

## تأثیر مورفولوژی و شرایط فرماتور بر تولید اسید سیتریک توسط اسپرژیلوس نایجر

تقی زاده مسعود\*، موسوی نژاد گلاره\*  
دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی.  
تلفن: ۰۵۱-۸۷۹۶۶۱۸، دورنگار: ۰۵۱-۸۷۸۷۴۳، پست الکترونیکی: masoud.tgh@gmail.com

### حکیده:

تولید مداوم و غیرمداوم اسید سیتریک از ساکاروز با استفاده از اسپرژیلوس نایجر NCIM 588 مورد بررسی قرار گرفته است. میسلیوم اسپرژیلوس نایجر رسد یافته بر روی میکروفیبریل سلولز، تحت شرایط کنترل شده از کشت غنی از اکسیژن، تشکیل یک میسلیوم غیر یکنواخت و نازک می‌دهد. در حالت غیرمداوم با استفاده از یک راکتور سیرکوله، اکسیژن حل شده سیستم در ۲۰ mg/lit با استفاده از هوای غنی از اکسیژن، نگره داشته شد.

این بهر موری حجمی بهبود یافته به میزان ۱/۸۵ gr/lit.h اسید سیتریک، حداقل یک افزایش ۱۵ برابری نسبت به نتایج حاصل از روش همزمان با استفاده از Shake-flasks و ۱/۲ برابر نسبت به یک راکتور غیرمداوم هوادهی شده نشان می‌دهد. جایگزینی ساکاروز با عصاره نیشکر به عنوان یک منبع کربن در یک سیستم سیکل مجدد feed batch امکان‌پذیر بود. سرعت تولید ویژه کلی اسید سیتریک به ترتیب با استفاده از عصاره نیشکر و ساکاروز ۰/۱۴۷ gr/gr.h و ۰/۲۰۷ gr/gr.h به دست آمد. در تخمیر پیوسته یک محیط کشت شامل ۵۰ gr/gr.h ساکاروز، از طریق تثبیت کننده در یک زمان توقف ۴۰ ساعت، شروع به چکین کرد.

### Abstract

Continuous and batch production of citric acid from sucrose has been investigated using *Aspergillus niger* NCIM 588. Mycelia of *A.niger* grown on cellulose microfibril forms a uniform and thin mycelial proliferation under controlled conditions of cultivation rich in oxygen. In the fed batch mode using a recycle reactor, the DO of the system was maintained at 20 mg/l oxygen enriched air. This improved volumetric productivity to 1.85g/l.h of citric acid, representing an increase of at least 15-fold over results obtained simultaneously using shake-flasks and 1.6-fold over a conventional aerated batch reactor. It was possible to substitute sucrose with sugarcane juice as a carbon source in a fed batch recycle system. An overall specific production rate of citric acid of 0.147 and 0.208 g/g.h was achieved using cane juice and sucrose, respectively. In continuous fermentation, a medium containing 50 g/l of sucrose was allowed to drip through the fabric support at a residence time of 20 h. As a result of interface interaction, a citric acid volumetric productivity of 2.08 g/l.h was achieved for 26 days without any significant loss of productivity.

### مقدمه:

تثبیت کننده‌های جامد، یعنی شیشه ناقل، کف پلی اورتان، احاطه کردن به وسیله آلژینات کلسیم، احاطه در ژلهای پل اکریل آمید، فیبرهای خالی پلی پروپیلن، احاطه در آگار، آگاروز و ناقله‌های سلولز را گزارش کرده‌اند.

تولید اسید سیتریک یک فرایند تخمیر هوازی است. در حالت غوطه‌موری، سطح اکسیژن حل شده در ۵۰٪ اشباع با استفاده از هوا به عنوان منبع اکسیژن حفظ می‌گردد. فرماتورهای بر جی به خاطر سهولت صنعتی کردن و امکان حصول مقادیر بالاتری از اکسیژن حل شده (در چند سال اخیر، مطالعات قابل توجهی در زمینه تولید اسید سیتریک و تلاشهایی جهت به دست آوردن بهر موری حجمی بالاتر تحت شرایط سطحی و غوطه‌موری صورت گرفته است).

