جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم علوم الأغذية

الإستفادة من مخلفات معامل الألبان في إنتاج حمض السيترك والغاز الحيوي

رسالة جامعية أعدت لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية
(علوم الأغذية)

إعداد المهندس الزراعي
محمد أحمد النصار

بإشـــــراف

الدكتور أنطون طيفور
أستاذ في قسم علوم الأغذية
كلية الزراعة – جامعة دمشق

الدكتور صياح أبوغزة
أستاذ في قسم علوم الأغذية
كلية الزراعة – جامعة دمشق

2016 م

الإهداء

إلى المعلم الأول ونور القلوب وهادي الأمم ومنقذ البشرية

نبينا محمد صلى الله عليه وسلم

إلى من ربياني صغيرا" وعلماني كبيرا" وبذلوا النفيس والغالي

أبي الشهيد وأمي الغالية

إلى من زرع فينا حب الخير ومحبته لاتزال في قلوبنا

أخي الشهيد المهندس عمر

إلى من عشت معهم أحلى أيام حياتي وكانوا خير سند لي

أخوتي وأخواتي

إلى من شاركتني الحياة بحلوها ومرها وكانت خير ملجأ لي

زوجتي

إلى مستقبلي المشرق وورود قلبي وبراعم بستاني ورياحين حديقتي

أولادي أحمد و بشار و راما و عمر

إلى جميع أصدقائي .....

جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم علوم الأغذية

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة هو نتيجة بحث قام به المهندس محمد أحمد النصار تحت إشراف الدكتور أنطون طيفور والدكتور صياح أبوغرة في قسم علوم الأغذية في كلية الهندسة الزراعية بجامعة دمشق ,وأي بحث أخر في هذا الموضوع موثق في النص.

المرشح	المشرف العلمي	المشرف العلمي المشارك
محمد أحمد النصار	**أ.د. أنطون طيفور**	**أ.د.صياح أبو غرة**

تصريح

أصرح بأن هذا البحث **(الإستفادة من مخلفات معامل الألبان في إنتاج حمض السيترك والغاز الحيوي)** لم يسبق أن قبل للحصول ولا هو مقدم حاليا" للحصول على شهادة أخرى.

تاريخ 2016/6/21

المرشح

محمد أحمد النصار

Damascus University
Agriculture Institute
Food Science Department

CERTIFICATE

It is here by certified that the work described in this thesis is the result of the author,s own investigation under the supervisions of Dr Antoine Tayfour and Dr sheah Abo Ghorrah from department of food science, Institute of Agriculture, Damascus University, and any reference to other researchers work has been acknowledged in the text**.**

Candidate
Mohamad Alnassar

Supervisor ***Co advisor***
Prof.Dr. Antoine Tayfour ***Prof.Dr. sayah Abou Ghorrah***

DECLARATION

It is here by declare that this work **(Utilization of the dairy factories wastes in production citric acid and biogas)** in my own work and has not been accepted,nor submitted for any other degree.

Date:21/6/2016

Candidate
Mohamad Alnassar

شكر وتقدير

تعجز الكلمة أحيانا" عن التعبير ونقل المشاعر ولكن لا بد من الكلمة, ولاسيما كلمة الشكر لأن فيها عرفان بالجميل ورقي بالتعامل ودفع إلى العطاء.

أتقدم بخالص الشكر والإمتنان للسيد الأستاذ الدكتور أنطون طيفور والسيد الأستاذ الدكتور صياح أبوغرة لتفضلهما بالإشراف على هذا البحث لما قدما لي من يد مساعدة ودعم معنوي وللجهود التي بذلوها لإنجاح هذا البحث ولتواجدهم إلى جانبي في كل مراحل العمل, ولملاحظاتهم القيمة وأرائهم السديدة.

وأتوجه بالشكر والتقدير الكبير لكل أساتذتي في كلية الزراعة بجامعة دمشق وفي قسم علوم الأغذية, وللدكتور رأفت العفيف لملاحظاته القيمة ورأيه السديد لإنجاح هذا العمل.

المهندس محمد أحمد النصار

محتويات الرسالة(الفهرس)

العنوان رقم الصفحة

1-المقدمة.....1
2-الدراسة المرجعة.....3
أولا"-إنتاج حمض الليمون:.....3
2-1-1-مصل الجبن والتلوث البيئي.....3
2-1-2-طرائق معالجة المصل.....4
2-1-3-حمض الليمون وأهميته الصناعية.....5
2-1-4-إنتاج حمض الليمون.....6
2-1-5-الإنتاج الحيوي لحمض الليمون.....8
2-1-6-العوامل المؤثرة في إنتاج حمض الليمون من الفطر الأسود.....9
2-1-7-العناصرالغذائية اللازمة لعمليات إنتاج حمض الليمون حيويا"من الفطر الأسود.13
2-1-8-طرائق التخمير لإنتاج حمض الليمون صناعيا"..... 17
ثانيا"-الطاقة البديلة والغاز الحيوي.....20
2-2-1- الطاقة البديلة.....20
2-2-2- طاقة الكتلة الحيوية.....20
2-2-3-إنتاج الغاز الحيوي من مصل الجبن.....23
2-2-4- تقانة إنتاج الغاز الحيوي.....23
2-2-5- التخمر اللاهوائي.....24
2-2-6-مراحل التخمر اللاهوائي.....24
2-2-7-الأحياء الدقيقة المشاركة في إنتاج الميثان.....27
2-2-8-العوامل المؤثرة في عملية الهضم اللاهوائي.....27
3-مواد وطرائق البحث.....35
3-1-إنتاج حمض الليمون.....35
3-1-1-موادالبحث.....35
3-1-2-الأجهزة المستخدمة في هذا البحث.....35
3-1-3-طرائق العمل.....35
1"-تقدير التركيب الكيميائي للسكروز.....35
2"-الإختبارات الكيميائية لمصل الجبن.....35

3"- أوساط الزرع المستخدمة في تخمير مصل الجبن.....36
4"-دراسةتأثير المكملات الغذائية ودرجة PHالوسط مصل الجبن في إنتاج حمض الليمون37
5"-تعقـــــــ

4-1-9-تأثيرحديدي سيانيد البوتاسيوم في إنتاج حمض الليمون بوساطة سلالة الفطر.61
4-1-10-تأثيركبريتات التوتياء في إنتاج حمض الليمون بوساطة سلالة الفطرالمنتخبة65
4-1-11-تأثيردرجات الحموضة في إنتاج حمض الليمون بوساطة سلالة الفطر المنتخبة.....69
4-1-12-تأثيركلورالصوديوم في إنتاج حمض الليمون بوساطة سلالة الفطر المنتخبة.71
4-1-13-دراسةإنتاج حمض الليمون باستعمال وسط مصل الجبن بالطريقة العميقة....74
ثانيا"-إنتاج الغاز الحيوي.....77
4-2-1-نتائج التركيب الكيميائي العينات.....77
4-2-2-الهضم اللاهوائي لمصل الجبن قبل وبعد فصل البروتين في مجال الحرارة37°م.....78
4-2-2-تأثير التخمر المشترك على إنتاج الغاز الحيوي ونوعيته في مجال الحرارة37°م.....82
الإستنتاجات.....85
التوصيات والمقترحات.....86
المراجع.....87
1-المراجع العربية.....87
2-المراجع الإنكليزية.....89

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
1	التركيب الكيميائي للمصل الحامضي والمصل الحلو	4
2	أهم الدول المنتجة لحمض الليمون	7
3	المقارنة بين التخمر اللاهوائي والتخمر الهوائي	25
4	مقارنة بين عملية التخمر اللاهوائي في درجة الحرارة المرتفعة وفي درجة الحرارة المعتدلة	28
5	الحدود الصغرى و العظمى لبعض العناصر الهامة لعملية التخمر اللاهوائي	32
6	نسبة C\N في بعض المواد العضوية	33
7	المكملات الغذائية المضافة لبيئة مصل الجبن	36
8	خلائط العينات وكمياتها التجريبية	42
9	التركيب الكيميائي للسكروز المستعمل في عمليات التخمير	44
10	التركيب الكيميائي لمصل الجين المستعمل في عمليات التخمير	44
11	إنتتاجية السلالات المدروسة من الحموضة الكلية (غ/ل) خلال فترة التخمير	45
12	بعض المؤشرات للسلالات الفطرية المدروسة باستعمال وسط السكروز	46
13	الحموضة الكلية الناتجة باستعمال وسط مصل الجبن	48
14	بعض المؤشرات للسلالات الفطرية المدروسة باستعمال مصل الجبن	49
15	مقارنة بين الحموضة الكلية والمردود الحقيقي للعزلات والسلالات الأجنبية والمحلية باستعمال وسط السكروز و وسط مصل الجبن	50
16	الحموضة الكلية الناتجة باستعمال مستويات مختلفة من اللاكتوز	51
17	بعض المؤشرات للسلالة الفطرية باستعمال مستويات مختلفة من اللاكتوز	52
18	الحموضة الكلية الناتجة باستعمال مستويات مختلفة من نترات الأمونيوم	54
19	بعض المؤشرات للسلالة الفطرية باستعمال مستويات مختلفة من نترات الأمونيوم	56
20	الحموضة الكلية الناتجة باستعمال مستويات مختلفة من فوسفات أحادية البوتاسيوم	58
21	بعض المؤشرات باستعمال مستويات مختلفة من فوسفات أحادية البوتاسيوم	59

22	الحموضة الكلية الناتجة باستعمال مستويات مختلفة من حديدي سيانيد البوتاسيوم	62
23	بعض المؤشرات باستعمال مستويات مختلفة من حديدي سيانيد البوتاسيوم	63
24	الحموضة الكلية الناتجة باستعمال مستويات مختلفة من كبريتات التوتياء	66
25	بعض المؤشرات باستعمال مستويات مختلفة من كبريتات التوتياء	67
26	بعض المؤشرات باستعمال مستويات مختلفة من درجات الحموضة الـ (pH)	69
27	الحموضة الكلية الناتجة باستعمال مستويات مختلفة من كلور الصوديوم	71
28	بعض المؤشرات باستعمال مستويات مختلفة من كلور الصوديوم	73
29	دراسة خصائص إنتاج حمض الليمون بإستعمال وسط مصل الجبن بقيمه المثلى بجهاز المخمر الرجاج (الطريقة العميقة) بوساطة سلالة الفطر المنتخبة(PLA30)	75
30	التركيب الكيميائي لمصل الجبن ومصل الجبن المنزوع البروتين والحليب الخام	77
31	تأثير درجة الـpH على إنتاج الغاز الحيوي	78
32	قيم الـ COD للسائل المفصول عن راسب المادة الصلبة للعينات بعد عملية التخمر	79
33	قيم الآزوت الكلي للسائل المفصول عن راسب المادة الصلبة للعينات بعد عملية التخمر	79
34	قيم المادة الصلبة الكلية للسائل المفصول عن راسب المادة الصلبة للعينات بعدعملية التخمر	80
35	قيم اللاكتوز الكلي للسائل المفصول عن راسب المادة الصلبة للعينات بعد عملية التخمر	80
36	تركيب الغاز الحيوي الناتج عن الهضم اللاهوائي لمصل الجبن	81
37	تأثير درجة الـpH على إنتاج الغاز الحيوي للخلائط ومياه الصرف الصحي لمعمل الألبان	82
38	قيم الـ COD للسائل المفصول عن راسب المادة الصلبة لمياه الصرف لمعمل الألبان	83
39	تركيب الغاز الحيوي الناتج من الهضم اللاهوائي لمياه الصرف لمعمل الألبان والخلائطMix1وMix2 عند الشروط pH=7، T=37°م	84

قائمة الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
1	المراحل الأساسية لعملية التحول الميكروبي	26
2	رسم تخطيطي لوحدة معالجة (لاهوائية) لمخلفات مصانع الألبان	27
3	بعض مؤشرات فعالية للسلالات الفطرية المدروسة في إنتاج حمض الليمون باستخدام وسط السكروز	47
4	بعض مؤشرات فعالية للسلالات الفطرية المدروسة في إنتاج حمض الليمون باستخدام وسط مصل الجبن	51
5	بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من اللاكتوز	54
6	بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من نترات الأمونيوم	57
7	بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من فوسفات أحاديةK	61
8	بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من حديدي سيانيد K	65
9	بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من كبريتات الزنك	69
10	بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال درجات مختلفة من الحموضة	71
11	بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من كلور الصوديوم	74
12	دراسة خصائص النمو وإنتاج حمض الليمون بإستعمال وسط مصل الجبن بقيمه المثلى بالمخمرالرجاج (Shaker) (الطريقةالعميقة) بوساطة سلالة الفطر المنتخبة (PLA30)	76

قائمة الإختصارات

BOD: متطلب الأكسجين الحيوي

COD: متطلب الأكسجين الكيميائي

IN Kg vs: ليترنظامي لكل كيلوغرام من المادة العضوية

C.N: نسبة الكربون إلى الأزوت.

P.N.C: نسبة الفوسفور إلى الأزوت إلى الكربون.

الملخص

يعد حمض السيتريك أحد أهم الحموض العضوية التي يستخدمها الإنسان في مجالات شتى مما رفع الإنتاج العالمي مؤخرا" إلى 1.6 مليون طن/سنويا".

تعد طريقة التخمير من أفضل الطرائق المتبعة عالميا" لإنتاج حمض السيتريك في الوقت الحاضر,ويعتمد مبدأ هذه الطريقة على الفعاليات الحيوية الإستقلابية التي تقوم بها الكائنات الحية الدقيقة ومنها الفطرالأسود (*Aspergillus Niger*) , ويعتبر مصل الجبن مصدرا" جيدا" لإنتاج حمض السيتريك ويستمر البحث الحثيث نحو زيادة أنواع المصادر الأولية غير التقليدية من منتجات ومخلفات زراعية مختلفة مثل العسل والتين والموز والتمر و الأناناس والمندرين ومخلفات إنتاج النشاء من الذرة الصفراء والقمح, وكل ما يمكن أن يحتوي على المواد الكربوهيدراتية.

وتعد معالجة مخلفات معامل الألبان بإستخدام الهضم اللاهوائي خياراً جيداً للحفاظ على بيئة نظيفة ومصدر متجدد لإنتاج الطاقة.

يهدف البحث: إلى إختبار ودراسة الفعاليات الحيوية لعدة سلالات فطرية من الفطر الأسود المنتجة لحمض السيتريك عند تنميتها على أوساط النمو (السكروز ومصل الجبن) والتوصل إلى أفضل تركيز للعناصر المهمة في عمليات التخمير المنتجة لحمض السيتريك وتحديد درجة حموضة وسط النمو الأولي (pH) الأنسب لعمليات التخمير,و معالجة مصل الجبن بالهضم اللاهوائي مناسب لتخفيض نسبة التلوث الناتجة عنه وإنتاج طاقة نظيفة.

أجري هذا البحث في مخابر كلية الزراعة ومركز الدراسات البيئية وجامعة حلب ومركز البحوث العملية بدمشق.

وحصلنا على النتائج التالية: تفوقت السلالة (*Aspergillusniger* PLA30) معنويا" خلال جميع مراحل التنشيط على السلالات الأخرى في وسطي النمو(سكروز, مصل جبن) حيث أنتجت أعلى مردود كلي وحقيقي وبلغت أعلى كمية من حمض الليمون في محلول مصل الجبن عند تركيز لاكتوز 150 غ/ل ودرجة pH 3.5 و0.3 غ/ل من حديدي سيانيد البوتاسيوم و1غ/ل من نترات الأمونيوم و0.25 غ/ل من فوسفات أحادية البوتاسيوم و0.1 غ/ل من كبريتات التوتياء و10% من كلور الصوديوم, وقد أظهرت النتائج أن السلالة الطافرة(PLA30)أعطت مردودا" أعلى في إنتاج حمض الليمون في بيئة السكروز ومصل الجبن وبفارق معنوي كبير تلتها السلالة الطافرة (PLA40),بينما أنتجت العزلتان المحليتان C و D حمض الليمون بمردود ضعيف وبفارق معنوي كبير, وحصلت زيادة في المردود الكلي

(65.77)% والحقيقي (62.16)% لحمض الليمون بإستعمال المخمر الرجاج لطريقة التخمير بالطريقة العميقة في اليوم السابع للتخمير بالإعتماد على القيم المثلى المختارة للوسط الزرعي لمصل الجبن وكانت نسبة الحموض المرافقة لحمض الليمون منخفضة (3.61)% وكتلة المشيجة الفطرية في الحدودالمسموح به (15.45) غ/ل.

وتعد معالجة مخلفات معامل الألبان بإستخدام الهضم اللاهوائي خياراً جيداً للحفاظ على بيئة نظيفة ومصدر متجدد لإنتاج الطاقة, وتولى البحث تحري إنتاج ونوعية الغاز الحيوي من المخلفات السائلة الناتجة عن معمل الألبان (مصل الجبن و مصل الجبن المنزوع البروتين) وأجريت التجارب في وحدة تخميرلاهوائية بسعة(18) ليتر مكونة من 3 وحدات هضم ضمن درجة حرارة 37°م بزمن حضانة 30 يوم,حيث بلغ حجم الغاز الحيوي الناتج من الهضم اللاهوائي لمصل الجبن (47) lNKg-1vs و لمصل الجبن المنزوع البروتين (37) lNKg-1vs وذلك في مجال درجة الحرارة المعتدلة T=(37°م) وضمن مجال لل pH=(7) وكانت نسبة غاز الميثان (59%) لمصل الجبن و(57%) لمصل الجبن المنزوع البروتين على التوالي, أما النسبة المتبقية كانت بأغلبيتها CO_2 وبلغ حجم الغاز الحيوي الناتج من الهضم اللاهوائي لمياه الصرف لمعمل الألبان (132)lNKg-1vs والخليط MIX1(58) lNKg-1vs و(116)lNKg-1vs للخليط MIX2 وذلك في مجال درجة الحرارة المعتدلة T=(37°م) وضمن مجال لل pH=(7) ونسبة غازالميثان (62%) لمياه الصرف لمعمل الألبان و(61%) للخليطMIX1 و(63%) للخليط MIX2 على التوالي, وأظهرت نتائج الدراسة أن الهضم اللاهوائي لمصل الجبن الحاوي على 5.95% مادة صلبة كلية وCOD=(65000) مغ/ل أدى إلى تخفيض نسبة الـCOD له إلى(4600) مغ/ل واللاكتوز بنسبة(95.65)%والآزوت الكلي 8.53%.

وأخيرا" بينت نتائج البحث أن معالجة مصل الجبن بالهضم اللاهوائي مناسب لتخفيض نسبة التلوث الناتجة عنه وإنتاج طاقة نظيفة, وإمكانية إستخدام مصل الجبن كبيئة مغذية لإنتاج حمض الليمون بكميات مناسبة.

Summary

Citric acid is considered one of the most important organic acid,which is used in various aspects,that increases the total global production to 1.6 million tons a year.
Presently ,fermentation method is considered one of the best methods for Citric acid production.
The principal of this method depends on an metabolism bioactive processes caused by some micro-organisms such as *Aspergillusniger*.
cheese whey is considered the best source for Citric acid production.
Researchers are still looking for new non-traditional sources for Citric acid production such as agricultural products production such as: honey,fig, banana,date,pineapple,mandarin,residuals of starch production from corn and wheat , and from anything may contains saccharine.
Anaerobic digestion is apromising option for environmentally friendly recycling of the dairy factories wastes and renewable resources for energy production.
This investigation was carried out at Damascus University-Faculty of Agriclture,Enveronmental research center,University-Faculty of Aleppo,scientfic research center.
Research aim: this research aims to test and study the bioactive processes That produce Citric acidfrom many fungal strains of *Aspergillus Niger*.
When we grow it up in an agricultural media (Saccharose, cheese whey) and That produce Citric acid,and identify the suitable pH for primary agricultural media for fermentation processes.
Liquid gabage produced from dairy factories wastewater and their mixtures (cheese whey and cheese whey without proteen,dairy factorieswaste water) were investigated to determine their maximum biogas production.
We take important results: The strain *Aspergillusniger*(PLA30) has been selected because its highly significant superiority through all activation stages,on other strain in the two agricultural media.
The highest product of Citric acid in cheese whey was with lactose concentration 150 g/l lactose, pH(3.5), 0.3 g/l Ferrocyanicde,1 g/l Ammonium nitrate ,0.25 g/l of monopotassium phosphate,0.1g/l of $ZnSO_4$ and 10% NaCl.
The results pointed out that the mutant fungi type (PLA30) was high statistically significant and it had produced higher percentage of Citric acid in Saccharose and cheese whey medium,followed by type PLA40

The local fungi type (C,D) had the lower produced the higher yield of Citric acid.
Shaker had gave the highest total yield of Citric acid (65.77)%,giving also real yield of Citric acid (62.16)% ,when we using Shaker in fermentation processes(submerged fermentation method) at seven today of fermentation depending on the typical structure of culture medium selected from previous studies,whiled others product acids was low (3.61)%, and the fungal mycelia produced on the lowed bordered line (15.45)g/l.
Anaerobic digestion is apromising option for environmentally friendly recycling of thedairy factories wastes and renewable resources for energy production.
Liquid gabage produced from dairy factories wastewater and their mixtures (cheese whey and cheese whey without proteen) were investigated to determine their maximum biogas production.
The experiments were made in (18) liters anaerobic unites at 37°Cfor 30 days.
The biogas yield ranged Condition between for cheese whey (47) $lNKg^{-1}vs$ and (37) $lNKg^{-1}vs$ for cheese wheywithoutprotieen.
The methane concentration in the biogas ranged between (59)%, for cheese whey and (57)% for cheese whey without protieen,
The biogas yield ranged for dairy factory's wastewater and their mixtures max_1,max_2 in mesphilic Condition between (132) $lNKg^{-1}vs$ for dairy factory's wastewater, (58)$lNKg^{-1}vs$ for mixture max_1 and (116)$lNKg^{-1}vs$ for mixture max_2.
The methane concentration in the biogas ranged between (62)%for dairy factory's wastewater,(61)% for mixture max_1 and (63)% for mixture max_2.
and also the main remaining gas was CO_2, at the Conditions of pH=7,T= 37C.
The results indicated that cheesewhey containing 5.95% total solids,and COD=(65000) mg/l was decreased to (4600) mg/l and the lactose consumption ratio was 95.65%, and the percent decreases were 8.53% for total nitrogen.
The treatment of cheese whey by Anaerobic digestion is suitable for decreasing the pollution rate caused by it and producing a clean energy
And results Showed also that the using of cheese whey as agricultural medium to produsing Citric acid is available.

University of Damascus
Faculty of Agriculture
Department of Food science

Utilization of the dairy factories wastes in production citric acid and biogas

Thesis Submitted for phD degree in Agriculture engineering (Food science)

presented By

Mohamad Ahmad Alnassar

Scientific Supervisors

Supervisor	Co advisor
Prof.Dr. Antoine Tayfour	Prof.Dr. sayah Abou Ghorrah
Faculty of Agriculture	Faculty of Agriculture
Department Food science	Department Food science

Damascus University

2016

1- المقدمة

يعد التلوث البيئي أحد أهم المشاكل التي تواجه معظم دول العالم، وتتنوع مصادره لتشمل كل من الهواء والماء والتربة.

إن التخلص من المخلفات العضوية للمصانع هو أحد أهم النقاط في المحافظة على البيئة والحد من التلوث البيئي للمياه والتربة، حيث تستهلك المخلفات العضوية المعلقة الأوكسجين المنحل في الماء عند رميها فيه ، و تطلق روائح كريهة أثناء تخمرها هوائيا" مما يؤدي إلى نقص الأوكسجين المنحل في المسطحات المائية وعرقلة الحياة فيها.

يعد مصل الجبن أحد أهم المخلفات العضوية الناتجة عن صناعة الألبان، وهو يحتوي على البروتينات واللاكتوز والدهن والتي يجب معالجتها قبل التخلص منها إلى مياه الصرف الصحي.

بلغت كمية المصل الناتج عن وحدات صناعة الأجبان في سورية بشكل تقريبي حوالي (800) طن يوميا" موزعة على أرجاء القطر، وتخضع أقل من نصف هذه الكمية للمعالجة الحرارية البسيطة بهدف تخثير البروتينات لإنتاج جبنة القريش وأما الباقي فيرمى في الأنهار والأراضي المجاورة دون أي معالجة، مما يسبب خسارة اقتصادية كبيرة، بالإضافة للتلوث البيئي.

يمكن الاستفادة من المصل قبل التخلص منه وذلك من خلال استخدامه كمادة أولية في إنتاج بعض المكونات الهامة كإنتاج حمض الليمون وإنتاج الغاز الحيوي .

يعد حمض الليمون من أهم الحموض العضوية التي يستخدمها الإنسان في مجالات شتى، وقد بلغ الإنتاج العالمي مؤخرا" إلى 1.6 مليون طن/سنويا".

يمكن استخدام الفطر الأسود *Aspergillus Niger* بتخمير مصل الجبن وتحويل اللاكتوز إلى حمض الليمون مما يساعد على التخلص من جزء من المكونات العضوية الصلبة الضارة.

من جهة أخرى، يعد إنتاج غاز الميثان بالتخمر اللاهوائي للمخلفات العضوية الحيوانية والصناعية مصدراً للطاقة المتجددة، والذي يستخدم بديلاً عن الوقود الأحفوري في توليد الطاقة والحرارة وكوقود لوسائط النقل، ومنافساً في الكفاءة والتكاليف لأشكال الطاقة الحيوية الاخرى كالغاز الصناعي والايثانول .

ونظرا" للحاجة إلى إيجاد طرائق فعالة في التخلص من المصل الناتج عن صناعة الأجبان والتي تشكل مصدرا" للتلوث البيئي وخسارة اقتصادية كبيرة في تصريف المنتجات الناتجة والتي تحتوي على نسب من المواد العضوية واللاكتوز وتلبية لطلب وزير الإدارة المحلية والبيئة بالقرار رقم 455 بتاريخ 2008/3/25 بضرورة العمل على معالجة مخلفات الأجبان والتي ترمى حاليا" في مياه الصرف الصحي وتسبب تلوث بيئي كبير فقد هدف هذا البحث

إلى :

1- دراسة إمكانية إنتاج حمض الليمون من مصل الجبن الناتج عن مخلفات معامل الألبان باستخدام عزلات محلية من الفطر الأسود(*Aspergillus Niger*) ومقارنتها مع سلالات أجنبية مستوردة.

2- دراسة الظروف المثلى لإنتاج حمض الليمون من السلالات باستخدام طريقة التخمير السطحية والعميقة .

3- دراسة إمكانية إنتاج الغاز الحيوي باستخدام مصل الجبن ومخلفات معامل الألبان (التخمر المشترك) وتحديد أفضل الظروف (pH ، نسب إضافة كل من مصل الجبن إلى مياه الصرف الصحي لمعمل الألبان) للحصول على الإنتاج الأعظمي للغاز.

4- تقييم نوعية الغاز الحيوي الناتج.

2-الدراسة المرجعية

(Literature review)

أولا"-إنتاج حمض الليمون:

2-1-1- مصل الجبن والتلوث البيئي:

يعرف مصل الجبن بأنه المحلول المائي المنفصل عن الحليب بعد تخثر الكازئين ويعتبر منتجاً ثانوياً ناتجاً عن تصنيع الأجبان ويشكل (80-90%) من الحجم الكلي للحليب المصنع ،كما أنه يحتوي على50% من المواد الصلبة الموجودة أصلا" في الحليب ،والتي هي بشكل أساسي عبارة عن بروتينات ذائبة ولاكتوز ومواد دسمة وأملاح وفيتامينات (الميدع، 1990).

ويمكن تمييز نوعين من مصل الجبن وفقاً لدرجة الحموضة هما:

المصل الحلو: ناتج عن التخثر الأنزيمي للجبن كالأجبان الطازجة

المصل الحامضي: ناتج عن التخثر الحامضي للجبن كالأجبان المضغوطة والمطبوخة .

ونظراً لأن آلية التجبن في الحالتين مختلفة ،حيث تقوم الأنزيمات في حالة التجبن الأنزيمي بالدور الأولوي ترسب الكازئين على شكل ملح مع الكالسيوم،لذلك يكون المصل الحلو خاليا" من الكالسيوم ،أما في حالة التجبن الحامضي فيلعب حمض اللبن الدور الأساسي في عملية التجبن حيث يخفض رقم الحموضة ، ويتحد بالكالسيوم مكوناً لاكتات الكالسيوم الذائبة ،وبذلك يحتوي المصل الحامضي على لاكتات الكالسيوم.

بلغ الإنتاج العالمي من المصل عام (1984) حوالي (90) مليون طن،ووصل هذا الرقم إلى (150) مليون طن عام (2005) ،وهذا الرقم بازدياد مستمر مع ازدياد كمية الجبنة المصنعة في العالم،وهذه الكمية الكبيرة من المصل تسبب تلوثاً بيئيا" كبيراً حيث أن متطلب الأكسجين الحيوي لها(BOD) حوالي(30000-50000) مغ/ل ومتطلب الأكسجين الكيميائي (COD) (60000-80000) مغ/ل(Gonzalezsiso،1996).

وينتج عن معامل الأجبان كميات كبيرة من المصل والتي يمكن أن تسبب خسارة اقتصادية إذا ما رميت دون الاستفادة منها حيث يحتوي على سكر اللاكتوز بنسبة (5-4.5)%، وبرتينات ذائبة (0.6- 0.8)% وليبيدات (0.45-0.5)% كما يحتوي على أملاح معدنية والتي تشكل نسبتها (8-10)% من المادة الجافة الكلية وحمض اللبن (0.05)% وحمض الليمون ،ومركبات النتروجين غير بروتينية مثل اليوريا وحمض البولة ،وفيتامينات المجموعة(B) (الميدع، 1990).

ويبين الجدول (1) التركيب الكيميائي لكل من المصل الحامضي والمصل الحلو.

الجدول (1) التركيب الكيميائي للمصل الحامضي والمصل الحلو

المكونات	المصل الحلو[%]	المصل الحامضي [%]
المواد الصلبة الكلية	7-6	6-5
الماء	94-93	95-94

المواد الدسمة	0.1 >	0.1 >
المواد البروتينية	1 – 0.8	1 – 0.8
سكر اللاكتوز	5 – 4.5	4.2 – 3.8
الرماد	0.7 – 0.5	0.8 – 0.7
رقم الحموضة (pH)	6.45	5
حمض الليمون	0.1	0.1
حمض اللبن	آثار بسيطة	0.8

(1995،**Byund**)

وتمثل المواد الآزوتية في المصل حوالي (10–14%) من المواد الصلبة الكلية، حيث تشكل المواد الآزوتية غير البروتينية حوالي (35%) من المواد الآزوتية الكلية، وهذه البروتينات هامة من وجهة النظر الغذائية لغناها بالأحماض الأمينية الضرورية (التي لا يستطيع تصنيعها الجسم) وخاصة الأحماض الأمينية الكبريتية الليزين (Lysine) والتربتوفان (Tryptophan)
يحتوي المصل أيضاً على الفيتامينات ومعظمها من النوع الذواب في الماء، أما الفيتامينات الذوابة في الدسم فتذهب مع خثرة الجبن، حيث يحتوي المصل على فيتامين C والريبوفلافين وفيتامين (B2) الذي يعطي المصل اللون الأخضر المصفر، كما يوجد في المصل كميات مهمة من حمض البانتوثينيك والثيامين والبيريدوكسين(الميدع، 1990).

2–1–2– طرائق معالجة المصل:

تتمثل أهمية معالجة المصل في استعادة ما يحتويه من مواد ذات قيمة غذائية كبيرة .
ويمكن اختصار أهم أهداف معالجة المصل بما يلي :
–استعادة المواد الجافة والتي تمثل أكثر من نصف المواد الجافة للحليب.
–فصل البروتينات ذات القيمة الغذائية العالية الخصائص الوظيفية المتميزة.
–استخلاص سكر اللاكتوز والذي يعد مادة أولية هامة للعديد من الصناعات الغذائية والكيميائية والصيدلانية.
–تخفيض التلوث الناتج عن رمي هذه المنتجات في المجاري والأنهار والمسطحات المائية.
ومع ذلك فإن التوجه نحو معالجة المصل لا يخلو من المعوقات والتي تتمثل فيما يلي:
–محتوى عالي جداً من الماء ما يتطلب كمية كبيرة من الطاقة لفصل هذا الماء وتركيز المصل.
–ملوحة عالية تصل إلى (10%) من المواد الصلبة الكلية حيث إن إزالة هذه الملوحة يعد مصدر التلوث البيئي.

-معدل البروتين إلى السكر منخفض (1-6).
-يعد المصل مادة أولية صعبة الحفظ سريعة الفساد.
وتقسم طرائق معالجة المصل إلى ثلاثة أقسام رئيسة وهي :

- معالجة المصل بشكل كامل أي بقاء كل المكونات ضمن المصل ومعالجته كوحدة كاملة.
- معالجة المصل بعد تجزئته إلى مركزات بروتينية وأخرى سكرية حيث يتطلب فصل البروتينات من المصل إلى خفض متطلب الأوكسجين المرتفع حوالي (10000) ملغ /ل.
- معالجة المصل حيوياً حيث تستخدم هذه الطريقة لمعالجة المصل بالشكل الكامل أو المجزأ.

إن الاستفادة من المصل تتم في فصل مكوناته المختلفة، وبروتينات المصل هي الجزء الأكثر أهمية من ضمن مكوناته نظراً لقيمتها الغذائية العالية لاحتوائها على الأحماض الأمينية الأساسية لتغذية الإنسان والحيوان وبصورة خاصة الليزين والتريبتوفان وكذلك لاستعمالاتها المتعددة.
وتمثل بروتينات المصل حوالي (20%) من مجموع بروتينات الحليب وتختلف عن الكازئينات بالصفات الفيزيائية والكيميائية، وهي توجد ذائبة في المصل وهي من الناحية الغذائية ذات قيمة عالية جداً وتشمل الأنواع التالية:1-بيتا لاكتو غلوبولين 2-ألفا لاكتا ألبومين،3-ألبومين المصل 4- غلوبولينات المناعة،5- البروتيوز ببتون ،6-البروتينات المعدنية وهي مثبتة للمعادن كالحديد والنحاس ويكون ارتباط المعدن بالبروتين قوياً، كما تلعب هذه البروتينات دوراً بنقل المعادن إلى الجسم مثل : اللاكتوفيرين - الترانسفيرين - السيروليوبلاسمين (الميدع، 1990).

2-1-3-حمض الليمون وأهميته الصناعية :

يوجد حمض الليمون على شكلين مختلفين من البلورات ، يسمى الشكل الأول بلا ماء حمض الليمون وصيغته الجزيئية $C_6H_8O_7$ ووزنه الجزئي 192.13 غ ، ويسمى الشكل الثاني حمض الليمون أحادي الماء وصيغته الجزيئية $C_6H_8O_7.H_2O$ ووزنه الجزيئي 210.15غ وكلاهما يحتوي على 3 مجموعات كربوكسيل، ويعد حمض الليمون من أهم الحموض العضوية شائعة الاستخدام في غذاء الإنسان ، ويتوفر في كثير من الفاكهة وخاصة الحمضيات وتستحوذ ثمار الليمون على أعلى نسبة منه(Kristiansen وزملاؤه، 1999).
يدخل حمض الليمون في أغلب الصناعات الغذائية السكرية في عصائر الخضار والفاكهة الطبيعية والشرابات اللا كحولية والمشروبات الغازية كمانع بلورة للسكروز لتعديل حموضتها (Ano، 1997) ،ويستخدم أيضاً كمادة داعمة لمضادات الأكسدة في صناعة الدهون والزيوت والمنتجات الغذائية التي تحوي في تركيبها نسبة عالية من الدهون ، نتيجة ارتباطه بالمعادن الثقيلة المحرضة على عملية الأكسدة مثل الحديد والنحاس والمنغنيز،كما تضاف أملاح السترات

على شكل محلول مائي مكون من سترات ثنائية الصوديوم وسترات ثلاثية الصوديوم لإنتاج الأجبان المصهورة (Spreer،1988؛Lesniak، 2002).

تستخدم أملاح حمض الليمون في الصناعات الصيدلانية كمحاليل منظمة بشكل جيد في صناعة الأدوية وفي تثبيت حمض الاسكوربيك، يخلط حمض الليمون مع الكربونات والبيكربونات لإنتاج مضادات الحموضة(Kapoor وزملاؤه،1984)، وإنتاج مركبات الأسبرين الذائبة(Sato،1990) كما تستخدم بعض أملاحه مثل سترات الأمونيوم الحديدية في تعويض الدم المفقود آنياً ، ولحفظ الدم من التخثر كما يدخل في تركيب المستحضرات التجميلية وكريمات الجلد وذلك حسب البحاثة (Bodie وزملاؤه،1994).

من جهة أخرى يستخدم حمض الليمون في العديد من الصناعات كتنظيف المعادن وزيادة لمعانها و تنظيف المراجل والمخمرات لأنه لا يسبب أضراراً لبعض خلائط الفولاذ، ويدخل في الصناعات البلاستيكية، كما يدخل مع العديد من الكحولات كمادة ملدنة في صناعة الرقائق البلاستيكية الصالحة لتغليف الأغذية، ويضاف إلى مياه المراجل الصناعية لمنع ترسب الأملاح على وشائع التسخين(Lesniak،2002).

دخل حمض الليمون مؤخراً في صناعة المنظفات بديلاً عن حمض الفوسفور لحماية البيئة كون العناصر التي تنتج عن تحلل حمض الليمون عناصر طبيعية لا تضر بالبيئة، كما يستخدم في عملية دباغة الجلود وصناعة الأصبغة ، والأفلام الملونة ، وعمليات تحميضها، وقد أدى اتساع مجالات استخدام الحمض بشكل متزايد إلى التحري عن أفضل الطرائق لإنتاجه، وتعتبر الدراسات حول هذا الموضوع قليلة جداً في القطر العربي السوري الأمر الذي دعى للتوجه إلى مثل هذه الأبحاث الهامة (Lesniak، 2002).

2-1-4- إنتاج حمض الليمون:

قام العالم شيل عام (1784) لأول مرة بإنتاج حمض الليمون بشكله البلوري النقي، واحتاج إلى 30-40 كغ من ثمار الليمون ليستحصل على 1 كغ من بللوراته، وببدايات خجولة في مطلع القرن الماضي تم الحصول على حوالي 10 طن من الحمض المبلور من ثمار الليمون (Kristiansen وزملاؤه، 1998) ،إلا أن هذه الكمية لم تف بحاجة السوق الكبيرة على مدار العام ، مما أدى إلى ارتفاع سعره ارتفاعاً كبيراً وهذا ما دعا إلى البحث عن طرائق أخرى للحصول عليه بتكلفة أقل و بكميات أوفر (Krzysztof ، 1985) ، وبعدئذ لجأ إلى طريقة التخمير كأفضل وسيلة متبعة لإنتاجه (Papagianni،2007).

