مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هشتم، شماره 3، پاییز 1392، صفحات 163-155

تولید اسید سیتریک از کاه گندم و باگاس خام نیشکر با استفاده از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* به روش تخمیر در بستر جامد

آلاله ذوقی[1]، کیانوش خسروی دارانی[2]، سارا سهراب‌وندی[3]

1- استادیار گروه صنایع شیمیایی، دانشکدهٔ فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرری، تهران، ایران

2- نویسنده مسئول: دانشیار گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: kiankh@yahoo.com

3- استادیار، گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/4/2 تاریخ پذیرش: 92/7/20

چکیده

سابقه و هدف: اسید سیتریک یکی از پرمصرف‌ترین فرآورده‌های تخمیری است و کوشش‌های زیادی برای کاهش هزینه تولید آن به عمل آمده است. هدف این تحقیق مقایسه تولید اسید سیتریک از کاه گندم و باگاس نیشکر به عنوان سوبسترای ارزان قیمت، با *آسپرژیلوس نایجر* در تخمیر حالت جامد می‌باشد. همچنین فاکتورهای مؤثر بر تولید مانند pH، رطوبت اولیهٔ سوبسترا، غلظت اولیه قند، میزان تلقیح، سن اسپور، درصد متانول و منبع نیتروژن، دما، زمان تخمیر، نوع حلال و زمان اعمال بخار بررسی شدند.

مواد و روش‌ها: *آسپرژیلوس نایجر* PTCC 5010، در اسلنت‌های PDA به مدت 5 روز در دمای 30°C گرمخانه‌گذاری و از آن سوسپانسیون اسپوردار تهیه شد. سپس سوبسترای خشک توزین و pH، رطوبت، قند و نیتروژن آن تنظیم شد. پس از اتوکلاو سوبسترا، تلقیح و گرمخانه‌گذاری انجام شد. محیط کشت با آب مقطر یا استون فروشویی شد و جداسازی فاز مایع و جامد به کمک صافی و سانتریفوژ انجام گرفت.

یافته‌ها: بیشترین تولید اسید سیتریک 47 و 94/5 گرم به ازای کیلوگرم کاه و باگاس نیشکر خشک به دست آمد. راندمان تولید بر مبنای مقدار قند قابل تخمیر کاه گندم و باگاس نیشکر به ترتیب برابر با 93 و 97 درصد تعیین شد. بیشترین میزان بهره‌دهی از کاه و باگاس به ترتیب به 11/21 و 22/22 گرم بر کیلوگرم در روز رسید.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد کاه گندم و باگاس نیشکر سوبستراهای مؤثر و اقتصادی در تولید اسید سیتریک هستند. پس از فروشویی اسید سیتریک و پاکسازیِ محیط کشت تخمیر می توان به عنوان خوراک دام استفاده کرد.

واژگان کلیدی: تولید اسید سیتریک، تخمیر حالت جامد، باگاس نیشکر، کاه گندم، *آسپرژیلوس نایجر*

• مقدمه

بیوتکنولوژی علم استفاده از قوای حیاتی ریزاندامگان‌ها در جهت تولید محصولات مختلف (1) مانند اسید سیتریک است. این اسید آلی به طور طبیعی در گیاهان و جانوران وجود دارد و توسط بسیاری از کپک‌ها، مخمرها و باکتری‌ها تولید می‌شود. اولین بار اسید سیتریک توسط شیل از آبلیمو در سال 1784 به صورت کریستال جدا شده، Grimoux و Adam تولید شیمیایی آن را از گلیسرول در سال 1880 انجام دادند و تولید تخمیری توسط *آسپرژیلوس نایجر* بر پایهٔ تحقیقات Curry در سال 1917 صورت پذیرفت و امروزه نیز این روش جهت تولید صنعتی استفاده می‌شود (2). صنعت تولید اسید سیتریک یکی از عمده‌ترین صنایع فرآورده‌های تخمیری است و به سه روش کشت غوطه‌ور، سطحی و حالت

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-04-04]

جامد تولید می‌شود (3). واژهٔ بستر جامد برای محیطی بکار می‌رود که ریزاندامگان بر روی مواد جامد فاقد مایع آزاد رشد نماید (4). در حدود یک پنجم از تولید اسید سیتریک در کشور ژاپن به وسیله کشت حالت جامد حاصل می‌شود (5).

