مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره سوم (پیاپی ۲۴) پاییز ۱۳۹۴
صفحات ۲۴۷-۲۴۱

Original Article

بهینه سازی تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر* در حضور و عدم حضور ترکیب SR63

سید رسول طیب*[1]، محمد مهدی متقی[2]، بابک خیرخواه[2]

[1] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کرمان، گروه میکروب شناسی، [2] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: اسید سیتریک یکی از مهم ترین اسیدهای آلی می باشد که مصرف آن در جهان از اهمیت بالایی برخوردار بوده و سالیانه تقاضای آن رو به افزایش است. این مطالعه با هدف بهینه سازی تولید اسید سیتریک توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در حضور و عدم حضور ترکیب SR63 انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه به منظور جداسازی *آسپرژیلوس نایجر* از نمونه های مختلف محیطی شامل هوا، سطح برگ گیاهان، آب و خاک استفاده گردید. جدایه های برتر از نظر تولید اسید سیتریک بر روی محیط اختصاصی چاپ کداکس آگار غربالگری شدند. به منظور افزایش بازده تولید، ترکیب SR63 به محیط کشت مایع تخمیری اضافه گردید. بهینه‌سازی شرایط تخمیر، دمای محیط کشت و زمان تخمیر مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در مجموع ۱۰ جدایه از محیط های مختلف به دست آمد که تنها یکی از آنها از نظر تولید اسید سیتریک نسبت به بقیه عملکرد بهتری داشت. از نظر بهینه سازی بهترین نتیجه در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس، مدت زمان ٦ روز و استفاده از رقت ۰/۰۱۲۵ گرم بر لیتر از ترکیب SR63 در pH ۵ به دست آمد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده، ترکیب SR63 با جلوگیری از رشد بیشتر ریسه های قارچ *آسپرژیلوس نایجر* می تواند موجب افزایش در تولید اسید سیتریک گردد.

واژگان کلیدی: *آسپرژیلوس نایجر*، اسید سیتریک، ترکیب SR63.

دریافت مقاله: آذر ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: اسفند ماه ۹۳

مقدمه

اسید سیتریک یا ۲-هیدروکسی۱، ۲، ۳ پروپان تری کربوکسیلیک اسید یک محصول مهم در تجارت جهانی است (۱). این ترکیب به دلیل انحلال پذیری در آب، طعم ترش مطبوع، خواص بافری، عدم سمیت، جذب آسان و شرکت در واکنش های شیمیایی به وسیله سازمان بهداشت و خواروبار جهانی برای استفاده در صنایع غذایی، داروئی و بهداشتی تأیید شده است (۲).

در قرن بیستم میلادی میزان مصرف اسید سیتریک در جهان بسیار بالا گزارش شده و این اسید آلی به عنوان یکی از بزرگترین محصولات بیوتکنولوژی صنعتی مطرح می باشد. بر اساس آمار موجود، میزان اسید سیتریک تولیدی از طریق فرآیند تخمیر بالغ بر ۷۰۰,۰۰۰ تن در سال است (۳).

از مجموع اسید سیتریک مصرفی جهان، ۷۵-۷۰ درصد در صنایع غذایی، ۱۲-۱۰ درصد در صنایع دارویی و بهداشتی و ۱۸-۱۵ درصد باقی مانده به صنایع دیگر اختصاص می یابد (٤).

*) آدرس برای مکاتبه: کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات.
تلفن: ۰۹۱۳۲۹٦٤۰۵۲ پست الکترونیک: s.rasool.t@gmail.com

امروزه از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*) برای تولید تجاری و موفق اسید سیتریک استفاده می شود. به طوری که با تنظیم شرایط، تولید اسیدهای آلی دیگر مانند اسید اگزالیک، اسید ایزوسیتریک و غیره می تواند متوقف گردد و تولید اسید سیتریک آغاز شود (۵).

با پیشرفت روش های تجزیه ای، مطالعات زیادی بر روی نقش ریز مغذی ها در تخمیر اسید سیتریک صورت گرفته است (۵). برای رسیدن به بازده بهینه در تولید این محصول، به کارگیری مقادیر مناسبی از روی، منگنز، آهن، مس و مولیبدن در محیط رشدی *آسپرژیلوس نایجر* ضروری است. از این میان نقش عنصر آهن جالب توجه می باشد.

