Archive of SID

مجله پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۱۹ شماره ۱/ سال ۱۳۸۸

بررسی تولید اسید سیتریک با استفاده از تفاله سیب به روش جدید کشت سطحی

محمدیار حسینی[۱*]، محمود رضازاد باری[۲] و محمد علیزاده خالدآباد[۲]

تاریخ پذیرش: 87/9/24

1- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه

2 - گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

*مسئول مکاتبه E-mail: hosseini_60@yahoo.com

چکیده

با توجه به افزایش قیمت هیدروکربن‌ها و عدم دسترسی آسان به این منابع، طرحهایی بر پایه سوبسترای هیدروکربنی، جای خود را به طرح‌هایی بر پایه ضایعات کربوهیدراتی کشاورزی مثل تفاله سیب، قهوه، ساقه‌های گندم ،ضایعات آناناس، مخلوط میوه‌ها، باگاس و دیگر مواد برای تولید اسید سیتریک داده است. تفاله سیب سوبسترایی مناسب برای تولیدمیکروبی اسید سیتریک توسط آسپرژیلوس نایجر می‌باشد. در این مطالعه فرمانتور با حجم 22/2 متر مکعب ساخته شد و از سیستم هوادهی و تغییر گرادیان دمایی نیز در آن استفاده شد. توسط بیوراکتور مورد نظر و روش سیمپلکس بهینه‌سازی آن برای تولید اسید سیتریک صورت گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق با توجه به جنبه صنعتی و اقتصادی، نشان داد که حداکثر تولید اسید سیتریک (گرم اسید در کیلوگرم تفاله خشک) توسط آسپرژیلوس نایجر در رطوبت 80 درصد(**w/w**)، مدت زمان تخمیر 93/9 ساعت، آهنگ هوادهی 1/2 لیتر در دقیقه، منبع ازت (سولفات آمونیم)0/19% (**w/w**)و فاصله صفحات فرمانتور 7/4cm تا حداکثر 159/14 گرم اسید در کیلوگرم تفاله خشک بدست می‌آید.

واژه های کلیدی: آسپرژیلوس نایجر، اسید سیتریک ، تخمیر حالت جامد، تفاله سیب، هوادهی

Evaluation of Citric Acid Production from Apple Pomace Using Surface Culture Method

M Hosseini[1*], M Rezazad Bari[2] and M Alizadeh Khaledabad[2]

[1]Former MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran

[2]Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran

*Corresponding author: E-mail: hosseini_60@yahoo.com

Abstract

Due to increasing price of hydrocarbons and difficult access to them, process based on hydrocarbonate substrate has been shifted to design process on the base of waste agriculture carbohydrate such as apple pomace, coffee husk, wheat straw, pineapple waste, mixed fruit, bagasse to produce citric acid. Apple pomace is a suitable substrate for microbial production of citric acid using *Aspergillus niger*. In this study, new solid-state bioreactor ($22.2m^3$) was designed with heat gradients and aeration changes and has successfully been put into operation. The

www.SID.ir

Archive of SID

operation of bioreactor was optimized using Simplex method of analysis. The results of the present study considering the economical and industrial aspects showed that maximum amount of citric acid was produced under the following conditions: moisture content, 80% (w/w); fermentation time, 93.9 hours; aeration rate, 1.2 (l/min); nitrogen source (ammonium sulfate), 0.19% (w/w) and plates distance, 7.4 Cm. Under optimized conditions, 159.14 g citric acid was produced from 1kg dry apple pomace.

Keywords: Aeration , Apple pomace, *Aspergillus niger*, Citric acid, Solid-state fermentation

