فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال اول، شماره ۱، زمستان ۱۳۸۷

بهینه سازی شرایط جهت تولید اسیدسیتریک از ضایعات خرما با استفاده از روش فاز مایع

حمید راشدی*[۱] و مهناز مظاهری‌اسدی[۲]

۱- دانشکده مهندسی شیمی دانشگاه تهران hrashedi@ut.ac.ir ۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

چکیده

از جمله محصولات غذایی، اسیدهای آلی است که به عنوان مواد افزودنی در صنایع غذایی و همچنین به عنوان مواد شیمیایی اولیه در بسیاری از صنایع کاربرد دارد. فرآیندهای تخمیری، نقش زیادی در تولید اکثر اسیدهای آلی دارند، به طوری که تمامی اسیدهای چرخه تری کربوکسیلیک اسید را می‌توان توسط میکروبها و با راندمان بالا تولید کرد. علاوه بر این اسیدهایی که به طور غیرمستقیم از چرخه کربس مشتق می‌شوند (مثل اسید ایتاکونیک) نیز می‌توانند توسط میکروارگانیسم‌ها تولید شوند. در این تحقیق سعی شده است که فرآیند تخمیری تولید اسیدسیتریک بر روی ضایعات خرما در دو بخش مورد بررسی قرار گیرد. بخش اول شامل شیره خرما است که با توجه به ترکیبات آن از نظر مواد قندی، مواد ازته و سایر مواد، محیط مناسبی برای تخمیر سیتریکی به نظر می‌رسد و بخش دوم شامل تفاله حاصل از شیره خرما است که پس از صاف کردن شیره بدست می‌آید و معمولاً یا از آن استفاده‌ای نمی‌شود و یا به صورت محدود پس از خشک کردن به عنوان خوراک دام استفاده می‌گردد. تفاله مذکور با توجه قند نسبتاً بالای آن (حدود ۳۵ درصد) به صورت تخمیر بستر جامد به منظور تولید اسید سیتریک مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که شیره خرما از نظر عوامل تغذیه‌ای مؤثر در فرآیند تخمیر، دارای پتانسیل خوبی برای تولید اسید سیتریک می‌باشد و علی‌رغم گران‌تر بودن قیمت آن نسبت به ملاس، دارای امتیازاتی مثل کمتر بودن ترکیبات و یونهای فلزی مزاحم و همچنین کمتر بودن احتمال آلودگی محیط در حین تخمیر (بواسطه امکان استفاده از pHهای پایین‌تر) می‌باشد که این محاسن در مجموع باعث می‌شود که شیره خرما، یک محیط جالبی برای تخمیر اسید سیتریک به نظر برسد.

واژگان کلیدی: اسید سیتریک، تخمیر غوطه‌وری، تخمیر فاز مایع، ضایعات خرما

مقدمه

بیوتکنولوژی دانشی است که در رابطه با استفاده از امکانات ژنتیکی موجودات زنده و یا متابولیتهای آنها جهت تولید فرآورده‌های مختلف غذایی، دارویی، شیمیایی و غیره در مقیاس صنعتی بحث می‌کند (۵) و یا به عبارت ساده‌تر موضوع اصلی در بیوتکنولوژی استفاده از قوای حیاتی ارگانیزم‌ها در جهت تولید محصولات مختلف می‌باشد (۱۶). در عین حال، از میان تمام اسیدهای آلی، فقط اسید سیتریک است که منحصراً از طریق تخمیر تولید می‌شود و برای تولید اسیدهای آلی دیگر، معمولاً

Archive of SID

www.SID.ir

بین فرآیندهای شیمیایی و بیولوژیکی رقابت عظیمی وجود دارد (۵). با توجه به گستردگی مصرف اسید سیتریک در صنایع مختلف (غذایی، دارویی، بهداشتی، آرایشی و...) و رقابت شدیدی که بین تولیدکنندگان این محصول در نقاط مختلف دنیا وجود دارد، کوشش‌های زیادی در جهت پایین آوردن هزینه‌های تولید به عمل آمده است. این فعالیت‌ها، بخش‌های مختلفی نظیر، بهینه‌سازی سوش، بهینه‌سازی محیط کشت و شرایط تخمیر، استفاده از مواد اولیه ارزان قیمت، پایین آوردن هزینه استخراج اسید سیتریک از مایع نهایی تخمیر و موارد دیگر را شامل می‌شود. در این ارتباط مطالعات زیادی نیز در جهت استفاده از ضایعات مختلف برای تولید اسیدسیتریک صورت گرفته است (۶،۷،۲۱،۲۲،۲۴ و ۲۶). با توجه به این که تولید صنعتی اسیدسیتریک در دنیا تقریباً از دهه ۱۹۲۰ شروع شده، ولی تاکنون در کشور ما علی‌رغم موارد استفاده فراوان، تولید نمی‌شود و هر ساله واردات آن، مقادیر زیادی از ارز مملکت را به خود اختصاص می‌دهد، از طرف دیگر ایران یکی از بزرگترین کشورهای تولید کننده خرما است، به طوری که در سال ۲۰۰۷ میلادی با تولیدی در حدود ۱۱۰۰هزار تن، رتبه اول را در دنیا به خود اختصاص داده است ولی متأسفانه مقادیر نسبتاً زیادی از خرمای تولیدی (حدود ۲۵ درصد) در مراحل مختلف تولید و فرآوری محصول و به دلایل مختلف ضایع می‌شوند. قسمت عمده این ضایعات بدون استفاده باقی مانده و فقط بخش کوچکی از آن برای تولید فرآورده‌هایی نظیر شیره خرما (عمدتاً به صورت سنتی) مورد استفاده قرار می‌گیرد. در صورتیکه به نظر می‌رسد امکان استفاده‌های بهینه‌تر از این ضایعات، خصوصاً در بخش بیوتکنولوژی وجود دارد. با توجه به موارد فوق هدف از انجام این تحقیق بهینه سازی شرایط جهت تولید اسیدسیتریک از ضایعات خرما با استفاده از روش فاز مایع بوده است.

مواد و روشها

تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های تفاله و شیره خرما

ابتدا نمونه‌هایی از شیره و تفاله خشک شده خرما از کارخانه پارس گهر که تولید کننده سرکه و شیره خرما می‌باشد، تهیه شد. سپس نمونه‌های تهیه شده برای اندازه‌گیری برخی از ترکیبات شیمیایی نظیر قندهای احیاء کننده (قبل و بعد از هیدرولیز) اسپکتروفتومتری با معروف اسید ۳ و ۵ دی‌نیتروسالیسیلیک (DNSA) (۹و۱۵)، ازت از روش میکروکلدال (۱و۲)، رطوبت با استفاده از آون در دمای $105^{\circ}C$ (۹) خاکستر با استفاده از کوره الکتریکی در دمای $^{\circ}C$ ۵۵۰ آماده سازی شدند(۹).

