# إنتاج حامض الستريك من عزلة محلية للفطر *Aspergillus niger* باستخدام الوسط القياسي

**ولاء حمدون شكر و شمال يونس عبد الهادي و صفاء إسماعيل رشيد**

*قسم علوم الحياة ، كلية التربية ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق*

**الملخص :**

تم في هذه الدراسة عزل (5) عزلات للفطر *Aspergillus. niger* وتشخيصها ، عزلت من مصادر مختلفة ( الهواء ، التربة ، أوراق البصل ، أوراق نبات الكلغان وأوراق البنجر السكري ) واستخدمت لإنتاج حامض الستريك بوساطة احد الأوساط التركيبية ، جرى مقارنة إنتاج حامض الستريك بين العزلات المختلفة، اتضح إن عزلة الفطر *Aspergillus. niger* 3 أكفأ عزلة فطرية في إنتاج حامض الستريك اذ أعطت أعلى كمية من الحامض والتي بلغت 24.45 ( غم/لتر) بعد 9 أيام من التحضين . تبين إن السكروز والكلوكوز كمصادر كاربونية كانت أفضل السكريات على إنتاج حامض الستريك . إنتاج الحامض ازداد بزيادة تركيز االسكروز وتم الحصول على 29.86 ( غم/لتر) عندما كان تركيز السكروز في الوسط (18%) . الرقم الهيدروجيني الأولي الأمثل لإنتاج الحامض 2.5 . عزز اضافة الايثانول انتاج الحامض وخاصة عند التركيز 1%.

**المقدمة :**

حامض الستريك من الحوامض العضوية المهمة وهو حامض ثلاثي الكاربوكسيل (2-hydroxy propane -1,2,3- tri carboxylic acid) . ان حامض الستريك ينتج بشكل طبيعي من خلال المسارات الايضية التي تجري في الخلية الحية بدورة كربس ( دورة الاحماض العضوية الثلاثية الكاربوكسيل (Tri carboxylic acid cycle) [3,2,1] .له تطبيقات عديدة في الأغذية والصناعات الكيميائية والصيدلانية كمواد منكهة ومواد حافظة ومثبتة [5,4].

كان المصدر الطبيعي لحامض الستريك هو ثمار الفاكهة مثل انواع الحمضيات المختلفة والكمثرى والأناناس وغيرها حتى نهاية القرن التاسع عشر ثم اتجه الإنسان للبحث عن مصادر بديلة بعد ذلك وخاصة بعد زيادة الطلب عليه [7,6]. تم تطوير طريقة ناجحة لإنتاجه بوساطة الأحياء المجهرية عن طريق استخدام التخمرات الساكنة في البداية وبعد ذلك استخدمت طريقة التخمرات المغمورة.

بدأت عملية إنتاج الحامض بوساطة الأحياء المجهرية تتصدر طرق الإنتاج الأخرى وفاقت الطرق الكيمياوية وكانت أول عملية إنتاج حيوي له حوالي عام 1923 [8].ومنذ ذلك الحين والى يومنا هذا ينتج حامض الستريك تجاريا وبكميات كبيرة جدا وهذا الإنتاج يتزايد يوم بعد يوم [10, 9].

هناك العديد من الكائنات الحية المنتجة لحامض الستريك منها الفطريات ، الخمائر والبكتريا [12,11 ,13 ]. وهناك نوعان من الجنس *Aspergillus* يستخدمان بصورة عامة في انتاج حامض الستريك هما : *A. niger* و *A. wentii* [15,14 ].

