إنتاج حمض الغلوكونيك من المولاس باستخدام فطر *Aspergillus niger* وأمثلة ظروف الإنتاج

شيماء إبراهيم وادي* **أ.د.صباح اليازجي****

د.نسرين نقشو***

الملخص

اكتسب حمض الغلوكونيك ومشتقاته، خلال السنوات الخمسين الماضية، اهتماماً متزايداً في الصناعات الغذائية، الدوائية،المنظفات وفي مجال البناء، لذا فقد هدف هذا البحث إلى إنتاج حمض الغلكونيك عن طريق تخمير المولاس باستخدام فطر *Aspergillus niger* وأمثلة ظروف الإنتاج، اذ تم الكشف على 10عزلات لها القدرة على إنتاج الحمض بعد اختبار 20 عزلة من الفطر مأخوذة من مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية وبينت النتائج تفوق العزلة (An6) عن باقي العزلات في قدرتها على إنتاج الحمض، الذي بلغ 122.3غ/ل، وبعدها استخدمت هذه العزلة في أمثلة ظروف الإنتاج (سرعة الدوران– درجة الحرارة– درجة الحموضة– تركيز السكر– مدة التحضين) باستخدام برنامج التحليل الإحصائي Minitab، وأظهرت النتائج أن أعلى إنتاج للحمض كان عند سرعة دوران 150 دورة/ د – درجة حرارة: 30° C-درجة حموضة: 6– تركيز السكر: 234غ/ل سكر– مدة التحضين : 6 أيام.

الكلمات المفتاحية: حمض الغلوكونيك،*Aspergillusniger*، المولاس، التخمير بالطريقة السائلة السطحية.

* مهندسة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية – دمشق.

** أستاذ في قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة جامعة دمشق.

*** باحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية – دمشق.

Production of Gluconic Acid from MolassUsing *Aspergillusniger* Fungi and Optimization of Production Conditions

SHaima Wadi* **Sabah Yazgi****

Nsreen Naksho***

Abstract

During the past fifty years, gluconic acid and its derivatives have gained increasing interest in the food, pharmaceutical, textile, and construction industries, so this research aimed to produce gluconic acid by fermenting molasses using Aspergillus niger and optimization of production conditions, 10 isolates have the ability to produce acid after testing 20 isolates of Aspergillus niger taken from the National Commission for Bio technology. Results showed that the most productive isolate was (An6), with122.3 g / lgluconic acid. Then this isolate was used in the optimization of production conditions (aeration speed - temperature - pH - sugar concentration - incubation time) using the Minitab statistical analysis program. The optimal parameters were: aeration speed of 150 rpm- pH: 6 temperature:°C 30 - sugar concentration: 234g / l sugar- incubation time: 6 days

Key words: Gluconic Acid, Aspergillus niger, Molasses, Surface liquid fermentation.fermentation

.

* Engeneer in National Commission for Biotechnology.

** Professor in Food Science –Faculty of Agriculture – Damascus University

*** Searcher in National Commission for Biotechnology

المقدمة:

يعد حمض الغلوكونيك من الأحماض العضوية الهامة المنتجة بواسطة الأحياء الدقيقة ولا سيما الفطريات بعملية التخمير عن طريق استخدام المنتجات الثانوية والمخلفات الزراعية كركائز أساسية وذلك لما له من أهمية كبيرة في الكثير من المجالات الغذائية والصناعية والصيدلانية نتيجة الخصائص الفيزيائية، والوظيفية العديدة التي يتمتع بها، وتجدر الإشارة إلى أنه في عام 1986، اعترفت إدارة الغذاء والدواء الأمريكية بحمض الغلوكونيك ومشتقاته كمادة مضافة آمنة، وأذنت باستخدامها غير المقيد كمكونات غذائية حيث تم إدراجها في دستور المواصفة القياسية للمضافات الغذائية تحت الأرقام (E580) (E574)(Food Chemicals Codex،2010). وبالتوازي مع ذلك، قامت منظمة الأغذية والزراعة (FAO) ومنظمة الصحة العالمية بتنظيم استخدام الحمض ومشتقاته كمضافات غذائية من خلال ممارسات التصنيع الجيدة.

الدراسة المرجعية:

تشكل المنتجات الثانوية؛ الزراعية والصناعية، مشاكل اقتصادية وبيئية كبيرة ذات أهمية، بالرغم من ذلك، فإن العديد منها يحتوي على كميات كبيرة من السكريات، يجعل منها مواد خام مفيدة يمكن استخدامها في التكنولوجيا الحيوية وإنتاج منتجات ذات قيمة، وعليه يمكن أن تكون المنتجات الثانوية من المواد سريعة التلف مثل الفواكه مفيدة للغاية لهذا الهدف، وهنا يبرز حمض الغلوكونيك كنموذج للاستفادة من مخلفات الإنتاج ذات المحتوى العالي من السكر على النحو الأمثل، فحمض الغلوكونيك ($C_6H_{12}O_7$) حمض سكري ينتمي إلى عائلة ألدونيك الحمضية. يتمتع بالكثير من الخصائص؛ فهو حمض ضعيف وغير متطاير، عديم الرائحة، غير قابل للتآكل، غير سام، سهل الانحلال في الماء وغير قابل للذوبان في المذيبات غير قطبية، له عدة مشتقات مثل غلوكونات الصوديوم، غلوكونات الكالسيوم، غلوكو–لاكتون. يوجد هذا الحمض ومشتقاته بشكل طبيعي في العسل واللحوم وبعض