در روش DNSA اساس واکنش استفاده از اسید ۳ و ۵ دی‌نیتروسالیسیلیک (DNSA) که فقط با قندهای احیاء کننده وارد واکنش می‌شود. وقتی که این واکنش‌گر درحضور قندهای احیاء کننده حرارت داده می‌شود، براثر احیاء آن، محصولی به رنگ قهوه‌ای متمایل به قرمز به نام اسید ۳ و ۵ دی‌نیتروسالیسیلیک تولید می‌گردد، که با اندازه‌گیری شدت جذب آن در ۵۴۰nm و مقایسه با استانداردهای مربوط، می‌توان مقدار کربوهیدرات موجود در نمونه‌ها را پس از هیدرولیز آنها به قندهای احیاء کننده محاسبه نمود(۹).

سویه آسپرژیلوس نایجر (PTCC 5010) از بخش بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه، و در کلیه مراحل این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

برای تهیه سوسپانسیون اسپوری، حدود ۱۰ میلی لیتر از آب مقطر استریل و یا سرم فیزیولوژی حاوی Tween 80 ۰/۱ درصد (به‌منظور جداسازی بهتر اسپورها از یکدیگر و شمارش دقیق‌تر) را بر روی سطح اسلانت ریخته و پس از شستشو با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند (۲۰) و به این ترتیب سوسپانسیون حاوی 2×10^{8} اسپور در هر میلی‌لیتر تهیه گردید.

برای تهیه محیط پیش کشت، ابتدا شیره خرما (با غلظت قند ۵۷ درصد) تا رسیدن به غلظت قند ۱۰ درصد با آب مقطر رقیق گردید. سپس به‌منظور حذف فلزات سنگین به خصوص آهن و منگنز و همچنین به منظور ایجاد رسوب مناسب، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول ۰/۵ درصد فروسیانیدپتاسیم در حالت جوش به آن اضافه گردید. بقیه مراحل طبق روش Hustede در سال ۱۹۷۶ صورت پذیرفت (۲۸).

آماده‌سازی محیط کشت اصلی شیره خرما

برای تهیه محیط کشت اصلی شیره خرما ابتدا شیره خرما با استفاده از آب مقطر تا غلظت قند ۱۴ درصد رقیق

Archive of SID

www.SID.ir

گردید. سپس جهت حذف برخی از ناخالصی‌ها و مواد سلولزی موجود در آن به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ شده و محلول بدست آمده از آن به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر به ارلنهای ۵۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد. در ادامه به هر یک از ارلنهای حاوی محیط کشت مقادیر ۱٪ گرم فسفات هیدروژن پتاسیم و ۲٪ گرم سولفات منیزیم افزوده (۲۱) و پس از استریلیزاسیون و سرد کردن تا دمای محیط، عمل تلقیح توسط پلت‌های بدست آمده از محیط پیش کشت به میزان ۸ درصد انجام شد. با توجه به روش Poukas and Kotzekidou در سال ۱۹۹۷ (۲۲) مدت زمان تخمیر ۸ روز تعیین گشت. برای تعیین میزان تلقیح مناسب، مقادیر تلقیح ۴، ۶، ۸،۱۰و۱۲ درصد از محیط پیش کشت به محیط کشت اصلی مورد بررسی انتقال داده شد (۲۲و۲۱).

در شیره خرما با توجه به یون‌های فلزی مزاحم، خصوصاً آهن و منگنز، تیمار اولیه‌ای در جهت حذف یا کاهش آنها صورت پذیرفت (۲۱). به این ترتیب که از دو ماده فروسیانیدپتاسیم و تری‌کلسیم فسفات در مقادیر ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد (v/w) برای تیمارسازی اولیه شیره خرما استفاده گردید.

بهینه سازی تولید اسید سیتریک

تأثیر pH اولیه

با توجه به اهمیت pH اولیه در راندمان تولید اسیدسیتریک، pHهای اولیه ۳/۵، ۴ ، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶ و ۶/۵ در محیط کشت اصلی شیره خرما (تیمار شده با ۲۵٪ گرم در لیتر فروسیانیدپتاسیم) مورد مطالعه قرار گرفت. تنظیم pH قبل از استریلیزاسیون و با استفاده از اسیدکلریدریک و سودنرمال انجام گرفت (۲۰).

تأثیر متانول

بعد از این که محیط شیره خرما از نظر برخی از پارامترها نظیر فروسیانیدپتاسیم، pH و سولفات آمونیوم بهینه گردید. در مرحله بعد اثر متانول در جهت افزایش بیشتر راندمان تولید اسیدسیتریک مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق متانول در مرحله بعد از استریلیزاسیون به محیط کشت اصلی (تیمار شده با ۰/۲۵ g/L فروسیانید پتاسیم، ۲g/L سولفات آمونیوم و pH=۴/۵) در محدوده غلظت ۰/۵ تا ۲/۵ درصد (V/V) اضافه گردید (۲۰).

فرآیند تخمیر بستر جامد

پودر خشک شده تفاله خرما با اندازه ذرات حدود ۱ تا ۲ میلی‌متر به‌منظور تولید اسید سیتریک در فرآیند تخمیر بستر جامد با مقادیر ۲۰ گرم در ارلنهای ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و بعد از تنظیم رطوبت، در حرارت $121\ ^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردیدند. در ادامه ارلن‌های حاوی محیط کشت تا دمای محیط سرد شده و در شرایط استریل با ۱۰ درصد از پلت‌های حاصل از محیط پیش کشت تلقیح گردیدند (۲۳).

برای تنظیم رطوبت مطلوب، محدوده رطوبتی ۶۰ تا ۹۰ درصد، مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور به ارلن حاوی محیط کشت اصلی به ترتیب مقادیر ۱۲، ۱۴، ۱۶ و ۱۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد (۶و۷).

برای بررسی اثر فروسیانید پتاسیم ابتدا از محلول ۰/۵ درصد آن در حالت جوش، حجم‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌لیتر برداشته و سپس به ارلن‌های حاوی محیط کشت اصلی تفاله خرما (رطوبت ۸۰٪) در مرحله قبل از استریلیزاسیون اضافه گردید (۲۰). تنظیم pH قبل از استریلیزاسیون و با استفاده از اسید کلریدریک و سود نرمال انجام شد (۲۱).