مقدمه

اسید سیتریک (2- هیدروکسی پروپان، 1و2و3- تری کربوکسیلیک اسید) با وزن مولکولی 210/14 دالتون، یک ترکیب شیمیایی تجاری است که با توجه به میزان تقاضای زیاد جهانی ، یکی از بزرگترین محصولات تخمیری می‌باشد و در جهان با تناژهای زیادی تولید می‌شود.70 درصد مصرف کل اسید سیتریک تولیدی در صنعت غذا، 12 درصد در صنایع دارویی و 18 درصد بقیه در سایر کاربردهای صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرد(هنگ و وودامز1995). بنابراین بررسی روشهای مؤثر در تخمیر و پیشرفت آن بر فرآیند اقتصاد حائز اهمیت است. عموماً تخمیر غوطه‌وری برای تولید تجاری اسیدسیتریک با استفاده از فیلامانتهای قارچ آسپرژیلوس نایجر مورد استفاده قرار می‌گیرد (آلبن و رکمن 2004). با توجه به افزایش قیمت هیدروکربن‌ها و عدم دسترسی آسان به این منابع، طرحهایی بر پایه سوبسترای هیدروکربنی، جای خود را به طرح‌هایی بر پایه ضایعات کربوهیدراتی کشاورزی مثل تفاله سیب و انگور داده است (چاوداری و همکاران 1978). محصول جانبی فرآوری سیب، تفاله سیب می‌باشد. تفاله سیب شامل کیک فشرده حاصل از عملیات پرس کردن سیبها برای تولید عصاره و آب سیب است و یا به عبارتی دیگر کیک فشرده بدست آمده در مرحله پرس کردن سیب-ها، شامل ضایعات پوست و مغز تولید شده در طی عملیات آماده‌سازی فرآوری برای تهیه کمپوت، خشک کردن و فریز کردن می‌باشد.

تفاله سیب تازه، یک سوبسترای اسیدی قابل توجه می‌باشد که به دلیل رطوبت بالا، رشد میکروارگانیسم‌ها در آن به خوبی صورت می‌گیرد. فرآیند تخمیر حالت جامد اولین بار به‌وسیله کان[1] در سال 1935 معرفی شد. در این شیوه پیشرفت میکروارگانیسمها در محیط کم آب و نامحلول صورت می‌گیرد و این روش نسبت به روشهای دیگر تولید اسید سیتریک به انرژی کمتری نیاز دارد و هزینه‌های سرمایه‌گذاری و عملیاتی پایین‌تر و بهره‌دهی حجمی بالاتری دارد (شجاع الساداتی و بابایی‌پور2002).

هدف از انجام این تحقیق،بررسی تولید اسید سیتریک به روش جدید کشت سطحی با استفاده از فرآیند تخمیر حالت جامد از تفاله سیب بود. در این طرح، تکنیک نوینی به کار گرفته شد که در آن هوادهی از دو طرف سوبسترا در درون فرمانتور انجام می‌گیرد و همچنین سطح تماس محصول با هوا افزایش می‌یابد که با نیروی هوادهی، اکسیژن تازه مهیا می‌شود و دی اکسید کربن و گرمای سوبسترا در طی تخمیر برداشته می‌شود ، بنابراین انتقال جرم و گرما را تنظیم می‌کند که نتیجه آن رشد بیشتر میکروارگانیسم‌ها و افزایش تولید اسید سیتریک است.

[1]Cahn

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم

آسپرژیلوس نایجر ***CA1***،در آزمایشگاه گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه تهیه شد. این میکروارگانیسم در محیط کشت ***P.D.A*** [1] به صورت خطی تلقیح داده شد و به مدت 4 روز در دمای 30 درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار گرفت ، سپس در یخچال در 4 درجه سانتیگراد نگهداری شد و هر 10 روز یکبار کشت‌ها تکرار شدند.

سوبسترا

تفاله سیب تازه از کارخانه آبمیوه شهداب ارومیه خریداری و در سردخانه سرد سرو، جاده نازلو در دمای 18- درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس تا رطوبت 6%(w/w) با هوای داغ 55 درجه سانتیگراد در کوره پاستور خشک و در درجه حرارت اتاق تا موقع مورد نیاز نگهداری گردید.

تلقیح

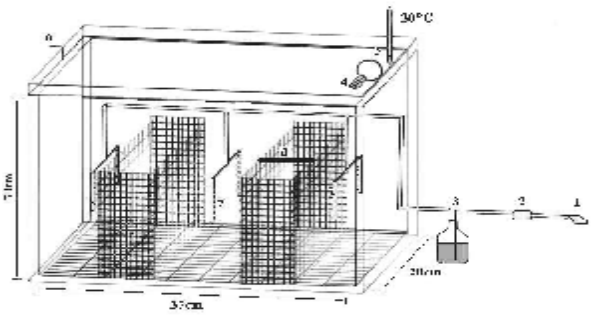
اسپورهای کپک آسپرژیلوس نایجر ***CA1*** در شرایط استریل و در حضور شعله با 10 میلی‌لیتر آب مقطر استریل 30 درجه سانتیگراد مخلوط شده و یک سوسپانسون اسپور درست شد و سپس با روش لام نیوبار تعداد اسپورها به 10^5 اسپور بر میلی‌لیتر تنظیم شد.