الأطعمة مثل النبيذ والخل وثمار الفاكهة مثل العنب والتفاح والنباتات مثل الأرز (Ramachandran وزملاؤه،2006). اكتسب الحمض ومشتقاته اهتمامًا متزايدًا بالصناعات الغذائية والأدوية والمنسوجات والبناء خلال السنوات الخمسين الماضية. حيث قدر إنتاجه السنوي بحوالي 100000 طن وهو في معظمه إنتاج حيوي (Climent وزملاؤه،2011)، مع تكاليف إنتاج تصل إلى1.20 دولار أمريكي/كغ لحمض الغلوكونيك، و8.50 دولار أمريكي/كغ لغلوكونات الكالسيوم وغلوكونو-لاكتون (Singh and Kumar,2007). تمثل غلوكونات الصوديوم أكثر من 80% من الإنتاج العالمي، وقد ذكر (Roehrوزملاؤه،2001) أن الحمض متاح تجارياً كمحلول مائي بتركيز50% ودرجة حموضةpH1.82 وكثافة 1.24غ/سم3، وهو يستخدم ومشتقاته باستثناء غلوكونو- لاكتون كمواد مضافة في مستحضرات العناية بالبشرة، ومواد فعالة في المستحضرات الدوائية؛ فمثلاً غلوكونات الكالسيوم تستخدم لعلاج نقص الكالسيوم عن طريق الفم أو الحقن الوريدي، غلوكونات الحديد لعلاج نقص الحديد، غلوكونات الزنك لعلاج نزلات البرد (Ramachandran وزملاؤه،2006)، كما تستخدم المحاليل القلوية من غلوكونات الصوديوم في تنظيف الأوعية الزجاجية، والمعدنية (الفولاذية والمخلوطة)، فعلى سبيل المثال، تستخدم معامل الألبان مشتقات الحمض لمنع ترسب أملاح الكالسيوم على معدات المعالجة وأوعية تخزين الزجاج، وفي صناعة البناء يضاف غلوكونات الصوديوم إلى الأسمنت لزيادة صلابته ومقاومته الظروف البيئية القاسية (Hustede وزملاؤه،2012)، أما في الصناعات الغذائية، فإنه يضاف إلى منتجات الألبان والمشروبات الغازية للحفاظ على الخصائص الحسية و/أو تعزيزها(Rogers وزملاؤه،2006)، كذلك يعمل على منع تشكل الترسبات في عصائر الفاكهة عن طريق ربط بعض الشوارد والمعادن، التي يمكن أن تكون موجودة فيها، مثل Ca و Fe. كما يستخدم كمادة حافظة للأطعمة المخللة، ويستخدم غلوكونو-لاكتون كمادة حافظة للنقانق واللحم المقدد(Milsom and) Meer,1985).

ينتج حمض الغلوكونيك بواسطة ثلاث طرائق مختلفة: الأكسدة الكيميائية للغلوكوز Kundu and) Das,1984)، أو الأكسدة الكهربائية لمحلول الغلوكوز المحتوي على قيمة معروفة من البروميد (Amberkar وزملاؤه، 1965)، وكلاهما أكثر تكلفة وأقل كفاءة من الطريقة الثالثة؛ التخمير حيث تستخدم كائنات حية دقيقة محددة تزرع في وسط يحتوي على الغلوكوز ومكونات أخرى؛ مثل مولاس قصب السكر، تفل العنب، قشور الموز ومخلفات الورق وغيرها (Lee وزملاؤه،1998)، الأمر الذي جعل منه واحداً من التقنيات الفعالة والمهيمنة لتصنيع حمض الغلوكونيك، حيث يتم إنتاجه بواسطة كائنات حية دقيقة مختلفة، تشمل البكتيريا *Gluconobacter oxydans*،*Acetobacter methanolicus*،*Pseudomonas ovalis* والفطريات (Bekers وزملاؤه، 2000) *Zymomona smobilis*، *Aspergillus niger* و*Penicillium variabile* (Anastassiadis وزملاؤه،2003) والخمائر *pullulans Aureobasidium* (Anastassiadis وزملاؤه، 2005).

