DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

تولید اسید سیتریک از ضایعات کشاورزی با استفاده از *Aspergillus niger* به روش تخمیردر بستر جامد و بهینه سازی فرآیند تولید

فرنگیس آتش نور و معصومه انوری*

ایران، رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۷

چکیده

اسید سیتریک یکی از اسیدهای آلی پرکاربرد است که به صورت گسترده در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این اسیدآلی معمولا توسط فرآیند تخمیر غوطه‌ور یا تخمیر سطحی و از طریق *آسپرژیلوس نایجر* تولید می‌شود. تحقیقات اخیر نشان دهنده موفقیت‌آمیز بودن تولید اسید سیتریک از طریق روش تخمیر در بستر جامد می‌باشد. در شرایط آزمایشگاهی چهار فاکتور مهم در تولید اسید سیتریک، در چهار سطح؛ شامل: نوع سوبسترا (کاه گندم، کاه برنج، سبوس برنج و پوست بادام زمینی)، (۴،۵،۶،۷ pH)، دمای تیمارسوبسترا (شامل ۹۰،۷۵،۶۰،۴۵ درجه سانتی گراد) و زمان تیمار سوبسترا (۱۲۰،۹۰،۶۰،۳۰ دقیقه) در تولید اسید سیتریک توسط قارچ آسپرژیلوس نایجر مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج این پژوهش حداکثر تولید اسید سیتریک درpH برابر با ۵، زمان تیمارسوبسترا ۶۰ دقیقه، دمای تیمارسوبسترا ۶۰ درجه سانتی گراد و با استفاده از کاه گندم به عنوان بهترین سوبسترا به دست آمد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که قارچ *آسپرژیلوس نایجر* یک میکروارگانیسم مناسب جهت تولید اسید سیتریک می باشد؛ همچنین کاه گندم با توجه قیمت ارزان آن بستر مناسبی جهت تولید اقتصادی اسید سیتریک محسوب می شود. تمام چهار فاکتور مورد مطالعه در این پژوهش اثر معنی داری در تولید اسید سیتریک داشتند ($P<۰/۰۵$).

واژه‌های کلیدی: اسید سیتریک ، ضایعات کشاورزی، *آسپرژیلوس نایجر*، بهینه سازی، تخمیر در بستر جامد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۲۳۲۳۴۸۲ ، پست الکترونیکی: anvari@iaurasht.ac.ir

مقدمه

اسید سیتریک یک ترکیب شیمیایی تجاری است که به عنوان یکی از پر مصرف ترین فرآورده‌های تخمیری می-باشد. بر اساس آمار موجود سالانه بالغ بر ۷۰۰ هزار تن اسید سیتریک از طریق فرآیند تخمیر در سطح جهان تولید می‌شود (۳۲). این اسید آلی به دلیل ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی و گروههای عاملی در ساختار خود به وسیله سازمان بهداشت و خواروبار جهانی برای استفاده درصنایع غذایی، دارویی و بهداشتی تأیید شده است (۴) . امروزه از *قارچ آسپرژیلوس نایجر* جهت تولید تجاری و موفق اسید سیتریک استفاده می شود (۲۳). از آنجایی که ویژگیهای ریخت شناسی قارچ در محیط تخمیر، در تولید اسید سیتریک اثر بسیار مهمی دارد؛ بنابراین شناسایی و انتخاب سویه مورد نظر از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می‌باشد (۲۴). به طور کلی تکنیک تخمیر بر بازده اسید سیتریک تولید شده تأثیر گذار می‌باشد. به عنوان مثال یک سویه ممکن است در تخمیر غوطه‌ور عملکرد خوبی داشته باشد اما در فرآیند تخمیردر بسترجامد عملکرد ضعیفی داشته باشد. بنابراین سویه‌های تولید شده باید به وسیله روشهای مختلف تخمیر و درسوبستراهای صنعتی مورد آزمایش قرار گیرند تا بهترین روش تخمیر برای تولید انتخاب شود (۲۵). روش تخمیر سطحی امروزه اگر چه با وجود روش کشت غوطه ور اهمیت خود را ازدست داده است، اما هنوز

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

هم در مقیاس کوچک و متوسط استفاده می‌شود. این نوع تخمیر برای هوادهی و اختلاط نیاز به انرژی ندارد، اما نسبت به تغییر در واسطه‌ها حساس است و احتمال ایجاد آلودگی در محیط را زیاد می‌کند. روش تخمیر در بسترجامد برای فرآیندهایی به کار می‌رود که در آنها میکرو ارگانیسم‌ها از مواد نامحلول در آب و در شرایط بدون حضور آب آزاد استفاده می‌کنند. این نوع تخمیر نیاز به آب و هزینه عملیاتی کمی دارد و از طرفی سازگاری بهتری با محیط زیست دارد. پس از طی چند دهه روش تخمیر در بستر جامد برای تولید اسید سیتریک به دلیل امکان استفاده از ضایعات فراوان و ارزان کشاورزی به عنوان سوبسترا رواج یافته است. با توجه به افزایش قیمت هیدروکربنها و عدم دسترسی آسان به این منابع طرحهایی بر پایه سوبستراهای هیدروکربنی جای خود را به طرحهایی بر پایه ضایعات کشاورزی داده است (۱۰). یکی از مهمترین مباحث کلیدی در سطح اقتصاد جهانی و به ویژه ایران، موضوع ضایعات می‌باشد و این امر به دلیل آن است که سطح تأثیر ضایعات در تولید ناخالص داخلی و درآمد ملّی بسیار نگران کننده است. در سالهای اخیر شاهد افزایش ضایعات کشاورزی بوده به طوری که ۳۰ درصد محصولات کشاورزی در ایران به ضایعات تبدیل می‌شود. کاهش ضایعات کشاورزی افزایش عرضه را در بر دارد و لذا از عوامل تولید اضافی صرفن نظر می گردد. با اعمال این سیاست در بهره برداری از منابع طبیعی نیز صرفه جویی شده و منابع غیر قابل تجدید که در معرض تخریب قرار می‌گیرند، جهت استفاده نسلهای آینده استمرار می یابند؛ همچنین این امر دربردارنده توسعه پایدار کشور خواهد شد (۳). در تولید اسید سیتریک می‌توان با استفاده از ضایعات کشاورزی هم انرژی را مدیریت کرد و هم با توجه به قیمت نسبتاً ارزان ضایعات کشاورزی به مدیریت اقتصادی فرآیند و تولید پرداخت. وجود انواع ضایعات جامد در کشور که سوزانده و یا به عنوان غذای دام مصرف می‌شوند می‌تواند به عنوان منبع ارزان جهت تولید انواع مواد بیولوژیکی با ارزش، مورد استفاده قرار گیرند. حجم تجارت جهانی اسید سیتریک و مشتقات آن بیش از ۳۰۰ هزار تن در سال است و با وجود تحقیقات بسیار وسیع که در خارج از کشور بر روی تولید و استخراج اسید سیتریک انجام شده است، متأسفانه در ایران هنوز این ماده با ارزش جزء مواد وارداتی محسوب می‌شود (۳). تمام موارد بیان شده اهمیت اسید سیتریک را نشان می‌دهد، از این رو یک طراحی معین و مناسب جهت انجام آزمایشهای بهینه‌سازی فرآیند تخمیر، مهم و ضروری است. زمانیکه پارامترهای متعددی در سطوح مختلف در یک آزمایش دخیل باشند، آن گاه طراحی یک طرح تجربی مؤثر و کارا برای رسیدن به نتیجه بهینه بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در طراحی آزمایش به روش تاگوچی دو موضوع تعیین تعداد آزمایشهای موردنیاز و تعیین شرایط هرآزمایش، حائز اهمیت می باشد؛ برای این منظور از یک سری آرایه های خاص برای طراحی آزمایش استفاده شد. در مطالعاتی که به روش تاگوچی انجام شد از تجزیه واریانس(آنووا) جهت شناسایی پارامترهایی که بر پاسخ اثر می‌گذارند استفاده شد. برای این منظور نمودارهای میانگین در مورد هر یک از پارامترها رسم شد، و از روی نمودارها پارامترهایی که دارای بیشترین تأثیر بودند و مقادیر بهینه آنها، تعیین شد (۱۳). این تحقیق با هدف تولید ماده ارزشمند اسید سیتریک از ضایعات کشاورزی توسط *آسپرژیلوس نایجر* و بهینه سازی فرآیند تولید به روش طراحی آزمایشی تاگوچی انجام شد.

مواد و روشها

میکروارگانیسم مورد استفاده: سویه تهیه شده از مرکز کلکسیون باکتریها و قارچهای سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، قارچ *آسپرژیلوس نایجر* PTCC5010 بود.

آماده سازی سوبستراهای مورد استفاده: در این پژوهش از چهار سوبسترای کاه گندم، کاه برنج، سبوس برنج و پوست سخت بادام زمینی استفاده شد. سوبستراهای مورد استفاده به قطعات ریز هم اندازه (۵ میلی متر) تقسیم شدند

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

و جهت اطمینان، از غربالهای با منافذ یکسان عبور داده شدند. مقدار ۵ گرم از هرکدام از سوبستراها به ارلنهای ۱۰۰ سی سی اضافه شدند. برای شکستن حصار لیگنین بافت چوبی سوبستراها، آزاد سازی سلولز و استفاده بهتر میکروارگانیسم، سوبسترا ها تحت تیمار اسیدی - حرارتی قرار داده شدند (۱۸، ۱۹ و ۲۷). جهت تیمار اسیدی، اسید سولفوریک۰/۰۱درصد به اندازه ای که تمام سطح سوبسترا را بپوشاند به بسترهای درون ارلن اضافه شد. در ادامه سوبسترا ها با توجه به زمان تیمار و دمای تیمار متناسب درج شده در جدول ۱ درون حمام آب گرم قرار داده شدند. پس از تیماراسیدی- حرارتی، سوبسترا ها با آب فراوان شستشو داده شدند. پس از خشک شدن، سوبستراهای تیمار شده جهت بهره برداری و تلقیح محلول قارچ آماده شدند.

