروف إنتاج حمض الغلوكونيك:

1.3 تصميم التجربة:

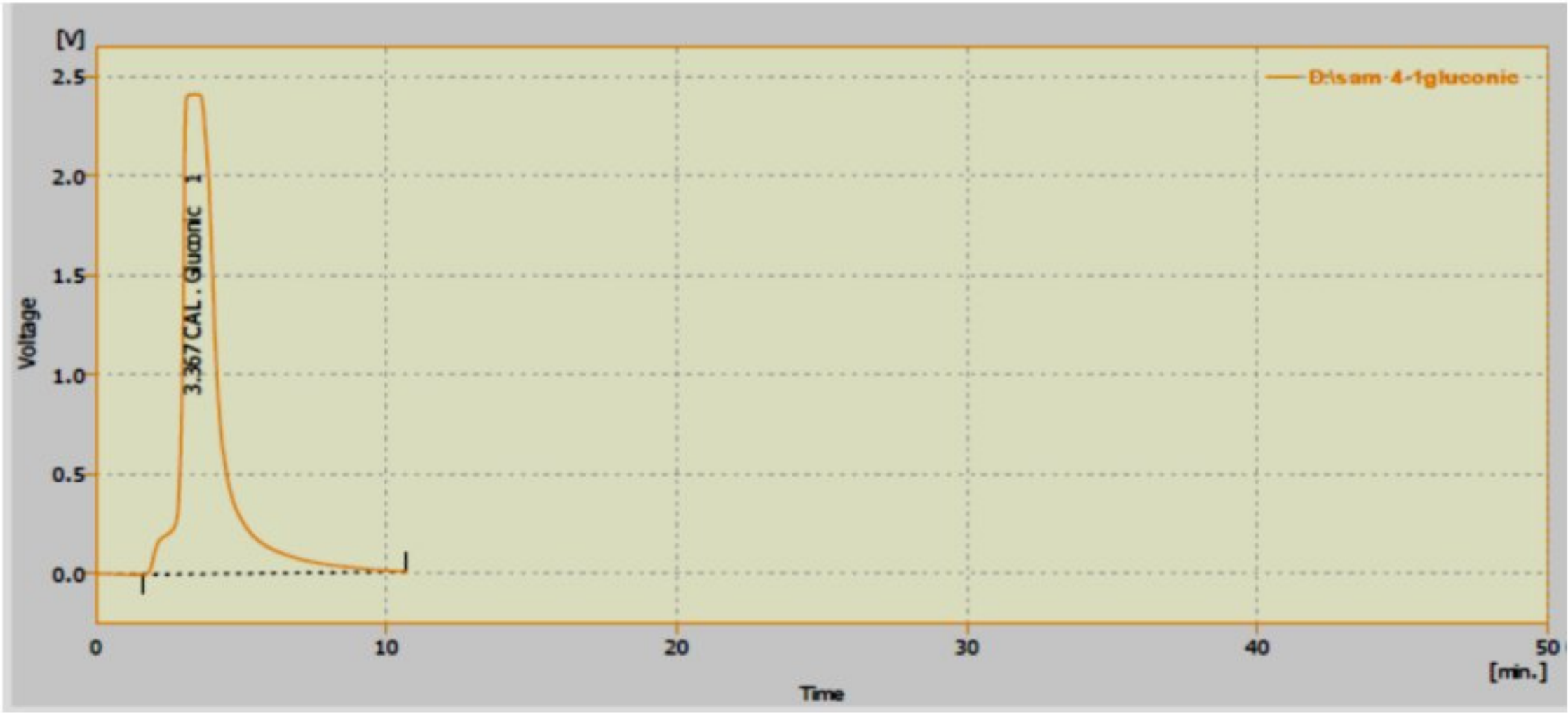
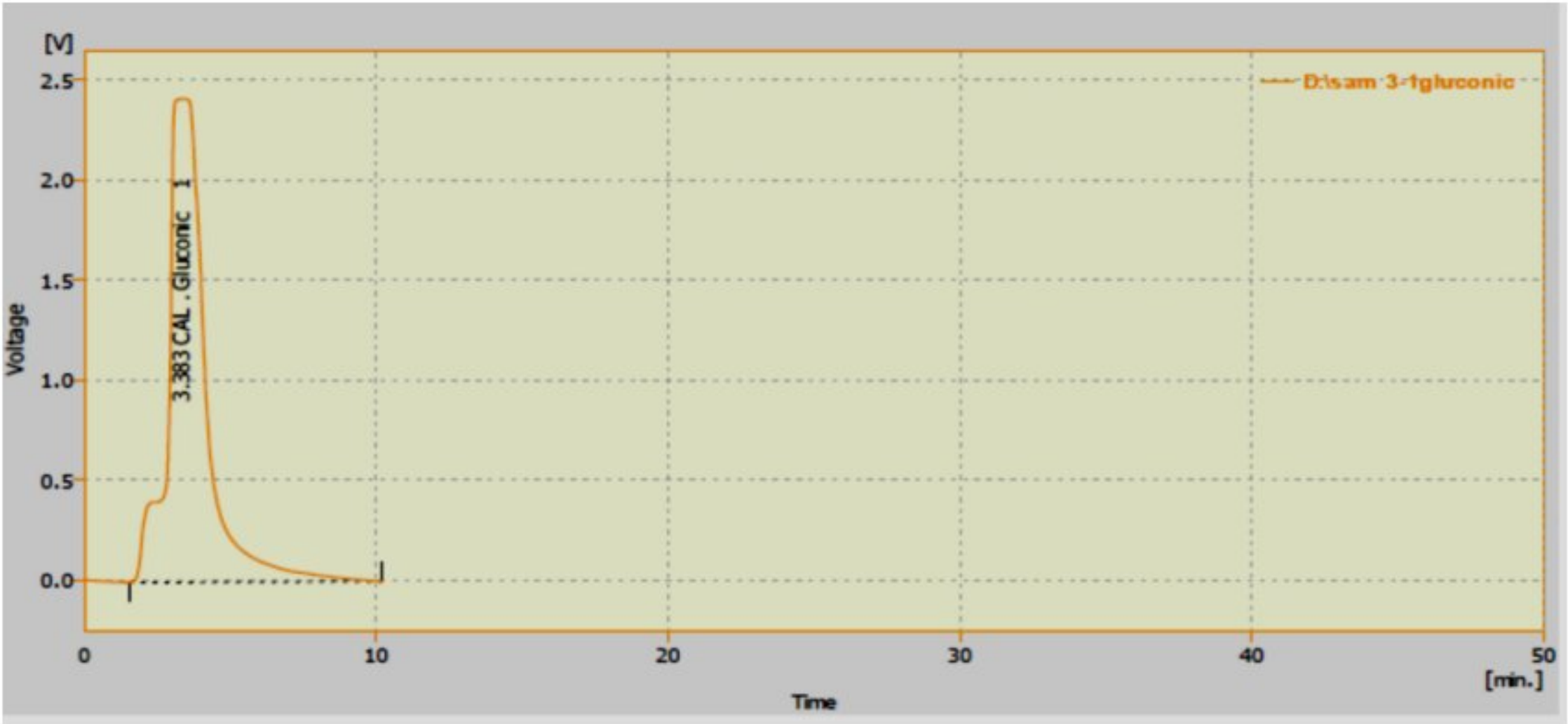
استخدم التصميم الإحصائي المذكور في الفقرة (1.3) من مواد البحث وطرائقه لأمثلة ظروف إنتاج الحمض والذي يتألف من 96 معاملة و5 متغيرات، وتم الحصول على قيم كمية الحمض لكل معاملة، كما هو موضح بالجدول (7).

الجدول رقم (7) كمية الحمض في المعاملات المدروسة

كمية الحمض غ/ل	تركيز السكر غ/ل	مدة التحضين Incubation time يوم	درجة الحموضة pH	درجة الحرارة Temperature °C	سرعة التهوية Aeration دورة/دقيقة	Blocks
109.7	234	6	5	30	200	1
85	176	6	5	30	300	1
88.8	176	6	5	40	200	1
99.5	234	6	5	40	300	1
92	176	6	7	30	200	1
98.9	234	6	7	30	300	1
106.8	234	6	7	40	200	1
91.1	176	6	7	40	300	1
90	176	8	5	30	200	1
107.8	234	8	5	30	300	1
110.2	234	8	5	40	200	1
94.8	176	8	5	40	300	1
105.5	234	8	7	30	200	1
109.7	176	8	7	30	300	1
93	176	8	7	40	200	1
85	234	8	7	40	300	1
109.9	205	7	6	35	150	1
84	205	7	6	35	350	1
54.2	205	7	6	25	250	1
76.7	205	7	6	45	250	1
104	205	7	4	35	250	1
97	205	7	8	35	250	1
99.8	205	5	6	35	250	1
98.9	205	9	6	35	250	1
54.2	146	7	6	35	250	1
114.5	264	7	6	35	250	1
101.6	205	7	6	35	250	1
101.5	205	7	6	35	250	1
101.6	205	7	6	35	250	1
101.6	205	7	6	35	250	1
101.4	205	7	6	35	250	1

1	250	35	6	7	205	101.6
2	200	30	5	6	234	109.3
2	300	30	5	6	176	85.2
2	200	40	5	6	176	88.5
2	300	40	5	6	234	99.3
2	200	30	7	6	176	92
2	300	30	7	6	234	99
2	200	40	7	6	234	106.5
2	300	40	7	6	176	91
2	200	30	5	8	176	90.2
2	300	30	5	8	234	107.5
2	200	40	5	8	234	110
2	300	40	5	8	176	94.8
2	200	30	7	8	234	105.4
2	300	30	7	8	176	109.8
2	200	40	7	8	176	93.3
2	300	40	7	8	234	84.9
2	150	35	6	7	205	109.9
2	350	35	6	7	205	84.1
2	250	25	6	7	205	54
2	250	45	6	7	205	76.6
2	250	35	4	7	205	104.2
2	250	35	8	7	205	96.9
2	250	35	6	5	205	100
2	250	35	6	9	205	98.7
2	250	35	6	7	146	54
2	250	35	6	7	264	114.5
2	250	35	6	7	205	101.5
2	250	35	6	7	205	101.6
2	250	35	6	7	205	101.6
2	250	35	6	7	205	101.5
2	250	35	6	7	205	101.4
2	250	35	6	7	205	101.6
3	200	30	5	6	234	109.6
3	300	30	5	6	176	84.9
3	200	40	5	6	176	88.8
3	300	40	5	6	234	99.7
3	200	30	7	6	176	92.2
3	300	30	7	6	234	99
3	200	40	7	6	234	106.6
3	300	40	7	6	176	91
3	200	30	5	8	176	90.1
3	300	30	5	8	234	107.7
3	200	40	5	8	234	110
3	300	40	5	8	176	94.8
3	200	30	7	8	234	105.5
3	300	30	7	8	176	109.6
3	200	40	7	8	176	93
3	300	40	7	8	234	85.3
3	150	35	6	7	205	110
3	350	35	6	7	205	84
3	250	25	6	7	205	54.1