تکمیل این فرایندها موانع بیولوژیکی و فرایندی زیادی دارد. قارچهای رشته‌ای در مقایسه با تخمیرهای تک سلولی، محیط پیچیده در بیوراکتور و غیر یکنواختی تحت شرایط هم زده قابل مشاهده است. مورفولوژی قارچی، خصوصیات فیزیکی محیط را تغییر می‌دهد که باعث مشکلات متعددی در فرماتورهای صنعتی در زمینه بخش گاز، انتقال جرم و حرارت و هموزنی‌سازی می‌شود. علاوه بر آن، در بیوراکتورهای مداوم و قراردادی، انتقال اکسیژن و اختلاط به خاطر ویسکوزیته ظاهری بالای محیط کشت، نسبتاً به صورت نامساعد صورت می‌گیرد.

در مقایسه با فرایندهای سطحی، سیرکوله کردن بیومس به عنوان نتیجه‌ای از جایگزینی محیط کشت عموماً در تخمیر غوطه‌ور شده، معمولاً پیچیده‌تر است. امکان استفاده مکرر از بیومس اسپرژیلوس نایجر با استفاده از یک تکنیک تغییر فیلتراسیون ثابت شد. اندرسون و همکاران یک فرماتور دیسکی جهت تولید پیوسته و انبوه اسیدسیتریک، استفاده کردند. تلاشهایی جدیدی برای تولید پیوسته اسید سیتریک با استفاده از استوانه‌های تماسی مغناطیسی، بیوراکتورهای جتی رفت و برگشتی (متناوب)، راکتورهای فیبر خالی و محیط کشتهای پیوسته، گزارش شده است. به علاوه چند مطالعه در مورد استفاده از اسپرژیلوس نایجر تثبیت شده بر روی انواع مختلف (DO) در بخشها و قطعات پایینتر و در نتیجه فشار هیدرواستاتیک افزایش یافته ترجیح داده می‌شوند.

در برخی گزارشات، فراهم بودن اکسیژن، با استفاده از اکسیژن خالص یا با استفاده از فشار بالا قابل حصول است. در سطح ۶۰ mg/lit از DO بازده بهتری از اسیدسیتریک به وسیله ساتو گزارش شده است. این مساله به تشکیل کاهش یافته بیومس و تبدیل کمتر سوپرنتر برای این منظور، نسبت داده می‌شوند.

هدف این کار، جستجو جهت امکان حصول بهر موری بالای حجمی اسیدسیتریک با استفاده از سیستمهای تخمیری عالی در حالت مداوم و غیرمداوم می‌باشد.

مطالعه شامل تثبیت کنترل شده سلول و تغییرات در کوفیگوراسیون راکتور جهت حصول حداقل تنش برشی می‌باشد. این مساله باعث یک افزایش قابل توجه در ناحیه میانی بین محیط کشت و میسلیوم می‌گردد. علاوه بر میسلیوم و هوا تخمیر سطحی برای فرایند مداوم و یک راکتور با جریان پیوسته بازگشتی برای شرایط فرآوری غیرمداوم جهت بهبود سرعت تولید تولید اسید سیتریک استفاده می‌شوند.

### نتایج و بحث:

مطالعه حاضر سه موضوع اولیه را مد نظر داشته است. کاهش زمان تخمیر برای بیوکنورسیون، استفاده مجدد از همان بیومس قبلی و انجام عمل تحت شرایط دشوار استریل کمتر. تعدادی از آزمایشات در روشهای مختلف کار با راکتور برای تحقیق بهترین شرایط عمل برای مشاهده این موضوعات انجام شده‌اند.

