Archive of SID

بررسی توانایی بیوسنتز اسید سیتریک توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* بر پایه کاه در مقیاس آزمایشگاهی

فاطمه عوایدی، **بهین امیدی***، فاطمه داوودی

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت : ۱۳۹۷/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش : ۱۳۹۸/۰۱/۲۸

چکیده

اسید سیتریک در در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و سایر صنایع مورد استفاده قرار دارد. کاربرد وسیع آن باعث شده که منابع طبیعی مانند مرکبات جوابگوی نیاز جوامع بشری نباشد بنابراین از روش‌های میکروبی جهت تولید اسید سیتریک استفاده شده است که در این میان از *آسپرژیلوس نایجر* بیشتر استفاده شده است. در این تحقیق جهت تولید اسید سیتریک از مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* با کد 70562 DSM به روش تخمیر در بستر جامد، بر منبع کاه گندم به عنوان سوبسترا استفاده شده است. در این تحقیق در ابتدا محیط کشت با منبع کربن گلوکز تهیه شد و مخمر به آن تلقیح گردید و میزان تولید اسید سیتریک توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ nm اندازه‌گیری شد. سپس به جای گلوکز از کاه تیمار شده استفاده گردید و میزان اسید تولیدی اندازه‌گیری شد و در نهایت برای بهینه‌سازی از روش چند عاملی تاگوچی برای طراحی آزمایش استفاده شد و طی عملیات تخمیر، تأثیر پارامترهای اسیدیته، دما، میزان دور شیکر و هوادهی و منبع کربنی گلوکز و یا کاه گندم بررسی شدند. نتایج نشان داد که *یاروویا لیپولیتیکا* توانایی بیوسنتز اسید سیتریک در محیط با منبع کربن گلوکز و هم محیط با منبع کربن کاه را دارد. در طی عملیات بهینه‌سازی، بیشترین میزان تولید اسید سیتریک برای منبع کربن گلوکز در دمای ۳۰ °C، pH=۵/۲۵، میزان هوادهی با ۱۷۵ rpm، میزان ۰/۸۱۹g/L ثبت شد و برای منبع کربن کاه، در دمای ۳۲ °C، pH= ۴/۵، میزان هوادهی ۲۰۰rpm، ۰/۹۵۹g/L بدست آمد. در راستای اهداف بیوتکنولوژی و کاهش ضایعات کشاورزی، تأثیر محیط کشت با منبع کاه راهکار مناسبی به نظر می‌رسد. این موارد نشان دهنده این است که پسماندهای صنعتی و کشاورزی گزینه مناسبی برای تولید اسید سیتریک می‌باشند تا بتوان ارزش پسماندهای تولید شده در کشور را به چند برابر رساند و نیازهای بخش های مختلف را تامین نمود.

کلمات کلیدی: اسید سیتریک، تخمیر در بستر جامد، روش تاگوچی، کاه گندم، مخمر *یاروویا لیپولیتیکا*

* beh.omidi@iauctb.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تولید اسیدهای آلی به دلیل کاربرد وسیع آن‌ها در صنایع مختلف از دیرباز مورد مطالعه و بررسی بوده است. از جمله اسیدهای آلی مورد استفاده، اسید سیتریک است که دارای کاربرد متعددی در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و سایر صنایع می‌باشد. بدلیل غیرسمی بودن، اسیدیتهٔ مناسب، قابلیت بافری و غیره هر سال ۲ تا ۳ درصد بر میزان مصرف آن افزوده می‌گردد. اسید سیتریک یا جوهر لیمو یکی از اسیدهای آلی است که در مرکبات به خصوص لیموترش یافت می‌شود به گونه‌ای که تقریبا ۸ درصد وزن خشک لیموترش را تشکیل می‌دهد(۱). رابطه شیمیایی آن $C_6H_8O_7$ می‌باشد و نام آیوپاک آن:

3- tricarboxylic acid ،2-hydroxypropane-1,2

است. سیتریک اسید[1] به دلیل دارا بودن خصوصیت‌هایی مانند حلالیت بالا در آب، ترش کنندگی و ایجاد طعم دلپذیر، خواص بافری و غیر سمی بودن آن در حجم زیاد، باعث افزایش کاربرد وسیع آن شده است و حدود ۷۰ درصد از این اسید و نمک‌های آن در صنایع غذایی استفاده می‌شود(۳ و ۲).

با وجود حجم بالای مصرف اسید سیتریک، استخراج آن از مرکبات، جوابگوی نیاز به این ماده در سراسر جهان را برآورده نمی‌کند لذا روش‌های میکروبی می‌تواند جایگزین مناسبی در این خصوص باشد که با استفاده از میکروارگانیسم‌ها بتوان از مواد دور ریز و ارزان قیمت به عنوان منبع غذایی میکروارگانیسم استفاده کرد و به محصول مورد نظر دست یافت. روش میکروبی تولید اسید سیتریک معمولا از طریق تخمیر میکروبی بوده است(۳).

صنعت تولید اسید سیتریک یکی از عمده‌ترین صنایع فرآورده‌های تخمیری است و به سه روش کشت غوطه‌ور سطحی و حالت جامد تولید می‌گردد. در سلول‌های زنده اسید سیتریک به عنوان واسطه چرخه کربس تولید می‌شود و در بعضی از باکتری‌ها و قارچ‌ها به خاطر غیر نرمال بودن قابل جمع آوری می‌باشد که به آن تخمیر نوع دوم گیدن[2] گفته می‌شود(۴).

یکی از مشکلات عدیده‌ی روش تخمیر انتخاب گونه‌های مناسب است(۵). یکی از بهترین میکروارگانیسم‌های شناخته شده تولید اسید سیتریک، *آسپرژیلوس نایجر*[3] می‌باشد که از ملاس به عنوان ماده غذایی و اولیه استفاده می‌شود(۶). فرآیند تخمیر از طریق قارچ *آسپرژیلوس نایجر* هنوز هم منبع اصلی تولید میکروبی اسید سیتریک در سطح جهانی است. انتخاب مخمرهاگزینه دیگری است که نسبت به کپک‌ها این مزیت را دارند که به مقادیر بالای ماده خام و یون‌های فلزی مقاومت دارند در نتیجه می‌توان از ماده خام ارزان‌تر استفاده کرد(۷). مخمرها قادرند از منابع قندی و آلکانی استفاده کنند و اسید سیتریک تولید نمایند(۸).

در این پژوهش از مخمر *یاروویا لیپولیتیکا*[4] استفاده شده است. *یاروویا لیپولیتیکا* متعلق به خانواده همی‌آسکومایست‌ها می‌باشند(۹) و یکی از مخمرهای غیرتجاری است که از *ساکارومایسس*ها جدا شده‌اند و در مورد آن‌ها مطالعات گسترده‌ای صورت گرفته است. این مخمر می‌تواند از منابع کربن غیرمعمول مانند هیدروکربن‌ها استفاده کند و قادر به تولید متابولیت‌های مهمی می‌باشد (۲ و ۱۰).