در نهایت، به منظور افزایش تولید اسید سیتریک، اثر متانول در محدوده ۱ تا ۵ درصد (v/v) مورد بررسی قرار گرفت. به عبارت دیگر به ارلنهای حاوی تفاله خرما (تیمار شده با ۳ میلی لیتر از محلول ۰/۵ درصد رفروسیانید پتاسیم، pH=۴/۴ و رطوبت ۸۰ درصد) بعد از استریلیزاسیون و خنک شدن تا دمای محیط، حجم‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی لیتر از متانول اضافه گردید (۲۱).

روش اسپکتروفتومتری ماریروبولت (۱۳) در تعیین میزان اسید سیتریک استفاده شد. اساس این روش بر مبنای تشکیل رنگ در حضور پیریدین و انیدریداستیک می‌باشد.

نتایج و بحث

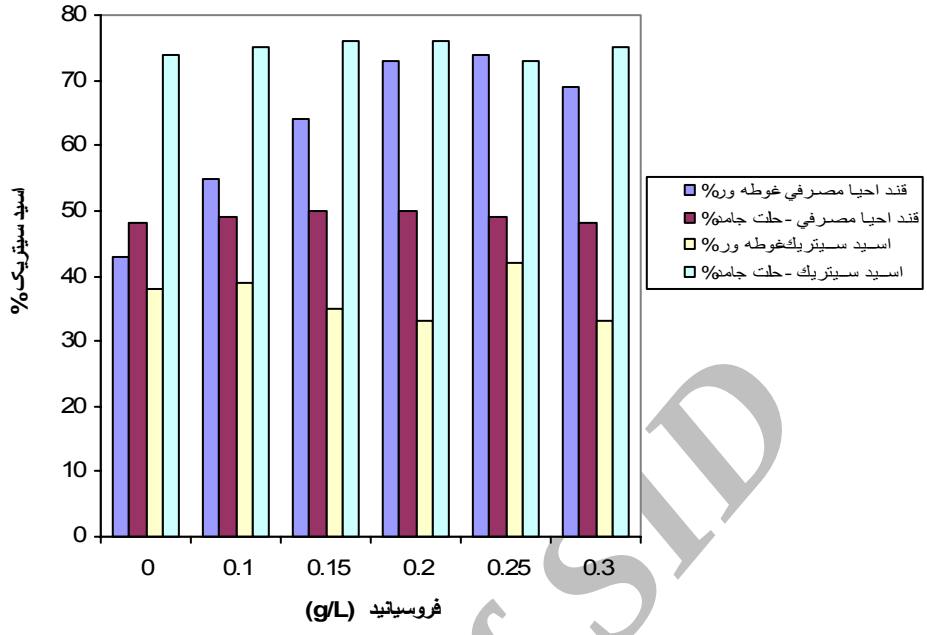
۱-آزمایشات مربوطه، برای تعیین میزان قندهای احیاء کننده (قبل و بعد از هیدرولیز)، ازت، خاکستر و

Archive of SID

www.SID.ir

رطوبت مواد اولیه (شیره و پودر تفاله خرما) با توجه به توضیحات ارائه شده در بخش مواد و روش‌ها انجام شد.

میانگین نتایج حاصل در جدول ۱ آورده شده است.



نمودار ۲. بررسی مطالعات غلظت فروسیانید بر بازدهی تولید اسید سیتریک بوسیله کشت غوطه ور

می‌توان عنوان کرد، علاوه بر این نکته که نتایج حاصله در این تحقیق در رابطه با فرآیند غوطه‌ور می‌باشد، عوامل دیگری مثل نوع سوش مورد استفاده، نحوه انجام تیمار و شرایط محیطی تخمیر را نیز می‌توان در این اختلاف مؤثر دانست.

براساس تحقیقات Roukas وKotzekidou (۲۱) در فرآیند کشت سطحی، استفاده از تری کلسیم فسفات جهت تیمارسازی اولیه شیره خرما، باعث افزایش راندمان در تولید اسید سیتریک می‌گردد. براین اساس در این تحقیق نیز تأثیر غلظت‌های مختلف تری کلسیم فسفات در فرآیند غوطه‌ور مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج بدست آمده در جدول ۲ نشان می‌دهد که افزودن تری کلسیم فسفات تا سطح ۱/۵٪ (w/v) باعث کاهش شدید رشد سلولی و افزایش مصرف قند احیاء می‌گردد. از طرف دیگر بیشترین مقدار تولید اسید سیتریک نیز در همین مقدار از تری کلسیم فسفات حاصل شده است.

جدول۲. تأثیرتیمار با غلظت‌های مختلف تری کلسیم فسفات در فرآیند غوطه‌ور تولید اسید سیتریک

تری کلسیم فسفات(٪)	pH نهایی	وزن خشک جرم سلولی (g/L)	قند احیاء مصرفی		راندمان اسید سیتریک	
			(٪)	(g/L)	(٪)	(g/L)
۰/۵	۲/۵	۳۷	۶۱/۹	۸۶/۷	۲۳/۷	۲۰/۶
۱	۲/۴	۳۴/۴	۶۹/۶	۹۷/۵	۲۴/۴	۲۳/۸
۱/۵	۲/۳	۲۴/۷	۷۰/۸	۹۹/۱	۳۴/۶	۳۴/۳
۲	۲/۳	۴۰/۲	۶۲/۳	۸۷/۵	۳۳/۴	۲۹/۲
۲/۵	۲/۳	۴۷/۵	۶۱/۱	۸۵/۶	۳۲/۸	۲۸/۱

دوره تخمیر ۸ روز، ترکیب محیط کشت: شیره خرما (۲۵۰g/L)، KH_2PO_4 (۰/۱g/L) و $MgSO_4\ 7H_2O$ (۰/۲g/L).

اعداد فوق میانگین نتایج حاصل از ۳ تکرار می‌باشند.