3	250	45	6	7	205	76.5
3	250	35	4	7	205	104.1
3	250	35	8	7	205	97.2
3	250	35	6	5	205	99.9
3	250	35	6	9	205	99
3	250	35	6	7	146	54
3	250	35	6	7	264	114.3
3	250	35	6	7	205	101.5
3	250	35	6	7	205	101.4
3	250	35	6	7	205	101.5
3	250	35	6	7	205	101.6
3	250	35	6	7	205	101.6
3	250	35	6	7	205	101.4



شكل رقم (12) نماذج لتحليل بعض العينات على جهاز HPLC

2.3 تحليل التجربة:

دراسة تأثير العوامل المدروسة (التأثير الخطي، التأثير المربع، التأثير المتبادل بين العوامل) في إنتاج الحمض، حيث كانت النتائج كالآتي:

التحليل الإحصائي للتأثير الخطي للمتغيرات الخمسة المدروسة (أي تأثير كل عامل على حدا). نلاحظ من الجدول رقم (8) أن قيمة P لكل المتغيرات أكبر من 0.05، وبالتالي ليس هنالك تأثير معنوي لها في إنتاج الحمض.

التأثير المربع، نلاحظ من الجدول (8) أن قيمة P لكل المتغيرات أقل من 0.05 ($P < 0.05$)، وبالتالي هنالك تأثير معنوي لها في إنتاج الحمض والعلاقة بين إنتاج حمض الغلوكونيك المنتجة والعوامل الخمسة على شكل منحني (قطع مكافئ).

التأثير التفاعلي، أي تأثير العوامل المتداخلة في إنتاج الحمض، تحتوي المعادلة على 10 علاقات تداخل بين المتغيرات الخمسة، ونلاحظ من الجدول (8) أن جميع العلاقات كانت ذات تأثير معنوي حيث كانت ($P < 0.05$).

معامل التحديد $R^2 = 97.10\%$ وهذا يدل على أن معادلة الانحدار للعوامل المتغيرة تؤثر بنسبة 97.10 % على مقدار التغير في كمية الحمض المنتجة .

واعتماداً على الجدول (8) يمكن كتابة المعادلة كما يأتي:

$$Y = 89.59 + 3.97X_1^2 + 18.87X_2^2 + 16.92X_3^2 - 6.58X_4^2 + 12.02X_5^2 + 19.05X_1 * X_2 + 2.3$$

$$5X_1 * X_3 + 6.40X_1 * X_4 - 9.10X_1 * X_5 + 13.55X_2 * X_3 + 13.40X_2 * X_4 - 2.60X_2 * X_5 - 4X_3$$

$$* X_4 + 6X_3 * X_5 + 11.55X_4 * X_5$$

جدول رقم (8) تأثير العوامل المدروسة في إنتاج حمض الغلوكونيك

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	89.59	18.86	4.75	0.003
Aeration	0.53	8.73	0.06	0.953
Temperature	2.13	8.73	0.24	0.815
pH	-4.12	8.73	-0.47	0.654
Time	0.13	8.73	0.02	0.988
Sugar concentration	6.53	8.73	0.75	0.482
Aeration*Aeration	3.97	21.38	0.19	0.039
Temperature*Temperature	18.87	21.38	0.88	0.012
pH*pH	16.92	21.38	0.79	0.011
Time*Time	-6.58	21.38	-0.31	0.009
Sugar concentration * Sugar concentration	12.02	21.38	0.56	0.004
Aeration*Temperature	19.05	21.38	0.89	0.007
Aeration*pH	2.35	21.38	0.11	0.016
Aeration*Time	6.40	21.38	0.30	0.005
Aeration* Sugar concentration	-9.10	21.38	-0.43	0.023
Temperature*pH	13.55	21.38	0.63	0.050
Temperature*Time	13.40	21.38	0.63	0.014
Temperature* Sugar concentration	-2.60	21.38	-0.12	0.017
pH*Time	-4.00	21.38	-0.19	0.008
pH* Sugar concentration	6.00	21.38	0.28	0.043
Time* Sugar concentration	11.55	21.38	0.54	0.009

$R^2 = 97.10\%$.

يبين الجدول (9) وجود متغير مربع واحد (Square) على الأقل من المتغيرات المربعة الخمسة

معنوي ($P < 0.05$)، كما يوجد علاقة ترابط واحدة (Interraction) على الأقل من علاقات

الترابط العشرة معنوية حيث ($P < 0.05$).

جدول رقم (9) التحليل الإحصائي لتباين المتغيرات المدروسة في إنتاج حمض الغلوكونيك

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	20	13670.6	13670.63	683.53	10.46	0.000
Linear	5	5848.3	5848.29	1169.66	17.89	0.215
Square	5	5626.2	5626.16	1125.23	17.21	0.000
Interaction	10	2196.2	2196.18	219.62	3.36	0.001
Residual Error	73	4772	4772	65.37		
Lack-of-Fit	58	4771.9	4771.89	82.27	11391.78	0.445
Pure Error	15	0.1	0.11	0.01		
Total	95	18442.7				

3.3 أمثلة ظروف إنتاج الحمض:

بينت نتائج الأمثلة أن كمية الحمض المتشكلة تراوحت من 54 غ/ل و 114.5 غ/ل كما هو مبين بالجدول رقم (7) وأدت درجة الحرارة وتركيز السكر الدور الأساسي في ذلك، وفيما يأتي مناقشة النتائج لكل عامل على حدا.

1.3.3 تأثير سرعة التهوية في إنتاج الحمض:

استخدمت سرعات مختلفة للحاضنة الهزاة عند تحضين دوارق التخمير لتحديد التهوية المثالية لإنتاج الحمض تراوحت بين 150-350 دورة/د. لوحظ أن أعلى إنتاج للحمض كان عند سرعة دوران 150 دورة/د كما هو مبين بالشكل رقم (13)، وهذا توافق مع الدراسة التي أجراها (Singh وآخرون، 2005) لإنتاج حمض الغلوكونيك من المولاس باستخدام فطر *Aspergillus niger*، كما تقاربت النتائج مع ماتوصل إليه (Purane وآخرون، 2012) عند دراسة إنتاج الحمض من فطر *Aspergillus niger*، حيث وجد أن أعلى إنتاج كان عند استخدام سرعة دوران 180 دورة/د.

2.3.3 تأثير درجة الحرارة في إنتاج الحمض:

نلاحظ من الجدول (8) والشكل (13) أن درجة الحرارة ذات تأثير معنوي في إنتاج الحمض.

وبينت النتائج أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج الحمض هي 30 °C، وهذا توافق مع نتائج

(Singh و آخرون، 2005) ، كما توافقت هذه النتائج مع دراسات أخرى أظهرت أن الإنتاج الأعظم للحمض عند درجة حرارة 30°C من فطر *Aspergillus niger* عند استخدام المولاس كركيزة (Ahmed وآخرون، 2015). كما تتسجم هذه النتائج مع ما توصل إليه (Znad وآخرون، 2015)، حيث كان أعلى إنتاج للحمض عند هذه الدرجة، كما تقاربت النتائج مع نتائج كل من (Purane و Lohar، 2016) ونتائج (Purane و آخرون، 2012) عند دراسة إنتاج حمض الغلوكونيك من الفطر نفسه.

3.3.3 تأثير درجة الحموضة في إنتاج الحمض:

بينت النتائج في الشكل رقم (13) أن درجة الحموضة المثلى لإنتاج الحمض ضمن ظروف التجربة هي 6، كما أن درجة الحموضة ذات تأثير معنوي في إنتاج الحمض وهذا يتوافق مع ما توصل إليه (Shindia وآخرون، 2006) حين استخدموا فطر *Aspergillus niger* لإنتاج الحمض ضمن مدى pH تراوح بين 2 إلى 9 فكانت درجة الحموضة المثالية هي 6، كما تقاربت النتيجة مع نتيجة (Znad وآخرون، 2015) حيث وجدوا أن درجة الحموضة المثلى 5.5 في إنتاج الحمض.

