إنتاج حامض الستريك من مخلفات العنب باستخدام تخمرات الحالة الصلبة بوساطة الفطر *Aspergillus niger*

احمد محمد علي[١]، كركز محمد ثلج[٢] و امين سليمان بدوي[٢]

[١] *كلية التمريض، جامعة الموصل، الموصل، جمهورية العراق.*

[٢] *قسم علوم الأغذية والتقانات الاحيائية، كلية الزراعة، جامعة تكريت، تكريت، جمهورية العراق.*

الملخص:

استخدمت في هذه الدراسة طريقة تخمرات الحالة الصلبة في انتاج حامض الستريك من مخلفات العنب وبوساطة الفطر *Aspergillus niger* . تبين من النتائج ان انتاج الحامض قد تاثر بوزن المادة الخاضعة المستخدمة ونسبة الترطيب وتركيز الميثانول المستخدم والـ pH الابتدائي لوسط التخمر، أذ تم الحصول على أعلى إنتاج من حامض الستريك عندما استخدام ٤٠غم من المادة الخاضعة ونسبة ترطيب ٧٠% من بيئة Johnson و Shu الخالية من السكروز وتركيز ١% من الميثانول والـ pH الابتدائي عند مستوى٦,٥ . حيث بلغ الانتاج من حامض الستريك ٦٥ غم/كغم من مخلفات العنب اما كمية السكر المستهلكه فكانت٧١غم/كغم من المخلفات وبكفاءة انتاج بلغت ٩٠%.

الكلمات الدالة: حامض الستريك، العفن الاسود، التخمر.

المقدمة:

حامض الستريك من الحوامض ثلاثية الكاربوكسيل وقد تم عزله اولاً من الحمضيات ، فهو مكوّن طبيعي للفواكه الحمضية. اذ كانت اول عملية بلورة له من قبل العالم Scheel سنة ١٧٨٤ . يستخدم الحامض في مجالات واسعة اهمها الصناعات الغذائية بنسبة ٧٠% والصناعات الدوائية بنسبة ١٢% بينما ١٨% منه تستخدم في صناعة المنظفات وغيرها (١ و ٢). ينتج حامض الستريك بصورة تجارية مايكروبايولوجيا باستخدام الفطر *Aspergillus niger* وباستعمال الطريقة المغمورة في تخمير المولاس (3) ، الا ان تخمرات الحالة الصلبة تعد الافضل في انتاج حامض الستريك من الناحية الاقتصادية لانها تشغل حيزاً أقل اذ انها تحتوي كميات منخفضة من الماء فضلاً عن انخفاض كلفة الانتاج (4). مخلفات العنب هي المواد المتبقية بعد استخلاص عصير العنب والتي تنتج بكميات كبيرة لتترك بصورة مخلفات لافائدة منها، ان هذه المخلفات تكون غنية بالكاربوهيدرات الا انها منخفضة في محتواها من النيتروجين والفسفور (5). وان الطبيعة الفيزياوية لها لاتسمح باستخدام طريقة تخمرات الحالة السائلة لكونها مادة صلبة وان عملية استرجاعها بالماء يجعلها تفقد محتواها من العناصر الرئيسية اللازمة لعملية التخمر ولذلك لابد من استخدام طريقة تخمرات الحالة الصلبة (6). تهدف الدراسة الحالية الى تطوير طريقة تخمرات الحالة الصلبة لانتاج حامض الستريك باستخدام الفطر *Aspergillus niger* من مخلفات العنب وذلك بتحديد الظروف المزرعية المثلى للحصول على الأنتاج الافضل من الحامض.

المواد وطرائق البحث:

اولاً- الفطر المستخدم : استخدمت سلالة من الفطر *A. niger* عزلت محليا من التربة وحفظت على اكار مائل من وسط PDA (٧).

ثانياً- المادة الخاضعة : تم الحصول على تلف العنب من محلات انتاج عصير العنب، حيث تم تجفيفه في فرن حراري على ٤٠ م لمدة ٤٨ ساعة. بعدها تم طحن المجفف الناتج ، ثم تمت تنقيته باستخدام منخل حجم ٠,٣٥ سم وتم قياس نسبة السكر في الناتج باستخدام الطريقة الموصوفة في (٨) فكانت ١٧% بعدها تم الحفظ في درجة حرارة الغرفة لحين الاستخدام.