فرآیند تخمیر

سوبسترا با اندازه‌های 2 میلیمتر در اتوکلاو با دمای 121 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه پس از افزودن مواد افزودنی به آن استریل شد. سوبسترای تلقیح شده با اسپور در شرایط استریل به فرمانتور استریل شده با اشعه فرابنفش و اتانول داخل سل‌های راکتور قرار داده شد. دمای همه آزمایشات در 30 درجه سانتیگراد در دوره‌های زمانی مختلف کنترل شد. پس از بارگذاری راکتور، سیستم کاملاً بسته و فاقد هر گونه درز می‌باشد. پس از پایان دوره تخمیر مواد تخمیری با آب مقطر ولرم 30 درجه سانتیگراد استخراج گردید و آنالیز اسید سیتریک و قند صورت گرفت.

معرفی راکتور بستر جامد

در آزمایشگاه، راکتور بستر جامد از جنس پلاستیک با ابعاد **37cm** طول، **20cm** عرض و **30 cm** ارتفاع ساخته شده است و نمای سه بعدی آن در شکل 1 که با نرم افزار ***3Ds Max*** طراحی شده است، مشاهده می‌گردد.



شکل 1- اجزای مختلف فرمانتور طراحی‌شده:
کمپرسور آکواریوم(1)، فیلتر هوا (2)، ظرف مرطوب سازی هوا(3)، سنسور حرارتی(4)، ترمومتر(5)، فیلترخروج هوا(6) ، لوله‌های هوادهی(7).

این سیستم مجهز به سنسور حرارتی، ترمومتر، فیلتر، لوله‌های هوادهی، ظرف مرطوب‌سازی‌هوا و پمپ هوا می‌باشد که عملیات تخمیر در آن به آسانی صورت می‌پذیرد. در این تحقیق عملیات هوادهی بصورت مرطوب انجام شد و از ارلنهای حاوی آب مقطر برای مرطوب سازی هوا استفاده گردید. همچنین از آنجائیکه هوای محیط از انواع مختلفی از میکروارگانیسمها و اسپورهای آنها تشکیل شده است بنابراین جهت جلوگیری آلودگی سوبسترا از فیلتر برای سترون کردن هوای ورودی به فرمانتور

[1] Potato dextrose agar

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده شد. در این سیستم دمای داخل محفظه توسط ترمومتر و سنسور حرارتی در 30 درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته شد. این فرمانتور مجهز به دوسل برای تخمیر سوبسترا می‌باشد و **d** فاصله بین صفحات بر حسب سانتیمتر می‌باشد که متغیر در نظر گرفته شده است که با سوبسترا اشغال می‌گردد.

پمپ طراحی شده از نوع پمپ آکواریوم هست که با عبور دادن هوای مرطوب به داخل راکتور، دفع سریعتر مواد فرار و گرمای متابولیکی تخمیر که اثر بازدارندگی روی رشد و تولید محصول دارند، صورت می‌گیرد و همچنین از خشک شدن سوبسترا توسط عمل هوادهی کاسته می‌شود و دبی آن با استفاده از فلومتر بر حسب (**l/min**) مشخص گردید. سوبسترا در وسط صفحه‌های مشبک عمودی قرار می‌گیرد و هوادهی از هردو طرف آن صورت می‌گیرد.

روش‌های اندازه گیری

مقدار رطوبت تفاله با استفاده از کوره پاستور در دمای 105 درجه سانتیگراد تا رسیدن به وزن ثابت اندازه گیری شد. رسانیدن رطوبت سوبسترا به رطوبتهای آزمایشی با استفاده از قانون جرم و ماده بر طبق اصول مهندسی صورت گرفت. تعیین قندهای احیاکننده با روش سوموگی نلسون و تعیین قندهای کل با روش فنل سولفوریک انجام شد(سوموگی1952). اسید سیتریک به روش اسپکتروفتومتریک طبق روش بولت- ماریر(شجاع الساداتی و بابایی‌پور2002) با معرفهای پیریدین و انیدرید استیک تعیین شد(سوموگی1952).