4.3.3 تأثير مدة التحضين في إنتاج الحمض:

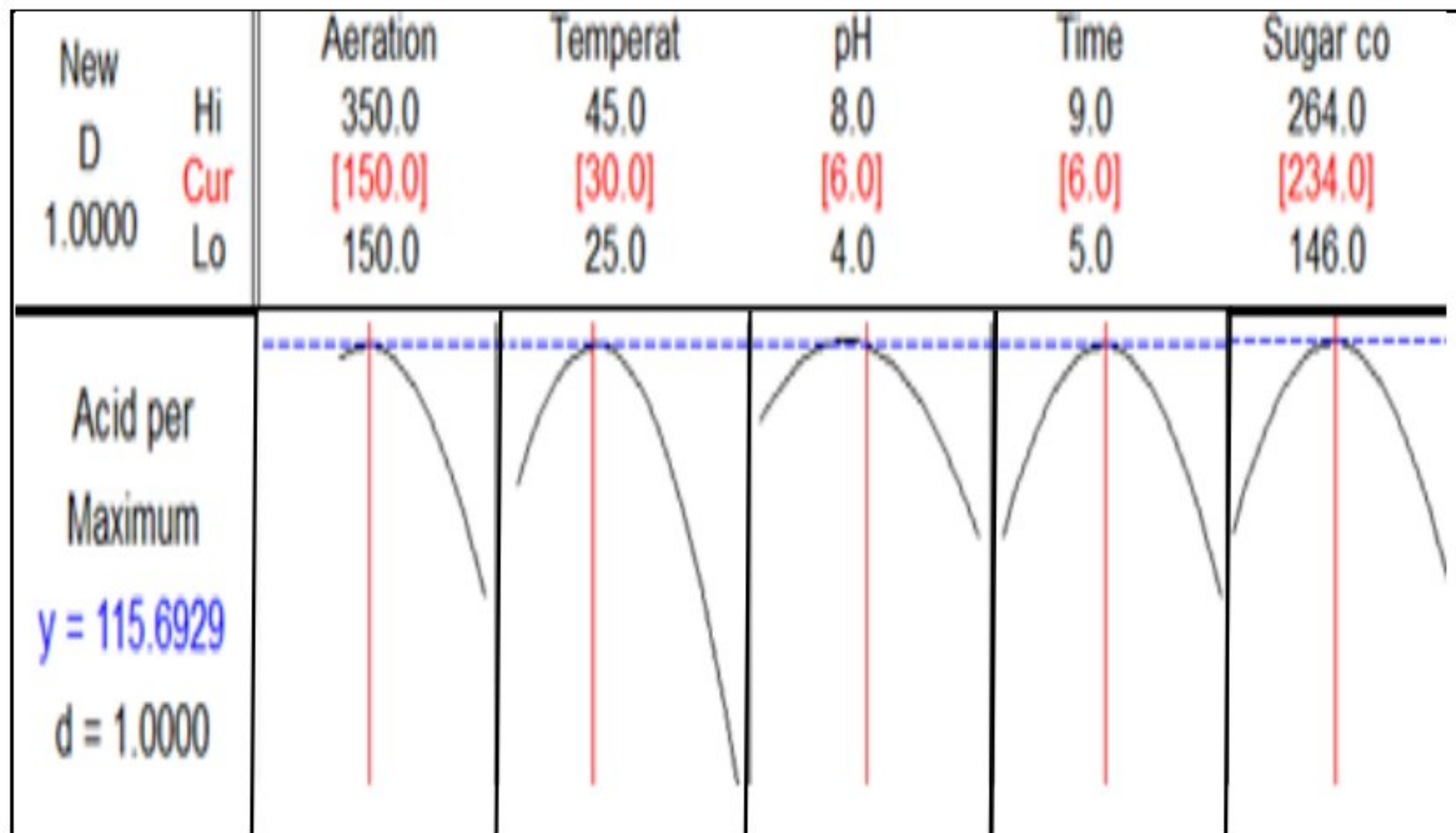
تؤثر مدة التحضين في إنتاج الحمض تأثيراً معنوياً حسب الجدول (8)، إلا أن زيادة مدة التحضين لا تؤدي إلى زيادة الإنتاج وذلك يعود إلى انخفاض كمية المواد المغذية في الوسط إضافة إلى المواد المثبطة المنتجة من الفطر نفسه. بينت النتائج أن مدة التحضين المثلى كانت 6 أيام كما هو مبين في الشكل رقم (13)، حيث توافقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه (Singh وآخرون، 2005). في حين تقاربت النتيجة مع الدراسة التي أجراها (Ahmed وآخرون، 2015)، حيث وجد أن أعلى إنتاج للحمض كان في اليوم السابع عند دراسة تأثير فترات تحضين مختلفة تراوحت بين 3-11 يوماً .

كما توصل Shindia وآخرون (2006) إلى أن أقصى إنتاج لحمض الغلوكونيك من فطر *Aspergillus niger* عند مدة تخمير 7 أيام، وذلك عند إنتاج الحمض بفترات تخمير تراوحت

من 1-12 يوم باستخدام الغلوكوز . وتعود هذه الاختلافات إلى الاختلاف في مكونات وسط التخمر واختلاف الكائن الحي المستخدم.

5.3.3 تأثير تركيز السكر في إنتاج الحمض:

الغلوكوز هو الركيزة التي يعمل عليها الغلوكوز أوكسيداز لإنتاج الحمض لذا فإن وجوده في الوسط بالتركيز المناسب ضروري لحد الفطر على الإنتاج. استخدمت تراكيز مختلفة من السكر عند دراسة الشروط المثلى لإنتاج الحمض، وكان أفضل تركيز هو (234 غ/ل سكر) كما يبين الشكل (13)، وهذا يقارب ماتوصل إليه (Singh وآخرون، 2005)، حيث بلغ أعلى إنتاج للحمض عند تركيز 250 غ/ل.



شكل رقم (13) الظروف المثلى لإنتاج الحمض

تبين مما سبق أن الظروف المثلى هي:

سرعة التهوية 150 د/د، درجة الحرارة 30°C، درجة الحموضة pH = 6، مدة التحضين 6 أيام، أما تركيز السكر 234 غ/ل سكر.

4. دراسة مردود حمض الغلوكونيك:

درس مردود الحمض من خلال تقدير نسبة السكر المستهلك وكمية الحمض الناتجة في كل معاملة،

وكانت النتائج كما هي مبينة بالجدول الآتي:

جدول رقم (10) دراسة مردود الحمض

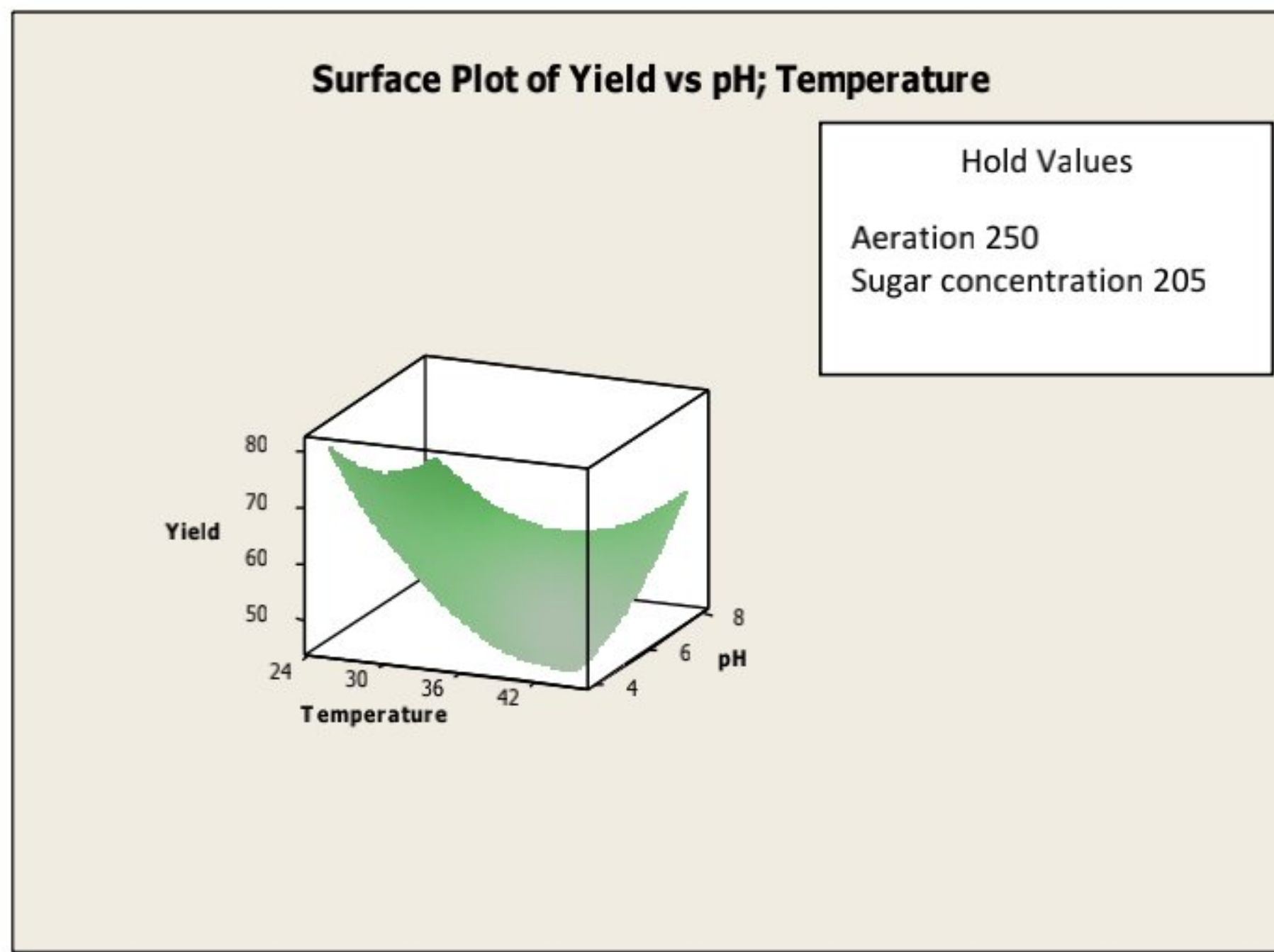
الإننتاجية غ/ل/سا	المردود غ/100غ	نسبة الحمض غ/ل	السكر المستهلك غ/ل	السكر النهائي غ/ل	السكر البدائي غ/ل	Blocks
4.57	57.4	109.7	191.08	43.75	234.84	1
3.54	54.7	85	155.2	20.9	176.13	1
3.7	55.5	88.8	159.9	16.16	176.13	1
4.14	43.6	99.5	227.8	6.95	234.84	1
3.8	60.9	92	150.9	25.191	176.13	1
4.12	45.5	98.9	217.2	17.62	234.84	1
4.45	45.7	106.8	233.6	1.189	234.84	1
3.79	53.7	91.1	169.4	6.66	176.13	1
3.75	55.2	90	168.3	7.76	176.13	1
4.49	50.5	107.8	213.1	21.71	234.84	1
4.59	50	110.2	11.3	123.48	234.84	1
3.95	56.4	94.8	167.9	8.21	176.13	1
4.39	46.4	105.5	227.3	7.46	234.84	1
4.57	77.9	109.7	140.7	35.43	176.13	1
3.87	55.2	93	168.3	7.76	176.13	1
3.54	37.3	85	227.6	7.19	234.84	1
4.57	57.2	109.9	192	13.41	205.48	1
3.5	46.7	84	179.6	25.8	205.48	1
2.25	27.1	54.2	199.8	5.65	205.48	1
3.19	40.1	76.7	190.9	14.5	205.48	1
4.33	52.1	104	199.6	5.8	205.48	1
4	52.6	97	184.5	20.9	205.48	1
4.15	55.5	99.8	200.3	5.13	205.48	1
4.12	49	98.9	70.3	135	205.48	1
2.25	38.6	54.2	140.3	6.42	146.78	1
4.77	49.5	114.5	169.6	94.52	264.19	1