يعتبر مولاس الشوندر السكري الناتج عن عمليات إنتاج السكر وتنقيته مصدراً جيداً لإنتاجه حسب (Kahlon وزملاؤه،1991)، بالإضافة إلى العديد من المواد الخام الأخرى الحاوية على نسبة عالية من السكريات كمخلفات الذرة والقمح وتفل الشوندر والتفاح وقشور العنب وعصير التين والتمر (Roukas و Kotzekidou،1997).

ويوافق الحمض المنتج حيوياً في تركيبه ومواصفاته حمض الليمون المستخلص من ثمار الحمضيات، ويتركز إنتاجه في الولايات المتحدة الأمريكية و الصين (Berovic،2007) . وتزداد هذه الكمية تبعاً لتعدد مجالات استخدامه، فالصناعات الغذائية لها الحصة الأكبر بحوالي 70–75% و12% للصناعة الصيدلانية(Schlosser، 1997).

ويبين الجدول رقم (2) أهم الدول المنتجة لحمض الليمون.

الجدول (2) أهم الدول المنتجة لحمض الليمون

الدول	الإنتاج (طن/لسنة)
دول أوربا الشرقية ، المملكة المتحدة، فرنسا بلجيكا، ألمانيا .	100.000
الاتحاد السوفيتي السابق U.S.S.R	20.000
كندا	10.000

اليابان	7.000
تشيكوسلوفاكيا	4.000
استراليا	3.000
الولايات المتحدة	185.000
بولندة	2.500
الصين	200.000
باقي الدول	16.000

(Lesniak ، 2002)

2-1-5-الإنتاج الحيوي لحمض الليمون:

إن عملية إنتاج حمض الليمون حيوياً بكميات كبيرة عملية معقدة جداً كون إنتاج مركبات الاستقلاب الأولي محدوداً وتمر بعدة مراحل هي :

- **الأكسدة الهوائية للسكريات** : تتم أكسدة السكريات ممثلة بسكر العنب (Glucose) في الخلايا الحية للأحياء بوجود الأوكسجين إلى ثاني أوكسيد الكربون وماء ويتم هذا على عدة مراحل :

- التحلل السكري و إنتاج حمض البيروفيك
- تحول حمض البيروفيك إلى أسيتيل المرافق
- أكسدة الاستيل المرافق إلى ثاني أوكسيد الكربون عبر سلسلة من التفاعلات، وتدعى بدورة الحموض الثلاثية الكروبوكسيل أو دورة حمض الليمون كونه الناتج الأول في هذه الدورة، أو دورة هانس وكريبس(الخفاجي، 1990؛Roukas،1991)، والإنزيم المسؤول عن المرحلة الأخيرة هو معقد بيروفيك ديهايدروجيناز (حمضمض، 1977؛Chmiel،1998).

يدل تراكم حمض الليمون على عدم اكتمال دورة الحموض ثلاثية الكربوكسيل كما في الحالة الاعتيادية ويتحول الحمض إلى مركب وسطي من حمض (Cis-aconitate) ، ثم إلى مركب آيزوسترات(Isocitrate) بوساطة الإنزيم اكونيتاز (Aconitase)، وتحتاج هذه العملية إلى بعض المعادن كالحديد والمنغنيز، ويؤدي سحب الحديد من الوسط باستخدام بعض المثبطات إلى منع اكتمال التحولات الضرورية للوصول إلى حمض الليمون، والتي تحدث في الحالة الاعتيادية ولإنتاج كميات كبيرة من الحمض على غير المعتاد يجب أن يحصل خلل في سلسلة العمليات الحيوية لخلايا الأحياء الدقيقة المنتجة، وينشأ هذا الخلل عن تغير في التركيب الوراثي الذي يصيب المورثات المسؤولة عن إنتاج الأنزيمات التي تحول الحمض بعد تكوينه، مما يؤدي

إلى تراكمه داخل الخلية المنتجة،أو نتيجة اضطراب فعالية هذه الأنزيمات لأسباب عدة يتحول جزء من سكريات وسط النمو إلى كتلة حيوية نامية (المشيجة الفطرية) عند البدء بإجراء عمليات التخمير، بعدها يبدأ طور إنتاج الحمض الذي يعتمد بدوره على نوع الأنزيمات المنتجة(Chmiel،1998).

استخدمت طريقة التخمير عام 1940 في إنتاج حمض الليمون تجاريا" على المستوى العالمي ورافق هذا الأسلوب دراسات مستفيضة عكست التطور الهائل لإنتاجه (Lesniak،2002).

ويستخدم حالياً على المستوى الصناعي سلالات عالية النشاط من الفطر الأسود وذلك حسب البحاثة (Bodie وزملاؤه،1994).

وأعطت الأبحاث الكثيرة التي أجريت في نهاية القرن العشرين في العديد من الدول دفعاً قوياً في مجال إنتاج الحمض ، هدفت أولاً إلى الحصول على سلالات من الكائنات الحية الدقيقة ذات فعالية حيوية عالية واستنتجت أفضل تركيب لوسط النمو ، كما تركزت نحو ضبط ظروف التخمير (Milsom، 1998) .

وتم إنتاج الحمض في وسط (مولاس الشوندر) باستخدام كل من الخمائر *Candida.gulliermondii* و*C.lipoLytica* وتمكنوا من إنتاج 1119 كغ منه خلال مدة تخمير 189 ساعة في وسط نمو يحوي 3145 كغ سكر (Kapoor وزملاؤه، 1984).

أشار الباحث Wehmer عام 1983 إلى بعض الفطور قادرة على إنتاج حمض الليمون (Mattey وزملاؤه، 1999؛Wehmer،1983)، وقام بعزل وتسمية السلالتين التابعتين للجنس *Penicillium* باسم *Citromyces glaber* و*C.peffevianus* .

بعد ذلك أمكن إنتاجه حيوياً بتنمية أنواع من جنس *Penicillium* و*Aspergillus* في أوساط النمو المغذية السائلة المحتوية على سكر القصب (السكروز)(Rohr، 1998).

تم استخدام المصل المملح باعتباره بيئة رخيصة ومناسبة لإنتاج حمض الليمون باستخدام سلالات من الفطر الأسود *Aspergillus Niger*، حيث تم اختيار أفضل السلالات من هذا الفطر والذي له إنتاجية عالية للحمض في الظروف البيئية المثلى من حموضة ، وتركيز الملح، وتركيز الإيثانول ثم تأثير الطفرات،وكانت أفضل السلالات الفطرية المستخدمة هو فطر*Asp. Niger* CAIM، حيث تم إنتاج 1.6غ حمض الليمون/لمصل بعد مرور 9 أيام من التخمر عند تركيز للميثانول 4% (Fooda، 1992؛Khorshid، 1992).

كما قام الباحثMurad عام (2003) بإنتاج حمض الليمون بتنمية سلالة الفطر الأسود ATCC9642على مصل الجبن باستخدام نسب مختلفة من السكروز، والغلوكوز، والفركتوز وفوسفات ثلاثية الكالسيوم ،والميثانول وغالاكتوز ريبو فلافين، وذلك باستخدام تقنية التخمير

السطحي، فوجد أن مصل الجبن مع 15 % سكروز مع أو بدون 1% ميثانول أدت إلى رفع إنتاجية الحمض إلى 106.6غ/ل.

2-1-6-العوامل المؤثرة في إنتاج حمض الليمون من الفطر الأسود:

أجرى الباحثان Lesniak و Kutermankiewicz عام (1990) دراسات تمحورت حول تأثير العناصر المعدنية الموجودة في مولاس الشوندر السكري لإنتاج حمض الليمون باستخدام الفطر الأسود ، والمكونة من عناصر البوتاسيوم و الصوديوم والكالسيوم ، كما قاما بدراسة تأثير كل عنصر على حدة ،إذ تبين أن للبوتاسيوم تأثيراً سلبياً في عملية إنتاج حمض الليمون في وسط نمو (مولاس الشوندر) يفوق الصوديوم والكالسيوم بعدة مرات، إلا أن هذه الزيادة لم تؤثر في كمية الكتلة الحيوية النامية، ولم تتسبب بتشكيل حموض أخرى، ولعب عنصر الصوديوم دوراً إيجابياً في كمية الحمض المنتجة عند إضافة كميات قليلة منه، ويصبح تأثيره ضاراً إذا ما تجاوز 2.5 غ/ل، إذ تنتج عمليات الاستقلاب الحيوي حمض الاوكزاليك بدلاً من حمض الليمون.

كما درس تأثير شوارد الكالسيوم في كمية الحمض المنتجة ، ووجد أن الكمية القليلة من عنصر الكالسيوم تزيد من إنتاجه وزيادة كميته تطيل فترة التخمير وتزيد من الكتلة الحيوية ، الأمر الذي ينعكس سلباً على عمليات التصنيع الحيوي للحمض (Pera و Calliere، 1999)

قارن الباحث Arbakariya وزملاؤه عام (1995) بين طريقتي التخمير المتقطع و المستمر وتبين أن إتباع طريقة التخمير المستمر تعطي مردوداً أكبر من الحمض 0.294 غ/ل/ سا بالمقارنة مع الطريقة المتقطعة ذات المردود 0.025 غ/ل/ سا أي بزيادة 0.269 غ/ل/ سا.

كما أجرى الباحث Shadafza وآخرون عام (1976) في إيران مقارنة بين إنتاج حمض الليمون من مولاس الشوندر السكري وعصير التمر باستخدام الفطر الأسود و بإتباع الطريقة السطحية، وقد أدت إضافة0.25 – 0.1 غ/ل من نترات الأمونيوم و 0.1 – 0.2 غ/ل من فوسفات أحادية البوتاسيوم إلى كل من مولاس الشوندر وعصير التمر إلى زيادة طفيفة في كمية الحمض المنتجة، وكان أفضل تركيز للسكريات في بيئة المولاس 120-150غ\ل وفي بيئة عصير التمر 66 – 90غ \ل، وأفضل درجة حموضة لكليهما(5-6.5) وتم الحصول على أفضل إنتاجية عند خلط المولاس مع عصير التمر بنسبة 2:3 (300 محلول مولاس : 200 عصير تمر) (Shadafza وزملاؤه،1976).

درس الباحث Roukas عام (1988) تأثير درجة حموضة وسط النمو (مولاس الشوندر) بتركيز سكري 14% وعند درجتي حموضةpH(6 و3) في تشكل الحموض المرافقة لحمض الليمون كحمض الغلوكونيك بإتباع الطريقة المستمرة عند معدل تدفق 0.12 مل / سا ، واستنتج ميل الكتلة الحيوية لإنتاج حمض الغلوكونيك بنسبة عالية بلغت 13.47غ / ل عند درجة

حموضةpH(3) على حساب حمض الليمون الذي بلغ 4.83غ/ل في حين تعاكست النسب عند درجة حموضة pH(6) .

توصلت أبحاث Roukas وKotzekidou عام (1997) أن إضافة 235 مغ/ل من حديدي سيانيد البوتاسيوم و2%من فوسفات ثلاثية الكالسيوم إلى وسط النمو (عصير التمر)،أدت إلى رفع مستوى إنتاج الحمض إلى 55 غ /ل ، وبلغ معدل السكريات الممثلة 73.3%.

درس الباحث Moataza عام (2006) إنتاج حمض الليمون من عصير التمر الخام وعصير التمر المعامل بحديدي سيانيد البوتاسيوم بنسبة 0.025 غ / ل و 1% من فوسفات ثلاثية الكالسيوم و3% من الكحول الميتيلي عند تركيز سكريات وسط النمو 240 غ/ل معتمداً درجة حموضة أوليةpH(6.5) ومتبعاً طريقة التحضير المستقر ، مستقرئاً النتائج لصالح عصير التمر المعامل .

نمى الباحثان Abdulrahman وAlyasser عام (2006) خلايا من الفطر الأسود في عصير التمر عند درجة حرارة 30م° وتركيز سكريات 15%، ودرجة حموضة أولية(5.5pH) فحصلا على 42.5غ /ل من الحمض باستهلاك 61.70 % من سكريات وسط النمو.

توصل الباحثان Ambati وAyyanna عام (2001) إلى أعلى إنتاجية من الحمض المستخلص من عصير التمرالتدمري بطريقة التخمير المستقر، بدرجة حرارة تخمير29.76م° عند تركيز سكريات221.66 غ/ل ، مضافا إليها 0.479 غ /ل نترات الأمونيوم و2.33 غ/ل حديدي سيانيد البوتاسيوم ودرجة pH (5.35).

حصل العالم Hung-changعام (1996) على أفضل إنتاج منه بإتباع الطريقة السطحية بدرجة حرارة 30م°عند تركيز سكريات 109.6 غ/ل، و1.83 غ/ل من نترات الأمونيوم ، و0.4 غ/ل من فوسفات أحادية البوتاسيوم .

عمل الباحثان Roukas وLiakopoulou عام (2002)على إنتاج كميات أوفر من حمض الليمون والغلوكونيك من مستخلص التين باستخدام الفطر الأسود،وحصلا على إنتاجية 20.5 و97.0 غ/ل على التوالي عند تركيز سكريات 200 غ /ل، ودرجة حموضة pH(7) وبكتلة حيوية نامية 18.5 غ /ل، في حين أدت إضافة 4% من الميتانول إلى رفع إنتاجية حمض الليمون إلى 30.7 غ /ل وحمض الغلوكونيك إلى 145.5 غ/ل على التوالي.

تم الحصول على مردود مرتفع من الحمض 70.5 % عند استخدام خلايا خميرة *Candida*في وسط نمو مكون من مزيج سكر العنب و الفاكهة بدرجة حرارة 28 م° مع التهوية المستمرة لمدة 5 أيام ، وإضافة اليوريا وفوسفات أحادية البوتاسيوم وكبريتات المغنزيوم وكبريتات المنغنيز وفحمات الكالسيوم حسب (Kapoor وزملاؤه،1984؛ Mattey وKristiansen، 1999).

درس الباحث Kamzolova وآخرون عام (1996) تأثير شوارد أيونات الحديد في إنتاج حمض الليمون ومماكبه بوساطة الخميرة المطفرة *YarrowiaLipolytica* في وسط النمو (الغول الايتيلي) تحت ظروف الزراعة المستقرة ، وإضافة تراكيز مختلفة من الحديد 0.05 – 10مغ/ ل وبتركيز آزوت ثابت وارتفع مردود الحمض ووصل حده الأقصى عند تركيز شوارد من الحديد 0.05 مغ/ل في وسط النمو ، ثم انخفض المردود بازدياد نسبة شوارد الحديد في وسط النمو.

حصل الباحث Hans عام 2005 على أعلى إنتاج من حمض الليمون مقدراها 57.8 غ/ل وإنتاجية ساعية 0.096 غ/ ل/ سا عند درجة حموضة pH(5) وكان تركيز سكر الغلوكوز في وسط النمو 120غ/ل باستخدام خلايا الخميرة *Candida oleophila* ATCC 20177 وبإتباع الطريقة المستمرة .

درس أثر عمليات التهوية في معدل إنتاج الحمض لخلايا خميرة:

Candida oleophila ATCC 20177 الذي بلغ أقصاه 167 غ /ل ، وإنتاجية ساعية 1.434 غ /ل/سا عند معدل تهوية 80 % ، خلال فترة تخمير بلغت 111.4 سا ، باستخدام وسط نمو من سكر الغلوكوز تركيزه 131.2 غ /ل بإتباع الطريقة المستمرة، في حين بلغت كمية الحمض المنتجة 157.6 غ/ ل عند مقدار تهوية 20 % خلال فترة تخمير (4–5) يوم حسب الباحث (Hans،2005).

قام الباحث Xu– DingBang وآخرون عام (1989) باختبار مصادر مختلفة من الكربوهيدرات كمصدر طاقة لوسط النمو كسكر المالتوز و السكروز و الغلوكوز و المانوز والفركتوز لإنتاجية أعلى من حمض الليمون وتبين أن تمثيل السكروز و المالتوز من قبل الفطر الأسود أفضل بالمقارنة مع سكري الغلوكوز والفركتوز وحصلت أفضل النتائج عند تركيز سكريات 10–14 % كما انخفض إنتاج الحمض، في الأوساط المغذية الحاوية على تراكيز سكريات أقل من 2.5 %.

درس الباحثان Choe و Yoo عام (1991) تأثير تركيز الأمونيا في عمليات إنتاج حمض الليمون باستخدام الطريقة العميقة، إذ أدت التراكيز العالية من شوارد الأمونيا المستخدمة إلى تأخير إنتاج الحمض وارتفع معدل الإنتاج عند تركيز نترات الأمونيوم (2–3 مغ \ غ) .

درس الباحث Berovic عام (2007) تأثير كمية الأوكسجين المتدفقة إلى جهاز المخمر الحيوي في شكل الكتلة الحيوية النامية (الميسيلوم) ، وكذلك في إنتاج الحمض، ووجد تأثيره الكبير في شكل الكتلة الحيوية المكونة في عمليات التخمير العميق، و لوحظ أن الشكل الحبيبي أعطى نتائج أفضل بالمقارنة مع الشكل الخيطي(Dhananjay وزملاؤه، 1993).

قام الباحث Mashhoor وزملاؤه (1988) بدراسة أثر المعادن النادرة وكذلك الفيتامينات في إنتاج الحمض أثناء التخمير العميق ، وتبين لهم التأثير الإيجابي لكل من عناصر النحاس والحديد و التوتياء و الكوبالت عند وجودها بنسب منخفضة في وسط النمو في عملية إنتاجه

كما لوحظ ارتفاع مردود الحمض إلى 61.18% بوجود البيرودوكسين والبيوتين وحمض النيكوتينيك .

درس الباحثان Segovia و Benuzzi عام (1997) تأثير تركيز شوارد النحاس في شكل الكتلة الحيوية للفطر وكذلك في إنتاج الحمض ، وصل الإنتاج إلى 60غ /ل عند تركيز 78 مغ /ل من شوارد النحاس في وسط النمو خلال فترة تخمير 120 ساعة (Haq وزملاؤه، 2002) .

تحقق أعلى إنتاج من حمض الليمون مقداره 42غ/ل في وسط سكر الغلوكوز المغذي، وبتنمية أحياء دقيقة من نوع *Bacillus Licheniformis* في ظروف هوائية بدرجات حرارة 30-37م° وبدرجة حموضة pH(7) خلال مدة التخمير 120 ساعة (Kapoor وزملاؤه،1984).

2-1-7-العناصر الغذائية اللازمة لعملية إنتاج حمض الليمون حيوياً من الفطر*A. Niger*:

تهدف التقنية الحيوية نحو تحقيق احتياجات الإنسان من المنتجات الصحية و بكلفة منخفضة ولا بد عند الشروع بعمليات التصنيع الحيوي من التعرف على الاحتياجات الغذائية الضرورية لنمو الأحياء الدقيقة ذات الأهمية الصناعية ، ومتطلبات عمليات التخمير اللازمة لنموها و استقلابها ويأتي بالمرتبة الأولى عنصر الكربون يليه الآزوت فالأوكسجين والهيدروجين و الفوسفور والكبريت حيث تشكل هذه العناصر 90-95 % من الوزن الجاف للخلية الحية، ويأتي بعدها من حيث الأهمية البوتاسيوم و المغنيزيوم و الصوديوم والكالسيوم والحديد ، وغيرها من العناصر الغذائية (الخفاجي، 1990).

ومن أهم العناصر الرئيسية التي تدخل في تركيب وسط النمو :

1-الكربون:

يعد الكربون من العناصر الأساسية لنمو الكائنات الحية الدقيقة ، إذ يدخل في بناء كتلتها الحيوية وعمليات التنفس و إنتاج الحموض العضوية ، وتأتي السكريات البسيطة و الثنائية في مقدمة المواد التي تحوي الكربون اللازم لنمو الفطرالأسود (Janczar و Pietkiewicz،1998).

يتصف كل من سكر العنب و القصب و الشوندر والمانوز بسرعة التمثيل ، بينما يتصف سكري الغالاكتوز واللاكتوز بصعوبة التمثيل بالإضافة إلى السكريات المعقدة مثل النشاء والسيللوز التي يستطيع الفطر الأسود استخدامها بدرجات مختلفة في العمليات الحيوية وذلك حسب البحاثة: (Manomani وSreekantiah،1987؛Nguyen وزملاؤه،1992).

ويعتبر مولاس الشوندر و قصب السكر من أهم المركبات الاقتصادية المستخدمة في نمو و استقلاب هذه الكائنات (Kutermankiewicz،1980؛Podgorski وزملاؤه،1987).

ويفضل أن يكون تركيز السكريات في وسط النمو بحدود10-15% ويلاحظ أن ازدياد مستوى السكريات في وسط النمو يؤثر سلباً في معامل التمثيل،إذ تبلغ قيمته 97% عند تركيز سكريات 15% وينخفض إلى 92% عند تركيز 20% كما تزيد في مدة التخمير، ويلزم عند اختيار المقادير المثلى من السكريات في وسط النمو الربط بين معامل التمثيل وكمية السكريات الممثلة وتكاليف عملية الإنتاج(Legisa وGradisnik،1995).

2-الآزوت:

يعد عنصر الآزوت من العناصر الأساسية و الضرورية لنمو الخلايا الحية ، إذ يدخل في تركيب البروتينات و الحموض النووية و غيرها وهناك مصدران للآزوت يمكن أن يؤمنا حاجة خلايا الفطر الأسود من هذا العنصر أولهما عضوي ممثلاً بالحموض الأمينية و البروتينات ونواتج تحللها و الأميدات و اليوريا ، وثانيهما لا عضوي ممثلاً بأملاح الأمونيوم و النترات مثل نترات الأمونيوم و البوتاسيوم و الصوديوم و الكالسيوم وماءات الأمونيوم ويفضل استخدام نترات الأمونيوم مصدراً للآزوت في وسط النمو لتساوي كمية استهلاك الفطر الأسود لكل من النترات والأمونيوم ، محافظاً بذلك على درجة حموضة وسط النمو ثابتة وينصح أن يكون تركيز الآزوت في وسط النمو بحدود 0.1-0.4 % ، ويؤدي نقصه إلى تراجع مستويات النمو وكذلك انخفاض معدل إنتاج الأنزيمات، بينما تؤدي زيادة تركيز الآزوت في وسط النمو إلى زيادة كبيرة في الكتلة الحيوية وانخفاض فعالية إنتاج حمض الليمون، ويحتوي وسط النمو المؤلف من مولاس الشوندر أو القصب السكري على كميات مختلفة من الآزوت قد تكون كافية أحياناً، ويجب إضافته إلى وسط النمو عند فقر وسط النمو به (Pintado،1993) .

3-الفوسفور:

يعد من المركبات الأساسية للنشاط الحيوي، إذ يدخل في تركيب الحموض النووية والفوسفوليبدية والفوسفوبروتينية، ويساهم أيضاً في تركيب العديد من مرافقات الأنزيم التي تدخل في تركيب ATP وADP.

يمكن استخدام حمص الأورثوفوسفوريك وأملاحه، وكذلك المركبات العضوية الغنية بعنصر الفوسفور مصدراً له.

ويوصي بان يكون محتوى الفوسفور (P_2O_2) في وسط النمو بحدود 0.025% عند إتباع الطريقة السطحية و0.01% عند إتباع طريقة الزراعة العميقة في التخمير.

وجد أن وجود الفوسفور في وسط النمو يحد من إنتاج حمض الاوكزاليك أثناء إنتاج حمض الليمون، وأدى غياب الفوسفور إلى ارتفاع نسبة حمض الأوكزاليك المنتجة إلى 80%، وأدى انخفاض تركيز الفوسفور في وسط انخفاض مستويات تمثيل الآزوت، وتراجع في تركيب الفيتامينات، وتؤدي في المقابل زيادة الفوسفور في وسط النمو إلى ارتفاع مستوى نشاط عمليات

تنفس الكتلة الحيوية وانخفاض فعالية إنتاج حمض الليمون، ويوصى بإضافة فوسفات أحادية البوتاسيوم في عمليات التخمير الهادفة لإنتاج الحمض حيث يعتبر مصدراً للفوسفور والبوتاسيوم في آن معاً (Honecker وزملاؤه, 1989؛Yigitoglu وMcneil،1992).

4- البوتاسيوم:

تحتاج الخلايا إلى عنصر البوتاسيوم بشكل أساسي، حيث يستعمل في عمليات التبادل الشاردي عبر الأغشية الخلوية، ويساهم مساهمة فعالة في عمليات تركيب البروتينات ضمن الخلية ويرتبط مع الرايبوزومات، ويشارك في عمليات استقلاب السكريات (الخفاجي، 1990).

ويستحسن أن يكون تركيز البوتاسيوم في وسط النمو بحدود 0.015 - 0.01%، ولم يسجل أي تأثير سلبي في معدل إنتاج الحمض عند زيادة تركيزه في وسط النمو، بينما يؤدي نقصه في وسط النمو إلى تدني مستوى إنتاج البروتين وبالتالي انخفاض في مستوى نمو الكتلة الحيوية وذلك حسب (Lesniak وKutermankiewicz، 1990).

هناك عناصر صغرى تدخل في تركيب وسط النمو بكميات ضئيلة 10^{-3}–10^{-5}% مثل المنغنيز والكالسيوم والزنك والحديد والنحاس والكبريت إضافة إلى العناصر الأساسية ولتحقيق الإنتاج العالي من الحمض يجب توفر الرقابة الصارمة على العناصر النادرة وخاصة في التخمير العميق(Carlos وزملاؤه ، 2006).

5- الزنك:

يؤثر الزنك في نمو الكتلة الحيوية للفطر، كذلك في معدل نشاطه، ويقلل من حساسيته للتأثيرات الناتجة عن زيادة نسبة البوتاسيوم والحديد في وسط النمو، ويضاف على شكل كبريتات الزنك ويؤدي نقصه في وسط النمو إلى إنتاج كتلة حيوية مرهفة وسريعة الغرق في المحلول التخميري (Kristiansen وزملاؤه،1998).

6- الحديد:

يدخل الحديد في تركيب أنزيمات عديدة ويشجع نمو الكتلة الحيوية وخاصة عند توفر عنصر الزنك، وتقدر كمية الحديد في وسط النمو التي تعطي نمواً جيداً مقروناً بإنتاجية عالية من حمض الليمون بـ 2×10^{-6}% ولا تتأثر بعض سلالات الفطر الأسود بزيادة تركيز الحديد في وسط النمو،وخاصة عند استخدام التخمير العميق إذ يرتفع تركيزه تدريجياً في وسط النمو نتيجة تحرره من الخلائط المعدنية المستعملة في بناء أجهزة التخمير المقاومة للحموضة المرتفعة،ولهذا يجب أن تكون سلالة الفطر الأسود المستخدمة في إنتاج الحمض على المستوى الصناعي مقاومة لزيادة نسبة الحديد في وسط النمو (Romuald و Elzieta، 1992)

7-النحاس:

يؤثر وجود النحاس في وسط النمو تأثيراً كبيراً نتيجة تشكيله مركبات معقدة عند ارتباطه مع الحموض الأمينية ويجب أن يتراوح النحاس في وسط النمو 5×10^{-5}% ويؤدي ارتفاع تركيزه في وسط النمو أكثر من 10^{-4}% إلى تثبيط نمو الكتلة الحيوية وانخفاض قدرتها على إنتاج الحمض وذلك حسب (Kristiansen وزملاؤه،1998).

8-المغنيزيوم:

يأخذ دوراً كبيراً في العديد من التفاعلات الحيوية الحاصلة ضمن خلايا الكتلة الحيوية وخاصة في تركيب الحموض الأمينية والبروتين والفيتامينات وغيرها، ويكون النمو الحيوي غير طبيعي عند نقص المغنيزيوم في وسط النمو نتيجة ازدياد محتوى الكيتين في الخلايا وانخفاض محتوى البوليميرات،ويؤدي زيادة تركيز المغنيزيوم في وسط النمو إلى تراجع في عملية إنتاج حمض الليمون(Lesniak وKutermankiewicz،1990).

9- الكبريت:

يدخل الكبريت في تركيب حموض أمينيه كثيرة وفي تركيب البروتينات والفيتامينات والأنزيمات ويفضل أن يكون تركيزه في وسط النمو 0.007%، وتؤدي زيادة هذه النسبة إلى انخفاض سرعة عمليات تركيب حمض الليمون في حين أن زيادة هذه النسبة قليلاً لا تؤثر سلباً في مجرى عمليات إنتاج الحمض وذلك حسب (Lesniak وKutermankiewicz،1990).

10- مركبات أخرى (another Components):

1"-الأغوال:

يؤدي إضافة كميات قليلة من الأغوال مثل الميتانول والايتانول وn- بربانول وايزوبروبانول إلى وسط النمو إلى تثبيط إنتاج الكتلة الحيوية وتحسن الإنتاج عند إضافتها إلى وسط النمو بمستويات محددة وتوجه عمليات التمثيل نحو إنتاج حمض الليمون وتستخدم بشكل عام بنسبة1-5% (Georgieva وزملاؤه، 1989).

2"-الزيوت والدهون:

تضاف لوسط النمو أثناء إتباع أسلوب التخمير العميق لمنع تشكل الرغوة في المخمرات عند إنتاج حمض الليمون، وتستهلك خلال عمليات التخمير كمصدر للكربوهيدرات بعد انتهاء مصدر الكربوهيدرات الأساسي وتضاف بكمية 0.05 - 0.3% (Kamal وزملاؤه،1999).

3"- درجة الحموضة : (pH)

تتغير درجة حموضة pH وسط النمو استجابة للفعاليات الإستقلابية الحيوية، والسبب في ذلك عائد لإفراز الأحياء الدقيقة للحموض العضوية في وسط النمو كحمض الليمون وغيره من الحموض ، إذ إن طبيعة وسط النمو وتقنية الإنتاج تؤثر في درجة الحموضة pH، ولهذا يلزم أن تحدد درجة الحموضة البدائية بشكل جيد مراعياً ما يناسب الكائن الحي النامي ومواد وسط النمو وتقنية الإنتاج (Carlos وزملاؤه ، 2006).

4"-التهوية: (Aeration)

تعتبر عملية الإنتاج الحيوي لحمض الليمون هوائية، ولهذا يكون للأوكسجين دور مؤثر ومحدد لعمليات الإنتاج وتؤدي معدلات التهوية المتزايدة إلى تحسين الإنتاج واختصار الزمن، ويفضل أن تكون نسبة الأوكسجين المنحل ما بين 9-12% من نسبة إشباع الهواء، أثناء طور النمو ومن 12-14% أثناء طور الإنتاج(Kim وزملاؤه،1995؛Fiedurek، 1999).

2-1-8-طرائق التخمير لإنتاج حمض الليمون صناعياً:

1- طريقة التخمير السطحية:

استخدمت هذه الطريقة منذ اعتمادها من عام (1917) وحتى الآن، وتقسم طريقة التخمير السطحية تبعاً لنوع وسط النمو المستعمل في عمليات التخمير حسب(Lesniak وزملاؤه،1993) إلى:

1"-التخمير السطحي باستخدام أوساط النمو السائلة :تستخدم المواد الحاوية على نسبة عالية من السكريات بعد تمديدها كمحلول المولاس الممدد أو محلول عصير التمر الممدد أو أي مركب آخر يحوي نسبة عالية من السكريات كأوساط لتنمية الفطر الأسود، وتتم عمليات التخمير السطحي في حجرة التخمير المجهزة بالأحواض المصنوعة من الخلائط المعدنية المقاومة للحموضة، بطول 7 م وعرض 1.5م وارتفاع 0.2م، وتبعد المسافة بين صفوف الأحواض 1.5 م والمسافة بين الحوض والآخر 0.5 م.

وتجهز حجرة التخمير أيضاً بمجموعة تهوية خاصة مكونة من آليات تعقيم الهواء وضخه إلى داخل حجرة التخمير من أجل تأمين الأوكسجين اللازم لنمو الكائنات الحية بشكل سليم، وتزود أيضاً بشبكة من الأنابيب لنشر بخار الماء الساخن اللازم لتعقيم حجرة التخمير، وشبكة أخرى للماء البارد لتوازن عمليات الضبط الحراري داخل حجرة التخمير، وطرح الحرارة الزائدة الناتجة عن العمليات الحيوية النشطة، وتزود أيضاً بأنابيب توصيل وضخ محلول وسط النمو إلى أحواض التخمير، وأخرى لسحب محلول وسط النمو بعد انتهاء عمليات التخمير.

وتعقم حجرة التخمير وكذلك الأحواض قبل البدء بعمليات التخمير بضخ بخار الماء الساخن أولاً ثم يضخ مزيج من بخار الماء الساخن الفورمالين بنسبة 10-20 مل فورمالين / م^3 من حجم حجرة التخمير، ثم يضخ الماء الساخن لغسيل الفورمالين، وبعدها تضبط درجة حرارة حجرة

التخمير على 40 م°، ثم يُضخ وسط النمو إلى الأحواض بعمق 0.1- 0.16 متر بتركيز سكريات 12-16 % (Kubicek،1998).

يليها البدء بضخ الهواء المعقم إلى حجرة التخمير بمعدل 3م^3 هواء /م^2 من سطح التخمير / سا لتبريد وسط النمو إلى درجة حرارة 35 م°، ثم يوقف ضخ الهواء بشكل مؤقت وتتم عملية إضافة اللقاح المكون من مزيج أبواغ الفطر الأسود مع الكربون المنشط المعقم حرارياً بشكل مسبق بنسبة (1/200) ثم ينشر مزيج الأبواغ على سطح وسط النمو بطريقة يدوية أو آلياً بحقن اللقاح خلال أنابيب معقمة بمعدل 50-70 ملغ / م^2 من سطح الأحواض،يستأنف ضخ الهواء المعقم إلى داخل حجرة التخمير بعد عدة ساعات بدرجة حرارة 50م°حتى بدء ظهور الكتلة الحيوية للفطر على سطح الأحواض، ويتم تخفيض درجة حرارة الهواء إلى 28-23م°.

ثم تخفض درجة حرارة الهواء مرة أخرى إلى 25 م° بعد مرور 30-36 ساعة من نمو الكتلة الحيوية ، وهي الحرارة المثلى لإنتاج حمض الليمون، وبعدها يبدأ زيادة ضخ الهواء إلى حجرة التخمير إلى معدل يتراوح مابين 15-18م ^{3} / م^2 / سا، كما يتم ضبط معدل الرطوبة الجوية بحدود 75-85% خلال كامل مرحلة التخمير (Sakurai وزملاؤه، 1997)

تبدأ سلسلة أخذ العينات من المحلول التخميري وإجراء الاختبارات اللازمة التي تحدد مستوى الاستقلاب الحيوي المنتج لحمض الليمون، ثم توقف عمليات التخمير عندما ينخفض تركيز السكريات في وسط النمو التخميري إلى حد الحرج للعمليات الحيوية 0.5-1 % سكريات، عندئذ يوقف ضخ الهواء ويسترد المحلول التخميري من الصواني إلى خزانات خاصة وذلك للبدء بمرحلة أخرى لاحقة هي مرحلة التنقية والفصل حسب (Lesniak، 2002).

2"- التخمير السطحي باستخدام أوساط النمو الصلبة: تجرى عمليات التخمير السطحي لإنتاج حمض الليمون باستخدام أوساط النمو الصلبة كنخالة القمح ،ولب البطاطا الحلوة بعد فصل النشاء منه ، وتفل الشوندر السكري (Hang وزملاؤه، 1985).

وهذا الأسلوب حديث العهد لم يكن منتشراً على نطاق واسع، ولكن سرعان ما انتشر وكثر استخدامه في السنوات الأخيرة (Rugsasel وزملاؤه،1995).

توضع المواد الخام الصلبة في الصواني، وتعقم تعقيماً حرارياً، ثم تبرد وتلقح بأبواغ الفطر الأسود، وتحضن على درجة حرارة 28م° لمدة 5-8 أيام (Bodie وزملاؤه،1994)،ويمكن تسريع وتيرة التخمير بإضافة مستحضر أنزيم الأميلاز لزيادة معدل تحرير السكريات القابلة للتخمير ويفصل حمض الليمون المنتج بعد الانتهاء من عملية التخمير عن بقايا منتجات التخمير باستعمال الماء الساخن وسحب محلول الحمض إلى خزانات خاصة لإجراء عمليات التنقية والبلورة (Rohr،1998).

2- **طريقة الزراعة المغمورة (العميقة):**بدأت طريقة التخمير العميق بالانتشار منذ عام 1940

وينتج بطريقة التخمير العميق 80% من الإنتاج العالمي لحمض الليمون التي تفوقت نتائجها مقارنة بطريقة التخمير السطحي(Jamal وزملاؤه، 1988).

إلا أن هذه الطريقة تحتاج إلى عوامل عديدة لنجاحها:

-احتياجها إلى فنيين ذوي خبرة عالية، وكلفتها العالية من التجهيزات .

-حاجتها لطاقة كهربائية للقيام بعمليات الخلط والتهوية والتقليب بشكل مستمر.

-صناعة المخمرات الحيوية من مواد مقاومة للحموضة العالية، ويجب أن يكون اللقاح المستعمل فعالاً ونقياً.

-اختيار المواد الخام المناسبة وضبط درجة الحرارة، والتهوية(o2 المنحل)، وضبط درجة الpH وتأمين مستوى منخفض من المعادن الثقيلة (Mattey و**Kristiansen**،1999).

تتم عمليات التخمير العميق على مرحلتين:

الأولى تخصص لإنتاج الكتلة الحيوية في المخمر الابتدائي، والثانية تخصص لإنتاج الحمض في المخمر الإنتاجي (Rohr وزملاؤه ،1981).

تحضر المخمرات السابقة بغسلها وتعقيمها ببخار الماء الساخن، ثم يحضر وسط النمو المقترح ضمن المخمر الابتدائي، وتزرع أبواغ الفطر المناسبة بعد إجراء عمليات التعقيم والتبريد بتركيز 10^{-5}-10^{-7} بوغ/ سم3 ويستمر التخمير حتى تشكل الكتلة الحيوية، عندئذ تنقل محتويات هذا المخمر كاملة إلى المخمر الإنتاجي الذي سبق تنظيفه وتعقيمه وملؤه بوسط النمو المعقم، في هذه المرحلة لا يجوز إيقاف عمليات التهوية والخلط ولو لخمس دقائق لضمان وصول الأوكسجين إلى الكتلة الحيوية النامية(Gomezوزملاؤه،1988).

يلاحظ ظهور الرغوة على سطح وسط النمو لاحتوائه على مادة السابونين وكذلك عند النشاط العالي للعمليات الحيوية، ويتم إطفاء الرغوة بإضافة مضادات الرغوة مثل الحموض الدسمة والزيوت النباتية كما أنها تستهلك من قبل كتلة الفطر النامية كمصدر للكربون وذلك حسب البحاثة (Ricciardi وزملاؤه،1997)، ويفضل إضافة هذه المركبات على دفعات وحين اللزوم،لأن إضافتها دفعة واحدة يؤدي لانخفاض الأوكسجين المنحل في وسط النمو بدرجة كبيرة مما يؤدي إلى خفض نشاط عملية التخمر وضعف المردود(Wang وزملاؤه،2000).