با توجه به گستردگی مصرف اسید سیتریک در صنایع مختلف 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. در این ارتباط مطالعات زیادی به منظور استفاده از ضایعات مختلف برای تولید اسید سیتریک صورت گرفته است که برای مثال می‌توان به تفالهٔ سیب (7، 6، 3)، تفالهٔ انگور (8)، پوست کیوی (9)، ضایعات قهوه (10)، چوب ذرت (11)، تفالهٔ خرما (12) و خزه (13) اشاره کرد. با توجه به این که تولید صنعتی اسید سیتریک در دنیا تقریباً از دههٔ 1920 شروع شده، ولی این اسید در کشور تولید بسیار ناچیزی علی‌رغم مورد استفادهٔ فراوان، دارد و هرساله واردات آن مقادیر زیادی از ارز مملکت را به خود اختصاص می‌دهد. از طرف دیگر در سال‌های اخیر اقتصاد کشور ایران از لحاظ تولید گندم به خودکفایی رسیده است و درصد بالایی از این گیاه در صنعت به کاه گندم تبدیل می‌شود، همچنین باگاس نیشکر نیز جزو ضایعات کارخانهٔ قند محسوب می‌شود و هر دو برای نگهداری نیاز به فضای بسیار زیادی دارند.

طراحی پلاکت- برمن به فراوانی برای بررسی متغیرهای مؤثر در فرآیند استفاده می‌شود (14)و به ویژه برای پژوهش‌های بیوتکنولوژی بسیار مناسب و پرکاربرد است (15) مانند فرایند تولید اسپورهای *کولتوتریکم کوکودز* (16)، اسید سوکسینیک (17)، پلی هیدروکسی بوتیرات (18). این طراحی برای مطالعه K فاکتور دو سطحی در N آزمایش مناسب است که در آن N مضربی از 4 می‌باشد.

• مواد و روش‌ها

ریزاندامگان استفاده شده قارچ *آسپرژیلوس نایجر* PTCC 5010 (ATCC 9142) بود که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. سوش مورد نظر در اسلنت‌های حاوی محیط کشت PDA، کشت داده شد و به مدت 5 روز در دمای 30 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید و سپس در یخچال با دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور جلوگیری از کاهش فعالیت سوش و آلودگی‌های احتمالی، هر ماه یک بار اسلنت‌های جدیدی از آن تهیه گردید. جهت آماده نمودن سوسپانسیون اسپوردار، 8 میلی‌لیتر آب مقطر استریل به اسلنت‌های 4 و یا 6 روزه افزوده شد و پس از جدا سازی اسپورها توسط لوپ و رها نمودن آن‌ها در آب، شمارش اسپورها با کمک لام توما توسط میکروسکوپ صورت گرفت و رقت‌های مورد نظر تهیه شدند. کاه گندم این تحقیق از یک مزرعهٔ گندم در منطقهٔ طالقان و باگاس نیشکر مورد استفاده از کارخانهٔ تولید قند هفت تپه تهیه و در دمای محیط نگهداری شدند. سایز ذرات کاه گندم و باگاس نیشکر به ترتیب 3/5-0/5 و 7-1 سانتی-متر تخمین زده شد. متخلخل بودن محیط کشت به حد مناسب سبب نفوذ بهینهٔ اکسیژن و دفع مناسب گرمای تولیدی در حین تخمیر می‌شود (19). با کاهش سایز ذرات، فضای خالی بین ذرات کم شده و آمادگی ذرات برای فشردگی افزایش می‌یابد، در نتیجه کاهش انتقال اکسیژن و دی‌اکسیدکربن رخ می‌دهد و با بیشتر شدن اندازهٔ ذرات، هوادهی مطلوب‌تر شده و تولید بالا می‌رود (7). لذا به دلیل صرفه‌جویی در مصرف انرژی و موارد ذکر شده، از آسیاب کردن کاه گندم و باگاس نیشکر صرف نظر شد.

عملیات تخمیر: 4 گرم از سوبسترای کاملاً خشک شده در ارلن‌های 250 میلی‌لیتر ریخته شد و پس از تنظیم pH روی 4 یا 5/5، رطوبت روی 65% یا 75% (با افزودن آب مقطر)، قند اولیه روی 14 یا 18% (وزنی /وزنی) و افزودن 2 یا 4% (وزنی /وزنی) منبع نیتروژن (اوره) و 3 یا 4% (وزنی /حجمی)، در اتوکلاو با دمای 121 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 یا 90 دقیقه استریل گردید. پس از خنک شدن، در شرایط استریل سوسپانسیون اسپوری با رقت‌های $1x10^5$ یا $1x10^7$ (میلی‌لیتر / اسپور) به هر ظرف تخمیر تلقیح شد. ارلن‌های تخمیر شده در دمای 25 یا 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 4 یا 5 روز گرمخانه‌گذاری شدند. کلیهٔ کشت‌ها با دو بار تکرار بررسی گردیدند.