1	205.48	3.63	201.7	101.6	50.3	4.23
1	205.48	3.63	201.7	101.5	50.3	4.22
1	205.48	3.63	201.7	101.6	50.3	4.23
1	205.48	3.63	201.7	101.6	50.3	4.23
1	205.48	3.63	201.7	101.4	50.2	4.22
1	205.48	3.63	201.7	101.6	50.3	4.23
2	234.84	43.75	191.08	109.3	57.2	4.55
2	176.13	20.9	155.2	85.2	54.7	3.55
2	176.13	16.16	159.9	88.5	55.34	3.68
2	234.84	6.95	227.8	99.3	43.5	4.13
2	176.13	25.19	150.9	92	60.96	3.83
2	234.84	17.62	217.2	99	45.5	4.12
2	234.84	1.18	233.6	106.5	45.5	4.43
2	176.13	6.66	169.4	91	53.7	3.79
2	176.13	125.4	109.3	90.2	82.5	3.75
2	234.84	21.71	213.1	107.5	50.4	4.47
2	234.84	123.4	111.3	110	50.2	4.58
2	176.13	8.21	176.9	94.8	56.4	3.95
2	234.84	7.46	227.3	105.4	46.3	4.39
2	176.13	35.43	140.7	109.8	78	4.57
2	176.13	7.76	168.3	93.3	55.4	3.88
2	234.84	7.19	227.6	84.9	37.3	3.53
2	205.48	13.41	192	109.9	57.2	4.57
2	205.48	25.82	179.6	84.1	46.7	3.5
2	205.48	5.65	199.8	54	27.1	2.25
2	205.48	14.5	190.9	76.6	40.1	3.19
2	205.48	5.8	199.6	104.2	52.2	4.34
2	205.48	20.9	184.5	96.9	52.5	4.03
2	205.48	5.13	200.3	100	55.3	4.16
2	205.48	135	70.3	98.7	49	4.11
2	146.78	6.42	140.3	54	38.6	2.25
2	264.19	94.52	169.6	114.5	49.6	4.77
2	205.48	3.63	201.7	101.5	50.3	4.22
2	205.48	3.63	201.7	101.6	50.3	4.23
2	205.48	3.63	201.7	101.6	50.3	4.23
2	205.48	3.63	201.7	101.5	50.3	4.22

2	205.48	3.63	201.7	101.4	50.2	4.22
2	205.48	3.63	201.7	101.6	50.3	4.23
3	234.84	43.75	191.08	109.6	57.3	4.56
3	176.13	20.9	155.2	84.9	54.7	3.53
3	176.13	16.16	159.9	88.8	55.5	3.7
3	234.84	6.95	227.8	99.7	43.7	4.15
3	176.13	25.19	150.9	92.2	61.1	3.84
3	234.84	17.62	217.2	99	45.5	4.12
3	234.84	1.18	233.6	106.6	45.6	4.44
3	176.13	6.66	169.4	91	53.7	3.79
3	176.13	125.44	109.3	90.1	82.4	3.75
3	234.84	21.71	213.1	107.7	50.5	4.48
3	234.84	123.48	111.3	110	50	4.58
3	176.13	8.21	167.9	94.8	56.4	3.95
3	234.84	7.46	227.3	105.5	46.4	4.39
3	176.13	35.43	140.7	109.6	77.8	4.56
3	176.13	7.76	168.3	93	55.2	3.87
3	234.84	7.19	227.6	85.3	37.3	3.55
3	205.48	13.41	192	110	57.2	4.5
3	205.48	25.82	179.6	84	46.7	3.5
3	205.48	5.65	199.8	54.1	27.1	2.25
3	205.48	14.5	190.9	76.5	40.1	3.18
3	205.48	5.8	199.6	104.1	52.1	4.33
3	205.48	20.9	184.5	97.2	52.6	4.05
3	205.48	5.13	200.3	99.9	55.5	4.16
3	205.48	135	70.3	99	48.9	4.12
3	146.78	6.42	140.3	54	38	2.25
3	205.48	94.52	169.6	114.3	49.5	4.76
3	205.48	3.63	201.7	101.5	50.3	4.22
3	205.48	3.63	201.7	101.4	50.2	4.22
3	205.48	3.63	201.7	101.5	50.3	4.22
3	205.48	3.63	201.7	101.6	50.3	4.23
3	205.48	3.63	201.7	101.6	50.3	4.23
3	205.48	3.63	201.7	101.4	50.2	4.22

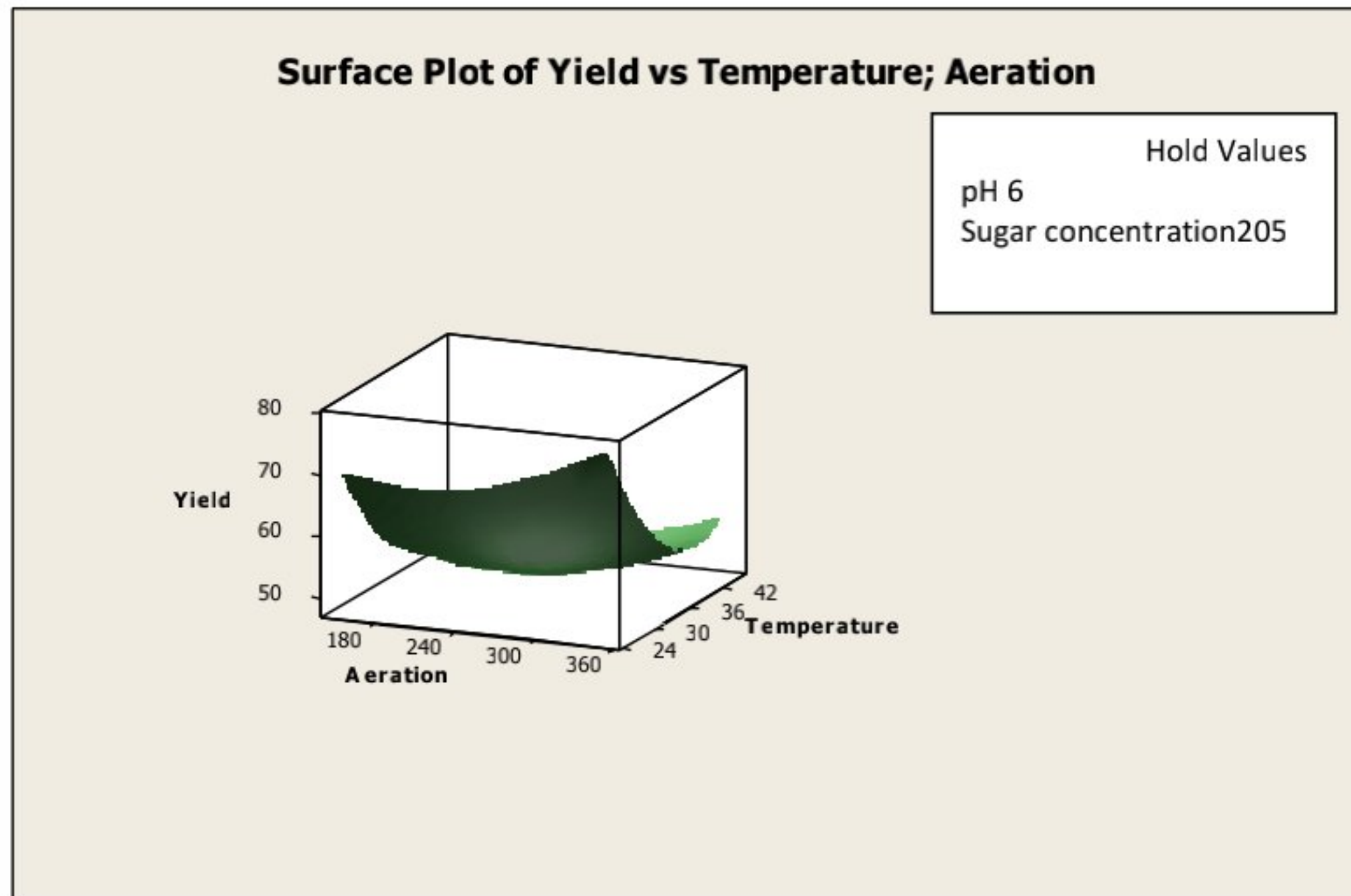
1.4 تأثير المتغيرات في مردود حمض الغلوكونيك:

يبين الشكل (14) تأثير اثنين من المتغيرات (pH ودرجة الحرارة) في مردود الحمض المنتج مع تثبيت العوامل الأخرى عند القيم المثلى، حيث يلاحظ من الشكل أن المردود يتأثر بارتفاع درجة الحموضة pH نظراً لأن تأثيرها معنوي، وبلغ المردود أعلى قيمة عند $\text{pH} = 6$ ، كما تأثر المردود بدرجة الحرارة حيث بلغ أعلى قيمة عند الدرجة 30°C ، وكانت العلاقة مابين درجة الحرارة ودرجة الحموضة معنوية في إنتاج الحمض.



