بهینه‌سازی تولید اسیدسیتریک از گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر*

حمیدرضا صمدلوئی[1*]، شاهرخ قرنجیک[2]

۱- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران
۲- استادیار گروه پژوهشی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات: hsamadlouie@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۳/۸/۷ پذیرش نهایی: ۹٤/۷/۱۹)

چکیده

اسید سیتریک به‌طور عمده توسط گونه‌های کپکی *آسپرژیلوس نایجر* و با استفاده از روش تخمیر حالت مایع تولید می‌گردد. در این تحقیق بهینه‌سازی تولید اسید سیتریک از گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* به روش One factor at time و سپس با استفاده از روش سطح پاسخ با استفاده از تخمیر حالت مایع انجام شد. نتایج روش One factor at time نشان داد که میزان اسید سیتریک با افزایش دور همزن از ۱۵۰ به ۲۰۰ دور در دقیقه، دما از ۱۷ به ۳۲ درجه سلسیوس و کاهش pH به ۲، افزایش یافت و تیمارهای حاوی سویا و عناصر معدنی نسبت به بقیه تیمارها تأثیر قابل‌توجهی در افزایش تولید اسید سیتریک (حدود ۲۵ گرم در لیتر) داشتند. هم‌چنین نتایج نشان داد که امواج اولتراسونیک در زمان رشد میکروارگانیسم تأثیر قابل‌توجهی در افزایش اسید سیتریک داشته است. آزمون آماری سطح پاسخ نشان داد که بیشترین میزان تولید اسید سیتریک (۵۸ گرم در لیتر) در سطوح ۲۳۰/۸۷ گرم در لیتر ساکارز و ۲۰۰ گرم در لیتر پودر سویا تولید شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده افزایش قابل‌توجه تولید اسید سیتریک در شرایط بهینه نسبت به شرایط اولیه تخمیر نشان‌دهنده روش آماری مناسب به منظور بهینه‌سازی و انتخاب صحیح متغیرهای اعمالی و سطوح استفاده شده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *آسپرژیلوس نایجر*، **اسید سیتریک، بهینه‌سازی و سطح پاسخ**

مقدمه

بیوتکنولوژی علم استفاده از میکروارگانیسم‌ها در جهت تولید فرآورده‌های مختلف می‌باشد (Brock and Adigan, 1994). امروزه بسیاری از فرآورده‌های حاصل از تخمیر میکروبی به‌عنوان افزودنی و مکمل در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شوند (موسوی‌نسب و داراب‌زاده، ۱۳۸۹). اسیدهای آلی از مهم‌ترین محصولات میکروبی می‌باشد که به‌عنوان افزودنی در صنایع غذایی کاربرد دارد. از میان تمام اسیدهای آلی، فقط اسید سیتریک است که منحصراً از تخمیر تولید شده و برای تولید اسیدهای آلی دیگر بین فرایندهای شیمیایی و میکروبی رقابت نزدیکی وجود دارد. در بین گونه‌های میکروبی *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*) گونه مناسبی جهت تولید اسید سیتریک می‌باشد (Papagianni, 2007). با توجه به گستردگی مصرف اسید سیتریک در صنایع مختلف و با هدف افزایش میزان تولید اسید سیتریک از این گونه قارچی، تحقیقات وسیعی صورت گرفته است (Majumder *et al*., 2010). این فعالیت‌ها بخش‌های مختلفی نظیر بهینه‌سازی سوش، بهینه‌سازی محیط کشت (استفاده از مواد اولیه ارزان قیمت‌تر) و کاهش هزینه استخراج اسید سیتریک از مایع نهایی تخمیر می‌باشد. در سال‌های اخیر تحقیقات وسیعی در زمینه بهینه‌سازی تولید اسید سیتریک از این گونه میکروبی انجام شده است (Papagianni and Mattey 2004; Papagianni, 2007). تحقیقی که توسط متی و همکاران انجام شد نشان داد که منابع کربن نقش قابل توجهی در تولید اسید سیتریک از این گونه قارچی دارد (Mattey *et al*., 1992). کوبیک و روهر نشان دادند که ساکارز منبع مناسبی برای تولید اسید سیتریک می‌باشد (Kubicek and Röhr, 1989). تحقیقات پاپاگانی نشان داد که کاهش pH محیط کشت، تولید اسیدهای آلی مانند اگزالیک اسید را کاهش داده و باعث افزایش تجمع اسید سیتریک در محیط کشت می‌شود (Papagianni, 2007). هم‌چنین طبق نتایج همین مطالعه، با کاهش pH امکان آلوده شدن محیط کشت کاهش یافت. با توجه به تحقیقات انجام شده، به نظر می‌رسد ترکیبات محیط کشت در میزان تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر* موثر می‌باشند. از این‌رو در این تحقیق تأثیر ترکیبات فیزیکی و شیمیایی محیط کشت به منظور بهینه‌سازی تولید اسید سیتریک از گونه جدید جداسازی شده *آسپرژیلوس نایجر* بررسی شد. با نظر گرفتن اهمیت استفاده از امواج اولتراسونیک در سایر محصولات میکروبی (Jomdech *et al*., 2006; Resa *et al*., 2007; Wang *et al*., 2010)، در این تحقیق برای اولین بار اثر این امواج در تولید اسید سیتریک در مراحل مختلف رشد *آسپرژیلوس نایجر* بررسی شد. در این تحقیق برای به حداقل رساندن تیمارها به روش One factor at time و روش آماری سطح پاسخ (Response Surface Method) شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط کشت برای تولید اسید سیتریک از *آسپرژیلوس نایجر* بهینه شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده در فرایند تخمیر

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش، به‌جز پودر سویا (شرکت سبحان) و ملاس (کارخانه قند شاهرود)، سایر مواد از شرکت مرک آلمان خریداری شد. در این تحقیق از ساکارز، ملاس، پودر سویا،

عصاره مخمر، خیساب ذرت (Corn steep liquor)، مالت آگار و املاح معدنی شامل ($FeSO_4$ (0.1g/l؛ $NaCl$ (1g/l) ؛KH_2PO_4 (5g/l) ؛$(NH_4)NO_3$ (5 g/l); $MgSO_4$؛ (1 g/l) $7\ H_2O$، اسید کلریدریک و سود ۰/۵ نرمال استفاده شد.