فروشویی: جداسازی اسید سیتریک از محیط، با افزودن دو مرحله آب مقطر یا یک مرحله آب مقطر و یک مرحله استون، در حجم‌های 150 میلی‌لیتر به محیط و هم‌زدن به مدت نیم ساعت در هر مرحله و سپس جداسازی فاز مایع و جامد به کمک صافی و سانتریفوژ انجام گرفت. پس از این مرحله میزان اسید سیتریک تولیدی و قند باقیماندهٔ موجود در فاز مایع اندازه‌گیری شد. میزان قند اولیه و باقیمانده به روش دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) (20) و میزان اسید سیتریک تولیدی به روش پیریدین-انیدرید استیک (21) اندازه‌گیری شدند.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-04-04]

انـدازه‌گیـری pH: بـرای تعیـین pH از دسـتگاه pH متـر (Crison Instruments S.A.، بارسلونا، اسپانیا) با اسـتفاده از محلول 10% آبی استفاده شد.

روش طراحی پلاکت - برمن: اولین قدم در این روش تشخیص متغیرهایی است که بصورت معنی‌داری روی تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر* تأثیرگذار هستند. به منظور بیشینه کردن رشد *آسپرژیلوس نایجر* و تولید اسید سیتریک توسط آن، فاکتورهای مؤثر و سطوح آن‌ها بر اساس تحقیقات گذشته انتخاب شدند. متغیرهای ارزیابی شده شامل شرایط محیط کشت و فاکتورهای محیطی در جدول 1 آورده شده‌اند. جدول 2 طراحی پلاکت- برمن را برای انجام 12 آزمایش به همراه یازده متغیر در دو سطح، نشان می‌دهد. علامت + نشان دهندهٔ سطح بالا و علامت نیز نشان دهندهٔ سطح پایین هر متغیر می‌باشد. مرحله اول برای طراحی پلاکت-برمن، محاسبهٔ ضریب برای هر یازده متغیر سپس تخمین راندمان برای هرکدام است. با داشتن دو مقدار آزمایشی و پیش‌بینی شده پاسخ، خطای استاندارد و آن گاه خطای تخمینی به دست می‌آید. با محاسبه مقدار t برای هر متغیر و مقایسه آن با مقدار t جداول آمار با درجه آزادی 10 و سطح اطمینان 75، 90 و 95 درصد به ترتیب برابر با 0/69، 1/37 و 1/81 اهمیت هر متغیر مشخص می‌شود. محاسبات ذکر شده برای طراحی پلاکت-برمن روی تولید اسید سیتریک از کاه گندم در جداول 3 و 4 و از باگاس نیشکر در جداول 5 و 6 آمده‌اند.

جدول 1. متغیرهای مؤثر در تولید اسید سیتریک از کاه گندم و باگاس نیشکر

متغیر	سطح بالا (+)	سطح پایین (-)
درصد منبع نیتروژن (w/w)	4	2
درصد متانول (v/w)	4	3
زمان اعمال بخار (دقیقه)	90	20
درصد قند اولیه (w/w)	18	14
دمای تخمیر (ºC)	30	25
زمان تخمیر (روز)	5	4
حلال	استون	آب
PH اولیه	5/5	4
سایز تلقیح(spore/ml)	10^7	10^5
درصد رطوبت	75	65
سن اسپور (روز)	6	4

جدول 2. طراحی پلاکت- برمن برای مطالعهٔ 11 متغیر در تولید اسید سیتریک

No	*A*	*B*	*C*	*D*	*E*	*F*	*G*	*H*	*I*	*J*	*K*
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
3	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
4	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
5	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
6	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-
7	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
8	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
9	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
10	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
11	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
12	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-04-04]

• یافته‌ها

جدول‌های 3 و 5 مقایسهٔ بین راندمان و بهره‌دهی تجربی و پیش‌بینی شده در فرآیند تولید اسید سیتریک از کاه گندم و باگاس نیشکر را نشان می‌دهند. همچنین در جداول 4 و 6 آنالیز واریانس راندمان و بهره‌دهی تولید اسید سیتریک از کاه گندم و باگاس نیشکر آورده شده است.

اثر متانول: نتایج این تحقیق نشان می‌دهند که سطح بالای متانول (4% وزنی /حجمی)، برای هر دو سوبسترا بالاترین راندمان و بهره‌دهی تولید را حاصل می‌نماید و اثر بیشتری روی بهره‌دهی نسبت به راندمان دارد.

اثر رطوبت اولیه: با توجه به جداول 4 و 6 مشخص می‌شود که بالاترین راندمان و بهره‌دهی برای کاه و باگاس به ترتیب در رطوبت 65 و 75 درصد حاصل می‌شود.