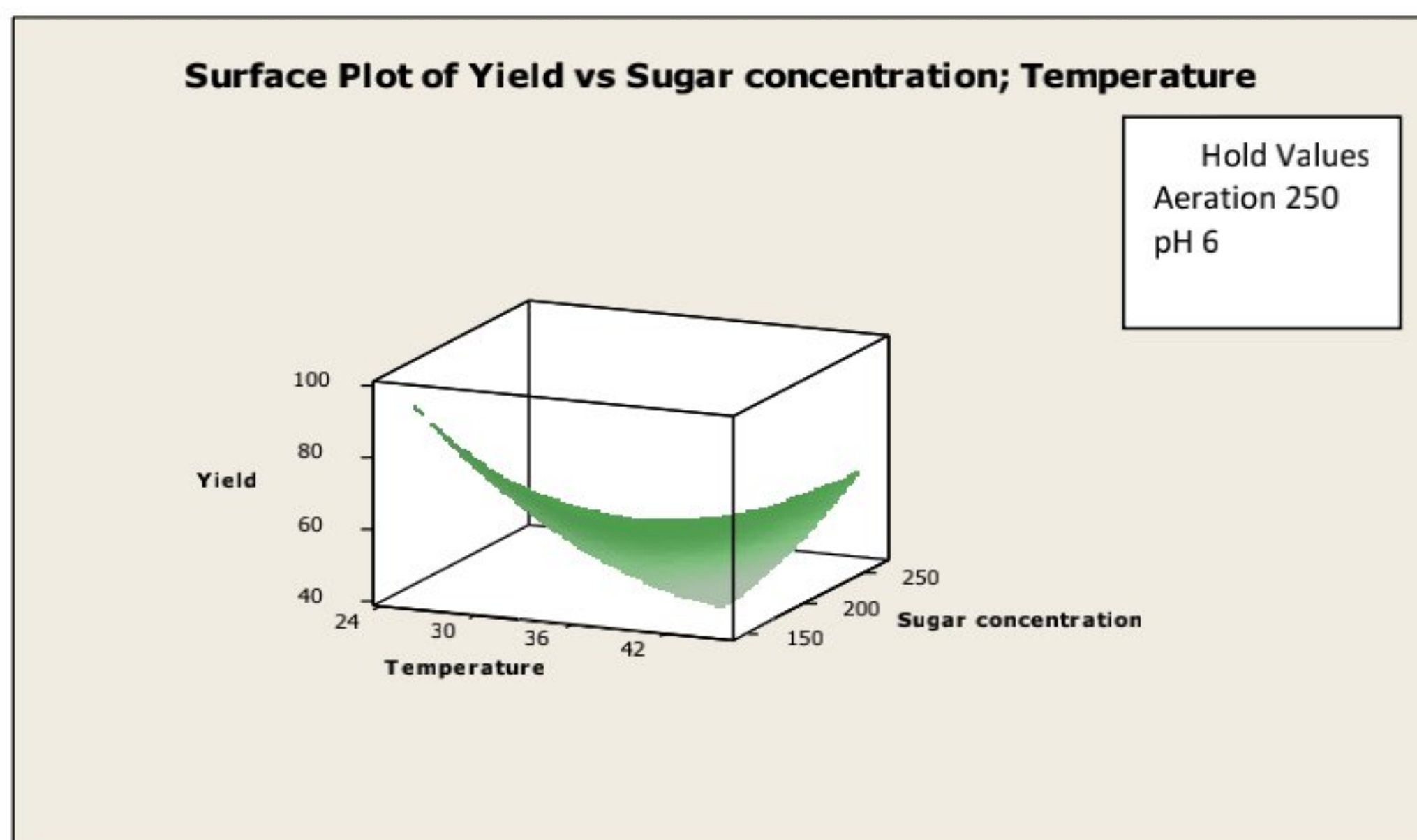
الشكل (14) : تأثير pH ودرجة الحرارة في مردود الحمض المنتج

يبين الشكل (15) تأثير اثنين من المتغيرات (درجة الحرارة والتهوية) في مردود الحمض المنتج مع تثبيت العوامل الأخرى عند القيم المثلى، حيث يلاحظ من الشكل أن أعلى قيمة للمردود كانت عند سرعة تهوية 150 د/د، كما يزداد المردود بازدياد درجة الحرارة ليصل إلى أعلى قيمة له عند 30°C ، وكانت العلاقة مابين درجة الحرارة والتهوية معنوية.



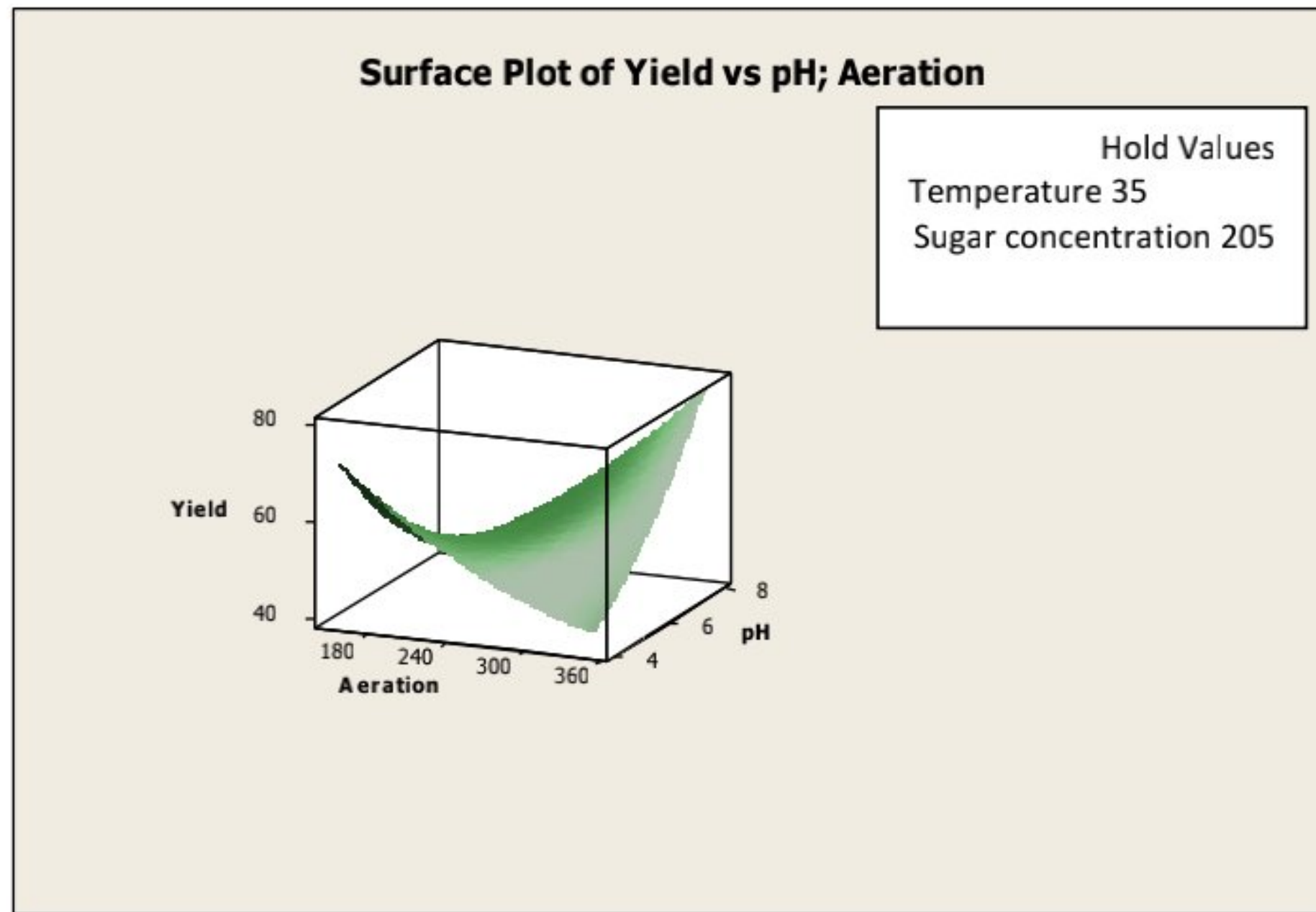
الشكل (15) : تأثير التهوية ودرجة الحرارة في مردود الحمض المنتج

يبين الشكل (16) تأثير اثنين من المتغيرات (درجة الحرارة وتركيز السكر) في مردود الحمض المنتج مع تثبيت العوامل الأخرى عند القيم المثلى، حيث يلاحظ من الشكل ازدياد قيمة المردود بازدياد تركيز السكر في وسط التخمر ليصل لأعلى قيمة عند تركيز 234 غ/ل سكر، ومن ثم يبدأ بالانخفاض، كما يزداد المردود بازدياد درجة الحرارة ليصل إلى أعلى قيمة له عند 30°C، وكانت العلاقة ما بين درجة الحرارة والتهوية معنوية.



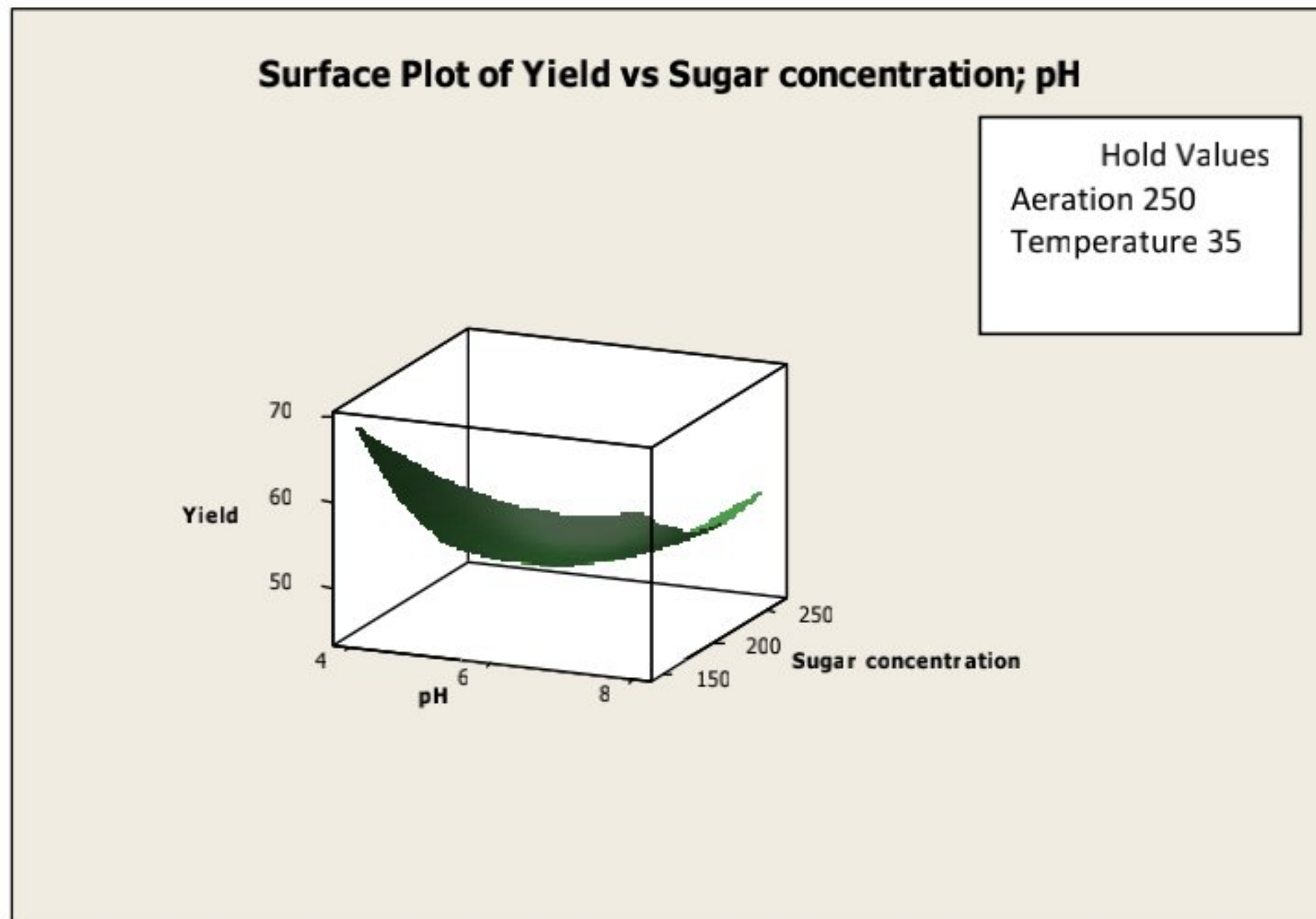
الشكل (16) : تأثير تركيز السكر ودرجة الحرارة في مردود الحمض المنتج