در این مطالعه امکان بیوسنتز اسید سیتریک با استفاده از مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* بررسی گردید و به امکان تولید اسیدسیتریک بر پایه کاه در مقیاس آزمایشگاهی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از سویه مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* با کد DSM 70562 استفاده شد که از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران تهیه گردید. محیط کشت استفاده شده در این تحقیق،[5] YGC

[1] Citric acid
[2] Jayden fermentation
[3] *Aspergillus niger*
[4] *Yarrowia lipolytica*
[5] Yeast Extract Glucose ChlorampHenicol Medium (YGC-Medium)

www.SID.ir

Archive of SID

بود که حاوی g/L ۱۵ گلوکز، g/L ۵ دی آمونیم سولفات، g/L ۱ مونو پتاسیم فسفات، g/L ۰/۵ منیزیوم سولفات ۷ آبه، g/L ۰/۵ عصاره مخمر بود. میکروارگانیسم مورد نظر در محیط کشت YGC، کشت داده شد و به مدت ۵ روز در دمای ۲۵ ˚C انکوبه و سپس در یخچال با دمای ۴ ˚C نگهداری شدند.

به‌منظور پیش‌تیمار کاه گندم، کاه گندم موردنظر داخل ارلن ریخته شد و ده برابر وزن سوبسترا به آن محلول سود ۱تا ۵ M اضافه گردید. این مخلوط به مدت یک ساعت جهت انجام واکنش و هیدرولیز مواد لیگنوسلولزی در دمای محیط قرار گرفت، سپس دو بار با آب مقطر شستشو داده شد و به آون ۸۰ ˚C انتقال داده شد تا کاملاً خشک گردد. در نهایت کاه برای پرورش مخمر آماده شد.

جهت بررسی تولید اسید سیتریک توسط *یاروویا لیپولیتیکا*، ابتدا ۵۰۰cc از محیط کشت به مدت ۴۸ h ساعت در دمای ۲۸ ˚C و دور شیکر ۱۵۰rpm قرار داده شد. ۵cc از مایه تلقیح به۴۵ cc از محیط کشت تولید در ارلن مایر ۲۵۰cc انتقال داده شد. این محیط دارای g/L ۳۰ گلوکز، g/L ۱ دی آمونیم سولفات، g/L ۷ مونو پتاسیم فسفات، g/L ۲ مونو سدیم فسفات، g/L ۱ منیزیوم سولفات ۷ آبه و g/L ۱ عصاره مخمر بود که pH برابر ۶ داشت. به مدت۹۶ h در دمای ۲۸ ˚C و دور شیکر۱۸۰ rpm کشت داده شد و سپس ۵۰ cc از آن در داخل ارلن‌های۲۵۰ cc توزیع شد. حدود ۵۰۰ µl از سوسپانسیون ۲۴ ساعته مخمر به داخل ارلن حاوی محیط کشت تلقیح شد، سپس در حرارت ۲۹˚C داخل شیکر انکوباتور با دور شیکر ۲۰۰ rpm انکوبه شد و تا ۱۹۶ h، هر ۲۴ h یکبار میزان سیتریک اسید توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰nm اندازه‌گیری شدند.

جهت بررسی تولید اسید سیتریک توسط *یاروویا لیپولیتیکا* بر پایه کاه، ۴g از سوبسترای کاملاً خشک شده پیش تیمارشده (کاه گندم)، در ارلن‌های ۲۵۰cc ریخته شد، سپس سایر مواد از جمله g/L ۱ دی آمونیم سولفات، g/L ۷ مونو پتاسیم فسفات، g/L ۲ مونو سدیم فسفات، g/L ۱ منیزیوم سولفات ۷ آبه و g/L ۱ عصاره مخمر هم افزوده شد. لازم به ذکر است تفاوت این بود که به جای منبع کربن محیط اصلی از کاه استفاده شد. سپس pH روی ۵/۵-۴ و رطوبت روی۷۵ – ۶۵ درصد، قند اولیه روی ۱۴ یا ۱۸ درصد (وزنی/وزنی) و افزودن ۲ یا ۴ درصد (وزنی/وزنی) منبع ازت (اوره) و ۳ یا ۴ درصد (وزنی/حجمی) تنظیم شد. در این مرحله محیط آماده شده در اتوکلاو با دمای ^{0}c ۱۲۱ به مدت ۲۰min استریل شد. پس از خنک شدن، در شرایط استریل سوسپانسیون مخمر با رقت‌های cfu/ml ۱×۱۰^{۵} یا cfu/ml ۱×۱۰^{۷} به هر ظرف تخمیر تلقیح گردید. ارلن‌ها در دمای ۲۵ ˚C یا ۳۰ ˚C به مدت ۴ یا ۵ روز گرمخانه‌گذاری شدند. کلیهٔ کشت‌ها با سه تکرار بررسی شد.

به‌منظور بررسی رشد سلولی میکروبی به‌صورت آنلاین از روش دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ nm استفاده شد.

جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات از روش بهینه‌سازی به نام روش سطح پاسخ استفاده شد. در این پژوهش با کمک نرم افزار MINITAB و برنامه تاگوچی روش چند عاملی طراحی و آزمایش شد. برای بررسی‌های مربوط به اعتبار سنجی داده‌ها از روش one way ANOVA و هم چنین رگرسیون داده‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج بررسی امکان تولید اسید سیتریک توسط *یاروویا لیپولیتیکا* (محیط بر پایه گلوکز) با سه بار تکرار در جدول ۱ آمده است که از طریق آزمون تی، اعتبار داده‌ها مشخص شد که رابطه معناداری بین اعداد وجود ندارد ($p\leq$ ۰/۰۵).

نمودار ۱ منحنی استاندارد میزان کدورت‌سنجی تولید اسید سیتریک در محیط کشت بر پایه گلوکز در طول موج ۴۲۰ nm را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از نمودار ۱ حاکی از آن است که هر چه میزان کدورت بیشتر باشد، میزان تولید اسید سیتریک بالاتر است. محیط کشت بر پایه گلوکز ۶ =pH، دمای ۲۹ ˚C، هوادهی ۱۸۰ rpm بیشترین

www.SID.ir

Archive of SID

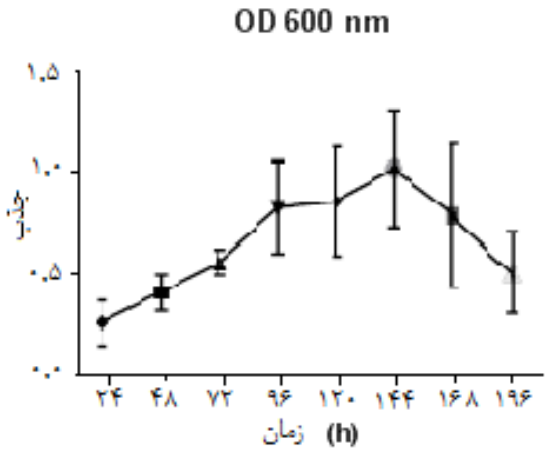
جدول ۱. میزان دانسیته نوری محیط کشت گلوکز در طول موج های ۴۲۰ nm (اسید سیتریک) و۶۰۰ nm (رشد میکروبی) $p\leq$ ۰/۰۵