از نسبت معکوسی که بین رشد سلولی و مصرف قند احیاء وجود دارد می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که تری‌کلسیم فسفات تا غلظت مشخص (۱/۵ w/v٪) ضمن کاهش جرم سلولی، باعث تسریع در مصرف قند احیاء

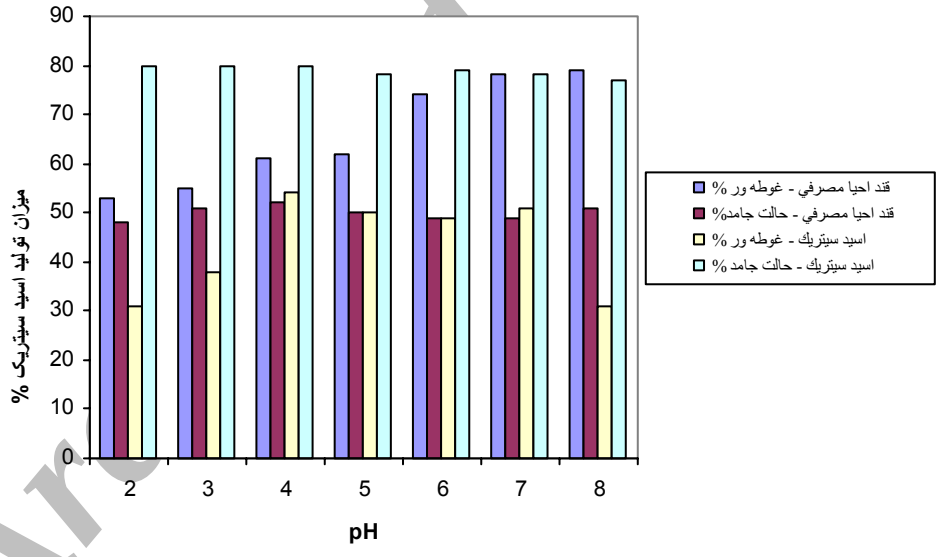
Archive of SID

www.SID.ir

می‌گردد. که این قند احیاء مصرفی، عمدتاً در جهت تولید اسیدسیتریک مورد استفاده قرار می‌گیرد.

با توجه به این که بیشترین تأثیر تری‌کلسیم فسفات همانند فروسیانید پتاسیم، حذف یون‌های فلزی مزاحم می‌باشد(۲۲)، بنابراین به نظر می‌رسد که غلظت مشخص از این ترکیب می‌تواند بیشترین پیوند را با این یونهای فلزی مزاحم (خصوصاً آهن و منگنز) برقرار کرده و آنها را به صورت کمپلکس از محیط خارج سازد که این عمل باعث بهبود در فرآیند تخمیری تولید اسید سیتریک می‌گردد. همانطور که در جدول ۲ مشخص است بالاترین میزان تولید اسید سیتریک یعنی ۳۴/۳ g/L در سطح ۱/۵٪ از تری کلسیم فسفات بدست آمده است، که البته این مقدار کمتر از راندمان ۵۵ g/L است که از طرف Roukas و Kotzekidou (۲۲) در سیستم تخمیر سطحی و دوره تخمیر ۱۴ روزه گزارش شده است. عواملی نظیر نوع سیستم تخمیری مورد استفاده، نوع سوش، مدت زمان تخمیر و عوامل دیگر را می‌توان در این اختلاف بین نتایج مؤثر دانست. به طور کلی در مورد تیمار اولیه شیره خرما با توجه به نتایج حاصل از آزمایشات، می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که در سیستم غوطه‌و، استفاده از فروسیانید پتاسیم از نظر بهبود در فرآیند تولید اسید سیتریک، نتایج بهتری را در مقایسه با استفاده از تری کلسیم فسفات، به همراه داشته است.

همانطور که در نمودار ۳ قابل مشاهده است تنظیم pH اولیه در چگونگی انجام تخمیر و راندمان تولید اسید سیتریک بسیار مؤثر است. با افزایش pH اولیه از ۳/۵ تا ۶/۵ شرایط برای رشد سلولی مناسب‌تر شده و ضمن مصرف قند بیشتر، بیومس یا جرم سلولی بیشتری نیز تولید می‌شود. در مورد تولید اسید سیتریک وضعیت به این صورت است که تا pH اولیه ۴/۵ تا ۶ ، تولید اسید سیتریک در بیشترین حد خود قرار داشته و از pH حدود ۵/۵ به بعد با یک کاهش نسبی رو به رو می‌شود.



نمودار ۳. بررسی مطالعات pH بر روی قند احیا مصرفی و بازدهی تولید اسید سیتریک بوسیله کشت غوطه ور

در واقع تنظیم pH یکی از راههای کنترل فرآیند تخمیر در جهت تولید محصول مورد نظر است. در مورد تولید اسید سیتریک همانطور که در منابع آورده شده است، شرایط محیط کشت نمی‌بایست به گونه‌ای باشد که اجازه رشد سلولی نامحدودی را به قارچ آسپرژیلوس نایجر بدهد، زیرا که در این شرایط قند محیط صرفاً در جهت افزایش مقدار توده سلولی، مصرف شده و اسید سیتریکی تولید نخواهد شد. با تنظیم pH اولیه، ضمن کنترل رشد سلولی، می‌توان شرایط تخمیر را در جهت تولید اسید سیتریک تغییر داد (۱۶ و ۱۹) از محدوده اپتیمم pH بدست آمده (۴/۵ تا ۶)، pH اولیه ۴/۵ که pH طبیعی شیره خرما است برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. با انتخاب این pH، احتمال آلوده شدن محیط کشت در طول فرآیند تخمیر نیز به حداقل می‌رسد. همانطوریکه در نمودار۳ مشخص است، در کشت بستر جامد، مقدار تولید اسید سیتریک در pH=۴/۴ که pH

Archive of SID

www.SID.ir

طبیعی پودر خرما است نسبت به سایر سطوح pH بیشتر می‌باشد. روند مصرف قند احیاء نیز تا pH=۵/۵ افزایش پیدا کرده و بعد از آن اندکی کاهش می یابد. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که سطوح مختلف pH از نظر آماری تأثیر معنی‌داری بر روی مقدار اسید سیتریک تولیدی و قند احیاء مصرفی دارند. همچنین در مقایسه میانگین‌های اسید سیتریک تولیدی نیز این نتیجه حاصل شد که بین سطوح pH۴/۴ و ۵/۵ در سطح احتمال ۵ درصد، اختلاف معنی داری وجود ندارد اما بین این دو pH با سطوح دیگر pH ، در سطح احتمال ۵درصد، اختلاف معنی داری مشاهده می‌گردد، در عین حال بیشترین مقدار مصرف قند احیاء نیز در این محدوده از pH حاصل شده است (نمودار۳). حساسیت کمتر محیط کشت‌های جامد نسبت به شرایط محیطی و از جمله pH سبب می‌شود که امکان استفاده از pHهای پایین‌تر در اینگونه محیط‌ها وجود داشته باشد (۵) که این مسئله به خصوص در فرآیند تولید اسید سیتریک، علاوه بر تأثیر مثبتی که بر روی راندمان می‌گذارد، احتمال آلودگی محیط کشت را نیز کاهش می‌دهد. نتایج حاصل از این آزمایش نیز، مطالب فوق را تأیید می‌کند.