اثر pH اولیه: جداول 4 و 6 نشان می‌دهد که pH اولیهٔ 5/5 برای هر دو سوبسترا مناسب‌تر از 4 می‌باشد. اثر pH روی بهره‌دهی بیشتر از راندمان است، یعنی با توجه به ضریب متغیر و محاسبات انجام شده، با تغییر pH تغییرات میزان بهره‌دهی نسبت به تغییرات راندمان، قابل توجه می‌باشد.

اثر دما و زمان تخمیر: دمای تخمیر مناسب تولید اسید سیتریک در این تحقیق برای کاه و باگاس به ترتیب معادل 25 و 30 درجه سانتی‌گراد و زمان تخمیر نیز برای هر دو سوبسترا 5 روز بود. البته طبق جدول 4 و 6 تفاوت زیادی بین میزان اثر دو سطح روی بهره‌دهی و راندمان تولید مشاهده نمی‌شود.

اثر سن اسپور و سایز تلقیح: برای تولید بیشتر اسید سیتریک از هر دو سوبسترا، *آسپرژیلوس نایجر* PTCC 5010 روی اسلنت PDA به مدت 6 روز رشد کرد و میزان 10^5 (اسپور /میلی‌لیتر) از آن به محیط کشت تلقیح شد.**اثر غلظت قند اولیه:** در صنایع تخمیری غلظت مؤثر قند در محیط کشت جامد باید 22-14 درصد باشد. قند محلول کاه گندم و باگاس نیشکر استفاده شده به ترتیب برابر با 4 و 2/5 درصد بود و چون این مقادیر از حد لازم پایین‌تر بودند، از ملاس نیشکر برای بالا بردن قند اولیهٔ محیط کشت استفاده شد. مطابق با نتایج جدول 4 و 6، غلظت قند اولیهٔ مناسب برای تولید بیشینهٔ اسید سیتریک برای هر دو سوبسترا، 18% (وزنی /وزنی) بود.

جدول 3. مقایسهٔ بین راندمان و بهره‌دهی تجربی و پیش‌بینی شده در فرآیند تولید اسید سیتریک از کاه گندم

شمارهٔ آزمایش	راندمان اسید سیتریک % (قند/اسید)		بهره‌دهی اسید سیتریک (g/kg.day)	
	تجربی	پیش‌بینی شده	تجربی	پیش‌بینی شده
1	0/853	0/891	11/21	11/57
2	0/135	0/177	3/24	3/64
3	0/527	0/567	6/34	6/72
4	0/042	0/083	1/09	1/48
5	0/473	0/513	5/59	5/98
6	0/095	0/137	2/54	2/94
7	0/344	0/385	4/41	4/82
8	0/930	0/483	3/71	0/68
9	0/423	0/459	4/09	4/48
10	0/470	0/511	4/09	4/48
11	0/876	0/913	8/03	8/42
12	0/696	0/735	3/71	4/10

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-04-04]

اثر استفاده از استون در فروشویی: همان طور که در جداول 4 و 6 آمده است، استون نسبت به آب، اثر بیشتری روی فروشویی دارد.

اثر افزودن منبع نیتروژن: از جداول 4 و 6 معلوم می‌شود که بیشترین میزان تولید اسید سیتریک از کاه گندم و باگاس نیشکر به ترتیب با افزودن 2% و 4% (وزنی /وزنی) اوره به عنوان منبع نیتروژن، حاصل شده است

اثر زمان اعمال بخار: در این تحقیق استفاده از 90 دقیقه اعمال بخار روی کاه گندم و باگاس نیشکر، بیشترین بهره‌دهی و راندمان را حاصل نمود (طبق جداول 4 و 6). قرار گرفتن سوبسترا در معرض بخار می‌تواند به عنوان یک پیش‌تیمار فیزیکی عمل کند، به همین دلیل موجب افزایش تولید اسید سیتریک شده است.

جدول 4. آنالیز واریانس راندمان و بهره‌دهی تولید اسید سیتریک از کاه گندم

متغیر	راندمان اسید سیتریک (a)		بهره‌دهی اسید سیتریک (b)	
	ضریب متغیر	مقدار t	ضریب متغیر	مقدار t
منبع نیتروژن (%w/w)	-0/013	-0/097	0/01	0/01
درصد متانول (v/w)	0/010	0/074	0/22	0/21
زمان اعمال بخار (دقیقه)	0/086	0/641	1/78	1/87
قند اولیه (%w/w)	0/057	0/425	0/67	0/71
دمای تخمیر (°C)	-0/093	-0/694	0/56	0/59
زمان تخمیر (روز)	0/020	0/149	0/43	0/45
نوع حلال	0/062	0/462	1/54	1/62
pH اولیه	0/032	0/238	0/70	0/74
سایز تلقیح (spore/ml)	-0/020	-0/149	-0/09	-0/09
رطوبت اولیه (%)	-1/462-0/196		-1/5 -1/19	
سن اسپور (روز)	0/447- 0/060		0/93-0/88	

(a) میانگین راندمان تجربی برابر با 0/488، خطای استاندارد برابر با 0/217 و خطای تخمینی برابر با 0/134 است.