وهناك سلالات عديدة من الفطر *A. niger* تستعملها المصانع التجارية لإنتاج حامض الستريك حيث يحتفظ كل مصنع بسر نوع السلالة المستخدمة وكذلك بالتحسينات التي يجريها خلال مراحل الإنتاج [17,16]. والميزات الرئيسية لاستخدام هذا الكائن هو سهولة الحصول عليه وقابليته على تخمير كمية كبيرة من المواد الخام الرخيصة كما انه يعطي انتاجا عاليا. وتختلف السلالات فيما بينها في كفاءتها الإنتاجية ويعتمد تحسين إنتاج حامض الستريك في وسط النمو واستخدام سلالات أكثر كفاءة لإنتاج هذا الحامض [18]. إن هدف هذا البحث الاستمرار في الحصول على عزلات جديدة من البيئة المحلية تمتلك قابلية عالية لإنتاج حامض الستريك فضلا عن إمكانية تحسين الوسط الغذائي بالتعرف على الظروف الفسيولوجية المثالية للحصول على أقصى إنتاجية من حامض الستريك.

**مواد وطرائق البحث :**

**الفطريات المستخدمة :**

تم استخدام عزلات مختلفة من الفطر *A. niger* والتي عزلت من مصادر متعددة (هواء ، تربة ، أوراق البصل ، نباتات الكلغان والبنجر السكري ). تم حفظ العزلات على وسط البطاطا والسكروز والاكار (PSA) بشكل مائل داخل أنابيب اختبار في الثلاجة بدرجة 4 سيليزية .تم تنشيط العزلات الفطرية وذلك بتجديد زراعتها كل اسبوعين.

**الأوساط الزرعية :**

أ- مستخلص البطاطا والسكروز والاكار (PSA) :

استخدم هذا الوسط لعزل وتشخيص وحفظ وتنشيط الفطريات . حضر هذا الوسط من 200غم بطاطا ،20غم سكروز، 20غم اكار. ثم اكمل الحجم إلى اللتر بالماء المقطر.

ب- القياسي :

استخدم هذا الوسط لتحضير لقاح الفطر وأيضا كوسط لإنتاج حامض الستريك. يتكون هذا الوسط من كل مما يأتي (غم/لتر):

140 سكروز، 2.50 $(NH_4)_2CO_3$، 2.50 $KH_2PO_4$ ، - $MgSO_4$ ، 2.50 $7H_2O$

بالإضافة إلى المواد التالية :

0.06 ملغم/لتر $CuSO_4.5H_2O$، 0.25 ملغم/لتر $Zncl_2$، 1.3ملغم/لتر $Fecl_3.6H_2O$، ضبط الرقم الهيدروجيني عند 3.8 [1].

**تحضير اللقاح الفطري :**

تم تحضير اللقاح الفطري بإضافة 5 مل من الماء المقطر المعقم إلى كل مزرعة فطرية ( Slant ) للفطر وبعمر اسبوع واحد . رجت الأنابيب جيدا بوساطة اليد لفصل السبورات وتم جمع المعلق السبوري $10x3^7$ سبور/مل (تم عد السبورات بوساطة شريحة العد Haemocytometer) في دورق مخروطي معقم.

**الظروف الزرعية :**

بعد تحضير وسط إنتاج حامض الستريك وزع في دوارق مخروطية سعة 250مل بمقدار 50 مل /دورق بمعدل مكررين لكل معاملة . سدت الدوارق بسدادات قطنية وعقمت بجهاز المؤصدة Autoclave عند ضغط 1باوند /انج$^2$ ودرجة حرارة 121 مْ لمدة 20 دقيقة ، تركت الدوارق لتبرد ولقحت بلقاح الفطر بمقدار 2% (حجم/ حجم) وضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 28 $\pm$ 1 مْ بمعدل هز 200 دورة /دقيقة لفترات مختلفة من التحضين.

**طرائق التحليل :**

*تقدير الكتلة الحيوية* :

تم تقدير الكتلة الحيوية بعد انتهاء فترة التحضين المحددة وذلك بترشيح مزارع الفطر باستخدام الشاش . ترك الراشح جانبا لتقدير الحامض والسكر المتبقي بينما جمعت خلايا الفطر بإطباق صغيرة معلومة الوزن ثم وضعت الأطباق في الفرن عند درجة حرارة 28 $\pm$ 2 مْ ولمدة 24 ساعة. تم تقدير الكتلة الحيوية من خلال الفرق ما بين الكتلتين عن طريق استخدام ميزان حساس [19 ].