در فرآیند تخمیر سیتریکی همچون سایر فرآیندهای تخمیری نسبت بین کربن و نیتروژن از اهمیت ویژه ای برخوردار است. با توجه به ناچیز بودن مقدار ازت موجود در شیره خرما از سولفات آمونیوم به عنوان منبع ازت محیط کشت استفاده شد و غلظت‌های مختلف آن در فرآیند تولید اسید سیتریک مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در بررسی منابع به تفصیل آمده است هرچند که در ابتدا اعتقاد بر این بود که شرایط اساسی برای تولید اسید سیتریک، ایجاد محدودیت در میزان ازت است (۱۱) ولی تحقیقات بعدی نشان دادند که در صورت وجود محدودیت در میزان فسفات و برخی از یونهای فلزی خصوصاً منگنز و آهن، وجود ازت نه تنها مانعی برای تولید اسید سیتریک نیست بلکه مقدار مشخصی از آن باعث بالا رفتن راندمان تولید اسید سیتریک می‌گردد. با توجه به ناچیز بودن مقدار فسفات در شیره خرما (۳) و همینطور تیمارسازی اولیه آن با استفاده از فروسیانید پتاسیم به منظور حذف یونهای فلزی، قابل پیش‌بینی بود که استفاده از مقادیر مشخصی از یک منبع ازت (سولفات آمونیوم) می‌تواند منجر به افزایش در تولید اسید سیتریک گردد (۱۲و۲۵).

جدول۲. تأثیرتیمار با غلظت‌های مختلف تری کلسیم فسفات در فرآیند غوطه‌ور تولید اسید سیتریک

تری کلسیم فسفات(٪)	pH نهایی	وزن خشک جرم سلولی (g/L)	قند احیاء مصرفی		راندمان اسید سیتریک	
			(٪)	(g/L)	(٪)	(g/L)
۰/۵	۲/۵	۳۷	۶۱/۹	۸۶/۷	۲۳/۷	۲۰/۶
۱	۲/۴	۳۴/۴	۶۹/۶	۹۷/۵	۲۴/۴	۲۳/۸
۱/۵	۲/۳	۲۴/۷	۷۰/۸	۹۹/۱	۳۴/۶	۳۴/۳
۲	۲/۳	۴۰/۲	۶۲/۳	۸۷/۵	۳۳/۴	۲۹/۲
۲/۵	۲/۳	۴۷/۵	۶۱/۱	۸۵/۶	۳۲/۸	۲۸/۱

*دوره تخمیر ۸ روز، ترکیب محیط کشت: شیره خرما (۲۵۰g/L)، KH_2PO_4 (۰/۱g/L) و $MgSO_4\ 7H_2O$ (۰/۲g/L).

اعداد فوق میانگین نتایج حاصل از ۳ تکرار می‌باشند. از نسبت معکوسی که بین رشد سلولی و مصرف قند احیاء وجود دارد می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که تری‌کلسیم فسفات تا غلظت مشخص (۱/۵ ٪ w/v) ضمن کاهش جرم سلولی، باعث تسریع در مصرف قند احیاء می‌گردد. که این قند احیاء مصرفی، عمدتاً در جهت تولید اسیدسیتریک مورد استفاده قرار می‌گیرد.

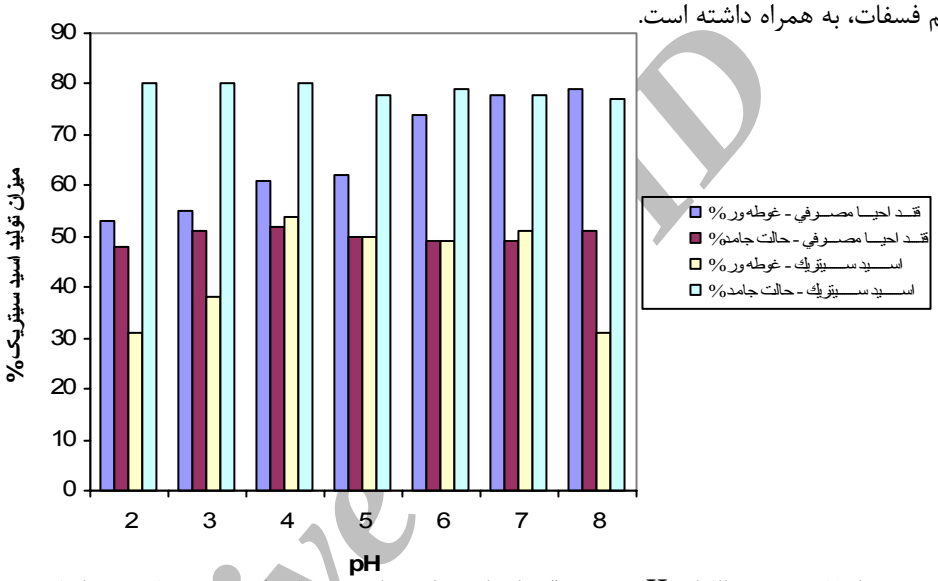
با توجه به این که بیشترین تأثیر تری‌کلسیم فسفات همانند فروسیانید پتاسیم، حذف یون‌های فلزی مزاحم می‌باشد (۲۲)، بنابراین به نظر می‌رسد که غلظت مشخص از این ترکیب می‌تواند بیشترین پیوند را با این یونهای فلزی مزاحم (خصوصاً آهن و منگنز) برقرار کرده و آنها را به صورت کمپلکس از محیط خارج سازد که این عمل باعث بهبود در فرآیند تخمیری تولید اسید سیتریک می‌گردد. همانطور که در جدول ۲ مشخص است بالاترین میزان تولید اسید سیتریک یعنی g/L ۳۴/۳ در سطح ۱/۵٪ از تری کلسیم فسفات بدست آمده است، که البته این مقدار کمتر از راندمان g/L ۵۵ است که از

Archive of SID

www.SID.ir

طرف Roukas و Kotzekidou (۲۲) در سیستم تخمیر سطحی و دوره تخمیر ۱۴ روزه گزارش شده است. عواملی نظیر نوع سیستم تخمیری مورد استفاده، نوع سوش، مدت زمان تخمیر و عوامل دیگر را می‌توان در این اختلاف بین نتایج مؤثر دانست. به طور کلی در مورد تیمار اولیه شیره خرما با توجه به نتایج حاصل از آزمایشات، می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که در سیستم غوطه‌و، استفاده از فروسیانید پتاسیم از نظر بهبود در فرآیند تولید اسید سیتریک، نتایج بهتری را در مقایسه با استفاده از تری کلسیم فسفات، به همراه داشته است.