روش تهیه بافرمورد استفاده: برای تهیه بافر از ۰/۰۵گرم مونو پتاسیم فسفات (KH_2PO_4)، ۰/۰۲گرم نیترات آمونیوم (NH_4NO_3)، ۰/۰۲گرم منیزیم سولفات ($Mg\ S0_4\ .7H_20$)، ۰/۲ میلی لیتر متانول، ۵گرم گلوکز و ۹/۸میلی لیتر آب مقطر استفاده شد (۵، ۱۱ و ۱۷). ۱۰ میلی لیتر از بافر تهیه شده به صورت قطره قطره در تمام سطح هریک از سوبستراهای تیمار شده پخش شد. تمامی نیازهای اولیه میکروارگانیسم مورد نظر جهت رشد توسط بافر تأمین شد. pH محلول بافرطبق جدول۱ در چهار سطح (۴،۵،۶،۷) به وسیله محلول اسید سولفوریک ۲ نرمال و محلول سود (سدیم هیدروکسید) تنظیم شد.

ترکیب و تهیه محیط پیش کشت: جهت آماده سازی محیط کشت از ۲/۵ گرم گلوکز، ۰/۰۰۵ گرم منیزیم سولفات ۷آبه ($Mg\ S0_4\ .7H_20$)، ۰/۰۰۵ گرم دی پتاسیم فسفات (K_2HPO_4)، ۰/۵گرم پپتون واتر و ۰/۰۰۱ گرم کلسیم کلرید ($CaCl_2$) استفاده شد (۵ و ۱۷). به منظور تهیه مایع تلقیح قارچ، مواد در ۱۰۰میلی لیتر آب مقطر حل شد و به مدت ۵ دقیقه در اتوکلاو قرار داده شد. پس از خنک شدن محیط در شرایط کاملاً آسپتیک(عاری از آلودگی)، لوپ استریل به اسپورهای آسپرژیلوس نایجر آغشته و در حضور شعله با 10 میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط شده و یک سوسپانسون اسپور درست شد و سپس با روش لام نیوبار تعداد اسپورها به 10^5اسپور بر میلی لیتر تنظیم شده و به محیط انتقال یافت. سپس در انکوباتور در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت گرم خانه‌گذاری شد (۱۹، ۲۱ و ۲۳).

تهیه محیط کشت اصلی یا محیط تخمیر: ۵گرم از هر یک از سوبستراهای تیمار شده درون ارلن ۱۰۰ سی سی ریخته شد. طبق جدول ۱ مقادیرpH درچهارسطح (۴،۵،۶،۷) به محلول بافر، درجه حرارت تیمار در چهار سطح (۹۰، ۷۵، ۶۰، ۴۵ درجه سانتی گراد) و زمان تیمار نیز در چهارسطح (۱۲۰، ۹۰، ۶۰، ۳۰ دقیقه) به سوبستراهای مورد استفاده (کاه گندم، کاه برنج، سبوس برنج و پوست بادام زمینی) اعمال شد. لازم به ذکر است که منبع کربن (گلوکز) و منبع ازت کمکی (نیترات آمونیوم) به صورت ثابت بوده است. برای رساندن بافر به pH هدف از اسید و باز استفاده شد. در ادامه محیط تهیه شده استریل گردید. سپس۴میلی لیتر از قارچ کشت شده با پیپت استریل به تمامی سطح محیط تلقیح شد (تعداد اسپور های موجود در هر سی سی از محیط کشت شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتردر طول موج۵۶۰ نانومتر انداره گیری شد). تمامی نمونه ها طی مدت ۶ روز در دستگاه انکوباتور در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از طی مدت زمان تعیین شده مقدار ۴۰ میلی لیتر آب مقطر به نمونه ها اضافه شد و ترکیب ایجاد شده به منظور مخلوط شدن آب مقطر و ترکیبات تولید شده به وسیله قارچ بر روی بستر، به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه تکان داده شد. سپس محلول رویی نمونه ها به درون لوله های آزمایش مجزا و مخصوص به خود در درون سانتریفیوژ با دور۶۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. با پایان سانتریفیوژ محلول رویی نمونه ها از فیلترهای ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. به منظور تعیین میزان اسید

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

سیتریک تولید شده، OD محلولهای جدا شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گرفته شد (۲۰، ۲۱ و ۲۹). محلول حاوی بالاترین میزان OD جهت تعیین میزان اسید سیتریک تولید شده با استفاده از دستگاه HPLC مشخص شد.

جدول ۱- آزمایشات ۱۶ گانه طبق روش طراحی آماری تاگوچی به منظورتولید اسید سیتریک (با توجه به pH)

ردیف	نوع سوبسترا	PH	زمان تیمار (دقیقه)	دمای تیمار (سانتی گراد)
۱	کاه گندم	۴	۳۰	۴۵
۲	کاه گندم	۵	۶۰	۶۰
۳	کاه گندم	۶	۹۰	۷۵
۴	کاه گندم	۷	۱۲۰	۹۰
۵	کاه برنج	۴	۹۰	۶۰
۶	کاه برنج	۵	۱۲۰	۴۵
۷	کاه برنج	۶	۳۰	۹۰
۸	کاه برنج	۷	۶۰	۷۵
۹	سبوس برنج	۴	۱۲۰	۷۵
۱۰	سبوس برنج	۵	۹۰	۹۰
۱۱	سبوس برنج	۶	۶۰	۴۵
۱۲	سبوس برنج	۷	۳۰	۶۰
۱۳	پوست بادام	۴	۶۰	۹۰
۱۴	پوست بادام	۵	۳۰	۷۵
۱۵	پوست بادام	۶	۱۲۰	۶۰
۱۶	پوست بادام	۷	۹۰	۴۵

اندازه گیری میزان اسید سیتریک به وسیله روش طیف سنجی نوری: نمونه ها جهت تعیین میزان OD به آزمایشگاه پارک علم وفناوری استان گیلان برده شدند. نوع دستگاه مورد استفاده ازنوع اسپکتروفوتومتری مرئی و ماوراء بنفش (UV/Vis)، WPA S 2000 ساخت کشورانگلستان بود. در این روش با استفاده ازمیزان جذب نور، غلظت مشخص می‌شود. خروجی اسپکتروفتومتر همیشه نموداری از شدت نور نسبت به طول موج است. جهت تعیین میزان OD محلولهای فیلتر شده، به ۱ میلی لیتر از عصاره تهیه شده،۱/۳ میلی لیتر پیریدین اضافه شد. چند ثانیه محلول مورد نظر جهت انجام واکنش تکان داده شد. در ادامه ۵/۷ میلی لیتر اسید استیک به ترکیب اضافه شد. ترکیب به دست آمده به مدت نیم ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد در حمام آب گرم قرار داده شد. سپس جذب نوری هر یک از محلولها در طول موج ۴۰۵ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. لازم به ذکر است که برای صفر کردن دستگاه و تهیه بلانک از آب مقطر استفاده شد (۲۰، ۲۱ و ۲۹).

تهیه محلولهای استاندارد اسید سیتریک: در روش اسپکتروفتومتری برای تعیین میزان اسید سیتریک از محلولهای استاندارد(ppm ۱۰۰،۳۰۰،۵۰۰،۱۰۰۰،۳۰۰۰) استفاده شد. جذب نوری هر یک از محلولهای استاندارد در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. نتایج اسپکتروفتومتری محلولهای استاندارد منجر به ایجاد منحنی استاندارد براساس میزان جذب بر غلظت شد. با توجه به خط ایجاد شده از طریق معادله y=ax+b و بر اساس نتایج

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

OD نمونه های استاندارد، غلظت اسید سیتریک تولید شده درهریک از محلول بسترهای اصلی به صورت تقریبی اندازه گیری شد. بهترین نتیجه جهت تعیین میزان اسید سیتریک با استفاده از دستگاه HPLC مشخص گردید.

روش HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا) جهت تعیین مقدار اسید سیتریک تولیدی: نمونه مورد نظرجهت HPLC و اندازه گیری اسید سیتریک تولیدی به آزمایشگاه پارک علم و فناوری استان گیلان برده شد. نوع دستگاه مورد استفاده Variam ساخت کشور امریکا بود. مقدار ۲۰ میلی لیتر از محلول فیلتر شده مورد نظر در طول موج ۲۱۰ نانومتر جهت تعیین میزان اسید تولیدی آنالیز شد. نوع حلال مورد استفاده آب مقطر با pH برابر با ۲ بود. pH حلال با اسید فسفریک تنظیم شد(۲۸). طراحی آزمایش و آنالیز آماری نتایج بر اساس نرم افزار minitab 16 و روش طراحی آزمایش تاگوچی انجام شد. همچنین جدول آنالیز واریانس حاصل از تحلیل نرم افزار در مقاله به پیوست می‌باشد.

نتایج

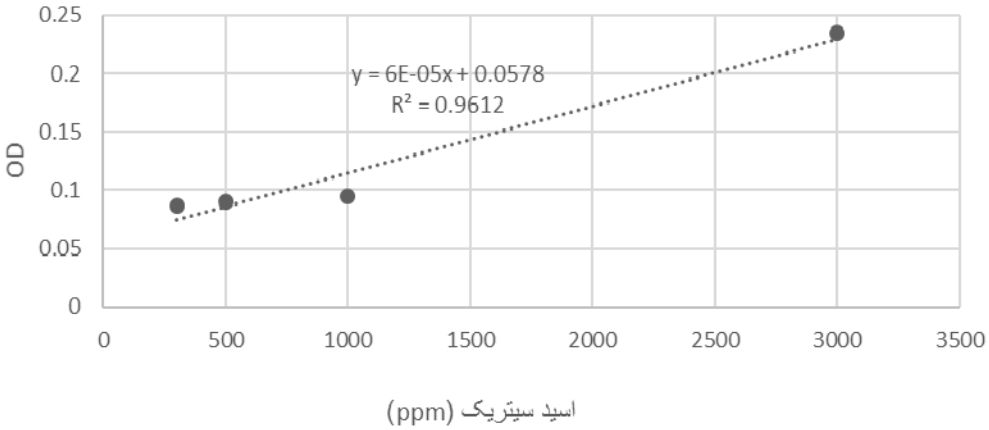
میکروارگانیسم مورد استفاده: بدین منظور از کپسولهای لیوفیلیزه قارچ *آسپرژیلوس نایجر* PTCC5010 تهیه شده از بانک میکروبی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران استفاده شد (شکل ۱).