زمان (h)	میزان دانسیته نوری در ۴۲۰nm			میزان دانسیته نوری در۶۰۰ nm		
	میانگین	انحراف معیار	تعداد تکرار	میانگین	انحراف معیار	تعداد تکرار
۲۴	۰/۲۵	۰/۰۹۹	۳	۱/۵۲	۰/۳۱۱	۳
۴۸	۰/۰۶	۰/۰۸۵	۳	۱/۷۴۵	۰/۳۰۴	۳
۷۲	۰/۵۳	۰/۰۵۷	۳	۲/۰۸	۰/۵۲۳	۳
۹۶	۰/۷۷۵	۰/۲۰۵	۳	۲/۲	۰/۴۲۴	۳
۱۲۰	۰/۸	۰/۲۴۰	۳	۲/۳۴۵	۰/۲۴۷	۳
۱۴۴	۰/۹۶۲	۰/۱۹	۳	۲/۴۵۵	۰/۲۱۹	۳
۱۶۸	۰/۷۳۵	۰/۳۱۸	۳	۲/۱۵	۰/۶۳۶	۳
۱۹۶	۰/۴۸	۰/۱۸۴	۳	۱/۶۳۵	۰/۳۸۹	۳

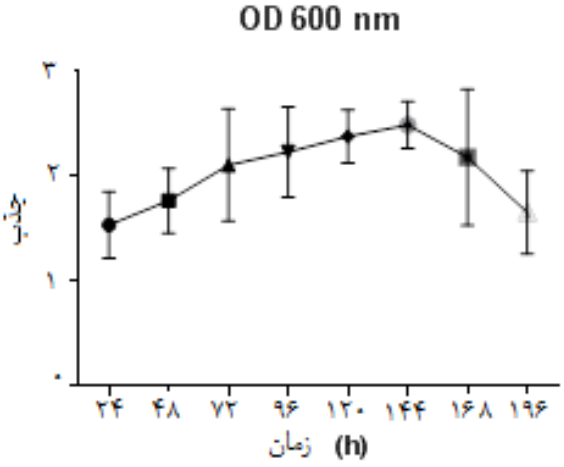
تولید اسید سیتریک را در زمان ۱۴۴ h ثبت کرده است. لازم به ذکر است منحنی براساس میانگین و تغییرات انحراف معیار ترسیم شده است.

نمودار۲ منحنی استاندارد میزان کدورت سنجی رشد سلولی محیط کشت بر پایه گلوکز در طول موج ۶۰۰ nm را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از نمودار ۲ حاکی از آن است که هرچه میزان کدورت بیشتر باشد، میزان رشد سلولی بالاتر است. محیط کشت بر پایه گلوکز ۶ =pH، دمای ۲۹ ˚C، هوادهی ۱۸۰ rpm بیشترین تولید سلولی را در زمان ۱۴۴ h ثبت کرده است و بعد از آن به فاز مرگ نزدیک می‌شود. لازم به ذکر است منحنی براساس میانگین و تغییرات انحراف معیار ترسیم شده است.

نتایج بررسی امکان تولید اسید سیتریک توسط *یاروویا لیپولیتیکا* بر پایه کاه سه بار تکرار در جدول ۲ آمده است که از طریق آزمون تی، اعتبار داده‌ها مشخص شد که رابطه معناداری بین اعداد وجود ندارد ($p\leq$۰/۰۵). نمودار۳ منحنی استاندارد میزان کدورت سنجی تولید اسید سیتریک در محیط کشت بر پایه کاه در طول موج ۴۲۰ nm را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از نمودار ۳ حاکی از آن است که هر چه میزان کدورت بیشتر باشد، میزان تولید اسید سیتریک بالاتر است. محیط کشت بر پایه کاه pH=۶، دمای ۲۹ ˚C، هوادهی ۱۸۰ rpm بیشترین تولید اسید سیتریک را در مدت



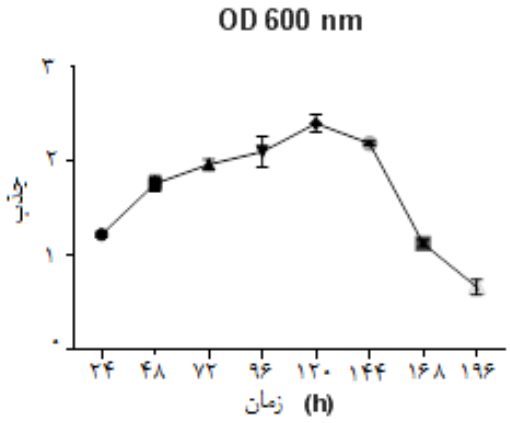
نمودار ۱. منحنی استاندارد میزان کدورت سنجی تولید اسید سیتریک در محیط کشت بر پایه گلوکز در طول موج ۴۲۰ nm.



نمودار ۲. منحنی استاندارد میزان کدورت سنجی رشد سلولی محیط کشت بر پایه گلوکز در طول موج ۶۰۰nm

www.SID.ir

Archive of SID

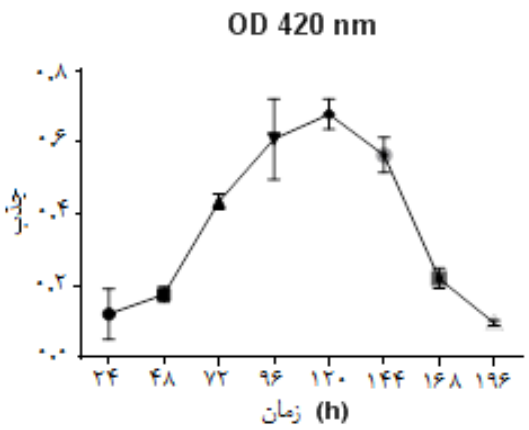


نمودار ۳. منحنی استاندارد میزان کدورت سنجی تولید اسید سیتریک در محیط کشت بر پایه کاه در طول موج ۴۲۰ nm

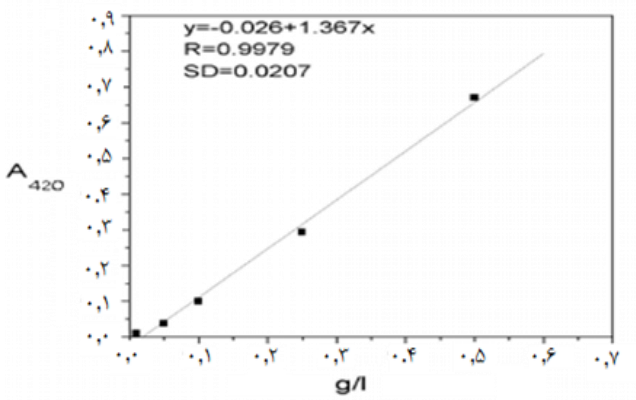
زمان ۱۲۰h ثبت کرده است. در محیط کشت بر پایه کاه در طول موج ۴۲۰ nm را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از نمودار ۳ حاکی از آن است که هر چه میزان کدورت بیشتر باشد، میزان تولید اسید سیتریک بالاتر است. محیط کشت بر پایه کاه pH=۶، دمای ۲۹ ˚C، هوادهی ۱۸۰ rpm بیشترین تولید اسید سیتریک را در زمان ۱۲۰h ثبت کرده است. لازم به ذکر است منحنی براساس میانگین و تغییرات انحراف معیار ترسیم شده است.