همانطور که در نمودار ۳ قابل مشاهده است تنظیم pH اولیه در چگونگی انجام تخمیر و راندمان تولید اسید سیتریک بسیار مؤثر است. با افزایش pH اولیه از ۳/۵ تا ۶/۵ شرایط برای رشد سلولی مناسب‌تر شده و ضمن مصرف قند بیشتر، بیومس یا جرم سلولی بیشتری نیز تولید می‌شود. در مورد تولید اسید سیتریک وضعیت به این صورت است که تا pH اولیه ۴/۵ تا ۶ ، تولید اسید سیتریک در بیشترین حد خود قرار داشته و از pH حدود ۵/۵ به بعد با یک کاهش نسبی رو به رو می‌شود.



نمودار ۳. بررسی مطالعات pH بر روی قند احیا مصرفی و بازدهی تولید اسید سیتریک بوسیله کشت غوطه ور

در واقع تنظیم pH یکی از راههای کنترل فرآیند تخمیر در جهت تولید محصول مورد نظر است. در مورد تولید اسید سیتریک همانطور که در منابع آورده شده است، شرایط محیط کشت نمی‌بایست به گونه‌ای باشد که اجازه رشد سلولی نامحدودی را به قارچ آسپرژیلوس نایجر بدهد، زیرا که در این شرایط قند محیط صرفاً در جهت افزایش مقدار توده سلولی، مصرف شده و اسید سیتریکی تولید نخواهد شد. با تنظیم pH اولیه، ضمن کنترل رشد سلولی، می‌توان شرایط تخمیر را در جهت تولید اسید سیتریک تغییر داد (۱۶ و ۱۹) از محدوده اپتیمم pH بدست آمده (۴/۵ تا ۶)، pH اولیه ۴/۵ که pH طبیعی شیره خرما است برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. با انتخاب این pH، احتمال آلوده شدن محیط کشت در طول فرآیند تخمیر نیز به حداقل می‌رسد. همانطوریکه در نمودار۳ مشخص است، در کشت بستر جامد، مقدار تولید اسید سیتریک در pH=۴/۴ که pH طبیعی پودر خرما است نسبت به سایر سطوح pH بیشتر می‌باشد. روند مصرف قند احیاء نیز تا pH=۵/۵ افزایش پیدا کرده و بعد از آن اندکی کاهش می یابد. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که سطوح مختلف pH از نظر آماری تأثیر معنی‌داری بر روی مقدار اسید سیتریک تولیدی و قند احیاء مصرفی دارند. همچنین در مقایسه میانگین‌های اسید سیتریک تولیدی نیز این نتیجه حاصل شد که بین سطوح pH۴/۴ و ۵/۵ در سطح احتمال ۵ درصد، اختلاف معنی داری وجود ندارد اما بین این دو pH با سطوح دیگر pH ، در سطح احتمال ۵درصد، اختلاف معنی داری مشاهده می‌گردد، در عین حال بیشترین مقدار مصرف قند احیاء نیز در این محدوده از pH حاصل شده است (نمودار۳). حساسیت کمتر محیط کشت‌های جامد نسبت به شرایط محیطی و از جمله pH

Archive of SID

www.SID.ir

سبب می‌شود که امکان استفاده از pHهای پایین‌تر در اینگونه محیط‌ها وجود داشته باشد (۵) که این مسئله به خصوص در فرآیند تولید اسید سیتریک، علاوه بر تأثیر مثبتی که بر روی راندمان می‌گذارد، احتمال آلودگی محیط کشت را نیز کاهش می‌دهد. نتایج حاصل از این آزمایش نیز، مطالب فوق را تأیید می‌کند.

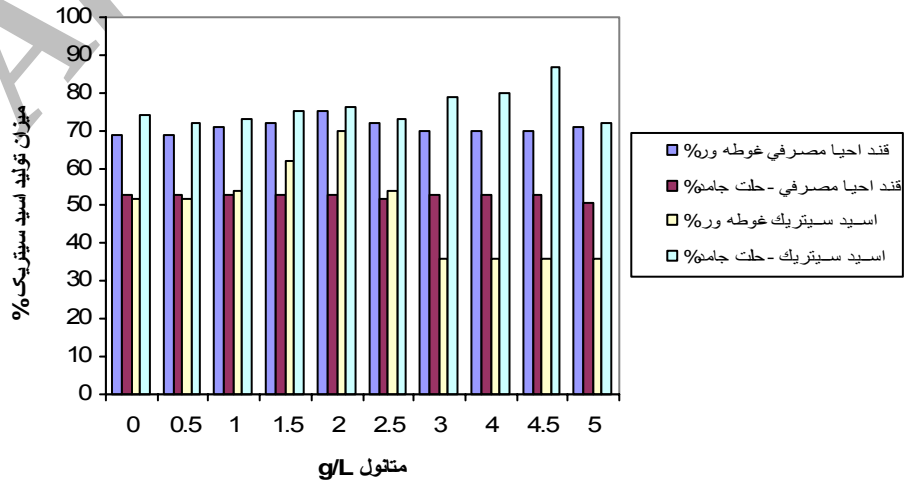
در فرآیند تخمیر سیتریکی همچون سایر فرآیندهای تخمیری نسبت بین کربن و نیتروژن از اهمیت ویژه ای برخوردار است. با توجه به ناچیز بودن مقدار ازت موجود در شیره خرما از سولفات آمونیوم به عنوان منبع ازت محیط کشت استفاده شد و غلظت‌های مختلف آن در فرآیند تولید اسید سیتریک مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در بررسی منابع به تفصیل آمده است هرچند که در ابتدا اعتقاد بر این بود که شرایط اساسی برای تولید اسید سیتریک، ایجاد محدودیت در میزان ازت است (۱۱) ولی تحقیقات بعدی نشان دادند که در صورت وجود محدودیت در میزان فسفات و برخی از یونهای فلزی خصوصاً منگنز و آهن، وجود ازت نه تنها مانعی برای تولید اسید سیتریک نیست بلکه مقدار مشخصی از آن باعث بالا رفتن راندمان تولید اسید سیتریک می‌گردد. با توجه به ناچیز بودن مقدار فسفات در شیره خرما (۳) و همینطور تیمارسازی اولیه آن با استفاده از فروسیانید پتاسیم به منظور حذف یونهای فلزی، قابل پیش‌بینی بود که استفاده از مقادیر مشخصی از یک منبع ازت (سولفات آمونیوم) می‌تواند منجر به افزایش در تولید اسید سیتریک گردد (۱۲و۲۵).