يعد الفطر *Aspergillus niger* من أكثر الأحياء الدقيقة المستخدمة لإنتاج حمض الغلوكونيك على نطاق واسع. ينتج الفطر *A. niger* جميع الإنزيمات اللازمة لتحويل الغلوكوز إلى الحمض؛ الغلوكوز أوكسيداز والكتلاز واللاكتوناز، كما ينتج إنزيم mutarotase، الذي يعمل على تسريع التفاعل، إلا أن إنتاجه يرتبط ارتباطًا مباشرًا بنشاط الغلوكوز أوكسيداز. يتطلب إنتاج الغلوكونيك توفر الظروف المثلى للإنتاج التي تتضمن: تركيز الغلوكوز، ومصادر النيتروجين والفوسفور وقيمة pH بالإضافة إلى معدل التهوية (سرعة الدوران).

تعتبر كل من درجة الحموضة والتهوية في وسط التخمير عاملاً أساسياً لإنتاج الحمض بالإضافة إلى درجة الحرارة ونسبة السكر، فقد أظهرت الدراسة التي أجراها (Znadوزملاؤه،2004) أن إنتاج الحمض كان عند استخدام pH 4.5–6.5 وسرعة دوران 300 دورة/د، كما قام (Ahmed وزملاؤه،2015) بدراسة إنتاج حمض الغلوكونيك من

المولاس باستخدام عدة درجات pH تراوحت بين 4 و8 ودرجات حرارة مختلفة (25−40°C) حيث بلغ69.87غ/ل و هذا توافق مع (Botros وزملاؤه،2012) .أما (Purane وزملاؤه،2012) قام بدراسة الإنتاج عند درجة حرارة 28°C ودرجة حموضة5.5 وسرعة دوران 180 دورة/د وبلغت نسبة الإنتاج 85.2 غ/ل، في حين بلغ إنتاج الحمض عند (Singhوزملاؤه،2005) 61.3 غ/ل وذلك عند درجة حرارة 30 °C وpH 6.5 وسرعة دوران 150 دورة/د.

مبررات وأهداف البحث:

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

1- إنتاج حمض الغلوكونيك باستخدام عزلات من فطر *Aspergillusniger*.

2- أمثلة ظروف الإنتاج (درجة الحرارة- درجة الحموضة- درجة التهوية- تركيز السكر- مدة التحضين).

3- تقدير حمض الغلوكونيك المنتج.

مواد البحث وطرائقه:

عزلات الفطر:

درست 20 عزلة فطرية نقية من مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية، لتحديد مقدرتها على إنتاج حمض الغلوكونيك، حيث نميت على وسط PDA عند درجة حرارة 30°C لمدة سبعة أيام، ثم حُضّر معلق بوغي من كل عزلة بتركيز 2×10^6 بوغة/مل (Ahmed وزملاؤه،2015).

غربلة عزلات الفطر:

حضر وسط التخمير بتركيز سكر 176غ/ل من المولاس، وضبط رقم الحموضة باستخدام حمض الكبريت للوصول إلى pH 6، وأضيفت المواد المغذية بالتراكيز التالية:

الجدول (1): المواد المغذية المضافة لوسط التخمير

المادة المضافة	التركيز المستخدم غ/ل
KCL	**0.52**
$MgSO_4$	**0.52**
KH_2PO_4	**0.52**
$(NH_4)_2SO_4$	**0.95**

بعد ذلك عقم الوسط بعد توزيعه في دوارق مخروطيةحجم 250 مل ومن ثم لقح بالمعلق البوغي بنسبة (2%) حجم/حجم.

حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة بسرعة دوران 200 دورة/دقيقة ودرجة حرارة 30C° لمدة 7 أيام، وبعدها أخذت عينات حجم 1.5مل من كل دورق بأنابيب Eppendorf وثفلت الأنابيب بمثفلة MiniSpin Eppendorf بسرعة 3400 دورة/دقيقة، وفلترت باستخدام فلاتر قطر 0.45 ميكرومتر، وحللت العينات بجهاز تحليل الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء

HPLC (KNAUER) باستخدام العمود C_{18}، وتدفق 1 مل/د، وكاشف UV عند طول موجة 210 نانومتر، وطور متحرك مكون من الأسيتونتريل بنسبة 20% وماء HPLC بنسبة 80%، لتحديد العزلات ذات القدرة على إنتاج الحمض. تم عمل منحنى قياسي لحساب تركيز الحمض في كل عينة على حدا، لتحديد العزلة الأكثر إنتاجاً للحمض، التي سيتم استخدامها في تحديد الظروف المثلى لإنتاج الحمض، كما حدد تركيز السكر عند كل درجة بريكس في البداية باستخدام جهاز HPLC (KNAUER) باستخدام عمود NH_2– كاشف RI (Refractive Index Detector)– درجة حرارة 30°C– تدفق 2.4 مل/د وطور متحرك مكون من الأسيتونتريل بنسبة 85% وماء HPLC بنسبة 15%.