نمودار ۴ منحنی استاندارد میزان کدورت سنجی رشد سلولی محیط کشت بر پایه کاه در طول موج ۶۰۰nm را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از نمودار ۴ حاکی از آن است که هر چه میزان کدورت بیشتر باشد، میزان رشد سلولی بالاتر است. محیط کشت بر پایه گلوکز۶ =pH، دمای ۲۹ ˚C، هوادهی ۱۸۰rpm بیشترین تولید سلولی را در زمان ۱۲۰h ثبت کرده است و بعد از آن به فاز مرگ نزدیک می‌شود. لازم به ذکر است منحنی براساس میانگین و تغییرات انحراف معیار ترسیم شده است.

تولید اسید سیتریک به ترتیب ۰/۲۵۵g/L ± ۰/۳۴ و۱/۷۹ ±۰/۵۹۲ و میزان کدورت سنجی رشد سلولی به ترتیب ۱/۰۵۰±۰/۵۷۶ و۲/۱۶۰±۰/۴۷۸ بدست آمد که نشان دهنده رابطه مستقیم pH و رقت در تولید اسید سیتریک می‌باشد.



نمودار ۴. منحنی استاندارد میزان کدورت سنجی رشد سلولی محیط کشت بر پایه کاه در طول موج ۶۰۰nm



نمودار ۵. نمودارااستاندارد غلظت اسیدسیتریک

آزمایش مربوط به بهینه‌سازی تولید اسید سیتریک در محیط کشت بر پایه کاه گندم با سه بار تکرار انجام گرفت. در این تحقیق شرایط آزمایش بهینه‌سازی برای تولید اسید سیتریک با نرم‌افزار MINITAB طبق روش تاگوچی طراحی گردید از ۴ متغیر با پنج آستانه استفاده شد که متغیرها منبع کربن با آستانه‌های کاه و گلوکز، میزان هوادهی با ۱۳۳، ۱۵۰، ۱۷۵، ۲۰۰ و rpm ۲۱۷، دما ۲۶، ۲۸، ۳۰، ۳۲ و ˚C ۳۴، pH با آستانه‌های ۴، ۴/۵، ۵/۲۵، ۶ و ۶/۵ بود که ۲۶ آرایه برای آن تعریف گردید تا از بین آنان شرایط بهینه محاسبه گردید. آزمایشات تاگوچی و نتایج اندازه گیری شده در جدول ۳ آورده شده است.

نتایج نشان می‌دهد که بیشترین میزان تولید اسید سیتریک منبع کاه در pH ۴/۵، دور شیکر rpm ۲۰۰ و با مقدار

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. میزان دانسیته نوری محیط حاوی کاه در طول موج های ۴۲۰nm و ۶۰۰ nm. ($p\leq ۰/۰۵$)

زمان (h)	میزان دانسیته نوری در ۴۲۰nm			میزان دانسیته نوری در ۶۰۰ nm		
	میانگین	انحراف معیار	تعداد تکرار	میانگین	انحراف معیار	تعداد تکرار
۲۴	۰/۱۲	۰/۰۷۱	۳	۱/۲۲	۰/۰۲۸	۳
۴۸	۰/۱۷۵	۰/۰۲۱	۳	۱/۷۶	۰/۰۸۴	۳
۷۲	۰/۴۳۵	۰/۰۲۲	۳	۱/۹۶	۰/۰۵۶	۳
۹۶	۰/۶۱	۰/۱۱۳	۳	۲/۰۹۵	۰/۱۶۲	۳
۱۲۰	۰/۶۸	۰/۰۴۲	۳	۲/۳۹۵	۰/۰۹۱	۳
۱۴۴	۰/۵۶۵	۰/۰۴۹	۳	۲/۱۸۵	۰/۰۲۱	۳
۱۶۸	۰/۲۲	۰/۰۲۸	۳	۱/۱۲۵	۰/۰۳۵	۳
۱۹۶	۰/۰۹۵	۰/۰۰۷	۳	۰/۶۶۵	۰/۰۷۷	۳

جدول۳. آزمایشات تاگوچی و نتایج اندازه گیری شده

آزمایش	pH	دما (°C)	هوادهی (RPM)	منبع کربن	دانسیته نوری۴۲۰ nm
۱	۵/۲۵	۳۴	۱۳۳	گلوکز	۰/۱۱۱
۲	۵/۲۵	۳۰	۲۱۷	گلوکز	۰/۵۹
۳	۵/۲۵	۳۰	۲۱۷	گلوکز	۰/۴۱
۴	۵/۲۵	۳۰	۲۱۷	کاه	۰/۰۶۲
۵	۵/۲۵	۳۴	۱۷۵	کاه	۰/۰۱۵
۶	۵/۲۵	۳۰	۱۳۳	کاه	۰/۰۹۴
۷	۶	۳۲	۲۰۰	گلوکز	۰/۰۱۳
۸	۶	۳۲	۱۵۰	گلوکز	۰/۰۱۱
۹	۴/۵	۳۲	۱۵۰	گلوکز	۰/۰۰۵
۱۰	۶	۲۸	۱۵۰	گلوکز	۰/۰۰۲
۱۱	۶/۵	۳۰	۱۷۵	گلوکز	۰/۰۰۷
۱۲	۴/۵	۲۸	۲۰۰	گلوکز	۰/۵۶
۱۳	۵/۲۵	۲۶	۱۷۵	کاه	۰/۶۵
۱۴	۵/۲۵	۳۰	۱۷۵	گلوکز	۱/۱۲
۱۵	۴	۳۰	۱۷۵	کاه	۰/۰۰۳
۱۶	۴/۵	۲۸	۲۰۰	کاه	۰/۹۹
۱۷	۵/۲۵	۲۶	۱۷۵	گلوکز	۰/۸۸
۱۸	۴/۵	۲۸	۱۵۰	کاه	۰/۶۴
۱۹	۵/۲۵	۳۰	۱۷۵	کاه	۰/۳۲
۲۰	۶/۵	۳۰	۱۷۵	کاه	۰/۰۱۳
۲۱	۴/۵	۳۲	۱۵۰	کاه	۰/۷۵
۲۲	۴	۳۰	۱۷۵	گلوکز	۰/۰۰۲
۲۳	۴/۵	۳۲	۲۰۰	کاه	۱/۳۱
۲۴	۶	۳۲	۱۵۰	کاه	۰/۲۷
۲۵	۴/۵	۲۸	۱۵۰	گلوکز	۰
۲۶	۶	۲۸	۲۰۰	کاه	۰/۲۳