ويستمر طور نمو الكتلة الحيوية خلال 60-70 سا حيث تستهلك معظم الآزوت في وسط النمو المستعمل عندئذ يبلغ معدل الكتلة الحيوية 8-10 غ مادة جافة / ل (Suzuki وزملاؤه،1996) بعدها يضعف نموها ليبدأ إنتاج حمض الليمون الذي يستمر حتى نفاذ مصدر الكربون في وسط النمو ويتراوح الزمن الضروري لإتمام عمليات التخمير ما بين 120-130 ساعة، وتعتمد هذه الفترة على نوع المادة الخام المستعملة، التي تطول عند استعمال المولاس كمادة خام لتصل إلى 140-160 ساعة تخمير في حين تصل عند استخدام النشاء كمصدر للطاقة إلى أكثر 160

ساعة وتتعلق طول فترة التخمير أيضاً بالظروف المحيطة بعملية التخمير،ويسخن المحلول التخميري بعد انتهاء عمليات التخمير إلى درجة حرارة 70 م° لمدة 15 د بهدف تخثر البروتين وقتل الكتلة الحيوية، ثم يستجر بعدها إلى أجهزة الترشيح لفصل الكتلة الحيوية عن المحلول الذي تجرى عليه عمليات تنقية وبلورة الحمض (Sarangbin وزملاؤه، 1993).

ثانيا"-الطاقة البديلة والغاز الحيوي:

2-2-1-الطاقة البديلة: وهي عبارة عن مصادر طبيعية دائمة وغير ناضبة متوفرة في الطبيعة ومتجددة باستمرار بالإضافة إلى كونها نظيفة ولا ينتج عن استخدامها تلوث بيئي وهي الطاقة الشمسية وطاقة الرياح و الطاقة المائية (الطاقة الكهرومائية – طاقة المد و الجزر – وطاقة الأمواج) وطاقة حرارة الأرض الباطنية بالإضافة إلى طاقة الكتلة الحيوية (Khatib، 1996) .

ولقد أصبح تطوير مصادر الطاقات المتجددة حاجة ماسة في وقتنا الراهن وذلك للحد من ظاهرة الاحتباس الحراري وكون المخزون النفطي العالمي في طريقه إلى النفاذ ، وقد أصبحت الطاقة المتجددة بجميع مصادرها وأشكالها تشكل نسبة متزايدة من إنتاج الطاقة العالمي وذلك حسب (Amon وزملاؤه، 2001).

وأكد تقرير صادر عن مركز الطاقة المتجددة الأوروبي لعام 2004 بأنه بحلول عام 2040 يمكن أن تغطي الطاقات المتجددة 50% من الطاقة الرئيسة في العالم.

وقد حددت دول الإتحاد الأوروبي أهدافاً أساسية فيما يتعلق بموضوع الطاقات المتجددة كالتالي:

1- يجب أن تشكل الطاقة المتجددة حوالي 22% من استهلاك الطاقة الكلي.

2- يجب أن يشكل الوقود الحيوي 5.75%من وقود السيارات عام2010.

وعلى الرغم من الصعوبات الكبيرة التي تواجه تقانات الطاقات المتجددة من كونها متقطعة غير مستمرة بالإضافة إلى كلفة استثمارها العالية ، إلا أن هناك استعمالات معينة تستطيع الطاقات المتجددة أن تلعب فيها دوراً رئيساً في تزويد الكهرباء للمناطق الريفية والنائية .

2-2-2- طاقة الكتلة الحيوية:

يطلق مصطلح الكتلة الحيوية على كل المواد ذات المنشأ العضوي، أي المواد الحاوية على الكربون في تركيبها الكيميائي، وتعرف بأنها الطاقة الناتجة عن المخلفات العضوية الصلبة والسائلة والحيوانية والنباتية كالمخلفات الزراعية و الصناعية ومياه الصرف الصحي، أو بمعنى آخر هي الطاقة الناجمة عن تدوير المخلفات السابقة عن طريق حرقها أو تخميرها لنحصل بعد معالجتها على منتجات هامة كالوقود (ايثانول – غاز حيوي ...) بالإضافة إلى الأسمدة العضوية(نشواتي ، 2007) .

وتعتبر طاقة الكتلة الحيوية مصدراً من مصادر الطاقات المتجددة ، وحالياً تمثل الطاقة المائية والكتلة الحيوية حوالي 15.2 % من إنتاج الطاقة العالمية (Amon وزملاؤه، 2001).

وتطورت التقنيات المطبقة على الكتلة الحيوية واستعمالاتها عالمياً وخاصة خلال العقدين الأخيرين، وتصنف هذه التقنيات بشكل عام إلى تقنيات حرارية (الحرق المباشر للمخلفات العضوية) وتقنيات حيوية (التخمر الهوائي و التخمر اللاهوائي)، ويعتمد اختيار هاتين التقنيتين بشكل أساسي على خواص المادة وكذلك على الحالة الاقتصادية و الاجتماعية (Classen وزملاؤه، 1999؛الخطيب ، 2006).

تعتبر سوريا من الدول الغنية بالمخلفات العضوية حيث تصل كمية المخلفات العضوية في سوريا إلى 2.15 مليون طن، وإن هذه الكتلة الحيوية الهائلة وما تحتويه من مركبات عضوية تتسبب في تلوث الهواء والمياه الجوفية بالإضافة إلى مشاكل بيئية ضخمة (العفيف وأمون، 2008).

أنواع طاقة الكتلة الحيوية :

تقسم الطرائق التي يتم بها تحويل المخلفات العضوية إلى طاقة إلى مايلي :

1"- التقنيات الحرارية :

-**الحرق المباشر:** تعتبر أبسط الطرائق لإنتاج الطاقة من المخلفات العضوية، وذلك عن طريق الحرق الكامل لها بوجود الهواء (أكسدة كاملة) ،حيث تتحول المادة العضوية إلى ثاني أوكسيد الكربون وبخار الماء .

- **التكسير الحراري أو التقطير الاتلافي (Pyrolysis)** : وهي عملية تحلل حراري للأخشاب أو المواد اللغنوسيللوزية بالتسخين بمعزل عن الهواء لينتج الكربون النباتي .

- **تحويل المخلفات العضوية إلى وقود غازي (Gasification)** : وهي عملية تحويل كامل للمخلفات العضوية الصلبة إلى وقود غازي بالحرق في جو محدود من الهواء (أكسدة جزئية)

- **تحويل المخلفات العضوية إلى وقود سائل (Liquefaction)** : تعتبر هذه الطريقة أكثر تعقيداً وأكثر تكلفة من الطرائق السابقة للحصول على الطاقة ،حيث يتم أولاً الحصول على الغاز وهو خليط من أول أكسيد الكربون والهدروجين ومن ثم يتم تنقية الغاز الناتج وتحويله إلى الميثانول وذلك في حرارة وضغط مرتفعين.

2"- التقنيات الحيوية :

• **إنتاج كحول الايثانول (التخمر الهوائي)** : يتم إنتاج كحول الايثانول على نطاق واسع من المخلفات العضوية المحتوية على نسبة عالية من المواد الكربوهيدراتية حيث يتم تخميرها باستخدام أنواع محددة من الأحياء الدقيقة ومن ثم يتم تقطير الكحول وتنقيته ليتم استعماله فيما بعد.

• **إنتاج الهيدروجين** : يعد غاز الهدروجين مصدر طاقة متجدد حيث أن احتراقه بوجود الأكسجين ينتج عنه الماء النقي الذي يعاد استخراج الهيدروجين منه مجدداً ، ويعد الهيدروجين أرخص أنواع الوقود نسبة إلى كمية الطاقة المخزنة فيه .

• **إنتاج الغاز الحيوي (التخمر اللاهوائي)**: تعد عملية التخمر اللاهوائي واحدة من التقنيات الحيوية الواعدة عالمياً لإنتاج الغاز الحيوي (طاقة نظيفة) الذي يستخدم كوقود أو يستخدم لتوليد الطاقة الكهربائية والحصول على السماد العضوي كأهم منتج مادي وكذلك جمع غاز الميثان الذي يفوق تأثيره تأثير ثاني أكسيد الكربون على ظاهرة البيت الزجاجي، إضافة إلى الحصول على بيئة نظيفة و الحد من انتشار الحشرات والأمراض، كذلك تمثل تقنية إنتاج الغاز الحيوي إحدى التقانات الملائمة للتنمية الريفية(Van وزملاؤه،1979).

يعرف الغاز الحيوي بأنه خليط غازي مكون من غاز الميثان وغاز ثاني أوكسيد الكربون بشكل أساسي بالإضافة إلى غاز النتروجين و الهيدروجين وأول أوكسيد الكربون والأكسجين وكبريت الهيدروجين، وكذلك يحتوي على كميات قليلة من بخار الماء والأحماض الدهنية الطيارة والكحولات، والغاز الحيوي غير سام وهو أخف من الهواء، تتراوح طاقته الحرارية بين 5000- 6000 كيلو كالوري /م^3 وتقدر الكفاءة الحرارية للغاز الحيوي بحوالي 60 % وهي تعادل مثيلاتها بالنسبة لمعظم أنواع الوقود الاخرى(Angelidakiو Sanders ، 2004)

وكل (1م^3) من الغاز الحيوي يعادل من حيث الطاقة (8كغ) حطب = 44 % بوتان =0.6 ليتر وقود =6.5 كيلو واط / ساعة (نشواتي ، 2007) .

تعود بدايات إنتاج الغاز الحيوي إلى عام 1776 في إيطاليا عن طريق العالم الكسندر فولتا وعرف في ذلك الوقت بغاز المستنقعات حيث كان ينتج من البحيرات المحتوية على المخلفات

النباتية المتحللة جزئياً،وأول من بدأ بدراسة إنتاج الميثان حيويا" من روث الحيوانات العالمRefe عام1808م ثم تلاها العالمAmleanske عام1895م،وقدأجرى العالمKozentof أبحاثا" حول فكرةAmleanske واستنتج أن الميثان كان يتولد من مواد عضوية في باطن الأرض وأن مكامن الغاز الطبيعي التي تشكلت عبر قرون هي إنتاج بكتريا لاهوائية وتوصل العالم الألماني Ymonفي عام 1920 م إلى إنتاج الغاز الحيوي عن طريق التخمر المستمر لمياه الصرف الصحي وأصبحت طريقته تستخدم لمعالجة مياه الصرف الصحي (العقلة،1990)

في عام 1890وضعت الهند برنامج حكومي لإنشاء مليون مخمر لإنتاج الغاز الحيوي،وفي الصين الشعبية فقد بدأت محاولات إنتاج الغاز الحيوي إلى عام (1920) بمحاولات فردية متفرقة، إلى أن بدأ البرنامج القومي في عام (1972) بإنشاء حوالي (5) ملايين وحدة منزلية للغاز الحيوي تتراوح أحجامها بين 4 إلى60 م^3،وفي عام (1940) بدأ انتشار استعمال تكنولوجيا الغاز الحيوي من مخلفات الصرف الصحي في الولايات المتحدة الأمريكية، وفي العام نفسه نشط الفرنسيون أيضاً في إنشاء وحدات للغاز الحيوي بلغ عددها ألف وحدة ، علاوة على إدخال الوحدات في بلدان شمال إفريقيا وفي البلاد العربية فإن انتشار هذا الشكل من الطاقة محدوداً جداً، واقتصر على أعداد قليلة من المخمرات في مصر والجزائر وتونس والمغرب ولبنان،وكانت معظمها ذات طابع تجريبي ولم تصل إلى المستوى الشعبي كما هو الحال في الهند والصين(Guliedge و Scnimel،1998) .

بدأ في سوريا مؤخراً (1997) إنشاء بعض الوحدات التجريبية من قبل وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي والمركز العربي لدراسات المناطق الجافة و الأراضي القاحلة (أكساد) بالإضافة إلى المركز الوطني لبحوث الطاقة، ولقد أجري عديد من البحوث حول آلية إنتاج الغاز الحيوي والمادة العضوية المتخلفة عنه، وبينت جميعها إمكانية استعمال المخلفات العضوية والحيوانية والنباتية ومخلفات الصرف الصحي والمخلفات الصناعية في إنتاج الغاز الحيوي واستثمار الطاقة الناتجة للاستعمالات الريفية وفي تشغيل محطات الصرف الصحي في المدن بالإضافة إلى القيمة الاقتصادية للراسب الناتج عن الهضم اللاهوائي التي تكمن في كونه سماد عضوي ذو مواصفات جيدة، وبالتالي يعد إنتاج الغاز الحيوي أحد الحلول التقنية المجدية اقتصادياً والسليمة بيئياً، وذلك حسب(Borken و Brume،2002).

2-2-3-إنتاج الغاز الحيوي من مصل الجبن:

بين Ghaly و Ramkumar عام (1999) أنه يمكن إنتاج الغاز الحيوي من مصل الجبن وذلك بمعدل(0.51) lN Kg^{-1}vs يوميا" ، و زمن التخمر (15) يوما".

وبين Gelegenis وزملاؤه عام (2007) أن استعمال مصل الجبن لإنتاج الطاقة ليس واسع الانتشار بالرغم من أن المصل له الإمكانية الكافية لإنتاج الغاز الحيوي ، كما بين أنه تم إنتاج الغاز الحيوي من زرق الدواجن ومصل الجبن بمعدل(2.2) lN Kg⁻¹vs يوميا" .

وجد أن التخمر المشترك بين المصل وروث الأبقار أنتج غازا" حيويا" بنسبة تصل إلى حوالي (0.966) lN Kg⁻¹vs يوميا" حيث كانت نسبة المواد الصبة الكلية 8% حسب البحاثة (Kavacik و Topaloglu، 2010).

ووجد أن عملية التخمر اللاهوائي لمصل الجبن بواسطة البكتريا تعطي غازا" حيويا" يحتوي على نسبة كبيرة من الميثان حوالي (50–70) % و (30–45)% من غاز CO2، و نسبة من H2S حوالي (50–2000)PPM حسب (Janis وزملاؤه، 2011).

كما يمكن استخدام الناتج الصلب الناتج عن عملية التخمر اللاهوائي لمصل الجبن كمادة محسنة للتربة الزراعية لما يحويه من أملاح معدنية من آزوت وفوسفور (بيطار، 1998).

2–2–4– تقانة إنتاج الغاز الحيوي:

تعتمد تقانة الغاز الحيوي على تفكك المخلفات و المواد العضوية وتحللها وذلك في ظروف لا هوائية بوساطة الكائنات الحية الدقيقة وبشروط ملائمة للعمليات الحيوية التي تقوم بها هذه الكائنات الدقيقة ضمن المخمر مما يؤدي إلى انطلاق غاز قابل للاشتعال يعرف بالغاز الحيوي والذي يشكل غاز الميثان الجزء الأكبر من تركيبه والذي يمكن استخدامه مباشرة كوقود أو لتوليد الطاقة الكهربائية، بالإضافة إلى أنه ينتج عن عملية التخمر مادة غنية تستخدم كسماد عضوي نظيف عالي الجودة وخالي من البذور الضارة و الكائنات الممرضة وليس له رائحة جاذبة للحشرات (Deshpande وزملاؤه، 1979؛نشواتي، 2007)، وتستخدم تقانة الغاز الحيوي بشكل ناجح لمعالجة مياه الصرف الصحي و مخلفات الحيوانات والمياه الناتجة عن المصانع والمخلفات الصلبة الآدمية والمخلفات الزراعية النباتية، وإن إنتاج الغاز الحيوي الغني بغاز الميثان بعملية الهضم اللاهوائي من محاصيل الطاقة وبقايا المحاصيل والمخلفات الحيوانية يمكن أن يكون خياراً هاماً لزيادة إنتاج الوقود الحيوي محلياً بالإضافة إلى أنه يساهم في التخفيف من انبعاث غازات الدفيئة وبالتالي الحد من ظاهرة الاحتباس الحراري، حسب(Glouke، 1985).

2–2–5– التخمر اللاهوائي (Anaerobic Digestion) :

يعرف التخمر اللاهوائي (الهضم اللاهوائي) بأنه عملية بيولوجية (حيوية) تحدث في غياب الأكسجين بحيث تؤمن الأحياء الدقيقة الطاقة اللازمة لنشاطها من خلال تحليل للمادة العضوية القابلة للتحلل حيث ينتج عن التحلل الكامل للمادة العضوية نواتج غازية نهائية هي CO2 حسب (العفيف و كروفوشكو ، 2009).

تحدث هذه العملية بشكل نموذجي ضمن مفاعلات مغلقة و بدرجات حرارة محددة ، ويمكن أن تحدث طبيعياً في التراب و المطامر بدرجة حرارة الوسط الخارجي (Poulsen، 2009).

يعتبر التخمر اللاهوائي للمواد العضوية أكثر كفاءة من التخمر الهوائي ، ففي المعالجة الهوائية تستخدم الأحياء الدقيقة الأكسجين الجوي لتحويل قسم من المادة العضوية إلى غاز ثاني أكسيد الكربون وماء وتحصل الأحياء الدقيقة على الطاقة اللازمة لنموها من خلال عملية الأكسدة هذه، لذلك يكون نموها سريعاً وقسم كبير من المادة العضوية يدخل في تركيب خلايا جديدة منها وبالمقارنة فإنه ينتج عن التخمر اللاهوائي غاز الميثان وتحصل الأحياء الدقيقة على طاقة قليلة نتيجة بطء نموها هذا بالإضافة إلى أن جزءا" بسيطا" من المواد العضوية يمكن أن يتحول إلى كتلة حيوية جديدة (Speece ،2007) .

تمر عملية التخمر اللاهوائي بأربعة مراحل وبمساعدة مجموعات مختلفة من الأحياء الدقيقة اللاهوائية إذ أن كل مرحلة من هذه المراحل تتم بوساطة مجموعة من هذه الأحياء(Wilkie،2005) .

2-2-6-مراحل التخمر اللاهوائي :

1-الحلمهة : خلال عملية الحلمهة تقوم البكتريا اللاهوائية بتحطيم الجزئيات العضوية المعقدة (البروتينات السكريات المتعددة ، الليبيدات) وتحولها إلى مونوميرات ، حيث تتحول البروتينات إلى أحماض أمينية وتتحول الدهون إلى أحماض دهنية وغليسيرول بينما تتحول الكربوهيدرات كالسكريات المتعددة والسيللوز والنشاء إلى سكريات بسيطة (سكريات أحادية) وبذلك تشكل هذه المركبات البسيطة وسطاً مغذياً ملائماً لنشاط المجموعة الجرثومية الثانية (الحمضية) ، وتتحلل الجزئيات المعقدة إلى جزئيات بسيطة بواسطة مجموعة من الأنزيمات الخارجية ومن هذه الأنزيمات أنزيم السيلولاز والبروتياز، وتعتبر مرحلة الحلمهة بطيئة نسبياً مقارنة بمراحل التحلل الأخرى(Magrinho وزملاؤه، 2006).

2-مرحلة التخمر الحامضي :

تقوم هنا مجموعة من البكتريا وتدعى بالبكتريا الحامضية بأكسدة السكريات البسيطة والأحماض الأمينية والأحماض الدهنية فينتج عن ذلك أحماض مختلفة مثل: (حمض الخل حمض البربيونيك، حمض النمل،حمض اللبن، وحمض الزبدة) والكحولات والكيتونات مثل الايثانول والميثانول والغليسرول والأسيتون وخلات الكربون والهيدروجين، ويعتبر حمض الخل الناتج الأساسي لتخمر الكربوهيدرات، وتختلف النواتج المتشكلة بحسب نوع البكتريا بالإضافة إلى ظروف الوسط (درجة الحرارة ،الpH) (Poliafico و Murfy،2007).

ويبين الجدول (3) المقارنة بين التخمر اللاهوائي والتخمر الهوائي

نوع التخمر	التخمر اللاهوائي	التخمر الهوائي
نواتج التفاعلات	$H_2, NH_3, H_2S, CH_4, CO_2$	PO_4, SO_4, CO_2, H_2O, NH_3, NH_2
المحاسن	–الحمأة الناتجة ضئيلة –للميثان كمركب نهائي له قيمة اقتصادية	– الحمأة الناتجة كبيرة –معدنة جميع المركبات القابلة للتحطيم
المساوئ	–انبعاث روائح مزعجة ناتجة عن التخمر –زمن التخمر من أيام حتى عدة أشهر –الجملة مغلقة	– الطاقة المستهلكة من أجل التهوية بالهواء عالية –زمن التخمر من (2–4) أسبوع –الجملة مفتوحة.
ظروف التخمر	*ضرورة عدم وجود أكسجين *التفاعل معقد ويمر بمراحل متتالية ومتداخلة ويحول المادة العضوية إلى مواد بسيطة ثم إلى غاز حيوي	*ضرورة وجود أكسجين *التفاعل بسيط ومباشر من خلال أكسدة المادة العضوية إلى ثاني أكسيد الكربون وماء
نواتج التخمر	*الغاز الحيوي(CH_4–CO_2) *سماد عضوي عالي الجودة	*غازات معظمها CO_2وH_2O *سماد عضوي منخفض الجودة

الطاقة المتولدة	*تختزن في صورة محتوى حراري بالغاز الحيوي أساسا"	*تنطلق مباشرة في صورة حرارة أكسدة
الأجهزة المستخدمة	*يتطلب استخدام أجهزة خاصة لضمان العزل التام عن الهواء ومعزولة حراريا" مع استخدام وسائل تقليب	*لا يحتاج إلى أجهزة خاصة بل يكتفي بتكويم المخلفات وتقليبها بين حين وأخر ،وفي العمليات الكبيرة قد يتطلب الأمر أجهزة نفث هواء.

الجدول (3) المقارنة بين التخمر اللاهوائي والتخمر الهوائي

(Ali وزملاؤه، 2000)

3-مرحلة الأكسدة المشكلة لحمض الخل : تقوم البكتريا المشكلة لحمض الخل بتحويل الأحماض الدهنية والكحولات إلى أسيتات (خلات) وهيدروجين وثاني أوكسيد الكربون الذي يتم استهلاكها بوساطة بكتريا الميثان، وتتطلب هذه المجموعة تركيز منخفض من الهيدروجين لتقوم بعملية تحليل الأحماض الدهنية، ولذلك يجب أن يتم في هذه المرحلة مراقبة شديدة لتركيز الهيدروجين ،لأنه تحت التركيز العالي جزئياً للهيدروجين ينخفض تشكل الأسيتات فيما تتحول المادة إلى حمض الزبدة وحمض البربيونيك ويتشكل الايثانول على حساب تشكيل غاز الميثان . وتعمل هذه التفاعلات على إنقاص الpH أي زيادة حموضة الوسط والذي يعتبر مناسبا" جداً لعمل البكتيريا المشكلة للأسيتات التي تفضل الوسط الحامضي (Debok وزملاؤه،2004) .

4-مرحلة تشكيل الميثان (Methanogenesis):تقوم بكتريا الميثان وهي بكتريا لا هوائية في المرحلة الأخيرة من عملية التخمر اللاهوائي بإنتاج غاز الميثان حيث أن ثلثي كمية هذا الغاز تشتق غالباً من الأسيتات أو من تخمر الكحولات وأما الثلث الآخر من الميثان فيتم إنتاجه من إرجاع غاز ثاني أوكسيد الكربون بالهدروجين، وتلعب بكتيريا الميثان دورا" هاما" في المرحلة النهائية من سلسلة التخمر اللاهوائي محولة نواتج التخمير ذات المستويات الغذائية الأعلى إلى نواتج خاملة نسبياً لا هوائيا"، وهي غاز الميثان وغاز ثاني أوكسيد الكربون، وإذا لم يتم نزع الهيدروجين فعلياً من المحلول من خلال نشاط بكتريا الميثان ذاتية التغذية سوف يتم تثبيط عمل بكتريا الخلات المنتجة للهيدروجين، وتعتبر البكتريا المنتجة للميثان حساسة جداً للظروف البيئية وتعمل ضمن مجال ضيق من درجات الحموضة (pH=6.5-7.5) (Duval وsteve،2000) ويوضح الشكل (1) المراحل الأساسية لعملية التحول الميكروبي للمواد العضوية المعقدة إلى ميثان في الشروط اللاهوائية حسب(Duval وSteve،2000).

الجزيئات المعقدة (بولميرات) ذات المنشأ البيولوجي

المرحلة الأولى:سيللوز ،نشاء، بروتين، شحوم، كيتين، ليغنين

↓

جزيئات أحادية أو بسيطة: سكروز ،غلوكوز، حموض أمينية، حموض دسمة ، غليسرين

↓

المرحلة الثانية: إيتانول،ميتانول،لاكتات،أستات،بروبيونات،بوتيرات،فورميات،CO2،H2

↓

المرحلة الثالثة: أسيتات،حموض عضوية، حمض الخل، CO2 ،H2

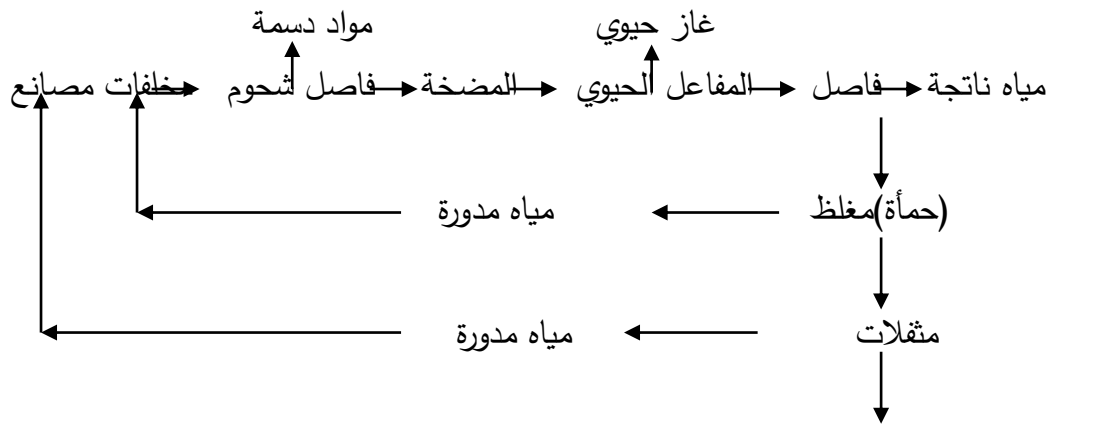
↓

المرحلة الرابعة:CH4+ CO2(الغاز الحيوي)

الشكل (1) المراحل الأساسية لعملية التحول الميكروبي

2-2-7- الأحياء الدقيقة المشاركة في إنتاج الميثان:تشارك في إنتاج غاز الميثان أحياء دقيقة من نوع:Methanogens– Methanogenic وتصادف في الطبيعة في الأماكن التي تتواجد فيها المواد العضوية (مالاشينكا يورو زملاؤه،1993).

ويبين الشكل (2) وحدة معالجة (بيولوجية لاهوائية) مستخدمة لمعالجة مخلفات معامل الألبان في ألمانيا حيث تمر المخلفات عبر المراحل الموضحة في الشكل.



الشكل (2) رسم تخطيطي لوحدة معالجة (لاهوائية) لمخلفات مصانع الألبان

2-2-8- العوامل المؤثرة في عملية الهضم اللاهوائي:

تتأثر عمليه الهضم اللاهوائي بعدد من العوامل أهمها : درجة الحرارة ، درجة الحموضة ، تركيز المادة العضوية ، تركيز المواد المغذية ، فترة الحضانة ، المحتوى الصلب، نسبة الكربون إلى الآزوت ، صفات المادة العضوية المراد تحليلها بالإضافة إلى التحريك (Poulsen ، 2009).
للتأكد من استقرار عملية الهضم اللاهوائي يوجد عديد من العوامل التي تعتبر كمؤشرات على عدم توازن العملية وهي : إنتاج الغاز الحيوي ، تركيب الغاز الناتج ، تغير الpH، بالإضافة إلى تركيب وتركيز الأحماض الدهنية القابلة للتطاير (Poliafico و Murfy ، 2007).
درجة الحرارة (Temperature) :تؤثر درجة الحرارة في الأنظمة الميكروبية بعدة طرائق تتضمن تأثيرها في معدل التحول الاستقلابي والتوازن الأيوني و قابلية انحلال المواد ، بالإضافة إلى تأثيرها في درجة رطوبة في الغاز الحيوي الناتج حيث يزداد المحتوى الرطوبي في الغاز الحيوي بشكل واضح مع ارتفاع درجات الحرارة ، كما تؤثر درجة الحرارة أيضاً في كمية الغاز والمواد العضوية القابلة للتطاير المنحلة ، بالإضافة إلى تركيز الأمونيا وكبريت الهيدروجين في الغاز الناتج (AbouNahra وزملاؤه، 2003) .
تصنف الأحياء الدقيقة السائدة في المفاعلات اللاهوائية بالنسبة لتأقلمها مع درجات الحرارة في ثلاث مجالات حسب (Borken و Brume ،2002):
• الأحياء الدقيقة التي تعيش في مجال الحرارة المرتفعة Thermophilic(50−70م°).
• الأحياء الدقيقة التي تعيش في مجال الحرارة المعتدلةMesopilic(25−40 م°) .
• الأحياء الدقيقة التي تعيش في مجال الحرارة المنخفضة Psychrophilic (25−5م°).
وتعد درجة الحرارة 35م°هي درجة الحرارة المثالية ضمن المجال الحراري المعتدل حيث أن إنتاج الغاز لايتأثر بزيادة درجة الحرارة عن الحد الأمثل 35م° بدرجات قليلة بينما الإنخفاض عن هذا الحد بدرجات قليلة يؤدي إلى انخفاض إنتاج الغاز الحيوي بشدة (البلخي ، 2001)، وتعتبر درجة الحرارة 55م°هي درجة الحرارة المثالية ضمن المجال الحراري المرتفع، والتي تؤمن أفضل نمو للبكتيريا المحبة للحرارة المرتفعة وتوفر أفضل إنتاج لغاز الميثان (Lund وزملاؤه ، 1996) ويبين الجدول (4) مقارنة عملية التخمر اللاهوائي التي تتم في درجات الحرارة المرتفعة والتي تتم في درجات الحرارة المعتدلة من حيث المزايا والمساوئ.

جدول (4) مقارنة بين عملية التخمر اللاهوائي في درجة الحرارة المرتفعة وفي درجة الحرارة المعتدلة

التخمر اللاهوائي	درجات الحرارة المعتدلة (32-42) م°	درجات الحرارة المرتفعة (50-70) م°
المزايا	• استقرار جيد لعملية الهضم اللاهوائي • عدم الحاجة إلى عملية تحكم معقدة • تركيز بخار الماء ضمن الغاز الحيوي الناتج قليل نسبياً • الحاجة إلى طاقة تشغيل أقل	•نمو سريع للأحياء الدقيقة • إنتاجية عالية من الغاز الحيوي في وحدة الزمن • زمن تخمر قصير نسبياً • كمية المواد الناتجة عن عملية التخمر اللاهوائي قليلة نسبياً
المساوئ	• إنتاجية أقل من الغاز الحيوي في وحدة الزمن •زمن تخمر كبير نسبياً . • معدل تحلل أقل.	• استقرار أقل لعملية التخمر اللاهوائي . • الحاجة إلى عملية تحكم معقدة • الحاجة إلى طاقة تشغيل أكبر • تركيز بخار الماء ضمن الغاز الحيوي عالي .

(العفيف ، 2008)

تتميز البكتيريا التي تعمل ضمن مجال درجة الحرارة المعتدلة بأنها أكثر نشاطاً وقدرة على تحمل المتغيرات البيئية، وتحتاج إلى وقت أطول لتكمل عملية الهضم ، كما أنها تحتاج لمفاعلات بحجم أكبر، إلا أن البكتريا التي تعمل ضمن مجال حرارة مرتفعة تكون حساسة جداً للمتغيرات البيئية (Debok وزملاؤه، 2004).

وتتميز المعالجة اللاهوائية في مجال الحرارة المرتفعة بأنها أقل استقراراً مقارنة مع مجال الحرارة المعتدلة، كما أن الانتقال من مجال الحرارة المرتفعة إلى مجال الحرارة المعتدلة يؤدي إلى موت الخلايا البكتيرية المسؤولة عن إنتاج غاز الميثان (Fang وWai-chungchung، 1999).

• **زمن التخمر:**

يعرف زمن التخمر بأنه متوسط عدد الأيام التي تمكثها المواد المتخمرة داخل المخمر، ويمكن أن يحسب زمن التخمر بقسمة حجم المخمر على حجم المواد الداخلة إلى المخمر يومياً، وقد أثبت عدد من الدراسات أن الحد الأدنى لزمن بقاء المادة المتخمرة داخل وحدة الهضم يجب أن يزيد عن الزمن اللازم لتكاثر البكتريا المنتجة للميثان (بكتريا الميثان) وذلك لكي لا يتم إزالة المادة العضوية من المخمر فيما إذا كان زمن الحضانة أقل من الزمن اللازم لتكاثر البكتريا في نظام التغذية المستمر (Poulsen، 2009).

يعتبر زمن التخمر المثالي هو الزمن الذي نحصل من خلاله على 80% من الغاز الحيوي الناتج عن العينات وبشكل عام فإن انخفاض زمن التخمر يترافق بانخفاض شديد في إنتاج غاز الميثان(العفيف، 2008).

ويعتمد زمن التخمر بشكل أساسي على :

1- درجة الحرارة: حيث يقل زمن التخمر بارتفاع درجة الحرارة إلى حوالي 60م°، ويتراوح زمن الحضانة بالنسبة للمخلفات التي تتم معالجتها في مخمر بمجال حراري معتدل بين (10-40) يوم أما بالنسبة للمخمرات ذات المجال الحراري المرتفع فهو بحدود 14 يوم (Wikie،2005).

2- طبيعة المادة المراد تخميرها: بحيث يجب أن يكون هذا الزمن طويل ليسمح بعمليات الاستقلاب التي تتم بوساطة البكتريا اللاهوائية ضمن المفاعل(Rozzi وMalpei، 1996).

3- نوع وحدة الهضم وحجمه:

أي بازدياد زمن الحضانة كلما كان حجم الهاضم أكبر (البلخي ، 2001).

• **درجة الحموضة (pH) :**

تعتبر الحموضة عامل هام في عملية التخمر اللاهوائي، وتؤثر درجة الحموضة في النمو الميكروبي وفي فصل وانحلال بعض المركبات ضمن المخمر (Borja وزملاؤه، 2002).

تعطي درجة الحموضة مؤشراً عن العوامل الكيميائية ضمن المخمر اللاهوائي وذلك حسب البحاثة(Horiuchi وزملاؤه، 2003).

ومن أهم العوامل الكيميائية هي قلوية النظام ، الضغط الجزئي لغاز CO_2(حيث ينحل غاز CO_2 في المحلول ويتحول إلى كربونات) حيث كلما زاد الضغط زاد الانحلال، بالإضافة إلى أنها مؤشر إلى تركيز الأحماض الدهنية القابلة للتطاير في الوسط.

لكل مجموعة من الأحياء الدقيقة المستخدمة في عملية التخمر اللاهوائي درجة حموضة مثالية للنمو، فمثلا" بالنسبة للأحياء الدقيقة الحامضية فإن درجة الحموضة المثالية pH(6) ، بينما من أجل الأحياء الدقيقة المنتجة للخلات وغاز الميثان فإن درجة الحموضة المناسبة هي pH (7) وبشكل عام ينخفض معدل نمو الأحياء الدقيقة المنتجة لغاز الميثان بشدة عند(6.6)pH وذلك حسب (Mossbrugger وزملاؤه، 1993)،وبشكل عام تستطيع معظم أنواع البكتريا اللاهوائية المنتجة لغاز الميثان أن تعمل في مجال pH(6.7– 7.4) حيث أنه في الفترات الأولى للتخمر تنتج كميات كبيرة من الحموض العضوية و بالتالي تنخفض درجة الحموضة داخل المخمر إلى pH (5)(Mossbrugger وزملاؤه، 1993)،وهذا بدوره يوقف عملية التخمر بتثبيطه نمو الجراثيم المنتجة لغاز الميثان(Mechichi و Sayada،2005).

ولكن تتراوح درجة الpH المثالية بين 7–7.2 (Borja وزملاؤه، 2002).

ويتوقف إنتاج الغاز الحيوي تماماً عند pH أقل من 4.5 (البلخي ، 2001) .

يمكن أن تفشل عملية التخمر إذا كانت قيمة الpH أقل من 6 ، وتنتج البكتريا المنتجة للأحماض أحماض عضوية تؤدي إلى خفض قيمة الpH، وفي الظروف الطبيعية يؤدي زيادة تركيز ثنائي الكربون والذي يتم إنتاجه من قبل بكتريا ميثان إلى انخفاض قيمةالpH (Borja وزملاؤه،2002)

تعتبر الأحياء الدقيقة المنتجة لغاز الميثان حساسة جداً لدرجة الحموضة، ولا تنمو في درجة حموضة أقل من 6.5، ولاحقاً وباستمرار عملية الهضم يزداد تركيز الأمونيا بشكل متناسب مع هضم الآزوت وهذا بدوره يؤدي إلى رفع قيم الحموضة إلى أكثر من 8 وبالتالي عندما يثبت مستوى إنتاج الميثان يبقى مجال درجة الحموضة بين 6.9 و 6.7 (Gallert وزملاؤه،1998) وللمحافظة على درجة حموضة ضمن المخمر 6.7– 7.4 يتم إضافة قلوي مثل بيكربونات الصوديوم وذلك لتحطيم الحموض الدسمة ذات السلاسل الطويلة والتي تعتبر سامة بالنسبة للأحياء الدقيقة ، أو أن تضاف مواد تحتوي نسبة عالية من البروتين(Pind وزملاؤه، 2002)

• المحتوى الصلب الكلي (Total solids content) :

يشير هذا المصطلح إلى مجموع الأجسام الصلبة المنحلة و المعلقة في العينة ، أو بمعنى آخر هو عبارة عن تركيز المادة الجافة في المادة العضوية المراد تخميرها ، ويزداد معدل إنتاج الغاز الحيوي بزيادة تركيز المواد الصلبة الكلية في محلول التخمير إلى حد معين وذلك تبعاً لنوع المادة العضوية المستخدمة ، ويتم تحديد التركيز الأمثل بالاعتماد على حجم المخمر ودرجة الحرارة وتركيز الأمونيا الناتجة عن هضم المادة العضوية المراد تخميرها وتركيز الأحماض الدهنية الطيارة الناتجة بالإضافة إلى الناحية الهندسية المتعلقة بمدى سهولة سريان محلول التخمير من وإلى المخمر (VDI 4630، 2006؛8–414 DIN 38،1998)

ويمكن لعملية التخمر اللاهوائي أن تتم في مجال واسع من تركيز المادة الجافة لمواد العضوية المراد تخميرها ويتراوح هذا التركيز مابين2-25%، ويفضل أن يكون تركيز المادة الجافة في المخمرات التي تعالج المخلفات الحيوانية 3-12% (Poulsen، 2009).