دراسة الظروف المثلى لإنتاج حمض الغلوكونيك:

صممت التجربة باستخدام برنامج التحليل الإحصائي Minitab Optimization Method لدراسة تأثير كل عامل على حدا وتأثير العوامل المتفاعلة مع بعضها البعض. تم دراسة خمسة متغيرات

(سرعة التهوية، درجة الحرارة، درجة الحموضة، تركيز السكر، مدة التحضين)، عند خمسة مستويات كما يلي:سرعة التهوية (350-300-250-200-150) دورة/د،درجة الحرارة (-30-25 35-40-45)°C، درجة الحموضة (8-7-6-5-4)، تركيز السكر(-205-234-176-146 264)غ/ل، مدة التحضين (9-8-7-6-5) أيام وعليه تضمن التصميم 96 معاملة مختلفة.

حضر وسط التخمير من المولاس بعد تمديده بالماء المقطر، وإضافة مادة هيكسا سيانوفيرات البوتاسيوم $K_3[Fe(CN)_6]$ للحد من المعادن الثقيلة الموجودة في المولاس والتي تؤثر على عملية التخمير، وذلك للوصول للتركيز المطلوب، وأضيفت المواد المغذية المذكورة سابقاً، ومن ثم ضبطت الشروط في كل معاملة على حدا وتمت عملية التخمير بالطريقة السائلة السطحية وفقاً للتصميم الإحصائي.

التحليل الإحصائي:

يعبر عن العلاقة بين إنتاج حمض الغلوكونيك والمتغيرات الخمسةالدروسة بمعادلة من الدرجة الثانية كما يلي:

$$Y=a+bX_1+CX_2+dX_3+eX_4+fX_5+gX_1^2+hX_2^2+iX_3^2+jX_4^2+kX_5^2+lX_1*X_2+mX_1*X_3+nX_1*X_4+oX_1*X_5+pX_2*X_3+qX_2*X_4+rX_2*X_5+sX_3*X_4+tX_3*X_5+uX_4*X_5$$

حيث:Y: المعامل المدروس Response كمية الحمض.

a: المعامل الثابت Constant .

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

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

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

حيث أن X1 : سرعة التهويةX2: درجة الحرارة

X3: درجة الحموضةX4: مدة التحضين

X5: تركيز السكر.

النتائج والمناقشة:

1. الغربلة الأولية:

بينت نتائج الغربلة الأولية أنه من بين20 عزلة تم استخدامها، 10عزلات فقط كانت لديها القدرة على إنتاج الحمض، بعد الكشف عنه بجهاز HPLC بعد حقن ستاندر للحمض ومقارنة العينات بالستاندر وكانت النتائج كالتالي :

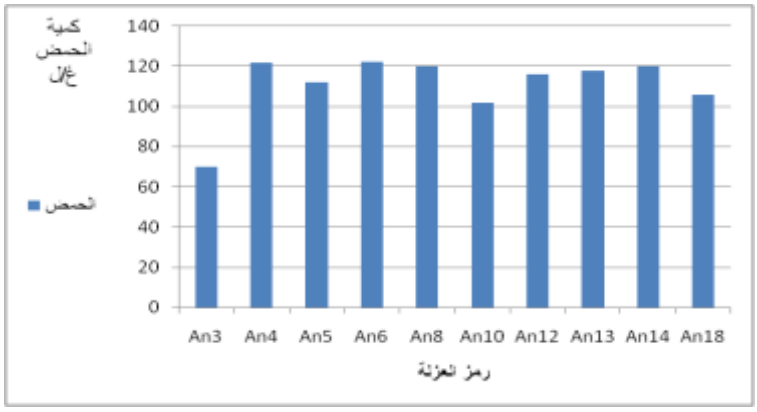
الجدول (2): نتائج الغربلة الاولية

رقم العزلة	رمز العزلة	القدرة على إنتاج الحمض
1	An1	−
2	An22	−
3	An3	+
4	An4	+
5	An5	+
6	An6	+
7	An12	−
8	An8	+
9	An30	−
10	An10	+
11	An19	−
12	An12	+
13	An13	+
14	An14	+
15	An15	−
16	An23	−
17	An16	−

+	**An18**	**18**
-	**An24**	**19**
-	**An22**	**20**

2. الغربلة الثانوية:

أظهرت نتائج الغربلة الثانوية على العزلات ال 10 أن العزلات An4 و An6 أظهرت أعلى إنتاج للحمض، إلا أن العزلة An6 تفوقت أكثر، وذلك بعد عمل منحنى قياسي بتراكيز محددة والإسقاط عليه لمعرفة كمية الحمض، حيث بلغت كمية الحمض122.3غ/ل، ويبين الشكل التالي نتائج الغربلة:



الشكل (1): نتائج الغربلة الثانوية

أمثلة ظروف إنتاج حمض الغلوكونيك:

1.3 تصميم التجربة:

استخدم التصميم الإحصائي المذكور سابقاً من مواد وطرائق البحث لأمثلة ظروف إنتاج الحمض والذي يتألف من96 معاملة وخمسة متغيرات وتم الحصول على قيم كمية الحمض لكل معاملة، كما هو موضح بالجدول (1)

الجدول (3): كمية الحمض في المعاملات المدروسة

Blocks	سرعة التهوية Aeration دورة/دقيقة	درجة الحرارة Temperature C°	درجة الحموضة pH	مدة التحضين Incubation time يوم	تركيز السكر Brix	نسبة الحمض غ/ل
1	200	30	5	6	32	109.7
1	300	30	5	6	24	109.7
1	200	40	5	6	24	88.8
1	300	40	5	6	32	99.5
1	200	30	7	6	24	92
1	300	30	7	6	32	122
1	200	40	7	6	32	106.8
1	300	40	7	6	24	91.1
1	200	30	5	8	24	90
1	300	30	5	8	32	107.8
1	200	40	5	8	32	110.2
1	300	40	5	8	24	84
1	200	30	7	8	32	105.5
1	300	30	7	8	24	109.7
1	200	40	7	8	24	93
1	300	40	7	8	32	123.8
1	150	35	6	7	28	98.9
1	350	35	6	7	28	94.8
1	250	25	6	7	28	98.9
1	250	45	6	7	28	106
1	250	35	4	7	28	104
1	250	35	8	7	28	97
1	250	35	6	5	28	99.8

1	250	35	6	9	28	54.2
1	250	35	6	7	20	76.7
1	250	35	6	7	36	114.5
1	250	35	6	7	28	101.6
1	250	35	6	7	28	101.5
1	250	35	6	7	28	101.6
1	250	35	6	7	28	101.6
1	250	35	6	7	28	101.4
1	250	35	6	7	28	101.6
2	200	30	5	6	32	109.3
2	300	30	5	6	24	109.7
2	200	40	5	6	24	88.5
2	300	40	5	6	32	99.3
2	200	30	7	6	24	92
2	300	30	7	6	32	122.2
2	200	40	7	6	32	106.5
2	300	40	7	6	24	91
2	200	30	5	8	24	90.2
2	300	30	5	8	32	107.5
2	200	40	5	8	32	110
2	300	40	5	8	24	84
2	200	30	7	8	32	105.4
2	300	30	7	8	24	109.8
2	200	40	7	8	24	93.3
2	300	40	7	8	32	123.5
2	150	35	6	7	28	98.5
2	350	35	6	7	28	95
2	250	25	6	7	28	99
2	250	45	6	7	28	106.2
2	250	35	4	7	28	104.2
2	250	35	8	7	28	96.9
2	250	35	6	5	28	100

2	250	35	6	9	28	54
2	250	35	6	7	20	76.5
2	250	35	6	7	36	114.5
2	250	35	6	7	28	101.5
2	250	35	6	7	28	101.6
2	250	35	6	7	28	101.6
2	250	35	6	7	28	101.5
2	250	35	6	7	28	101.4
2	250	35	6	7	28	101.6
3	200	30	5	6	32	109.6
3	300	30	5	6	24	109.8
3	200	40	5	6	24	88.8
3	300	40	5	6	32	99.7
3	200	30	7	6	24	92.2
3	300	30	7	6	32	122
3	200	40	7	6	32	106.6
3	300	40	7	6	24	91
3	200	30	5	8	24	90.1
3	300	30	5	8	32	107.7
3	200	40	5	8	32	110
3	300	40	5	8	24	84
3	200	30	7	8	32	105.5
3	300	30	7	8	24	109.6
3	200	40	7	8	24	93
3	300	40	7	8	32	123.6
3	150	35	6	7	28	99
3	350	35	6	7	28	94.9
3	250	25	6	7	28	98.9
3	250	45	6	7	28	105.9
3	250	35	4	7	28	104.1
3	250	35	8	7	28	97.2
3	250	35	6	5	28	99.9

3	250	35	6	9	28	54
3	250	35	6	7	20	76.7
3	250	35	6	7	36	114.3
3	250	35	6	7	28	101.5
3	250	35	6	7	28	101.4
3	250	35	6	7	28	101.5
3	250	35	6	7	28	101.6
3	250	35	6	7	28	101.6
3	250	35	6	7	28	101.4

2.3 تحليل التجربة:

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

التحليل الإحصائي للتأثير الخطي للمتغيرات الخمسة المدروسة نلاحظ من الجدول رقم(4) أن قيمة P لكل المتغيرات أقل من 0.05 وبالتالي هنالك تأثير معنوي لها في إنتاج الحمض والعلاقة خطية.

التأثير المربع نلاحظ من الجدول(4) أن قيمة P لكل المتغيرات أقل من 0.05 وبالتالي هنالك تأثير معنوي لها في إنتاج الحمض.