(b) میانگین بهره‌دهی تجربی برابر با 4/83، خطای استاندارد برابر با 10/85 و خطای تخمینی برابر با 0/95 می‌باشد.

جدول 5. مقایسهٔ بین راندمان و بهره‌دهی تجربی و پیش‌بینی شده در فرآیند تولید اسید سیتریک از باگاس نیشکر

شمارهٔ آزمایش	راندمان اسید سیتریک % (قند/اسید)		بهره‌دهی اسید سیتریک (g/kg.day)	
	تجربی	پیش‌بینی شده	تجربی	پیش‌بینی شده
1	0/930	0/984	22/22	22/94
2	0/917	0/970	14/02	14/75
3	0/710	0/764	8/59	9/32
4	0/053	0/108	1/09	1/82
5	0/605	0/660	4/84	5/60
6	0/564	0/618	13/32	14/04
7	0/310	0/366	5/82	6/56
8	0/422	-0/184	2/54	5/50
9	0/971	1/024	8/03	8/74
10	0/862	0/916	7/65	8/38
11	0/896	0/950	11/78	12/52
12	0/738	0/792	5/58	6/32

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-04-04]

جدول 6. آنالیز واریانس راندمان و بهره‌دهی تولید اسید سیتریک از باگاس نیشکر

متغیر	راندمان اسید سیتریک (a)		بهره‌دهی اسید سیتریک (b)	
	ضریب متغیر	مقدار t	ضریب متغیر	مقدار t
منبع نیتروژن (%w/w)	0/022	0/120	-0/424	-0/381
درصد متانول (v/w)	0/189	1/038	2/162	1/965
زمان اعمال بخار (دقیقه)	0/161	0/884	3/622	3/292
قند اولیه (%w/w)	0/064	0/351	2/215	2/013
دمای تخمیر (°C)	0/020	0/109	2/622	2/383
زمان تخمیر (روز)	0/073	0/401	-1/060	-0/963
نوع حلال	0/103	0/565	2/944	2/676
pH اولیه	0/009	0/049	0/497	0/451
سایز تلقیح (spore/ml)	-0/023	-0/126	-0/869	-0/790
رطوبت اولیه (%)	0/003	1/247	0/264	0/240
سن اسپور (روز)	0/227	0/016	2/332	2/120

(c) میانگین راندمان تجربی برابر با 0/664، خطای استاندارد برابر با 0/399 و خطای تخمینی برابر با 0/182 است.
میانگین بهره‌دهی تجربی برابر با 8/79، خطای استاندارد برابر با 14/65 و خطای تخمینی برابر با 1/10 می‌باشد.

• بحث

استفاده از متانول به منظور افزایش تولید اسید سیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر*، اولین بار در سال 1953 توسط Moyer انجام گرفت (22). متانول نفوذپذیری دیواره سلولی را برای ترشح اسید سیتریک به خارج افزایش می‌دهد. اثر متانول روی تولید اسید سیتریک به سطح رطوبت کاربردی بستگی دارد (23)، از طرف دیگر این الکل روی متابولیسم میکروارگانیسم اثر می‌گذارد و چنانچه بیش از حد اندازه افزوده شود، رشد میکروارگانیسم را تا حد زیادی پایین می‌آورد (24).

یکی از فاکتورهای مهم و مؤثر در سیستم تخمیر حالت جامد، رطوبت اولیهٔ سوبسترا می‌باشد (25). سطح رطوبت سوبسترا توسط ماهیت سوبسترا، نوع محصول نهایی و نیاز ریزاندامگان تعیین می‌شود (26). بالا رفتن رطوبت بیش از حد سبب کاهش فضای خالی بین ذرات و افت انتقال جرم گاز می‌شود (27)، کاهش بیش از حد رطوبت نیز موجب کاهش انتقال جرم و در نتیجه کاهش تولید خواهد شد (7).

بنابر گزارش‌های موجود گسترهٔ pH مناسب برای رشد *آسپرژیلوس نایجر* 5-4 می‌باشد (4). بررسی‌های انجام شده توسط دانشمندان نشان داده است که در pH حدود 2/5-2 و کمتر از 2 تقریباً 95% اسید تولید شده اسید سیتریک می‌باشد (28)، بعد از آن مقدار pH بدلیل اکسید شدن اسید سیتریک توسط ریزاندامگان بالا می‌رود (29).