شکل ۱- تصویر رشد *آسپرژیلوس نایجر* در محیط کشت جامد

محیط کشت اصلی یا تخمیر: نتایج حاصل از رشد *آشپرژیلوس نایجر* بر روی سوبستراهای مورد استفاده جهت تولید اسید سیتریک در شکل۲ به نمایش گذاشته شده است.

شکل۲- تصویر محیط کشت تخمیر

ترسیم منحنی استاندار اسید سیتریک: شکل ۳ نتایج اسپکتروفتومتری محلولهای استاندار اسید سیتریک را در قالب منحنی استاندارد اسید سیتریک نشان می‌دهد.



شکل۳- منحنی استاندارد اسید سیتریک

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

نتایج مربوط به بهینه سازی تولید اسید سیتریک به روش طراحی آزمایش تاگوچی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری: پس از انجام آزمایشات، نتایج در بسترهای ۱۶ گانه آزمایشی در جدول۲ نشان داده شده است. همان گونه که در جدول مذکور مشاهده می‌گردد به استناد روش اسپکتروفتومتری و روش HPLC بستر شماره ۲ در pH برابر۵ و دمای تیمار۶۰ درجه سانتی گراد و زمان تیمار۶۰ دقیقه و با وجود استفاده از کاه گندم به عنوان سوبسترا، بهترین بستر جهت تولید اسید سیتریک با مقدارتولید ۷۶۳ppm می‌باشد.

جدول۲- نتایج روش تاگوچی برای مقدار اسید سیتریک تولیدی از *آسپرژیلوس نایجر*

ردیف	سوبسترا	pH	دمای تیمار (c°)	زمان تیمار (min)	مقدار تولید اسید سیتریک (ppm)
۱	کاه گندم	۴	۴۵	۳۰	۷۲۳
۲	کاه گندم	۵	۶۰	۶۰	۷۶۳
۳	کاه گندم	۶	۷۵	۹۰	۵۱۳
۴	کاه گندم	۷	۹۰	۱۲۰	۵۷۸
۵	کاه برنج	۴	۶۰	۹۰	۷۱۳
۶	کاه برنج	۵	۴۵	۱۲۰	۴۷۳
۷	کاه برنج	۶	۹۰	۳۰	۵۶۳
۸	کاه برنج	۷	۷۵	۶۰	۶۱۲
۹	سبوس برنج	۴	۷۵	۱۲۰	۵۳۸
۱۰	سبوس برنج	۵	۹۰	۹۰	۶۲۲
۱۱	سبوس برنج	۶	۴۵	۶۰	۵۰۳
۱۲	سبوس برنج	۷	۶۰	۳۰	۵۵۳
۱۳	پوست بادام	۴	۹۰	۶۰	۵۰۸
۱۴	پوست بادام	۵	۷۵	۳۰	۵۴۸
۱۵	پوست بادام	۶	۶۰	۱۲۰	۵۴۸,۷
۱۶	پوست بادام	۷	۴۵	۹۰	۵۴۸

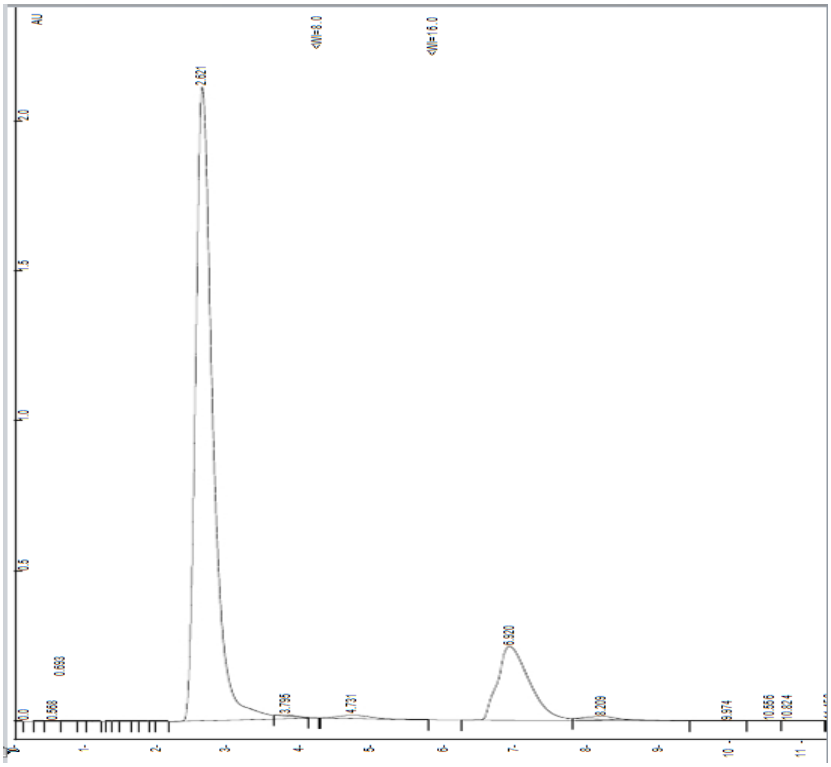
همانطور که اشاره شد بستر شماره ۲ کاه گندم طبق نتایج اسپکتروفتومتری با تولید۷۶۳ppm اسید سیتریک بهترین بستر جهت تولید اسید سیتریک می‌باشد.

نتایج آزمایش HPLC : نتایج حاصل از آنالیز HPLC بر روی بستر شماره ۲ در شکل ۴ نشان داده شده است.

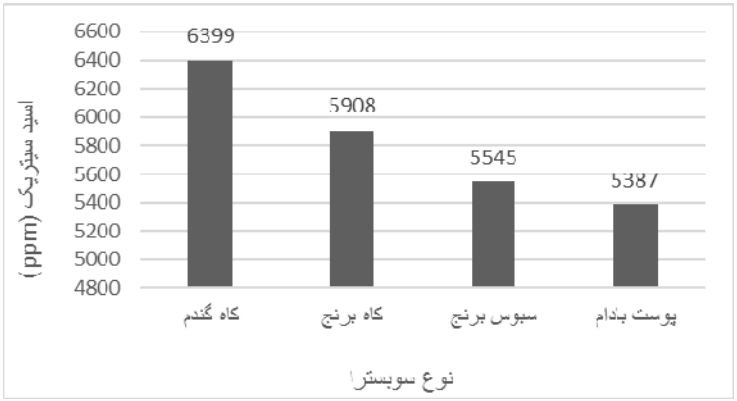
همانطور که مشاهده می‌شود بستر شماره۲ کاه گندم به میزان ppm ۷۶۳ تولید اسیدسیتریک داشته است.

بررسی شرایط بهینه تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر:* شکل۵ اثرنوع سوبسترا بر میزان اسید سیتریک تولید شده توسط *آسپرژیلوس نایجر* را نشان می دهد.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8



شکل۴- آنالیز HPLC مربوط به نمونه شماره ۲ کاه گندم

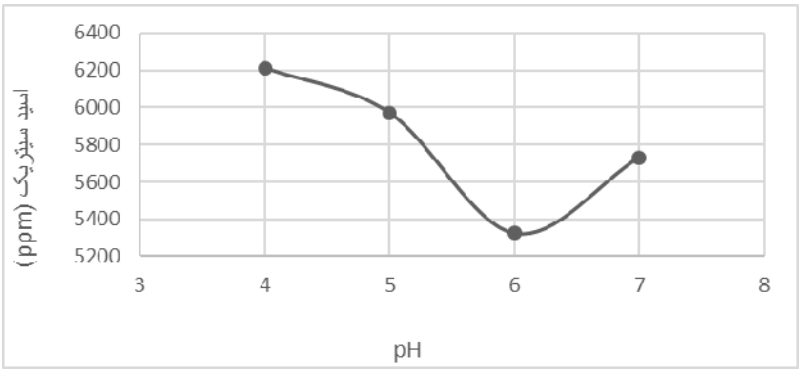


شکل۵- نمودار اثر نوع سوبسترا بر میزان تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر*

همان گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود میزان تولید اسید سیتریک در حضور سوبسترای کاه گندم برابر با ppm ۶۳۹۹ ، در حضور سوبسترای کاه برنج برابر با ppm ۵۹۰۸ ، در حضور سوبسترای سبوس برنج برابر با ppm ۵۵۴۵ و درحضور سوبسترای پوست بادام زمینی برابر با ۵۳۸۷ppm می‌باشد. بنابراین مقدار تولید اسید سیتریک در حضور سوبسترای کاه گندم نسبت به سوبستراهای کاه برنج، سبوس برنج و پوست بادام زمینی بیشتر است.

اثر pH : شکل۶ اثر pH بر میزان تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر* را نشان می‌دهد.