طراحی آزمایش

بهینه سازی آزمایشات بر طبق روش سیمپلکس[1] طراحی شد که یکی از مشهورترین روشهای بهینه‌سازی است. سیمپلکس، ساده‌ترین متغیر ممکن در فضای **N** بعدی است و در تعداد فاکتورهای آزمایش هیچ محدودیتی وجود ندارد (ساکوری و همکاران 1997).

سیمپلکس ثابت، معمولی‌ترین و ساده‌ترین روش بهینه‌سازی سیمپلکس برای درک مفهوم آن است و این روش بهترین توصیف کلی از یکسری قوانین است که بعضی از این قوانین عبارتند از:

1- تعداد عاملهای موردنظر را مشخص کنیم و آنها را **K** بنامیم.

2- آزمایشهایی با محدودیت سیمپلکس(یا سه گوش برای دو عامل) در فضای عامل **K+1(=3)** را انجام می‌دهیم.

شرایط آزمایش به درجات آن بستگی دارد که نتیجه نهایی بهینه‌سازی را مشخص می‌کند. هر چه قدر اندازه درجه کوچکتر باشد بهینه‌سازی بهتری می‌تواند بدست آید ولی آزمایشهای بیشتری موردنیاز است (ساکوری و همکاران 1997).

نتایج و بحث

طراحی فاکتورهای آزمایش با بهینه‌سازی سیستم طرح جدید راکتور، با ملاحظه به آهنگ هوادهی (**l/min**)، مقدار رطوبت (**w/w%**)، درصد ازت (**w/w**)، فاصله صفحات فرمانتور (**cm**) و زمان تخمیر (ساعت) طراحی شده است. این ارقام در جدول 1 ارائه شده است:

[1] Simplex

www.SID.ir

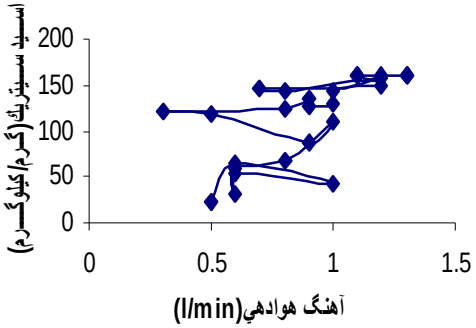
Archive of SID

جدول 1- آزمایشات بهینه‌سازی به روش سیمپلکس

RUN	Moisture(%w/w)	Air rate (l/min)	N(%w/v)	Plate distance (cm)	Time(h)	Citric acid (gr/kg)
RUN1	65	0.6	0.05	5	48	21.562
RUN2	69.6	0.6	0.05	5.4	50.5	66.18
RUN3	65	1	0.05	5.4	50.5	43.031
RUN4	65	0.6	0.1	5.4	50.5	52.365
RUN5	66	0.6	0.05	6.8	50.5	90.336
RUN6	66	0.6	0.05	5.4	58.9	60.019
RUN7	68.5	0.8	0.08	6.4	56.3	68.233
RUN8	70.2	1	0.1	7.1	60.5	100.677
RUN9	69.1	0.9	0.09	4.7	57.9	87.275
RUN10	70.9	0.7	0.1	5.8	60.8	117.332
RUN11	72.5	0.8	0.12	6	66	122.512
RUN12	72.9	0.8	0.08	6	67	125.079
RUN13	76.4	0.9	0.07	6.3	75.3	134.693
RUN14	77.1	0.9	0.12	6.4	65.1	126.106
RUN15	78	1	0.15	6.8	68.2	130.4
RUN16	76.5	1	0.11	6.7	79.1	141.288
RUN17	80	1.2	0.19	7.4	93.9	159.149
RUN18	78.9	0.8	0.14	7.6	79.3	144.214
RUN19	80.2	0.7	0.14	6.5	85.7	146.641
RUN20	81.3	1.2	0.16	7.3	86.2	148.521
RUN21	81.4	1.1	0.15	7.7	102.3	161.389
RUN22	83.6	1.1	0.16	8.3	120.9	169.829
RUN23	83.6	1.2	0.23	8.6	110.3	161.949
RUN24	87.2	1.4	0.31	9.7	122.7	159.522
RUN25	82.3	1.3	0.2	7.7	118.6	161.208