ويتراوح التركيز الأمثل لروث الأبقار ما بين8-10% وفي حالة زرق الدجاج 6-7% وذلك حسب (إسكوا ، 1989) .

وتعتبر المحافظة على محتوى صلب محدد من المواد الداخلة إلى المخمر عامل هام وأساسي في توازن عملية التخمر لأن التغير في هذا المحتوى ينتج عنه تثبيط وفشل في عملية التحلل بسبب زيادة إنتاج الأحماض العضوية(Poulsen ،2009).

وبشكل عام فإن المحافظة على تركيز المواد الصلبة (الجافة) الكلية بنسبة 8-10% يساعد على سهولة سريان المواد العضوية المراد تخميرها دون الحاجة إلى عملية ضخ كما أنه يحافظ على توازن عملية الهضم اللاهوائي (Nicholas وزملاؤه، 1980).

• العناصر المغذية (Nutrients) :

تتطلب عملية التحلل اللاهوائي الفعالة مجموعة من العناصر المغذية كالآزوت و الفوسفور والكربون وبعض العناصر المعدنية، ويعد الآزوت والفوسفور من المتطلبات الغذائية الضرورية حيث تستهلك البكتريا المنتجة للميثان الآزوت بسرعة كبيرة وذلك لتؤمن احتياجاتها البروتينية اللازمة للنمو حيث يدخل الآزوت في صنع البروتينات والحموض النووية و النكليوتيدات وجدر الخلايا الجرثومية، كما يعد الفوسفور ضروري لإعادة إنتاج وتحلل الخلايا الجرثومية وذلك حسب (Saez وزملاؤه، 1992؛ Hu وزملاؤه،2003)، وكذلك يحفز وجود بعض العناصر المعدنية بتراكيز منخفضة عملية التخمر اللاهوائي مع العلم أن التركيز المرتفع لهذه العناصر قد يؤدي إلى تثبيط عملية التخمر اللاهوائي، فمثلاً وجود الأمونيا بتركيز 50-200مغ/ل يشجع نمو البكتيريا وبالتالي يحفز عملية التخمر، إلا أن وجودها بتركيز فوق 1500مغ/ ل له تأثير سمي على عملية التخمر اللاهوائي، ويبين الجدول (5) تراكيز أهم العناصر المطلوبة لضمان نشاط بكتريا الميثان ضمن المخمر.

جدول (5) الحدود الصغرى و العظمى لبعض العناصر الهامة لعملية التخمر اللاهوائي

العنصر	الحد الأدنى	الحد الأعلى
النتروجين	0.15 g/L	0.45 g\L
الفوسفور	0.05 g\L	0.15 g\L
الكبريت	0.05 g\L	0.1 g\L
البوتاسيوم	0.075 g\L	0.25 g\L
المغنزيوم	0.01 g\L	0.04 g\L
الصوديوم	0.045 g\L	0.2 g\L
الكالسيوم	0g\L	0.075 g\L
الحديد	0.01 g\L	0.2 g\L
النيكل	0.5 mg\L	30 mg\L
الكوبالت	0.5 mg\L	20mg\L
المولبيديوم	0.1 mg\L	0.35 mg\L
النحاس	0 mg\L	0.75 mg\L
الزنك	0 mg\L	3 mg \L
المنغنيز	0 mg\L	0.1 mg \L

(Bejarano و Madrid , 1994)

•نسبة الكربون إلى الآزوت (Carbon\Nitrogen Ratio) :

للحفاظ على نشاط البكتريا في أعلى مستوياته لابد من توفر المواد الأنفة الذكر كالكربون والفوسفور في المادة العضوية ولكن في نسب محددة ، فعلى سبيل المثال يفضل أن تكون نسبة P:N:C (1:5:150) أي نسبة C\N (30:1) (البلخي ، 2001) .

وتعد نسبة C\N أحد المؤشرات الهامة على قابلية وسرعة المواد العضوية على التفكك وإنتاج الغاز الحيوي ويعد الحفاظ على أقصى نشاط للبكتريا ضرورياً للحصول على أعلى إنتاج من الغاز الحيوي وهذا يتطلب وجود عناصر كالكربون والآزوت والفوسفور في المادة العضوية ولكن وفق نسب محددة .

فإذا كانت نسبة الكربون إلى الآزوت مرتفعة سوف يتم استهلاك الآزوت المتوافر بسرعة من قبل بكتريا الميثان وبالتالي سوف ينعكس ذلك على الانخفاض في إنتاج الغاز الحيوي، أما إذا كانت نسبة الكربون إلى الآزوت منخفضة فإن ذلك سوف يؤدي إلى تراكم الأمونيا وارتفاع الpH إلى أعلى من 8.5 والذي له تأثير سمي على البكتريا المنتجة للميثان.

ومن أجل الحصول على نسبة مثالية من C\N تتم عملية تخمر مشترك لمواد ذات نسبة C\N مرتفعة (مواد عضوية صلبة) ومواد ذات نسبة C\N منخفضة (مخلفات حيوانية) كما في الجدول (6).

جدول (6) نسبة C\N في بعض المواد العضوية

المادة	روث الماشية	زرق الدجاج	مخلفات آدمية	تبن القمح	قش الأرز	قش الذرة الصفراء
C\N	25\1	15\1	3\1	83\1	67\1	60\1

Bjornsson(وزملاؤه،2000)

• المواد السامة – المثبطة (Toxic Substances):

يوجد مجال واسع من المواد السامة المسؤولة عن فشل عملية التخمر اللاهوائي ومنها المبيدات و المنظفات الصناعية والمضادات الحيوية و المعادن الثقيلة بالإضافة إلى التراكيز العالية من الليبيدات و الأحماض الدهنية القابلة للتطاير و الفينولات وبعض العناصر المعدنية و الأحماض الدهنية طويلة السلسة (حمض النخيل وحمض النمل ..)،وبشكل عام تعتبر بكتريا الميثان أكثر حساسية للتأثر بالمواد السامة مقارنة مع بقية الكائنات الحية الدقيقة التي تتواجد ضمن عملية التخمر اللاهوائي(Heredia–Beltran وزملاؤه، 2000).

•عملية التحريك (Mixing) : تعتبر عملية تحريك محتويات المخمر من العوامل التي تساعد على رفع كفاءة عملية التخمر اللاهوائي حيث تساعد هذه العملية على زيادة إنتاج الغاز الحيوي وتقليل زمن الحضانة وتحول عملية التحريك دون تكون طبقات منفصلة في محلول التخمير وتعمل على زيادة فرص تماس المواد المتخمرة مع بكتريا التخمر ، كما تساعد على تجانس درجة حرارة المخمر وذلك حسب (Poliafico و Murfy، 2007).

إلا انه يجب عدم زيادة عملية التحريك عن حد معين لأنه يمكن أن تؤدي إلى تخريب الخلايا البكتيرية وتختلف درجة التحريك المطلوبة ونوع أداة التحريك بحسب نوع المخمر ومحتوى المواد الصلبة في المخمر.

• الصفات الطبيعية للمادة العضوية المستخدمة: تؤثر الصفات الطبيعية للمادة العضوية في نوعية وكمية الغاز الحيوي الناتج وكذلك في نوعية الراسب أيضاً فالمخلفات السائلة تماماً والتي لا تحتوي مواد صلبة لا توفر سطوحاً تنشط عليها البكتريا مما ينعكس سلباً على إنتاج الغاز

الحيوي ، كما أنه كلما زادت درجة تفتيت المادة العضوية كلما أدى إلى زيادة إنتاج الغاز الحيوي ولذلك فإن تقطيع بعض المواد أو طحنها أو تنعيمها يزيد من إنتاجية الغاز الحيوي نتيجة لزيادة السطح النوعي لهذه المواد (البلخي ، 2001).

وكذلك التحكم في عملية تخفيف محلول التخمير إلى حد معين هو عامل مهم لأنه يعمل على التخفيف من الأثر المثبط لبعض العناصر (Wilkie، 2005).

• **الأحماض الدهنية المتطايرة (Volatile Fatty Acids)** : تعرف الأحماض الدهنية المتطايرة بأنها الأحماض التي يبلغ عدد ذرات الكربون 2–5 ذرات الكربون ، وهي أحماض ذوابة في الماء على الرغم من أنها ذات نقاط غليان عالية إلا أنها يمكن أن تزال من المحلول المائي بالتقطير وأكد عدد من الدراسات ان محتوى الحامض الدهني المتطاير يعد مؤشرا" جيدا" على توازن عملية الهضم اللاهوائي ، حيث أن تراكم هذه الأحماض له تأثير مثبط في عمل المخمر وسير عملية التخمر اللاهوائي .

وأشارت عديد من الدراسات إلى أن عملية الهضم اللاهوائي تسير بشكل مثالي إذا كان محتوى حمض الاسيتيك أقل من 1غ/ل ومحتوى البربيونيك أقل من 200 مغ/ل، وعلى العكس إذا تجاوز المحتوى الكلي للحامض الدهني3غ/ل أو كان محتوى البروبيونيك أعلى من 300 مغ/ل فإن هذا يدل على وجود عرقلة في عملية التخمر اللاهوائي (Bjornsson وزملاؤه، 2000).

• **التخمر المشترك (Co–fermentation)** :يعرف التخمر المشترك بأنه تخمر لاهوائي لمزيج من المواد العضوية المختلفة المحددة من حيث تركيبها العضوي لإنتاج الغاز الحيوي أو بمعنى آخر هي عملية تخمر لاهوائي تحدث في وقت واحد لمزيج من مادتين أو أكثر من المواد العضوية (Gadus و Krocko، 2006؛العفيف وكروفوشكو ، 2009).

وبدأ باستخدام تقانة التخمر المشترك بشكل واسع في العقد الأخير من هذا القرن ، والحالة الأكثر شيوعاً من التخمر المشترك عندما يتم مزج كمية أساسية من المادة الأساس مع كمية ثانوية من مادة أو أكثر من المواد الإضافية ليتم فيما بعد هضمها لاهوائياً معاً ضمن نفس المخمر، ومن المهم جداً في عملية التخمر المشترك الانتباه إلى كمية ونوعية المواد المضافة للتأكد من استمرارية عملية الهضم اللاهوائي، لذلك يجب معرفة تركيب المادة المضافة بالإضافة إلى الفترة الزمنية الضرورية لبقاء المادة العضوية في المخمر وبالتالي الوصول إلى الهضم الكافي للمواد العضوية.

وتتجلى مزايا التخمر المشترك حسب(Gadus و Krocko ،2006) في:

1– تعديل نسبة C\N ضمن الحدود المثالية لنشاط البكتريا المولدة لغاز الميثان .

2–امكانية استخدام أنواعا" مختلفة من المواد العضوية والتي تتواجد بالقرب من معمل إنتاج الغاز الحيوي

3-إمكانية رفع الكفاءة الاقتصادية لعملية إنتاج الغاز الحيوي، وزيادة إنتاج الغاز الحيوي أو نسبة الميثان.

3-مواد وطرائق البحث

(Materials and Methods)

3-1-إنتاج حمض الليمون:

3-1-1- مواد البحث:Materials

1"- سلالات الفطر الأسود القياسي:

تم استيراد سلالتين من الفطر الأسود(*Aspergillus Niger*) من(معهد التقانات الحيويةالغذائية) من بولونيا والمحسنة وراثيا"و المطفرة، وأعطيت الرمز (PLA40 وPLA30).

2"-السكروز.

3"-مصل الجبن: تم تأمين المصل من شركة ألبان دمشق،حيث أحضر المصل بعد عملية التصنيع مباشرة ونقل إلى المخبر لتحديد تركيبه الكيميائي وتم حفظه بالبراد حتى وقت استخدامه.

3-1-2-الأجهزة المستخدمة في هذا البحث:

1"- جهاز التحضين (الحاضنة) أو المخمر: لطريقة التخمير السطحية.

2"- جهاز الرجاج (الهزاز) أو Shaker: لطريقة التخمير العميقة.

3-1-3- طرائق العمل:

1"- تقدير التركيب الكيميائي للسكروز:

تم تقدير كل من محتوى الرطوبة والسكروز وكمية السكريات المرجعة والرماد للسكروز المستخدم في تنمية الفطر وفق الطريقة الموصى بها في (AOAC، 1995).

2"-الاختبارات الكيميائية لمصل الجبن :

تم تحديد التركيب الكيميائي للمصل المستخدم في عملية إنتاج حمض الليمون(المواد الدسمة اللاكتوز ، الرطوبة ،الحموضة الكلية والآزوت الكلي) وفق الطريقة الموصى بها حسب (AOAC،1995).

وتم تعيين الفوسفور بقياس طيف الامتصاص الذري(طريقة الترميد) وفق الطريقة الموصى بها في (AOAC،1995) ، حيث تم ترميد عينة مصل الجبن على حرارة550 م° لمدة ساعتين ثم أذيب الرماد الناتج بحمض كلور الماء ثم قدر الفوسفور بقياس طيف الامتصاص الذري.

وتم قياس المتطلب الأكسجين الكيميائي COD بأخذ عينة من المصل وأضيف إليها ديكرومات البوتاسيوم(0.25 ن) في وسط حامضي مع التسخين لمدة ساعتين بدرجة حرارة 120 م°،ثم تمت معايرة الكروم الثلاثي الناتج عن أكسدة المادة العضوية بملح مور:

(98 غ من $(NH4)2SO4$ Fe +20 مل $H2SO4$ كثيف) بوجود كاشف الفورمالين ، وحسبت كمية الأكسجين المستلزم كيميائيا وفق الطريقة (AOAC،1995) باستخدام القانون التالي:

$$COD = \frac{(X1 - X2) \times 0.25 \times 800}{\text{حجم العينة (مل)}} \times \text{نسبةالتمديد}$$

حيث :

X_1: كمية ملح مور المستهلكة في العينة.

X_2: كمية ملح مور المستهلكة في التجربة الشاهدة.

3"- أوساط الزرع المستخدمة في تخمير مصل الجبن :

1-وسط السكروز: حضر (3) ليتر من محلول السكروز بتركيز (150)غ/ل وتم ضبط درجة حموضة الوسط على درجة pH = 3 باستخدام حمض الكبريت (2 ن) للوصول إلى الدرجة المثلى لعملية إنتاج حمض الليمون (Arbakariy وزملاؤه،1995).

كما أضيف نترات الأمونيوم (1غ/ل) كمصدر للآزوت و فوسفات أحادية البوتاسيوم بمعدل (0.15غ/ل) كمصدر للفوسفور و كبريتات المغنزيوم (0.5 غ/ل) كعامل منشط وذلك حسب(Honeckers وزملاؤه، 1989) ، واستخدمت هذه الإضافات لحاجة الفطر إليها في إنتاج المشيجة و الأبواغ.

2-وسط مصل الجبن: تم تحضر (3) ليتر من مصل الجبن وضبط تركيز سكر اللاكتوز فيه إلى (150)غ/ل (بإضافة بودرة اللاكتوز)، وضبطت درجة حموضة باستخدام حمض الكبريت (2 ن) إلى درجة pH (3) حسب(Yigitoglu و Mcneil، 1994؛Arbakariy وزملاؤه،1995) ثم أضيفت المكملات الغذائية المبينة في الجدول (7) إلى البيئة، ووزعت كما في الطريقة السابقة حسب (Roukas وزملاؤه ، 1991؛Lesniak، 1979)

الجدول (7) المكملات الغذائية المضافة لبيئة مصل الجبن

المركب المضاف	الصيغة الكيميائية	الكمية المضافة	الملاحظات

		غ/ل	
نترات الأمونيوم	NH4 NO3	0.5	مصدر للآزوت
فوسفات أحادية البوتاسيوم	KH2 PO4	0.15	مصدر للفوسفور والبوتاسيوم
كبريتات التوتياء	ZN SO4	0.05	للارتباط مع الكمية الزائدة من حديدي سيانيد البوتاسيوم
حديدي سيانيد البوتاسيوم	K4[Fe (CN)6]	0.36	لتثبيط التأثير السام للمعادن الثقيلة

4"–دراسة تأثير المكملات الغذائية ودرجة pH لوسط مصل الجبن في إنتاج حمض الليمون:

تم اختيار أفضل سلالة من الفطر الأسود والتي أعطت أعلى إنتاج من حمض الليمون عند تنمية كل منها على وسطي النمو المستخدمين في الدراسة (السكروز ومصل الجبن).

ثم تم دراسة تأثير كل من تركيز سكر اللاكتوز والمكملات الغذائية في إنتاجية الفطر الأسود لحمض الليمون على بيئة مصل الجبن كما يلي :

–حضر وسط مصل الجبن كما ذكر سابقاً مع تغيير تركيز السكر المضاف بحيث احتوى الوسط على التراكيز التالية(:40غ/ل،90غ/ل،150غ/ل،180غ/ل) والموزعة ضمن دوارق سعة 500 مل وبمعدل مكررين لكل تركيز.

–كما تم دراسة تأثير رقم pH الوسط في إنتاجية الحمض بحيث ضبطت درجة pH الوسط على الدرجات :(2.5 ، 3، 3.5 ، 4 ، 4.5).

–تم اختيار أفضل تركيز من السكر ودرجة الحموضة والتي أعطت أعلى مردود من حمض الليمون ودرس تأثير تركيز المكملات الغذائية بحيث استخدم كل من نترات الأمونيوم بالتراكيز (0 غ/ل ،0.5 غ/ل، 1 غ/ل ،1.5 غ/ل، 2غ/ل) وسيانيد البوتاسيوم بالتراكيز (0 غ/ل، 0.3 غ/ل 0.6غ/ل ،0.9 غ/ل) و فوسفات أحادية البوتاسيوم بالتراكيز:(0 غ/ل، 0.05 غ/ل 0.15 غ/ل 0.25غ/ل، 0.30 غ/ل) و كبريتات التوتياء بالتراكيز:(0 غ/ل ،0.06 غ/ل،0.1 غ/ل 0.12 غ/ل) و كلور الصوديوم (ملح الطعام) بالتركيز:(0 %، 2 %، 6 %، 10 %، 12%).

– وتم استعمال المخمر الرجاج (shaker) لطريقة التخمير بالطريقة العميقة لإنتاج حمض الليمون بالاعتماد على القيم المثلى المختارة للوسط الزرعي(مصل الجبن) من الدراسات السابقة.

5"– تعقيم البيئات المغذية:

وزعت البيئة المغذية على (12) دورقا" نظيفاً ومعقماً سعة (500) مل وبمعدل (250) مل من البيئة في الدورق الواحد حيث بلغت نسبة الحجم للسطح المعرض للهواء في بيئات التخمر (4)مل/سم^2 ، غلفت الدوارق الزجاجية جميعاً بنوع خاص من أغطية النسيج القطني الذي يسمح

بالتبادل الهوائي، ويمنع عبور الجراثيم ، ثم عقمت في جهاز التعقيم الرطب (الأوتوغلاف) على درجة حرارة120 م° لمدة 20 دقيقة وكررت عملية التعقيم مرة أخرى بعد فترة (24) ساعة لضمان خلو البيئة المغذية من أي تلوث.

6"-عزل الفطر الأسود محلياً:

استخدمت عدد من عزلات الفطر المحلية وتوصلنا إلى عزلتين محلتين من الفطر الأسود لأفضل إنتاج من حمض الليمون باستعمال المواد الخام الآتية (بصل متعفن وشراب التوت) التي وضعت في ظروف حفظ غير مناسبة، حيث بعد ظهور نموات لأعفان مختلفة ، عزلت النموات التي تخص الفطر الأسود باستعمال الوسط الزراعي بطاطا دكستروز أغار (PDA) وقد عزلت العزلة الأولى من البصل المتعفن ورمز لها بالرمز C، وعزلت الثانية من شراب التوت المتعفن ورمز لها بالرمز D، وتم تنشيطها مرة كل أسبوعين (باشا وزملاؤه،1999).

وتم التعرف على الفطر الأسود حسب (Fassatiova،1986 ؛Moreira، 2006) ،وقياس الأبعاد المجهرية للعفن النامي بواسطة الطريقة الموصوفة عند (بودوين،1991).

7"-تنشيط مزارع الفطر الأسود المحسنة وراثياً:

نشطت سلالات الفطر الأسود المحسنة وراثياً من الفطر *Aspergillus Niger* والمرمزة بـ(PLA40 ،PLA30) باستعمال وسط بطاطا دكستروز أغار(PDA) (3) مرات متتالية وبمعدل (3) أطباق للمرة الواحدة، وأخذت أبواغ الفطر الأسود من الطبق الأخير وزرعت في أنابيب اختبار زجاجية تحوي الوسط الزرعي المعقم ذاته بشكل مائل ضمن حجرة العزل الجرثومي ثم حضنت بدرجة حرارة (30م°) ولمدة 3 أيام ثم تركت بدرجة حرارة الغرفة لـ7 أيام أخرى وكررت العملية عدة مرات لتنشيط أبواغ السلالات الفطرية المستخدمة بشكل كامل للحصول على نشاط حيوي عال (Faiez وزملاؤه،2007).

8"- تلقيح البيئات المغذية بأبواغ المزارع الفطرية من الفطر الأسود المعزول:

رقمت الدوارق الزجاجية المعقمة والمبردة إلى درجة حرارة 35 °م بشكل متسلسل ، وبمعدل ثلاثة مكررات لكل معاملة، ولقحت بأبواغ المزارع الفطرية من السلالات والعزلات الأربع في داخل حجرة التحضين بتركيز أبواغ 75ملغ/م² أو 10000بوغ/مل(بطريقة الأطباق المخطوطة) ثم حضنت الدوارق الزجاجية داخل غرفة التحضين بدون رج أو اهتزاز وذلك لمنع غرق الأبواغ الفطرية المعلقة أو الطافية على سطوح البيئات المغذية السائلة وضبطت درجة حرارة غرفة التحضين على الدرجة 33 م في الأيام الثلاثة الأولى وعلى الدرجة 29 م في بقية فترة التخمير

لأن عمليات التكاثر والنمو المشيجي تحتاج إلى درجة حرارة أعلى من درجة الحرارة التي تحتاجها في فترة التصنيع الحيوي لحمض الليمون وضبطت نسبة الرطوبة الجوية ما بين (95-100)% في فترة التخمير كلها لمنع تبخر البيئة المغذية السائلة ونقصها وذلك حسب البحاثة(Drysdale و Mckay، 1995).

9"-مراقبة عمليات التخمير:

تم متابعة تطور عمليات التخمير ونمو المشيجة الفطرية (الهيفات) على سطح البيئة المغذية في الأيام الأولى من التخمير وذلك لمعرفة سرعة النمو وسلامته من حدوث تلوثات جانبية أخرى وبدءاً من اليوم السابع للتخمير أخذت عينات من محاليل التخمير، وأجريت عليها التحاليل المناسبة لمعرفة مدى نشاط كل من السلالات الفطرية وقدرتها على إنتاج الحموضة الكلية وحمض الليمون.

1- تقدير الحموضة الكلية:

أجري هذا الاختبار ابتداءً من اليوم السابع من عمليات التخمير السطحي و بشكل دوري حتى اليوم السادس عشر، وبدءاً من اليوم الثالث وبشكل دوري باستخدام طريقة التخمير العميقة وحتى اليوم السادس عشر، وقدرت الحموضة الكلية لوسط التخمير معايرة 2 مل منه بمحلول NaOH(0.1) عياري، وبوجود دليل فينول فتالئين، وحسبت الحموضة الكلية لحمض الليمون والأحماض المرافقة على أساس حمض الليمون وحيد الماء، وتنتهي عمليات التخمير عند توقف ارتفاع الحموضة في الوسط أو عندما تبدأ بالانخفاض وتسجل المدة الزمنية التي استغرقتها هذه العملية ومنها يحسب المردود الكلي للحموض الناتجة من السكريات الداخلة في عمليات التخمير (Kristiansen وزملاؤه ، 1998).

- تقدير الحموضة الكلية المتشكلة غ/ل = كمية NaOH المستهلكة لمعايرة 2 مل 0.007 X 1000X/ حجم العينة (مل).

- يكافيء 0.007 من حمض الليمون لكل 1مل 0.1 عياري من ماءات الصوديوم.

-تقدير المردود الكلي % = الإنتاجية الكلية من الحموض المتشكلة (غ/ل) / كمية السكريات (غ/ل) × 100.

-تقدير الحموض المرافقة % = المردود الكلي % - المردود الحقيقي %.

المردود الحقيقي:وهو الذي يمثل كمية حمض الليمون المنتجة بالنسبة للسكريات(سكر اللاكتوز) بدون الحموض المرافقة(حمض الكبريت، حمض الأوكزاليك).

2- تقدير النسبة المئوية لحمض الليمون المتشكل (المردود الحقيقي %):

وذلك بطريقة التحليل الطيفي الضوئي:

تعتمد هذه الطريقة على تنقية وفصل حمض الليمون أولا"، ثم قياس امتصاصيته عند طول موجة(294) نانومتر كما يلي:

أخذ (1) مل من محلول التخمير بعد ترشيحه وتمديده بالماء المقطر إلى قمع الفصل سعته 100 مل ثم أضيف إليه (5) مل من محلول بروميد البوتاسيوم المحمض بحمض الكبريت ثم أضيف محلول برمنغنات البوتاسيوم المشبعة بمعدل نقطة – نقطة حتى ظهور راسب قرمزي اللون.

وأضيف (10) مل من كبريتات الحديد المشبعة والمحمضة بحمض الكبريت مما يؤدي هذا إلى زوال اللون القرمزي والراسب الناتج عن البروم ويتحول اللون الناتج أصفر فاتحاً، ثم أضيف (20) مل من الكلوروفورم إلى قمع الفصل ويتم إغلاقه ويجرى له الرج الشديد لمدة (3) دقائق ويؤخذ السائل من قمع الفصل وتقاس امتصاصيته بواسطة مقياس الطيف الضوئي على طول موجة(294) نانومتر وقورنت هذه النتائج بمحاليل قياسية من حمض الليمون النقي معلومة التركيز والمحضرة مسبقاً، وحسبت النسبة المئوية لحمض الليمون في المحاليل التخميرية بالاعتماد على شدة الامتصاص الضوئي، وأخذت قيم الامتصاص الضوئي من متوسط 5 مكررات للعينة حسب (Kristiansen وزملاؤه،1999).

3- تقدير النسبة المئوية للسكريات المتبقية في المحلول المتخمر بعد انتهاء التخمير:

يجرى هذا الاختبار بعد الانتهاء من عملية التخمير ليدل على نشاط السلالة الفطرية وقدرتها في استقلاب السكر الموجود في الوسط المغذي، ويجب أن تكون هذه النسبة المتبقية أقل من(1) % وتستخدم طريقة فهلنغ في هذا الاختبار حسب (Lesniak وKutermankiewicz،1990).

4- تقدير كتلة الفطر الجافة (المشيجة):يجرى هذا الاختبار بعد انتهاء عملية التخمير ليدل على كثافة نمو الفطر وتشكل المشيجة وليعبر أيضاً عن كمية السكريات المستهلكة في بناء المشيجة الفطرية والحدود المثلى لها بحدود (40–60) غ/ل، وتقدر بأخذ (50) مل من محلول التخمير الذي يحتوي على كتلة الفطر الأسود بعد مجانسته وترشيحه بواسطة قمع بوخنر ثم غسلت المشيجة بالماء المقطر عدة مرات إلى حين التأكد من عدم احتوائها على السكريات أو حمض الليمون ثم جففت المشيجة بالمجفف الحراري بحرارة 105م° ، ثم حسبت كتلة الفطر الجافة بـغ/ل وذلك حسب البحاثة (Lesniak وKutermankiewicz،1990).

5- الكشف عن حمض الكبريت: وذلك بإضافة عدة نقاط من محلول كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) تركيز (10) % إلى محلول التخمير المسخن لدرجة الغليان ، ثم يبرد ويرشح ويدل تشكل راسب أبيض من كبريتات الكالسيوم $CaSO_4$، الناتج عن وجود حمض الكبريت في محلول التخمير حسب(Lesniak وKutermankiewicz، 1990؛Bohdan،1980).

6-الكشف عن إنتاج حمض الاوكزاليك :

يجرى هذا الاختبار بعد انتهاء عملية التخمير إذ يعد وجوده ضاراً في هذه التقنية ويتم الكشف عنه بإضافة (1) مل من حمض الخل إلى (2) مل من المحلول التخميري المسخن ، ثم يضاف (1) مل من محلول كلور الكالسيوم وعند تشكل راسب أبيض من أوكزالات الكالسيوم، فإنه يدل ذلك على وجود حمض الاوكزاليك في العينة المختبرة حسب (درمش وزملاؤه ،1991) .

7- الكشف عن إنتاج حمض الليمون :

يجرى الاختبار بعد الانتهاء من عملية التخمير بإضافة كبريتات الزئبق إلى المحلول التخميري وإضافة عدة نقاط من برمنغنات البوتاسيوم تركيز (2)% ويعتبر زوال لون البرمنغنات وظهور راسب أبيض دليل على وجود حمض الليمون في العينة المختبرة، وتحضر $HgSO_4$ بإضافة 5غ من أوكسيد الزئبق إلى 20مل من H_2SO_4 المركز وتكمل إلى 100مل بالماء المقطر حسب (Lesniak و Kutermankiewicz،1990).

3-2-إنتاج الغاز الحيوي

3-2-1- مواد البحث:Materials

1"-مصل الجبن :

استخدم في التجارب مصل طازج، وتم فصل بروتين المصل باستخدام(30) مل من كلور الألمنيوم تركيز (5)% إلى (5) ليتر من المصل ثم الغليان لمدة (5) د (الميدع، 1990).

2"-وسط التخمر المستخدم في التجارب:

وهو خليط مكون من نسب متساوية من روث الحيوانات (روث أبقار كبيرة، وروث عجول صغيرة) ومياه مستنقعات والحمأة الجافة الناتجة عن محطة معالجة مياه دمشق (محطة عدرا) بالإضافة إلى الحمأة التي جمعت عند المرحلة الأخيرة لعملية التخمر عند انخفاض إنتاج الغاز

الحيوي لأدنى حدوده(Jessee وزملاؤه، 1983) وكانت نسبة وسط التخمر المستخدمة 0.3 % من حجم العينة المتخمرة.

3"–المخمر اللاهوائي:

تم استخدام وحدة تخمير لاهوائية سعة 18 ليتر، مكونة من 3 وحدات هضم.

4"– مخلفات مياه الصرف لمعمل الألبان:

يتم صرف كمية كبيرة من مياه الصرف الصحي في المصارف وهي تحتوي على منظفات ومواد فعالة منظفة وصودا، ومصدر هذه المخلفات معمل ألبان دمشق.

5"– تحضير خلائط التخمير اللاهوائي:

لتحديد الخليط المثالي من مصل الجبن ومصل الجبن بعد فصل البروتين ومياه الصرف لمعمل الألبان للحصول على الميثان، تم استخدام النسب التالية، كما هو موضح في الجدول(8).

الجدول (8) خلائط العينات وكمياتها التجريبية

الخليط	%A	%B	%C
المعاملة (1) مخلفات مياه الصرف لمعمل الألبان	100	0	0
المعاملة (2):مصل الجبن	0	100	0
المعاملة (3) : مصل الجبن المنزوع البروتين	0	0	100

المعاملة(4):MIX1 **20%مياه الصرف لمعمل الألبان** **+80%مصل الجبن المنزوع البروتين**	20	0	80
المعاملة (5):MIX2 **80%مياه الصرف لمعمل الألبان** **+20%مصل الجبن المنزوع البروتين**	80	0	20

A :مخلفات مياه الصرف لمعمل الألبان ،**B** : مصل الجبن،**C:** مصل الجبن المنزوع البروتين

3-2-2- طرائق العمل :Methods

1"-التحاليل الكيميائية للعينات:

تم إجراء التحاليل المخبرية لمصل الجبن وقد شملت التحاليل مايلي حسب(AOAC، 1995):

1-اللاكتوز بطريقة لين وإينون.

2-الدسم بطريقة جربر.

3- المادة الصلبة الكلية بطريقة التجفيف بالدرجة 105°محتى ثبات الوزن.

4-COD بطريقة المعايرة بكرومات البوتاسيوم.

5- الآزوت الكلي والبروتين بطريقة كلداهل.

6-الفوسفور بالطريقة اللونية بجهاز السبكتروفوتوميتر.

7- الحموضة باستخدام محلول عشر نظامي من ماءات الصوديوم وكاشف فينول فتالئين وتم حساب الحموضة المعايرة للمصل على أساس حمض اللبن.

8-نسب مكونات الغاز الناتج بجهاز الكروماتوغرافيا الغازية.

9- قياس درجة الpH بجهاز الpH.

"2-اختبارات الهضم اللاهوائي:

أجريت تجارب تحري إنتاج وتقييم نوعية الغاز الحيوي في درجة حرارة 37°م ولمدة 30 يوماً وجمع الغاز الحيوي المنطلق في أكياس جمع الغاز المخصصة لذلك، وكررت عملية قياس الغاز الحيوي الناتج لكل عينة يومياً، وتم تخمير مصل الجبن قبل وبعد فصل البروتين وتم تخمير نسبتين من خلائط العينات:

الخليطMIX1 :20%مياه الصرف لمعمل الألبان +80%مصل الجبن المنزوع البروتين.

الخليطMIX2 :80%مياه الصرف لمعمل الألبان +20%مصل الجبن المنزوع البروتين.
بالإضافة إلى تخمير مادة مخلفات مياه الصرف لمعمل الألبان ومصل الجبن ومصل الجبن المنزوع البروتين بشكل منفرد، كما هو واضح في الجدول (8).
وأنجزت عملية تحري إنتاج الغاز الحيوي في اليوم الثالث من عملية الهضم اللاهوائي، وقيس حجمه في الشروط النظامية، وقيس حجم الغاز الحيوي في ليتر نظامي لكل كيلو غرام من المادة العضوية (IN $Kg^{-1}vs$) وتم تحليل غاز الميثان باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا الغازية وتم تحليل غازCO_2وغاز النشادر وكبريت الهيدروجين باستخدام جهازي Msa وTesto وأيضاً خلال إجراء التجارب تم دراسة تأثير كل من العوامل (pH،التخمرالمشترك) على عملية المعالجة اللاهوائية من خلال قياس كل من COD،الآزوت الكلي، اللاكتوز ،المادة الصلبة الكلية، كمية الغاز الحيوي ،وقيس الpH كل2-3أيام خلال فترة الهضم وبعد انتهاء التجارب، وأجريت التجارب عند درجة الـ PH(7)،وضبط الpH بماءات الأمونيوم(نظامي)(Ghalyوزملاؤه،1999). وللمحافظة على درجة الحموضة ضمن المخمر يتم إضافة قلوي مثل بيكربونات الصوديوم وذلك لتحطيم الحموض الدسمة ذات السلاسل الطويلة والتي تعتبر سامة بالنسبة للأحياء الدقيقة حيث تلعب مادة البيكربونات كمادة منظمة للpH من أجل إعادة التوازن ، وتراوحت كمية البيكربونات المضافة مابين (2500-5000) مغ/م3/يوم من حجم العينة المختمرة(Pind وزملاؤه، 2002). ودرس التركيب الكيميائي للراسب الناتج عن عملية التخمر وخاصة الآزوت والفوسفور.

3"-التحليل الإحصائي للنتائج :

تم حساب المتوسطات الحسابية، ثم قورنت المتوسطات بإجراء أقل فرق معنويL.S.Dعلى مستوى ثقة 5% باستخدام البرنامج الإحصائي spss نسخة20.

4-النتائج والمناقشة

(Results and discussion)

أولا"-إنتاج حمض الليمون:

4-1-1- التركيب الكيميائي للأوساط الزرعية:

أظهرت النتائج أن نقاوة السكروز المستخدم في تحضير وسط التخمير الأول بلغت 99% وأن محتوى السكريات المرجعة بلغ 0.09% كما أظهرت النتائج الموضحة بالجدول(9).

الجدول (9) التركيب الكيميائي للسكروز المستعمل في عمليات التخمير

التركيب الكيميائي	القيمة%
السكروز	99

الرطوبة	0.83
السكر المرجع	0.09
الرماد	0.08
pH	7

كما أظهرت النتائج الموضحة بالجدول (10) أن المصل المستخدم كوسط في عملية التخمير

السلالةأوالعزلة	الحموضة الكلية مقدرة بالمعايرة غ/ل

وبلغ تركيز اللاكتوز فيه 4 % و درجة الحموضة 0.15 % (كحمض لبن) وبلغ متطلب الاوكسجين الكيميائي 65000 مغ/ل, وبعد تعديل درجة pH واضافة المكملات الغذائية لكلا الوسطين والتعقيم استخدما في تنمية الفطر الاسود.

الجدول (10) التركيب الكيميائي لمصل الجين المستعمل في عمليات التخمير

التركيب الكيميائي	القيمة%
الدسم	**0.40**
البروتين	**0.9**
اللاكتوز	**4.0**
الحموضة الكلية *	**0.15**
pH	**6.5**
المواد الصلبة الكلية	**5.95**
COD (مغ/ل)	**65000**

*** مقدرة كحمض لبن**

4-1-2-إنتاج سلالات الفطرالأسود المدروسة من الحموضة الكلية باستعمال وسط السكروز:

أظهرت النتائج الموضحة بالجدول (11) وجود اختلافات معنوية في كمية الحموضة الكلية الناتجة عن تخمير وسط السكروز باستخدام السلالات المحلية والمستوردة من الفطر *A.niger* وذلك خلال فترة التخمير كما في الجدول (11)

الجدول (11) إنتاجية السلالات المدروسة من الحموضة الكلية (غ/ل) خلال فترة التخمير

	مدة التخمير (يوم)							القيمةالعظمى للحموضة غ/ل
	7	9	11	13	14	15	16	
PLA40	45.92	58.97	70.38	87.99	91.38	84.59	79.31	91.38b
PLA30	63.14	76.96	87.88	97.93	98.42	97.12	90.51	a98.42
C	31.50	41.96	53.51	67.72	66.50	63.38	61.28	67.72c
D	14.28	17.50	21.38	38.99	42	40.25	38.50	42p

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى p<0.05

يبين الجدول (11) تفوق السلالات المستوردة (PLA30) و (PLA40) على السلالات المحلية في إنتاج الحموضة بشكل عام وذلك خلال مدة التخمير, حيث بلغ إنتاج السلالة PLA30 من الحموضة الكلية في اليوم السابع لعملية التخمير 63.14 غ/ل و وصل إلى 90.51 غ/ل في نهاية فترة التخمير في حين بلغ انتاج العزلة المحلية C 31.50 غ /ل في اليوم السابع ووصل الى 61.28 غ/ل في نهاية فترة التخزين , أي أن انتاجية السلالة المحلية من الحموضة تعادل 67.70% من انتاجية السلالة المستوردة ,وقد أظهر اختبار أقل فرق معنوي (L.S.D) تفوق السلالة (PLA30) على باقي السلالات والعزلات وكانت الفروق معنوية على مستوى دلالة 0.05.

وقد أظهرت نتائج تحليل التباين وجود فروق معنوية جداً للحموضة الكلية المنتجة خلال اليوم الرابع عشر وبقية فترات التخمير المدروسة .في حين كانت الانتاجية الأعلى للحموضة الكلية للسلالات المحلية في اليوم الثالث عشر للتخمير .