میزان تولید اسید سیتریک نسبت به دما و زمان دارای یک حداکثر است، با عبور از نقطهٔ حداکثر، رشد و اسپورزایی شدید ریزاندامگان سبب توقف رشد می‌شود و درنتیجه نولید اسید پایین می‌آید (30). در زمان تخمیر پیشنهاد یک مدل برای رشد ریزاندامگان در بستر جامد کار چندان ساده‌ای نیست، چراکه رشد در بستر جامد بیشتر شبیه رشد محیط طبیعی است و مواد مغذی موجود در سوبسترا بطور ایده‌آل نمی‌باشد (31).

Fernandez و همکاران اظهار داشتند که بیشترین میزان اسید زمانی تولید می‌شود که سن اسپور کمتر از 7 روز باشد، زیرا اسپورهای پیرتر بعد از تولید اسید و قبل از این که زمان تخمیر کامل شود، مجدداً اسید را مصرف می‌نمایند (32). طبق گزارش منابع غلظت مؤثر قند در محیط کشت جامد باید در محدوده 22-14 درصد باشد (33). افزایش تعداد ریزاندامگان تلقیح شده، در ابتدا میزان تولید را بالا می‌برد ولی در ادامه، افزایش تعداد ریزاندامگان‌ها فرآیند را به سمت انبوه شدن سلول و مصرف قند را به نفع تولید تودهٔ زیستی سوق می‌دهد، در نتیجه تولید محصول کاهش پیدا می‌کند، کاهش بیش از حد میزان تلقیح نیز سبب طولانی شدن فاز سازگاری و در نتیجه کاهش بهره‌وری است (30).

فروشویی یکی از مهم‌ترین قسمت‌های عملیات واحد است که برای استخراج یک یا بیشتر مواد تشکیل دهنده

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-04-04]

مخلوط جامد به وسیلهٔ تماس با یک حلال صورت می‌پذیرد. فروشویی اسید سیتریک با استون منجر به افزایش درصد استخراج نسبت به آب می‌گردد و با توجه به نقطهٔ جوش پایین این حلال (56/2 درجه سانتیگراد)، بازیافت و استفادهٔ مجدد از آن امکان‌پذیر خواهد بود (34). پیش‌تیمار با بخار سبب شکسته شدن اتصالات گروه‌های استیل و فرمیل همی‌سلولز و پکتین، دپلی‌ویتراسیون لیگنین، نرم شدن دیوارهٔ سلولی و افزایش ظرفیت نگهداری آب می‌گردد (35).

هنگامی که *آسپرژیلوس نایجر* به محیط کم نیتروژن یا فاقد نیتروژن اضافه شود، به اندازهٔ تولید اسید سیتریک، اسید اگزالیک تولید می‌کند، ولی افزایش زیاد منبع نیتروژن نتیجهٔ عکس دارد و موجب افزایش رشد ریزاندامگان و کاهش تولید اسید سیتریک می‌شود (30).

در فرآیند تولید اسید سیتریک از کاه گندم و باگاس نیشکر به روش تخمیر در بستر جامد، میزان اسید سیتریک تولیدی توسط قارچ *آسپرژیلوس نایجر* PTCC 5010 به ترتیب برابر با 47 و 94/5 گرم به ازاء یک کیلوگرم سوبسترای خشک به دست آمد.این مقادیر در مقایسه با مقادیر اسید سیتریک تولیدی از سوبستراهای مختلف پایین‌تر می‌باشند (13-6 ،3)، علت این امر می‌تواند به دلیل ساختار لیگنوسلولزی کاه گندم و باگاس نیشکر باشد، زیرا شکستن دیوارهٔ سلولی برای میکروارگانیسم مشکل است. بیشترین راندمان تولید اسید سیتریک بر مبنای قند مصرفی برای کاه و باگاس به ترتیب برابر با 93% و 97% بود و بالاترین بهره‌دهی تولید نیز به ترتیب حدود 11/21 و 22/22 (گرم / کیلوگرم در روز) حاصل شد. طبق نتایجی که در جدول 4 آورده شده، با سطح اطمینان 95% متغیر زمان اعمال بخار و با سطح اطمینان 90% نوع حلال، متغیر مؤثر و با اهمیت در بررسی بوده‌اند. از آنجا که با اعمال بخار روی کاه گندم و باگاس نیشکر، نوعی پیش‌تیمار فیزیکی انجام پذیرفته است، بنابراین مهم بودن متغیر زمان اعمال بخار قابل پیش‌بینی بود. همچنین طبق تحقیقات گذشته (34 ،6)، همانگونه که انتظار می‌رفت فروشویی با استون راندمان بالاتری را حاصل نمود، درنتیجه متغیر نوع حلال نیز جزء متغیرهای با اهمیت تعیین گردید. با توجه به جدول 6، در سطح اطمینان 95% متغیرهای درصد متانول، زمان اعمال بخار، غلظت قند اولیه، دمای تخمیر، نوع حلال و سن اسپور برای سوبسترای باگاس نیشکر متغیرهای مؤثر شناخته شدند. پاسخی که برای هر متغیر به دست می‌آید بستگی به مقادیر سطوح انتخابی دارد. در واقع در روش طراحی پلاکت-برمن، اگر فاصلهٔ بین دو سطح انتخاب شده برای متغیرهای کم اثر خیلی زیاد نباشد، ممکن است پاسخ‌های قابل توجهی حاصل شود. از طرف دیگر احتمال دارد سطح بالا یا پایین برخی از متغیرهای مؤثر طوری انتخاب شود که اختلاف پاسخ آنها به قدری بزرگ باشد که اثر متغیرهای دیگر را بپوشاند. از آنجا که روش طراحی پلاکت-برمن معمولاً به عنوان یک روش بهینه‌سازی اولیه بکار می‌رود، برای بررسی اثر این گونه متغیرها در تولید اسید سیتریک نیاز به روش‌های اندازه‌گیری دقیق‌تری می‌باشد.