*تقدير حامض الستريك* :

قدر حامض الستريك حسب طريقة Marrier و Boulet [20].

*تقدير السكر المتبقي* :

قدر السكر المتبقي بحسب طريقة Dubois وأخرون [21].

**النتائج والمناقشة :**

**تشخيص عزلات الفطر *A. niger* :**

تم عزل الفطر *A. niger* من مصادر مختلفة هي : الهواء ، التربة ،أوراق البصل وأوراق البنجر السكري ونبات الكلغان والتي تظهر عليها أعراض تبقع على الأوراق جدول ( 1 ) . وبعد الحصول على مستعمرة نقية باستعمال طريقة السبور المنفرد تم تشخيصها بالاستعانة بطريقة Slide Cultures technique الموصوفة من قبل [22] وبالاعتماد على المفاتيح التصنيفية [ 23 و24 ] وأكد التشخيص بالاعتماد على صفات الفطر المورفولوجية الذي يتميز بسبوراته ذات اللون الأسود لذا يسمى عادة فطر العفن الأسود (Black mould) . وتم التأكد من شكل الفطر الذي يتكون من حوامل كونيدية قائمة غير متفرعة وغير مقسمة تنشأ هذه الحوامل من بعض الخلايا السميكة الجدران تعرف بالخلايا القاعدية (Foot cells)، تتسع نهاية كل حامل لتصبح بهيئة حوصلة (Vesicle) كروية أو اسطوانية الشكل يتكون على سطحها طبقة واحدة مؤلفة من خلايا صغيرة قارورية الشكل تعرف بالذنيبات ( Sterigmata) . وقد تعطي الذنيبات بدورها طبقة ثانية من الذنيبات . تحمل خلية الذنيب سلسلة غير متفرعة من الكونيدات تتكون هذه الكونيدات بطريقة الانفصال المتعاقب ، تكون فيها الكونيديوم الناضجة عند نهاية السلسلة بينما تكون الحديثة وغير بالغة عند قاعدة السلسلة . تتساقط الكونيدات فتكون طبقة سوداء تغطي سطح الغزل الفطري [25].

**الجدول (1) : الفطريات المعزولة من مصادرها المختلفة .**

| رقم العزلة | مصدر العزلة |
|---|---|
| 1 | الهواء |
| 2 | التربة |
| 3 | أوراق الكلغان |
| 4 | أوراق البنجر السكري |
| 5 | أوراق البصل |

**مقارنة إنتاجية حامض الستريك لعزلات الفطر *A. niger* المختلفة خلال فترات تحضين مختلفة :**

تم في هذه التجربة زراعة العزلات المحلية المختلفة للفطر *A. niger* المعزولة من المصادر المختلفة في الوسط القياسي المستخدم في غالبية بحوث إنتاج حامض الستريك وذلك لغرض المقارنة بين العزلات وتحديد أكفأها إنتاجا لحامض الستريك . أظهرت النتائج في الجدول (2) إن لفترة التحضين تأثيرا في نشاط الفطريات المعزولة من حيث النمو وإنتاج حامض الستريك وأظهرت نتائج المقارنة اختلاف الفترة الزمنية اللازمة لأقصى انتاج من حامض الستريك باختلاف عزلات الفطر *A. niger* إذ تم الحصول على أقصى كمية من حامض الستريك باستخدام عزلة نبات الكلغان إذ بلغت كمية الحامض 24.45 (غم/لتر) بعد 9 أيام من التحضين يليها من حيث الإنتاجية عزلة نبات البنجر إذ بلغت إنتاجيتها للحامض ( 19.75غم/لتر) ولنفس فترة التحضين أما عزلة أوراق البصل فقد أعطت أقصى إنتاجية لحامض الستريك بعد مرور 7 ايام من التحضين وبلغت (13.96)غم/لتر وبلغت إنتاجية عزلتي الهواء والتربة للحامض (7.63 و 11.54)غم/لتر بعد مرور 12 و 9 ايام على التوالي.