التأثير التفاعلي أي تأثير العوامل المتداخلة في إنتاج الحمض، تحتوي المعادلة على 10 علاقات تداخل بين المتغيرات الخمسة ونلاحظ من الجدول (4) أن علاقة سرعة الدوران مع درجة الحرارة ومع درجة الحموضة معنوية0.05>(P) في تأثيرها في إنتاج الحمض، وعلاقة درجة الحرارة مع مدة التحضين وتركيز السكر معنوية 0.05>(P)، كما كانت علاقة درجة الحموضة مع مدة التحضين معنوية 0.05>(P) في حين كانت باقي العلاقات غير معنوية 0.05<(P) في تأثيرها في إنتاج الحمض واعتماداً على الجدول(4).

يمكن كتابة المعادلة كما يلي:

$$Y=99.716+1.828X1-1.478X2+1.261X_3-3.633X_4+8.406X_5+0.642X_1^2+2.051X_2^2+1.572X_3^2-4.324X_4^2+0.313X_5^2-3.271X_1*X_2+2.917X_1*X_3+0.054X_1*X_4-0.583X_1*X_5+1.242X_2*X_3+2.838X_2*X_4+2.492X_2*X_5+2.233X_3*X_4+1.104X_3*X_5+0.858X_4*X_5$$

الجدول (4): تأثير العوامل المدروسة في إنتاج حمض الغلوكونيك

المصطلح	Coef	SE Coef	T	P
الثابت	99.716	1.816	54.918	0.000
التهوية	1.828	0.929	1.967	0.043
الحرارة	-1.478	0.929	-1.590	0.016
درجةالحموضة	1.261	0.929	1.357	0.039
مدةالتحضين	-3.633	0.929	-3.910	0.000
تركيزالسكر	8.406	0.929	9.046	0.000
التهوية* التهوية	0.642	0.841	0.764	0.047
الحرارة* الحرارة	2.051	0.841	2.440	0.017
درجةالحموضة* درجةالحموضة	1.572	0.841	1.870	0.042
مدةالتحضين* مدةالتحضين	-4.324	0.841	-5.145	0.000
تركيزالسكر * تركيزالسكر	0.313	0.841	0.373	0.010
التهوية* الحرارة	-3.271	1.138	-2.874	0.005
التهوية* درجةالحموضة	2.917	1.138	2.563	0.012
التهوية* مدةالتحضين	0.054	1.138	0.048	0.962
التهوية* تركيزالسكر	-0.583	1.138	-0.513	0.610
الحرارة* درجةالحموضة	1.242	1.138	1.091	0.279
الحرارة* مدةالتحضين	2.838	1.138	2.493	0.015
الحرارة* تركيزالسكر	2.492	1.138	2.189	0.032
درجةالحموضة* مدةالتحضين	2.233	1.138	1.962	0.054

درجةالحموضة* تركيزالسكر	1.104	1.138	0.970	0.335
مدةالتحضين* تركيزالسكر	0.858	1.138	0.754	0.453

$R^2 = 94.90\%$

3.3 أمثلة ظروف إنتاج الحمض:

1.3.3 تأثير سرعة الدوران في إنتاج الحمض:

استخدمت سرعات مختلفة للحاضنة الهزازة عند تحضين دوارق التخمير لتحديد سرعة الدوران المثالية لإنتاج الحمض. لوحظ أن أعلى إنتاج للحمض كان عند سرعة دوران 150دورة/د كما هو مبين بالشكل(2) وهذا توافق مع الدراسة التي أجراها (Singh وزملاؤه،2005) لإنتاج حمض الغلوكونيك من المولاسباستخدام فطر *Aspergillus niger*، كما تقاربت النتائج مع ماتوصل إليه (Purane وزملاؤه، 2012)عند دراسة إنتاج الحمض من فطر *Aspergillus niger* حيث وجد أن أعلى إنتاج كان عند استخدام سرعة دوران 180دورة/د.

2.3.3 تأثير درجة الحرارة في إنتاج الحمض:

نلاحظ من الجدول(4) والشكل(2) أن درجة الحرارة ذات تأثير معنوي في إنتاج الحمض.وبينت النتائج أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج الحمض هي $30°C$ وهذا توافق مع نتائج (Singh وزملاؤه، 2005)،كما توافقت هذه النتائج مع دراسات أخرى أظهرت أن الإنتاج الأعظم للحمض عند درجة حرارة $30°C$ من فطر *Aspergillus niger* عند استخدام المولاس كركيزة (Ahmed وزملاؤه،2015). كما وتنسجم هذه النتائج مع ما توصل إليه (Znad وزملاؤه،2004) حيث كان أعلى إنتاج للحمض عند هذه الدرجة. كما تقاربت النتائج مع نتائج كل من (2016,Purane and Lohar)، ونتائج (Purane وزملاؤه،2012) عند دراسة إنتاج حمض الغلوكونيك من الفطر نفسه.