روش نگه‌داری میکروارگانیسم

در این تحقیق از کپک *آسپرژیلوس نایجر* استفاده شد. پس از جداسازی کپک از خاک بسطام استان سمنان و شناسایی آن، روی محیط کشت آگار شیب‌دار در درجه حرارت ۲۲ درجه سلسیوس و مدت زمان ۷ روز کشت داده شد و سپس در یخچال با درجه حرارت ۳ درجه سلسیوس نگه‌داری گردید. کشت مجدد میکروارگانیسم هر شش ماه یک‌بار برای نگه‌داری آن انجام شد.

مایه تلقیح و کشت‌های اصلی

از سوسپانسیون میسلیومی برای تلقیح کشت‌های تولید محصول استفاده شد (Zhu *et al.*, 2003). برای تهیه این سوسپانسیون، ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت شامل گلوکز تک‌آبه (۳۰ g/l) و عصاره مخمر (۱۰ g/l) در یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری تهیه شد و در درجه حرارت ۱۲۱ درجه سلسیوس و ۱۵ دقیقه سترون گردید. سپس به‌وسیله آنس سترون، *آسپرژیلوس نایجر* در محیط کشت «توسعه تلقیح» وارد گردید و در درجه حرارت ۲۶ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت و ۱۷۰ دور بر دقیقه (rpm) تخمیر شد (Singh and Ward, 1997). تعداد ۳ تا ۱۰ درصد از کشت‌های توسعه تلقیح به‌عنوان مایه تلقیح به محیط کشت تولید محصول افزوده شد. در محیط‌های کشت تولید محصول از ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری که شامل ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت بود، استفاده گردید. محیط‌های کشت تولید محصول با توجه به روش آماری طراحی و در هر مرحله، اجزای مورد نیاز افزوده شد. برای تنظیم pH از اسید کلریدریک و سود استفاده گردید (Zhu *et al.*, 2003). از دستگاه اولتراسونیک شرکت Qsonica مدل Q700 با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز، میزان سیکل فعال (Duty cycle) ۱۰ درصد (۱ ثانیه روشن و ۹ ثانیه خاموش)، قدرت ۱ وات بر سانتی‌متر مربع استفاده شد.

جداسازی توده زیستی

جداسازی توده زیستی توسط کاغذ صافی واتمن شماره ٤١، روی قیف بوخنر مجهز به پمپ خلاء صورت گرفت. سپس برای اندازه‌گیری میزان اسید سیتریک مایع رویی محیط کشت برداشته شد (Sakuradani *et al.*, 2004).

اندازه‌گیری اسید سیتریک

مقدار ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت تخمیری صاف شده با ۱/۵ میلی‌لیتر پیریدن به‌سرعت مخلوط شد و در حمام آب گرم ۳۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. میزان جذب نور در طول موج ٤٢٠ نانومتر اندازه‌گیری شد و با توجه به منحنی استاندارد میزان اسید سیتریک تعیین گردید(Marrier and Boulet, 1958).

طرح آزمایش

طرح آماری این تحقیق در ۲ مرحله انجام گردید. در مرحله اول با استفاده از روش One factor at time، به‌صورت مرحله به مرحله اثر عوامل فیزیکی (دما، دور هم‌زن و امواج اولتراسونیک) و شیمیایی (مواد معدنی، pH، ملاس، سویا، خیساب ذرت و اتانول) موثر در تولید بهینه اسید سیتریک بررسی شد. در هر مرحله اثر یک عامل بر تولید اسید سیتریک بررسی و بهترین میزان

برای مرحله بعد به‌عنوان ثابت استفاده گردید و متغیر بعدی اعمال و به‌همین ترتیب اثر هر عامل بررسی شد. در مرحله دوم بهینه‌سازی از روش سطح - پاسخ استفاده شد. آزمایش‌های بهینه‌سازی، دست‌یابی به یک مدل ریاضی برای پیش‌بینی رفتار فرایند بود. طرح‌های بهینه‌سازی از عوامل کمتری نسبت به طرح‌های معمولی برخوردار هستند اما این عوامل به‌طور قابل توجهی تأثیرگذار می‌باشند (Strobel *et al*., 1999). با توجه به نتایج به‌دست آمده از مرحله اول آزمایش غربالگری، سطوح مختلف منبع کربنی (ساکارز) و منبع نیتروزنی (سویا) به‌عنوان متغییر اصلی و کلیدی در تولید اسید سیتریک بررسی شد (جدول ۱). از طرح مرکب مرکزی (Central composite design) با ۱۰ آزمایش و ۲ تکرار که شامل ۲ آزمایش در نقطه مرکزی بود، استفاده شد (جدول ۲).

جدول (۱)- متغیرهای کربن و نیتروژن در بهینه‌سازی و سطوح مختلف آن‌ها (گرم بر لیتر)

عامل	نماد	سطوح مختلف متغیرها				
		۱/٤۱	+۱	۰	-۱	-۱/٤۱
ساکارز	X_1	۳٤۱/٤۲	۳۰۰	۲۰۰	۱۰۰	٥۸/٥۸
پودر سویا	X_2	۳٤۱/٤۲	۳۰۰	۲۰۰	۱۰۰	٥۸/٥۸

جدول (۲)- طرح مرکب مرکزی برای مرحله بهینه‌سازی

آزمایش	ساکارز	پودر سویا
۲	۰	۰
۳	۱	۱
٤	۰	۰
٥	-۱/٤	۰
٦	۱/٤	۰
۷	۰	۱/٤
۸	۱	-۱
۹	۰	-۱/٤
۱۰	-۱	-۱

نتایج آزمایش‌ها براساس معادله چند جمله‌ای درجه دوم زیر تحلیل شد:

$$y = \alpha_0 + \sum_{j=1}^{k} \alpha_j X_j + \sum_{j=1}^{k} \alpha_{jj} X_j^2 + \sum \sum_{i<j} \alpha_{ij} X_i X_j$$