ثالثاً- معلق السبورات : تم تنمية الفطر *A.niger* على وسط اكارالبطاطا والدكتسروز المائل في انابيب لمدة اسبوع على درجة حرارة ٢٨ مْ ، ثم تم تحضير معلق السبورات باضافة ٥ مل من الماء المعقم على الفطر النامي واضيف اليه تركيز٠,٨% من مادة Tween-80.

رابعاً- تقنية التخمر : اخذ ٥٠ غم من مخلفات العنب ووضعت في دورق مخروطي حجم ٥٠٠مل، ورطبت ببيئة Shu و Johnson (٩) من (Oxoid)الخالية من السكروز بنسبة ٦٠% ثم عقمت بالأوتوكليف على درجة حرارة ١٢١مْ لمدة ١٥ دقيقة وتم تلقيحها بسبورات الفطر *A. niger* باعداد (٢×١٠ ٦ سبور/مل) ثم حضنت لمدة اربعة ايام وبعد اكتمال عملية التخمر استخلصت المادة المتخمرة لتقدير حامض الستريك والسكر المتبقي.

خامساً- طرق التحليل :

١- تقدير السكريات : تم تقدير السكر باستخدام جهاز Polarimeter نوع Saccharomat الالماني الصنع، في كل من المخلفات ووسط الانتاج بعد انتهاء عملية التخمير.

٢- تقدير حامض الستريك : تم تقدير حامض الستريك حسب الطريقة الموصوفة من قبل (١٠)

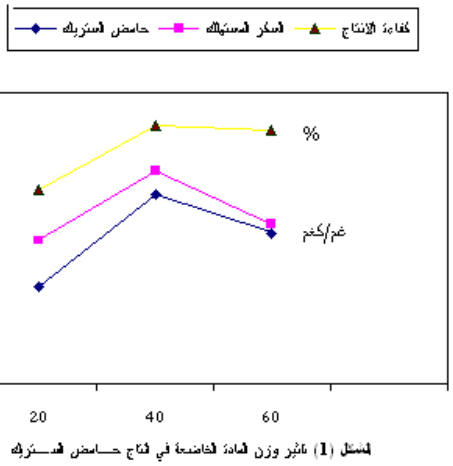
٣- تقدير الحموضة الكلية : قدرت الحموضة الكلية بطريقة التسحيح وكما متبع في(١١).

النتائج والمناقشة:

يعتمد انتاج حامض الستريك على السلالة المستخدمة في الانتاج ونوع التخمر والظروف المثلى لعملية التخمر وفي هذا البحث تمت دراسة طريقة المزارع الصلبة وبعض الظروف المزرعية اللازمة لانتاج حامض الستريك مثل وزن المادة الخاضعة المستخدمة ونسبة الترطيب وإضافة الميثانول والـ pH الابتدائي لوسط التخمر.

أولاً- وزن المادة الخاضعة:

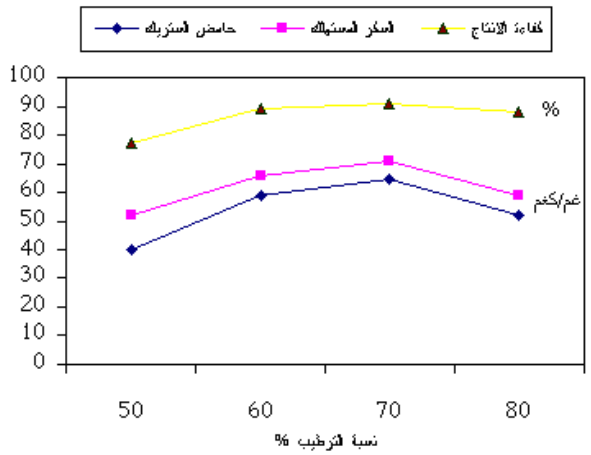
الشكل (١) يبين تأثير وزن المادة الخاضعة في عملية الانتاج حيث ظهر ان الوزن ٤٠ غم قد اعطى افضل انتاج من حامض الستريك اذ تم الحصول على ٦٥ و ٧٣ غم/كغم لكل من حامض الستريك والسكر المستهلك على التوالي من المخلفات وبكفاءة انتاج ٨٩%. من خلال الملاحظة وجد ان المادة الخاضعة خفيفة الوزن وان زيادة كميتها عن ٤٠ غم ادى الى امتلاء دورق التخمير الذي كان له تأثير سلبي في عملية انتشار هايفات الفطر بصورة كاملة على المادة الخاضعة وقد يعود هذا الى عدم انتشار الهواء بصورة كاملة خلال المادة الخاضعة، في حين كان الوزن المتوسط ٤٠ غم ملائم جداً لعملية انتشار هايفات الفطر على جميع اجزاء المادة الخاضعة.ان هذه النتائج اتفقت مع ما ذكره كل من(١٢و١٣).