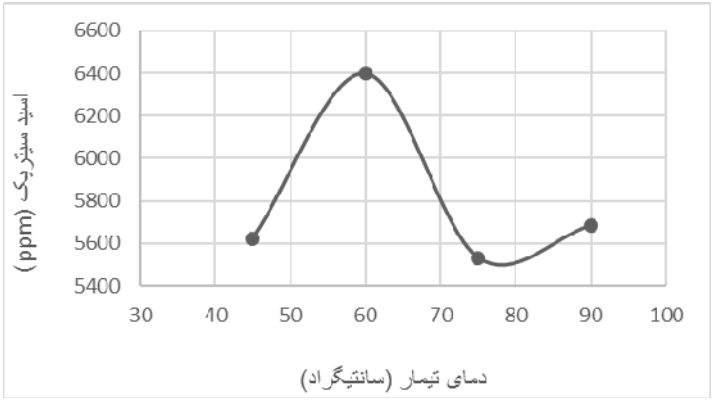
DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8



شکل ۶- نمودار اثر pH بر میزان تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر*

همان گونه که در تصویر مشاهده می‌شود بالاترین میزان تولید اسیدسیتریک در pH برابر با ۴ می‌باشد. باافزایش یک واحدی pH تا مقدار برابر ۵ میزان تولید اسیدسیتریک با شیب کمی کاهش می‌یابد. با افزایش مجدد یک واحدی این پارامتر میزان تولید اسیدسیتریک با شیب بیشتری کاهش می‌یابد، به گونه‌ای که در pH برابر با ۶ کمترین میزان تولید اسید سیتریک مشاهده می شود. با افزایش pH تا مقدار برابر ۷، میزان تولید اسید سیتریک افزایش می‌یابد.

اثر دمای تیمار در تولید اسید سیتریک: نتایج بررسی اثر دمای تیمار در تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر* در شکل۷ نشان داده شده است .

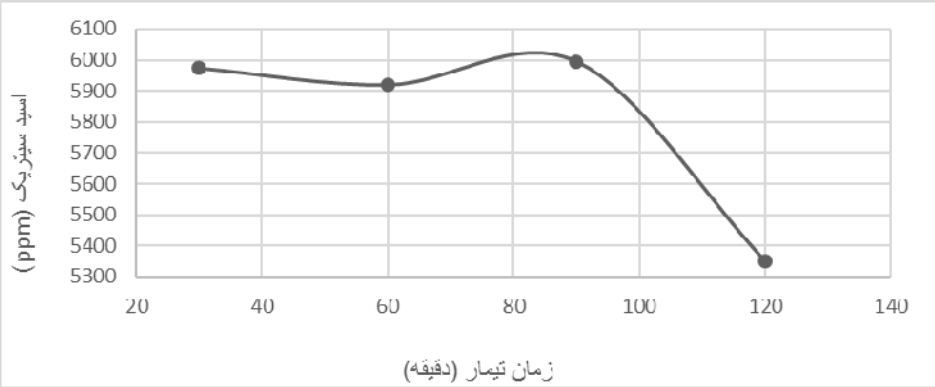


شکل۷- نمودار اثر دمای تیمار بر تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر*

یافته های به دست آمده از این پژوهش نشان داد که تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر* در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد بیشترین بازدهی را دارد.

اثر زمان تیمار در تولید اسید سیتریک: نتایج بررسی اثر مدت زمان تیمار اعمال شده بر روی سوبسترا ها در تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر* در شکل ۸ نشان داده شده است.

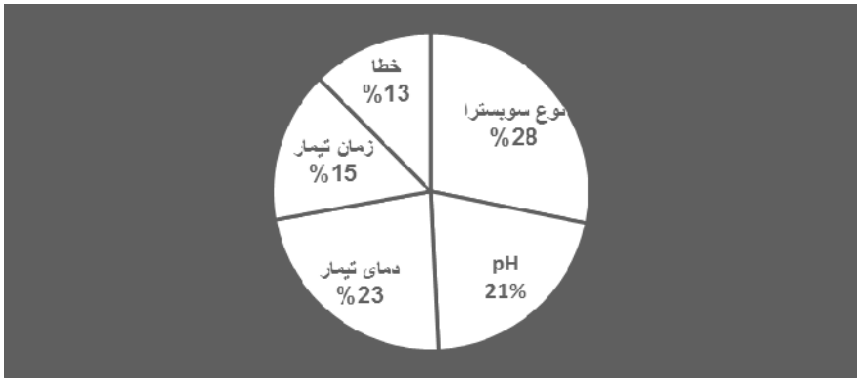
DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8



شکل ۸- نمودار اثر زمان تیمار بر میزان تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر*

نتایج به دست آمده از بررسی اثر زمان تیمار بر میزان تولید اسید سیتریک نشان می‌دهد که بالاترین میزان تولید اسید مذکور در زمان ۹۰ دقیقه به دست آمده است.

سهم هر یک از فاکتورهای مورد بررسی در تولید اسید سیتریک: در شکل شماره۹ سهم هر یک از فاکتورهای مورد بررسی در تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر* نشان داده شده است.



شکل۹- سهم هریک از فاکتورهای مورد بررسی در تولید اسید سیتریک

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که نوع سوبسترای مورد استفاده ۲۸درصد، pH ۲۱ درصد، دمای تیمار۲۳ درصد و زمان تیمار ۱۵درصد را در تولید اسید سیتریک به خود اختصاص داده اند. درصد خطا در تولید اسید سیتریک۸درصد می‌باشد.

جدول آنالیز واریانس: نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس در جدول ۳ نشان داده شده است.

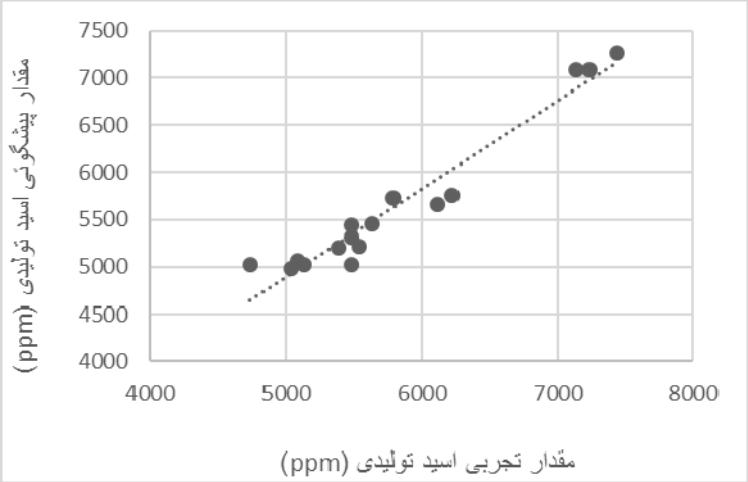
تحلیل داده های به دست آمده از پژوهش با استفاده از نرم افزار Minitab 16 انجام شد. که ۴ فاکتور در ۴ سطح مورد بررسی قرار گرفتند. تحلیل این داه ها نشان داد که هر ۴ فاکتور مورد بررسی در سطح آماری ۰/۰۵> P معنادار می-باشند. بدین ترتیب که فاکتورهای نوع سوبسترا، pH، دمای تیمار و زمان تیمار که مقدار P آنها به ترتیب ۰/۰۲۷۴، ۰/۰۳۲۸، ۰/۰۳۱۳، ۰/۰۳۸۲ می باشد، اثر معنا داری در تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر* داشته‌اند.

جدول۳- تحلیل واریانس داده های نتایج آزمایشات

Source	P
سوبسترا	۰/۰۲۷۴
pH	۰/۰۳۲۸
دمای تیمار(c)	۰/۰۳۱۳
زمان تیمار(min)	۰/۰۳۸۲

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

تطابق بین داده های تجربی و پیشگویی نرم افزار: در شکل ۱۰ تطابق بین داده های تجربی و پیشگویی نرم افزار نشان داده شده است.



شکل ۱۰- تطابق داده های تجربی و پیشگویی نرم افزار

همان‌گونه که در شکل ۱۰ ملاحظه می‌شود میزان همبستگی وتطابق داده های تجربی و پیشگویی نرم افزار مقدار ۹۴ درصد می باشد، وبه عبارتی میزان صحت داده های به دست آمده ۹۴ درصد می‌باشد.

بحث و نتیجه گیری

بررسی پارامترهای مؤثر بر بهینه سازی شرایط تولید اسید سیتریک: اسید سیتریک دارای پتانسیل اقتصادی بالایی می-باشد و کاربردهای بسیار زیادی در بخش صنعت دارد؛ بنابراین همواره نیاز به بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر در تولید اسید سیتریک وجود دارد. به طوری که امکان تولید اسید سیتریک بدون توجه به پارامترهای مؤثر در بهینه سازی تولید وجود ندارد. در نهایت مجموعه عوامل مؤثر در تولید اسید سیتریک شرایطی را به وجود می‌آورند که میکروارگانیسم را به سمت تولید حداکثری اسید سیتریک پیش می‌برد. در حالی که هر یک از عوامل به تنهایی نمی-توانند در به حداکثر رساندن تولید اسید سیتریک نقش داشته باشند. استفاده از قابلیت میکروارگانیسم‌ها در تبدیل مواد کم ارزش به مواد با ارزش افزوده از اهداف مهم فرآیندهای زیستی می‌باشد(۱). امروزه میکروارگانیسم‌ها به عنوان زیست واکنشگر قادر به ایجاد ترکیبات شیمیایی از سوبستراهای به کار گرفته شده می‌باشند(۱). در زمان تخمیر پیشنهاد یک مدل کلی برای رشد میکروارگانیسم ها در بستر جامد کار چندان ساده ای نیست، چرا که رشد در بستر جامد بیشتر شبیه رشد محیط طبیعی است و مواد مغذی موجود در سوبسترا به طور ایده آل نمی باشد (۷). در این پژوهش چهار فاکتور مهم در بهینه سازی تولید اسید سیتریک مورد بررسی قرار گرفتند.