4-1-3- بعض المؤشرات للسلالات الفطرية المدروسة باستعمال وسط السكروز:

يبين الجدول (12) مؤشرات فعالية السلالات الفطرية أثناء إنتاج حمض الليمون بالتخمير السطحي حسب(Lesniak و Kutermankiewicz،1990؛Mashhoor وزملاؤه ،1988).

الجدول (12) بعض المؤشرات للسلالات الفطرية المدروسة باستعمال وسط السكروز

السلالات والعزلات المدروسة	الحموضة الكلية غ/ل	المردود الكلي %	المردود الحقيقي%	الحموض المرافقة %	السكريات المتبقية %	الكتلةالحيوية غ/ل
PLA40	91.38b	60.92b	57.65b	2.11cb	0.65c	16.98c

15.69^{b}	0.34^{b}	1.49^{b}	64.12^{a}	65.61^{a}	98.42^{a}	PLA30
17.24^{b}	1.49^{b}	3.27^{b}	41.87^{c}	45.14^{c}	67.72^{c}	C
21.55^{a}	3.99^{a}	9.41^{a}	18.59^{b}	28^{b}	42^{b}	D

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى $p<0.05$

يبين الجدول(12) تفوق السلالة (PLA30) على باقي السلالات والعزلات المدروسة من حيث المردود الحقيقي والكلي لحمض الليمون المنتج وقد ترافق ذلك مع انخفاض في مؤشرات كل من الحموض المرافقة والسكريات المتبقية والكتلة الحيوية.

بلغ مردود السلالة (PLA40) الكلي 60.92% والحقيقي 57.65% بينما كان مردود السلالة (PLA30) الكلي 65.61% والحقيقي 64.12%، وأعطت العزلة (C) مردوداً كلياً 45.14% ومردوداً حقيقياً 41.87% في حين كان المردود الكلي للسلالة (D) 28% والمردود الحقيقي 18.59%.

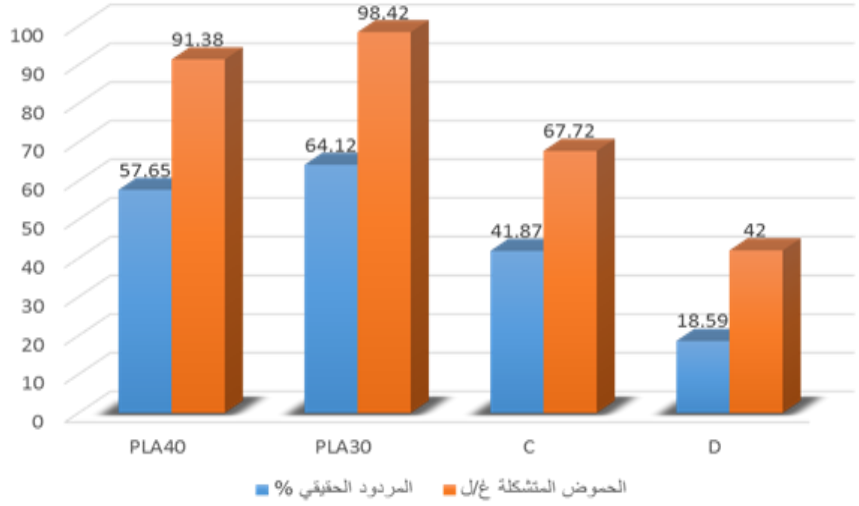
وازداد ناتج الحموض العضوية المرافقة وكمية السكريات المتبقية دون تخمير معنوياً مع انخفاض كفاءة السلالة وكانت أقل كمية للحموض المرافقة 1.49% عند السلالة (PLA30)، تلتها السلالة (PLA40) بـ2.11% والعزلة (C)3.27% بينما كانت العزلة (D) الأنشط في تشكيل الحموض المرافقة بـ 9.41%.

لم يلاحظ تشكل حمض الكبريت الضار أثناء عملية التخمير باستخدام السلالات المحسنة وراثياً بينما تشكل باستخدام العزلات المحلية وهذا يستدع السعي في تحسين السلالات المحلية من اجل زيادة إنتاجيتها لحمض الليمون ,أما بالنسبة لحمض الاوكزاليك فقد لوحظ إنتاجه من قبل جميع السلالات المدروسة.

من جهة أخرى يظهر من الجدول(12) قدرة السلالتين (PLA40) و(PLA30) في استقلاب السكريات الموجودة في البيئة المغذية وتحويلها إلى حمض الليمون ثم طرحها إلى الوسط المحيط، حيث بلغت كمية السكريات المتبقية في الوسط 0.34% للسلالة (PLA30) و0.65% للسلالة (PLA40)، كما بينت النتائج الموضحة بالجدول (12) ضعف مقدرة العزلتين (C) و (D) في استقلاب السكريات الموجودة في البيئة المغذية، وإعطاء مردود منخفض من الحمض وقد بلغت نسبة السكريات المتبقية دون تخمير للعزلة (C) 1.49% والعزلة (D) 3.99%، وتعد هذه القيم أعلى من المجال المسموح به وذلك حسب(Lesniakو Kutermankiewicz،1990).

وبلغت كتلة الفطر الجافة والكتلة الحيوية لسلالة فطر *A.niger* (PLA30) قيمة 15.69غ/ل كما في الجدول (12) وهي تقع ضمن المجال المثالي لنمو المشيجة الفطرية، وترافق ذلك مع انخفاض كمية السكريات المتبقية وزيادة إنتاجية الفطر من حمض الليمون وهذه النتائج تتوافق

مع نتائج الباحثين(Lesniak و Kutermankiewicz،1990), الذين أشارا إلى أن انخفاض كمية السكريات المستهلكة في بناء المشيجة الفطرية ينعكس على المردود النهائي من حمض الليمون , كما لوحظ زيادة الكتلة الكتلة الحيوية في السلالات الأخرى ولاسيما السلالات المعزولة محلياً حيث بلغت للسلالة (C) 17.24غ/ل، و(D) 21.55غ/ل، وربما يعود ذلك الى استهلاك معظم السكريات في بناء المشيجة الفطرية مما يؤدي إلى خفض فعالية التنفس والتهوية في المشيجة الفطرية ومنع وصول الأوكسجين إلى كل الخلايا، مما يؤدي إلى عرقلة عملية التخمير اللازمة لإنتاج حمض الليمون وانخفاض مردوده، وقد تطابقت هذه النتائج مع البحاثة (Elimer و Gajos ، 1994) ، ويبين الشكل (3) بعض مؤشرات فعالية السلالات الفطرية المدروسة في إنتاج حمض الليمون باستخدام وسط السكروز



الشكل (3) بعض مؤشرات فعالية السلالات الفطرية المدروسة في إنتاج حمض الليمون باستخدام وسط السكروز

4-1-4- الحموضة الكلية الناتجة عن تخمير وسط مصل الجبن باستخدام الفطر الأسود:

يبين الجدول (13) أن سلالات وعزلات الفطر الأسود سلكت سلوكاً متشابهاً في تطور إنتاج الحموضة في أوساطها التخميرية (مصل الجبن) مع تقدم عملية التخمير، وبلغت السلالتين (PLA40) و (PLA30) المستوى الأعظمي للحموضة في اليوم الرابع عشر.

الجدول (13) الحموضة الكلية الناتجة باستعمال وسط مصل الجبن

السلالة أوالعزلة المدروسة	الحموضة الكلية مقدرة بالمعايرة غ/ل						
	مدة التخمير(يوم)						القيمة العظمى للحموضة غ/ل
	7	9	11	13	14	15	16	
PLA40	45.11	58.76	66.88	83.02	87.99	86.13	79.69	87.99b

91.38[a]	78.96	84.59	91.38	85.89	70.42	59.88	46.02	PLA30
70.45[c]	66.99	70.45	66.88	66.46	50.29	39.09	31.46	C
47.46[b]	47.46	45.46	42.38	35.73	22.92	17.39	14.49	D

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى p<0.05

يبين الجدول (13) تأخر وصول السلالة (C) إلى المستوى الأعظمي إلى اليوم الخامس عشر والسلالة (D) وصل مستواها الأعلى من الحموضة في اليوم السادس عشر، مع اختلاف في مقدار الحموضة المنتجة من سلالة إلى أخرى فالسلالة (PLA40) وصل إنتاجها من الحموضة في اليوم السابع من التخمير 45.11غ/ل واستمر إنتاج الحموضة حتى وصل إلى مستواه الأعظمي في اليوم الرابع عشر 87.99غ/ل ثم حصل تراجع في مستوى الحموضة حتى نهاية مدة التجربة، وبلغ إنتاج الحموضة من قبل السلالة (PLA30) في اليوم السابع 46.02غ/ل واستمر إنتاج الحموضة حتى وصل إلى مستواه الأعظمي في اليوم الرابع عشر 91.38 غ/ل ثم حصل تراجع في مستوى الحموضة حتى نهاية مدة التجربة،أما العزلة(C) فكانت الحموضة المنتجة في اليوم السابع 31.46غ/ل ووصل إلى مستواه الأعلى في اليوم الخامس عشر 70.45غ/ل، بينما كانت الحموضة المنتجة من قبل العزلة (D) في اليوم السابع 14.49غ/ل ووصلت إلى مستواها الأعظمي في اليوم السادس عشر 47.46غ/ل، ونستنتج مما سبق أن السلالة (PLA30) أدت إلى إنتاج أكبر كمية من الحموضة في حين تناقصت الحموضة عند السلالات والعزلات الأخرى باستعمال وسط مصل الجبن تلتها السلالة (PLA40) ثم العزلة (C) وأخيراً العزلة (D) وهذا يتطابق مع نتائج (Lesniak وزملاؤه ، 1993).

أي بلغت كمية الحموض العظمى الكلية 87.99 غ/ل للسلالة (PLA40)، و 91.38 غ/ل للسلالة (PLA30) و70.45غ/ل للسلالة (C)،و 47.46 غ/ل للسلالة (D).

ويتبين من التحليل الإحصائي للنتائج المذكورة سابقاً وجود فروق معنوية في إنتاج السلالات والعزلات الأربع من الحموضة باستعمال وسط مصل الجبن ، وكذلك أظهر اختبار أقل فرق معنوي (L.S.D) تفوق السلالة (PLA30) على باقي السلالات، وكانت الفروق معنوية جداً تلتها السلالة (PLA40) ثم العزلة (C) وأخيراً العزلة (D).

4-1-5- بعض المؤشرات للسلالات الفطرية المدروسة باستعمال وسط مصل الجبن:

يتضح من الجدول (14) تباين واضح في المردود الكلي والحقيقي لحمض الليمون بواسطة السلالات والعزلات الأربع باستعمال وسط مصل الجبن، فبلغ المردود الكلي للسلالة (PLA40) 58.66% والحقيقي 54.88 % بينما كان مردود السلالة (PLA30) الكلي 60.92 % والحقيقي58.05 % وأعطت العزلة (C) مردوداً كلياً 46.96 % ومردوداً حقيقياً 34.49% وكان المردود الكلي للعزلة (D) 31.64 % والمردود الحقيقي 18.21 %.

الجدول (14) بعض المؤشرات للسلالات الفطرية المدروسة باستعمال وسط مصل الجبن

السلالات والعزلات المدروسة	الحموض الكلية غ/ل	المردود الكلي %	المردود الحقيقي %	الحموض المرافقة %	السكريات المتبقية %	الكتلة الحيوية غ/ل
PLA40	87.99^{b}	58.66^{b}	54.88^{b}	3.78^{c}	0.71^{c}	17.14^{c}
PLA30	91.38^{a}	60.92^{a}	58.05^{a}	2.87^{D}	0.39^{cD}	16.88^{D}
C	70.45^{c}	46.96^{c}	34.49^{c}	12.47^{b}	1.69^{b}	18.14^{b}
D	47.46^{D}	31.64^{D}	18.21^{D}	13.43^{a}	2.01^{a}	22.15^{a}

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى p<0.05

وتبين نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عالية للمردود الكلي والحقيقي الناتج عن السلالات والعزلات الفطرية، وتفوق السلالة (PLA30) التي أعطت أكبر كمية من المردود الكلي والحقيقي، ثم السلالة(PLA40) ثم العزلة (C) وأخيراً العزلة D، وتباين مردود السلالات الأربع من الحموض المرافقة الأخرى وكان على التوالي (3.78، 2.87 ، 12.47، 13.43)% محسوباً على أساس المردود الكلي ولوحظ وجود حمض الكبريت في حالة العزلتين C، D، بينما تواجد حمض الاوكزاليك مع جميع السلالات.

ولوحظ ارتفاع النسبة المئوية للسكريات المتبقية دون تخمير مع انخفاض كفاءة السلالة وكانت على التوالي (0.39، 0.71، 1.69، 2.01)%،إذ تمكنت السلالة (PLA30) من استقلاب كامل السكريات تقريبا" ، ثم السلالة(PLA40) بينما أبقت العزلتين (C) و(D) نسبة من السكريات أعلى من المستوى المسموح به في أوساطها التخميرية دون تخمير.

ولم تظهر فروق معنوية بكمية السكريات المتبقية دون تخمير بين السلالتين (PLA40) و(PLA30) التي أنتجتا0.39 % و 0.71% على التوالي بينما ظهرت فروق معنوية مع باقي السلالات والعزلات الأخرى وكانت كمية السكريات المتبقية دون تخمير للسلالة (C) و (D) كبيرة (1.69، 2.01)%.

ويلاحظ من الجدول (14) تقارباً في كمية مشيجة الفطر الأسود المتكونة في أثناء عمليات التخمير حيث أعطت العزلة (D) أعلى كمية مشيجة من الفطر الأسود 22.15 غ/ل، في حين أعطت السلالة (PLA30) 16.88 غ/ل، بينما أعطت السلالة (PLA40) 17.14غ/ل والعزلة (C) 18.14غ/ل،وذلك حسب (Lesniak وزملاؤه ، 1993؛ Lesniak وstawicki،1979).

ونستنتج من الجدول (14) أن سلالة الفطر الأسود (PLA30) أنتجت أكبر كمية من الحموضة 91.38غ/ل وهذا يقابلها أعلى مردود كلي منتج من حمض الليمون 60.92% وكذلك أعطت أعلى مردود حقيقي من حمض الليمون 58.05% في حين كانت نسبة الحموض المنتجة

والمرافقة لحمض الليمون 2.87%، وكتلة المشيجة الفطرية المتكونة 16.88 غ/ل، وكذلك نسبة السكريات المتبقية دون تخمير 0.39% وتعتبر محصلة المعطيات المذكورة سابقاً مؤكداً لاعتبار سلالة الفطر الأسود(PLA30) أفضل من باقي السلالات والعزلات المختبرة لإنتاج حمض الليمون في وسط مصل الجبن.

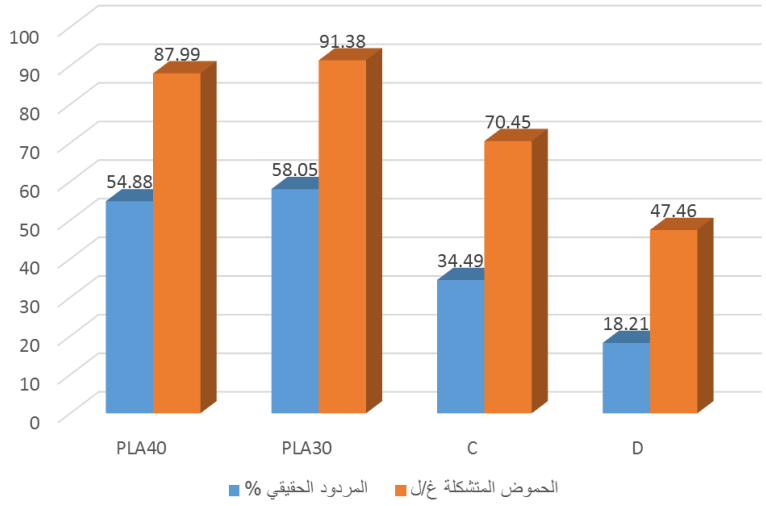
ويبين الجدول(15) مقارنة بين الحموضة الكلية والمردود الحقيقي للعزلات والسلالات الأجنبية والمحلية باستعمال وسط السكروز و وسط مصل الجبن.

الجدول(15) مقارنة بين الحموضة الكلية والمردود الحقيقي للسلالات الفطرية المدروسة باستعمال وسط السكروز و وسط مصل الجبن

السلالات والعزلات المدروسة	الحموضة الكلية		المردود الحقيقي	
	وسط السكروز	وسط اللاكتوز	وسط السكروز	وسط اللاكتوز
PLA40	91.38^{b}	87.99^{b}	57.65^{b}	54.88^{b}
PLA30	98.42^{a}	91.38^{a}	64.12^{a}	58.05^{a}
C	67.72^{c}	70.45^{c}	41.87^{c}	34.49^{c}
D	42^{p}	47.46^{p}	18.59^{p}	18.21^{p}

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى $p<0.05$

ويبين الشكل (4) بعض مؤشرات فعالية السلالات الفطرية المدروسة في إنتاج حمض الليمون باستخدام وسط مصل الجبن.



الشكل (4) بعض مؤشرات فعالية السلالات الفطرية المدروسة في إنتاج حمض الليمون باستخدام وسط مصل الجبن

4-1-6- تأثير اللاكتوز في إنتاج حمض الليمون بوساطة سلالة الفطر الأسود المنتخبة PLA30:

يبين الجدول(16) دراسة فعالية سلالة الفطرالأسود(PLA30) في إنتاج حمض الليمون باستخدام أربعة تراكيز مختلفة لسكر اللاكتوز في وسط النمو :40غ/ل،90غ/ل،150غ/ل،180غ/ل .

الجدول (16) الحموضة الكلية الناتجة باستعمال مستويات مختلفة من اللاكتوز

مستويات سكر اللاكتوز المدروسة غ/ل	الحموضة الكلية مقدرة بالمعايرة غ/ل							
	مدة التخمير(يوم)							القيمةالعظمى للحموضة غ/ل
	7	9	11	13	14	15	16	
40	29.82	24.92	22.43	–	–	–	–	29.82[D]
90	50.85	59.01	60.76	57.64	–	–	–	60.76[C]
150	42.38	51.76	64.68	84.66	89.35	87.88	82.28	89.35[A]
180	33.28	47.07	62.96	70.49	79.69	83.96	85.85	85.85[B]

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى 0.05>p

ويبين الجدول (16) أنه عند اليوم السابع من التخمر وصلت الحموضة المنتجة إلى مستواها الأعظمي 29.82غ/ل وذلك عند المستوى الأول لسكر اللاكتوز 40غ/ل، تلاها انخفاض مباشر في مستوى الحموضة في الأيام التالية من التخمير وبلغت الحموضة مستواها الأعظمي 60.76غ/ل في اليوم الحادي عشر من التخمير عند مستوى90غ/ل ثم تناقصت بعد ذلك ومع زيادة مستوى سكر اللاكتوز 150غ/ل لوحظ ازدياد في مستوى الحموضة الناتجة حتى وصلت إلى مستواها الأعظمي في اليوم الرابع عشر89.35غ/ل ثم تناقصت الحموضة فيما بعد وعند المستوى 180غ/ل لاكتوز بلغت الحموضة قيمتها العظمى في اليوم 16 للتخمير85.85غ/ل نستنتج مما سبق أن المستوى 150غ/ل سكر اللاكتوز مضاف كان أفضل المستويات إنتاجاً للحموضة 89.35 غ/ل في اليوم الرابع عشر، أما عند مستويات اللاكتوز الأدنى من ذلك فكانت الحموضة الناتجة أقل وذلك بسبب ضآلة كمية سكر اللاكتوز الموجودة في الوسط الزرعي، في حين يعزى سبب تناقص كمية الحموضة الناتجة عند مستويات سكر اللاكتوز أعلى من 150غ/ل إلى ارتفاع الضغط الحلولي (الأسموزي) داخل محلول الوسط الزرعي وما يترتب عليه من تأثيرات مختلفة وتبين نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية في إنتاج الحموضة الناتجة عن الأوساط الزرعية المختلفة من سكر اللاكتوز بواسطة السلالة(PLA30).

كما أظهر اختبار أقل فرق معنوي (L. S.D) تفوق مستوى سكر اللاكتوز 150غ/ل على جميع المستويات يليه المستوى 180غ/ل ثم 90غ/ل وأخيراً 40غ/ل وهو أضعفها إنتاجاً للحموضة ويتبين أيضاً وجود فروق معنوية جداً لكمية الحموضة المنتجة خلال مدة التخمير إذ أن المستوى 150غ/ل أعطى أعلى إنتاج في اليوم الرابع عشر ثم تناقصت الحموضة مع تقدم مدة التخمير أما المستوى 180غ/ل أعطى أعلى حموضة في اليوم السادس عشر ونتيجة لما سبق يتبين أن

السلالة (PLA30) أعطت أعلى إنتاج في الحموضة عند مستوى سكر لاكتوز 150غ/ل وفي اليوم الرابع عشر للتخمير، وبالتالي يمكن اعتبار المستوى 150غ/ل أفضل مستوى بسبب قصر مدة التخمير ويتطابق هذا مع نتائج (Murad، 2003).

ويتبين من الجدول (17) ارتفاع كمية الحموض الكلية المتشكلة مع زيادة تركيز السكريات لوسط النمو، فبلغت أعلى كمية منها 89.35 غ/ل وذلك عند استخدام التركيز 150غ/ل متفوقة على جميع التراكيز المتبقية، تلتها معاملة التركيز 180 غ/ل بكمية نحو 85.85 غ/ل، تبعتها معاملة التركيز 90 غ/ل بـ 60.76 غ/ل وعند التركيز 40 غ/ل كانت كمية الحموض الكلية المتشكلة 29.82 غ/ل.

الجدول (17) بعض المؤشرات باستعمال مستويات مختلفة من اللاكتوز

مستويات سكر اللاكتوز المدروسة غ/ل	الحموض الكلية غ/ل	المردودالكلي %	المردودالحقيقي %	الحموض المرافقة %	السكريات المتبقية %	الكتلةالحيوية غ/ل
40	29.82^{D}	47.69^{D}	42.51^{D}	5.18^{a}	1.61^{a}	22.57^{a}
90	60.76^{c}	59.56^{c}	56.21^{c}	3.35^{b}	0.85^{b}	19.78^{b}
150	89.35^{a}	74.55^{a}	72.11^{a}	2.44^{D}	0.43^{D}	12.22^{D}
180	85.85^{b}	67.51^{b}	64.34^{b}	3.17^{c}	0.59^{c}	16.88^{c}

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى $p<0.05$

ويتبين من الجدول (17) تشابه في جميع نتائج الحموض المتشكلة ونتائج المردود الكلي حيث بلغ المردود الكلي:74.55%،67.51%،59.56 %،47.69 % لتراكيز سكريات: 150غ/ل،180غ/ل،90غ/ل ،40غ/ل على الترتيب، حيث تفوقت معاملة التركيز 150 غ/ل على جميع المعاملات الأخرى، تلتها المعاملة 180غ/ل ثم 90غ/ل وتابع المردود الكلي

انخفاضه بانخفاض تركيز السكريات عند 40غ/ل ، وكانت جميع الفروق بين هذه التراكيز معنوية،كما بلغ المردود الحقيقي 72.11 % لمعاملة التركيز 150 غ/ل متفوقة بذلك على جميع التراكيز المختلفة تبعها تفوق معاملة التركيز 180غ/ل بـ 64.34 %، ثم معاملة التركيز 90غ/ل بـ 56.21 % ثم معاملة التركيز 40غ/ل التي أنتجت 42.51% مردود حقيقي، وهذا يتوافق مع(Kubicek،1998).

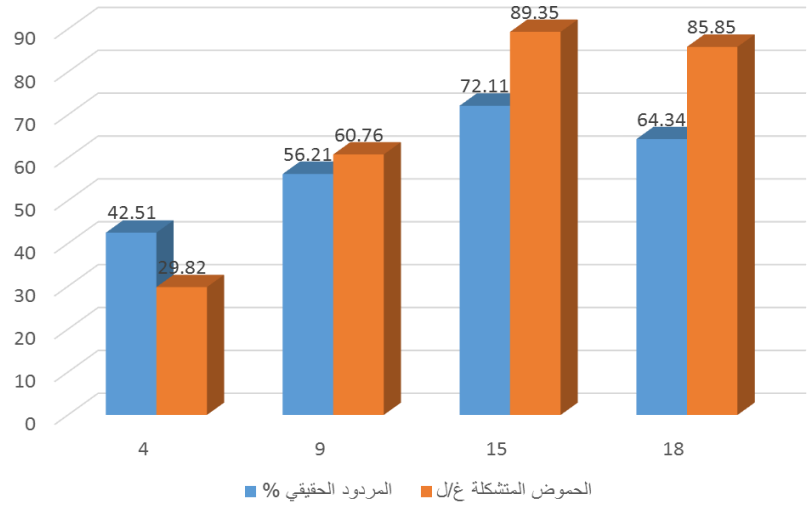
وتباين إنتاج سلالة الفطر الأسود (PLA30) للحموض المرافقة لحمض الليمون حيث تبين عند تدقيق النتائج انخفاض كمية الحموض المرافقة مع زيادة تركيز السكريات إذ بلغ الإنتاج الأعظمي منها عند مستوى سكر لاكتوز 40غ/ل في الوسط الزرعي 5.18%، وعند مستوى 150غ/ل سكر لاكتوز بلغت الحموض المرافقة 2.44% تلاها مستوى السكر 180غ/ل ، إذ بلغت الحموض المرافقة 3.17% أما المستوى 90 غ/ل فقد أعطى نسبة من الحموض المرافقة 3.35%، ولم يكن حمض الكبريت أحد الحموض المتكونة والمرافقة لحمض الليمون بينما وجد حمض الاوكزاليك في معظمها، وكانت الفروق مابين جميع المعاملات معنوية لصالح التركيز الأعلى حسب (Legisa وزملاؤه ، 1995) .

ويلاحظ من الجدول (17) ازدياداً كبيرا في كتلة المشيجة الجافة المتكونة عند المستويات المنخفضة من سكر اللاكتوز في الوسط الزرعي، وكان التناسب عكسيا" بين مستوى السكر المضاف وكتلة المشيجة المتكونة فكانت أقل قيمة لكتلة المشيجة 12.22 غ/ل عند مستوى سكر 150 غ/ل، وأعلاها قيمة 22.57 غ/ل عند مستوى سكر 40غ/ل ، وكانت الفروق مابين جميع المعاملات معنوية جداً دائماً لصالح التركيز الأعلى حسب (Nguyen وزملاؤه، 1992).

ويبين الجدول (17) النسبة المئوية للسكريات المتبقية في وسط التخمير حيث ازدادت النسبة طرداً مع انخفاض نسبة السكر المستعمل في الوسط الزرعي، حيث تمكنت مشيجة الفطر الأسود النامية في استقلاب معظم كمية السكر عند مستويات السكر في الوسط الزرعي

(150، 180، 90) غ/ل ولكن عند مستوى سكر 40غ/ل تجاوزت الحدود الموصى بها وكانت الفروق مابين جميع المعاملات معنوية لصالح التركيز الأعلى، ونستنتج من الجدول (17) أن أفضل مستوى للاكتوز هو 150غ/ل حيث أعطى 89.35 غ/ل من الحموضة المنتجة ويقابل هذا مردود كلي 74.55%و72.11% مردود حقيقي، وهذا يتوافق مع (Ettler وزملاؤه،1991).

ويبين الشكل (5) بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من اللاكتوز.



شكل (5) بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من اللاكتوز

4-1-7-تأثير نترات الأمونيوم في إنتاج حمض الليمون بوساطة سلالة الفطر المنتخبة PLA30:

يبين الجدول (18) تأثير مستويات مختلفة من نترات الأمونيوم المتدرجة والمختلفة: (0 – 0.5 – 1 – 1.5 – 2) غ/ل في كمية الحموضة الناتجة عن عملية التخمر ،بعد إضافة المستوى الأفضل من سكر اللاكتوز 150غ/ل.

الجدول (18) الحموضة الكلية الناتجة باستعمال مستويات مختلفة من نترات الأمونيوم

مستويات نترات الأمونيوم المدروسة غ/ل	الحموضة الكلية مقدرة بالمعايرة غ/ل							
	مدة التخمير (يوم)							القيمة العظمى للحموضة غ/ل
	7	9	11	13	14	15	16	
0	33.28	42.38	52.11	63.42	66.50	64.82	62.96	66.50
0.5	36.92	49.45	62.61	84.49	89.28	87.11	82.32	89.28
1	51.90	65.76	76.61	88.58	99.61	94.88	88.97	99.61
1.5	35.38	46.06	56.66	65.66	68.81	65.50	63.98	68.81
2	31.50	40.04	53.83	56.38	59.46	59.88	61.42	61.42

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى $p<0.05$

ويبين الجدول (18) أن الهدف من استخدام التراكيز المختلفة من نترات الأمونيوم، هو التوصل إلى نمو حيوي أفضل لإنتاج أوفر من حمض الليمون، وهذا التأثير كان إيجابياً حتى المستوى (1) غ/ل من نترات الأمونيوم بعدها بدأت كمية الحموضة المنتجة بالتناقص مع زيادة مستوى مصدر الآزوت المضاف، وبلغت كمية الحموضة المنتجة في اليوم السابع للتخمير 33.28غ/ل

عند عدم إضافة مصدر للآزوت في الوسط الزرعي واستمرت بالزيادة حتى وصلت الذروة في اليوم الرابع عشر للتخمير 66.50غ/ل بسبب وجود مركبات الآزوت موجودة في مصل الجبن وعند إضافة (0.5) غ/ل من مصدر الآزوت بلغت الحموضة الناتجة في اليوم السابع للتخمير 36.92غ/ل، ووصلت إلى الذروة في اليوم الرابع عشر 89.28غ/ل وكان النمو المشيجي جيداً وبإضافة (1) غ/ل كانت الحموضة الناتجة في اليوم السابع 51.90غ/ل واستمرت بالارتفاع في اليوم الرابع عشر إلى 99.61غ/ل وبارتفاع مصدر الآزوت إلى (1.5) غ/ل كانت الحموضة الناتجة في اليوم السابع 35.38غ/ل ، في حين وصلت الحموضة الناتجة إلى الذروة في اليوم الرابع عشر إلى 68.81غ/ل وعند إضافة مصدر أزوت (2) غ/ل وصلت الحموضة الناتجة إلى الذروة 61.42 غ/ل في اليوم السادس عشر وهي الأقل إنتاجاً ، نجد مما سبق أن كمية نترات النشادر (كمصدر للآزوت) المضافة (1) غ/ل أعطت أعلى حموضة، في حين تناقصت الحموضة عند ارتفاع مستوى الآزوت عن هذا المستوى أو نقصانه ويمثل هذا المستوى القيمة الأفضل في عمليات التخمير المنتج لحمض الليمون في وسط مصل الجبن، ويعزى ذلك أن كمية الآزوت الموجودة أصلاً في مصل الجبن غير كافية بشكل كامل لإنتاج حموضة بكميات كبيرة وإنما تحتاج إلى كميات إضافية لتعويض هذا النقص، وتبين من التحليل الإحصائي للنتائج المذكورة سابقاً وجود فروق معنوية جداً للحموضة الناتجة عن المستويات المختلفة من نترات النشادر في وسط مصل الجبن.

كما أظهر اختبار أقل فرق معنوي (L. S. D) تفوق المستوى (1) غ/ل من مصدر الآزوت وبفروق معنوية جداً على جميع المستويات ثم يليه المستوى (0.5) غ/ل ثم المستوى (1.5)غ/ل ثم (0) غ/ل ثم (2) غ/ل وأنه يوجد فروق معنوية جداً ما بين جميع المستويات، أي بلغت كمية الحموض الكلية مايلي على الترتيب:(66.50، 89.28، 99.61، 76.16، 61.42)غ/ل.

ويبين الجدول (19) ازدياد المردود الكلي بارتفاع مستوى مصدر الآزوت في وسط مصل الجبن حتى مستوى مضاف من نترات النشادر (1) غ/ل بعدها يبدأ المردود الكلي بالانخفاض وكان على التوالي: (44.33،59.52 ،66.40 ، 50.77 ،40.94)% ،وهذا يقابله أيضاً ارتفاع المردود الحقيقي لحمض الليمون بارتفاع مستوى مصدر الآزوت في الوسط الزرعي حتى مستوى (1) غ/ل، ثم يبدأ بعدها بالتناقص وكان على التوالي:

(38.65،55.74 ،63.44 ،45.91 ،35.35) %.

الجدول (19) بعض المؤشرات باستعمال مستويات مختلفة من نترات الأمونيوم

مستويات نترات الأمونيوم المدروسة غ/ل	الحموض الكلية غ/ل	المردودالكلي %	المردودالحقيقي %	الحموض المرافقة %	السكريات المتبقية %	الكتلةالحيوية غ/ل

15.84^{e}	1.02^{c}	5.68^{a}	38.65^{p}	44.33^{p}	66.50^{p}	0
17.48^{p}	0.78^{p}	3.78^{p}	55.74^{b}	59.52^{b}	89.28^{b}	0.5
19.35^{c}	0.63^{e}	2.96^{e}	63.44^{a}	66.40^{a}	99.61^{a}	1
26.11^{b}	0.91^{b}	4.86^{c}	45.91^{c}	50.77^{c}	76.16^{c}	1.5
29.13^{a}	1.79^{a}	5.59^{b}	35.35^{e}	40.94^{e}	61.42^{e}	2

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى $p<0.05$

ولوحظ مما سبق أن ارتفاع المردود الكلي والحقيقي لحمض الليمون باستمرار إضافة مصدر الآزوت حتى مستوى (1) غ/ل ثم تناقص بعد ذلك بالرغم من استمرار إضافة مصدر الآزوت وهذا يدل على حاجة عملية الاستقلاب المنتجة لحمض الليمون لمستويات معينة من الآزوت وزيادة هذه المستويات عن المستوى المحدد والمطلوب ينعكس تأثيرها سلباً على هذه التقنية وهذا يتطابق مع (Wolschek و Kubicek, 1999 ؛ Czesc و Produkcyjne ، 1973)

ويتبين من التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية جداً للمردود الكلي والحقيقي لحمض الليمون الناتج عن وجود مستويات مختلفة من مصدر الآزوت .

ويبين اختبار أقل فرق معنوي (L. S. D) تفوق مصدر مستوى الآزوت (1) غ/ل وبشكل معنوي جداً على جميع المستويات، يليه المستوى (0.5) غ/ل، ثم (1.5) غ/ل, ثم (0) غ/ل ولم يلاحظ فروق معنوية بين المستويان (0) غ/ل و (2) غ/ل .

وعند دراسة الحموض المرافقة لحمض الليمون كانت وفقاً للقيمة الآتية:

(5.68،3.78، 2.96، 4.86، 5.59)%، وتبين أن كمية الحموض المرافقة بلغت أعلى مستوى 5.68 % بغياب نترات الأمونيوم(الشاهد) ثم بدأت بالانخفاض مع الإضافة التدريجية من نترات الأمونيوم لتصل إلى أدنى مستوى 2.96%عند تركيز(1) غ/ل، لتعاود ارتفاعها من جديد مع زيادة نترات الأمونيوم حتى تصل إلى5.59% عند تركيز(2) غ/ل، وكانت الفروق معنوية بين جميع المعاملات، ولم يلاحظ وجود حمض الكبريت بينما وجد حمض الأوكزاليك.

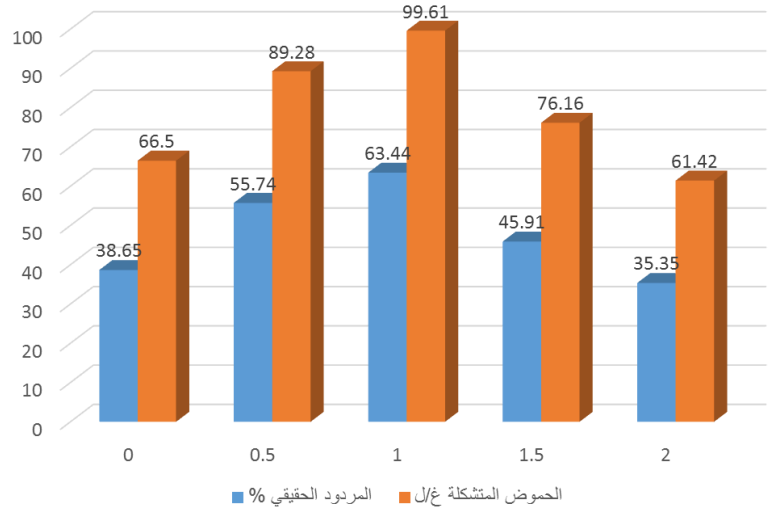
ويلاحظ من الجدول (19) أن ازدياداً واضحاً ومستمراً حصل في كمية كتلة المشيجة الجافة (الكتلة الحيوية النامية) نتيجة ارتفاع مستوى مصدر الآزوت في وسط مصل الجبن وفقاً للقيم الآتية:(15.84،17.48، 19.35، 26.11، 29.13)غ/ل ونستنتج أنه عند عدم إضافة مصدر الآزوت إلى الوسط الزرعي قد أدى إلى نمو مشيجي واضح وجيد، وازدادت كمية الكتلة الجافة مع زيادة مصدر الآزوت المضاف حتى (1) غ/ل حيث بلغت عندها كمية الكتلة الجافة 19.35 غ/ل، وضمن المستوى الموصى به أما الزيادة اللاحقة من مصدر الآزوت فقد أدت إلى نمو مضطرب في كتلة مشيجة الفطر إلى مستويات أعلى من الحد المسموح به ، يتضح مما

سبق وجود تناسب طردي بين كمية الآزوت الموجودة في الوسط الزرعي وكتلة النمو المشيجي حسب (Wolschek و Kubicek، 1999).

ويبين الجدول (19) النسبة المئوية للسكريات المتبقية في وسط التخمير حيث أن ارتفاع مستوى مصدر الآزوت المضاف إلى الوسط الزرعي أثر عكسياً في نسبة السكريات المتبقية والتي هي على التسلسل: (1.02،0.78،0.63 ، 0.91،1.79) %، ولوحظ أن السكريات المتبقية تتجه عكساً مع الحموض المرافقة وكانت نسبة السكريات المتبقية من دون تخمير 0.63 % عند مستوى مصدر أزوت مضاف (1) غ/ل ثم بدأت نسبة السكريات المتبقية بالصعود مع زيادة الكميات المضافة من نترات الأمونيوم لتصل إلى1.79% عند التركيز (2) غ/ل ، وكانت الفروق معنوية بين جميع المعاملات (Wolschek و Kubicek، 1999).

وأخيراً نستنتج من الجدول (19) أن أفضل مستوى مقترح لنترات النشادر (مصدر للآزوت) في وسط مصل الجبن(1) غ/ل، نتيجة إعطائها أفضل حموضة 99.61 غ/ل، ومردوداً كلياً 66.40 % ، ومردوداً حقيقياً 63.44% وكانت باقي المعطيات المستحصل عليها جيدة أيضاً.