به منظور حداکثر رشد قارچ به غلظت های بالاتر آهن نیاز است. اما برای حداکثر تولید اسید سیتریک تنها به ۰/۰۵ تا ۰/۵ میلی گرم در لیتر آهن نیاز می باشد. میزان آهن مورد نیاز به نوع کربوهیدرات مصرفی بستگی دارد. به عنوان نمونه در مورد ساکارز خالص، ۲ میلی گرم در لیتر آهن برای رشد مناسب است. اما اگر مواد اولیه ای مانند قند انورت یا نشاسته هیدرولیز شده استفاده شوند، ۰/۲ میلی گرم در لیترآهن برای رشد کافی است (٦).

آسپرژیلوس نایجر به برخی از عناصر برای رشد نیاز دارد. در مقابل، محدود بودن برخی عناصر برای تولید اسید سیتریک لازم است. به عنوان نمونه در تخمیر غوطه ور، میزان عناصری مانند روی، منگنز، مس، فلزات سنگین و فلزات قلیایی باید محدود شوند (۷). سطح پایین گلوکز بر ریخت شناسی ریسه ها تأثیر به سزایی دارد. به نحوی که با کاهش سطح گلوکز از رشد ریسه ها جلوگیری شده و همین امر سبب افزایش تولید اسید سیتریک می شود (۸).

از آنجایی که ویژگی ریخت شناسی قارچ در محیط تخمیر در تولید محصول مورد نظر، اثر به سزایی در تولید اسید سیتریک دارد، بنابراین شناسایی و انتخاب جدایه مورد نظر از اهمیت بالایی برخوردار است (۹).

هدف از این مطالعه ایجاد شرایط بهینه، در فرآیند تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر* با اضافه کردن ترکیب SR63 بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری و جداسازی: به منظور جداسازی *آسپرژیلوس نایجر* از نمونه های مختلف محیطی شامل هوا، سطح برگ گیاهان، آب و خاک مورد نظر به ترتیب از روش های ته نشینی، سوآپ، تهیه رقت و کشت سطحی استفاده شد. تمامی نمونه ها در محیط PDA (Potato Dextrose Agar) کشت و به مدت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس نگهداری شدند.

سپس بر اساس خصوصیات ظاهری کلنی و میکروسکوپی جدایه های مورد نظر تحت عنوان *آسپرژیلوس نایجر* شناسایی و گزارش شدند. کلنی های *آسپرژیلوس نایجر* جداسازی و در کشت های متوالی خالص سازی شدند (۱۰).

ب) غربالگری و انتخاب جدایه برتر تولید کننده اسیدسیتریک: به منظور انتخاب جدایه توانمند در تولید اسیدسیتریک، جدایه ها برای ارزیابی کیفی بر روی محیط چاپ کداکس آگار (مرک، آلمان) در مرکز پلیت تلقیح و در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس گرمخانه گذاری شدند (جدول ۱).

هر ٢٤ ساعت یک بار به مدت ۷ روز از لحاظ بروز هاله زرد ناشی از تولید اسید مورد بررسی قرار گرفتند (۱۱). در این مطالعه از محیط چاپ کداکس آگار حاوی قند ساکارز و رنگ برموکروزول سبز به ترتیب به منظور تولید اسید سیتریک

جدول ۱: ترکیب و مقدار مواد محیط چاپ کداکس آگار.

نوع ترکیب	مقدار(gr/l)
قند ساکارز	۳۰
نیترات سدیم	۲
سولفات منیزیم ۷ آبه	۰/۵
فسفات هیدروژن دی پتاسیم	۱
سولفات آهن	۰/۰۱
کلریدپتاسیم	۰/۵
آگار	۲۰
آب مقطر	۱۰۰۰ cc
رنگ برموکروزول گرین۱ درصد	٤۰ cc

و مشخص کردن اسید سیتریک استفاده گردید.

ج) *تخمیر غوطه ور:* برای تولید اسید سیتریک به وسیله *آسپرژیلوس نایجر* از محیط کشت مایع تخمیری حاوی ترکیبات (گرم بر لیتر): قند ساکارز (۱۵۰)، سولفات دی آمونیوم (۲/۵)، سولفات منیزیم ۷ آبه (۰/۵)، فسفات دی هیدروژن پتاسیم (۲)، سولفات آهن (۰/۱)، سولفات روی ۷ آبه (۰/۱)، سولفات مس ۵ آبه (۰/۰٦)، ترکیب SR63 (۰/۰۱۲۵) و آب مقطر (یک لیتر) استفاده گردید (۱۲). مقدار ۱۰۰ میلی لیتر از این محیط برای انجام فرآیند تخمیر غوطه ور در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد.