الشكل (1) تاثير وزن المادة الخاضعة في انتاج حامض الستريك

ثانيا– الترطيب:

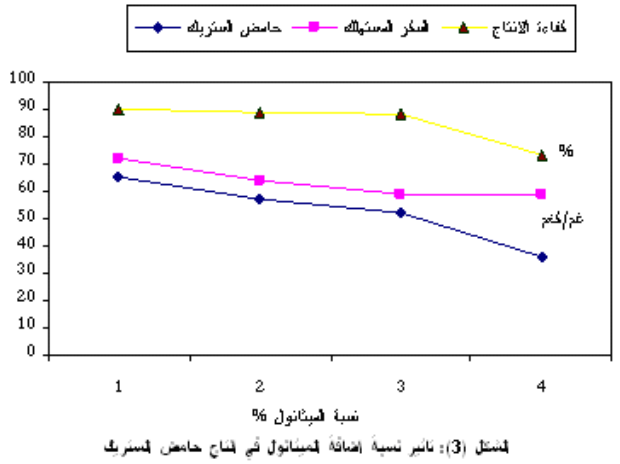
تبين من الشكل (٢) تأثير نسبة الترطيب لبيئة Shu و Johnson الخالية من السكروز حيث اعطت نسبة الترطيب ٧٠% أفضل إنتاج حيث كانت ٦٥ و ٧١ غم/كغم لكل من حامض الستريك والسكر المستهلك على التوالي من المخلفات وبكفاءة انتاج ٩١%.لوحظ ان مخلفات العنب لاتشابه مخلفات التمر فعند اعادة ترطيبهما باكثر من ٦٠% تصبح الثانية مادة دبقة متماسكة ينمو الفطر على سطحها فقط، في حين تبقى مخلفات العنب مفككة الى نسبة الترطيب ٧٠% وينمو الفطر على جميع اجزاء المادة الخاضعة، وهذا ما اكده (١٤).



الشكل (2): تاثير نسبة الترطيب في انتاج حامض الستريك

ثالثاً– الميثانول

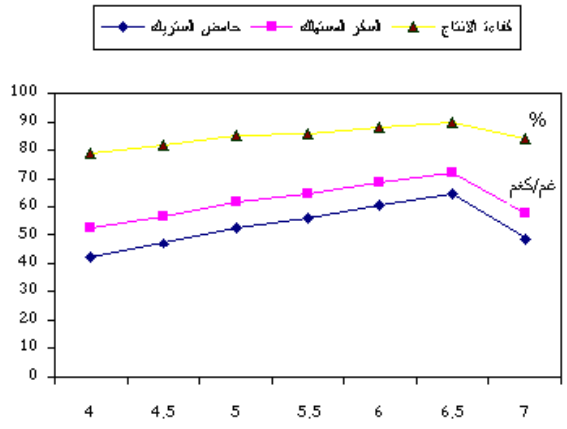
ان تأثير اضافة الميثانول في انتاج حامض الستريك قد تم توضيحها من خلال الشكل ٣. اذ ان التركيز ١% اعطى افضل انتاج حيث وصل الى ٦٥ و ٧٢ غم/كغم لكل من حامض الستريك والسكر المستهلك على التوالي من المخلفات وبكفاءة انتاج ٩٠% ، بينما التراكيز العالية من الميثانول كان لها تأثير مثبط لنمو الفطر ويحتاج الى فترة تخمير اطول لاكتمال نمو الفطر وعملية الانتاج، وهذا ما اكده (١٥) . وتأثير الميثانول في زيادة الانتاج من حامض الستريك يمكن ان يكون في قدرة الميثانول على زيادة النفاذية من خلال جدران الفطر وهذا يؤدي الى نضوح الحامض المنتج الى خارج الخلايا من دون أن يؤثر على الأيض وان هذه النتائج قد اتفقت مع ماذكره كل من (٦ و ١٦ و ١٧).