يبين الشكل (17) تأثير اثنين من المتغيرات (التهوية و pH) في مردود الحمض المنتج مع تثبيت العوامل الأخرى عند القيم المثلى، حيث يلاحظ من الشكل أن المردود يتأثر بارتفاع درجة الحموضة pH نظراً لأن تأثيرها معنوي، وبلغ أعلى قيمة له عند $pH = 6$ ، كما يلاحظ أن أعلى قيمة للمردود كانت عند سرعة تهوية 150 د/د، وكانت العلاقة مابين pH والتهوية معنوية.



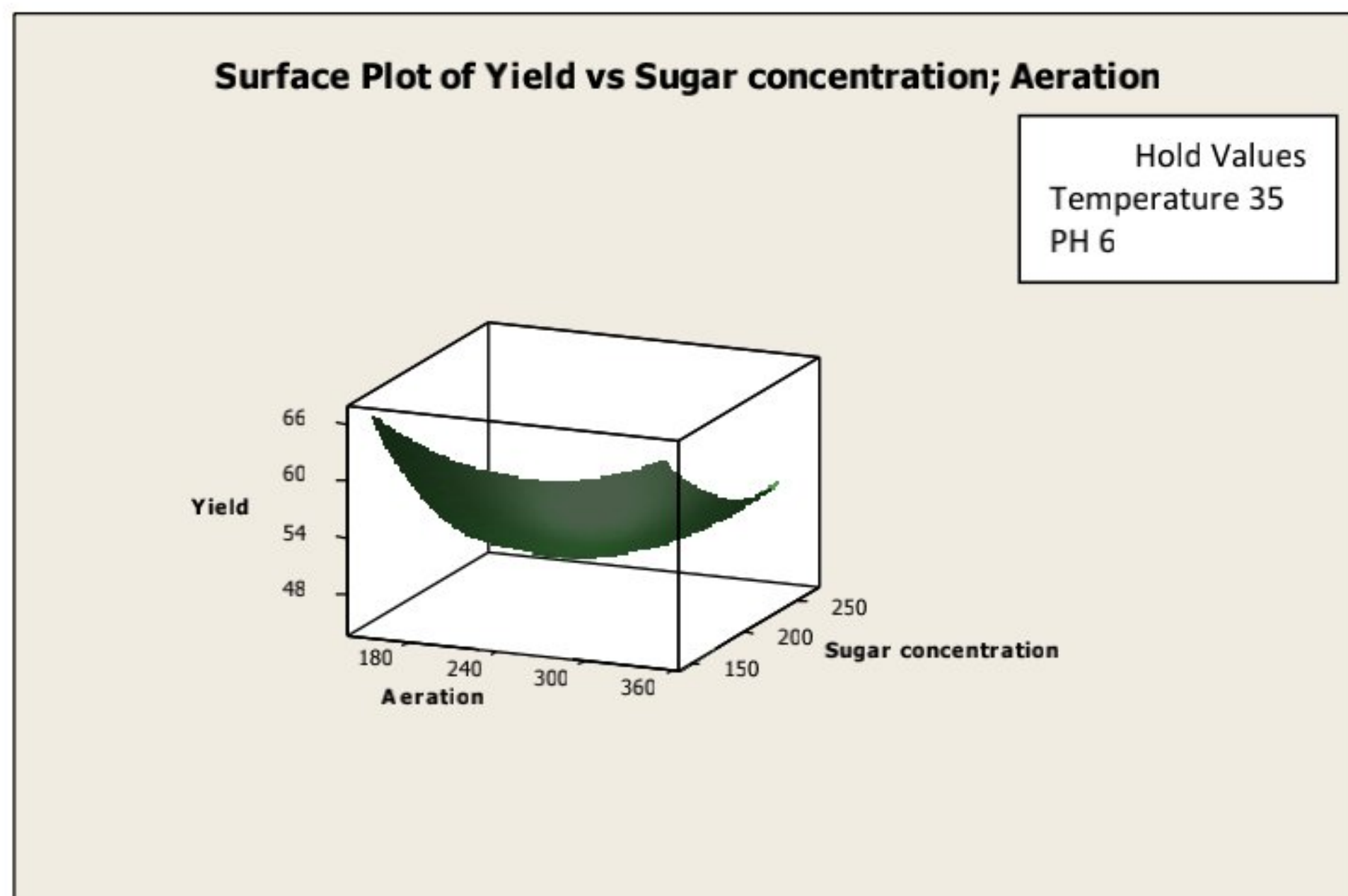
الشكل (17) : تأثير التهوية و pH في مردود الحمض المنتج

يبين الشكل (18) تأثير اثنين من المتغيرات (pH وتركيز السكر) في مردود الحمض المنتج مع تثبيت العوامل الأخرى عند القيم المثلى، حيث يلاحظ من الشكل ازدياد قيمة المردود بازدياد تركيز السكر في وسط التخمر ليصل إلى أعلى قيمة عند تركيز 234 غ/ل سكر، ومن ثم يبدأ بالانخفاض، كما يزداد المردود بازدياد pH ليصل إلى أعلى قيمة له عند $pH = 6$ ، وكانت العلاقة مابين pH وتركيز السكر معنوية.



الشكل (18) : تأثير تركيز السكر و pH في مردود الحمض المنتج

يبين الشكل (19) تأثير اثنين من المتغيرات (تركيز السكر والتهوية) في مردود الحمض المنتج مع تثبيت العوامل الأخرى عند القيم المثلى، حيث يلاحظ من الشكل ازدياد قيمة المردود بازدياد تركيز السكر في وسط التخمر ليصل إلى أعلى قيمة له عند تركيز 234 غ/ل سكر، ومن ثم يبدأ المردود بالانخفاض، كما يلاحظ من الشكل أن المردود يكون أعلى ما يمكن عند سرعة تهوية 150 د/د، وكانت العلاقة ما بين تركيز السكر والتهوية معنوية.



الشكل (19) : تأثير تركيز السكر و التهوية في مردود الحمض المنتج

5. تطبيق الظروف المثلى باستخدام المخمر على المولاس وتقل العنب

والمقارنة بين الركيزتين:

طبقت الظروف المثلى لإنتاج الحمض على المولاس وتقل العنب باستخدام المخمر الرباعي بثلاثة

مكررات، وكانت النتائج كما في الجدول الآتي :

جدول رقم(11) تطبيق الظروف المثلى على المخمر الرباعي للمولاس وتقل العنب

الركيزة	تركيز الحمض غ/ل			متوسط المكررات
	المكرر الأول	المكرر الثاني	المكرر الثالث	
المولاس	107,83	105,7	101,68	$105.07^{a \pm 3.12}$
تقل العنب مع السكر	197,16	190,9	193,9	$193.9^{b \pm 3.13}$
تقل العنب دون السكر	116	114,1	115,1	$115.06^{c \pm 0.95}$

نلاحظ من الجدول (11) وجود فروق معنوية بين الركائز، حيث بينت النتائج أنه يمكن الاعتماد

على تقل العنب لإنتاج حمض الغلوكونيك حيث كانت كمية الحمض 115.06 غ/ل، كما بينت أنه

يمكن زيادة الحمض المتشكل عند رفع تركيز السكر مع تقل العنب.

كما تفوق تقل العنب على المولاس من حيث كمية الحمض المتشكل. توافقت هذه النتيجة مع

ماتوصل إليه (Singh وآخرون، 2005)، حيث بلغ إنتاج الحمض عند استخدام تقل العنب

73.2 غ/ل في حين كان 12 غ/ل عند استخدام المولاس.

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusion And Recommendations

الاستنتاجات:

- 1- القدرة العالية لعزلات فطر *Aspergillus niger* على إنتاج حمض الغلوكونيك.
- 2- تفوق العزلة An6 بإنتاج الحمض عن باقي العزلات حيث بلغ الإنتاج 122.3 غ/ل.
- 3- الظروف المثلى لإنتاج الحمض كانت عند سرعة الدوران 150 دورة/د - درجة الحرارة 30°C - درجة حموضة pH 6 - تركيز السكر 234 غ/ل سكر - مدة التحضين 6 أيام.
- 4- يمكن الاعتماد اعتماداً أساسياً على المولاس في إنتاج حمض الغلوكونيك بسبب غناه بالآزوت والعناصر المغذية.
- 5- أظهرت النتائج إمكانية الاعتماد على نقل العنب لإنتاج حمض الغلوكونيك، حيث أظهر كفاءة عالية مقارنة مع المولاس.