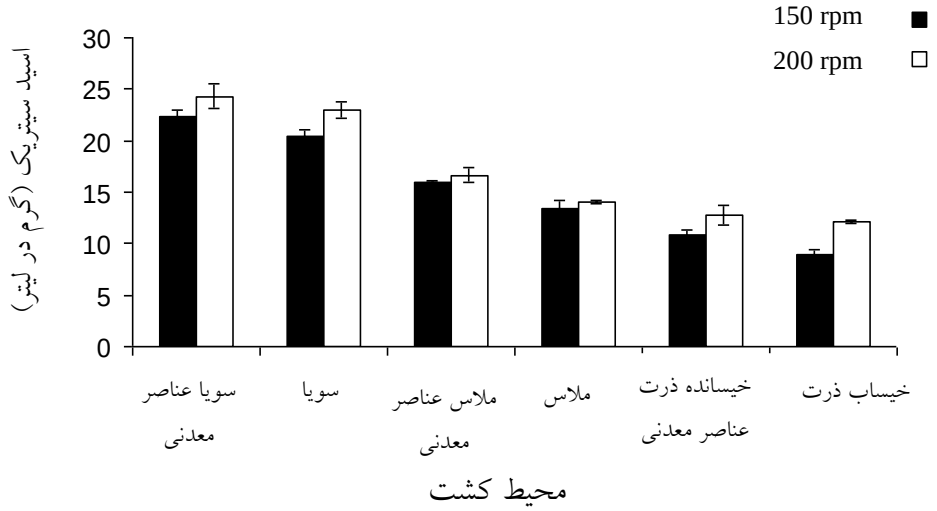
که در آن α_0، α_j، α_{jj} و α_{ij} به‌ترتیب ضریب‌های رگرسیون برای عرض از مبدا، خطی، مربعی (درجه دوم) و متقابل می‌باشد و X_i و X_j متغیرهای مستقل کد شده می‌باشند. ضریب‌های رگرسیون و منحنی‌های سطح پاسخ و کنتور توسط نرم‌افزار (Design Expert, USA) محاسبه و رسم شد.

یافته‌ها

بررسی اثرات ترکیبات محیط کشت بر میزان اسید سیتریک به روش آماری one-factor-at-a-time

اثر منابع نیتروژنی،کربنی، مواد معدنی و دور همزن در تولید اسید سیتریک

در شکل (۱) نتایج تأثیر نوع منابع نیتروژنی، مواد معدنی و دور همزن مشخص شده است.



نمودار (۱)- اثرات منابع نیتروژنی متفاوت (سویا، ملاس و شربت ذرت خیسانده)، مواد معدنی بر تولید اسید سیتریک

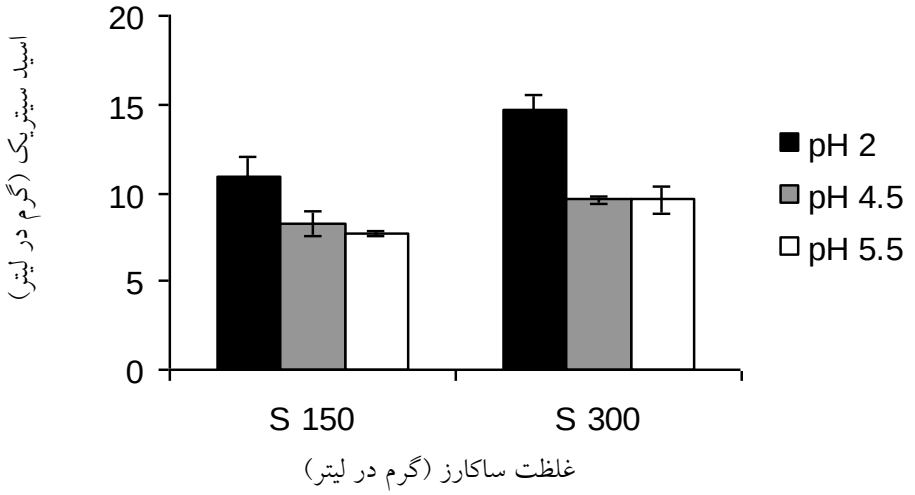
* نمودارها دارای خطای معیار در سه تکرار می‌باشند.

در این مرحله از تحقیق از ساکارز ۱۴۰ گرم در لیتر در همه تیمارها و متغیر منبع پروتئینی ۵۰ گرم در لیتر (پودر سویا و خیساب ذرت) استفاده شد. نمونه ملاس با در نظر گرفتن این نکته که حاوی ۷۰ گرم در لیتر ساکارز می‌باشد، در این تیمار در سطح ۲۰۰ گرم در لیتر و تنها از منبع نیتروژنی سویا استفاده شد. همان‌گونه که از نمودار (۱) برداشت می‌شود، منبع پروتئینی سویا نسبت به خیساب ذرت و هم‌چنین منبع کربنی ساکارز از ملاس اثر معنی‌دار ($p<0/05$) و بیشتری در افزایش تولید اسید سیتریک داشت. نتایج نشان داد که میزان اسید سیتریک با افزایش دور همزن و تیمارهای حاوی عناصر معدنی موجب افزایش میزان اسید سیتریک شد. از بین تیمارهای مورد بررسی، ترکیب سویا و عناصر معدنی با دور همزن ۲۰۰ دور در دقیقه بالاترین میزان تولید اسید سیتریک یعنی در حدود ۲۵ گرم در لیتر را نشان داد.

اثر میزان کربن و pH در تولید اسید سیتریک

نتایج اثرات pH و سطح قند ساکارز به عنوان منبع کربن در تولید اسید سیتریک در شکل ۲ مشخص شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمون گذشته در رابطه با دور همزن۲۰۰ دور در دقیقه، منبع پروتئینی سویا به میزان ۳۰ گرم در لیتر، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و مدت زمان تخمیر ٦ روز به عنوان ثابت های آزمون در نظر گرفته شد. در این مرحله میزان pH اولیه (۲، ٤ و۵/۵) و سطح ساکارز (۱۵۰ و۳۰۰ گرم در لیتر) به‌عنوان متغیر در نظر گرفته شد (نمودار ۲).