تاثیر آهنگ هوادهی

شکل 2 تاثیر آهنگ هوادهی را در تولید اسید سیتریک در راکتور جدید نشان می‌دهد. بر طبق اطلاعات بدست آمده واضح است که آهنگ هوادهی به مقدار زیادی تحت تاثیر تولید اسید سیتریک بود. گرچه آهنگ هوادهی بالاتر، باید بازده اسید سیتریک را تشدید کند، اما منحنی تاثیر منفی را نمایش می‌دهد. تاثیر منفی بالاتر اسید سیتریک در هوادهی بالاتر به خاطر نیروی برشی است که تاثیر مضری را بر روی رشته‌های مورفولوژی قارچی و کانالهای سوبسترا می‌گذارد. بی‌نظمی در آهنگ هوادهی به دلیل برهم کنش بین پارامترها می‌باشد (شجاع السادات و همکاران 1999). در نمودار مورد بحث برای تعیین مقدار بهینه اسید سیتریک میزان هوادهی 1/2 لیتر در دقیقه بدست آمد.



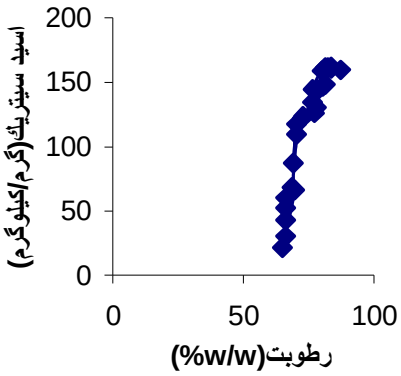
شکل 2 - تاثیر میزان آهنگ هوادهی بر روی تولید اسید سیتریک

تاثیر مقدار رطوبت

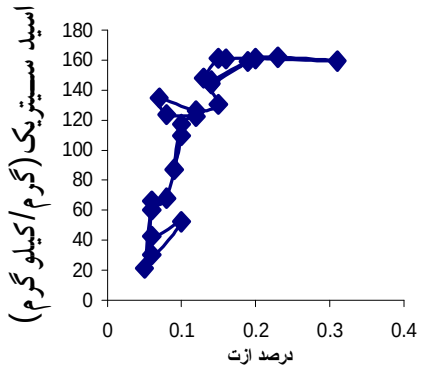
شکل 3 تاثیر مقدار رطوبت را در تولید اسید سیتریک در فرمانتور جدید نشان می‌دهد. بازدهی اسید سیتریک با افزایش مقدار رطوبت بیشتر شد زیرا که مستقیماً بر رشد قارچی، فعالیت آنزیمی و دسترس پذیری سوبسترا و همچنین تنظیم کردن تولید محصولات مؤثر است. در رطوبت زیاد، فضای خالی بین ذرات از آب پر شده و فاز گازی را خارج می‌کند. در نتیجه از هوادهی و گاززدایی ممانعت به عمل می‌آورد که به نوبه خود شرایط فرآیند بی-هوازی را ترغیب می‌نماید. رطوبت بسیار کم از رشد میسلیوم قارچی جلوگیری می‌کند. فعالیت آنزیمی و دسترس پذیری مواد مغذی را به علت کمتر متورم شدن سوبسترا کاهش می‌دهد و اسپورسازی را که آخرین عامل محدود کننده رشد قارچی می‌باشد، تسریع می‌بخشد (هنگ و وودامز 1987).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 3- تاثیر مقدار رطوبت بر تولید اسید سیتریک