اثر نوع سوبسترا: یکی از پارامترهای بسیار مهم در میزان تولید اسید سیتریک اثر نوع سوبسترای استفاده شده می-باشد. امروزه ضایعات فراوان صنایع کشاورزی و فرآوری میوه به عنوان منابع غنی برای تولید ترکیبات مختلف توسط میکروارگانیسم‌ها به کار برده می‌شود (۳۰). تاکنون تحقیقات زیادی در داخل وخارج از کشور در زمینه کاربرد انواع مختلفی از ضایعات کشاورزی جهت تولید بهینه اسید سیتریک انجام شده است. تحقیقات سوکسول وهمکارانش در سال ۲۰۰۶ به مثالهایی از این سوبستراها از جمله ملاس، چغندر، نشاسته لوبیا، همی سلولز، روغن کلزا، سویا، روغن زیتون و.... اشاره دارد (۳۵). در پژوهشی

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

ذوقی و همکاران در سال ۲۰۱۳ تولید اسید سیتریک از کاه گندم و باگاس خام نیشکر را با استفاده از *آسپرژیلوس نایجر* مورد بررسی قرار دادند، که بیشترین تولید اسیدسیتریک ۴۷ و ۹۴/۵ گرم به ازای کیلوگرم کاه گندم و باگاس نیشکر خشک به دست آمد (۳۶). نتایج حاصل از مقالات نشان دهنده مناسب بودن سوبسترای کاه گندم جهت تولید اسید سیتریک می‌باشد. در مورد سایر سوبستراهای مورد استفاده در این پژوهش تاکنون کارهای تحقیقاتی زیادی انجام نشده است. در این پژوهش از چهار سوبسترای کاه گندم، کاه برنج، سبوس برنج و پوست سخت بادام زمینی استفاده شده است که بیشترین میزان تولید اسید سیتریک از سوبسترای کاه گندم به مقدار ۷۶۳ppm می‌باشد، که در مقایسه با اسید سیتریک تولید شده توسط ذوقی و همکارانش مقدار قابل توجهی می-باشد. البته باید توجه داشت که این اختلاف می‌تواند ناشی از اثر عوامل گوناگون از جمله تفاوت در نوع تیمار باشد. پس از کاه گندم، کاه برنج، سبوس برنج و پوست سخت بادام زمینی به ترتیب جایگاههای بعدی را در تولید اسید سیتریک به خود اختصاص می‌دهند. اختلاف در میزان تولید می‌تواند ناشی از عوامل مختلفی از جمله تفاوت در ترکیب شیمیایی و میزان لیگنین و پلیمرهای پیچیده موجود در ساختار سوبستراها، تفاوت میزان تأثیرگزاری تیمار بر روی سوبستراهای مختلف، متفاوت بودن توانایی رشد *آسپرژیلوس نایجر* بر روی هر یک از سوبستراها و غیره باشد. تولید اسید سیتریک از دیدگاه بیوشیمیایی امری پیچیده است که ناشی از تأثیر عوامل مختلف تغذیه‌ای در محیط می‌باشد. تخمیر یک سوبسترا به طور مستقیم با کیفیت و کمیت منبع ارتباط دارد و ماهیت بستر که خود به منبع کربن بستگی دارد، تأثیر مشخصی بر فعالیت متابولیک سویه های میکروبی دارد (۳۴). بنابراین سوبسترای مورد استفاده می‌بایست نیازهای تغذیه ای میکروارگانیسم را جهت رشد فراهم کند. با توجه به کاربرد گسترده اسید سیتریک و در راستای استفاده از سوبستراهای بدون آلودگی محیط زیستی و ارزان قیمت با هدف کاهش هزینه تولید اسید سیتریک، استفاده از ضایعات کشاورزی از جمله کاه گندم بسیار مناسب می‌باشد (۱۶). از طرفی سالیانه بیش از ۱۵-۱۳ در صد گندم تولید شده در بخش کشاورزی درصنعت تبدیل به کاه گندم می‌شود؛ ازطرفی کاه گندم تیمار نشده قابلیت استفاده برای دام را ندارد و به دلیل حجم زیاد، نیاز به فضای زیادی جهت نگهداری دارد، در نتیجه استفاده از این سوبسترا با توجه به مقدار تولید اسید سیتریک از آن بسیار مقرون به صرفه و ضروری می‌باشد. امروزه حجم زیادی از کاه گندم در کشور سوزانده می‌شود که این امر خود موجب آلودگی محیط زیست نیز می‌شود. دیواره سلولزی کاه گندم شامل پلی ساکاریدهای سلولزی و همی سلولزی، پکتین و لیگنین می باشد(۳). سبوس برنج و کاه برنج یک محصول از فرآورده‌های جانبی آسیاب برنج و کارخانجات شالیکوبی می‌باشند که سالیانه ۱۰۰ تن از این محصول در جهان تولید می شود که ۹۶درصدآن سهم کشورهای در حال توسعه می‌باشد. سبوس برنج از نظر تغذیه ای به علت ترکیبات لیپیدی آن مورد توجه می‌باشد و غنی از ویتامینهای مختلف است (۱۵). پوست بادام حدود ۱۵-۱/۳درصد از ضایعات فرآورده بادام را تشکیل می‌دهد. پوست بادام از لحاظ میزان سدیم و قند فقیر است ولی از لحاظ فیبر غذایی و کلسیم غنی می باشد(۶).

اثرpH : یکی از پارامترهای بسیار مهم در تولید اسید سیتریک pH می‌باشد. pH یکی از فاکتورهای بسیار مهم در کشت حالت جامد می باشد. در واقع تنظیم pH یکی از راههای کنترل فرآیند تخمیر در جهت تولید حداکثری محصول مورد نظر می‌باشد (۱۲). آمن هاو وان و همکاران در سال ۲۰۱۳ به بررسی بهینه سازی و تولید اسید سیتریک از نشاسته ذرت با استفاده از *قارچ آسپرژیلوس نایجر* پرداختند (۳۷). در این پژوهش اثر pH محلول بر روی غلظت اسید سیتریک با استفاده از روش تجزیه و تحلیل پاسخ سطحی مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج این پژوهش میزان بالای اسید سیتریک در pH ۵-۸ ثبت شده

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

است که اثر همزمان سه متغیر pH، غلظت سوبسترا و دمای تخمیر منجر به مشاهده بیشترین مقدار اسید سیتریک می باشد. آنها در یافتند میزان pH محلول از دو جهت مهم است در مرحله اول جهت جوانه زنی اسپور و در مرحله دوم زمانی که پروتونها آزاد می‌شوند و مواد مغذی حاوی نیتروژن توسط اسپورهای جوانه زنی در طول تخمیر جذب می‌شوند که این عمل باعث کاهش pH می‌شود. از این رو کاهش pH نشان دهنده پیشرفت تخمیر و تولید اسید سیتریک می‌باشد. پازوکی و همکارانش تولید اسید سیتریک با استفاده از نیشکر را در سال ۲۰۰۰ توسط *آسپرژیلوس نایجر* مورد مطالعه قرار دادند؛ ودریافتند که ماهیت بستر مورد استفاده و تکنیکهای تولید بر میزان pH تأثیر می‌گذارند (۳۸). نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان دهنده تولید حداکثری اسید سیتریک درpH برابر با ۴ می-باشد. با توجه به اهمیت pH اولیه در راندمان تولید اسید سیتریک در این پژوهش pH در چهار سطح (۴،۵،۶،۷) در محیط کشت تخمیری سوبستراهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج این پژوهش بالاترین میزان تولید اسید سیتریک در pH برابر با ۴ از سوبسترای کاه گندم تولید شد، با افزایش این مقدار تا pH برابر با ۶ میزان تولید اسید سیتریک نیزکاهش می‌یابد. از pH ۶ تولید اسید سیتریک به صورت نسبی افزایش می‌یابد. بنابراین طبق نتایج به دست آمده از محدوده اپتیمم pH به دست آمده (۴-۵)، pH اولیه ۴، بهترین pH برای تولید اسید سیتریک از *آسپرژیلوس نایجر* PTCC5010 می‌باشد؛ این در حالی است که بهترین بستر تولید کننده اسید سیتریک با بررسی اثر متقابل ۴ متغیر مورد بررسی ، بستر شماره ۲ کاه گندم با pH اولیه ۵ می‌باشد. گستره pH مناسب برای رشد *آسپرژیلوس نایجر* در بازه ۵-۴ می‌باشد. در تولید اسید سیتریک شرایط محیط کشت نمی‌بایست به گونه ای باشد که اجازه رشد سلولی نامحدود را به *آسپرژیلوس نایجر* بدهد، زیرا در این شرایط قند محیط صرفاً در جهت افزایش مقدار توده سلولی، مصرف شده و اسید سیتریک تولید نخواهد شد (۲۲). رابطه pH با رشد قارچها یک رابطه پیچیده است که علت آن حساسیت بعضی و بالعکس مقاومت تعدادی از آنها نسبت به این نوع فاکتور می باشد(۲۲). نتایج پژوهش حاضر با نتایج کار بسیاری از پژوهشگران از جمله پازوکی (۲۰۰۰)(۳۸)، لودهی (2001)(۳۹)، بانیک(1975) (۴۰)، مطابقت دارد که در تمامی این پژوهشها حداکثر تولید اسید سیتریک در pH برابر با ۴ می‌باشد. آزمایشات نشان می‌دهد، که قارچها در محیط اسیدی نسبت به محیط قلیایی رشد بهتری دارند. همچنین pH محیط بر روی نفوذ پذیری غشاء، سلول وآنزیمها تأثیر می‌گذارد؛ در pH اسیدی غشای سلول از یونهای H^+ اشباع واز نفوذ کاتیونها جلوگیری می‌کند (۸).

pHمحیط کشت به دلیل فعالیتهای میکروبی و عمدتاً ترشح اسیدهای ارگانیک به صورت ناخواسته تغییر می‌کند. ترشح اسیدهای ارگانیک مانند اسید سیتریک باعث کاهش pH می‌شود(۸). کاهش مقدار تولید اسید سیتریک در pH های بالا (محدوده ۶-۴,۵) در این پژوهش ممکن است به علت تجمع اسیدهایی باشد که در کنار اسیدسیتریک به طور ناخواسته تولید می‌شوند. از طرفی بعد از تولید اسید سیتریک در pH های پایین به تدریج به دلیل اکسید شدن اسید سیتریک توسط میکروارگانیسم pH بالا می‌رود (۹). فرآیند تولید اسید سیتریک در *آسپرژیلوس نایجر* وابسته به فعالیت آنزیمها می‌باشد و آنزیمها به عنوان نیرو محرکه عمل می‌کنند، از طرفی رشد *آسپرژیلوس نایجر* در pH پایین، تولید اگزالیک اسید و گلوکونیک اسید را محدود می‌کند که این امر خود با افزایش تولیداسید سیتریک همراه می‌باشد (۲۶). pH به عنوان یک عامل تأثیر گذار باعث کاهش تجمع پروتون در محلول تخمیر می‌شود (۱۴). فعالیت آنزیم گلوتامین سنتاز با اثرات pH مرتبط است (۲۶). pH ابتدایی یک محیط براساس نوع میکرو ارگانیسم، نوع بستر و تکنیکهای تولید تعیین می‌شود و نوع سوبسترا و تکنیکهای تولید بر روی سنتیک pH مؤثر هستند، که

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

همین عوامل خود می توانند از علل عدم تطابق نتیجه پژوهشهای مختلف با یکدیگر باشد.