ويبين الشكل (6) بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من نترات الأمونيوم.



شكل (6) بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من نترات الأمونيوم

4-1-8-تأثير فوسفات أحادية البوتاسيوم في إنتاج حمض الليمون بوساطة سلالة الفطر PLA30:

يبين الجدول (20) تأثير مستويات فوسفات أحادية البوتاسيوم المختلفة والمتدرجة:

(0،0.05 ،0.15 ،0.25 ،0.30)غ/ل في كمية الحموضة الناتجة عن عملية التخمير، بعد إضافة المستوى الأفضل من اللاكتوز (150) غ/ل ومن نترات النشادر (1) غ/ل.

الجدول(20) الحموضة الكلية الناتجة باستعمال مستويات مختلفة من فوسفات أحادية K

مستويات فوسفات أحادية البوتاسيوم المدروسة غ/ل	الحموضة الكلية مقدرة بالمعايرة غ/ل							
	مدة التخمير (يوم)							القيمةالعظمى للحموضة غ/ل
	7	9	11	13	14	15	16	
0	43.93	41.96	48.89	59.39	63.91	73.50	62.47	73.50
0.05	38.46	48.58	54.46	65.52	76.96	82.83	69.58	76.96
0.15	51.97	62.33	72.62	84.66	95.02	91.59	89.53	95.02
0.25	59.08	61.21	72.43	87.53	98.38	98.35	97.96	98.38
0.30	47.56	56.87	64.01	84	94.50	91.66	89.04	94.50

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى p<0.05

ويلاحظ من الجدول (20) حصول نمو مشيجي عند عدم إضافة فوسفات أحادية البوتاسيوم وبلغت الحموضة المنتجة في اليوم السابع 43.93غ/ل وازدادت كمية الحموضة حتى وصلت الذروة في اليوم 15 من التخمير 73.50غ/ل ثم تناقصت بعد ذلك وعند إضافة المستوى الأول من فوسفات أحادية البوتاسيوم كانت الحموضة المنتجة في اليوم السابع من التخمير أعلى مما سبق 38.46غ/ل ، وبلغت الذروة في اليوم الرابع عشر من التخمير 76.96غ/ل وعند إضافة المستوى الثاني حصل ارتفاعا" في كمية الحموضة المنتجة في اليوم السابع 51.97غ/ل، وبلغت الذروة في اليوم الرابع عشر 95.02غ/ل، وكان تأثير المستوى الثالث إيجابياً إذ بلغت الحموضة في اليوم السابع 59.08غ/ل، و98.38غ/ل في ذروة الإنتاج، ونتيجة الاستمرار في زيادة كمية فوسفات أحادية البوتاسيوم إلى المستوى الرابع حصل تراجعاً في معدل الحموضة الناتجة في اليوم السابع 47.56غ/ل ، و94.50 غ/ل عند ذروة الإنتاج.

نستنتج مما سبق أن إضافة المستوى (0.25) غ/ل من فوسفات أحادية البوتاسيوم أدت إلى إنتاج أكبر كمية من الحموضة في حين تناقصت الحموضة عند ازدياد مستوى فوسفات أحادية البوتاسيوم أو نقصانها عن هذا المستوى ويمثل هذا المستوى القيمة الأفضل في عمليات التخمير المنتج لحمض الليمون في وسط مصل الجبن وهذا يتوافق مع(Pintado وزملاؤه ، 1993).

ويعزى ذلك أن كمية الفوسفات والبوتاسيوم الموجودة أصلاً في مصل الجبن غير كافية بشكل كامل لإنتاج حموضة بكميات كبيرة ، وإنما تحتاج إلى كميات إضافية لتعويض هذا النقص.

وتبين نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية جداً للحموضة الناتجة عن المستويات المختلفة من فوسفات أحادية البوتاسيوم في وسط مصل الجبن.

كما بين اختبار أقل فرق معنوي (L.S.D) تفوق المستوى (0.25) غ/ل بفروق معنوية جداً على جميع المستويات يليه المستوى (0.15) غ/ل الذي تفوق بفروق معنوية جداً على كل من المستويات (0،0.05) غ/ل بينما لم يتفوق بشكل معنوي على المستوى(0.30) غ/ل، ثم المستوى (0.05) غ/ل الذي لم يتفوق بشكل معنوي على المستوى الأخير (0) غ/ل، وتبين أيضاً وجود فروق معنوية جداً لكمية الحموضة المنتجة خلال مدة التخمير حيث أن المستوى (0.25) غ/ل أعطى أعلى إنتاج من الحموضة في اليوم الرابع عشر وكذلك المستويات (0.30، 0.15،0.05) غ/ل أما المستوى (0) غ/ل أعطى أعلى إنتاج في اليوم الخامس عشر، وبلغت كمية الحموض الكلية مايلي على الترتيب :

(73.50، 76.96، 95.02، 98.38، 94.50)غ/ل.

نستنتج مما سبق أن سلالة الفطر الأسود(PLA30) أعطت أعلى إنتاج لها من الحموضة والمقدرة بالمعايرة عند مستوى (0.25) غ/ل وفي اليوم الرابع عشر.

ويبين الجدول (21) ازدياد المردود الكلي من حمض الليمون مع زيادة مستوى فوسفات أحادية البوتاسيوم باستعمال وسط مصل الجبن حتى مستوى (0.25) غ/ل بعدها يبدأ المردود الكلي بالانخفاض وفقاً للقيم الآتية : (49،51.30 ,63.34 ,65.58 ,63) %.

الجدول (21) بعض المؤشرات باستعمال مستويات مختلفة من فوسفات أحادية البوتاسيوم

مستويات فوسفات أحادية البوتاسيوم المدروسة غ/ل	الحموض الكلية غ/ل	المردود الكلي %	المردود الحقيقي %	الحموض المرافقة %	السكريات المتبقية%	الكتلة الحيوية غ/ل
0	73.50^{e}	49^{ep}	41.56^{ep}	7.44^{a}	1.98^{a}	15.71^{e}
0.05	76.96^{p}	51.30^{p}	44.63^{p}	6.67^{b}	1.52^{b}	16.36^{p}
0.15	95.02^{b}	63.34^{b}	57.48^{b}	5.86^{c}	0.94^{c}	18.50^{c}
0.25	98.38^{a}	65.58^{a}	62.14^{a}	3.44^{e}	0.65^{p}	21.11^{b}
0.30	94.50^{c}	63^{cb}	58.88^{c}	4.12^{p}	0.71^{e}	22.76^{a}

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى p<0.05

ويلاحظ مما سبق وجود مردود كلي من حمض الليمون في حال عدم أية إضافة من فوسفات أحادية البوتاسيوم إلى وسط مصل الجبن ، وهذا يشير إلى وجود كميات من هذا المركب في مصل الجبن تكون صالحة للاستعمال من قبل مشيجة الفطر ولكنها غير كافية لإعطاء مردود أعظمي من حمض الليمون، لذا نجد أنه عند وضع الإضافة الأولى حصل ارتفاعاً في هذا المردود ويستمر هذا الارتفاع مع زيادة كمية الإضافة حتى (0.25) غ/ل، وبلغ المردود الكلي ذروته 65.58%، ويلاحظ بدء انخفاض المردود الكلي مع زيادة الكمية المضافة ويدل هذا على

الاحتياجات المحددة من فوسفات أحادية البوتاسيوم التي تعطي أفضل مردود كلي وهذا يتفق مع(Produkcyjne وCzesc ، 1973) .

وتبين نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية جداً للمردود الكلي الناتج عن استعمال مستويات مختلفة من فوسفات أحادية البوتاسيوم في وسط مصل الجبن.

ويبين اختبار أقل فرق معنوي (L. S. D) تفوق المستوى(0.25) غ/ل وبفروق معنوية على كافة المستويات يليه المستوى (0.15) غ/ل الذي تفوق وبفروق معنوية جداً على كل من المستويات (0، 0.05)غ/ل بينما لم يتفوق بشكل معنوي على المستوى (0.30) غ/ل، يليه من حيث التفوق المستوى (0.30) غ/ل الذي تفوق بشكل معنوي جداً مع كل من المستويات (0 ، 0.05) غ/ل ، وأخيراً المستوى (0.05) غ/ل الذي لم يتفوق بشكل معنوي على المستوى الأخير (0) غ/ل.

ويتبين من الجدول (21) ارتفاع المردود الحقيقي لحمض الليمون بزيادة مستوى فوسفات أحادية البوتاسيوم في وسط مصل الجبن ليصل ذروته عند مستوى (0.25) غ/ل ثم عاود نقصانه من جديد وكانت القيم على التسلسل :(41.56، 44.63، 57.48، 62.14، 58.88) %.

ويتوضح من التحليل الإحصائي للمردود الحقيقي لحمض الليمون نفس النتائج التي حصلنا عليها عند دراسة المردود الكلي والمبينة سابقاً وتفوق المستوى (0.25) غ/ل الذي أعطى مردوداً حقيقياً من حمض الليمون 62.14%، ولدى دراسة الحموض المرافقة لحمض الليمون، كانت مايلي:(7.44، 6.67، 5.86، 3.44، 4.12) %.

نجد أن نسبتها عند المستوى (0.25) غ/ل فوسفات أحادية البوتاسيوم بلغت (3.44)% ، ولم يلاحظ وجود حمض الكبريت بينما وجد حمض الأوكزالياك.

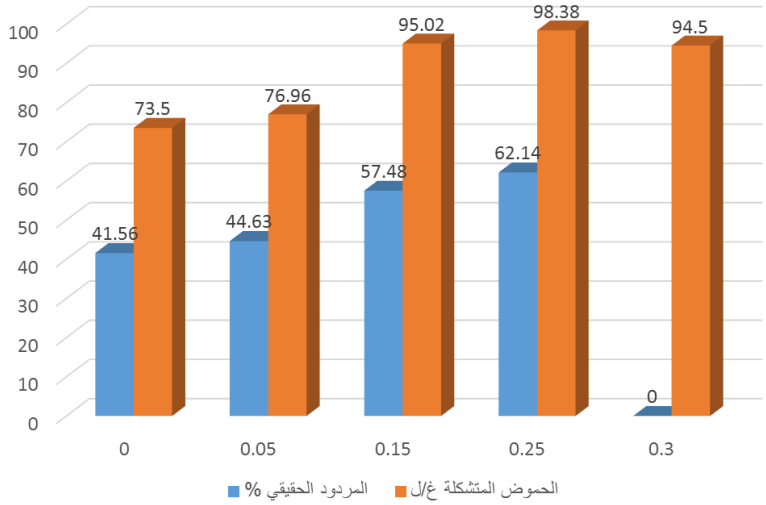
ويتوضح من الجدول (21) أن ازدياداً مستمراً حصل في كتلة المشيجة الجافة نتيجة ارتفاع مستوى فوسفات أحادية البوتاسيوم في وسط مصل الجبن وفقاً للقيم التالية:

(15.71،16.36، 18.50، 21.11، 22.76)غ/ل، ونستنتج من ذلك أنه حصل إنتاش ونمو مشيجي عند عدم إضافة فوسفات أحادية البوتاسيوم إلى وسط مصل الجبن ، وازداد معدل النمو المشيجي طرداً مع زيادة مستوى الإضافة منه، وكانت في حدودها المقترحة حتى مستوى إضافة (0.15) غ/ل بعدها وباستمرار معدل مستوى الإضافة زادت الكمية المنتجة من مشيجة الفطر طردياً وتجاوزت المستويات الموصى بها وهذا موافقاً مع (Pintado وزملاؤه ، 1993).

ويبين الجدول نسبة السكريات المتبقية في وسط التخمير، أن هناك تناسباً عكسياً بين مستوى فوسفات أحادية البوتاسيوم المضاف ونسبة السكريات المتبقية وتصبح ضمن المستوى الموصى به ابتداءً من مستوى إضافة (0.15) غ/ل وكانت على التسلسل:

(1.98، 1.52، 0.94، 0.65، 0.71)%، وبلغت عند مستوى إضافة (0.25) غ/ل فوسفات أحادية البوتاسيوم (0.65)% سكريات دون تخمير، ويستنتج من الجدول (21) أن أفضل مستوى إضافة مقترح لفوسفات أحادية البوتاسيوم (كمصدر للفوسفور والبوتاسيوم) في وسط مصل الجبن (0.25) غ/ل الذي أعطى أفضل حموضة منتجة 98.38غ/ل، وأعلى مردود كلي 65.58% وأفضل مردود حقيقي لحمض الليمون 62.14%، وكانت باقي المعطيات المستحصل عليها جيدة أيضا".

ويبين الشكل (7) بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من فوسفات أحادية البوتاسيوم.



الشكل (7) بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من فوسفات أحادية البوتاسيوم.

4-1-9-تأثير حديدي سيانيد البوتاسيوم في إنتاج حمض الليمون بوساطة سلالة الفطر PLA30:

يبين الجدول (22) تأثير مستويات مصدري السيانيد المضافة المختلفة والمتدرجة:

(0،0.3، 0.6، 0.9)غ/ل في كمية الحموضة الناتجة عن عملية التخمير بعد إضافة المستوى الأفضل من اللاكتوز (150) غ/ل ونترات الأمونيوم (1) غ/ل، وفوسفات أحادية البوتاسيوم (0.25) غ/ل.

الجدول (22) الحموضة الكلية الناتجة باستعمال مستويات مختلفة من حديدي سيانيد K

مستويات حديدي سيانيد البوتاسيوم	الحموضة الكلية مقدرة بالمعايرة غ/ل	
	مدة التخمير (يوم)	القيمة العظمى

مدروسة غ/ل	7	9	11	13	14	15	16	للحموضة غ/ل
0	41.89	43.54	55.61	58.69	59.92	63	61.25	63[D]
0.3	64.68	77.38	89.88	96.70	98.38	97.61	91.52	98.38[a]
0.6	60.76	70.38	75.53	81.06	80.46	73.88	70.45	81.06[b]
0.9	37.24	44.03	52.50	56.38	59.88	66.50	60.02	[c]66.50

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى p<0.05

ولوحظ من الجدول (22) أن تأثير حديدي سيانيد البوتاسيوم كان إيجابياً حتى مستوى إضافة (0.3) غ/ل وكانت كمية الحموضة المنتجة في اليوم السابع للتخمير 41.89 غ/ل عند عدم إضافة مصدر السيانيد في الوسط الزرعي، واستمرت بالزيادة حتى وصلت إلى الذروة في اليوم الخامس عشر للتخمير 63غ/ل وكان النمو المشيجي مرتفعاً، وعند إضافة (0.3) غ/ل من مصدر السيانيد بلغت الحموضة المنتجة في اليوم السابع للتخمير 64.68غ/ل، ووصلت إلى الذروة في اليوم الرابع عشر 98.38غ/ل، وبإضافة (0.6)غ/ل كانت الحموضة المنتجة في اليوم السابع للتخمير 60.76 غ/ل ، وواصلت الحموضة زيادتها باستمرار مدة التخمير حتى وصلت إلى الذروة 81.06غ/ل واستمر التناقص في كمية الحموضة المنتجة بارتفاع مستوى مصدر السيانيد المضاف حتى المستوى الأخير (0.9) غ/ل الذي بلغت فيه الحموضة الناتجة 37.24غ/ل في اليوم السابع و66.50غ/ل في ذروة الإنتاج في اليوم الخامس عشر.

نستنتج مما سبق أن الحموضة الناتجة في اليوم السابع للتخمير زادت بازدياد مستوى حديدي سيانيد البوتاسيوم المضاف حتى مستوى (0.3) غ/ل ، ثم بدأت بالتناقص وكذلك زادت الحموضة المنتجة بازدياد مستوى حديدي سيانيد البوتاسيوم المضاف ووصلت إلى الذروة في اليوم الرابع عشر للتخمير عند مستوى الإضافة ذاته، ثم انخفضت بازدياد مستوى مصدر السيانيد المضاف عن (0.3) غ/ل.

يتبين مما سبق أن الكمية المضافة من حديدي سيانيد البوتاسيوم إلى وسط مصل الجبن ساهمت بشكل جيد وواضح في إنتاجية سلالة الفطر المستعملة من الحموضة حتى مستوى محدد ثم أثرت بشكل سلبي باستمرار ارتفاع مستوى السيانيد المضاف، وتبين نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية جداً بين المستويات المختلفة من حديدي سيانيد البوتاسيوم في وسط مصل الجبن.

كما أظهر اختبار أقل فرق معنوي (L. S. D) تفوق المستوى (0.3) غ/ل من حديدي سيانيد البوتاسيوم وبفروق معنوية جداً على باقي المستويات ثم يليه على الترتيب(0.6،0.9،0)غ/ل كما تبين وجود فروق معنوية جداً لكمية الحموضة المنتجة خلال مدة التخمير إذ أن المستوى المتفوق أعطى أعلى إنتاج في اليوم الرابع عشر أما المستوى (0.6) غ/ل فقط أعطى أعلى إنتاج

في اليوم الثالث عشر أما المستويين (0،0.9)غ/ل فقد أعطيا أعلى إنتاج في اليوم الخامس عشر.

أي بلغت كمية الحموض الكلية ما يلي على الترتيب :(63 ,98.38 ,81.06 ,66.50) غ/ل

نستنتج مما سبق أن سلالة الفطر(PLA30) أعطت أعلى إنتاج من الحموضة المنتجة والمقدرة بالمعايرة عند مستوى من حديدي سيانيد البوتاسيوم (0.3) غ/ل في اليوم الرابع عشر.

ويبين الجدول (23) ازدياد المردود الكلي بارتفاع مستوى مصدر السيانيد باستعمال وسط مصل الجبن حتى مستوى مضاف من حديدي سيانيد البوتاسيوم (0.3) غ/ل بعدها يبدأ المردود الكلي بالانخفاض وفقاً للقيم التالية:(42,65.58 ,54.04 ,44.33) %.

الجدول (23) بعض المؤشرات باستعمال مستويات مختلفة من حديدي سيانيد البوتاسيوم

مستويات حديدي سيانيد البوتاسيوم المدروسة غ/ل	الحموضة الكلية غ/ل	المردودالكلي %	المردودالحقيقي %	الحموض المرافقة %	السكريات المتبقية %	الكتلةالحيوية غ/ل
0	63^{D}	42^{D}	37.11^{D}	4.89^{b}	0.39^{D}	22.11^{a}
0.3	98.38^{a}	65.58^{a}	63.47^{a}	2.11^{D}	0.42^{c}	20.04^{b}
0.6	81.06^{b}	54.04^{b}	49.93^{b}	4.11^{c}	0.68^{b}	18.12^{c}
0.9	66.50^{c}	44.33^{c}	38.58^{c}	5.75^{a}	0.99^{a}	17.89^{D}

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى $p<0.05$

وهذا يقابله أيضاً ازدياد المردود الحقيقي لحمض الليمون بارتفاع مستوى السيانيد في الوسط الزرعي حتى مستوى (0.3) غ/ل أيضاً ثم يبدأ بعدها بالتناقص وكانت على التوالي:

(37.11، 63.47، 49.93، 38.58) %وهذا يتطابق مع (Ettler وزملاؤه ، 1991).

ولوحظ مما سبق وجود مردود كلي وحقيقي عند عدم إضافة مصدر السيانيد إلى الوسط الزرعي وكان النمو المشيجي كثيفاً مما أدى إلى ضعف العمليات الحيوية المنتجة لحمض الليمون بسبب عدم وصول الأوكسجين إلى جميع خلايا مشيجة الفطر وبالتالي انخفاض مردود العمليات الحيوية من حمض الليمون وعند إضافة المستوى الأول منه (0.3) غ/ل ثبط مركب حديدي سيانيد البوتاسيوم النمو بدوره السام وساهم في رفع كفاءة الأوكسجين المنحل في محلول التخمير والدخول بالعمليات الحيوية المنتجة لحمض الليمون بشكل أفضل وبارتفاع مستوى حديدي سيانيد البوتاسيوم المضاف إلى الوسط الزرعي أدى إلى ازدياد المردود الكلي والحقيقي لحمض الليمون حتى الوصول إلى مرحلة توازن تقريبية بين كمية المعادن الثقيلة الموجودة في الوسط الزرعي وكمية حديدي سيانيد البوتاسيوم عندها كان المردود أعظمياً، وباستمرار ارتفاع مستوى حديدي سيانيد البوتاسيوم عن المستوى الأفضل أدى إلى تناقص المردود الكلي والحقيقي.

وتبين من نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية جداً للمردود الكلي والحقيقي لحمض الليمون الناتج عن إضافة مستويات مختلفة من حديدي سيانيد البوتاسيوم .

ويبين اختبار أقل فرق معنوي (L. S. D) تفوق المستوى (0.3) غ/ل وبشكل معنوي جداً على باقي المستويات يليه المستوى (0.6) غ/ل، ثم (0.9) غ/ل، ثم المستوى (0) غ/ل.

وعند دراسة التقدير الكمي للحموض المرافقة لحمض الليمون والمذكورة على التسلسل:

(4.89، 2.11، 4.11، 5.75)% نجد انخفاضاً في نسبتها حتى مستوى مضاف (0.3) غ/ل من حديدي سيانيد البوتاسيوم 2.11%، ثم ترتفع نسبتها من جديد مع ارتفاع مستوى الإضافة منه، ولم يلاحظ وجود حمض الكبريت بينما وجد حمض الأوكزاليك.

ويلاحظ من الجدول (23) أن تناقصاً واضحاً ومستمراً حصل في كمية كتلة المشيجة الجافة نتيجة ارتفاع مستوى مصدر السيانيد المضاف إلى وسط مصل الجبن والمبينة كما يلي:

(22.11، 20.04، 18.12، 17.89)غ/ل، ونجد أنه عند عدم إضافة مصدر السيانيد إلى الوسط الزرعي أدى إلى إنتاش ونمو مشيجي كبير أعلى من المستوى الموصى به حسب (Lesniak وزملاؤه ، 1990).

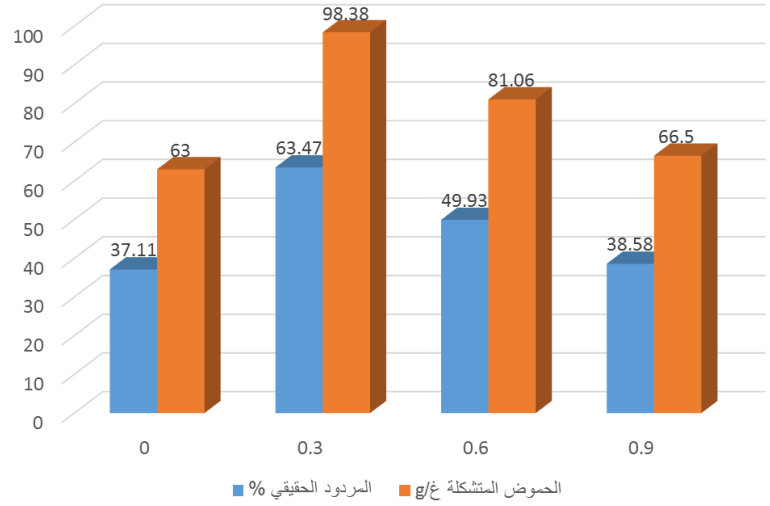
وتناقصت كمية الكتلة الجافة مع الزيادة من مصدر السيانيد المضاف بشكل دائم ومستمر حتى وصلت كميتها عند مستوى إضافة (0.9) غ/ل من بوتاسيوم سيانيد الحديد إلى 17.89 غ/ل من الكتلة الجافة النامية ويعود سبب هذا الانخفاض المستمر في كمية مشيجة الفطر النامية إلى الفعل السام الذي يؤديه مركب حديدي سيانيد البوتاسيوم وازدياد معدل السمية مع ارتفاع المستوى المضاف منه ويفيدنا في هذا الحال التحكم في النمو الزائد للمشيجة الفطرية والوصول إلى حالة توازن بين كمية مشيجة الفطر النامية وكمية الأوكسجين المنحل في وسط التخمير يتضح مما سبق وجود تناسب عكسي بين كمية حديدي سيانيد البوتاسيوم الموجودة في الوسط الزرعي وغزارة النمو المشيجي وهذا يتفق مع (Ali وزملاؤه،2002؛Sanchez وزملاؤه،19 1970).

ويبين الجدول (23) النسبة المئوية للسكريات المتبقية في وسط التخمير، حيث أن ارتفاع مستوى مصدر السيانيد المضاف إلى الوسط الزرعي أثر طردياً في نسبة السكريات المتبقية من دون تخمير والتي كانت حسب التسلسل:(0.42,0.39 ,0.68 ,0.99) %، وكانت نسبة السكريات المتبقية دون تخمير(0.42)% عند مستوى مصدر سيانيد مضاف (0.3)غ/ل، وهذا يقع ضمن المجال المسموح به من قبل :(Lesniak وKutermankiewicz،1990) والبالغ(1–0.2) % وذلك تبعاً لنوعية السكر المستعمل.

يستنتج من الجدول (23) أن أفضل مستوى مقترح لحديدي سيانيد البوتاسيوم في وسط مصل الجبن (0.3)غ/ل نتيجة إعطائه أفضل حموضة 98.38 غ/ل ومردود كلي 65.58% ومردود

حقيقي 63.47% وكانت باقي المعطيات المستحصل عليها جيدة أيضاً، وهذا ما يرفع من كفاءة إنتاج سلالة الفطر الأسود المستعملة لإنتاج حمض الليمون في وسط مصل الجبن.

ويبين الشكل (8) بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من حديدي سيانيد البوتاسيوم.



شكل (8) بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من حديدي سيانيد البوتاسيوم

4-1-10-تأثير كبريتات التوتياء في إنتاج حمض الليمون بوساطة سلالة الفطر المنتخبة PLA30:

يبين الجدول (24) تأثير مستويات مصدر كبريتات التوتياء المضافة المختلفة المتدرجة: (0،0.06، 0.1، 0.12) غ/ل في كمية الحموضة المنتجة عن عملية التخمير، بعد إضافة المستوى الأفضل من اللاكتوز (150) غ/ل،ومن نترات الأمونيوم (1) غ/ل، ومن فوسفات أحادية البوتاسيوم (0.25) غ/ل ومن حديدي سيانيد البوتاسيوم (0.3) غ/ل، وتمت دراسة تأثير كبريتات التوتياء اللازمة لترسيب الكمية الزائدة من حديدي سيانيد البوتاسيوم لإبطال مفعوله السام في عمليات تخمير حمض الليمون حسب (Lesniak و Kutermankiewicz،1990).

الجدول (24) الحموضة الكلية الناتجة باستعمال مستويات مختلفة من كبريتات التوتياء

مستويات كبريتات التوتياء المدروسة غ/ل	تقدير الحموضة الكلية مقدرة بالمعايرة غ/ل						
	مدة التخمير (يوم)						القيمة العظمى للحموضة غ/ل
	7	9	11	13	14	15	16	
0	41.12	47.98	51.97	61.25	66.46	63	59.32	66.46^{a}
0.06	66.46	75.74	88.13	91	94.88	92.78	85.08	94.88^{b}

98[a]	88.76	94.88	98	94.11	84.52	80.88	70.14	0.1
87.92[c]	73.92	83.96	87.92	84.38	80.88	76.26	61.39	0.12

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى p<0.05

لوحظ من الجدول (24) أن تأثير كبريتات التوتياء كان إيجابياً حتى مستوى إضافة (0.1) غ/ل إلا أنه أخذ منحى مخالفاً مع زيادة مستوى كبريتات التوتياء المضافة، وبلغت كمية الحموضة المنتجة في اليوم السابع للتخمير 41.12غ/ل عند عدم إضافة كبريتات التوتياء إلى الوسط الزرعي، واستمرت بالزيادة حتى بلغت الذروة في اليوم الرابع عشر للتخمير 66.46 غ/ل ، وعند إضافة (0.06)غ/ل من كبريتات التوتياء كانت الحموضة الناتجة في اليوم السابع 66.46 غ/ل ووصلت في اليوم الرابع عشر إلى 94.88غ/ل وبارتفاع مستوى كبريتات التوتياء المضاف إلى (0.1) غ/ل بلغت الحموضة في اليوم السابع 70.14 غ/ل وهي الأعلى من سابقاتها ثم تابعت زيادتها حتى وصلت إلى الذروة في اليوم الرابع عشر إلى 98 غ/ل وهذه القيمة أعلى مما سبق وبارتفاع مستوى كبريتات التوتياء إلى المستوى (0.12) غ/ل كانت الحموضة المنتجة في اليوم السابع 61.39غ/ل، في حين وصلت الحموضة المنتجة في اليوم الرابع عشر إلى الذروة 87.92غ/ل.

يلاحظ مما سبق أن الحموضة المنتجة في اليوم السابع للتخمير زادت بارتفاع مستوى كبريتات التوتياء المضاف حتى (0.1) غ/ل ثم بدأت بالتناقص، وكذلك زادت الحموضة المنتجة ووصلت إلى الذروة في اليوم الرابع عشر للتخمير حتى مستوى (0.1) غ/ل أيضاً وتناقصت بارتفاع مستوى كبريتات التوتياء المضافة عن (0.1) غ/ل.

يتبين مما سبق أن الكمية المضافة من كبريتات التوتياء إلى وسط مصل الجبن ساهمت بشكل جيد في رفع إنتاجية سلالة الفطر من الحموضة حتى مستوى (0.1) غ/ل،إلا أن ارتفاع مستوى الإضافة أثر سلبياً في كمية الحموضة المنتجة، وهذا يتفق مع (Sanchez وزملاؤه،1970).

وتبين نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية جداً لكمية الحموضة الناتجة عن المستويات المختلفة من كبريتات التوتياء في وسط مصل الجبن.

كما بين اختبار أقل فرق معنوي (L. S. D) تفوق المستوى (0.1) غ/ل وبفروق معنوية جداً على باقي المستويات ثم المستوى (0.06) و(0.12) غ/ل ، ثم المستوى(0) غ/ل.

أي بلغت كمية الحموض الكلية ما يلي على الترتيب :(66.46، 94.88، 98، 87.92) غ/ل

نستنتج مما سبق أن سلالة الفطر الأسود(PLA30) أعطت أعلى إنتاج من الحموضة المنتجة والمقدرة بالمعايرة عند مستوى من كبريتات التوتياء (0.1) غ/ل وفي اليوم الرابع عشر .

ويبين الجدول(25) ازدياد المردود الكلي بارتفاع مستوى كبريتات التوتياء في وسط مصل الجبن حتى مستوى مضاف (0.1) غ/ل وهذا ما يتطابق مع (Sanchez وزملاؤه ، 1970)، وبعدها يبدأ المردود الكلي بالانخفاض وفقاً لما يلي :(44.30,63.25, 65.33 ,58.61)%.

الجدول (25) بعض المؤشرات باستعمال مستويات مختلفة من كبريتات التوتياء

مستويات كبريتات التوتياء المدروسة غ/ل	الحموض الكلية غ/ل	المردودالكلي %	المردودالحقيقي %	الحموض المرافقة %	السكريات المتبقية %	الكتلةالحيوية غ/ل
0	66.46^{D}	44.30^{D}	39.42^{D}	4.88^{c}	1.75^{a}	20.37^{c}
0.06	94.88^{b}	63.25^{b}	55^{b}	8.25^{a}	0.85^{b}	22.63^{b}
0.1	98^{a}	65.33^{a}	59.34^{a}	5.99^{b}	0.49^{D}	23.11^{a}
0.12	87.92^{c}	58.61^{c}	53.87^{c}	4.74^{D}	0.73^{c}	17.51^{D}

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى 0.05>p

وهذا يقابله أيضاً ازدياد المردود الحقيقي لحمض الليمون بارتفاع مستوى كبريتات التوتياء حتى المستوى السابق ذاته (0.1) غ/ل،ثم يبدأ بعدها بالتناقص وفقا" للقيم التالية:

(39.42،55،59.34،53.87)% ، ويلاحظ مما سبق وجود مردود كلي وحقيقي عند عدم إضافة كبريتات التوتياء إلى الوسط الزرعي، وعند إضافة المستوى الأول (0.06) غ/ل من كبريتات التوتياء في الوسط الزرعي أدى إلى ارتفاع المردود الكلي والحقيقي لحمض الليمون وباستمرار ارتفاع مستوى كبريتات التوتياء المضاف أدى إلى ارتفاع المردود الكلي والحقيقي حتى الوصول إلى مرحلة التوازن التي تساوى فيها كمية كبريتات التوتياء المضافة مع كمية حديدي سيانيد البوتاسيوم الحر الموجود في الوسط الزرعي، عندها وصل المردود الكلي والحقيقي إلى الذروة وباستمرار ارتفاع مستوى كبريتات التوتياء المضافة إلى الوسط حصل تأثيراً سلبياً في المردود الكلي والحقيقي وأدى إلى نقصهما عن المستوى الأعلى الذي وصلا إليه وهذا يتطابق مع (Mashhoor وزملاؤه ،1988).

ويبين التحليل الإحصائي للمردود الكلي والحقيقي وجود فروق معنوية جداً بين المستويات المختلفة من كبريتات التوتياء وبين اختبار أقل فرق معنوي (L. S. D) بأن المستوى (0.1) غ/ل تفوق وبفروق معنوية جداً على باقي المستويات ثم يليه المستويان(0.06،0.12)غ/ل على الترتيب ثم المستوى (0) غ/ل.

وعند التقدير الكمي للحموض المرافقة لحمض الليمون والمبينة كما يلي :

(4.88،8.25، 5.99، 4.74)% نجد ارتفاعاً في نسبتها حتى مستوى مضاف (0.06) غ/ل من كبريتات التوتياء ثم انخفاض نسبتها من جديد مع ارتفاع مستوى الإضافة منها، ولم يلاحظ

وجود حمض الكبريت بينما وجد حمض الأوكزاليك، ويلاحظ من الجدول (25) أن ازدياداً حصل في كمية كتلة المشيجة الجافة نتيجة ارتفاع مستوى كبريتات التوتياء في وسط مصل الجبن ثم انخفاضاً في كميتها والمبينة وفقاً لما يلي :

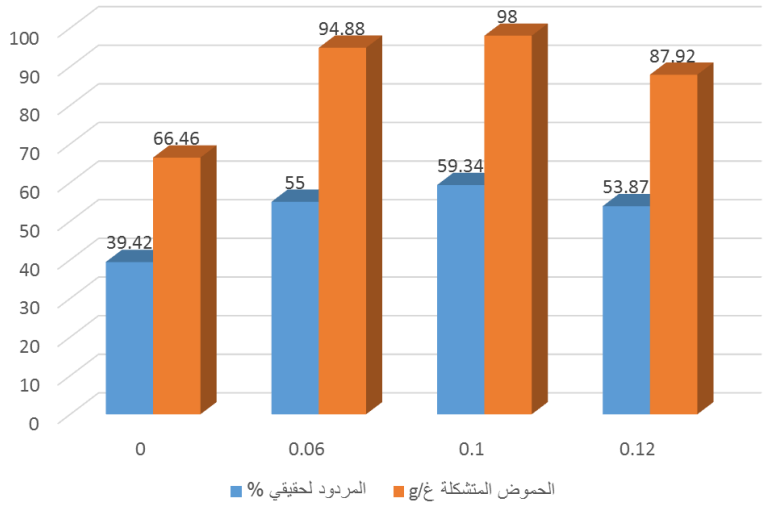
(20.37،22.63 ،23.11 ،17.51)غ/ل، ونستنتج أنه عند عدم إضافة كبريتات التوتياء إلى الوسط الزرعي حصل نمواً طبيعياً للمشيجة ثم ازدادت كمية كتلة الفطر الجافة مع ارتفاع مستوى كبريتات التوتياء المضافة إلى الوسط الزرعي حتى مستوى مضاف (0.1) غ/ل حيث بلغت فيه الكتلة الجافة 23.11 غ/ل وذلك لإبطال المفعول السام لمركب حديدي سيانيد البوتاسيوم الحر (الزائد)، ثم بدأت بالتناقص مع استمرار ارتفاع مستوى كبريتات التوتياء عن ذلك المستوى.

ويفسر ذلك أنه في حال عدم إضافة كبريتات التوتياء فإنه يوجد زيادة من مركب حديدي سيانيد البوتاسيوم لم ترتبط مع المعادن الثقيلة التي بقيت في الوسط الزرعي وأثرت تأثيرا" سلبياً في النمو المشيجي إلا أنه عند الإضافة الأولى من كبريتات التوتياء أدى ذلك إلى ارتباطها مع حديدي سيانيد البوتاسيوم الحر (غير المرتبط) وهذا أدى إلى انخفاض معدلات سميته وبالتالي ازداد النمو المشيجي حتى وصل إلى مرحلة التوازن والتي تتساوى فيها كمية حديدي سيانيد البوتاسيوم الحر مع كمية كبريتات التوتياء المضافة، ومع ارتفاع كبريتات التوتياء المضافة عن مرحلة التوازن أعاد التأثير السام في النمو المشيجي .

ويبين الجدول (25) النسبة المئوية للسكريات المتبقية دون تخمير في وسط التخمير وأن ارتفاع مستوى كبريتات التوتياء المضافة في الوسط الزرعي أثرت عكسياً في نسبة السكريات المتبقية ثم عادت للارتفاع من جديد وفقاً للقيم التالية:(1.75 ،0.85 ،0.49 ،0.73) %، وكانت ضمن المستوى الموصى به ابتداءً من مستوى إضافة كبريتات التوتياء (0.06) غ/ل وحتى المستوى الأخير، وكانت نسبة السكريات المتبقية من دون تخمير 0.49% عند مستوى مضاف من كبريتات التوتياء (0.1) غ/ل .

يستنتج من الجدول (25) أن أفضل مستوى مقترح لكبريتات التوتياء في وسط مصل الجبن (0.1) غ/ل نتيجة إعطائه أفضل حموضة 98غ/ل، ومردود كلي 65.33 % ومردود حقيقي 59.34% وكانت باقي المعطيات المستحصل عليها جيدة أيضاً وهذا ما يرفع من كفاءة إنتاج سلالة الفطر المستعملة لحمض الليمون في وسط مصل الجبن.

ويبين الشكل (9) بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من كبريتات التوتياء.



الشكل (9) بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من كبريتات التوتياء

4-1-11-تأثير درجات الحموضة (pH) في إنتاج حمض الليمون بوساطة سلالة الفطر المنتخبة PLA30:

ظهر لدى دراسة فعالية سلالة الفطر(PLA30) في إنتاج حمض الليمون فروق معنوية عند جميع الصفات المدروسة حسب الجدول (26) باستخدام 5 درجات من الحموضة pH: (4.5،4،3.5، 3،2.5) في وسط النمو لمصل الجبن بعد إضافة المستوى الأفضل من اللاكتوز (150) غ/ل، ونترات الأمونيوم (1) غ/ل وفوسفات أحادية البوتاسيوم (0.25) غ/ل وحديدي سيانيد البوتاسيوم (0.3) غ/ل، وكبريتات التوتياء(0.1)غ/ل.