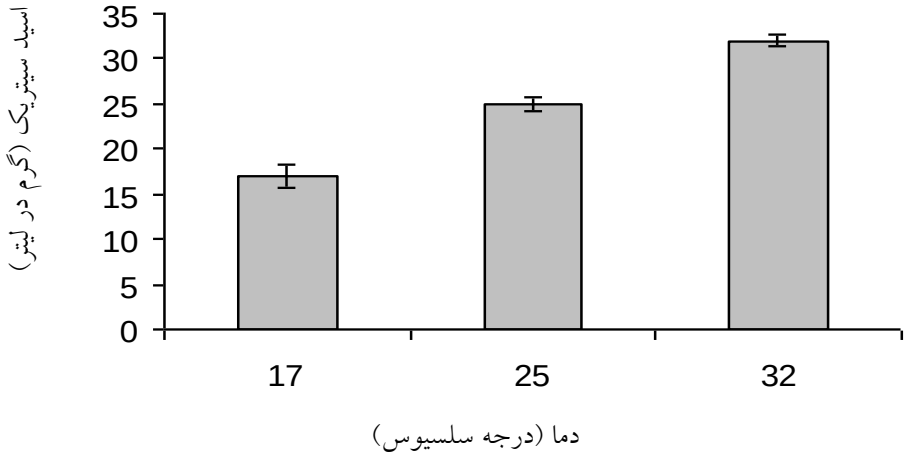
نتایج نشان داد که اثر pH اولیه ۲ در تولید اسید سیتریک معنی‌دار بوده ($p<۰/۰۵$) و بیشترین سطح اسید سیتریک را نسبت به بقیه تیمارها در هر دو سطح ساکاروز ۱۵۰ (گرم در لیتر) و۳۰۰ (گرم در لیتر) داشت، در حالی‌که بین مقادیر تولید اسید سیتریک در pH اولیه ٤/۵ و۵/۵ تفاوت معنی داری وجود نداشت ($p<۰/۰۵$).



نمودار (۲)- اثرات pH و مقدار ساکارز در تولید اسید سیتریک

اثر دما بر تولید اسید سیتریک

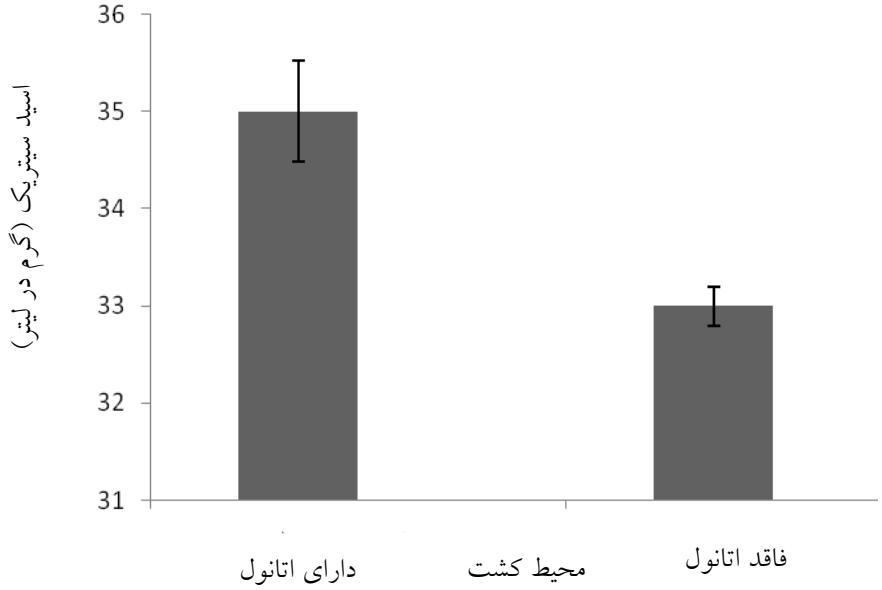
نتایج اثر دما بر اسید سیتریک در نمودار (۳) مشخص شده است. در این مرحله از آزمون، دما به‌عنوان متغیر در سه سطح ۱۷، ۲۵ و ۳۲ درجه سلسیوس اعمال شد. دور همزن ۲۰۰ دور در دقیقه، pH= ۲ و میزان ساکارز ۳۰۰ گرم در لیتر و پودر سویا به‌میزان ۳۰ گرم در لیتر از عوامل ثابت آزمون بودند. نتایج نشان داد که دمای ۳۲ درجه سلسیوس در مقایسه با دمای ۱۷ و ۲۵ درجه سلسیوس اثر معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) و بیشتری در تولید اسید سیتریک داشت. به این معنی که با افزایش درجه حرارت از ۱۷ به ۳۲ درجه سلسیوس، میزان تولید اسید سیتریک نیز سیر صعودی داشت. بالاترین راندمان دمای ۲۲ درجه سلسیوس بود.



نمودار (۳) – اثر دما بر تولید اسید سیتریک

اثر اتانول

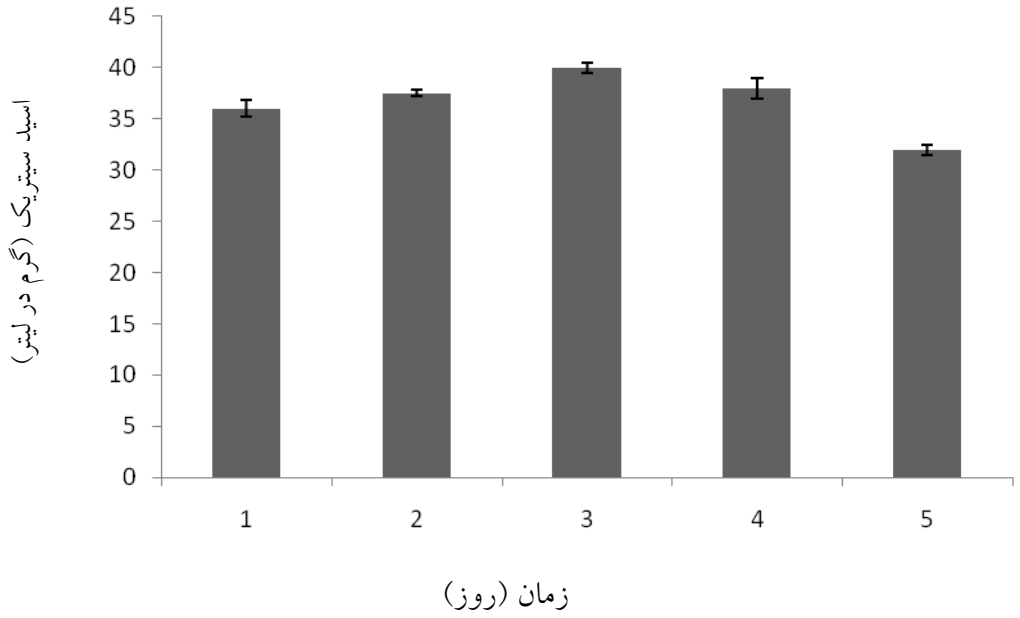
در این مرحله از آزمون، اتانول به‌عنوان متغیر بعد از ۲٤ ساعت از تخمیر به میزان ۱٪ با غلظت ۹٦٪ استفاده شد. دور همزن۲۰۰ دور در دقیقه، pH= ۲، دما ۳۲ درجه سلسیوس و میزان ساکارز ۳۰۰ گرم در لیتر و پودر سویا به میزان ۳۰ گرم در لیتر از عوامل ثابت آزمون بودند. نتایج نشان داد که افزودن اتانول اثر معنی‌داری در افزایش تولید اسید سیتریک دارد (p<۰/۰۵).