اثر تیمار سوبسترا: مواد لیگنوسلولزی در برابر حمله آنزیمی میکروارگانیسم‌ها از خود مقاومت نشان می‌دهند که این مقاومت به عوامل زیر بستگی دارد:۱- ساختمان کریستالی سلولز: در ترکیبات سلولزی، سلولز به صورت آمورف یا بدون شکل نسبت به قسمت کریستالی توسط حمله آنزیمی راحت‌تر هضم می‌شود. لذا با افزایش نسبت به قسمت بدون شکل سرعت هیدرو لیز بیشتر می‌شود.۲- محدود بودن مکانهای قابل دسترسی برای حمله آنزیمی: که علت این امر این است که اندازه میانگین رشته‌های موبینه در ترکیبات لیگنو سلولزی آنقدر کوچک است که اجازه وارد شدن مولکولهای آنزیمی بزرگ را به درون ساختمان نمی‌دهند؛ لذا حمله میکروبی به سطح خارجی محدود می‌شود.۳- لیگنین که سلولز را احاطه کرده است و یک منبع فیزیکی است. مهمترین عامل هضم آنزیمی سلولز، لیگنین می‌باشد. حضور یک مانع فیزیکی حمله آنزیمی را مشکل می‌کند که با انجام یک پیش تیمار مناسب می‌توان در دسترس بودن سلولز و در نتیجه سرعت هیدرولیز را افزایش داد (۳۱). ذوقی و همکاران در سال ۱۳۹۲ میزان تولید اسید سیتریک از کاه گندم تیمار شده را با استفاده از *آسپرژیلوس نایجر* مورد بررسی قرار دادند (۳۶). آنها با اعمال ۹۰ دقیقه بخار تحت فشار بر روی سوبسترا بیشترین راندمان اسید سیتریک را به دست آوردند. قرار گرفتن سوبسترا در معرض بخار می‌تواند به عنوان یک پیش تیمار فیزیکی عمل کند، به همین دلیل موجب افزایش تولید اسید می‌شود. در پژوهشی دیگر ابیشک و همکارانش میزان تأثیر تیمار اسیدی و سپس تیمار حرارتی وتیمار با اوره را برباگاس نیشکر در سال ۲۰۱۵ مورد مطالعه قرار دادند (۴۱). نتایج این پژوهش نشان دهنده اثر مثبت این تیمار در افزایش میزان تولید اسید سیتریک می‌باشد. در این پژوهش نقش دو پارامتر مهم در تیمار سوبستراها شامل دمای تیمار و زمان تیمار بر روی سوبستراهای مختلف مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت که تا کنون تحقیقات چندانی به صورت گسترده بر روی آنها انجام نشده است. دمای تیمار در ۴ سطح (۴۵،۶۰،۷۵،۹۰ سانتی گراد) مورد بررسی قرار گرفت که حداکثر تولید اسید سیتریک تولیدی در دمای ۶۰درجه سانتی گراد به دست آمد. مدت زمان اعمال تیمار بر روی سوبسترا نیز در ۴ سطح (۳۰،۶۰،۹۰،۱۲۰دقیقه) مورد بررسی قرار گرفت، که حداکثر تولید اسید سیتریک در مدت زمان ۹۰ دقیقه به دست آمد که در واقع نتیجه اثر تک فاکتور می‌باشد؛ درحالی که با در نظر گرفتن مجموع پارامترهای مهم در تولید اسید سیتریک حداکثر تولید در مدت زمان تیمار ۶۰ دقیقه به دست آمد. در این پژوهش به طور کلی ازسه روش تیمار فیزیکی خرد کردن، تیمار حرارتی به وسیله بخار آب و تیمار اسیدی با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ (H_2SO_4) استفاده شد. خرد کردن سوبسترا به قطعات ریز مقادیری از لیگنین و سیلیس محتوی آنرا می‌شکند. از اثرات مهم خیس کردن کاه، خروج مقادیر متنابهی از اگزالات موجود در آن است (۲۷). تیمار با بخار آب اگر چه در گروه تیمارهای فیزیکی طبقه بندی شده است، اما در حقیقت استفاده از بخار آب یک فرآیند ترموشیمیایی هیدرولیز اسیدی طبیعی می‌باشد؛ بخار آب تحت فشار در افزایش میزان کربوهیدرات قابل استفاده موجود در علوفه فیبری و محصولات فرعی آن مؤثر است (۲۱). در درجه حرارت بالا و شرایط اسیدی ایجاد شده اتصالات گروههای استیل و فرمیل همی سلولز وپکتین شکسته می‌شوند، علاوه بر این آزاد شدن اسیدهای آلی داخلی نیز با عمل کاتالیزوری خود، هیدرولیز فیبر را بالا برده وقابلیت هضم ماده غذایی را افزایش می‌دهند (۱۹). پیش تیمارهای شیمیایی به طور گسترده‌ای برای حذف لیگنین و املاح ساختمانی ترکیبات لیگنو سلولزی استفاده می‌شود (۱۹). به طور کلی نتایج حاصل از پژوهشهای مختلف و همچین نتایج حاصل از این پژوهش نشان دهنده

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

تأثیر معنی دار تیمار بر روی میزان تولید اسید سیتریک می-باشد.

نتیجه گیری

اسید سیتریک به دلیل کاربرد گسترده در صنایع گوناگون با افزایش تقاضا در جهان مواجه است؛ و انتظار می‌رود با افزایش تقاضا میزان تولید جهانی بیشتر شود. در حال حاضر *آسپرژیلوس نایجر* مناسب ترین میکروارگانیسم برای تولید اسید سیتریک محسوب می‌شود. در نتیجه می-توان نتیجه گرفت که *آسپرژیلوس نایجر* PTCC5010 را می‌توان به عنوان یک سویه مناسب جهت تولیداسید سیتریک انتخاب نمود. طراحی تاگوچی مکرراً برای متغیرهای مؤثر در یک فرآیند به کار گرفته می‌شود. مفید بودن این طراحی به منظور معین کردن تأثیر هر متغیر به طور مستقل روی سیستم می‌باشد. حسن استفاده از روش طراحی تاگوچی دقت بالای طراحی و کم شدن تعداد آزمایشات لازم جهت بهینه‌سازی و پایین آمدن هزینه و صرفه‌جویی در زمان می باشد، علاوه بر این نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که *آسپرژیلوس نایجر* توانایی تولید اسید سیتریک در سوبسترهای کاه گندم، کاه برنج، سبوس برنج وپوست بادام زمینی را دارد و با توجه به اینکه همه این سوبستراها به عنوان ضایعات کشاورزی و دور ریز صنایع در کشور محسوب می شوند، می توان نتیجه گرفت که تولید اسید سیتریک از این سوبستراها با توجه به بهینه سازی تولید علاوه بر تولید ارزان قیمت اسید سیتریک، پاک سازی محیط زیست را نیز در بر دارند. از طرفی پس از استخراج اسید سیتریک از کشت تخمیر شده و از بین بردن میکروارگانیسم ها، می توان از مواد باقیمانده به عنوان خوراک دام استفاده نمود. در این پژوهش اثر نوع سوبستراها، pH، دمای تیمار سوبسترا و زمان تیمارسوبسترا بر تولید اسید سیتریک مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل از این تحقیق به صورت زیر می باشد:

الف. در بررسی اثر نوع سوبسترا، بیشترین تولید اسید سیتریک با استفاده سوبسترای کاه گندم به دست آمد.

ب. در بررسی اثر pH، بیشترین میزان تولید اسید سیتریک درpH برابر با۴ به دست آمد.

ج . در بررسی اثر دمای تیمارسوبسترا، بیشترین میزان تولید اسید سیتریک در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به دست آمد.

د. در بررسی اثر زمان تیمارسوبسترا، بیشترین میزان تولید اسید سیتریک در زمان ۹۰ دقیقه به دست آمده وبا توجه به اینکه کاه گندم از نظر قیمت، سوبسترای بسیار مناسبی برای تولید اسید سیتریک می باشد، می توان این فرآیند را به عنوان یک روش مؤثر و اقتصادی در تولید اسید سیتریک مد نظر قرار داد.

منابع

۱- آشنگرف م، نحوی ا. (۱۳۹۳). تولید زیستی وانیلین طبیعی از سوبستراهای فنیل پروپانوئیدی به وسیله زیست تبدیلی با استفاده از سلول های میکروبی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۲۷(۳)، ۳۱۶-۳۳۴. doj: ۳۱۲۷

۲- فتحی رضایی پ، کیانی س، تقوی ف، شهابی‌وند ص. (۱۳۹۸). بهینه سازی تولید پکتیناز پریفورموسپورا ایندیکا از ضایعات چغندرقند به روش تاگوچی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۳۲(۱)، ۹۸-۱۱۴.

3-Abdorrahman SH. (2007). Investigating Economic Dimensions of Agricultural Waste Consumption ran. Sixth Iranian Agricultural Economics Conference, Mashhad, Iran Agricultural Economics Association, Ferdowsi University of Mashhad.