3.3.3 تأثير درجة الحموضة في إنتاج الحمض:

بينت النتائج في الشكل(2) أن درجة الحموضة المثلى لإنتاج الحمض ضمن ظروف التجربة هي عند pH6، كما أن درجة الحموضة ذات تأثير معنوي على إنتاج الحمض وهذا

يتوافق مع ما توصل إليه (Shindia وزملاؤه،2006) حين استخدموا فطر *Aspergillus niger* لإنتاج الحمض ضمن مدى pH تراوح بين 2 إلى 9 فكانت درجة الحموضة المثالية هي 6، كما تقاربت النتيجة مع نتيجة (Znadوزملاؤه،2004) حيث وجدوا أن درجة الحموضة المثلى 5.5 في إنتاج الحمض.

4.3.3 تأثير تركيز السكر في إنتاج الحمض:

الغلوكوز هو الركيزة التي يعمل عليها الغلوكوز أوكسيداز لإنتاج الحمض لذا فإن وجوده في الوسط بالتركيز المناسب ضروري لحث الفطر على الإنتاج. استخدمت تراكيز مختلفة من السكر عند دراسة الشروط المثلى لإنتاج الحمض وكان أفضل تركيز هو 234غ/ل سكر كما يبين الشكل(2)، وهذا يقارب ماتوصل إليه (Singh وزملاؤه،2005) حيث بلغ أعلى إنتاج للحمض عند تركيز (250غ/ل).

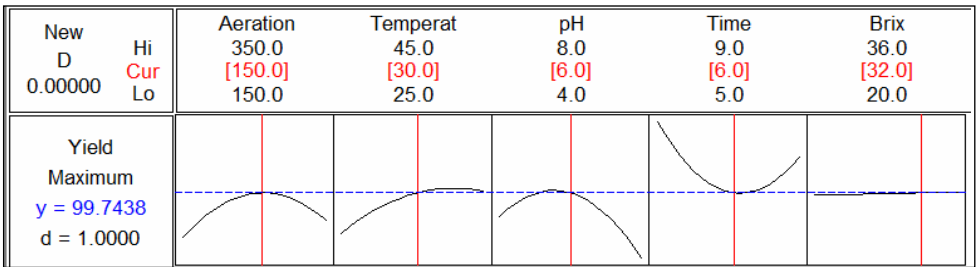
5.3.3 تأثير مدة التحضين في إنتاج الحمض:

تؤثر مدة التحضين في إنتاج الحمض تأثيراً معنوياً حسب الجدول (4) إلا أن زيادة مدة التحضين لاتؤدي إلى زيادة الإنتاج وذلك يعود لإنخفاض كمية المواد المغذية في الوسط إضافة إلى المواد المثبطة المنتجة من الفطر نفسه. وجدنا في دراستنا أن مدة التحضين المثلى كانت 6 أيام كما هو مبين في الشكل (2)، حيث توافقت هذه النتيجة مع ماتوصل إليه(Singh وزملاؤه، 2005) في حين تقاربت النتيجة مع الدراسة التي أجراها(Ahmed وزملاؤه،2015) حيث وجد أن أعلى إنتاج للحمض كان في اليوم السابع عند دراسة تأثير فترات تحضين مختلفة تراوحت بين 11-3 يوم.

كما توصل (Shindiaوزملاؤه،2006) إلى أقصى إنتاج لحمض الغلوكونيك من فطر *Aspergillus niger* عند مدة تخمير 7 أيام عند إنتاج الحمض بفترات تخمير تراوحت من 12-1 يوم باستخدام الغلوكوز. في حين وجد (Ganguly وزملاؤه، 2010) أن مدة التحضين المثلى كانت 4 أيام عند استخدام *gluconobacter oxydans* لإنتاج الحمض

وتعود هذه الأختلافات إلى الأختلاف في مكونات وسط التخمير واختلاف الكائن الحي المستخدم.

sugar concent



الشكل (2): الظروف المثلى لإنتاج حمض الغلوكونيك

الاستنتاجات:.

الظروف المثلى لإنتاج الحمض كانت عند سرعة الدوران 150 دورة/د – درجة الحرارة 30°C –درجة حموضة 6 pH– تركيز السكر 32 بركس (234.84غ/ل سكر) – مدة التحضين 6 أيام.

التوصيات:

- إنتاج الحمض باستخدام ركائز مختلفة غير المولاس ومقارنتها معه من حيث المردود.
- تطبيق إنتاج حمض الغلوكونيك على مستوى صناعي.