پس از تلقیح جدایه برتر در محیط یاد شده، نمونه ها بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند (۱۳).

د) *بهینه سازی محیط کشت مایع:* به منظور ایجاد شرایط بهینه در تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر*، جدایه های برتر در محیط مایع تخمیری تلقیح شدند. برخی از تیمارها دارای ترکیب SR63 بودند.

نمونه شاهد فاقد ترکیب SR63 بود. تمامی تیمارها در شرایط یکسان (دمای ۳۰ درجه سلیسیوس، pH ۵) به مدت ٦ روز بر روی شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند و از نظر

جدول ۲: مقایسه کمی تولید اسید سیتریک در محیط چاپ کداکس آگار.

جدایه	۲۴ ساعت اول	۲۴ ساعت دوم	۲۴ ساعت سوم	۲۴ ساعت چهارم	۲۴ ساعت پنجم	۲۴ ساعت ششم	۲۴ ساعت هفتم
جدایه An1	–	+	+	+	+	++	+++
جدایه An2	–	+	+	+	+	+	++
جدایه An3	–	–	–	–	–	+	+
جدایه An4	–	–	–	–	–	+	+
جدایه An5	–	–	–	–	–	+	+
جدایه An6	–	–	–	–	–	+	+
جدایه An7	–	–	–	–	–	+	+
جدایه An8	–	–	–	–	–	+	+
جدایه An9	–	+	+	+	+	+	++
جدایه An10	–	+	+	+	+	+	++
سویه 5010	–	+	+	+	+	+	++

– : عدم تشکیل هاله، + : هاله کم، ++ : هاله متوسط، +++ : هاله بزرگ

جدول ۳: مقایسه تولید اسید سیتریک بر حسب زمان به روش دانکن ($\alpha<0/5$).

روز	دانکن
هفتم	A
ششم	A
پنجم	B
چهارم	C
سوم	D
دوم	E
اول	F

میزان تولید اسید سیتریک با روش کمی بولت–ماریر بررسی شدند (١٤). مقایسه میانگین تیمارها به روش دانکن توسط نسخه بیست و یکم نرم افزار *SPSS* انجام گرفت.

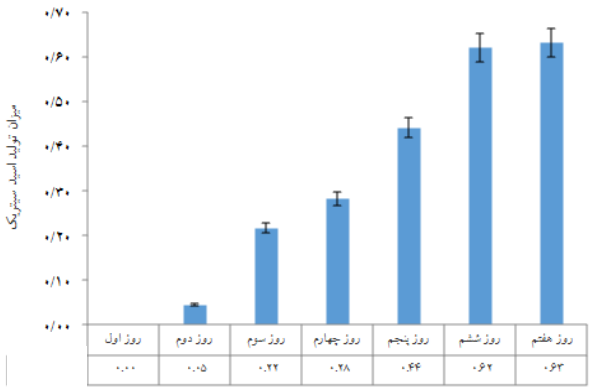
یافته ها

الف) نمونه برداری و جداسازی: در مجموع ۱۰ جدایه *آسپرژیلوس نایجر* خالص سازی گردیدند و از An_1 تا An_{10} نامگذاری شدند.

ب) غربالگری و انتخاب جدایه برتر تولید کننده اسید سیتریک: از میان ۱۰ جدایه خالص سازی شده بر روی محیط چاپ کداکس آگار نتایج ارایه شده در جدول ۲ به دست آمد. شایان یادآوری است که در ۲٤ساعت اول هیچ هاله ای تشکیل نشد.

ج) تأثیر زمان و غلظت ترکیب SR63 بر تولید اسید سیتریک: در این مطالعه تولید اسید سیتریک به روش تخمیر در طی زمان های ۱ تا ۷ روز با استفاده از غلظت ترکیب SR63 به مقدار ۰/۰۱۲۵ گرم در لیتر و تأثیر متقابل عوامل زمان فرآیند تخمیر و ترکیب SR63 بر تولید اسید سیتریک به روش دانکن مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل در جدول ۳ و نمودار ۱ نشان داده شده است.