4- Angumeenal A, Venkappayya D. (2013). An overview of citric acid production. *Food Tech.*

5-Ajibade A. Rokosu and Christine A. Anenih. *(1979).* Effects of various conditions on the production of citric acid during fermentation of molasses by *Aspergillus niger*. *Department of Biochemistry, University of Benin, P.M.B. 1154, Benin Oty, Nigeria.*

6-Beheshteh A, Mirzaii Dyzgah I, Shargi H. (2017). Evaluation the antioxidant levels in the extracts of seeds, skin and hull of peanut. Ebnesina-

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

IRIAF Health Administration; Vol 19: NO 1, Serial 58.

7-Chen H, He X, Geng H, Liu H. (2014). Physiological characterization of ATP-citrate lyase in *Aspergillus niger*. J Ind Microbiol Biotechnol; 41:1–11.

8-Del Campo G, Berregi I, Caracena R, Santos JI. (2006). Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Anal Chim Acta.; 556: 462– 468.

9-Hang YD, Splittstoesser DF, Woodams EE. (1975). Utilization of brewery spent grain liquor by *A. niger*. Appl Microbiol; 30: 879-880.

10-Hang Y, Luh B, Woodams E. (1987). Microbial production of citric acid by solid state fermentation of kiwifruit peel. J Food Sci; 52:226–227.

11-Haq Ikram-ul A, Sikander Ali A, Qadeer B, Javed Iqbal C. (2004). Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. Bioresource Technology; 93: 125–130.

12-Hesseltine CW. (1972). Solid state fermentation. Biotech Bioengin.; 517-32.

13-Hong Chien-wen. (2012). Using the Taguchi method for effective market segmentation. Expert Systems with Application; Volume 39: Issue 5, pp 5451-5459.

14-Jernejc K, Cimerman A, Perdih A. (1992). Composition of *Aspergillus niger* mycelium during growth on productive and unproductive substrates. J Biotechn.; 25: 341–348.

15-Keshavarz Hedayati A. A, Alammi M, Motamedzadegan A, Maghsudlo U, Darayi GarmabehKhani A. (2011). Investigation of Chemical Physical and Chemical Properties of Iranian Shoots of Rice. Journal of Food Science and Technology, Third issue.

16-Kiel H, Guvrin R, Henis Y. (1981). Citric acid fermentation by *Aspergillus niger* on low sugar concentrations and cotton waste. Applied and Environmental Microbiology; 42:1–4.

17-Kohtaro K, LeE S.P, Iwao N, Seiichiro K, Usami S. (*1988).* Improvement in Citric Acid Production by Haploidization of *Aspergillus niger* Diploid Strains .*Department of Applied Chemistry, School of Science and Engineering, Waseda University. Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan*

18-Kosravani Darani, K. (1392). citric acid production from wheat straw and sugarcane bagasse am using the fungus *Aspergillus niger* in solid state fermentation method, Journal of Nutrition and Food Technology; Pages155.

19-Liu JX, Orskov ER. (2001) Cellulase treatment of untreated and steam pretreated rice straw-effect on in vitro fermentation characteristics. Animal Feed Sci Technol; 88: 189-200.

20-Marier J. R, Boulet M. (1958). Direct determination of citric acid in milk with an improved Pyridine –Acetic Anhydride method. J. Dairy. Sci; 41:1683-1692.

21-Mazinanian N, Odnevall Wallinder I, Hedberg Y. (2015) Comparisonnof the influence of citric acid and acetic acid as simulant for acidic food on the release of alloy constituents from stainless steel.145: 51–63.

22-Milsom P. E, Meers J. L. (1986). Citric acid comprehensive biotechnology, the principles, applications and regulation of biotechnology in industry, agriculture and medicine. In: Moo-Yong, M(ed). Biotechnology. Pergamon Press, Oxford.

23-Papagianni M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. Biotech Avances; 25: 244-263.

24-Paul G, Priede M, Thomas C. (1999). Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations. Biochem Eng J; 3: 121-129.

25-Pazouki M, Panda T. (1998). Recovery of citric acid–a review. Bioprocess Eng; 19:435–439.

26-Ratledge C, Kristiansen B. (2001). Basic biotechnology. Cambridge University Press.

27-Roukas, T., Kotzekidou, P. (1997) Pretreatment of date syrup to increase citric acid production. Enzyme and Microbial Technology; 21: 273-276.

28-Sánchez-Machado D.I, Lopez-Cervantes J, Martinez-Cruz O. (2008). Quantification of Organic Acids in Fermented Shrimp Waste by HPLC. Food Technol. Bioethanol ;46 (4): 456–460.

29-Shojaosadati SA, Babaeipour V. (2002). Citric acid production from apple pomace in multilayer packed bed solid state bioreactor. Process Biochemistry; 37: 909-914.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

30-Somogy M. (1959). Notes on sugar determination. *Journal Biological* chemistry; 195: 19-23.

31-Tian Sh. Q, Zhao R.Y, Chen Z.Ch. (2018). Review of the pretreatment and bioconversion of lignocellolosic biomss from wheat straw materials. Renewable and sustainable energy reviews; volume91: pages 483-489.

32-Vandenberghe L, Soccol R, Pandey A, Lebeault J. (2000). Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. Bioresource Tech.; 74: 175-178.

33-Yar Hosseini M, Zadbary M. R, Alizadeh, M. (1388). Evaluation of citric acid Production from apple pomace using surface culture method. Journal of Food Industry Research; Volume 19: Number 1.

34-Yazdi Samadi B. (2008). Reduction of waste in wheat production and consumption. The 10 th Congress of Agronomy and Plant Breeding, Tehran, Abu Aryhan Campus, Tehran University.

35- Soccol C, Vandenberghe L, Rodrigues C, Pandey A. (2006) New perspectives for citric acid production and application. Food Biotecnol. 44(2): 1141-1149.

36- Zoghi A, Khosravi-Darani K, Sohrabvandi S. (2013) Citric acid production from raw wheat straw and sugarcane bagasse using A. niger ATCC 9142 and solid state fermentatio. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 8: 155-163.

37 - Amenaghawon, N. A., Areguamen, S. O., Agbroko, N.T., Ogbeide, S. E. and Okieimen, C. O.(2013) .Modelling and statistical optimisation of acid production from solid state fermentation of sugar cane bagasse using Aspergillus niger. International Journal of Sciences 2, 562-566.

38- Pazouki M, Felse P, Sinha J and Panda T. (2000) Comparative studies on citric acid production by Aspergillus niger and Candida lipolytica using molasses and glucose. Bioprocess Engineering, 22(4): 353-361.

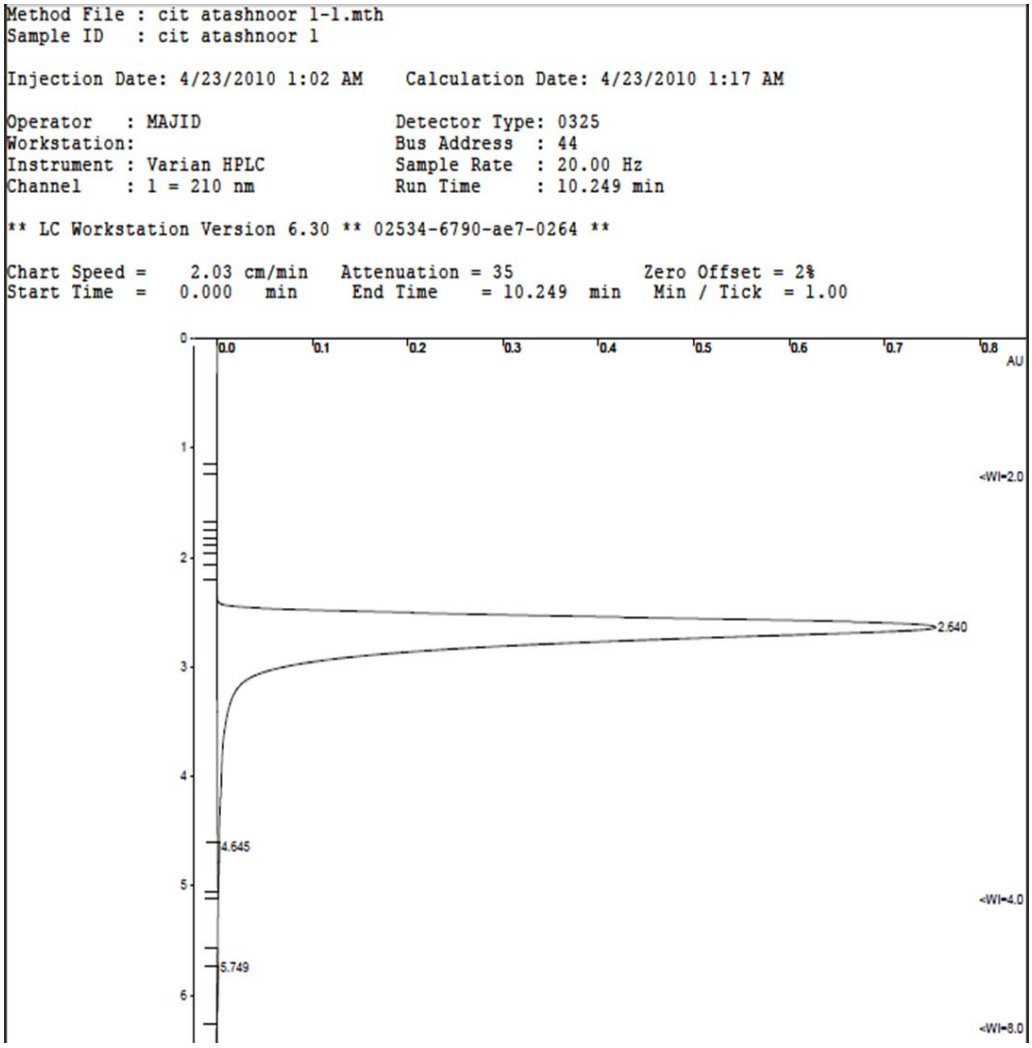
39- Lodhi A.K., M.Ashar, S.Ambreen, M.Asad (2001) Production of Citric Acid from Waste Bread by Aspergillus niger. J. .Biol.Sci., 1: 182-183.