www.SID.ir

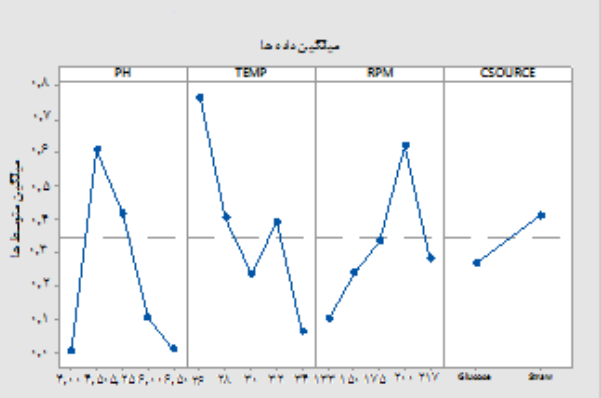
Archive of SID

جدول ۴ بررسی تغییرات سیگنال به نویز برای متغیرهای مختلف

نوع منبع کربن	جذب نوری	دما(°C)	دور شیکر (rpm)	pH	میزان اسید سیتریک g/L
کاه	۱/۳۱	۳۲	۲۰۰	۴/۵	۰/۹۵۹
گلوکز	۱/۱۲۰	۳۴	۱۳۳	۵/۲۵	۰/۸۱۹

دمای ۳۲ °C با جذب نوری ۱/۳۱ بوده است و برای گلوکز بیشترین تولید در دمای pH ۵/۲۵، دور همزن ۱۳۳ rpm و دمای ۳۴ °C با جذب نوری ۱/۱۱ ثبت شده است.

نتایج مربوط به آنالیز میانگین بهترین نتیجه متغیرها با استفاده از برنامه تاگوچی در نمودار۶ مشخص شده است.



نمودار ۶. نتایج مربوط به آنالیز میانگین بهترین نتیجه متغیرها با استفاده از برنامه تاگوچی

بحث و نتیجه‌گیری

اسید سیتریک، یک محصول صنعتی با کاربردهای زیاد است. به دلیل انحلال پذیری بالا در آب، طعم ترش مطبوع، خاصیت سمی بسیار کم و جذب آسان، خواص بافری و همچنین شرکت در سنتزهای شیمیایی در صنایع غذایی، داروسازی، آرایشی و بهداشتی و دیگر صنایع کاربرد فراوانی دارد. پیش بینی می‌شد تولید جهانی اسید سیتریک در سال ۲۰۰۹ به بیش از ۲ میلیون تن برسد. تا حدود سال ۱۹۶۵ *آسپرژیلوس نایجر* تنها ارگانیسم انحصاری برای تولید اسید سیتریک بود اما از آن سال به بعد با شناخت مخمرهای تولید کننده این اسید، مطالعه بر روی آن‌ها در جهت تولید اسید سیتریک افزایش چشمگیری داشته است. مزیت مخمرها نسبت به قارچ‌های کپکی رشد بر روی انواع سوبستراهای ارزان‌قیمت و قابل دسترس از جمله هیدروکربن‌ها و ترکیبات نفتی است. از دیگر مزایای مخمرها این است که می‌توانند مقادیر بالای قند را تحمل کنند و در نتیجه تغییرات ترکیب محیط کشت در مورد آن‌ها راحت‌تر صورت می‌گیرد. علاوه بر آن، حساسیت کم آن‌ها به یون‌های فلزات موجود در مواد اولیه خام، باعث شده که تیمار اولیه مخمرها جهت تولید پرهزینه نباشد(۸ و ۱۱).

در طی سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات لیگنوسلولزی برای پایه محیط کشت مورد توجه قرار گرفته است چرا که به راحتی در دسترس هستند و هزینه کمی دارند از جمله می‌توان به تفاله خرما، کیوی، ضایعات قهوه و چوب ذرت به عمل آمده است. یکی از موادی که برای استخراج مورد استفاده قرار می‌گیرد کاه گندم می‌باشد. کاه گندم ساختار لیگنوسلولزی دارد، بدون عمل‌آوری حتی برای دام قابل استفاده نمی‌باشد و از طرف دیگر نگهداری این میزان کاه گندم نیاز به فضای بسیار زیادی دارد، به همین دلیل مقادیر قابل توجهی از آن سوزانده می‌شود. انجام یک پیش‌تیمار مناسب روی کاه گندم موجب شکسته شدن کمپلکس لیگنین ـ کربوهیدرات و همچنین ساختار بلوری سلولز می‌شود(۱۲). کاه گندم شامل ۳۰ درصد سلولز، ۲۰ درصد همی سلولز و ۱۶ درصد لیگنین است. پیش تیمار کاه باعث انحلال پذیری سلولز می شود و میزان یون های فلزی را تنظیم می‌نماید(۱۳). از آن‌جا که اسید سیتریک در طی سیکل کربس در هر موجود زنده‌ای تولید می‌شود و بر روی تعداد بسیار زیادی از این میکروارگانیسم‌ها مطالعه شده است، مخمرهای *یاروویا*

www.SID.ir

Archive of SID

لیپولیتیکا یکی از بهترین مخمرهای تولید کننده اسید سیتریک، از منابع متفاوت می‌باشند. به طور کلی تولید اسید سیتریک در مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* دو مرحله دارد. تروفوفاز[1] که کلیه اسیدهای تولید شده صرف رشد میکروارگانیسم می‌شود و سلول‌ها مواد غذایی موجود در محیط را مصرف می‌کنند و سرعت رشد به علت کاهش مواد (به‌غیراز کربن) به پایان می‌رسد. سپس به دلیل محدود شدن منبع نیتروژن، سلول‌ها توانایی ادامه تقسیم را ندارند سلول وارد فاز ایدیوفاز می‌شود. در مرحله دوم مقدار همچنان اضافه می‌شود. و اسید سیتریک تولید شده در میتوکندری ترشح می‌گردد. این اسید سیتریک یا به اسیدهای چرب سلولی تبدیل می‌شود یا به خارج سلول ترشح می‌شود(۱۳).

در این تحقیق ابتدا تولید اسید سیتریک بر پایه گلوکز بررسی شد. بیشترین میزان جذب دانسیته نوری ۴۲۰ nm را در روز ششم با مقدار کدورت سنجی ۰/۹۶۲ ثبت شد و در نتیجه بیشترین میزان تولید اسید سیتریک را داشته است. همچنین تولید اسید سیتریک در محیط کشت بر پایه کاه گندم نیز بیشترین تولید را در روز پنجم ثبت کرده است و میزان کدورت سنجی آن ۰/۶۸۰ بود. در تحقیقی که لوسینا و همکاران در مورد سنتز اسید سیتریک با کشت حالت‌جامد *آسپرژیلوس نایجر* انجام دادند. از تفاله نیشکر، تفاله قهوه و تفاله کاساوا استفاده کردند. آن‌ها نشان دادند که بیشترین تولید بعد از ۱۲۰ h ساعت، رطوبت ۶۲ درصد و دمای ۲۶ ˚C در محیط کشت با پایه تفاله کاساوا اتفاق می‌افتد. تفاله کاساوا سرشا از کلسیم، فسفر ویتامین ب۲ و نیاسین است که این موارد نشان دهنده آن است که در زمان ۱۲۰h در فاز ایدیوفاز تولید اسید سیتریک افزایش یافته است و محیط کشت کاساوا نسبت کربن به نیتروژن مناسب تری نسب به سایر محیط‌ها ایجاد کرده است(۱۴). مولر و همکاران در سال بهینه‌سازی تولید اسید سیتریک در مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* برو روی محیط کشت برپایه گلوکز را بررسی کردند. آن‌ها اثر گلوکز در دمای ۳۰˚C و pH=۶ را در غلظت‌های ۵۰ g/L، ۷۵ g/L، ۱۰۰ g/L، ۱۵۰ g/L و ۲۰۰ g/L بررسی کردند که با افزایش گلوکز محیط کشت میزان تولید اسید سیتریک نیز افزایش یافت(۱۵) که در واقع با افزایش منبع کربن محدودیت بیشتری در نسبت کربن نیتروژن اعمال می‌گردد. درنتیجه تولید اسید سیتریک بالاتر خواهد رفت و این عامل می تواند دلیل تولید اسید سیتریک کمتر توسط محیط کشت بر پایه کاه نسبت به گلوکز باشد.