الجدول (26) بعض المؤشرات باستعمال مستويات مختلفة من درجات الحموضة الـ (pH)

درجة الحموضة (pH)	الحموض الكلية غ/ل	المردود الكلي %	المردود الحقيقي %	الحموض المرافقة %	السكريات المتبقية %	الكتلةالحيوية غ/ل
2.5	70^{c}	46.67^{c}	39.91^{c}	6.76^{a}	2.97^{a}	17.55^{a}
3	91.42^{b}	60.95^{b}	55.38^{b}	5.57^{e}	2.41^{b}	16.44^{b}
3.5	96.25^{a}	64.17^{a}	58.36^{a}	5.81^{b}	0.98^{e}	14.79^{e}
4	79.27^{b}	52.85^{b}	46.86^{b}	5.99^{c}	1.77^{b}	15.26^{b}
4.5	68.21^{e}	45.47^{e}	34.49^{e}	6.75^{ab}	2.37^{c}	16.17^{c}

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى $p<0.05$

ولوحظ من الجدول (26) تفوق درجة الحموضة الـ pH (3.5) على جميع المعاملات المشاركة حيث بلغت أعلى كمية من الحموض الكلية المتشكلة 96.25 غ/ل عند درجة الحموضة (3.5)

و79.27 غ/ل عند درجة الحموضة (4) في حين انخفضت إلى68.21غ/ل عند درجة حموضة (4.5) ، كما استمر الإنتاج بالانخفاض بانخفاض درجة حموضة الوسط من 91.42 غ/ل عند درجة الحموضة (3) إلى 70 غ/ل عند درجة الحموضة (2.5) ونجد أن الفروق بين جميع المعاملات معنوية.

وتم الحصول على أعلى مردود كلي 64.17% عند درجة الحموضة (3.5) متفوقة بذلك على جميع المعاملات وانخفض المردود الكلي ليصل إلى 52.85% و45.47% عند درجتي الحموضة (4، 4.5) على التوالي،وبلغ 60.95 % و46.67 % للمعاملات ذات درجة الحموضة (3، 2.5) على التوالي، وكانت الفروق مابين جميع المعاملات معنوية، وتم الحصول على أعلى مردود حقيقي 58.36 % في المعاملة ذات درجة الحموضة (3.5) متفوقة بذلك على جميع المعاملات، وانخفض المردود لكل من معاملتي درجة الحموضة(4،4.5) إلى 46.86% و34.49% على التوالي، كما تابع المردود الحقيقي انخفاضه بانخفاض درجة الحموضة ليصل إلى 55.38% و 39.91% في المعاملات ذات درجة الحموضة (3 و2.5) على التوالي وكانت الفروق مابين جميع المعاملات معنوية.

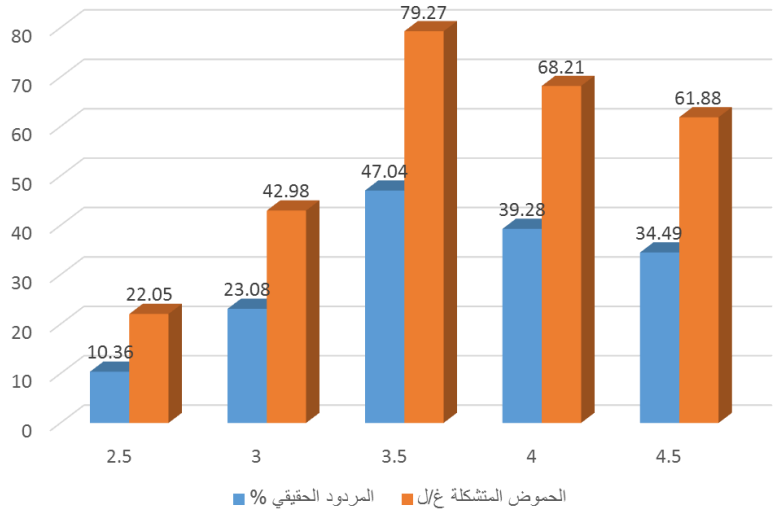
وتوافق إنتاج الحموض المرافقة مع ارتفاع درجة الحموضة مشكلة نسبة قدرها:

6.76% و5.57% و5.81 % و5.99% و 6.75% عند درجات الحموضة:

(2.5 و 3 و 3.5 و 4 و4.5) على التوالي.

يلاحظ عند متابعة مساري كل من درجات الحموضة ونسبة السكريات المتبقية دون تخمير انخفاض نسبة السكريات المتبقية 2.97% و 2.41% مع ارتفاع درجة الحموضة 2.5 و3 على التوالي لتصل إلى أدنى مستوياتها 0.98% عند معاملة درجة الحموضة (3.5) وما تلبث أن تعاود الارتفاع إلى1.77% و2.37% عند معاملتي درجة الحموضة (4 و4.5) على التوالي وكذلك الأمر بالنسبة للكتلة الحيوية المتشكلة حيث تواصل انخفاضها مع زيادة درجات الحموضة لتعطي 17.55غ/ل و16.44 غ/ل و14.79 غ/ل عند درجات الحموضة 2.5 و 3 و 3.5 ثم تعاود ارتفاعها إلى15.26 غ/ل و 16.17غ/ل عند درجة الحموضة (4 و4.5)على التوالي.

نجد من الجدول (26) أن أفضل مستوى مقترح لـ (pH) هو(3.5) لإعطائه أفضل حموضة 96.25غ/ل ومردود كلي 52.85% وحقيقي 47.04%، وكانت باقي المعطيات المستحصل عليها جيدة أيضاً وهذا ما يرفع من كفاءة إنتاج سلالة الفطر الأسود المستعملة لإنتاج حمض الليمون في وسط مصل الجبن وهذا يتفق مع (Fooda، 1992؛Khorshid ،1992).ويبين الشكل (10) بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال درجات مختلفة من درجات الحموضة الـ (pH).



الشكل (10) بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال درجات مختلفة من درجات الحموضة الـ (pH)

4-1-12- تأثير كلور الصوديوم في إنتاج حمض الليمون بوساطة سلالة الفطر المنتخبة PLA30:

يبين الجدول (27) تأثير مستويات كلور الصوديوم المضافة المختلفة وفق المستويات التالية: (0 و 2 و6 و10 و12) % في كمية الحموضة الناتجة عن عملية التخمير، بعد إضافة المستوى الأفضل من اللاكتوز (150) غ/ل، ونترات الأمونيوم (1) غ/ل، وفوسفات أحادية البوتاسيوم (0.25) غ/ل، وحديدي سيانيد البوتاسيوم (0.3) غ/ل، وكبريتات التوتياء (0.1) غ/ل، و(3.5) pH .

الجدول (27) الحموضة الكلية الناتجة باستعمال مستويات مختلفة من كلور الصوديوم

مستويات كلور الصوديوم المدروسة %	تقدير الحموضة الكلية مقدرة بالمعايرة غ/ل							
	مدة التخمير (يوم)							القيمة العظمى للحموضة غ/ل
	7	9	11	13	14	15	16	
0	26.42	36.78	38.92	47.39	50.85	55.82	52.11	55.82^{e}
2	49.45	54	57.29	64.57	74.02	70.38	64.78	74.02^{c}
6	53.79	59.88	66.92	74.09	77.38	73.99	70.73	77.38^{b}
10	56	60.65	71.47	77.52	82.28	80.46	73.88	82.28^{a}
12	40.46	45.92	53.27	60.62	64.54	62.61	58.62	64.54^{b}

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى $p<0.05$

ويبين الجدول (27) أن تأثير كلور الصوديوم كان إيجابياً حتى مستوى إضافة (10)% من كلور الصوديوم بعدها بدأت كمية الحموضة المنتجة بالتناقص مع زيادة مستوى مصدر كلور

الصوديوم المضاف وبلغت كمية الحموضة المنتجة في اليوم السابع للتخمير 26.42غ/ل عند عدم إضافة لمصدر كلور الصوديوم في الوسط الزرعي واستمرت بالزيادة إلى الذروة في اليوم الخامس عشر للتخمير 55.82غ/ل ، وكان النمو المشيجي جيداً وعند إضافة المستوى الأول (2)% من مصدر كلور الصوديوم بلغت الحموضة الناتجة في اليوم السابع للتخمير 49.45غ/ل، ووصلت إلى الذروة في اليوم الرابع عشر 74.02غ/ل.

وبإضافة المستوى الثاني (6)% كانت الحموضة الناتجة في اليوم السابع 53.79 غ/ل وواصلت زيادتها حتى وصلت إلى الذروة في اليوم الرابع عشر 77.38غ/ل و بإضافة المستوى الثالث (10)%، كانت الحموضة الناتجة في اليوم السابع 56غ/ل، في حين وصلت الحموضة الناتجة في اليوم الرابع عشر إلى الذروة 82.28 غ/ل، وتناقصت الحموضة الناتجة بارتفاع مستوى كلور الصوديوم المضاف إلى (12)% ووصلت إلى الذروة في اليوم الرابع عشر 64.54غ/ل ونستنتج مما سبق أن الحموضة الناتجة وصلت إلى الذروة في اليوم الرابع عشر للتخمير عند مستوى إضافة (10)% كلور الصوديوم، ثم تناقصت بارتفاع مستوى مصدر كلور الصوديوم المضاف .

وتبين نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين مستويات كلور الصوديوم المختلفة في وسط مصل الجبن حيث تفوق المستوى (10) % على جميع المستويات وبفروق معنوية، يليه المستوى (6)% الذي تفوق على باقي المستويات(2 ،12)% بعدها المستوى (2)% ثم المستوى (12)% وأخيراً المستوى (0)% أي بلغت كمية الحموض الكلية المتشكلة مايلي على الترتيب:(74.02،55.82، 64.54،82.28،77.38)%.

ونستنتج أن السلالة (PLA30) أعطت أعلى إنتاج لها من الحموضة المنتجة والمقدرة بالمعايرة عند مستوى (10) % من كلور الصوديوم وفي اليوم الرابع عشر، وهذا يتوافق مع ماذكره (Fooda، 1992).

ويبين الجدول (28) ازدياد المردود الكلي بارتفاع مستوى مصدر كلور الصوديوم في وسط مصل الجبن حتى مستوى مضاف من كلور الصوديوم (10)% بعدها يبدأ المردود الكلي بالانخفاض وفقاً للقيم التالية :(37.21، 49.34، 51.58، 54.85، 43.02) %.

ويبين الجدول (28) ازدياد المردود الحقيقي لحمض الليمون بارتفاع مستوى مصدر كلور الصوديوم في الوسط الزرعي حتى مستوى (10)%، ثم يبدأ بعدها بالتناقص وكان على التوالي: (31.40، 44.65، 48.37، 52.66، 39.61) %، ولوحظ مما سبق وجود مردود كلي وحقيقي لحمض الليمون في وسط مصل الجبن عند عدم إضافة مصدر كلور الصوديوم إلى الوسط الزرعي وكان المردود منخفضاً إلا أن زيادة مستويات كلور الصوديوم المضافة أدت إلى

ارتفاع المردود الكلي والحقيقي حتى مستوى معين بعدها أخذ بالتناقص، ويفسر ذلك أن مصدر كلور الصوديوم ينشط العمليات الحيوية في إنتاج حمض الليمون بالنسبة لمصل الجبن ولكن إلى حد معين ثم يتناقص بالرغم من استمرار إضافة مصدر كلور الصوديوم. الجدول (28) بعض المؤشرات باستعمال مستويات مختلفة من كلور الصوديوم

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى p<0.0

ويبين التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية للمردود الكلي الناتج عن مستويات مختلفة من مصدر كلور الصوديوم، حيث تفوق مستوى كلور الصوديوم (10)% بشكل معنوي على جميع

مستويات كلور صوديوم المدروسة غ/ل	الحموض الكلية غ/ل	المردود الكلي %	المردود الحقيقي %	حموض مرافقة %	سكريات متبقية %	الكتلةالحيوية غ/ل
0	55.82^{e}	37.21^{e}	31.40^{e}	5.81^{a}	2.11^{a}	16.85^{e}
2	74.02^{c}	49.34^{c}	44.65^{c}	4.69^{b}	1.15^{c}	18.11^{d}
6	77.38^{b}	51.58^{b}	48.37^{b}	3.21^{d}	0.85^{d}	19.62^{c}
10	82.28^{a}	54.85^{a}	52.66^{a}	2.19^{e}	0.76^{e}	21.15^{b}
12	64.54^{d}	43.02^{d}	39.61^{d}	3.41^{c}	1.24^{b}	22.17^{a}

المستويات يليه المستوى (6)% الذي تفوق بشكل معنوي على باقي المستويات (12،2) % ثم المستوى (2)% يليه المستوى (12)% وأخيراً المستوى (0)%، ويبين التحليل الإحصائي للمردود الحقيقي لحمض الليمون نفسها التي حصلنا عليها في حال المردود الكلي وتفوق مستوى مصدر كلور الصوديوم المضاف (10)% بشكل معنوي على جميع المستويات المدروسة.

ولدى دراسة الحموض المرافقة لحمض الليمون والمذكورة على التسلسل :

(5.81، 4.69،3.21،2.19،3.41)%، حيث نجد أن الحموض المرافقة تتناقص بازدياد مستوى كلور الصوديوم في الوسط الزرعي وبلغت نسبة الحموض المرافقة عند مستوى (10)% من كلور الصوديوم 2.19% ولم يلاحظ وجود حمض الكبريت بينما وجد حمض الأوكزاليك.

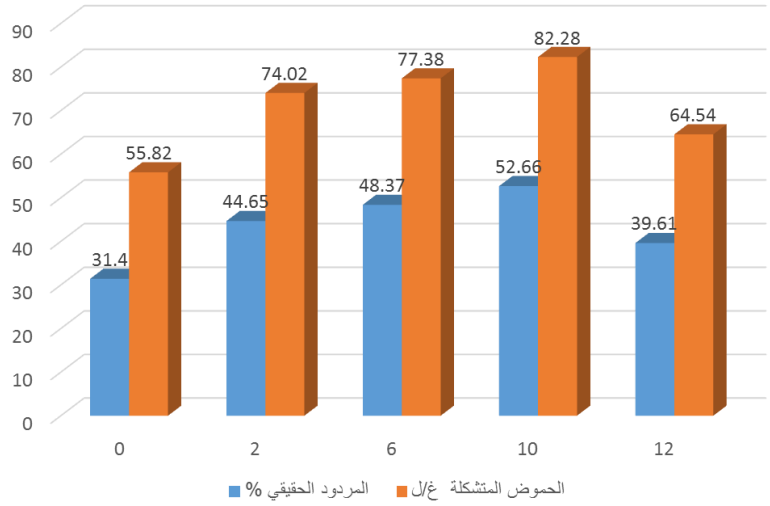
ويلاحظ من الجدول (28) أن ازدياداً واضحاً ومستمراً قد حصل في كمية كتلة المشيجة الجافة نتيجة ارتفاع مستوى مصدر كلور الصوديوم في وسط مصل الجبن وكانت على التسلسل :

(16.85،18.11، 19.62، 21.15، 22.17)غ/ل، ولوحظ إنتاش ونمو مشيجي واضح وجيد عند عدم إضافة مصدر كلور الصوديوم إلى الوسط الزرعي ضمن المستوى المسموح به وازدادت كمية الكتلة الجافة مع ارتفاع مستوى مصدر كلور الصوديوم المضاف حتى (6)% حيث بلغت عندها كمية الكتلة الجافة 19.62غ/ل أما الزيادة المستمرة من مصدر كلور الصوديوم فقد أدت

إلى نمو مضطرد في كتلة مشيجة الفطر، ويتضح مما سبق أن هناك تناسباً طردياً بين كمية كلور الصوديوم الموجود في الوسط الزرعي وكثافة النمو المشيجي.

ويبين الجدول (28) النسبة المئوية للسكريات المتبقية في وسط التخمير دون تخمير حيث أن ارتفاع مستوى كلور الصوديوم المضاف إلى الوسط الزرعي أثر عكسياً في نسبة السكريات المتبقية حتى مستوى (10)% بعدها أصبح التناسب طردياً والتي هي على التسلسل:

(2.11،1.15، 0.85، 0.76، 1.24) %، وكانت نسبة السكريات المتبقية من دون تخمير (0.76)% عند مستوى كلور الصوديوم المضاف (10)%، وهي ضمن المستويات المسموح بها، ونستنتج من الجدول (28) أن أفضل مستوى مقترح لكلور الصوديوم في وسط مصل الجبن (10)% نتيجة إعطائه أفضل حموضة منتجة 82.28غ/ل ومردوداً كليا"54.85%، ومردوداً حقيقياً 52.66% وكانت باقي المعطيات المتحصل عليها جيدة ، وهذا يتوافق مع(Khorshid،1992) ويبين الشكل (11) بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من كلور الصوديوم.



الشكل (11) بعض المؤشرات للسلالة الفطرية (PLA30) المنتخبة باستعمال مستويات مختلفة من كلور الصوديوم

4-1-13- دراسة إنتاج حمض الليمون باستعمال وسط مصل الجبن بقيمه المثلى بجهاز المخمر الرجاج بوساطة سلالة الفطر الأسود المنتخبة (PLA30) (الطريقة العميقة):

يبين الجدول (29) تطور إنتاج الحموضة الكلية مع تقدم مدة التخمير بعد استعمال مصل الجبن بقيمه المثلى لاكتوز (150) غ/ل،ونترات الأمونيوم (1) غ/ل ،وفوسفات أحادية البوتاسيوم (0.25)غ/ل وحديدي سيانيد البوتاسيوم (0.3)غ/ل، وكبريتات التوتياء (0.1)غ/ل،وpH(3.5).

الجدول (29) دراسة خصائص إنتاج حمض الليمون باستعمال وسط مصل الجبن بقيمه المثلى بجهاز المخمر الرجاج (الطريقة العميقة) بوساطة سلالة الفطر المنتخبة (PLA30)

فترة التخمير (اليوم)	الحموض الكلية غ/ل	المردود الكلي %	المردود الحقيقي %	الحموض المرافقة%	السكريات المتبقية %	الكتلة الحيوية غ/ل
1	2.87 h	1.91 h	1.09 h	0.82 h	13.89 a	0.00 h
2	9.48 g	6.32 g	6 g	0.32 f	10.41 b	1.59 g
3	34.47 f	22.98 f	21.54 f	1.44 g	7.11 c	9.14 f
4	61.28 e	40.85 e	38.87 e	1.98 e	6.18 d	13.15 e
5	87.88 d	58.58 d	50.29 d	8.29 d	3.25 e	17.11 a
6	94.50 b	63 b	59.82 b	3.18 b	1.62 f	16.99 c
7	98.66 a	65.77 a	62.16 a	3.61 a	0.87 g	15.45 d
8	92.31 c	61.54 c	57.32 c	4.22 c	1.61 h	17 b

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى $p<0.05$

يبين الجدول (29) أن معدل إنتاج الحموضة كان منخفضا" في الأيام الأولى للتخمير بسبب اتجاه الفطر نحو تكوين المشيجة الفطرية (Rohr،1988).

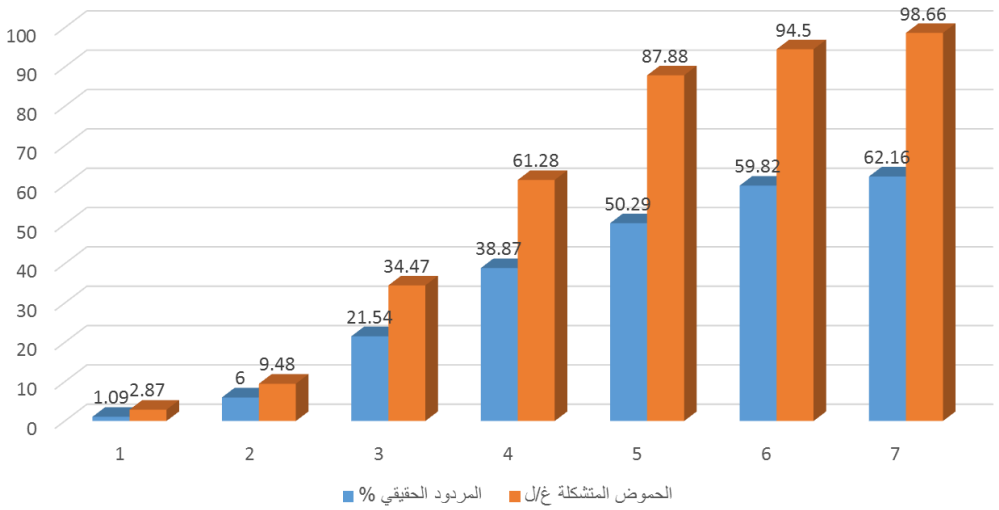
ولكن سرعان ما يبدأ بإنتاج الحمض في الأيام التالية من التخمير حتى يصل للمستوى الأعلى من الحموضة الكلية 98.66غ/ل في اليوم السابع للتخمير، عندها كانت نسبة السكريات المتبقية في الوسط الزرعي منخفضة 0.87%، وهذا مقارباً لنتائج أبحاث (Pietkiewicz ، 1988).

وهذه النسبة المتبقية من السكريات تؤدي إلى توقف إنتاج الحموضة في هذه الفترة نتيجة فقر الوسط الزرعي بالمصدر الكربوهيدراتي ويبين الجدول نفسه تطور نسبة المردود الكلي والحقيقي لحمض الليمون مع تقدم عملية التخمير حيث أنه ازداد ازدياداً متسارعاً مع تقدم مدة التخمير حتى وصل المردود الكلي إلى المستوى الأعلى65.77% والحقيقي 62.16% ، وبلغت كمية الحموض الكلية المتشكلة 98.66غ/ل في اليوم السابع للتخمير وهذا مقارباً لنتائج البحاثة (Cupta وزملاؤه ، 1976؛Podgorslki وزملاؤه ، 1987).

وعند دراسة تطور ونمو مشيجة الفطر مع تقدم مدة التخمير، نجد غياب النمو خلال اليوم (1) من مدة التخمير وهي فترة الطور التمهيدي للنمو، ثم يبدأ النمو بالازدياد حتى يصل إلى طور ثابت للنمو بعد مضي ثلاثة أيام من التخمير، وهكذا استمر طور الثبات حتى اليوم الخامس عندها بدأت كتلة الفطر بالتناقص (حيث بدأ طور الانحدار) في حين كان إنتاج الحموضة الكلية في مستواها الأعلى، وكذلك المردود الكلي والحقيقي في هذا الطور، وبعد ذلك يبدأ إنتاج الحمض بالانخفاض في اليوم الثامن من التخمر، وهذا يتوافق (Kim وزملاؤه ،1995).

ويبين الشكل (12) دراسة خصائص النمو وإنتاج حمض الليمون باستعمال وسط مصل الجبن

بقيمه المثلى بجهاز المخمر الرجاج (الطريقة العميقة) بوساطة سلالة الفطر المنتخبة(PLA30)



الشكل (12) دراسة خصائص النمو وإنتاج حمض الليمون باستعمال وسط مصل الجبن بقيمه المثلى بجهاز المخمر الرجاج (الطريقة العميقة) بوساطة سلالة الفطر المنتخبة(PLA30)

ثانيا"-إنتاج الغاز الحيوي:

4-2-1- نتائج التركيب الكيميائي للعينات:

أن المصل الناتج عن صناعة الأجبان يحتوي (48)% من محتوى الحليب الخام من المادة الصلبة الكلية ولذلك يعتبر مادة تحتوي جميع المواد الداخلة في تركيب الحليب الخام فمحتواه من البروتين يمثل (28)% من بروتين الحليب الخام, واللاكتوز (83)% من لاكتوز الحليب الخام والدسم (11)% من دسم الحليب الخام، والقيمة البيولوجية العالية للمصل تنبع من احتوائه على المواد البروتينية واللاكتوز (ميدع،1990).

ولوحظ من الجدول (30) تقارب في نسبة الدسم حيث بلغت لمصل الجبن(0.40) % ولمصل الجبن المنزوع البروتين(0.39)% ،أما بالنسبة للبروتين فقد وجد نسبة قليلة جدا" منه حيث بلغت لمصل الجبن المنزوع البروتين(0.05)% ، وأن إزالة البروتين من المصل تخفض قيمة COD

(المتطلب الكيميائي للأوكسجين) حيث بلغت لمصل الجبن المنزوع البروتين (60000) مغ/ل وهذا يتوافق مع البحاثة (Torang وزملاؤه، 1999).

جدول (30) التركيب الكيميائي لمصل الجبن ومصل الجبن المنزوع البروتين والحليب الخام

المادة	دسم%	بروتين%	لاكتوز%	الحموضة%*	pH	المادة الصلبة الكلية %	CODمغ/ل
مصل الجبن	0.40	0.9	4	0.15	6.5	5.95	65000
مصل الجبن المنزوع البروتين	0.39	0.05	3.9	0.18	5.9	4.74	60000
الحليب الخام	3.6	3.2	4.8	0.12	6.8	12.3	90000

*** مقدرة كحمض لبن**

لوحظ من الجدول (30) ارتفاع قيمة (COD) لمياه الصرف لمعمل الألبان (80000) مغ/ل بالمقارنة مع (COD) لمصل الجبن (65000) مغ/ل، ومصل الجبن المنزوع البروتين(60000) مغ/ل.

4-2-2-الهضم اللاهوائي لمصل الجبن قبل وبعد فصل البروتين في مجال الحرارة37°م :

1"- إنتاج الغاز الحيوي في مجال الـpH (6-7):

قيس الإنتاج الأعظمي من الغاز الحيوي لمصل الجبن قبل وبعد فصل البروتين ويبين الجدول (31) ناتج الغاز الحيوي، حيث بلغت كمية الغاز الحيوي الناتجة عن الهضم اللاهوائي (47)IN Kg^{-1}vs لمصل الجبن و(37)IN Kg^{-1}vs لمصل الجبن المنزوع البروتين،خلال فترة الحضانة (30) يوم وبدرجة حرارة 37°م في مجال الـ pH (7).

الجدول (31) تأثير درجة الـpH على إنتاج الغاز الحيوي

نوع العينة	pH	حجم الغاز الناتج (IN Kg^{-1}vs)
مصل الجبن	6	30^{a}

	7	47b
مصل الجبن المنزوع البروتين	6	c28
	7	d37

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى p<0.05

من الجدول (31) نلاحظ أن عند الشروط pH=7 وT=37°م كانت القيمة العظمى للغاز الحيوي الناتج (47)vs⁻¹gKlN لمصل الجبن و(37)vs⁻¹gKlN لمصل الجبن المنزوع البروتين ودلت الدراسة الإحصائية على وجود فرق معنوي في حجم الغاز الحيوي الناتج عن التخمر اللاهوائي لمصل الجبن بالمقارنة مع حجم الغاز الحيوي الناتج عن مصل الجبن المنزوع البروتين على مستوى ثقة 5%، وهذا الاختلاف في كمية الغاز الحيوي الناتجة عن التخمر اللاهوائي للعينات يعود إلى الاختلاف في التركيب الكيميائي، ولوحظ أن قيمة المتطلب الكيميائي للأوكسجين(COD) للسائل المفصول عن راسب المادة الصلبة للعينات بعد عملية التخمر انخفضت بعد عملية التخمر من (65000) مغ/ل إلى (4600) مغ/ل لمصل الجبن أي انخفضت المواد العضوية في المصل بنسبة 94.15% ولمصل الجبن بعد فصل البروتين انخفضت قيمة الـ (COD) من (60000) مغ/ل إلى (3800) مغ/ل أي انخفضت المواد العضوية بنسبة (93.83)% عند الشروط pH(7) ، كما هو واضح في الجدول(32).

الجدول(32) قيم الـ COD للسائل المفصول عن راسب المادة الصلبة للعينات بعد عملية التخمر

نوع العينة	pH	قيم الـCODمغ/ل	
		بعدالتخميرمغ/ل	نسبة التخفيض% بعد التخمير
مصل الجبن	6	5400b	92.77
	7	4600d	94.15
مصل الجبن المنزوع البروتين	6	4700 c	92.67
	7	3800f	93.83

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى p<0.05

ويوضح الجدول (33) أن نسبة الآزوت الكلي في السائل الراشح لمصل الجبن بعد التخمر كانت 0.1308% ونسبة تخفيض(8.53)% ، ولمصل الجبن بعد فصل البروتين كانت نسبة الآزوت الكلي بعد التخمر 0.019% ونسبة تخفيض (8.12)%عند الشروط pH(7) ، علماً أن قيمة الآزوت الكلي (القيمة المتوسطة) قبل التخمر كانت لمصل الجبن(0.143) %، ولمصل الجبن بعد فصل البروتين (0.02)% ، ومن قراءة النسب السابقة بالنسبة للآزوت الكلي، يتبين أن هذه النسب قليلة جداً مما يدل على أن البكتريا المشاركة في المعالجة البيولوجية اللاهوائية لم تستطع أن تفكك المركبات الآزوتية بشكل كامل، لأن إتمام عملية النترجة يحتاج إلى الأوكسجين

الجدول (33) قيم الآزوت الكلي للسائل المفصول عن راسب المادة الصلبة للعينات بعد عملية التخمر

نوع العينة	pH	قيم الآزوت الكلي%	
		بعد التخمير	نسبة التخفيض% بعد التخمير
مصل الجبن	6	0.1313b	8.18
	7	0.1308d	8.53
مصل الجبن المنزوع البروتين	6	0.0180g	7.93
	7	0.0190e	8.12

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى p<0.05

كما انخفضت المادة الصلبة الكلية بنسبة (91.80) % لمصل الجبن وبنسبة(90.49) % لمصل الجبن بعد فصل البروتين عند الشروط pH(7) ، والجدول (34) يبين ما سبق، علماً أن المادة الصلبة الكلية (القيمة المتوسطة) قبل التخمر كانت لمصل الجبن(5.95) %، ولمصل الجبن بعد فصل البروتين(4.74) %.

الجدول(34) قيم المادة الصلبة الكلية للسائل المفصول عن راسب المادة الصلبة للعينات بعد عملية التخمر

نوع العينة	pH	قيم المادة الصلبة الكلية%	
		بعدالتخمير	نسبة التخفيض% بعد التخمير
مصل الجبن	6	0.5117b	91.40
	7	0.4879d	91.80
مصل الجبن المنزوع البروتين	6	0.4687f	90.11
	7	0.4507g	90.49

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى p<0.05

ووجد أن نسبة اللاكتوز انخفضت حتى (95.65) % لمصل الجبن، وبنسبة (93) % لمصل الجبن بعد فصل البروتين ، كما في الجدول (35) ، علماً أن قيمة اللاكتوز الكلي قبل التخمر كانت لمصل الجبن(4) % ، ولمصل الجبن بعد فصل البروتين (3.9)%.

الجدول (35) قيم اللاكتوز الكلي للسائل المفصول عن راسب المادة الصلبة للعينات بعد عملية التخمر

نوع العينة	pH	قيم اللاكتوز%	
		بعدالتخمير	نسبةالتخفيض% بعد التخمير
مصل الجبن	6	f0.217	94.57
	7	0.174h	95.65
مصل الجبن المنزوع البروتين	6	0.312b	92
	7	0.273d	93

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى p<0.05

2"- نوعية الغاز الحيوي:

يبين الجدول (36) تركيز الميثان وثاني أوكسيد الكربون وكبريت الهيدروجين و الأمونيا في الغاز الحيوي عند الشروط: pH(7) ، و درجة الحرارة T(37°م) ، وتراوح تركيز الميثان في الغاز الحيوي الناتج عن مصل الجبن(59)% ولمصل الجبن بعد فصل البروتين (57) %، أما النسبة المتبقية فإن معظمهما غاز ثاني أوكسيد الكربون، وكانت نسبة كبريت الهيدروجين و الأمونيا في الغاز الحيوي ضئيلة.

الجدول (36) تركيب الغاز الحيوي الناتج عن الهضم اللاهوائي لمصل الجبن

المادة	$\%CH_4$	$\%CO_2$	(PPM) NH3	(PPM) H2S
مصل الجبن	59	40	100	30
مصل الجبن المنزوع البروتين	57	42	130	35

4-2-3-تأثير التخمر المشترك على إنتاج الغاز الحيوي ونوعيته في مجال الحرارة 37°م:

1"-إنتاج الغاز الحيوي لكل من الخلائطMix1،Mix2 ومقارنتها مع الإنتاج الأعظمي من الغاز الحيوي لمياه الصرف لمعمل الألبان في مجال الـpH (6-7) ، وT(37) °م.

تم قياس الإنتاج الأعظمي من الغاز الحيوي لكل من مياه الصرف لمعمل الألبان والخلائط Mix1، Mix2 ويبين الجدول(37) ناتج الغاز الحيوي، حيث تراوحت كمية الغاز الحيوي للعينات خلال فترة الحضانة(30) يوم وبحرارة (37) °م، وفي مجال الـ pH(7)132vs^{-1}Kg IN لمياه الصرف لمعمل الألبان و(58)vs^{-1}Kg IN للخليطMix1 و(116) vs^{-1}Kg IN للMix2.

الجدول (37) تأثير درجة الـpH على إنتاج الغاز الحيوي للخلائط ومياه الصرف لمعمل الألبان

نوع العينة	pH	حجم الغاز الناتج (IN Kg^{-1}vs)
مياه الصرف لمعمل الألبان	6	117.

	7	132^{e}
Mix1 **20% مياه الصرف لمعمل الألبان** **+80%مصل الجبن المنزوع البروتين**	6	47^{k}
	7	58^{j}
Mix2 **80%مياه الصرف لمعمل الألبان** **+20%مصل الجبن المنزوع البروتين**	6	102^{g}
	7	116^{f}

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى $p<0.05$

و تفسر النتائج السابقة بارتفاع نسبة المواد الكربوهيداتية (سكر اللاكتوز) ونسبة الدسم في كل من مياه الصرف لمعمل الألبان بالمقارنة مع الخليطMix2 والخليطMix1، وهذا يتوافق مع دراسة أجريت بأن غنى المادة بالمواد الكربوهيدراتية ذات قابلية التحلل العالية يؤدي إلى زيادة في إنتاج الغاز الحيوي بنسبة 40% حسب (Angelidaki وزملاؤه،2003).

والتخمر المشترك يعطي نتائج أفضل، وهذا يتوافق مع (Goksel وزملاؤه، 2000) بحيث أعطى التخمر المشترك لمخلفات المداجن (مادة غنية بالدسم والبروتين) مع مخلفات معامل الجبن (مادة غنية بالمواد الكربوهيدراتية) ومع ماء الجفت (مادة غنية بالدسم) إلى زيادة كمية الغاز الحيوي بشكل ملحوظ بالإضافة إلى كفاءة أعلى في إنتاج الميثان مقارنة مع التخمر اللاهوائي لكل مادة على حده، وهذا يتوافق مع ما ذكره (Golegenis وزملاؤه،2007).

وتحتوي مياه الصرف لمعمل الألبان على تركيز عالي من النتروجين الذي يتحول إلى آمونيا والتي لها تأثير سمي على بكتريا التخمر اللاهوائي، لذلك فإن إضافة مصل الجين (التخمر المشترك) يمكن أن يؤدي إلى خفض هذه النسبة، وبالتالي الحد من التأثير المثبط ولذا يصبح تركيز هذه المادة أكثر ملائمة للنمو البكتيري.

وهذا يتطابق مع (Braun وWellinger، 2003) بأن التخمر المشترك يؤدي للحصول على نسبة مثالية من C\N، حيث تتم عملية التخمر المشترك لمواد ذات نسبة C\N مرتفعة ومواد ذات نسبة C\N منخفضة.

ولوحظ أن درجة الحموضة pH لها تأثير على حجم الغاز المنطلق.

وهذا يتطابق مع ما ذكره(Comino وزملاؤه، 2009) بأن المستوى المثالي لنشاط بكتريا الميثان هوpH(7) واقترح إضافة مخلفات صناعة الخميرة للحفاظ على مستوى مثالي من الpH.

كما بين (Borja وزملاؤه، 2002) أن درجة الpH المثالية بين 7–7.2، ويتوقف إنتاج الغاز الحيوي تماماً عند pH أقل من 4.5 (البلخي ، 2001) .

وأن قيمة المتطلب الكيميائي للأوكسجين (COD) للسائل المفصول عن راسب المادة الصلبة لمياه الصرف لمعمل الألبان بعد عملية التخمر انخفضت بعد التخمر من(80000) مغ/ل إلى(3700) مغ/ل لمياه الصرف لمعمل الألبان أي انخفضت المواد العضوية في مياه الصرف بنسبة 94.25%عند الشروط pH(7) كما في الجدول (38).

الجدول(38) قيم الـ COD للسائل المفصول عن راسب المادة الصلبة لمياه الصرف لمعمل الألبان بعد عملية التخمر

نوع العينة	pH	قيم الـCODمغ/ل	
		بعدالتخميرمغ/ل	نسبة التخفيض% بعد التخمير
مياه الصرف لمعمل الألبان	6	4400a	93.25
	7	3700d	94.25

الأحرف المختلفة ضمن العمود تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى p<0.05

2"- نوعية الغاز الحيوي:

ويبين الجدول (39) تركيز الميثان وثاني أوكسيد الكربون وكبريت الهيدروجين و الأمونيا في الغاز الحيوي، عند الشروط: درجة الحموضة pH(7) ، و درجة الحرارة T(37°م) ، وتراوح تركيز الميثان في الغاز الحيوي الناتج من الخليط Mix1(61)% و Mix2(63)% ولمياه الصرف لمعمل الألبان(62) % والنسبة المتبقية فإن بمعظمها غاز CO2، و نسبة كبريت الهيدروجين و الأمونيا في الغاز الحيوي كانت ضئيلة.

الجدول (39) تركيب الغاز الحيوي الناتج من الهضم اللاهوائي لمياه الصرف لمعمل الألبان والخلائط Mix1 و Mix2 عند الشروط pH=7، T=37°م

الخليط	%CH4	%CO2	(PPM) NH3	(PPM) H2S
Mix1	61	37	60	45
Mix2	63	36	80	25
مياه الصرف لمعمل الألبان	62	37	40	57

تم تحليل المتبقي الصلب الناتج عن تخمير مياه الصرف لمعمل الألبان والخلائط والمفصول عن الراشح فوجد أنه يحتوي على أزوت كلي بنسبة تتراوح مابين(3.5-4)% وللفوسفور (2.5-3)% وهذه النتيجة تمكن من استخدام المتبقي الصلب كسماد ثانوي للتربة الزراعية لأنها قريبة من نسبة الآزوت والفوسفور في الأسمدة الزراعية والبالغة 5% للآزوت و8% للفوسفور.