تشير هذه النتائج إن أفضل فترة تحضين لأعلى إنتاج من حامض الستريك تقع بين (7 و 12) يوما لعزلات الفطر المختلفة. أما ما يتعلق بالكتلة الحيوية فنلاحظ إن هناك زيادة في الكتلة الحيوية باستمرار فترات التحضين كما إن إنتاج الكتلة الحيوية كان متباينا بين العزلات المختلفة ، أعلى كمية من الكتلة الحيوية تم الحصول عليها في عزلة أوراق البصل وبلغت (21.83)غم/لتر أما عزلة نبات الكلغان فأعطت كتلة حيوية بلغت 17.41 (غم/ لتر) أما اقل كمية من الكتلة الحيوية تم الحصول عليها من عزلة التربة وبلغت 9.55 (غم/لتر) بعد 12 يوما من التحضين.

إن استهلاك السكر من قبل العزلات الفطرية المختلفة كان انعكاسا للنمو إذ تباينت كمية السكريات المتبقية باختلاف فترات التحضين ويلاحظ إن هناك ارتفاع في كمية السكريات المتبقية في بداية فترة التحضين ونهايتها وقلة كميتها عند حدوث أقصى نمو للفطر.

الرقم الهيدروجيني النهائي انخفض عن الرقم الهيدروجيني الأولي (3.8) وقد وصل الانخفاض إلى الرقم الهيدروجيني (1.30) في بعض الحالات . إن الانخفاض في الرقم الهيدروجيني ظاهرة اعتيادية عند استخدام السكريات البسيطة كالكلوكوز والفركتوز كمصادر كاربونية للأوساط القياسية كما أشار إلى ذلك [27,26].

من النتائج أعلاه نلاحظ إن هناك زيادة في إنتاج الكتلة الحيوية باستمرار فترات التحضين ويعزى ذلك إلى انه في البداية يستهلك النتروجين قبل وبشكل تدريجي مما يؤدي إلى زيادة في الكتلة الحيوية للفطر نتيجة تراكم

الكاربون في خلايا الفطر . أما إنتاج الحامض فان الاختلاف بين العزلات الفطرية يعزى إلى نوع السلالة الفطرية ونوع السكر وظروف التخمر وهذا ما أشار إليه كل من [28 , 29] الذين أكدوا إن إنتاجية حامض الستريك تختلف باختلاف عزلات الفطر *A. niger* . كما إن هناك عزلات منتجة وغير منتجة لحامض الستريك[30] .وبناءا على ما تقدم تم اختيار عزلة نبات الكلغان 3 *A. niger* للقيام بالتجارب اللاحقة لإنتاج حامض الستريك.