صمدلویی و همکاران، بهینه‌سازی تولید اسیدسیتریک از گونه قارچی را مورد بررسی قرار دادند. همچنین تأثیر متقابل پودر سویا و ساکاروز در میزان تولید اسیدسیتریک در حضور *آسپرژیلوس* را بررسی کردند. نتایج نشان دادند که امواج فراصوت در زمان رشد میکروارگانیسم تأثیر قابل‌توجهی در افزایش اسیدسیتریک دارد. آنان بیان کردند که بیشترین میزان تولید اسیدسیتریک (۵۸g/L) در سطوح ۲۳۰/۸۷g/L ساکاروز و ۲۰۰ g/L پودر سویا تولید شدند(۱۶). جمشیدی و همکاران در پژوهشی از تفاله سیب به عنوان سوبسترا، قارچ *آسپرژیلوس نایجر* به عنوان عامل تخمیر کننده و کشت حالت جامد برای تولید اسیدسیتریک استفاده کردند (۱۷). میر باقری و همکاران در سال ۱۳۸۹، به بررسی جداسازی و شناسایی مخمر بومی تولید کننده اسیدسیتریک برای استفاده در صنایع پرداختند. با بررسی تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی این مخمر، یک سویه از مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* شناسایی شد و در بانک ژنی با شماره HM 011048 ثبت شد (۱۸). بابایی پور و همکاران با کشت *آسپرژیلوس نایجر* در محیط کشت جامد چند لایه بر پایه تفاله سیب، ۱۲۴g اسید سیتریک از یک کیلوگرم تفاله سیب تولید کردند. این در حالی بود که میزان آهنگ هوادهی ۰/۸ L/min، اندازه ذرات ۰/۶ cm تا ۲/۳۳ و ارتفاع سطح ۱۰ cm بود (۱۹).

لیو و همکاران تبدیل کاه پیش تیمار شده را به طور مستقیم با اسید سیتریک بر روی مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* SWJ-1b و میسیلیوم‌های ثابت شده *تریکودرما رسی*[2] بررسی کردند. میسیلیوم‌های *تریکودرما رسی* ۲/۹ IU/ml آنزیم

[1] tropHopHase

[2] Trichoderma reesei

www.SID.ir

Archive of SID

سلولاز تولید می‌کنند. وقتی که میسیلوم‌های آن به طور همزمان با محیط کشت جامد برپایه کاه کشت داده شدند، مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* با بازده ۱۰/۷ g/L اسید سیتریک تولید کرد و آن‌ها از روشی استفاده کردند که مرحله پیش تیمار جداگانه کاه را حذف کردند(۲۰). لوینسون و همکاران، به بررسی تأثیر نسبت منبع کربن(گلیسرول) به منبع نیتروژن بر میزان تولید اسیدسیتریک به‌وسیله مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* پرداختند. در این پژوهش آنان از نسبت‌های مختلف منبع کربن(گلیسرول) به منبع نیتروژن استفاده کردند. آنان بیان کردند که بیشترین نسبت بین منبع کربن به نیتروژن برای تولید اسیدسیتریک ۱:۷:۲ و بیشترین نسبت بین منبع کربن به نیتروژن برای رسیدن به بهترین راندمان ۱:۴:۳ بود(۲۱).

لازم به ذکر است محیط کشت بر پایه ملاس نیز توانایی خوبی برای تولید اسید سیتریک دارد اما همان‌طور که کارسانبا و همکاران در سال مطرح کردند دو مشکل برای این محیط کشت وجود دارد اول اینکه منبع اصلی کربن این محیط ساکارز می‌باشد که باید با کمک آنزیم اینورتاز به گلوکز و فروکتوز شکسته شود که همه موتان‌های *یاروویا لیپولیتیکا* این آنزیم را ندارند. از طرف دیگر همان‌طور که از جذب نوری تولید اسید سیتریک محیط ملاس نسبت به سایر محیط‌ها مشخص است، درصد نیتروژن به کربن این محیط بهینه نیست(۲۲).

استفاده از منابع کربن ارزان‌قیمت و قابل‌تجزیه راهکاری جالب جهت تولید محصولات پرکاربرد می‌باشد. استفاده از کاه گندم در تولید اسیدسیتریک گزینه مناسبی به شمار می‌آید، چرا که بعد از فروش اسید سیتریک تولید شده از کاه می‌توان از پسماند آن برای غذای دام و طیور استفاده کرد(۲۳).

در این پژوهش پس از انتخاب منبع کربنی کاه گندم از بین منابع مختلف، ابتدا از روش تک عاملی تنها عوامل رقت و pH تاثیر داده شد که یک بار pH = ۴ و رقت 10^5 و بار دیگر pH = ۵/۵ و رقت 10^7 تنظیم شد و میزان تولید اسید سیتریک و رشد میکروبی بررسی شد. آزمایش با سه بار تکرار انجام گرفت. تولید اسید سیتریک به ترتیب ۰/۲۵۵ ± ۰/۳۴ و ۱/۷۹۰±۰/۵۹۲ و میزان کدورت سنجی رشد سلولی به ترتیب ۰/۵۷۶ ± ۱/۰۵۰ و ۰/۴۷۸ ± ۱/۶۰ بدست آمد که نشان دهنده رابطه مستقیم pH و رقت در تولید اسید سیتریک می‌باشد. برای طراحی آزمایش چند عاملی، چهار عامل کلیدی منبع کربن، pH، هوادهی و دما انتخاب شدند. که با روش تاگوچی ۲۷ آزمایش طراحی شد. برای منبع کربنی گلوکز، دمای $30^{\circ}C$، pH= ۵/۲۵، میزان هوادهی با ۱۷۵ rpm میزان کدورت سنجی در ۴۲۰nm، ۱/۱۲۰ ثبت شد و برای منبع کربنی کاه، دمای $32^{\circ}C$، pH ۴/۵، میزان هوادهی با ۲۰۰ rpm میزان کدورت سنجی در۴۲۰nm، ۱/۳۱nm ثبت شد. در سال ساگناک و همکاران بر روی دستکاری محیط کشت بر پایه گلیسرول فسفات و تولید لیپید و اسید سیتریک در مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* کار کردند آن‌ها نشان دادند که افزایش منبع کربن باعث تغییر در تولید اسید سیتریک از g ۰/۴ به g ۰/۶۸ افزایش پیدا کرده است. آن‌ها نتیجه گرفتند که افزایش منبع کربن در محیط کشت باعث افزایش ورود گلوکز به سلول شده و در نهایت مسیرهای بیشتری برای تولید سیتریک اسید و لیپید فعال می‌شوند(۲۴). این فرآیند مشابه نتیجه بدست آمده از 10^5 به 10^7 است که کدورت از ۰/۲۵۵ ±۰/۳۴۰ و۱/۷۹۰ ±۰/۵۹۲ افزایش پیدا کرده است.