الشكل (3): تاثير نسبة اضافة الميثانول في انتاج حامض الستريك

رابعاً– تأثير الـ pH

وضح الشكل (٤) تأثير الـ pH الابتدائي لوسط التخمر في انتاج حامض الستريك، حيث أن pH ٦,٥ قد اعطى اعلى انتاج الذي وصل الى ٦٥ و ٧٢ غم/كغم لكل من حامض الستريك والسكر المستهلك على التوالي من المخلفات وبكفاءة انتاج ٩٠% . ان ماذكر أكده (١٧) اللذان ذكرا بان انتاج حامض الستريك يزداد بزيادة الـ pH الابتدائي لوسط التخمر، وان هذا يمكن ان يعود الى سرعة انبات السبورات ونمو الهايفات في المرحلة الاولى من التخمر (مرحلة النمو الخضري) الذي سبب في خفض الـ pH الى اقل من ٢,٠ الذي يعتبر ضروريا في خفض انتاج حامض الاوكزاليك وكذلك خفض احتمال التلوث بالميكروبات الاخرى خصوصاً البكتريا (١٥).



الشكل(4): تأثير الPH في انتاج حامض الستريك

المصادر:

1. Marison, I.W., (1988). Biotechnology for engineers biological system in processes. P. 323.
2. Haq, I., S. Ali and M.A. Qadeer 2001. Fed-batch culture studies during citric acid fermentation by Aspergillus niger GCM-7. Biologia, 45: 32-37.
3. Yigitoglu, M., (1992) . Production of citric acid by fungi. J. of Islamic Academy of sciences, 5 (2) : 100-106.
4. Hesseltine, C.W. (1972). Solid state fermentation Biotechnology and Bioengineering, 14:517.
5. Rice, A.C. (1979). Solid waste generation and by-product recovery potential from winery residues. Am. J. Enol. Vitic. 27: 21-27.
6. Hang, Y.D. and E.E. Woodams. (1986) . Utilization of grape Pomace for citric acid production by solid state fermentation. Am. J. Enol. Vitic., 37 (2) : 141-142.

٧. الزبير ، مفاخر عبد السلام، (١٩٨٨) . انتاج حامض الستريك من الفطر *A. niger* ومطفراته على بيئتي السكروز والدبس. رسالة ماجستير ، كلية الزراعة، جامعة الموصل.

8. Tasun, K., P. Chose and K. Glien 1970. Suger determination of DNS methods. Biotech. Bioengene., 12: 921-927.
9. Shu, P. and M.J. Johnson, (1948). Effect of the composition of the sporulation medium on citric acid production by *A. niger*. J. Bacteriology, 54: 162-167.

١٠. Marrier, J.R. and M. Boulet, (1958). Direct determination of citric acid in milk and improved pyridine-acetic anhydride method. J. Dairy Science, 41: 1683-1692.

11. Person, D., (1973) . Laboratory techniques in food analysis. P: 258-260. Duttere woth and Co. (Publishers).
12. Xu, W.Q. and Y.D. Hang, (1988) . Roller culture technique for citric acid production by *A. niger*. Process Biochemistry, August : 117-118.
13. Silman, R.W., (1980). Enzyme formation during solid substrate fermentation in rotating vessels. Biotech. Bioengin. 22 : 411-240.
14. Hang, Y.D. and E.E. Woodams, (1987). Microbial production of citric acid by solid state fermentation of kiwifruit peel. J. food Sci. 52 (1) : 226-227.

١٥. Tsay, S.S. and K.Y. To, (1987). Citric acid production using immobilized conidia of *A. niger* TMP 2022.

١٦. Roukas, T. and P. Kotzekidou, (1987). Influence of some trace metals and stimulants on citric acid production from brewery wastes by *A. niger*. Enzyme Microbiology and Technology 9. May: 291-294.

١٧. Alben, E. and O. Erkmen, (2004). Production of citric acid from a new substrate, under sized semolina, by *A. niger*. Food Technol. Biotechnol. 42 (1) : 19-22.

Citric acid production from grape pomace using solid state fermentation by *Aspergillus niger*

Ahmed M. Ali[1] , Karkaz M. Thalej[2] and Amin S. Badawy[2]

[1]*College of Nursing, University of Mosul, Mosul, Iraq*

[2]*Department of Food Science &Biotechnology, College of Agriculture, University of Tikrit, Tikrit,Iraq.*

Abstract:

Solid state fermentation was used to produce citric acid from grape pomace by *A. niger* . Various factors affected the production of citric acid. These included weight of substrate, dehydration ratio, methanol concentration and initial pH. The highest yield of citric acid becomes with the consumed sugar and production efficiency was 65, 71 g/kg pomace and 90% respectively, when used 40 g of substrate, 70% dehydration from Shu and Johnson medium, 1% of methanol and initial pH at level 6.5.

Key words: Citric acid, Aspergillus niger, fermentation.