40- Banik, A.K., (1975) Fermentative production of citric acid by Aspergillus niger: Strain selection and optimum cltural conditions for improved citric acid production. J. Food Sci. Technol., 2: 1112-1114.

41- Sharan, Abhishek, Charan, Amit Alexander, Bind, Akhilesh and Tiwari, Shashi Bhusan (2015). Citric acid production from pre-treated sugarcane bagasse by Aspergillus niger under solid state fermentation. Asian J. Bio. Sci., 10 (2) : 162-166.

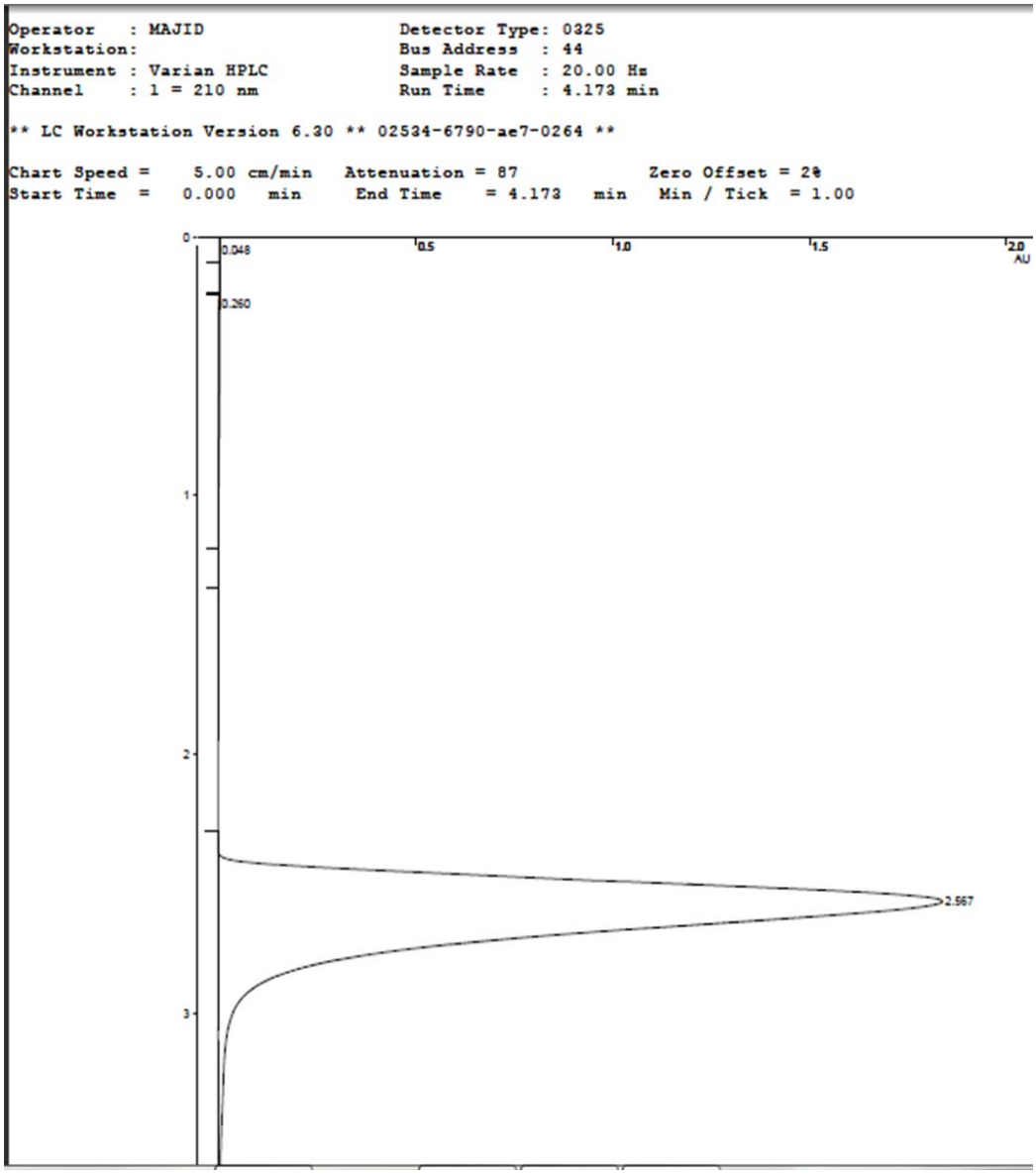
DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

پیوست ها



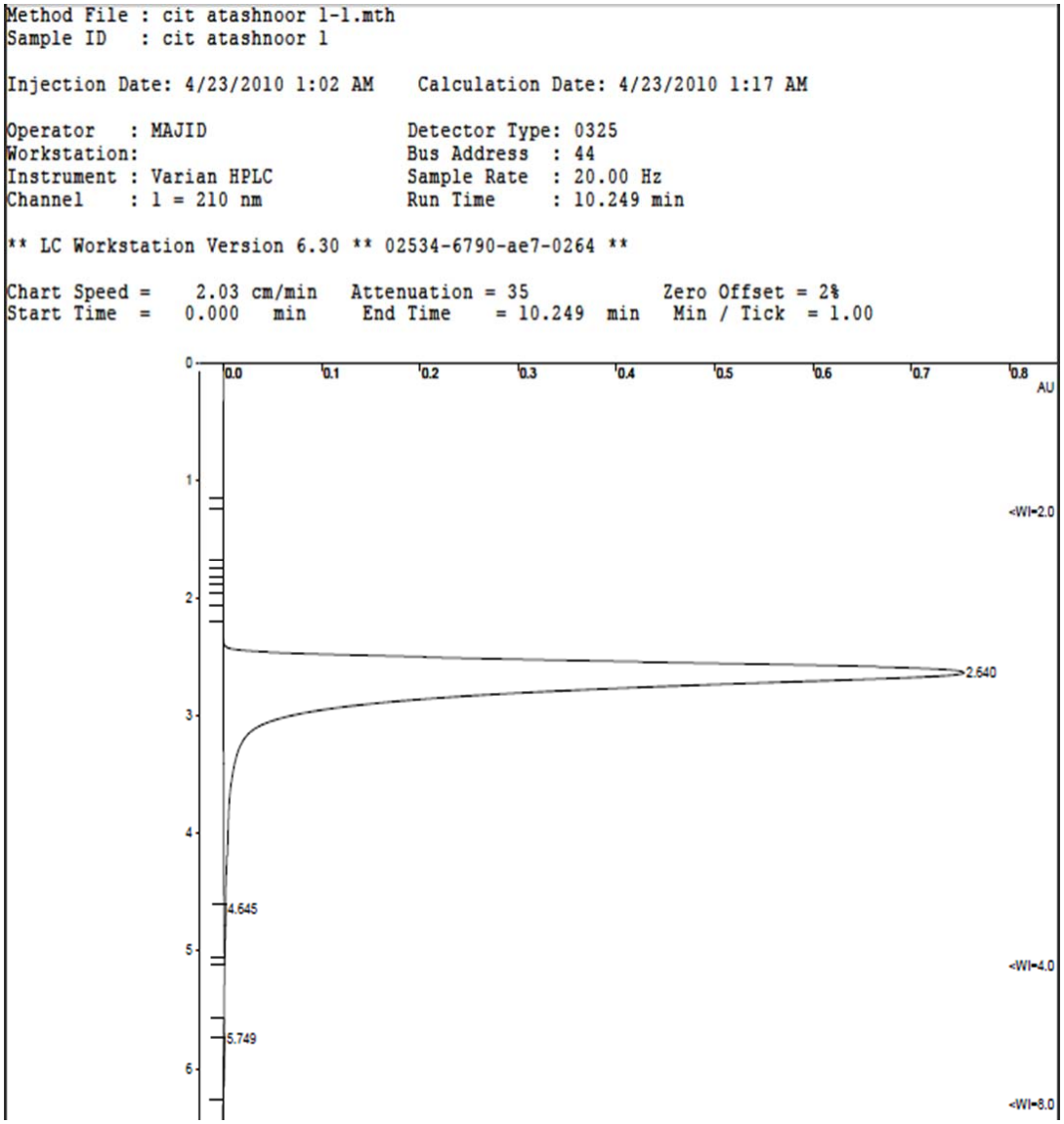
پیوست الف: منحنی استاندارد۱۲۰(ppm)اسید سیتریک

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8



پیوست ب : منحنی استاندارد ۲۴ (ppm) اسید سیتریک

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8



پیوست پ: منحنی آنالیز HPLC بستر شماره ۲کاه گندم قبل از اضافه نمودن اتانول به محیط کشت

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.4.5.8

Citric acid production by agricultural wastes with *Aspergillus niger* using solid state fermentation and process optimization

Atashnoor F. and Anvari M.*

Dept. of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R. of Iran.

Abstract

Citric acid is one the most commonly used organic acid in the food and pharmacntical which is produced mainly by submerged or surface fermentation by *Aspergillus niger*. As the most important of commereial producer. Recent works showed successful citric acid production through solied state fermentation. Under our experimental conditions, four important factor each one in four levels including substracte type (wheat straw, rice straw, rice bran, peanut skin) and pH (4,5,6,7) substrate treatment tempretures (45,60,75,90,˚c) and substracte treatment time (30,60,90,120min) on citric acid production by *Aspergillus niger* were assayed. Maximum amount of citric acid production was pH =5, treatment time and temperature of 60(min) and60 (˚c) respectively also the wheat straw was the best substrate for citric acid production. The results of this study showed that *Aspergillus niger* is a suitable microorganism for citric acid production and wheat straw is a good base for economical production of citric acid due to its low price. All of four understudied factors had significant effect on citric acid production in solid state fermentation ($P < 0.05$).

Key words: Citric Acid, Agricultural Wastes, *Aspergillus Niger*, Optimization, Solid state fermentation