نمودار (٤)– افزودن اتانول در ترکیب محیط و اثر آن بر تولید اسید سیتریک

اثر امواج اولتراسونیک در تولید اسید سیتریک و توده زیستی

در این مرحله از تحقیق از ۱٪ اتانول با غلظت ۹۶٪ استفاده شد. به‌علاوه، pH= ۲ ، دما ۳۲ درجه سلسیوس و میزان ساکارز ۳۰۰ گرم در لیتر و پودر سویا به میزان ۳۰ گرم در لیتر از عوامل ثابت آزمون بودند. نتایج نشان داد که امواج اولتراسونیک تأثیر معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در تولید محصول داشته است. نتایج نشان داد (نمودار ۵) که بیشترین تأثیر اولتراسونیک در شرایطی بود که تا روز سوم تخمیر از اولتراسوند با توان ۲۰KHz استفاده شد. اما زمانی‌که استفاده از اولتراسوند تا روز ۵ به طول انجامید، میزان تولید اسید سیتریک کاهش یافت.



نمودار (۵)- اثر اولتراسوند بر تولید اسید سیتریک

بهینه‌سازی به روش آماری سطح پاسخ

در این مرحله عوامل کلیدی مانند منبع کربن (ساکارز) و منبع نیتروژن (پودر سویا) که از مرحله قبل به‌دست آمده بود، در ۵ سطح برای بررسی بیشتر در نظر گرفته شد (جدول ۱). جدول (۳) ضرایب رگرسیون و مقادیر p را برای مدل‌های رگرسیون نشان می‌دهد. همانطور که از جدول (٤) مشخص می‌شود، اثرات خطی ساکارز و پودر سویا در میزان اسید سیتریک در محیط کشت، به‌ترتیب معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) و غیرمعنی‌دار است. اثرات متقابل ساکارز و پودر سویا برای مقدار اسید سیتریک معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$). در مورد اثر درجه دوم بر تولید اسید سیتریک هر دو عامل معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) و هم‌چنین اثر متقابل منبع کربن و نیتروژن در تولید اسید سیتریک معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).

جدول (۳)- پارامترهای ANOVA برای تولید اسید سیتریک (A ساکارز و B پودر سویا)

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربع	P	F
	اسید سیتریک	اسید سیتریک	اسید سیتریک	اسید سیتریک
مدل	۵	٤٤٥/٦٧٥٢	۰/۰۱۰۳	۱۵/۲۹۸۹
A	۱	۲۹۹/٤۰٤۲	۰/۰۳۲۷	۱۰/۲۷۷۸
B	۱	۰/۰۷۱۷	۰/۹٦۲۸	۰/۰۰۲٤
AB	۱	۵۰٦/۲۵	۰/۰۱٤۰	۱۷/۳۷۸۳
A^2	۱	۸۱۷/۷۸۵۷	۰/۰۰٦۱	۲۸/۰۷۲٦۸
B^2	۱	۱۱۸۸/٦٤۳	۰/۰۰۳۱	٤۰/۸۰۳۳٤
باقی‌مانده	٤	۲۹/۱۳۱۰۲		
عدم تطابق	۳	۳۸/٦۷٤٦۹	۰/۰۸۳۳	۳٤/۳٤۹۳۹
خطای خالص	۱	۰/۵		

میزان R^2 برای فرمول رگرسیون اسید سیتریک ۰/۹۵ می‌باشد.

معادله (۱):

$$Y = -29.92462 + 0.37118 \times C + 0.42095 \times N + 1.12500E\text{-}003 \times C \times N - 1.33750E\text{-}003 \times C^2 - 1.61250E\text{-}003 \times N^2$$

در معادله (۱)، میزان Y مربوط به میزان اسید سیتریک محیط کشت بوده و C و N به‌ترتیب مربوط به میزان ساکارز و پودر سویا (بر حسب گرم در لیتر) است. ضرایب مدل چند جمله‌ای درجه دوم پس از تجزیه و تحلیل توسط نرم‌افزار و حذف عبارات غیرمعنی‌دار توسط روش Forward در نرم‌افزار به‌دست آمد و نتیجه حاصل، معادله (۱) است.

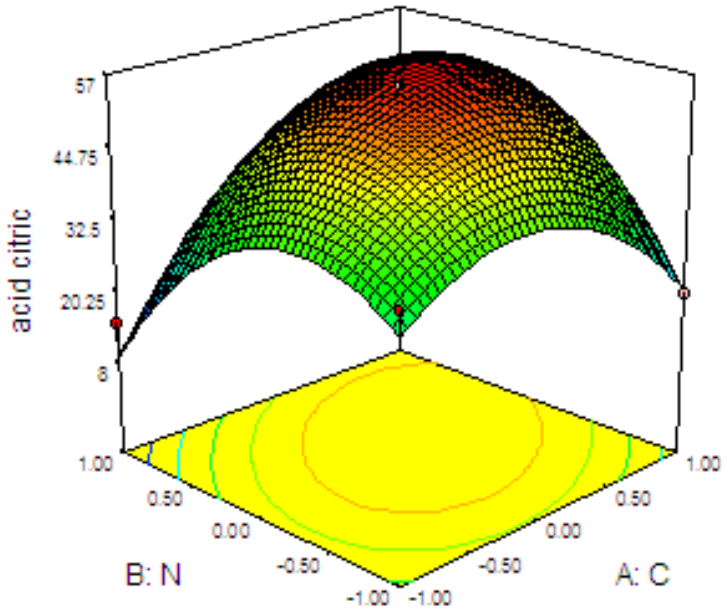
معادله (۱) مدل رگرسیون را برای تولید اسید سیتریک در خارج توده زیستی پس از تجزیه و تحلیل نتایج توسط نرم‌افزار Design Expert نشان می‌دهد. مقدار عددی ضریب تعیین (R^2) برای فرمول تولید اسید سیتریک ۰/۹۵ می‌باشد که نشان‌دهنده میزان انطباق داده‌ها در مدل رگرسیون است و می‌توان چنین نتیجه گرفت که مدل‌های رگرسیون به خوبی توانسته‌اند رابطه بین شرایط کشت (ساکارز و پودر سویا) و میزان اسید سیتریک در محیط کشت را نشان داده و پیش‌بینی کنند. هم‌چنین مدل نهایی دارای عدم تطابق (Lack of fit) غیرمعنی‌دار است که نشان‌دهنده برازش خوب مدل می‌باشد. طرح مرکب مرکزی روش سطح پاسخ به‌همراه میزان واقعی داده‌ها در جدول (٤) گزارش شده است.