با ارزیابی نتایج به دست آمده و با توجه به این که کاه گندم و باگاس نیشکر از نظر قیمت سوبستراهای بسیار مناسبی برای تولید اسید سیتریک می‌باشند، می‌توان این فرآیند را به عنوان یک روش مؤثر و اقتصادی در تولید اسید سیتریک مد نظر قرار داد. از طرفی پس از فروشویی و استخراج اسید سیتریک از کشت تخمیر شده و از بین بردن ریزاندامگان‌ها، می‌توان از مواد باقیمانده به عنوان خوراک دام استفاده نمود.

• References

1. Brock TD, Madigan TM. Microbial Biotechnology. Mc Graw Hill company 1994. p. 373-7.

2. Othmer K. Encyclopedia of chemical technology. 3th ed. 1987. p. 150-78.

3. Fatemi SS, Shojaosadati SA. Citric acid production from apple pomace in solid state fermentation. Iran J Chem Chem Eng 1999; 18: 44–47. [in Persian]

4. Hesseltine CW. Solid state fermentation. Biotech Bioengin 1972; 517-32.

5. Shankaranand VS, Lonsane BK. Sugarcane-pressmud as a novel substrate for production of citric acid by solid-state fermentation. World Microbiol Biotechnol 1993; 9: 377-80

6. Hang YD, Woodams EE. Solid state fermentation of apple pomace for citric acid production. MIRCEN J 1986; 2: 283-7.

7. Shojaosadati SA, Babaeipour V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. Process Biochem 2002; 37: 909-14.

8. Hang YD, Woodams EE. Utilization of grape pomace for citric acid production by solid state fermentation. American J Enolo viticul 1986; 37 (2): 141-2.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-04-04]

9. Hang YD, Luh BS, Woodams EE. Microbial production of citric acid by solid-state fermentation of kiwifruit peel. J Food Sci 1987; 52 (1): 226-7.

10. Shankaranand VS, Lonsane BK. Coffee husk: an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger* in a solid state fermentation system. World J Microbiol Biotechnol 1994; 10: 165-8.

11. Hang YD, Woodams EE. Production of citric acid from corncobs by *Aspergillus niger*. Bioresource Technol 1998; 65: 251-3.

12. Assadi MM, Nikkhah M. Production of Citric Acid from Date Pulp by Solid State Fermentation. J Agricul Sci Technol 2002; 4: 119-125 [in Persian]

13. Kim JW, Barrington S, Sheppard J, Lee B. Nutrient optimization for the production of citric acid by *A. niger NRRL 567* grown on peat moss enriched with glucose. Process Biochem, 2006; 41: 1253-60.

14. Plackett RL, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika 1946; 33: 305-325.

15. Haaland PD. Experimental design in biotechnology. Elsevier, New York 1989; p. 85.

16. Yu X, Hallett SG, Sheppard J, Watson AK. Application of the Plockett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Collototrichum coccodes* spores. Appl Microbiol Biotechnol 1997; 44: 301-3.

17. Lee PC, Lee WG, Lee SY. Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* succinic acid production. Process Biochem 1999; 35: 49-55.

18. Khosravi-Darani K, Vasheghani-Farahani E, Shojaosadati SA. Application of Plackett-Burman statistical design to optimize poly (hydroxybutyrate) production by Ralstonia eutropha in batch culture. Iranian J Biotechnol 2002; 1: 155-61.

19. Gervais P, Molin P. Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. Biotechnol Bioengin 1988; 31: 457-463

20. Miller GL. Use of dinitrosalycilic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytic Chemi 1959; 31: 426-30.

21. Marier YR, Boulets MA. Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine acetic anhydride method. J Dairy Sci 1958; 41: 1683-92.