جدول ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات آمونیوم در فرآیند تولید اسید سیتریک (تخمیر غوطه‌ور)

سولفات آمونیوم (g/L)	pH نهایی	وزن خشک جرم سلولی (g/L)	قند احیاء مصرفی(٪) (g/L)		راندمان اسید سیتریک (٪) (g/L)	
۰/۵	۲/۴	۲۱/۴	۵۸/۱	۸۱/۴	۴۸/۷	۳۹/۷
۱	۲/۴	۲۲/۲	۶۱/۵	۸۶/۱	۵۲/۴	۴۵/۱
۱/۵	۲/۳	۲۵/۶	۶۷/۲	۹۴/۱	۵۳/۰	۵۰/۳
۲	۲/۳	۲۶/۵	۶۸/۶	۹۶/۱	۵۴/۷	۵۲/۶
۲/۵	۲/۵	۳۳/۷	۵۲/۴	۷۳/۴	۴۹/۴	۳۶/۳

*دوره تخمیر ۸ روز، تیمار با فروسیانید پتاسیم (۰/۲۵ g/L) ، ترکیب محیط کشت: شیره خرما (۲۵۰ g/L)، KH_2PO_4 (۰/۱g/l)، $MgSO_47H_2O$ (۰/۲g/L) و pH=۴/۵ .

نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف متانول، نشان می‌دهد که با افزایش غلظت متانول تا سطح ۲٪ (v/v) ضمن مصرف بیشتر قند احیاء مقدار تولید اسید سیتریک نیز به نحو چشمگیری افزایش پیدا کرده است. اثر متانول در این آزمایش به خصوص در رشد سلولی کاملاً مشخص بوده و همانطور که در نمودار ۴مشخص است، با افزایش غلظت متانول دائما از وزن توده میسیلیومی کاسته می‌گردد.



نمودار ۴. بررسی مطالعات متانول بر روی قند احیا مصرفی و بازدهی تولید اسید سیتریک بوسیله کشت غوطه ور

Archive of SID

www.SID.ir

در این بررسی به وضوح مشاهده شد که متانول علاوه بر محدود کردن رشد سلولی، تغییراتی نیز در مورفولوژی توده سلولی ایجاد می‌کند. بطوریکه در مقایسه با توده‌های بزرگ میسیلیومی حاصل از محیط فاقد متانول، در محیط‌هایی که حاوی درصدهای بالاتری از متانول بودند، توده های کوچکتر و متراکم تر میسیلیومی تشکیل شده بود. مکانیسم عمل متانول در فرآیند تخمیر سیتریکی هنوز به طور کامل مشخص نشده است ولی به احتمال زیاد اثر آن در افزایش راندمان تولید اسید سیتریک مربوط به تغییر خواص کارکردی و نفوذپذیری غشای سلولی قارچ آسپرژیلوس نایجر می‌باشد(۱۰). افزایش قابل ملاحظه‌ای که با استفاده از درصد مشخصی از متانول در راندمان تولید اسید سیتریک بدست آمده با نتایج دانشمندان دیگری که در این زمینه تحقیق کرده‌اند، مطابقت می‌کند (۷، ۸، ۱۰ و ۲۲).

مطابق نمودار ۴ در کشت جامد بیشینه تولید اسید سیتریک در فاصله روزهای ششم تا هشتم از دوره تخمیری (هم زمان با انتهای فاز رشد لگاریتمی و ابتدای فاز سکون در آسپرژیلوس نایجر) اتفاق می‌افتد. همانطور که مشخص است مصرف قند احیاء در ۲ روز اول با شدت بیشتر و در روزهای بعدی با روند آهسته‌تری افزایش پیدا می‌کند. در مورد جرم سلولی نیز بیشترین مقدار، مربوط به روزهای دوم تا چهارم بوده و بعد از روز چهارم از شدت رشد سلولی کاسته می‌گردد. همانطوریکه از نتایج مشخص است، استفاده از متانول در محدوده مورد بررسی، اثر چندانی در افزایش اسید سیتریک نداشته و اختلاف کمی بین مقادیر اسید سیتریک حاصل در غلظت‌های مختلف متانول دیده می‌شود در حالیکه در تخمیر غوطه‌ور، تغییر غلظت متانول حتی در مقادیر کم، اثرات به مراتب بیشتری در راندمان تولید اسید سیتریک ایجاد می‌کرد. در مورد قند احیاء مصرفی با افزایش درصد متانول مقدار آن تقریباً ثابت باقی می‌ماند (نمودار۴).

نتایج حاصل از بررسی درصدهای مختلف رطوبت در کشت جامد، نشان می‌دهد که بالاترین میزان تولید اسید سیتریک در محدوده رطوبتی ۷۰ تا ۸۰ درصد حاصل شده است. ضمن اینکه بیشترین مصرف قند احیاء نیز در بالاترین درصد رطوبتی یعنی رطوبت ۹۰درصد بدست آمده است. در رطوبت‌های پایین‌تر از ۶۰درصد عملاً رشدی از قارچ مشاهده نمی‌شد و در رطوبت‌های بالاتر از ۹۰ درصد نیز، آسپرژیلوس نایجر، سریعاً وارد فاز اسپورزایی شده و تولید اسپور می‌کرد که این مسأله در فرآیند تخمیر سیتریکی مطلوب نبوده و باعث افت و کاهش راندمان در تولید اسید سیتریک میگردد. در واقع با ورود قارچ به مرحله اسپورزایی، قند موجود در محیط کشت به جای تبدیل به اسید سیتریک، در جهت تولید اسپور مصرف می‌گردد. بنابراین در فرآیند تخمیر بستر جامد، شرایط محیطی می‌بایست به گونه‌ای مهیا شود که تا حد امکان ورود قارچ به مرحله اسپورزایی به تأخیر بیفتد که یکی از عوامل مهم در این رابطه، تنظیم رطوبت اولیه محیط کشت است. جدول ۴ ، تأثیر درصدهای مختلف رطوبت اولیه را در فرآیند تخمیر بستر جامد نشان می‌دهد.