References المراجع:

1. Ahmed,A. S., S. S.Farag,A.Hany and W.Botros.(2015). Production of gluconic acid by using some irradiated microorganisms، J. Journal ofRadiation Research and Applied Sciences. 8 :374-380.
2. Anastassiadis,S.، A.Aivasidis and C .Wandrey. (2003). Continuousgluconic acid production by isolated yeast-like mould strains of*Aureobasidiumpullulans*. Applied Microbiology Biotechnology.61،110–117.
3. Anastassiadis, S. Anastassiadis, A. Aivasidis, C. Wandrey and H.J. Rehm.(2005).Processoptimization of continuous gluconic acid fermentationby isolated yeast-like strains of *Aureobasidiumpullulans*،Biotechnol. Bioeng. *91* :494–501.
4. Amberkar, S. B. Thadani and Y. M. Doctor. (1965). ProductionG. R.of calcium gluconate by *Penicilliumchrysogenum* in submergedculture. 13، 731.
5. Bekers, M., A. Vigants, J. Laukevics, M. Toma, A. Rapoports and P. Zikmanis. (2000). The effect of osmo-induced stress on productformation by *Zymomonasmobilis* on sucrose. International Journalof Food Microbiology 55، 147–150.
6. Botros,H. W., A. S. Ahmed, S. S.Farag and I. A.Hassan .(2012). Study on ethanol production from sugar cane molasses by using irradiated *Saccharomycescerevisiae*. Isotope and Radiation Research، 44(3)، 711.
7. Climent, M.J., A. Cormaand S. Iborra.(2011).Converting carbohydrates tobulkchemicals and fine chemicals over heterogeneous catalysts،Green Chem. 13:520–540.

8. Food Chemicals Codex.(2010).seventh ed.، United Book Press Inc.،Baltimore، MD United States.
9. Ganguly,S. S.K.Patra and S.K. Mandal.(2010). Optimization of some physical parameters for the production of gluconic acid by a mutant
10. *gluconobacteroxydans* GPM 60, International Journal of Biotechnology Applications, Vol. 2, pp-01-04.
11. Hustede ,H., H.J.Haberstroh and E. Schinzig. (2012).Gluconic acidUllmann'sEncyclopedia of Industrial Chemistry، vol. 17، Wiley-VCHVerlag GmbH &Co.KGaA، pp. 37–44.
12. Kundu,P. and A. Das.(1984). Utilization of cheap carbohydrate sourcesfor calcium gluconate production by *Penicilliumfuniculosum* mutant MN 238. Indian Journal of Experimental Biology 22،279–281.
13. Lee ,H. W. , J. G. Pan and J. M. Lebeault. (1998). Calcium gluconateform glucose substrate. Applied Microbiology and Biotechnology،49، 9.
14. Milsom,P. and J.L. Meers.(1985).Gluconic and itaconic acids، in: M. Moo- Young (Ed.)،Comprehensive Biotechnology: the Principles،Applications، and Regulationsof Biotechnology in Industry،Agriculture and Medicine،vol.3،PergamonPress،Oxford،pp.672–700.
15. Purane, N.K., Sh. K.Sharma,P.D.Salunkhe, D. S.Labade and M. M. Tondlikar.(2012). Gluconic Acid Production Syrup by *Aspergillusniger*Strain Using Semiautomati Stirred-Tank Fermenter.Microbial&Biochemical Technology،(4): 092-095.
16. Purane,N. K. and P.S. Lohar.(2016).Evaluation of Potential Activity of Fungi Isolated from Bagasse for Gluconic Acid

Production،International Journal for Innovative Research in Science &Technology. Vol: 2.

17. Ramachandran,S. , P. Fontanille, A. Pandey and C. Larroche.(2006). Gluconic acid: properties، applications and microbial production،Food Technol. Biotechnol.44 :185–195.
18. Roehr, M. , C.P. Kubicek and J.C. Komínek.(2001).Gluconic acid، in: H.J.Rehm، G. Reed(Eds.)،Biotechnology Set، second ed.، Wiley-VCH Verlag GmbH،Weinheim،Germany، pp. 347–362.
19. Rogers, P. , J.S. Chen and M.J. Zidwick.(2006).Organic acids and solventproduction،PartI: Acetic، lactic،gluconic succinic andpolyhydroxyalkanoic acids، in: M.Dworkin، S. Falkow، E. Rosenberg، K.H. Schleifer، E. Stackebrandt (Eds.)، The Prokaryotes، A Handbook on the Biology of Bacteria.
20. Symbiotic Associations، Biotechnology، Applied Microbiology،vol 1،thirded.، Springer، New York، pp. 511–755.
21. Singh ,O.V. and R. Kumar. (2007).Biotechnological production of gluconicacid: futureimplications، Appl. Microbiol. Biotechnol. 75 :713–722.
22. Singh ,O.V. , N. Kapur and R.P. Singh.(2005).Evaluation of agro-food byproducts forgluconic acid production by *Aspergillusniger* ORS-4.410، World J. Microbiol.Biotechnol. 21:519–524.
23. Shindia,A. A. G. A. El-Sherbeny, A. E. El-Esawy and Y. M. M. M. Sheriff.(2006).Production of Gluconic Acid by Some Local Fungi,Mycobiology 34(1): 22-29.
24. Znad,H. , J. Markoš and V. Baleš.(2004). Production of gluconic acid fromglucose by *Aspergillusniger*: growth and non-growth conditionProcess Biochemistry، 39: 1341–1345.