**الجدول(2) : إنتاج حامض الستريك من عزلات مختلفة للفطر *A. niger* خلال فترات تحضين مختلفة**

| العزلة | فترة التحضين | الكتلة الحيوية غم/لتر | السكر المتبقي غم/لتر | كمية حامض الستريك المنتج غم/لتر | pH النهائي |
|---|---|---|---|---|---|
| ( 1) | 3 | 10.26 (0.01) | 24.55 (0.00) | 2.86 (1.01) | 2.62 (0.01) |
| | 5 | 11.45 (0.13) | 24.01 (0.13) | 3.92 (0.05) | 2.22 (0.23) |
| | 7 | 16.52 (0.00) | 19.15 (0.15) | 5.73 (0.00) | 2.38 (0.00) |
| | 9 | 12.70 (0.12) | 18.26 (0.32) | 7.06 (0. 31) | 2.17 (0.13) |
| | 12 | 11.27 (0.27) | 11.42 (0.00) | 7.63 (0.51) | 2.30 (1.30) |
| | 15 | 11.17 (0.51) | 12.87 (0.32) | 6.26 (0.13) | 1.95 (0.22) |
| ( 2) | 3 | 10.35 (0.00) | 19.31 (0.51) | 5.11 (0.13) | 2.74 (0.05) |
| | 5 | 11.45 (0.13) | 17.63 (0.00) | 8.21 (0.23) | 2.28 (0.31) |
| | 7 | 17.60 (0.20) | 12.40 (0.31) | 9.40 (0.31) | 1.30 (0.50) |
| | 9 | 18.32 (0.31) | 11.20 (0.21) | 11.54 (0.00) | 1.72 (0.07) |
| | 12 | 9.55 (0.00) | 11.03 (0.35) | 10.35 (0.05) | 1.64 (0.02) |
| | 15 | 8.07 (0.31) | 10.42 (0.01) | 6.28 (0.07) | 1.45 (0.12) |
| ( 3) | 3 | 9.20 (0.00) | 20.21 (0.31) | 12.48 (0.53) | 2.85 (0.13) |
| | 5 | 13.55 (0.13) | 17.85 (0.50) | 15.35 (0.00) | 1.88 (0.00) |
| | 7 | 12.92 (0.10) | 9.34 (0.31) | 19.78 (0.10) | 1.75 (0.00) |
| | 9 | 17.41 (0.03) | 5.78 (0.00) | 24.45 (0.32) | 1.63 (0.31) |
| | 12 | 16.05 (0.04) | 9.34 (0.72) | 21.32 (0.51) | 1.54 (0.53) |
| | 15 | 13.73 (0.01) | 7.30 (0.31) | 20.93 (0.31) | 1.67 (0.50) |
| ( 4) | 3 | 13.10 (0.35) | 19.52 (0.12) | 5.62 (0.00) | 2.58 (0.01) |
| | 5 | 18.32 (0.49) | 15.22 (0.31) | 10.40 (0.31) | 2.05 (0.31) |
| | 7 | 16.85 (0.00) | 10.25 (0.92) | 15.07 (0.56) | 1.76 (0.51) |
| | 9 | 15.52 (0.51) | 13.04 (0.00) | 19.75 (0.06) | 1.42 (0.41) |
| | 12 | 13.96 (0.40) | 12.62 (0.03) | 18.81 (0.31) | 1.49 (0.51) |
| | 15 | 12.34 (0.05) | 9.15 (0.07) | 17.52 (0.08) | 1.31 (0.18) |
| ( 5) | 3 | 7.21 (0.03) | 12.24 (0.00) | 7.18 (0.31) | 2.58 (0.00) |
| | 5 | 12.32 (0.21) | 11.52 (0.73) | 10.05 (0.51) | 2.44 (0.12) |
| | 7 | 21.83 (0.59) | 17.25 (0.52) | 13.96 (0.92) | 2.37 (0.71) |
| | 9 | 14.49 (0.31) | 17.33 (0.06) | 11.72 (0.53) | 2.17 (0.81) |
| | 12 | 11.31 (0.29) | 19.60 (0.09) | 11.83 (0.39) | 2.07 (0.11) |
| | 15 | 11.02 (0.05) | 8.72 (0.17) | 5.90 (0.00) | 1.82 (0.05) |

كل قيمة هي معدل لمكررين والقيم بين الأقواس تمثل الانحراف المعياري

**تأثير إضافة مصادر كاربونية مختلفة :**

تم في هذه التجربة تنمية عزلة الفطر *A .niger* 3 في وسط الإنتاج باستخدام سكريات مختلفة بتركيز 14% بوصفها مصادر كاربونية الجدول (3) . تبين ان أفضل إنتاجية من حامض الستريك 24.63 ( غم/لتر) عند استخدام السكروز كمصدر كاربوني كما اعطى الكلوكوز إنتاجية مقاربة 24.30 ( غم/لتر) . ويلي الكلوكوز سكر الفركتوز من حيث تعزيزه لإنتاج الحامض إذ كانت كمية الحامض المنتج اقل من الكلوكوز وبلغت 20.42 ( غم/لتر) . وبالرغم من ان سكر الفركتوز دعم إنتاجية الحامض إلا انه لا يستخدم في الإنتاج التجاري لحامض الستريك. على العكس من ذلك لم يدعم كل من اللاكتوز والارابينوز كمصادر كاربونية أي إنتاج من حامض الستريك على الرغم من من دعمهما لنمو الفطر . من النتائج اعلاه يتضح تباين هذه السكريات في تعزيزها لإنتاج حامض الستريك من سلالات الفطر *A. niger* وقد يعود السبب الى صعوبة تمثيل هذه السكريات أو عدم القدرة على تخليق الأنزيمات اللازمة لتكسير بعض هذه السكريات (اللاكتوز) حيث تفتقر الفطريات القابلية على إنتاج انزيم بيتا– كالاكتوسديز (β- galactosidase) المحلل لسكر اللاكتوز الى كلوكوز و كالاكتوز . من ناحية أخرى يمتلك الفطر *A. niger* قابلية على إنتاج انزيم الانفرتيز لتكسير السكروز إلى الكلوكوز و الفركتوز كما إن الفطر