تیمومی و همکاران نیز با ایجاد اختلال در pH محیط‌های بسته و باز برای *یاروویا لیپیولیتیکا* نشان دادند که pH = ۵/۶ نسبت به pH های ۴/۵ و ۷ میزان اسید سیتریک بیشتری تولید می‌کند. چرا که میزان pH پایین تر باعث اختلال در نفوذپذیری غشای سلولی می‌شود و همچنین pH بالا نسبت سیتریک اسید و ایزوسیتریک اسید را تغییر می‌دهد(۲۵). نیکخواه و همکاران هم تولید اسید سیتریک توسط مخمر *آسپرژیلوس نایجر* را در محیط کشت بر پایه تفاله خرما بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که با کاهش pH تولید اسید سیتریک افزایش می‌یابد و مزیت دیگر تولید اسید در pH های پایین کاهش میزان آلودگی خواهد بود(۲۶).

www.SID.ir

Archive of SID

از آنجایی‌که مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* یک میکروارگانیسم هوازی است، از اطلاعات بدست آمده واضح است که هوادهی به طور زیادی تحت تاثیر تولید اسید سیتریک است. گرچه هوادهی بالاتر، باید بازده اسید سیتریک را تشدید کند، اما منحنی تاثیر منفی را نمایش می‌دهد. کامزولووا و همکاران در سال میزان اکسیژن لازم برای تولید اسید سیتریک در مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* را نشان دادند و نشان دادند که هر چه هوادهی بیشتر باشد تولید اسید سیتریک بالاتر خواهد رفت و تاثیر منفی بالاتر اسید سیتریک در هوادهی بالاتر به خاطر نیروی برشی است که تاثیر مضری را بر روی رشته‌های مورفولوژی مخمر و کانال‌های سوبسترا می‌گذارد(۲۷). هوادهی در تنظیم دمای محیط، دسترسی متناسب مواد غذایی به میکروارگانیسم‌ها و رطوبت محیط نیز تاثیر می‌گذارد(۲۸). ریوینسکا و همکاران نشان دادند که مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* در محیط کشت بر پایه گلیسرول از بین میزان همزدن ۴۰۰ تا ۹۰۰ rpm، بهترین رشد را در دورشیکر ۸۰۰ rpm نشان داده است که رابطه مستقیم هوادهی و تولید بیشتر اسید سیتریک را ثابت می نماید(۲۹). مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* معمولا در دمای ۳۲ °C الی ۳۴ °C یافت می‌شود و دمای بهینه آن بین دمای ۲۶ °C تا ۳۴ °C می‌باشد اما دمای بهینه تولید اسید سیتریک بسته به گونه مخمر متفاوت خواهد بود(۳۰). سوزا و همکاران نشان دادند که برای تولید اسید سیتریک در مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* در محیط کشت برپایه گلیسرول و هم زدن ۱۸۴ rpm دمای مناسب ۳۰°C می‌باشد(۳۱) که با نتایج این آزمایش تطابق دارد.

با در نظر گرفتن اینکه تولید صنعتی و میکروبی اسید سیتریک در دنیا تقریباً از دهۀ ۱۹۲۰ شروع شده، ولی تولید این اسید در کشور علی‌رغم مقادیر بالای مصرف آن، بسیار محدود بوده وکافی نیست. از طرف دیگر در سال‌های اخیر اقتصاد کشور ایران از لحاظ تولید گندم قدرت بیشتری پیدا کرده و درصد بالایی از این گیاه در صنعت به کاه گندم تبدیل می‌شود، بطوری‌که در سال تولید آن بالغ بر ۱۱۰۸۵۴۴۲ تن گزارش شده است(۳۲) از آنجا که کاه گندم ساختار لیگنوسلولزی دارد، بدون عمل‌آوری حتی برای دام قابل استفاده نمی‌باشد و نگهداری این میزان کاه گندم نیاز به فضای بسیار زیادی دارد، به همین دلیل مقادیر قابل توجهی از آن سوزانده می‌شود (۳۳) بدین ترتیب استفاده از تخمیر کاه علاوه بر ارزان بودن به حفظ محیط زیست نیز کمک شایانی خواهد کرد.

بنابراین در این تحقیق با بهینه سازی به روش تاگوچی، برای منبع کربنی گلوکز، دمای ۳۰°C، pH = ۵/۲۵، میزان هوادهی ۱۷۵ rpm میزان کدورت سنجی در ۴۲۰nm، ۱/۱۲۰ ثبت شد و برای منبع کربنی کاه، دمای ۳۲ °C، pH = ۴/۵، میزان هوادهی با ۲۰۰ rpm میزان کدورت سنجی در ۴۲۰ nm، ۱/۳۱ ثبت شد. که این موارد نشان دهنده این است که پسماندهای صنعتی گزینه مناسبی برای تولید اسید سیتریک می‌باشد. تا بتوان ارزش پسماندهای تولید شده در کشور را به چند برابر رساند و نیازهای بخش‌های مختلف را تامین نمود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی انجام شده است که بدین وسیله از تمامی عزیزان در بخش ازمایشگاه و بخش پژوهش تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. Cavallo E, Charreau H, Cerrutti P, Foresti ML. *Yarrowia lipolytica*: a model yeast for citric acid production. FEMS yeast research. 2017 Nov 2;17(8):fox084

2. Kristiansen B, Linden J, Mattey M. Citric acid biotechnology. CRC press; 2014 Apr 21.

3. Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. Biotechnology advances. 2007 May 1;25(3):244-63.

4. Pandey A, Soccol CR, Larroche C, editors. Current developments in solid-state fermentation. Springer Science & Business Media; 2008 Sep 16.

www.SID.ir

Archive of SID

۱۶. صمدلویی حمیدرضا, قرنجیک شاهرخ. "بهینه سازی تولید اسیدسیتریک از گونه قارچی آسپرژیلوس نایجر." ۵۹-۷۳.

۱۷. جمشیدی, میترا و فاطمه اردستانی، ۱۳۹۲، بهینه سازی تولید اسید سیتریک از تفاله سیب با استفاده از روش تاگوچی، اولین همایش ملی برنامه ریزی، حفاظت از محیط زیست و توسعه پایدار، همدان، انجمن ارزیابان محیط زیست هگمتانه

۱۸. میر باقری. م. الف.، نحوی. الف.، امتیازی. گ. و درویشی. ف. (۱۳۸۹). بررسی جداسازی و شناسایی مخمر بومی تولید کننده اسید سیتریک برای استفاده در صنایع. علوم و فناوری زیستی مدرس. دوره ۲. شماره ۱. ۸۹ – ۷۷.