جدول (٤)- جدول طراحی آزمایشات و نتایج دو متغیر اعمال شده بر روی پاسخ در روش RSM

نمونه	گلوکز (A)	پودر سویا (B)	میزان اسید سیتریک (گرم در لیتر)
١	١	-١	٢٠±٠/٦٨
٢	٠	٠	٥٥±٠/٣٥
٣	١	١	٤٤/٨±٠/٣٦
٤	٠	٠	٥٦±٠/٧
٥	٠	-١/٤١	٢٢/٣±٠/٨
٦	٠	١/٤١	١٩±٠/٥
٧	١/٤١	٠	٣٨±٠/٧
٨	-١	١	١٥±٠/٤٦
٩	-١/٤١	٠	١٤±٠/٨٢
١٠	-١	-١	٣٥/١±٠/٣

نتایج میزان تولید اسید سیتریک

نمودار (٦) تأثیر سطوح مختلف ساکارز و پودر سویا را بر میزان اسید سیتریک نشان می‌دهد. روش سطح پاسخ نشانگر بیشترین میزان تولید اسید سیتریک در سطوح حد واسط ساکارز و پودر سویا است.



نمودار (٦)- منحنی RSM برای تولید اسیدسیتریک (گرم در لیتر) به‌وسیله *آسپرژیلوس نایجر* با متغییرهای پودر سویا (N) و ساکارز (C)

مقادیر بهینه پیش‌بینی‌شده توسط مدل درجه دوم برای متغیرها

مقادیر بهینه پیش‌بینی شده با استفاده از نرم افزار Design Expert برای متغییرهای ساکارز (A) و پودر سویا (B) به‌منظور تولید حداکثری اسیدسیتریک به‌ترتیب ۲۳۰/۸۷ و ۲۰۰/۸۱ گرم در لیتر بود و میزان محصول ٥٦ گرم در لیتر پیش‌بینی شد.

اعتبارسنجی مدل رگرسیون اسید سیتریک

به‌منظور ارزیابی مدل، در آزمون‌هایی با دو تکرار، شرایط پیش‌بینی شده مدل تولید اسید سیتریک اعمال گردید. محیط کشت مناسب تولید اسید سیتریک حاوی ۲۳۰/۸۷ گرم در لیتر ساکارز و ۲۰۰/۸۱ گرم در لیتر پودر سویا بود و pH اولیه در عدد ۲ تنظیم شد. پس از ٦ روز تخمیر، میزان تولید اسید سیتریک ۵۸ گرم در لیتر به‌دست آمد که با نتیجه پیش‌بینی شده از فرمول اسید سیتریک که ٥٦ گرم در لیتر بود، نزدیکی قابل‌توجهی داشت. میزان خطا برای محیط بهینه اسید سیتریک ۳ درصد به‌دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که منبع پروتئینی سویا تأثیر قابل‌توجهی در تولید اسید سیتریک نسبت به بقیه منابع پروتئینی دارد. در تحقیق مشابهی که توسط اکزو و همکاران انجام شد نشان دادند که منبع پروتئینی تأثیر قابل‌توجهی در تولید اسید سیتریک داشته است (Xu *et al.*, 1989). تیمارهای با دور همزن پایین ۱۵۰ دور در دقیقه دارای کمترین میزان تولید اسید سیتریک بودند. این نتایج نقش مؤثر هوادهی به‌وسیله همزن را در تولید اسید سیتریک نمایان می‌سازد و با یافته‌های آزمایشات برخی از دانشمندان از جمله پاپاگانی و ماتی مطابقت دارد. این پژوهشگران گزارش کردند که افزایش دور همزن موجب افزایش میزان اکسیژن شده و در نتیجه تولید اسید سیتریک و غلظت زیست توده نهایی افزایش می‌یابد. نتایج این محققین نشان داد که حتی کمبود کوتاه مدت اکسیژن محلول موجب ایجاد تغییرات غیرقابل برگشت در فرایند تولید اسید سیتریک می‌شود (Papagianni and Mattey, 2004).

افزایش کربن از سطح ۱۵۰ به ۳۰۰ گرم در لیتر با ثابت بودن منبع نیتروژن، موجب افزایش میزان تولید اسید سیتریک شد (نمودار ۲). تحقیقات وسیعی نتایج به‌دست آمده را تأیید می کنند (El- Rohr *et al.*, 1981; Xu *et al.*, 1989 ،Hussein *et al.*, 2009; Sukesh *et al.*, 2013) نتایج تحقیقات آن‌ها نشان می‌دهد که افزایش میزان تولید اسید سیتریک با افزایش میزان ساکارز هماهنگ است. همان‌طور که در نمودار (۲) آمده pH اولیه ۲ بیشترین سطح اسید سیتریک را نسبت به بقیه تیمارها در هر دو سطح ساکارز ۱۵۰ و۳۰۰ گرم در لیتر داشت. تحقیقات پاپاگانی نشان داد که pH پایین خطر آلودگی محیط کشت را با میکروارگانیسم‌ها مختلف کاهش می‌دهد. هم‌چنین تولید اسیدهای آلی نظیر اگزالیک اسید و گلوکونیک اسید متوقف شده و باعث تولید بیشتر اسید سیتریک می‌شود (Papagiani and Mattey, 2004).