22. Moyer AJ. Effect of alcohols on the mycological production of citric acid in surface and submerged culture. II. Fermentation of crude carbohydrates. Appl Microbiol 1953; 1: 7–13.

23. Hang YD, Woodams EE. Effect of substrate moisture content of fungal production of citric acid in a solid state fermentation system. Biotechnol Lett 1982; 9(3): 183-6.

24. Chaudhary K. Citric acid production from indian cane molasses by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation conditions. J Ferment Technol 1978; 56 (5): 554-7.

25. Roukas T. Citric acid production from carob pod by solid state fermentation. Enzyme Microbial Technol 1999; 24: 54-9.

26. Jalili H, Ghaemi N. Citric acid production from sugarcane baggase by solid state fermentation. Proceedings of the third National Conference of Biotechnology, 2003; 172-4, Tehran, Iran. [in Persian]

27. Tran CT, Mitchell DA. Pine apple waste- a novel substrate for citric acid production by solid state fermentation. Biotechnol Lett 1995; 17: 1107-10.

28. Lobo FX, Nadkarni SM. Process for the preparation of citric acid from cane sugar molasses. Canadian Patent Office 1960; CA 604531.

29. Hang YD, Splittstoesser DF, Woodams EE. Utilization of brewery spent grain liquor by *A. niger*. Appl Microbiol 1975; 30: 879-880.

30. Fatemi SS, Shojaosadati SA. Experimental design optimization of citric acid production by Aspergillus niger in solid state fermentation. AmirKabir J 2001; 11: 314–9. [in Persian]

31. Mitchell DA, Greenfield PF, Doelle HW. A model substrate for solid state fermentation. Biotechnol Lett 1986; 8(11): 827-32.

32. Fernandez MG, Soria MA, Kerber NL. Influence of inoculum preparation on citric acid production by *Aspergillus niger*. World J Microbiol Biotechnol 1996; 12: 655-56.

33. Rohr M, Kubicek CP, Kominek J. Citric acid, In Biotechnology: Biomass Microorganisms for Special Applications, Microbial Products, I. Energy from Renewable Source, ed Dellweg, H. 1983. p. 420-54.

34. Hang YD, Woodams EE. A process for leaching citric acid from apple pomace with *A. niger* in solid state culture. MIRCEN J 1989; 5: 379-82.

35. Liu JX, Orskov ER. Cellulase treatment of untreated and steam pretreated rice straw-effect on in vitro fermentation characteristics. Animal Feed Sci Technol 2001; 88: 189-200.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-04-04]

Citric acid production from raw wheat straw and sugarcane bagasse using A. niger ATCC 9142 and solid state fermentatio

Zoghi A[1], Khosravi-Darani K[2], Sohrabvandi S[3]*

1- *Assistant Prof. Dept.of Chemical Industries, Faculty of Engineering, Islamic Azad University, Share-Rey Branch, Tehran, Iran*

2- **Corrsponding author: Associate Prof. Research Dept.of Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, Email: kiankh@yahoo.com*

3- *Assistant Prof. Research Dept.of Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received 23 Jun, 2013 **Accepted 12 Oct, 2013**

Background and Objectives: Citric acid is a widely-used fermented product and several methods for decreasing its production cost have been developed. This study compared citric acid production from wheat straw and sugarcane baggase as inexpensive sources using A. niger and solid state fermentation. Process variables that influence production, such as pH and moisture of substrate, initial sugar concentration, inoculum size, age of spore, methanol concentration, nitrogen source, temperature, fermentation time, type of solvent, and steaming time were evaluated.

Materials and Methods: A. niger ATCC 9142 was incubated at 30°C for 5 d on potato dextrose agar slants and the suspended spores were collected. The dried substrates were weighed and the pH and moisture recorded. Sugar and nitrogen content were adjusted accordingly. After autoclaving the substrate, inoculation and incubation were done. The medium was leached using distilled water or acetone, then separation was done by filtration and centrifuging.

Results: The maximum citric acid products were 47 g per kg for wheat straw and 94.5 g per kg (dry) for sugar cane bagasse. The citric acid yield based on the consumed fermentable sugar of wheat straw was 93% and of sugar cane bagasse was 97%. The maximum productivity for wheat straw was 11.21 g/kg day and for sugar cane bagasse was 22.22 g/kg day.

Conclusion: The results suggest that wheat straw and sugarcane baggase are effective and inexpensive substrates for production of citric acid. In addition, the fermented medium can be used as an animal feed component after leaching of the citric acid and decontamination.

Keywords: Citric acid production, Solid state fermentation, Sugar cane bagasse, Wheat straw, A. niger

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-04-04]