19. Shojaosadati SA, Babaeipour V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. Process Biochemistry. 2002 Mar 1;37(8):909-14.

20. Liu X, Lv J, Zhang T, Deng Y. Direct conversion of pretreated straw cellulose into citric acid by co-cultures of Yarrowia lipolytica SWJ-1b and immobilized *Trichoderma reesei* mycelium. Applied biochemistry and biotechnology. 2014 May 1;173(2):501-9.

21. Levinson WE, Kurtzman CP, Kuo TM. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. Enzyme and Microbial Technology. 2007 Aug 2;41(3):292-5.

22. Carsanba E, Papanikolaou S, Erten H. Production of oils and fats by oleaginous microorganisms with an emphasis given to the potential of the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*. Critical reviews in biotechnology. 2018 Nov 17;38(8):1230-43.

23. Zoghi A, Khosravi-Darani K, Sohrabvandi S. 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. 2013 Nov 15;8(3):155-63.

24. Yalcin SK, Bozdemir MT, Ozbas ZY. Citric acid production by yeasts: fermentation conditions, process optimization and strain improvement. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 2010;9:1374-82.

25. Timoumi A, Cléret M, Bideaux C, Guillouet SE, Allouche Y, Molina-Jouve C, Fillaudeau L, Gorret N. Dynamic behavior of *Yarrowia lipolytica* in

5. Mekasha Y, Tegegne A, Yami A, Umunna NN. Evaluation of non-conventional agro-industrial by-products as supplementary feeds for ruminants: in vitro and metabolism study with sheep. Small Ruminant Research. 2002 Apr 1;44(1):25-35.

6. Dhillon GS, Brar SK, Kaur S, Verma M. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. Industrial crops and products. 2013 Jan 1;41:78-84.

7. Cavallo E, Charreau H, Cerrutti P, Foresti ML. *Yarrowia lipolytica*: a model yeast for citric acid production. FEMS yeast research. 2017 Nov 2;17(8):fox084.

8. Anastassiadis S, Morgunov IG, Kamzolova SV, Finogenova TV. Citric acid production patent review. Recent patents on biotechnology. 2008 Jun 1;2(2):107-23.

9. Van der Walt JP, Von Arx JA. The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. Antonie van Leeuwenhoek. 1980 Nov 1;46(6):517-21.

10. Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribelarrea JL, Molina-Jouve C, Nicaud JM. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. Progress in lipid research. 2009 Nov 1;48(6):375-87.

11. Abou-Zeid AZ, Ashy MA. Production of critic acid: A review. Agricultural wastes. 1984 Jan 1;9(1):51-76.

12. Khosravi Darani K, Zoghi A, Alavi SA, Fatemi SS. Application of Plackett Burman design for citric acid production from pretreated and untreated wheat straw. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE). 2008 Mar 1;27(1):91-104.

13. Garg V, Dar RA, Phutela UG. Comparative evaluation of different pretreatment methods on biogas production from paddy straw. Journal of Applied and Natural Science. 2017 Sep 1;9(3):1525-33.

14. Soccol CR, Vandenberghe LP, Rodrigues C, Medeiros AB, Larroche C, Pandey A. Production of organic acids by solid-state fermentation. InCurrent Developments in Solid-State Fermentation 2008 (pp. 205-229). Springer, New York, NY.

15. Moeller L, Strehlitz B, Aurich A, Zehnsdorf A, Bley T. Optimization of citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*. Engineering in Life Sciences. 2007 Oct;7(5):504-11.

www.SID.ir

Archive of SID

response to pH perturbations: dependence of the stress response on the culture mode. Applied microbiology and biotechnology. 2017 Jan 1;101(1):351-66.

۲۶. نیکخواه م، مظاهری اسدی م. (۱۳۸۴) تولید اسیدسیتریک از تفاله خرما با استفاده از *آسپرژیلوس نایجر* در تخمیر حالت جامد، دومین همایش ملی بررسی ضایعات محصولات کشاورزی، ص ۱۷۲-۱۶۳.

27. Kamzolova SV, Shishkanova NV, Morgunov IG, Finogenova TV. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. FEMS yeast research. 2003 Apr 1;3(2):217-22.

28. Gonçalves FA, Colen G, Takahashi JA. *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. The Scientific World Journal. 2014;2014.

29. Rywińska A, Musiał I, Rymowicz W, Żarowska B, Boruczkowski T. Effect of agitation and aeration on the citric acid production by *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol. Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2012 May 1;42(3):279-91.

30. Nicaud JM. *Yarrowia lipolytica*. Yeast. 2012 Oct;29(10):409-18.

31. Souza KS, Schwan RF, Dias DR. Lipid and citric acid production by wild yeasts grown in glycerol. J Microbiol Biotechnol. 2014 Apr 1;24:497-506.

32. Bistanji G, Hamadeh S, Hassan SH, Tami F, Tannous R. The potential of agro-industrial byproducts as feeds for livestock in Lebanon. Livestock Research for Rural Development. 2000;12(3):1-6.

33. Soccol CR, Vandenberghe LP, Rodrigues C, Pandey A. New perspectives for citric acid production and application. Food Technology & Biotechnology. 2006 Apr 1;44(2).

www.SID.ir

Archive of SID

Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* in straw source in laboratory scale

Fatemeh Avayedi, **Behin Omidi***, Fatemeh Davodi

Department of Biology, Central Tehran branch, Islamic Azad University, , Tehran, Iran.

Abstract

Citric acid is the most important organic acid that used in food industry and pharmaceutical industry. Todays, microbial methods are used to produce citric acid. It is mostly produced by microbial fermentation using *Aspergillus niger*. *In this study we used Yarrowia lipolytica to biosynthesis of citric acid* by solid state fermentation from different sources of carbohydrates, such as glucose and straw. At first the culture with different source of carbon were Prepared and yeasts were inoculated and incubated at 25^0c, 180 rpm for 5 days then concentration of citric acid were measured by spectrophotometer 420 nm. For optimized of conditions such as pH, temperature and, rpm we used Taguchi method. Result that shown that *Yarrowia* lipolytica could to biosynthesis of citric acid in glucose and straw. In glucose culture the best condition was 30^0c, pH=5.25, 180 rpm and the amount of citric acid produced was 0.819 g/L. In straw culture the best condition was 32^0c, pH=4.5, 200 rpm and the amount of citric acid produced was 0/959 g/L. Referring to the results *Yarrowia lipolytica* had a good potential to biosynthesis of citric acid, in other hands One of the aim of biotechnology, which is the use of agricultural waste and scrap material as a source of food for microorganisms, in this study provided.

Keywords: Citric acid, Solid state fermentation, *Yarrowia lipolytica*, Straw, Taguchi method

* beh.omidi@iauctb.ac.ir

www.SID.ir