د) تأثیر دما و ترکیب SR63 بر تولید اسید سیتریک: در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس و با استفاده از ترکیب SR63 میانگین تولید ۰/۲۱ میکروگرم بر میلی لیتر و در شرایط مشابه در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس میانگین تولید ۱/۱ میکروگرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد.



نمودار ۱: تولید اسید سیتریک بر حسب زمان.

پس از انجام مقایسه میانگین ها، مشخص شد که اختلاف معنی داری بین سطوح مختلف دما با ترکیب SR63 وجود دارد ($\alpha<0/05$).

بحث

در این مطالعه، در مرحله اول غربال گری و انتخاب جدایه برتر تولیدکننده اسیدسیتریک، انجام شد. در مرحله بعد، اضافه کردن ترکیب SR63 به محیط مایع تخمیری در شرایط بهینه از نظر دما (۳۰ درجه سلیسیوس)، زمان (٦ روز) و pH (نزدیک ۵) در افزایش تولید اسید سیتریک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ترکیب SR63 با جلوگیری از رشد زیاد ریسه های *آسپرژیلوس نایجر* موجب افزایش تولید اسید سیتریک می گردد. اما نمونه هایی که در شرایط مشابه فاقد این ترکیب بودند، چنین افزایشی در تولید اسید سیتریک مشاهده نشد.

روش های متعددی برای تولید اسید سیتریک با استفاده از منابع متفاوت و روش های گوناگون وجود دارد. در پژوهش های گذشته چنین نتیجه گیری شده است که تولید اسید با استفاده از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و منبع ساکارز به عنوان منبع کربن و روش تخمیر غوطه ور بهترین و اقتصادی ترین روش می باشد.

پژوهشگران بسیاری تلاش نمودند تا با ایجاد شرایط مختلف به بالاترین بازده تولید برسند. از مهمترین عواملی که در افزایش تولید اسید سیتریک دخالت دارد، ریخت شناسی قارچ و کاهش اندازه ریسه های آنها می باشد. کاهش اندازه و خرد شدن ریسه ها و تبدیل ریسه های بلند و رشته ای (توده های غیرکروی و کلاف مانند) به ریسه های کروی شکل (توده ی زیستی) یکی از مهمترین عوامل افزایش تولید اسیدسیتریک می باشد (۵).

دیلون (Dhillon) و همکاران در سال ۲۰۱۳ تأثیر دماهای مختلف بر تولید اسیدسیتریک را مورد ارزیابی قرار دادند. یافته های آنها نشان داد که دمای بهینه در تولید اسید سیتریک ۳۰ درجه سلیسیوس می باشد (۱۵). در مطالعه حاضر نیز دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به عنوان بهترین دما در تولید اسید سیتریک با ترکیب SR63 مورد تأیید قرار گرفت. دماهای پایین تر مانع رشد اسپورها و تشکیل قارچ شده و دماهای بالاتر باعث تغییر ریخت شناسی قارچ می شود. در هر دو مورد تولید اسید سیتریک کاهش می یابد (۱۵).

پاپاجیانی (Papagianni) و همکاران در سال ۲۰۰٦ قطعات طبیعی از تجمع ریسه های قارچ *آسپرژیلوس نایجر* را در کشت غوطه ور مورد بررسی قرار دادند. این محققان عوامل موثر در تخمیر، مانند میزان تلقیح اسپور، غلظت فسفات و منگنز و ریخت شناسی ریسه های قارچ را در محیط کشت تخمیر به کار بردند و با آنالیزهای تصویری بررسی نمودند. قطر توده های زیستی ۰/۳ میلی متر گزارش گردید (۱٦). نتایج به دست آمده در این مطالعه با شرایط مشابه مطالعه یاد شده و با اضافه کردن ترکیب SR63 نشان داد که قطر توده های زیستی برابر با ۰/۲ میلی متر می باشد.