التوصيات:

- 1- العمل على إنتاج حمض الغلوكونيك باستخدام ركائز أخرى من المخلفات الزراعية والصناعية التي تشكل عبئاً على البيئة وبالتالي الاستفادة منها .
- 2- العمل على إنتاج حمض الغلوكونيك على مستوى صناعي لما له من استخدامات مهمة في العديد من المجالات.
- 3- العمل على تطوير قدرة العزلات على إنتاج الحمض بالتطهير.
- 4- العمل على تنقية الحمض لجعله متاحاً للاستخدام في المجالات الغذائية والصيدلانية.

المراجع

References

المراجع العربية:

- الرحمة، عبد الله بن ناصر. (1998). أساسيات علم الفطريات. كلية العلوم. جامعة الملك سعود.
- الشحات، محمد رمضان طه، راوية جمال فتحي. (2005). ميكروبيولوجيا التخمرات. دار الفكر العربي. القاهرة. ص: 99-100.
- عمر، عادل (2006). إنتاج أنزيمات الأميلاز من الفطريات وتنقيتها واستعمالها في بعض المجالات التطبيقية. أطروحة دكتوراه في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سوريا.
- طحلة، محمد خير والمصري سليمان. (1992/1993). تكنولوجيا وكيمياء السكر. منشورات جامعة دمشق.

- Ahmed, A. S., Farag, S. S., Hany, A., and Botros, W. (2015). **Production of gluconic acid by using some irradiated microorganisms**, J. Journal of Radiation Research and Applied Sciences. 8 :374-380.
- Anastassiadis, S., Aivasidis, A., Wandrey, C. (2003). **Continuous gluconic acid production by isolated yeast-like mould strains of Aureobasidium pullulans**. Applied Microbiology Biotechnology. 61, 110–117.
- Anastassiadis, S., Aivasidis, A., Wandrey, C., and Rehm, H.J. (2005). **Process optimization of continuous gluconic acid fermentation by isolated yeast-like strains of Aureobasidium pullulans**, Biotechnol. Bioeng. 91 :494–501.
- Amberkar, S., Thadani, B., and Doctor, Y. M. (1965). **Production of calcium gluconate by Penicillium chrysogenum**. submerged culture. 13, 731.
- Bartens, A. (2005). **International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis Methods Book**. Dr. Albert Bartens KG, Berlin, 431.
- Bekers, M., Vigants, A., Laukevics, J., Toma, M., Rapoport, A. and Zikmanis, P. (2000). **The effect of osmo-induced stress on product formation by Zymomonas mobilis on sucrose**. International Journal of Food Microbiology 55, 147–150.
- Bennett, J.W. (2010). **Aspergillus: Molecular Biology and Genomics**. Caister Academic Press.
- Belén, M., José, S., Manuel, Noelia, R., Sandra, C., Attilio, C., José Manuel, D. (2010). **Biotechnological production of citric acid**. Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology. 41 (4): 862–875.
- Botros, H. W., Ahmed, A. S., Farag, S. S. and Hassan, I. (2012). **Study on ethanol production from sugar cane molasses by using irradiated Saccharomyces cerevisiae**. Isotope and Radiation Research, 44(3), 711.
- Borzani, W. (2001). **Variation of the ethanol yield during the oscillatory concentrations changes in undisturbed continuous ethanol fermentation of sugarcane blackstrap molasses**. World. J. Microbiol. Biotechnol, 17, 253-258.

- Cañete-Rodríguez, M., Santos-Dueñas, M., Jiménez-Hornero, E., Ehrenreich, A., Liebl, W., García-García, I. (2016). **Gluconic acid: Properties, production methods and applications—An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste biovalorization**, Process Biochemistry 51, 1891–1903
- Cazetta, M., Celligoi, M., Buzato, J., Scarmino, I. (2007). **Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production**. Bioresource Technology, 98, 2824–2828.
- Climent, M.J., Corma, A., and Iborra, S. (2011). **Converting carbohydrates to bulk chemicals and fine chemicals over heterogeneous catalysts**, Green Chem. 13:520–540.
- Davis, L., Jeon, Y., Svenson, C., Rogers, P., Pearce, J. & Peiris, P., (2006). **Evaluation of *Zymomonas mobilis* -based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream**. Biomass and bioenergy, 30, 809–814.
- Fatmawati, A., Rudy, A., and Lindawati. (2009). **Kinetic Study of Gluconic Acid Batch Fermentation by *Aspergillus niger***, World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Chemical and Molecular Engineering, Vol:3, No:9
- Food Chemicals Codex. (2010). **Seventh ed.**, United Book Press Inc., Baltimore, MD United States.
- Gullo, M., Giudici, P. (2008). **Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: phenotypic traits relevant for starter cultures selection**, Int. J. Food Microbiol. 125, 46–53.
- Gullo, M., Verzelloni, E., Canonico, M. (2014). **Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: process and biotechnology aspects**, Process Biochem. 49, 1571–1579.
- Hayer, K. (2014). **Germination of *Aspergillus niger* conidia**. PhD thesis, University of Nottingham.
- Herrick, T., Ma, E. (1928). **The production of gluconic acid by the *Penicillium luteum-purpureum* group: Some optimal conditions for acid formation**. J. Biol. Chem., 77:185–195.

- Hinkova, A., Bubnik, Z. (2001). **Sugar beet as a raw material for bioethanol production**. Czech journal of food sciences, 19, 224-234.
- Hustede ,H., Haberstroh, H.J., and Schinzig, E. (2012).**Gluconic acid** **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, vol. 17, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 37–44.
- Ikeda, Y., Park, E.Y. , Okuda, N. (2006). **Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger***, Bioresour. Technol. 97 1030–1035.
- Karaffa, L., Kubicek, CP.(2003).***Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box?**, Appl Microbiol Biotechnol, 61(3):189-96.
- Kiss, M., Venyige, T., Stefanovits-Banyai, E., Sisak, C. and Boross, L., (1999). **Extractive fermentation of ethanol using alginate gel co-entrapped yeast cells (*Saccharomyces bayanus*) and lipase enzyme**. Acta alimentaria, 28, 49-57.
- Kundu ,P. and Das, A.(1984). **Utilization of cheap carbohydrate sources for calcium gluconate production by *Penicillium funiculosum* mutant MN 238**. Indian Journal of Experimental Biology 22,279–281.
- Latge J-P. (1999). ***Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis**. Clinical Reviews. 12 (2): 310–350.
- Machado,C.M., Oishi,B. O., Pandey, A. and Soccol,C.R.(2004).**Kinetics of *Gibberella fujikori* Growth and Gibberellic Acid Production by Solid State Fermentation in a Packed-Bed Column Bioreactor**. Biotechnology Progress, 20,1449-1453.
- Milsom ,P. and Meers, J.L.(1985).**Gluconic and itaconic acids**, in: **M. Moo-Young (Ed.)**, Comprehensive Biotechnology: the Principles, Applications, and Regulation of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine, vol.3, Pergamon Press, Oxford, pp.672–700.
- Murtagh, T.E .(1999). **Molasses as a feedstock for alcohol production**. In K.A. Jacques, T.P. Lyons & D.R. Kelsall (eds.) *The Alcohol Textbook*. 2nd edition ed. London: Nottingham University Press.

- Navaratnam, P., Arasaratnam, V., Balasubramaniam, K. (2000). **Influence of Different Nitrogen Sources on Citric Acid Production from Surface Culture of *Aspergillus niger***. Malaysian journal of Biochemistry and Molecular Biology, 5:1–4.
- Pandey, P., Putatunda, S., Dewangan, L., Pawar, V.S., Belorkar, S.A. (2013). **Studies on citric acid production by *Aspergillus niger* in batch fermentation**. Recent Research in Science and Technology, 5(2):66–67.
- Piggot, R. (2005). **Treatment and fermentation of molasses when making rum-type spirits**. The Alcohol Textbook. London: Nottingham University Press.
- Purane, N.K., K. Sharma, Sh., Salunkhe, P.D., Labade, D. S. and Tondlikar, M. (2012). **Gluconic Acid Production Syrup by *Aspergillus niger* Strain Using Semiautomatic Stirred-Tank Fermenter**. Microbial & Biochemical Technology, (4): 092-095.
- Purane, N. K. and Lohar, P.S. (2016). **Evaluation of Potential Activity of Fungi Isolated from Bagasse for Gluconic Acid Production**. International Journal for Innovative Research in Science & Technology. Vol: 2.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A. and Larroche C. (2006). **Gluconic acid: properties, applications and microbial production**. Food Technol. Biotechnol. 44 :185–195.
- Roukas, T. (2000). **Citric acid gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 25, 298–304.
- Rodriguez Couto, S. and Sanroman, M.A. (2005). **Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production**. Biochemical Engineering Journal, 22, 211-219.
- Robinson, T., Singh, D. and Nigam, P. (2001). **Solid-state Fermentation: a Promising Microbial Technology for Secondary Metabolite Production**. Applied Microbiology and Biotechnology, 55 284-289.
- Roehr, M., Kubicek C.P., Kominek, J. (2001). **Gluconic acid**, in: H.J. Rehm, G. Reed (Eds.), Biotechnology Set, second ed., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp. 347–362.

- Roehr, M., Kubicek, CP., Kominek, J. (1996). **Gluconic acid**. In: Rehm HJ, Reed G (eds). Biotechnology, product of Primary Metabolism, vol. 6. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 347–362
- Rohr M, Kubicek CP, Kominek J. (1983) .**Citric acid, gluconic acid**. In: Rehm HJ, Reed G (eds). Biotechnology, vol. 3. Verlag Chemie, Weinheim, pp 420–465.
- Rogers, P. , Chen, J.S. and Zidwick, M.J. (2006). **Organic acids and solvent production**. Part I: Acetic, lactic, gluconic succinic and polyhydroxyalkanoic acids, in: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria. Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology, vol 1, third ed., Springer, New York, pp. 511–755.
- Samson, R.A., Houbraken, J., Summerbell, RC., Flannigan, B., Miller, JD. (2001). **Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments**. Microorganisms in Home and Indoor Work Environments. CRC. pp. 287–292.
- Schuster, E., Dunn–Coleman, N., Frisvad, J.C., Van Dijck, P.W. (2002). **On the safety of *Aspergillus niger*—A review**. Applied Microbiology Biotechnology, 59: 426–435.
- Shindia, A. A., El-Sherbeny, G. A. , El-Esawy, A. E. and Sherif Y. M. M. (2006). **Production of Gluconic Acid by Some Local Fungi**, Mycobiology 34(1): 22-29.
- Singh ,O.V. and Kumar, R. (2007). **Biotechnological production of gluconic acid: future implications**, Appl. Microbiol. Biotechnol. 75 :713–722.
- Singh ,O.V. , Kapur, N. and Singh R.P. (2005). **Evaluation of agro-food byproducts for gluconic acid production by *Aspergillus niger* ORS-4.410**, World J. Microbiol. Biotechnol. 21:519–524.
- Wang, L.H., Hsie, M.C., Chang, Y.C., Kuo, S.L., Sang, K. and Hsiao, H.D., (1985). **Improvement of ethanol productivity from cane molasses by a process using a high yeast cell concentration**. J. Bioengin., 28, 270-284.