يستطيع اخذ المانوز والزايلوز والارابينوز لإنتاج حامض الستريك على الرغم من ان الانتاجية ضعيفة وهذا ما أكده [31].

إما الكتلة الحيوية للفطر فقد تباينت السكريات المستخدمة بوصفها مصادر كاربونية في تدعيمها للكتلة الحيوية للفطر إذ أعطى سكر الكلوكوز بوصفه مصدرا كاربونيا أعلى إنتاجية للكتلة الحيوية 33.07 ( غم /لتر) . ولم يتوافق إنتاج الكتلة الحيوية مع الإنتاج العالي لحامض الستريك حيث أعطى سكر المانوز كتلة حيوية 17.55 ( غم /لتر) على الرغم من كون إنتاجية حامض الستريك 10.73 (غم/لتر) . أما السكريات الأخرى (ارابينوز ومالتوز) والتي كان إنتاج الحامض قليل جدا فيها لم تعزز إنتاج الكتلة الحيوية للفطر .

أما السكر المتبقي فقد كان استهلاك المصدر الكاربوني من قبل عزلة الفطر باستخدام السكريات المختلفة موازيا لإنتاج الحامض والكتلة الحيوية إذ إن السكريات التي عززت إنتاج كبير للحامض ترافق معها استهلاك كبير للمصدر الكاربوني في حين الحالة تكون معكوسة عندما يكون إنتاج الحامض والكتلة الحيوية قليلا حيث يكون استهلاك السكر قليلا أيضا . أما الرقم الهيدروجيني النهائي فعموما كان هناك انخفاض واضح فيه عن الرقم الهيدروجيني الأولي ولجميع أنواع السكريات المستخدمة . هذه النتيجة مقاربة لنتائج الكثير من البحوث لسلالات اخرى من الفطر *A. niger* إذ أكد كل من [32,6] إن كل من السكروز والكلوكوز يدعمان إنتاج حامض الستريك في حين اللاكتوز لا يدعم إنتاج الحامض . وعلى ضوء هذه النتيجة تم استخدام السكروز كأفضل مصدر كاربوني في التجربة اللاحقة لكونه أعطى أعلى إنتاجية من حامض الستريك .

**الجدول ( 3 ) : تأثير مصادر الكاربون المختلفة على نمو عزلة الفطر *A . niger* 3 وإنتاج حامض الستريك بعد 9 أيام من التحضين.**

| أنواع المصادر الكاربونية 14% | الكتلة الحيوية غم/لتر | السكر المتبقي غم/لتر | كمية حامض الستريك المنتج غم/ لتر | الرقم الهيدروجيني النهائي |
|---|---|---|---|---|
| ارابينوز | 12.85 (0.00) | 15.68 (0.03) | 8.01 (0.00) | 1.53 (0.03) |
| لاكتوز | 20.17 (0.13) | 12.48 0.42) | 12.25 (0.72) | 1.75 (0.52) |
| فركتوز | 15.56 0.57) | 13.87 (0.13) | 20.42 (0.52) | 1.75 (0.72) |
| كلوكوز | 33.07 (0.01) | 8.95 (0.01) | 24.30 (0.03) | 1.93 (0.32) |
| مالتوز | 13.25 (0.00) | 25.11 (0.52) | 9.32 (0.71) | 1.37 (0.00) |
| مانوز | 17.55 (0.92) | 16.31 (0.35) | 10.73 (0.91) | 1.26 (0.31) |
| سكروز | 17.52 | 8.20 (0.00) | 24.63 (0.53) | 1.25 (0.79) |