تحقیقات وسیعی اثر امواج اولتراسونیک را در افزایش تولید محصول از میکروارگانیسم‌ها مختلف گزارش کردند ولی تاکنون تحقیقی در تولید اسید سیتریک از *آسپرژیلوس نایجر* تحت تأثیر امواج اولتراسونیک انجام نشده است. تحقیقات اخیر نشان داده که افزایش حلالیت سوبسترا محیط کشت در اثر استفاده از امواج

اولتراسونیک باعث رشد بیشتر میکروارگانیسم‌ها شده که در نهایت موجب افزایش تولید محصول می شود (Jomdecha *et al.*, 2006). استفاده از امواج اولتراسونیک غیرمخرب باعث شده میزان نفوذپذیری دیواره سلول به کلسیم با دوبار مثبت و آنزیم پروتئاز افزایش یافته که در نهایت در تولید محصول موثر است (Lanchun and Bochu 2003). هم‌چنین وانگ و همکاران نشان دادند که اولتراسونیک باعث شده میزان خروج گاز دی‌اکسیدکربن و جذب اکسیژن محیط کشت را افزایش می‌دهد. در عین حال اولتراسونیک باعث تحریک تولید آنزیم شده که باعث افزایش تولید محصول توسط میکروارگانیسم می‌گردد (Wang *et al.*, 2010). با توجه به نتایج تحقیقات اخیر و عوامل موثر در تولید اسید سیتریک از گونه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* چنین برداشت می‌شود که افزایش نفوذپذیری اکسیژن و فعالیت آنزیمی نقش موثری در افزایش تولید اسید سیتریک در اثر استفاده از امواج اولتراسونیک در این تحقیق داشته است.

نتایج به‌دست آمده از روش آماری سطح- پاسخ نشان داد که با افزایش میزان سویا، اسید سیتریک افزایش یافته (نمونه‌های ۱ و ۳) در صورتی‌که با ثابت ماندن سطح سویا و با افزایش میزان ساکارز در سطوح بالا (نمونه‌های ۲ و ۷) میزان اسید سیتریک کاهش یافت که می‌تواند به‌علت افزایش اثر اسمزی محیط کشت باشد. بیشترین مقدار اسید سیتریک در غلظت ۲۰۰ گرم در لیتر ساکارز و پودر سویا بدست آمد (جدول ٤). تحقیقات دانشمندان نشان داده است که با افزایش سطح ساکارز آنزیم‌های اینورتاز فعال شده و میزان قابل‌توجهی ساکارز تجزیه شده، که محرک تولید اسید سیتریک می‌باشد. هم‌چنین نشان دادند که افزایش بیش از حد بهینه قند، تولید اسید سیتریک را کاهش می‌دهد (Benuzzi and Segovia 1996; Papagiani, 2007).

نتایج نشان داد، با افزایش سویا تا سطح ۲۰۰ گرم در لیتر میزان اسید سیتریک افزایش یافت. از آن‌جایی که نیتروژن محرک رشد بوده و موجب تحریک رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود، می‌توان گفت که با افزایش نیتروژن میزان رشد افزایش یافته و تولید اسید سیتریک، افزایش می‌یابد (Papagiani, 2007). در سطوح بالاتر سویا میزان تولید اسید سیتریک کاهش یافته که با توجه به تحقیقی که توسط کریستیانسن و سینکلیر به‌دست آمد، نشان داده شد که افزایش بیش از نیاز نیتروژن باعث افزایش فشار اسمزی می‌شود که از عوامل اصلی کاهش تولید اسید سیتریک است (Kristiansen and Sinclair, 1978). همان‌طور که در جدول (۵) آمده میزان اسید سیتریک تولید از گونه قارچی ایزوله شده نسبت به گونه‌های غالب آسپرژیلوس جدا شده از سایر نواحی بالاتر بوده که نشان‌دهنده اهمیت این گونه میکروبی در تولید اسید سیتریک می‌باشد.

جدول (۵)- میزان اسید سیتریک تولیدی در گونه‌های مختلف از *آسپرژیلوس نایجر*

میکروارگانیسم	محیط کشت	شرایط تخمیر	میزان اسید سیترک (g/l)	منبع
آسپرژیلوس نایجر	ساکارز/عصاره مخمر	ارلن	۵۸	مطالعه اخیر
آسپرژیلوس نایجر	پوست نارگیل	ارلن	۱/۰۰	Sukesh *et al*., 2013.
آسپرژیلوس نایجر	آب پنیر/ساکارز	ارلن	۱۰۶/۵۰	El-Holi and Al-Delaimy, 2003
آسپرژیلوس نایجر 14/20	Pumpkin	ارلن	۱۰/۳۵	Majumder *et al*., 2010
آسپرژیلوس نایجر	Tapioca	ارلن	۱/۶۰	Sukesh *et al*., 2013.
آسپرژیلوس نایجر	سیب	ارلن	۲/۱۰	Sukesh *et al*., 2013.
آسپرژیلوس نایجر 14/20	ملاس	ارلن	۷/۷۲	Majumder *et al*., 2010
آسپرژیلوس نایجر	باکاس	ارلن	۰/۲۴	Vaishnavi *et al*., 2012
آسپرژیلوس نایجر	ملاس چقندر	ارلن	۲۴۰/۱۰	Lotfy *et al*., 2007
آسپرژیلوس نایجر	شربت ذرت خیسانده	ارلن	۱۰/۵۰	Lotfy *et al*., 2007

با بررسی میزان اسید سیتریک تولیدی فقط دو گونه میزان بالاتری نسبت به گونه جدا شده در این تحقیق داشته که نشان‌دهنده اهمیت گونه جدا شده و شرایط مناسب تخمیر در تولید اسید سیتریک می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در شرایط اولیه تخمیر میزان اسید سیتریک تولیدی ۸ گرم در لیتر شد (نمودار ۱) و با بهینه‌سازی این میزان به ۵۸ گرم در لیتر رسید که این افزایش قابل‌توجه نشان‌دهنده روش آماری مناسب به‌منظور بهینه‌سازی و انتخاب صحیح متغیرهای اعمالی و سطوح استفاده شده می‌باشد. در عین حال حداکثر متغییر اعمالی با حداقل آزمون‌های انجام شد که نشان‌دهنده روش سریع و مناسب آماری برای رسیدن به نقطه بهینه تولید است. در سطوح بهینه‌شده منبع قندی و نیتروژنی به‌منظور تولید اسید سیتریک با استفاده از روش سطح- پاسخ و مقایسه میزان اسید سیتریک تولیدی (۵۸ گرم در لیتر) با نتایج به‌دست آمده از تحقیق سایر محققان (جدول ۵) چنین تحلیل می‌شود که سویه جداسازی شده، روش آماری و متغیرهای اعمالی مناسبی انتخاب شده که تأثیر قابل‌توجهی در تولید این محصول تجاری نسبت به دیگر تحقیقات داشته است.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه صنعتی شاهرود به انجام رسیده است.