شکل 4- تاثیر ازت بر تولید اسید سیتریک

تاثیر مقدار ازت

شکل 4 تاثیر مقدار ازت را در تولید اسید سیتریک در بیوراکتور جدید نشان می‌دهد. ازت، حدود 8 تا 14 درصد وزن خشک میکروارگانیسم را تشکیل می‌دهد. ازتی هم به صورت آلی و هم به صورت معدنی در محیط کشت قابل استفاده است و تاثیر مهمی در تولید اسید سیتریک دارد. کمبود منبع ازت در محیط کشت سبب افت رشد گردید. هر افزایش یا کاهشی در غلظت ازت، نتیجه تخریب رشد قارچ و به تبع آن تولید کم اسید سیتریک را داریم. افزایش ازت در محیط باعث می گردد که رشد قارچ سریع صورت گیرد، لذا قارچ قند بیشتری از سوبسترا را برای تکثیر مصرف می‌کند و به تبع آن کاهش مقدار اسید سیتریک را داریم. در غلظت کم ازت، قارچ رشد چندانی ندارد و قند سوبسترا را به خوبی مورد تخمیر قرار نمی‌دهد. در کل با توجه به اطلاعات عمومی فرآیند، تولید اسید سیتریک به بحث بررسی میزان ازت نیازمند است (سیکندر و همکاران 2002). در نمودار مورد بحث این غلظت در 0/19 درصد (w/w) به مقدار بهینه رسیده است.

تاثیر زمان تخمیر

شکل 5 تاثیر زمان را بر تولید اسید سیتریک نشان می‌دهد. اسید سیتریک محصول اولیه متابولیکی است که در چرخه تری کربوکسیلیک اسید (*TCA*) تشکیل می‌شود. سینتیک تولید اسید سیتریک درآسپرژیلوس نایجر **CA_1** دارای دو مرحله مشخص تروفوفاز[1] و ایدیوفاز[2] است که به دنبال هم قرار دارند. در مرحله اول (تروفوفاز) بخشی از گلوکز افزوده شده به عنوان منبع کربن برای تولید میسلیوم قارچی مورد استفاده قرار می‌گیرد و از طریق تنفس به دی اکسید کربن تبدیل شده و آزاد می‌گردد. در مرحله دوم (ایدیوفاز) باقیمانده گلوکز به اسیدهای آلی (اسید سیتریک) تبدیل شده و تنفس قارچی به حداقل خود می‌رسد. ارتباط بین تولید اسید سیتریک با رشد سلولی در حالتهای مختلف آزمایشی، نشانگر متغیر بودن این روند در فرآیندها و شرایط فیزیکی و شیمیایی مختلف است (شجاع السادات و بابایی پور 2002).

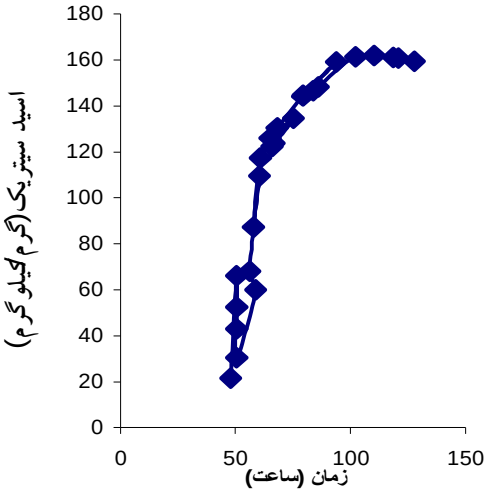
با توجه به بیوشیمی تخمیر اسید سیتریک، تجمع اسید زمانی آغاز می‌شود که رشد متوقف شود، یعنی بیشترین تولید مربوط به سلولهایی است که در فاز

[1]Trophophase
[2]Idiophase

www.SID.ir

Archive of SID

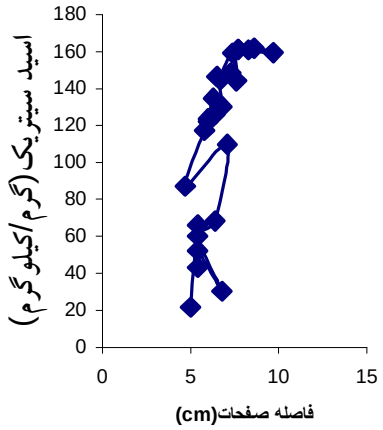
رشد نیستند. ملاحظه می‌شود که زمان حصول حداکثر تولید در کشتهای غوطه‌ور و سطحی از 6 تا 15 روز متغیر است و این مورد در کشتهای نیمه جامد از 3 تا 10 روز متغیر است. میزان تولید اسید سیتریک نسبت به زمان دارای یک حداکثر است و با عبور از نقطه حداکثر، اسید سیتریک تولید شده در محیط کشت کم می‌شود چونکه زمان زیاد باعث کاهش نیتروژن در درون سوبسترا می‌گردد و مقدار قند نیز کاهش می‌یابد (هنگ و همکاران 1987).