الاستنتاجات (Conclusions)

1- أنتجت سلالة الفطر الأسود (PLA30) عند انتخاب السلالة والعزلة الأفضل باستعمال وسطي النمو(السكروز ومصل الجبن) أكبر كمية من الحموضة الكلية، وهذه يقابلها أعلى مردود كلي لحمض الليمون وكذلك أعطت أعلى مردود حقيقي لحمض الليمون في حين كانت نسبة الحموض المنتجة والمرافقة لحمض الليمون منخفضة محسوبا"على أساس المردود الكلي وكتلة المشيجة الفطرية المتكونة في الحدود المسموح به، وتعد هذه المعطيات المذكورة أنفا"جيدة.

2- يعتبر أفضل مستوى لسكر اللاكتوز في الوسط الزرعي المكون من مصل الجبن(150)غ/ل ولنترات الأمونيوم (1)غ/ل ولفوسفات أحادية البوتاسيوم (0.25)غ/ل و لحديدي سيانيدالبوتاسيوم (0.3)غ/ل ولكبريتات التوتياء (0.1) غ/ل و درجة الحموضة الpH (3.5) و لكلور الصوديوم (10) %.

3-حصلت زيادة في الحموضة الكلية المنتجة، وكذلك في المردود الكلي والحقيقي لحمض الليمون باستعمال وسط مصل الجبن بقيمه المثلى بجهاز المخمر الرجاج (الطريقة العميقة) حيث بلغت الحموضة الكلية في اليوم السابع للتخمير (98.66) غ/ل و(65.77)% مردودا" كليا" و(62.16)% مردودا"حقيقيا".

4- تناقص كمية إنتاج الغاز الحيوي الناتج عن التخمر المفرد لكل من(مياه الصرف لمعمل الألبان ومصل الجبن، ومصل الجبن المنزوع البروتين، والخلائط) في درجة الحموضة الـpH (6) بالمقارنة مع درجة الحموضة الـpH (7) حيث ترتفع كمية إنتاج الغاز الحيوي بارتفاع قيمة الpH من درجة الحموضة الـpH (6) إلى درجة الحموضة الـpH (7).

5-كان للتخمر المشترك تأثير ايجابي على تركيز غاز الميثان الحامل للطاقة عند الشروط pH(7) ودرجة الحرارة T=(37°م) حيث كان الخليط MIX2 الأفضل من ناحية تركيز غاز الميثان بالمقارنة مع الخليط MIX1، ومياه الصرف للمعمل الألبان.

التوصيات و المقترحات (Recommendations)

1-تطوير السلالات الفطرية المحلية وتحسينها بالتطفير والمحافظة عليها بشكل نشيط في ظروف حفظ محددة

2-متابعة الدراسات باستخدام أسلوب التخمر العميق لإنتاج حمض الليمون على جهاز المخمر الحيوي.

3-متابعة الدراسة فيما يخص الاحتياجات الهوائية لعمليات التخمير لإنتاج حمض الليمون بشكل دقيق.

4-استكمال الدراسة على مخلفات مياه الصرف لمعمل الألبان و مادة مصل الجبن ومادة مصل الجبن المنزوع البروتين كمواد لإنتاج الغاز الحيوي و تحسين مقدار الاستفادة من الطاقة الكامنة وذلك من خلال :

1"-إضافة الإنزيمات المساعدة في عملية التحلل مما ينعكس إيجابا" على إنتاج الغاز الحيوي.

2"-دراسة السلالات البكتيرية اللاهوائية ذات الكفاءة العالية في إنتاج غاز الميثان.

3"-أمثلة العوامل المؤثرة على عملية التخمر اللاهوائي (كإضافة بعض العناصر المغذية) وإجراء تخمير مشترك مع مخلفات حيوانية أو نباتية.

المراجع(References)

1-المراجع العربية:

البلخي، أكرم.2001.توصيف المادة العضوية المتخلفة عن إنتاج الغاز الحيوي ودراسة حركيتها في نوعين من الترب السورية، رسالة ماجستير، قسم الأراضي جامعة دمشق.

الخطيب،هشام.2006. مصادر الطاقة المتجددة ، مؤتمر الطاقة العربي الثامن.

الخفاجي، زهرة محمود. 1990. التقنية الحيوية, منشورات جامعة بغداد, صفحة 886.

اسكوا. 1989. دليل تصميم وإنشاء وتشغيل وحدات إنتاج الغاز الحيوي العائلية، الأمم المتحدة.

الشكري، مهدي مجيد. 1991. أساسيات الفطريات وأمراضها النباتية, جامعة بغداد, مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر الموصل, صفحة 431.

العودة، كرم. 1990. مبادئ تقنيات أجهزة التحاليل الكيميائي, منشورات جامعة دمشق, صفحة 416.

العفيف، رأفت، وتوماس أمون.2008.إنتاج الغاز الحيوي من تفل الزيتون وروث الأبقار- تأثير التخمر المشترك والأنزيمات على إنتاجية الميثان. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية.24(2)،103-121.

العفيف،رأفت، وفيتالي كرفورشك.2009.الهضم اللاهوائي لمخلفات معمل السكر – تأثير التخمر المشترك مع المخلفات الحيوانية ومحاصيل الطاقة على إنتاجية الميثان، مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية.25(1):191-205

العقلة،حسن.1990.دراسة نظرية وعملية لاستثمار طاقة الغاز العضوي منشورات جامعة دمشق، سورية.

الميدع, إلياس .1990.الألبان،القسم العملي، مقرر السنة الرابعة،الشعبة العامة، كلية الزراعة جامعة حلب.

باشا، سهيل إبراهيم، وأحمد رمزي دباغ، وأديب فالح. 1999. الصناعات الميكروبيولوجية (الجزء العملي) ،منشورات جامعة حلب، صفحة 193.

بودوين-أ-ب .1991.تشخيص الأمراض النباتية (مبادىء نظرية-تطبيقات عملية). ترجمة زيدان أبو الهيجاء وصلاح الدين الحسيني محمد.الهيئة العربية للكتاب، الرياض، صفحة 375.

بيطار، منير .1998. مقالة بعنوان(تخمر النفايات) ،ندوة إدارة النفايات، جامعة البعث:155-160.

حمضمض، نزار. 1977. مبادئ الكيمياء الحيوية، منشورات جامعة حلب، صفحة 428.

درمش، محمد خلدون، ومحمد وليد كامل، و هناء قصاص. 1991. الكيمياء العضوية (القسم العملي) ، منشورات جامعة حلب، صفحة 131.

مالاشينكا يوروآخرون .1993. بيولوجيا الأحياء الدقيقة المشكلة والمؤكسدة للميثان،كييف ناؤكوفادومكا صفحة255.

نشواتي، هيثم.2007. إمكانية الاستفادة من تقانات الغاز الحيوي في الجمهورية العربية السورية ندوة في مؤتمر الأسبوع الثاني الألماني السوري للبيئة حول أنظمة الطاقة والبيئة المستدامة جامعة دمشق.

2-المراجع االأجنبية:

Abdulrahman, MandS.S. al Yasser. 2006**.**Citric acid productionfrom date syrup using immobilized cells of *Aspergillus niger*. Biotechnology, 5(4)p: 461- 465.

Abou Nahra, J ., S.Barrington, J . C. Frigon andS .R . Guiod. 2003.In storage Psychorophilic Anaerobic Digestion of swin slurry . *Resurces Conservations and Recycling* , 38: 23-37.

Ahring, B.K.,M . Sandberg and I. Anglidaki .1995.Volatile fatty acid as Indicators of Process Imbalance in Anaerobic Digesters,Appl. Microbiol. Biotechnol, 43:559-565.

Ali, R, A. C. Tekin and K, Daly.2000.Biogas Production From olives Pomace-Gaziantep,Turkey.

AL obaidi, Z and D.R. Berry**.**1979**.**Theuse of deionised date syrup as substrate for citric acid fermentation. *Biotechnol*. *Lett*. **(1):** 153- 158 p.

Ambati,p and Ayyanna, C.2001. Optimiizing medium constituent and fermentation condition for citric acid production from palmyra jiggery using response surface method. World journal of Microbiology .(17):331-335.

Amon, T.,D. Jeremic and J. Boxberger . 2001 . Neue Entwicklungen der L and wirtschaftlichen Biogaserzeugung in Osterreich, 465.

AL Afif, R and **Amon**, T.2006. (Biogas production from olive pulp and cattle manure - Effect of CO- fermentation and enzymes on methane productivity) Damascus University Journal for the Agricultural sciences 24 (2) : 103 - 121 .

Angelidaki,I.,L.Ellegard and k. Ahring.2003.Application of the Anaerobic digestion process.p1-33,In:Ahring, B.K.(ed).Biomethanation, Springer,Berlin,p:60-69.

Angelidaki, I.and W . Sanders. 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macro pollutants . *Ren Environ Sci Bio-Technol* 3:117-129.
Ano. 1997. Citric acid. a versatile food additive and Analysis Biochemistry and Biotechnology 47: (7/8): 22- 25.
Arbakariy,A., Mohamed , I and M. Madihah**.**1995**.**The influence of fermentor operation on citric acid production by *Aspergillus niger* under nitrogen limitation. Asian Food Journal, Malaysia, 10(2): 66-69p.
Association of official Analytical chemistry. AOAC. 1995**.** official of methods analysis., 12 th Ed. Washingtion D.C.USA. Vol: II.
Batastone, D.J.,J. Keller ,R.B. Newell and M . Newland . 2000. Modeling anaerobic degradation of complex waste water. I: Model development . *Bioresource technology* 75:67-74.
Bejarano, M.and L. Madrid .1994 . Complextation of pb (II) and Cu (II) with a residue from the olive - oil industry and asynthetic polymer by DPASV . *S*cience of the total Environment . 138:9-19.
Beltran-Heredia , J., J.Torregrosa and J. R. Dominquez . 2000. Treatment of black - olive Wastewaters bo Ozonation and aerobic biological degradation Water Research 34 (14) : 3515-3522.
Benuzzi, D. A., R. F. Segovia. 1997**.** Effect of the copper oncentration on citric acid productivity by an *Aspergillus niger* strain, Biochemistry and Biotechnology. 61(3): 393 - 397.
Berovic, M. 2007. Sumerged citric acid Fermentation: rheological properties of *Aspergillus niger* brothin a stirred tank reactor. Yugoslavia Microbial biotechnology. 34: 579 - 581.
Bjornsson, J.,M. Murto and B . Mattiasson . 2000. Evaluation of parameters for monitoring an anaerobic co-digestion process, *Appl . Microbiol. Biotechnol* , 54:844-849.
Bodie, E. A., B. Ben, M. B. Randy and N. Dunn – coleman. 1994**.** *Aspergillus*: 50 years on. W: Economically important organic acid and enzyme products. Elsevier., 29(22:561 - 568.
Bohdan, D. 1980. Analiza techniczna wprzeemysle spozywczm wydawniectwa szkoioei pedagogiczne.warszawa.,P: 417.
Borja, a .,B.F. Rincon,J. Raposo and A. Martin. 2002 .A study of anaerobic digestibility of two-phases olive mill solid waste (OMSW) at mesophilic temperature *Process Biochemistry* , 38(5) : 733,742 .
Borken , Y.J. and R. Brumme .2002 . Long-term reduction in nitrogen and proton inputs did not affect atmospheric methane uptake and nitrous oxide emission from a German spruce forest soil . *Soil Biology and Biotechnology* , 34(11) : 1815-1819.
Braun, R and A. Wellinger . 2003. Potential of co-digestion. IEA Bioenergy Report under Task 37 , Energy from Biogas and Landfill Gas California, USA.,p: (15)

Buswell,A.M.and H. F. Mueller .2010.Mechanism of methane fermentation,Ind Eng.Chem.,44:550-552.
Byund,G.1995. Dairy processing Hand Book ,Tetra Pak processing systems ABS-22186 lun, Sweden.
Carlos, R.S, P.S Luciana , C. R Vandenberghe and p Ashok.2006. New perspectives for citric acid production and Application, Food Technol. Biotechnol., 44(2): 141-149.
Chmiel, A. 1998. Biotechnologia. Podstawy mikrobilogiczne I, Bilogiczne. Warszawa: P.W.N,P:545.
Choe, j. H. and y. j. yoo. 1991.Effect of ammonium ion concentration and application to Fed-batch culture for over production of citric acid Journal of Fermentation and Bioengineering., 72(2): 106-109.
Chynoweth, D.P.,J . Owenes and R. Legrand. 2002 . Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Ren . Energy* 22:1-8.
Classen, P.A.M.,J. B. Lier ,A.M. van Lopez-contreras ,E.W.J. Niel L.Sijtsma A.J.M. Stams ,S.S. Vries andR .A. weusthusi. 1999.Utilisation of biomass for the supply of energy carriers , *Appl . Microbiol . Biotechnol* . 52:741-755 .
Comino, E., M. Rosso , V. Riggio.2009. Development of a pilot scale anaerobic digester for biogas production from cow manure and whey mix. Bioresource Technology, Latvia University of Agriculture, Institute of Biomechanics and Physical Research ,100 (21)p: 5072.
Cossu, R.,N . Blakey and P. Cannas. 1993. Influence of codisposal of municipal solid waste and olive vegetation water on the anaerobic digestion of a sanitary landfill . *Water sci technol* 27:261-271.
Crolla, A and K. J. Kennedy. 2001**.**Optimization of citric acid production from *candida lipolytica* y-l 095 using n- paraffin, Journal of Biotechnology., 89(1): 27-40
Cupta.j.k,i.g,hedingn, and o,b,jorecenjen .1976.: effect of sugars hydrogen ion concentration and ammonium nitrate on the formtation of citric acid by *Aspergillus Niger,acta microbiol* science.23:63-67p.
Czesc., I and P .Produkcyjne.1973.Biosynteza kwasu cytrynowego metoda wgtebna.Instyt tecnologii fermentacji. Microbiologii politechnika Idzka,(1):11-12p.
Debok, A. F. M.,C.M. Plugge and A. J. M. stams . 2004. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia , *Water research*, 38(6): 1368-1375.
Deshpande, p .,S.H. Godbole and P.M. Wagle . 1979. Electricity from biogas. *Curr . sci*, 48:490-492.
Dhananjay, B. P., C. Tuan and O. Timothy. 1993**.** Fractal model for the characterization of mycelia morphology, Biotechnology and Bioengineering., 42: 571-578.

DIN EN ISO 11734.1998. Water quality - Evaluation of the Ultimate anaerobic biodegrability of anaerobic compounds in digested sludge - Method by measurement of biogas production German Version.
Drysdale, C. R., A. M. Mckay. 1995.Citric acid production by *Aspergillus niger* in surface culture on inulin, Applied Microbiology, Belfast, UK., 20(4): 252-254.
Duval , B., andG. Steve . 2000 . Methane production and release from two new England peathlands . *International microbiology* , 20:89-95.
Elimer, E. and E. Gajos. 1994**.** Mikrobiologia Techniczna Wydawnictwo Akademii Ekonomicneim Poland., P: 335.
Ettler, p., L. Martinkova, E. Ujcova and L.Seichert. 1991**.** Application of scale-down experimentsin on the study of citric acid biosynthesis, Folia MicrobiaL vol., 36(5): 493-497.
Fang , H.H.P., and D. Wai-chungchung . 1999 . Anaerobic treatment of proteinaceous waste water under mesophilic and thermophilic conditions *water science and technology* , p : 77-84 .
Faiez.A,M.Urray .A ,William,B.Zakaria .2007. Optimization of citric acidproductionfrom a new strain and mutant *of Aspergillus niger* using solid state fermentation Food Biotechnology.21(2):169-180.
Fassatiova, O. 1986.Moulds and filamentous fungi in technical microbiology. Biblioteka glowna Akademii Ekonomicznej., vol: 22: 228.
Fiedurek, J. 1999. Influence of a pulsed electric field on the spores and oxygen consumption of ,*Aspergillus niger* and a citric acid production , Acta. Biotechnologica., 19(2):179 - 186.
Fooda. M.I. 1992. Citric acid production from salted whey.M.Sc.thesis,Fac.of Agric,Ain Shams University,Egypt.
Gadus, J andV. Krocko.2006. Evaluation of co-fermentation under agricultural biogas plant conditions. Faculty of agricultural engineering, Slovak university of agriculture in Nitra,Slvakia. *MOTROL*; 8A : 125-132.
Gallert, T,C.,S. Bauer and winter , J. 1998. Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophililc and thermophililc Biowaste population. Applied Microbiology and biotechnology , 50:495-501.
Gelegenis,J.,D.Georgakakis,I.Angelidaki and V.Mavaris .2007. optimization of biogas Production by co-digesting whey with diluted poultry manure, Renewable energy 32(13):2147-2160.
Georgieva, M., K. Aleksiva and I.Ganchev. 1989. Effect of various alcohols on the biosynthesis of citric acid from *Aspergillus niger* 119, Khranitelna – promishlenost., 38(2):27 - 28.
Ghaly, A.1996.Acomparative study of anaerobic digestion of acid cheese whey and dairy manure in two-stage reactor, Bioresource., 24:35-48.

Ghaly A.E. and D.R. Ramkumar.1999. "Controlling the pH of Acid Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Digester with Sodium Hydroxide." Energy Sources 21,. pp. 475-502.
Glouke, C.G.1985 . Temperature effects on anaerobic digestion of raw sewage sludge . *Sewege Ind. Wastes* .30:1225-1232.
Goksel,N.,D. Mentin,G. Engin,U.Örgen,T. Ulasand H.E. Tuba.2000. Anaerobic treatability and biogas production potential studies of different agro-industrial wastewaters in Turkey.,Renewable energy 11(6):401-405.
Gomez, G., I. Schnabal and J. Garrido. 1988. Pellet growth and citric acid yield of *Aspergillus niger* 110, Enzyme Microb., Acta. Biotechnologica.,10: 188 - 191.
Gonzalezsiso,M. I. 1996.The biotechnological utilization of cheese whey Areview Bioresour. Techol.,57:1-11.
Guliedge, J.M and J.P. Scnimel . 1998. Methane consumption : Links between biogeochemistry and microbial communities , Harvard University , 805:893-1688.
Gungor-Demiric, G., andG.N. Demirer. 2004. Effect of initial COD concentration, nutrient addition, temperature and microbial Acclimation on anaerobic treatability of broiler and cattle manure . Middle east *126*technical university . Turkey . *Bioresource*
Haq , I,S. Ali ,M.A,Qadeer and j. Iqbal.2002. citric acid fermentation by mutant strain of *Aspergillus niger* GCMC-7 using molasses based medium.Electronic journal of Biotechnology ISSN.5(2).
Hang,y.D,E.E.Woodams and G.grap .1985**.** Novel substarate for microbial Production of citric acid.lett.(7):235-254.
Hans, j. B. 2005. Biotechnika osiagniecia iperspektywy, Wiedza powszechna. Warszwa., P 270.
Harmsen, H.J.M.,B.L.M. Van kuijk, C.M.Plugge,A.D.L. Akkermans andA.J.M. Stams. 1998. A Syntrophic propionate-Degrading Sulfate-reducing Bacterium, *J . Syst. Bacteriol*, 48:1382-1387.
Hobson, P.N and B.G. Shaw.1973. The anaerobic digestion of waste from an intensive pig unit . *Water Research*, 7:437-449.
Honecker.B, S. Bisping, B. Zhu, Yang and H. J. Rehm . 1989. Influence of sucrose concentration and phosphate limitation on citric acid production by immobilized cells of *Aspergillus niger*, Microbiolgy and biotechnology Germany., 31(1): 24 - 30.
Horiuchi, J .,T . Shimizu ,K . Tada , T . Kanno and M . Kobayashi 2003 . Selective production of organic acid in anaerobic acid reactor by PH control. *Bioresouece technology* , 82 , (3) , 209-213.
Hu , Z .and C.Wetzel, Ekama. 2003. Modeling biological nutrient removal activated sludge system, *Wat.Res*, 37:3430-3444.

Hung - Chang, C.1996. Optimizing the concentration of carbon, Nitrogen and phosphorus in a citric acid fermentation with response surface method, Food - Biotechnology., 10(1): 13-27.
Hwang, M.H.,N.jang,S.H. HyumandI.S. Kim.2004. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation :The role of PH. *Journal of Biotechnology*, 111,(3),297-309.
Isabel,P.M.2000. Anaerobic digestion treatment of olive mill wastewater for effluent re-use in irrigation.Departamento de Energias Renovaveis, institutoNacional de Engenhariae Tecnologia industrial,East.paco,Lumiar, Portugal,p:45-55.
Jamal, R. F., E. L. Sawy, E.M. Ramadan and S. A. EL- sayed. 1988**.** Factors affecting production of citric acid by *sccharomycopsis Lipolytica* 7056 using fermentor as a batch, Egyptian journal of microbiology., 23(2): 315 - 328.
Janis,J., E.Skripsts ,V. Dubrovskis , E .Zabarovskis and V.Kotelenecs 2011.Biogas production from Cheese whey in Two phase Anaerobic digestion**.** Latvia University of Agriculture, Institute of Biomechanics and Physical ResearchLatvia,p373-376 .
Janczar, M. and J.Pietkiewicz. 1998. Characterization of wastes obtain in citric acid production and ways of their utilization. Bioengineering and Risk Assessment., P:251 - 257 .
Jernejc, K., A. Perdih and A. cimerman.1991. ATP: citrate lyase and carnitine acetyl - Tians ferase Activity in citric acid producing by *Aspergillus niger* strain. Microbiology and Biotechnology., 36(1): 92 - 95.
Jerzy, D. and k.Henryk. 1992. Biochemi zywnosci cwlczema I metody,wydawnictwo art olsztyn., p 328.
Jessee,J. A., A. C. Benott , G. C.HEndricks, J. L. Allen,G. S. Neal. 1983. Anaerobic Degradation of Cyanuric Acid Cystein and Atrazine by a facultative Anaerobic Bacterium. Applied and Environmental Microbiology United States Department of Energy, Washington D.C.,45(1)p:97-102.
Jha,D.K,A.K. Singh and M. Sapkot. 1996. Effects of biogas slurry and chemical fertilizer on fish production, *Institute of Agricultural and Animal Sciences* (NP9700079), P:9-14.
Kahlon, S., H. S. Grewal, M.Arora and J.Kaur. 1991. Citric acid production by immobilized spores or *Aspergillus niger*, Journal of search, India., 28(4):521-528.
Kamal, K. P., U. N. Verma, A. K Nag and S. P. Singh. 1999. Effect of antifoam and oxygen transfer rate on citric acid production by submerged fermentation, Asian Journal Chemistry., 11 (3): 1020-1022.
Kamzolova, S. V., N. V. Shishkanova, A. P. Il'chenko, E. G. Dedyukhina and T. **V. Finogenova**. 1996. Effects of iron ions on biosynthesis of citric

and isocitric acids by mutant *Yarrowia lipolytica* N 1 under conditions of continuous cultivation. Biochemistry and Microbiology., 32(1): 35-38.
Kapoor, K. K., K. Chaudhary and P. Tauro. 1984**.** Industrial Microbiology, in prescott & Dunn's Reed, Ed. (Mcgraw-HilLNew York) p: 70
Kato-Noguchi, H. and A. E. Watada. 1997**.** Citric acid reduces the respiration of fresh-cut carrot, Hort Science., 32(1): 136.
Kavacik B and B. Topaloglu.2010.Biogas production from co-digestion of a mixture of cheese whey and dairy manure. Biomass and Bioenergy, Latvia University of Agriculture, Institute of Biomechanics and Physical Research 34 (9)p: 1321-1329.
Khatib, H. 1996. Financial and economic evaluation of projects with special reference to the electrical power industry (Tutorial). *Fuel and energy abstracts,* 37(3):196.
Khorshid, A. 1992.Utilization of protein concentrates prepared by ultrafiltration in yoghurt.5th Egyptian conf ,dairy Sci Tech, Ain Shams University,Egypt.p:267.
Kim, K. S., Y. J. Yoo and M. H. Kim. 1995. Control of intracellular ammonium level using specific oxygen uptak rate for over production of citric acid by *Aspergillus niger*, Journal ferment, Bioeng., (79): 555-559.
kristiansen, R., M.Mattey and J. Linden. 1998. Citric acid Biotechnology Taylor and Francis,London, UK., p 250.
Kristiansen, B., M.Mattey and J. Linden. 1999**.** Citric Acid biotechnology,Taylor and Francis., vol. 22: 187.
Krzysztof, W. S. 1985**.** Techologia biochemiczna, Wydawnicza politechiniki warsz Awskiey. P: 274.
Kubicek, C. P. and M. Rohr. 1986. Citric Acid fermentation, Biotechnology., 3(4): 331 - 373.
Kubicek, C. P. 1998. the Role of Sugar Uptake and Channeling for Citric Acid Accumulation by *Aspergillus niger*, Food Technol, Biotechnol 36(3): 173 - 175.
Kutermaankiewicz, M. 1980. Badania Nad Wplywem Niektor Sklanikow brzeczki otrzymanej z potproduktow w produkcji cukru nacytrynowa fermentacje wgtebna. Praca doktorska, Wroclaw: inst Technol, Przem., Chem. I spoz. AE.
Kwapisz, E. 1978.zagadnienia aeracji we wglbne fermentacja cytrynowego praca doktorska., Lodz: politechnika lodszka.
Legisa, M. and M. Gradisnik – grapulin. 1995. sudden substrate dilution induces a higher rate of citric acid production By *Aspergillus Niger*, Enveroment, Microbiol. 61: 2732 - 2737.
Lesniak, W. 1972. badania nad fermentacja kwasu cytrynowego metoda wglebna. Praca doctorsaca , W: Wroclaw - Poznan: wse - wsr.

Lesniak, W. and S. stawicki. 1979. semi-continuous fermentation of citric acid bysubmerged fermentation, Acta alimentaria polonica. 4(5/29) 365-377.
Lesniak, W. S. and M.Kutermankiewicz. 1990. Podstawy produkcji Kwasu cyrynowego, Stowarzyszenie Technikow cukrowniko., p :224.
Lesniak, W., j. pietkiewicz and w.Podgorski. 1993**.** characterstyka porownawczabioreaktorow stosowanych do biosyntezy kwasu cytrynowegow skalitechnicznej,Biotechnologia., 3(22): 48-55.
Lesniak, W. S. 2002**.** Biotechnologia Zywwnosci, Wydawnictwo AkademiiEkonomicznejim., p :334.
Lund, M.S.,S.S. Andersen andM. Torry-Smith. 1996. Building of aflexibility bag biogas digester in Tanzania. In : Demirbas,A., Ozturk, T 2005 Alternative and renewable energy industries, International Journal of Green Energy, 1(4):483-494.
Magrinho ,A., F. didelet and V.semiano .2006. Municipal solid waste disposal in Portugal .waste management, 26(12):1477-1489.
Manonmani, H.K and K.R.Sreekantiah.1987.studies on the conversion of cellulose hydrolystate into citric acid by *Aspergillus niger*.process biochemistry (6):92-94.
Mashhoor, W. A., F. Rawia, A. A.j. Refaat and A. N.Sohair. 1987**.**Submerged production of citric acid by strain of *Aspergillus niger*, Annals agricSci, Egypt., 32(2): 1005-1021.
Mashhoor, W.j, R. F. Gamal, Refaat, A. A. and S. A. Nasr. 1988. Effett of traceelements and vitamins on submerged production of citric acid by *Aspergillusniger* Annals of Agricultural science., 33(1): 153-162.
Mattey, M. and B. Kristiansen. 1999**.** A brief introduction to citric acid biotechnology, taylor and francis., p: 1-9.
McHugh, S.,M.Carton , T.Mahony and V .Oflaherty. 2003. Methanogenic population steucture in a variety of anaerobic bioreactors FEMS. *Microbial Ecology* 219(2):297-304.
Mcintyre, M. and B. Mcneil. 1997. Dissolved, carbon dioxid efects on Morphology, growth and citrate production in *Aspergillus niger* A60 Enzymeand Microbial Technology., 20(2) :135-142.
Mechichi, T. and S. Sayada. 2005 . Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Process Biochemistry* , 40,139-145.
Milsom, P. E. and J. L. Meers. 1985. Citric acid, pregamon press., 3: 665-680
Milsom, P. E.1998.Organic acids by fermentation, especially citric acid,elsevier applied science., Vol 2: 273-307 .
Moataza,M.S.2006. citric acid production From pretreating crude date syrup by *Aspergillus niger* NRRL,595. Journal of Applied Sciences Research.2(2):74-79.

Moreira,M.2006:control of pellet morphology of filamentous fungi in fluidized bed bioreactors by means of apulsing flow.Enzyme and microbial Technology. Vol 19:261-266 p.
Mossbrugger, R.E.,M.C. Wentzel ,G.A. Ekama andG.V.R. Marias. 1993 A 5pH point titration method for determining the carbonate and SCFA weak acid bases in anaerobic systems. Water Science and technology 28,(2),237-245 .
Murad ,A.2003.citric acidproductioncheese sugars and additives*by Aspergillus niger* . African jounal of Biotechnology.2(10):356-359.
Nguyen,T.K ,L. Martinkov,L. Seichert,F. Machek .1992 . citric acid production by *Aspergillus niger* using media containg different concentrations of lactose. Folia Microbial .PRAHA.37(6):433-441.
Nicholas, P.,P.N. Cherenisinott and E. Fre. 1980 . Biomass technology and Production. Mercel, *Newyork* 54:130-142 .
Papagianni, M. 2007. Fungal morphology, W: citric acid Biotechnology Ed. by B. Kristiansen, M. Mattey, J. Linden, taylor and Francis., P: 69-84.
Papagianni, M., M. Mattey and R. Kristiansen .1994. Morphology and Citric acid production of *Aspergillus niger*, Biotechnology Letters 16(9): 929-934 .
Peffer, J.T. 1974 . Temperature effects on an aerobic fermentation of domestic refuse . *Bio Technol. Bio-engin*.16:771-787.
Pena, M.,M. Gonzalez and B. Go .1994. Citric acid Alimentation Equiposy Technologia., Spain 13 (2): 91-98.
Pera, L. M.and D. A. Callieri. 1999.Influence of calcium on fingal growth and citric acid production during fermentation of a sugar cane molasses-based medium by a strain of *Aspergillus niger*, World Journal of Microbiology and Biotechnology. 15(5): 647-649.
Pietkiewic,z.1988.Ocena przydatonosci cukru zoltego do produkcji kwasu cytrynowego metoda fermentacji wgtebej.W:stan I perspektywy peodueji kwasu cytrynowego w polsce. Wroclaw-watcz.wdy.osr.poligraf AE.19-25 p.
Pind, P.F., I.Angelidaki, B. Ahiring. 2002. Dynamics of the anaerobic process: Effects of volatile fatty acids Biotechnology and Bioengineering 28(7):791-801.
Pintado, j., M. A. Murado, M. P. Gonzalez, j. Miron and l.Pastrana. 1993. Joint effect of nitrogen and phosphorus concentration on citric acid production by different strains of *Aspergillus niger* grown on an effluent. Biotechnol, Lett. 15(11): 1157-1162.
Podgorski, W., W. S. lesniak and J. Pietkowicz. 1987. Removal of foam during citric acid fermentation. owocowo-warzwny, Poland., 31 (2): 30-32.

Poliafico, M.,J.D. Murfy. 2007 . Anaerobic digestion : Decision support software . Master degree Cork institute of technology, department of civil, structural and environmental engineering .
Poulsen, G.T. 2009 ., Solid waste managemet . the Dakofa/ Iswa Waste & Climate Conference 3, Copenhagen, Denmark .
Radisic, M. 1996. Technical-technological solution of production and utlilzation of biogas and bio fertilizer from liquid manure . *Novi. Sad*, pp: 186.
Ricciardi, A., E. Parente, Jr. Volpe and F. clement. 1997**.** Citric acid production from glucose by *Aspergillus niger* immobilized, in polyurethanefoam. Annali-di-Microbiology Enzimologia., 47(1): 63-67.
Rohr, M. 1998.A century of citric acid fermentation and research. Food technology and biotechnology., 36: 163-171.
Rohr, M., C. P. kubicek and J. Kominek. 1992.Industrial acid and other smallmolecules, W: *Aspergillus*, Klich,biotechnology series, Boston-wellingtonbutterworth-heinemann., 23: 91-131.
Rohr, M., C. P. kubicek and J. Kominek. 1996**.**Citric acid, W: biotechnology. verlag chemie., 6: 307-345 .
Rohr, M., O.Zehentgniber and C. P. Kubicek. 1981.Kinetics of biomass formation and citric acid production by *Aspergillus mger* on pilot scal Biotechnol. Bioeng., 23: 2433-2445.
Romuald, B. and B. EIZbieta. 1992**.**Technologia chemiczna. Organcizna,wydawnictwo academii Ekonomicznej wroctaw., p:738.
Roukas, T. and P. Kotzekidou. 1997.influence of some trace metals andstimulants on citric acid production from brewery wastes by *Aspergillus niger*,Enzyme microbial technlo., 9(5): 291-294.
Roukas, T. 1991. Influence of impeller speed on citric acid production andselected enzyme activities of TCA cycle, Journal of Industrial Microbiology,Greece. 7(3): 221-226.
Roukas, Land L.harvey. 1988. The effect of pH on the production of citric acid and gluconic acid from beet molasses by *Aspergillus niger*. *Biotechnology Lett*. 10(4)p: 289-294.
Roukas, T. and M.Liakopoulou-kyriakides. 2002. Optimization study for the.production of citric and gluconic acid, fig water extract by *Aspergillus niger* surface fermentation, Food Biotechnology., 16(l): 17-28.
Rozzi, A.and F.Malpei.1996. Treatment and disposal of olive mill effluent, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4):135-144.
Rugsaseel, S., S.Morikawa and S. Usami. 1995. Stimulation of citric acid production in *Aspergillus niger* by addition of viscous substances insaker culture. Applied microbiology and Biotechnology. Japan., 42(6): 839-843.

Saez, L.,J. Perez andJ. Martinez.1992. Low molecular weight Phenolic attenuation during simulated treatment of waste from olive oil mills in evaporation ponds, *Water Research*, 26(9):1261-1266.
Sakurai, A., H. Imai and M. Sakakibara. 1997**.** Effect of oxygen tension oncitric acid production by surface culture, Journal of Fermentation and Bioengineering. 82(5): 519-52l.
Sanchez, A., Q. Marro, R. Carreno and M. Ledezma. 1970. Effect of traceElements on citric acid fermentation by *Aspergillus niger*, Applied Microbiology., p: 888-892.
Sanders, W.T.M.,M. Geerink, G. Zeeman, andG. Lettinga. 2000. Anaerobic hydrolysis kinetics of particulate substrates *Water science and technology* 41(3):17-24.
Sarangbin, S., S.Moeikawa, K. Kirimtira and S.Usami. 1993. Fermentation of autodiploid strains *Aspergillus niger* and their application to citric acidproduction from starch , Journal of fermentatIon and Bioengineering., 77(5):474- 478.
Sato, S. 1990**.** Microbial production and control of cellular growth under highdissolved oxygen concentration, Hakokogaku-kaishi, Japan., 68(5) : 411-421.
Schlosser, E. 1997. Allgemeine phytopathologie, 2, neubearb,AUFL - Georgthieme verlag stuttgurt., p:356.
Shadafza ,D.,T.Ogawa and A.Fazeli .1976. Comparison of Citric acid production from beet molassess and date syrup with *Aspergillus niger*, ferment Technol, Iran,vol.54(2):67-75.
Simonnot, N.and R. santarell. 1975. Procede de synthese de acidecitriqu. Institut national de la propriete industrielle Paris., 30(4): 1-4
Speece, R.E.2007. Anaerobic fermentation of cattle manure: Modeling of hydrolysis and acidogenesis, *Water research* 41(2):323-332.
Speece,R.E.(1996).anaerobic biotechnology for industrial wastewaters vanderbilt university,Arachae press
Spreer, E. 1988**.** Technologie der Milchrearbeitung, VEB Fachbuchverlag Leipzig. 6: 540.
Suzuki, A., S. Sarngbin, K. Kirimura and S. Usami. 1996. Direct production of Citric acid from starch by *Aspergillus niger*, Journal of fermentation andBioengineering., 81(4):320-323.
Taliks, T. and S. Taliks.1979. Cwiczenia zchemii zywnosci Wroclaw skadrukarnia., p :159.
Tekin,A.R. and A.C.Dalgic.2000.Biogas production from olivepomace Resources,Conservation and Recycling.Elsevier science(Ed)30:301-313.
Torang, A.,A. S. Jonsson and G. Zacchi. 1999. Separation of cells and proteins from Fermentation broth in a shear-enhanced cross-flow ultra.filtration module as the first step in the refinement of lactic acid.Applied Biochemistry and Biotechnology.,76:143-157.

Tran, C. T. and D. A. Mitchell. 1995. Pineapple waste, a novel substrate for citric acid production by solid state fermentation, Biotechnology., 17:1107-1110.
Van Lier, J.B.,E. Brummeler and G. Lettinga.1993 . Thermo-tolerant anaerobic degradation of volatile fatty acids by digested organic fraction of municipal solid waste, Journal of Fermentation and Bioengineering 76(2):140-144.
Van Velsen, A.F.M.,G. Lettinga and D.Ottelander.1979. Anaerobic digestion of piggery waste :3 . Influence of temperature . Netherlands Journal of Agricultural Science, 27,255-267.
VDI 4630 .2006. Fermentation of organic materials. Characterisation the substrate, sampling, collection of material data ,fermentation tests.ICS 13.030.30,27.190.
Wang, J., X.Wen and D. Zhou. 2000. Production of citric acid from Molassesintegrated with in-setup product separation by ion-exchange resin adsorption.Bioresource technology., 75(3): 231-234.
Wehmer, C. 1983. Note sur la fermentation citrique, *Bull, Soc,*France (9):728
Wilkie, A,C. 2005 . Anaerobic digestion : Biology and Benefits, Dairy manure management: treatment, Handilng and Community relations. *NRAES*, 167:63-72.
Wolschek , M. F. and C. P. Kubicek. 1999. Biochemistrv of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*, Citric acid Biotechnology, Taylor and Francis. p: 11-32.
XU- DB., C. P. Madried, M. Roehr and C. P. Kubicek. 1989. The influenceof type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*, Applied Microbiology and Biotechnolog 3(6): 553-558.
Yigitoglu, M. and B.Mcneil. 1992**.** Ammonium and citric acid supplementationin batch culture of *Aspergillus niger* B- 60, Biotechnology, Late 14: 831-836.
Yigitoglu, M. and B. Mcneil. 1994. Optimization of initial pH and ammonium ion concentration in batch culture of *Aspergillus niger* B60 for citric acid production, Joumal of chemistry., 18(1): 9-13.
Zakowska, Z. 1994. Wplyw zwiazkowpr zeciwpieniacych obenychw melasach buraczanych na rozwoj *Aspergillus niger* produkcje kwasucytrynowego, Zeszty Naukowe PT,Rozprawy Naukowe., 702: 205.
Zakowska, Z. and B. Gabara. 1991. Changes in development and ultrastzcture of mycelium strain with increased tolerance to toxic substances from beet molasses. Acta Microbiology, Poland., 40 (3/4): 255- 26.
Ziobrowski, J. 1985. Technologia przemyslu spozywczego, Maszynopis Ziozonow wydawnictwie., P: 674 .