• منابع

- موسوی‌نسب، مرضیه و داراب‌زاده، نازنین (۱۳۸۹). تولید میکروبی لایزین با استفاده از آب پنیر و ملاس. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ٦، شماره ۲ صفحات: ۱۰٤– ۱۰۱ .
- Benuzzi, D.A. and Segovia, R.F. (1996). Effect of the copper concentration on citric acid productivity by an *Aspergillus niger* strain. Biochemistry and biotechnology, 61(3): 93-397.
- Bochu, W., Lanchun, S., Jing, Z., Yuanyuan, Y. and Yanhong, Y. (2003). The influence of Ca on the proliferation of *S. cerevisiae* and low ultrasonic on the concentration of Ca^{2+} in the *S. cerevisiae* cells, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 32: 35–42.
- Brock,T.D. and Adigan,T.M. (1994). Microbial Biotechnology. McGraw Hill Company, USA, p. 377.
- El-Holi, M.A. and Al-Delaimy, K.S. (2003). Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*, African Journal of Biotechnology, 2: 356–359.
- El-Hussein, A.A., Tawfig, S.A.M., Mohammed, S.G., Siddig M.A.E. and Siddig, A.M. (2009). Citric acid production from kenana cane molasses by *Aspergillus niger* in submerged fermentation. Journal of genetic engineering and biotechnology, 7(2): 51-57.
- Jomdecha, C., Prateepasen, A. (2006). The research of low ultrasonic energy affects to yeast growth fermentation process. Asia-Pacific Conference on NDT, 5^{th} – 10^{th} Nov 2006, Auckland, New Zealand
- Hang, Y.D. and Woodams E.E. (1984). Apple pomace: a potential substrate for citric acid production by *Aspergillus niger*. Biotechnology Letters, 5: 763-764.
- Iqba. J., Haq. I.U., Javed. M.M., Hameed. U., Khan. A.M., Parveen. N., *et al*. (2015). Isolation of *Aspergillus niger* strains from soil and their screening and optimization for enhanced citric acid production using cane molasses as carbon source, Journal of Applied Environmental and Biological Sciences, 5(4): 128-137
- Kristiansen, B. and Sinclair, C.G. (1978). Production of citric acid in batch culture. Biotechnology and Bioengineering, 20: 1711-1722.
- Lanchun, S., Bochu, W., Lianchai, Z., Jie, L., Yanhong, Y. and Chuanren, D. (2003). The influence of low intensity ultrasonic on some physiological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 30: 61–66.
- Lotfy. W.A. Ghanem. K.M. and El-Helow. E.R. (2007). Citric acid production by a novel *Aspergillus nigerisolate*: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. Bioresource Technology, 98: 3470–3477.
- Majumder, L. Khalil. I. and Munshi. M.K. (2010). Citric acid production by *Aspergillus niger* using molasses and pumpkin as substrates. European Journal of Biological Sciences, 2: 1–8.
- Marier, I.R. and Boulet, M. (1958). Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method. Journal of Dairy Science, 41: 1683-92.
- Moosavi Nasab, M. and Darabzadeh, N. (2010). Microbial production of lysine using whey permeate and molasses, Iranian Food Science and Technology Research Journal, 6(2): 104-101. [in Persian]
- Papagianni, M. and Mattey, M. (2004). Modeling the mechanisms of glucose transport through the cell membrane of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation processes. Biochemical Engineering Journal, 20: 7–12.
- Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger* Biochemical aspects, membrane transport and modeling. Biotechnology Advances, 25: 244–263.
- Sakuradani, E., Hirano, Y., Kamada, N., Nojiri, M., Ogawa, J. and Shimizu, S. (2004). Improvement of arachidonic acid production by mutants with lower n-3 desaturation activity derived from *Mortierella alpina* 1S-4. Applied Microbiology and Biotechnology, 66: 243–248.
- Singh, A. and Ward, O.P. (1997). Production of high yields of arachidonic acid in a fed-batch system by *Mortierella alpina* ATCC 32222. Apply Microbiology Biotechnology, 48: 1–5.

- Steinbock, F.A., Held, S. Choojun, H. Harmsen, M. Kubicek-pranz, E.M. and Kubicek, CP. (1991). Regulatory aspect of carbohydrate metabolism in relation to citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. Acta Biotechnol, 11: 571-581.
- Strobel, R.J. and Sullivan, G.R. (1999). Experimental design for improvement of fermentations. In: Manual of industrial Microbiology and Biotechnology, Demain, A.L. and Davies, J.E. Editors., ASM Press, Washington, DC, pp. 80-93.
- Sukesh, K., Jayasuni, J.S., Goku, C.N. and Anu, V. (2013). Citric acid production from agronomic waste using *Aspergillus niger* isolated from decayed fruit. Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences, 3(2): 1572-1576
- Samson, R.A., Houbraken, J., Summerbe, R.C., Flannigan, B. and Miller, J.D. (2001). Microogranisms in home and indoor work environments.Taylor and Francis, NewYork, p. 348.
- Resa, P., Bolumar, T., Pérez, G. and Espinosa, F.M.d. (2007). Monitoring of lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity. Journal of Food Engineering, 78(3): 1083–1091
- Rohr, M., Zehentgruber, O. and Kubicek, C.P. (1981). Kinetics of biomass formation and citric acid production by *Aspergillus niger* on pilot plant scale. Biotechnology and Bioengineering, 23: 2433–45.
- Vaishnavi, R., Chairman, K., Ranjit Singh, A.J.A., Ramesh, S. and Viswanathan, S. (2012). Screening the effect of bagasse—an agro waste for the production of citric acid using *Aspergillus niger* through solid state fermentation. Bioscience Methods, 3: 48–54.
- Wang, Z.M., Cheung, Y.C., Leung, P.H. and Wu, J.Y. (2010). Ultrasonic treatment for improved solution properties of a high-molecular weight exopolysaccharide produced by a medicinal fungus. Bioresource Technology, 101(14): 5517-22.
- Xu, B.D., Madrit, C., Röhr, M. and Kubicek, C.P. (1989).The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology, 30: 553–8.
- Zhu, M., Yu, L.J. and Wu, YX. (2003). An inexpensive medium for production of arachidonic acid by *Mortierella alpina*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30: 75–79.