شکل 5- تاثیر زمان بر تولید اسید سیتریک

تاثیر فاصله صفحات

شکل 6 تاثیر فاصله بین صفحات را در سل فرمانتور بر اسید سیتریک نشان می‌دهد. در فاصله 8/6 سانتیمتر بیشترین مقدار تولید اسید سیتریک را داریم. فاصله کم بین صفحات با توجه به نیروی هوادهی، منجر به پارگی میسلیومهای قارچ و همچنین خشک شدن رطوبت روی سوبسترا می‌گردد در حالیکه در فاصله‌های زیاد نیز نیروی هوادهی به داخل وسط سوبسترا نفوذ نمی‌کند و تخمیر به خوبی رخ نمی‌دهد و باعث کمتر شدن مقدار تولید اسید سیتریک می‌شود (شجاع الساداتی و همکاران 1999).



شکل 6- تاثیر فاصله صفحات فرمانتور در تولید اسید سیتریک

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق با توجه به جنبه صنعتی و اقتصادی نشان داد که حداکثر تولید اسید سیتریک (گرم اسید در کیلوگرم تفاله خشک) توسط آسپرژیلوس نایجر در رطوبت 80 درصد (w/w)، مدت زمان تخمیر 93/9 ساعت، آهنگ هوادهی 1/2 لیتر در دقیقه، منبع ازت (سولفات آمونیم)0/19%(w/w) و فاصله صفحات فرمانتور 7/4cm تا حداکثر 159/14 بدست می آید که این مقدار بازدهی 84% از مقدار کل قند سوبسترا(189/45 گرم قند بر کیلوگرم تفاله سیب) بر حسب گلوکز می باشد که نسبت به تحقیقهای قبل و راندمان 78%، در مدت زمان کم به میزان چشمگیری افزایش یافته است. با توجه به مصرف روزافزون و نیازی در حدود 5000 تن درسال، طراحی و اجرای طرح برای دستیابی به جنبه صنعتی در کارگاهها مورد آزمایش قرار گیرد و در صورت اقتصادی بودن طرح صنعتی این فرآیند پیشنهاد می‌شود. چنانچه صرفاً مواد اولیه تولیداسید سیتریک در کشتهای مایع (غوطه‌ور و سطحی) و جامد در خصوص استفاده از ملاس و تفاله سیب مقایسه شوند

www.SID.ir

Archive of SID

(جدای از تکنولوژیهای پیشرفته و حساسیتهای روش کشت در محیط مایع)، براحتی می‌توان دریافت که استفاده از روش کشت حالت جامد و استفاده از تفاله سیب، صرفه اقتصادی بالاتری دارد.

منابع مورد استفاده

Alben E and Erkmen O, 2004. Production of citric acid from a new substrate undersized semolina by *Aspergillus niger*. Food Technology and Biotechnology 42(1): 19-22.

Chaudary K , Ethiraj S, Lakshminaray , Ana K and Tacro P, 1978. Citric acid production from Indian cane molasses by *Aspergillus niger* under solid state fermentation condition. Journal of Fermentation Technology 56(5):554-557.

Hang YD, Luh. BS and Woodams EE, 1987. Fermentation of kiwifruit peel. Journal of Food Science 52: 226-227.

Hang YD and Woodams EE, 1995. Grape pomace a novel substrate for microbial production of citric acid. Biotechnology 7: 253-254.

Hang YD and Woodams EE,1987. Effect of substrate moisture content on fungal production of citric acid in solid-state fermentation system. Biotechnology 9(3):183-186.

Sakurai M, Itoh M, Sakakibara M and Satio H, 1997. Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. Journal Chemistry Technology Biotechnology 70: 157-162.

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

Shojaosadati SA, Faraidouni R, Madadi-Nouei A and Mohammadpour I, 1999. Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using Neurospora Sitophila. Resources Conservation Recycling 27: 73-78.

Sikander A, Ikram H, Qadeer MA and Javed I, 2002. production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor. EJB, Electronic of Biotechnology 5(3): 258-271.

Somogy M, 1952. Notes on sugar determination. Journal Biological chemistry195: 19-23.

www.SID.ir