جدول ۴. تأثیر درصدهای مختلف رطوبت در فرآیند تولید اسید سیتریک (تخمیر بستر)

رطوبت(٪)	pH نهایی	راندمان اسید سیتریک		قند احیاء مصرفی	
		(٪)[1]	(g/kg)	(٪)[2]	(g/kg)
۶۰	۲/۷	۶۸/۲	۱۱۵/۱	۴۵/۶	**۱۶۸/۷**
۷۰	۲/۶	۷۲/۹	۱۲۹/۷	۴۸/۱	**۱۷۸/۰**
۸۰	۲/۶	۷۰/۸	۱۳۴/۰	۵۱/۱	**۱۸۹/۳**
۹۰	**۲/۷**	**۶۲/۶**	**۱۱۸/۹**	**۵۱/۳**	**۱۸۹/۹**

*۱۰۰× قند احیاء مصرفی / اسید سیتریک تولیدی = درصد راندمان اسید سیتریک۱

*۱۰۰× قند احیاء مصرفی / کل قند پودر تفاله خرما = درصد راندمان احیاء مصرفی۲

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که شیره خرما از نظر عوامل تغذیه‌ای مؤثر در فرآیند تخمیر، دارای پتانسیل خوبی برای تولید اسید سیتریک می‌باشد و علی‌رغم گران‌تر بودن قیمت آن نسبت به ملاس، دارای امتیازاتی مثل کمتر بودن ترکیبات و یونهای فلزی مزاحم و همچنین کمتر بودن احتمال

Archive of SID

www.SID.ir

آلودگی محیط در حین تخمیر (بواسطه امکان استفاده از pHهای پایین‌تر) می‌باشد که این محاسن در مجموع باعث می‌شود که شیره خرما، یک محیط جالبی برای تخمیر اسید سیتریک به نظر برسد. از سوی دیگر، تیمارسازی اولیه و بهینه کردن شیره خرما (از نظر مواد مغذی و شرایط محیطی)، برای دستیابی به یک راندمان بالاتر از اسید سیتریک ضروری است. همچنین استفاده از فروسیانید پتاسیم به منظور حذف یون‌های فلزی مزاحم، تأثیر نسبتاً مطلوبی در افزایش راندمان تولید اسید سیتریک دارد.

از میان عوامل مورد بررسی، اثرات حاصل از عوامل pH، ازت و متانول، در افزایش راندمان اسید سیتریک، به مراتب بیشتر از عوامل دیگر می‌باشد.

پودر تفاله خرما، هم از نظر قیمت و هم از نظر عناصر مغذی در فرآیند تخمیر، محیط مناسبی برای تولید اسید سیتریک می‌باشد. بهینه سازی شرایط محیطی خصوصاً رطوبت اولیه، نقش مهمی در فرآیند تخمیر اسید سیتریک و افزایش راندمان تولید دارد.

یکی از امتیازات تخمیر بستر جامد، نسبت به تخمیر غوطه‌ور، حساسیت کمتر آن به pHهای پایین و یونهای فلزی مزاحم می‌باشد که احتمالاً به همین دلیل، استفاده از فروسیانید پتاسیم در تفاله خرما، تأثیر چندانی در افزایش راندمان اسید سیتریک نمی‌گذارد. استفاده از متانول در تخمیر بستر جامد (پودر تفاله خرما) تأثیر ناچیزی در افزایش تولید اسید سیتریک ایجاد می‌کند.

منابع

۱- پروانه، و. (۱۳۷۱). کنترل کیفی و آزمایشهای شیمیایی مواد غذایی. چاپ دوم. مؤسسه چاپ و انتشارات دانشگاه تهران.

۲- حسینی، ز.(۱۳۶۹). روش‌های متداول در تجزیه مواد غذایی. چاپ اول. انتشارات دانشگاه شیراز.

3- Abou-zeid A. A.; Khoja S. M, (1993). Utilization of dates in the fermentative formation of citric acid by yarrowia lipolytica. Zentralba. Microbiol., **148**: 213 - 221.

4- Brock T. D.; Madigan T. M, (1994). Microbial Biotechnology. McGraw Hill Company, 373-377.

5- Crueger W; Crueger A, (1990). Biotechnology, A text book of industrial Microbiology. Sinauer Associates, Inc. Sunderland.

6- Hang Y. D; Woodams E. E, (1984). Apple pomace: a potential substrate for citric acid production by A. niger. Biotechnol. Lett, **5**: 763-764.

7- Hang Y. D; Luh B. S; Woodams E. E, (1987). Microbial production of citiric acid by solid state fermentation of kiwi fruit peel. J. Food Sci, **52**(1): 226-227.

8- Hang Y. D; Splittstoesser D. E; Woodams E. E; Sherman R. M, (1977). Citric acid fermentation of brewery waste. J. Food Sci, **42**: 383-384.

9- James C. S, (1995). Analytical Chemistry of foods. Chapman and Hall.

10- Kapoor K. K; Chaudhary K; Tauro P, (1982). Citric Acid In: G.Reed (ed). Prescottand duns industrial minrobiology. AVI Publishing Co, Westport, CT.

11- Kristiansen B; Sinclair C. G, (1979). Production of Citric acid in continous culture. Biotechnol. Bioeng, **21**: 297.

12- Kubicek C. P; Rohr M, (1977). Influence of managanese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in Aspergillus niger. Eur. J. Appl. Microbiol; **4**: 167-175.

13- 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.

14- Martin S. M, (1955). Effect of ferrocyanide on growth and citric acid production of Aspergillus niger. Can. J. Microbiol; **1**: 644-652.

15- Miller G. I, (1954). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chem; **31**: 426-428.

16- 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. 51-69.

Archive of SID

www.SID.ir

17- Nandi P; Mishra A. K, (1972). A new process for citric acid production from deionized cane molasses and refined cane sugar. Ferment. Technol. Today, **1**(2): 209-213.

18- Ogawa T; Fazeli A, (1976). Additive effect of ferrocyanide treatment and step change pf PH on citric acid production from Iranian beet molasses with Aspergillus niger. J. Ferment, **54**(2):63-67.

19- Rohr M; Kubicek C. P; Kominek J, (1986). Citric acid. In: H. J. Rehm and G. Reed (eds). Biotechnology. **3**: 440-444.

20- Roukas T; Kotzekidou P, (1986). Production of citric from brewerg wastes by surface fermentation using Aspergillus niger. J. Food Sci, **51**: 225-226.

21- Roukas T; Kotzekidou P, (1988). The effect of pH on production of citric and gluconic acid from beet molasses using culture. Biotech. Lett, **10**(4): 289-294.

22- Roukas T; Kotzekidou P, (1997). Pretreatment of date syrup to increase citric acid production. Enzyme. Microb. Technol, **4**(21): 273-276.

Archive of SID

www.SID.ir