كل قيمة هي معدل لمكررين والقيم بين الأقواس تمثل الانحراف المعياري

**تأثير إضافة تراكيز مختلفة من السكروز في إنتاج حامض الستريك :**

تم زراعة العزلة *A. niger* 3 في وسط الإنتاج المزود بتراكيز مختلفة من السكروز كمصدر كاربوني وكانت التراكيز المستخدمة كما يلي , 20 18,16,14,12,10,8 (% ) أظهرت النتائج في الجدول (4) انه بعد 9 أيام من التحضين ازداد إنتاج حامض الستريك مع زيادة تركيز السكروز في الوسط إذ تم الحصول على أفضل إنتاجية لحامض الستريك 29.86 ( غم/لتر) عند استخدام السكروز بتركيز 18% .وكما يبدو إن إنتاج حامض الستريك يتناسب طرديا مع زيادة تركيز السكروز في الوسط والى حد التركيز الأمثل 18% ثم بدأ إنتاج الحامض يقل بزيادة تركيز السكروز إلى أن وصل إلى 22.74 (غم /لتر) عند استخدام السكروز بتركيز 20% وهو اعلى تركيز مستخدم في التجربة. أما الكتلة الحيوية فنلاحظ إن هناك زيادة في معدل نمو عزلة الفطر بزيادة تركيز السكروز وكانت الزيادة تدريجية في الكتلة الحيوية حيث إن الفطر في هذه التراكيز العالية من السكروز كان يستخدم المصدر الكاربوني لدعم إنتاج حامض الستريك وكذلك دعم إنتاج الكتلة الحيوية وتم الحصول على أعلى كمية من الكتلة الحيوية وبلغت 36.67 ( غم/لتر) عند التركيز الامثل من السكروز والذي أعطى أعلى كمية من الحامض . أما استهلاك السكر فقد كان انعكاسا لنمو الفطر وإنتاج حامض الستريك . الرقم الهيدروجيني النهائي انخفض عن الرقم الهيدروجيني الأولي ولجميع التراكيز المستخدمة وكان الانخفاض بشكل تدريجي بزيادة تركيز السكروز . ان هذه النتيجة كانت مقاربة لما أشار اليه [33] اللذان أكدا إن تركيز المصدر الكاربوني له تأثير كبير في انتاج حامض الستريك وان أقصى إنتاج للحامض يتم باستخدام تراكيز تتراوح بين (14-22) %[3] .

**الجدول (4) : تأثير تراكيز مختلفة من السكروز على نمو عزلة الفطر *A . niger* 3 وإنتاج حامض الستريك بعد 9 أيام من التحضين.**

| تركيز السكروز (وزن / حجم)% | الكتلة الحيوية غم/لتر | السكر المتبقي غم/لتر | كمية حامض الستريك المنتج غم/ لتر | pH النهائي |
|---|---|---|---|---|
| 8 | 11.74 (0.74) | 20.28 (0.03) | 15.63 (0.01) | 1.83 (0.01) |
| 10 | 13.27 (0.03) | 16.34 (0.12) | 18.32 (0.21) | 1.60 (0.21) |
| 12 | 15.46 (0.51) | 13.18 (0.25) | 20.56 (0.41) | 1.54 (0.71) |
| 14 | 17.35 (0.31) | 8.09 (0.30) | 24.78 (0.30) | 1.48 (0.21) |
| 16 | 30.95 (0.43) | 6.43 (0.40) | 26.88 (0.21) | 1.45 (0.10) |
| 18 | 36.67 (0.73) | 5.28 (0.02) | 29.86 (0.12) | 1.27 (0.00) |
| 20 | 26.35 (0.03) | 3.63 (0.00) | 22.74 (0.00) | 1.43 (0.12) |