- Wester, J., Weber, R. W.S.(2007). **Introduction to Fungi**. In: Published in the United States of America by Cambridge University Press, New York, Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Znad ,H. , Markoš, J. and Baleš, V.(2004). **Production of gluconic acid from glucose by Aspergillus niger: growth and non-growth condition Process** .Biochemistry, 39: 1341–1345.

الملحق



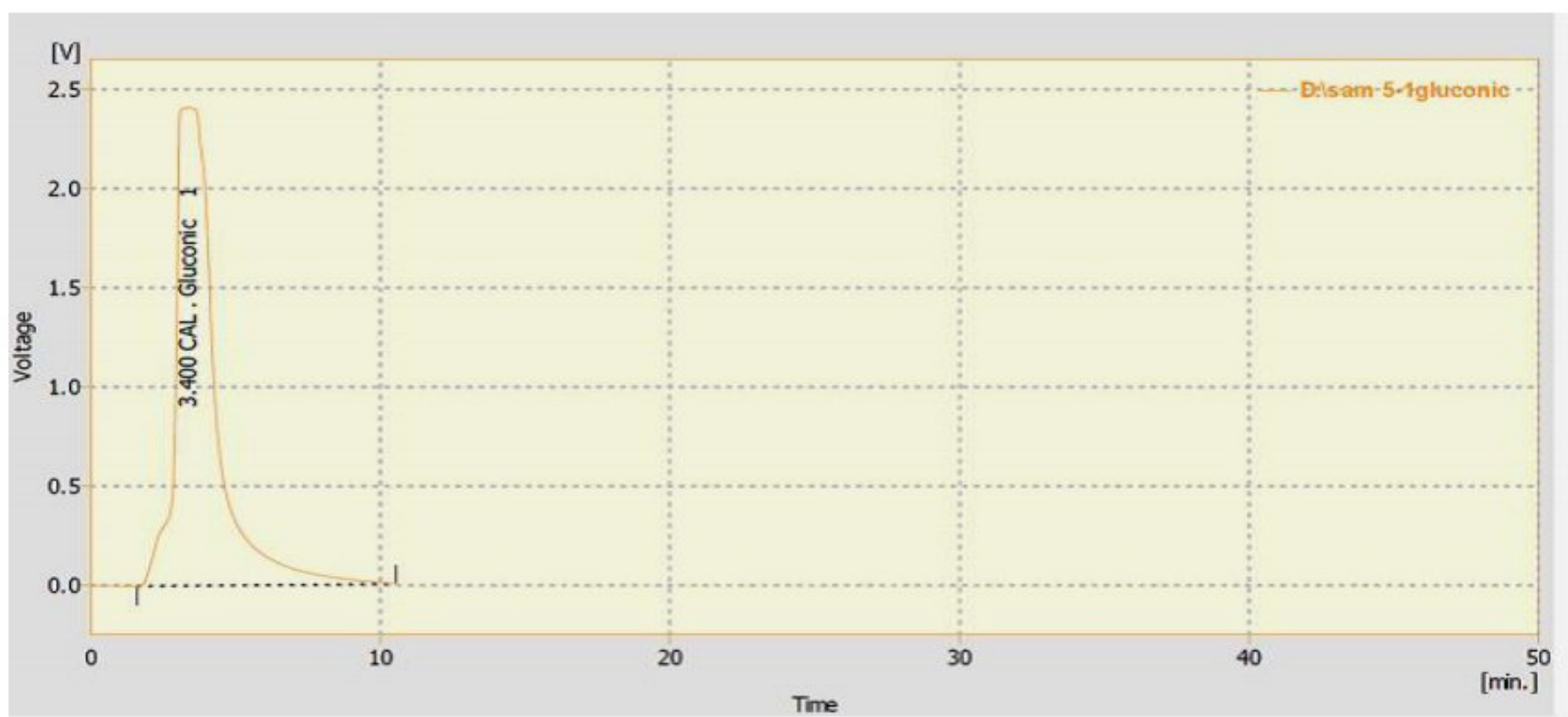
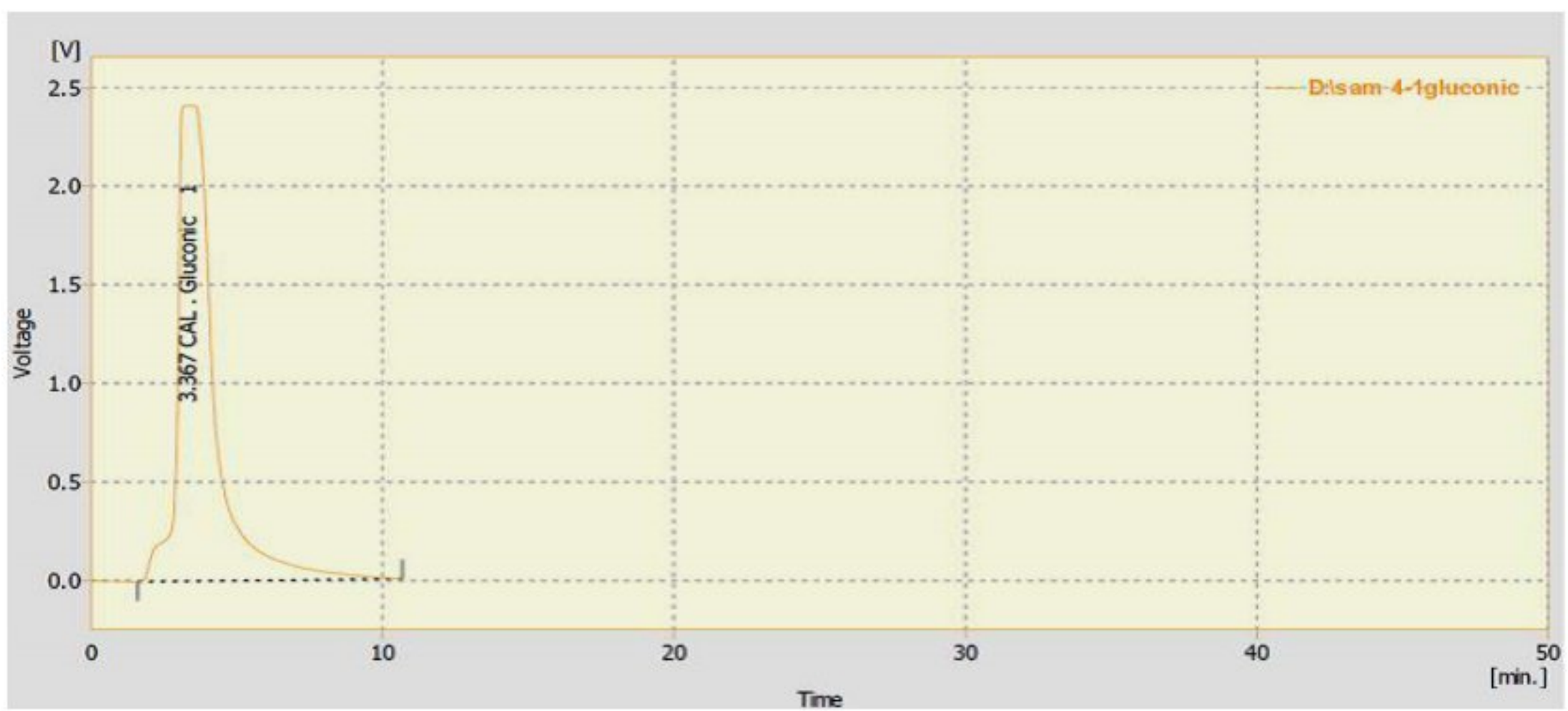
دوارق التخمر



جهاز Hplc



جهاز التراسونيك



شكل الكروماتوغرام لتحليل العينات على جهاز Hplc

ABSTRACT

20 isolates of *Aspergillus niger* Taken from The National Commission for Biotechnology were screened using molass 24 brix (176 g/l sugar) at a temperature 30° C, pH 6, Aeration 200 rpm for 7 days to identify their ability to produce Gluconic Acid .Then, the acid production was estimated with the HPLC. The results showed the 10 isolates have the ability to produce the acid and the most productive isolate was (An6) Where the acid concentration reached 122.3 g / l.

The optimization of production conditions for acid production were determined by the liquid method using a molasses substrate using the Optimization Method Minitab statistical analysis program, and the optimal parameters were: aeration speed of 150 rpm - pH: 6- temperature: 30°C - Sugar concentration 234 g / l sugar - incubation time: 6 days.

Grape- must added glucose to reach the optimum concentration substrate exhibited a higher efficiency comparing with grape- must without added sugar glucose and molass for gluconic acid production. The study showed there were significant differences between the substrates, the average acid concentration was 193.9 g/l when using grape- must after adding glucose sugar, and 115.06 g/l when using grape- must without adding sugar, while its average concentration was 105.07 g/l when using molass

Keywords: Gluconic acid , *Aspergillus niger* ,liquid fermentation method ,

HPLC



Syrian Arab Republic
Damascus University
Faculty Agricultural
Department Food Science

**Production of Gluconic Acid From Local Isolates Of
Aspergillus niger Fungus Using Molass and Grape- must**

**A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for
the degree of master in Food Science Section**

Prepared by

SHaimaa Ibraheem Wadi

Supervisor

Dr. Sabah Yazgi

Prof. in Food Science
Faculty of Agriculture
Damascus University

Co-Supervisor

Dr. Nsreen Naksho

Prof. in National Commission for
Biotechnology

2022