حق (Haq) و همکاران در سال ۲۰۰۲ اثر اضافه کردن یون مس را در ریخت شناسی *آسپرژیلوس نایجر* مورد ارزیابی قرار دادند. یافته های آنها نشان داد که یون مس تأثیر مستقیمی بر افزایش تولید اسید سیتریک دارد. به این صورت که یون مس قطر توده زیستی را ۰/۵ میلی متر کاهش می دهد و محصول را افزایش می دهد (۱۷). در مطالعه حاضر نیز با اضافه کردن ترکیب SR63 به محیط کشت تخمیری، قطر توده زیستی کاهش چشمگیری داشت (۰/۲ میلی متر) و تولید اسید سیتریک با افزایش همراه بود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه ترکیب SR63 با کاهش اندازه ریسه های قارچی و جلوگیری از رشد بیش از اندازه ریسه ها، می تواند موجب افزایش تولید اسید سیتریک توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* گردد. به طوری که با اضافه کردن این ترکیب به محیط کشت مایع تخمیری، بازده تولید اسید سیتریک تا ۸۰ درصد افزایش می یابد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای دکتر جاوید امینی و جناب آقای دکتر سید محمدرضا خوشرو به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Soccol C, Vandenberghe L, Rodrigues C, Pandey A. New perspectives for citric acid production and application. Food Biotecnol. 2006; 44(2): 141-149.

2. Angumeenal A, Venkappayya D. An overview of citric acid production. Food Tech. 2013; 50: 367-370.

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

4. Papagianni M, Mattey M. Modeling the mechanisms of glucose transport through the cell membrane of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation processes. Biochem Eng J. 2004; 20: 7-12.

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

6. Peksel A, Kubicek C. Effects of sucrose concentration during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. Turk J Chem. 2003; 27: 581-590.

7. Max B, Salgado J, Rodriguez N, Cortes S, Converti A, Dominguez J. Biotechnological production of citric acid. Brazil J. 2010; 41: 862-875.

8. Papagianni M, Mattey M, Kristiansen B. The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. Microbial. 1999; 25: 710-717.

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

10. Faezi Ghasemi M, Bakhtiari M, Fallahpour M, Noohi A, Moazami N, Amidi Z. Screening of urease production by *Aspergillus niger* strains. Iran Biomedical J. 2004; 8(1): 47-50.

11. Shivanna G, Govindarajulu V. Screening of asporogenic mutants of phytase-producing *Aspergillus niger* CFR 335 strain. Microbial Ecol. 2009; 21: 57-63.

12. Papagianni M, Mattey M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. Microbial Cell. 2006; 5(3): 1-12.

13. Lotfy W, Ghanem K, El-Helow E. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. Biore Tech. 2007; 98: 3464-3469.

14. Marier J, Boulet M. Direct determination of citric acid in milk by an improved pyridine acetic anhydrite method. J Dairy Sci. 1956; 41: 1683-1692.

15. Dhillon G, Brar S, Kaur S, Verma M. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. Industrial Product. 2013; 41: 78-84.

16. Papagianni M. Quantification of the fractal nature of mycelial aggregation in *Aspergillus niger* submerged cultures. Microbial Cell. 2006; 5(5): 1-13.

17. Haq I, Ali S, Qadeer M, Iqbal J. Effect of copper ions on mould morphology and citric acid productivity by *Aspergillus niger* using molasses based media. Process Biochem. 2002; 37: 1085-1090.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 3, September 2015

Original Article

Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* in the presence and absence of SR63

Sayyid Rasool Tayyeb[1], **Mohammad Mahdi Motaghi**[2], **Babak Kheirkhah**[2]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Kerman Science and Research branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Kerman branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Citric acid is one of the most important organic acid, which is used wildly in different industries, and this demand has been growing every year. This study was aimed to investigate the optimal conditions for the production of citric acid by *Aspergillus niger* in the presence and absence of SR63.

Materials & Methods: In this study, we used different environmental samples such as air, soil, water and leaves to isolate the fungus. Colonies with the ability to growth on czapek dox agar medium were screened. To increase the production efficiency, SR63 was added to fermentation liquid medium. Also, optimising of fermentation condition, temperature of medium and time of fermentation were examined.

Result: Overall, 10 colonies were isolated from different environment, which one of them had the best citric acid production ability in compare to the others. The best result was achieved in 30°c for 6 days into a medium with 0.0125g/L SR63 at pH 5.

Conclusion: Regarding the results, SR63 could increase the production of citric acid by inhibition of overgrowth of *A. niger* fungal thread.

Keywords: *Aspergillus niger*, Citric acid, SR63.

Correspondence to: Sayyid Rasool Tayyeb

Tel: +98 9132964052

E-mail: s.rasool.t@gmail.com

Journal of Microbial World 2015, 8(3): 241-247.