در روشهای feed batch و مداوم تخمیر، میزان بهر موری سلولهای تثبیت شده هنگامی که با گزارشات قبلی مقایسه می‌شوند بیشتر بود. حداکثر تولید حجمی به ترتیب برای روش مداوم سطحی و راکتور مداوم با جریان برگشتی ۲/۰۸ و ۱/۸۵ گرم بر لیتر ساعت به دست آمده است. تفاوت در بهر موری (روشهای سطحی و غوطه‌موری) می‌تواند به اختلاف مورفولوژی و اثرات آن بر ویسکوزیته ظاهری که انتقال توده و خصوصیات مخلوط را تغییر می‌دهد، نسبت داده شود. صنعتی بخصوص در هوادهی، انتقال جرم و گرما و هموزنی‌سازی می‌شود. پاپاکیانی و همکاران نشان دادند که طول فیلامنتها تنها پارامتری است که می‌تواند به تولید اسید سیتریک مربوط باشد.

همچنین مشاهده گردید که برای میزان مشابه اسید سیتریک مورفولوژی ارگانیزم در تانک هم‌ندار و راکتور لوپ متفاوت است. ماده تثبیت کننده استفاده شده در اینجا جهت تثبیت اسپرژیلوس نایجر و روش تخمیر نفسهای مهمی در افزایش بهر موری اسید سیتریک بازی می‌کنند.

این به جهت تفاوت مورفولوژی موجود تحت شرایط روش غوطه‌موری و سطحی تخمیر است. در تخمیر غوطه‌موری شکل میسلیادیک تار ضخیم از میکروفیبریلها است در حالی که در روش سطحی یک ساختار میسلیایی برجسته در یک زمینه تار عنکبوتی شکل از فیلامنتهای آزاد بین میکروفیبریلها ترکیبی دیده می‌شود.

این بیومس روی تثبیت کننده به شکل یک لایه میسلا نازک و در مابین فضاهای میکرو فیبریلها پخش شده است. با در نظر گرفتن مورفولوژی، میسلا کشت داده شده سطحی در معرض تنش برشی کمتری در مقایسه با میسلا غوطه‌ور قرار دارد. به علاوه تأثیرات چندگانه در طول تخمیر سطحی ممکن است به خاطر جایگزینی فضاهای آزاد با هوا که نشاندهنده بهره‌وری بیشتر است، بهتر باشد. به اضافه اینکه رشد کنترل شده میسلا بر میکرو فیبریلها تحت اتمسفر غنی از اکسیژن می تواند مفید باشد. استفاده از میسلا رشد کرده با هوا با افزایش بسیار بهره‌وری در تخمیر غوطه‌وری گزارش شده است.

مطالعات جندی با استفاده از کینکها، افزایش شکل‌گیری اسیدهای آلی را تحت شرایط هوادهی فوی گزارش می‌کنند. هوادهی دو کار را انجام می‌دهد: اکسیژن دهی و جابجایی گرما، احتیاج به اکسیژن نسبت به مراحل رشد متغیر است. در تخمیر غوطه‌وری، هم‌زدن بر اندازه پلتها و ساختار سطح پلتها تأثیر می‌گذارد. هم‌زمان فویتر در راکتور تانک هم‌زدن باعث افزایش اکسیژن نامحلول و شاخه‌دار شدن بیشتر هیفها می‌شود. پلت‌های شکل گرفته می‌توانند متر اکمتر و فوی‌تر بوده و قدرت انعطاف و کشش بالاتری را نشان می‌دهد به علاوه اندازه پلتها و محتوای مربوط به فیلامنتهای میسلا نسبت به زمان تخمیر و شدت هم‌زدن متفاوت است. فشارهای مکانیکی ایجاد شده به وسیله جریان متلاطم میسلاهای خارجی سطح پلت را جدا کرده و تا اندازه‌ای پلتها را لیز کرده و با ناقص نشان می‌دهند. مخلوط کردن اندک در بیوراکتورهای متداول سبب انتقال اکسیژن ناقص می‌شود. به هر حال برای مثال، بسنر آلجینات کلسیم تثبیت کننده سلولها، محدودیتی در انتقال جرم نشان می‌دهند. در هر مورد استفاده از اکسیژن خالص با هوای غنی از اکسیژن می‌تواند برای کاهش محدودیت انتقال و لیز شدن سلولها بسیار مؤثر باشد. مساله مربوط به ویسکوزیته ممکن است با اطمینان از اینکه رشد میسلا عمدتاً به شکل پلت بیش از حالت فیلامنتی است، برطرف گردد.

یک سوپرانسیون از میسلاهای پلتی معمولاً از سوپرانسیون میسلا به شکل فیلامنتی ویسکوزیته کمتری دارد. ارتباط بین اندازه پلت اسپرژیلوس نایجر و انتقال اکسیژن در یک گزارش با در نظر گرفتن مشخصه‌های مورفولوژیکی پلت توضیح داده شده است. قطر بهینه پلت ۲/۲ میلی‌متر تشخیص داده شد که در بیوراکتور سونوئی جبابی با توجه به بهبود قابل توجه تولید اسید سیتریک، کاملاً مشخص بود.

نتایج نشان داد که افزایش تأثیرات چندگانه باعث یک سرعت تولید ویژه بالا برای اسید گلوکونیک می‌شود که با مقدار به دست آمده آن با استفاده از سطوح اکسیژن نامحلول بالا در فشار بالا قابل مقایسه در مورد اسیدهای دی و تری کربوکسیلیک مقدار اکسیژن بالا باعث یک راه تنفسی متناوب مورد نیاز برای اکسیداسیون مجدد کوآنزیم کلینکولینیک تولید شده (NADH) می‌شود. به نظر می‌رسد که ترکیب نامشخص در این راه به صراحت به تقویت مقدار اکسیژن بالا وابسته است که حتی در وقفه کوتاه هوادهی به بهره‌وری صدمه می‌زند.

#### نتیجه گیری:

میسلاهای اسپرژیلوس نایجر NCIM 588 به وسیله جذب بر روی میکرو فیبریل‌های سلولز با یک ساختمان خلل و فرج‌دار تثبیت شده بود و در تولید بیج و مداوم اسید سیتریک استفاده شد. افزایش در بهره‌وری ویژه تخمیر اسید سیتریک هم در روش سطحی و هم روش غوطه‌وری می‌تواند از کاهش شرایط استرس بر میسلا و تنش برش کمتر در طول شرایط عمل همانطور که در اینجا شرح داده شد برخلاف سطوح بالای آن در بیوراکتورهای متداول همراه هم‌زدن یا همراه هوادهی نتیجه شود. داده‌های حاضر در این بررسی امکان بهبود بهره‌وری کامل تخمیر اسید سیتریک را با استفاده از سیستم جدید پیشنهاد می‌کند. نتایج به دست آمده با داده‌های در دسترس در گزارشهای استفاده کننده از سیستمهای مرتبط مقایسه شده‌اند. پلت‌های کیکی و سولهای تثبیت شده یک تغییر پذیری عمده در مورفولوژی نشان می‌دهند که اهمیت قابل ملاحظه‌ای در انتقال جرم یا گرما دارد. جدای از این تأثیر چند گانه و دفع متابولت مزایای عمده در تکنیک تثبیت هستند. تأثیر چندگانه بهبود یافته بالا بین میسلا و اکسیژن به خوبی انتشار سوپستر را بهبود می‌بخشد. همچنین انتقال مداوم متابولیک شکل گرفته باعث بهبود بهره‌وری می‌شود.

#### منابع

- 1- Rehm H.J. Industrielle Mikrobiologie, Vol. 2. Berlin: Springer Verlag, 1980: 47-119.
- 2- Matthey M. The production of organic acids. Crit Rev Biotechnil 1992; 12: 87-132.
- 3- Sand pal. N.V. Joshi A.P. citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils: in fluence of morphology and fermenter conditions on productivity.

Surf and download all data from SID.ir: [www.SID.ir](http://www.SID.ir)

Translate via STRS.ir: [www.STRS.ir](http://www.STRS.ir)

Follow our scientific posts via our Blog: [www.sid.ir/blog](http://www.sid.ir/blog)

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: [www.sid.ir/workshop](http://www.sid.ir/workshop)