كل قيمة هي معدل لمكررين والقيم بين الأقواس تمثل الانحراف المعياري

**تأثير الرقم الهيدروجيني الأولي في انتاج حامض الستريك :**

الرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي له دورا كبيرا في نمو الأحياء المجهرية وفي بناء وإنتاج المواد الايضية الأولية والثانوية المختلفة وقد يكون عاملا محددا إلى درجة كبيرة جدا في عمليات التخمرات الصناعية لإنتاج حامض الستريك . وقد لوحظ ان هناك اختلافا في الرقم الهيدروجيني الأولي لكل جنس أو نوع وحتى سلالة من اجل نمو أحسن وايض فعال [34] . ومن متابعة الرقم الهيدروجيني بعد انتهاء فترة التخمر للتجارب السابقة حيث كان هناك انخفاض في الرقم الهيدروجيني النهائي عن الرقم الهيدروجيني الأولي كان لا بد من دراسة تأثيرات الرقم الهيدروجيني الأولي على نمو الفطر وإنتاج الحامض . أظهرت نتائج دراسة هذا التأثير الجدول(5) إن للرقم الهيدروجيني الأولي تأثير كبير على نمو الفطر وإنتاج الحامض حيث تم الحصول على أقصى إنتاجية للحامض34.47 ( غم /لتر) عند الرقم الهيدروجيني الأولي (3.0) وبارتفاع الرقم الهيدروجيني نحو القاعدية كان هناك انخفاض في إنتاجية الحامض فالمعاملات ذات الرقم الهيدروجيني (3.5و4.0) أعطت كمية من الحامض بلغت 28.39و25.65 (غم/لتر) على التوالي . أما المعاملات ذات الأرقام الهيدروجينية الواطئة جدا (1.0و1.5) أعطت كمية قليلة من الحامض بلغت 16.35 و 22.42 ( غم/لتر) . من هذا يتضح إن الرقم الهيدروجيني الأفضل لإنتاج الحامض ينحصر بين (2.5- 3.0) . أما إنتاج الكتلة الحيوية فقد كان متباينا في المعاملات ذات الأرقام الهيدروجينية المختلفة وتم الحصول على أقصى كمية من الكتلة الحيوية عند الرقم الهيدروجيني 3.0 حيث بلغت 22.62 (غم /لتر).

من متابعة استهلاك السكر بعد مرور 9 أيام من التحضين يمكن القول إن معدل استهلاك السكر كان يتماشى مع الكتلة الحيوية حيث إن زيادة الكتلة الحيوية كان يصاحبه استهلاك عال للسكر من الوسط .

يمكن تفسير هذه النتائج إلى إن عملية الإنتاج تتم بارقام هيدروجينية منخفضة وتصل كفاءة تحويل السكر إلى ذروتها عند هذه الأرقام الهيدروجينية ولكن الرقم الهيدروجيني الملائم للإنتاج هو غير ذلك الملائم للنمو . ففي مرحلة النمو تبدأ الأرقام الهيدروجينية بالانخفاض نتيجة لاستهلاك ايونات الامونيوم وفيه تتم عملية إنتاج الكتلة الحيوية وتكون الأرقام الهيدروجينية عالية نوعا ما. في حين إن الارتفاع في الأرقام الهيدروجينية يؤدي إلى إنتاج حامض الاوكزاليك السام [7] إن هذه النتائج تتفق مع ما توصل إليه [36,35]. اللذين أشاروا إلى أهمية الرقم الهيدروجيني في الحصول على أقصى كمية من حامض الستريك كما تم التأكيد من قبل [37] إن الرقم الهيدروجيني الاولي 1.7 هو الأمثل لإنتاج حامض الستريك باستخدام الفطر *A. niger* . من جهة اخرى تم الاشارة من قبل [38] إن الـ pH الأمثل لأعلى إنتاج من حامض الستريك 4.0 باستخدام الفطر *A. niger* أما [39] فقد ذكرا إن الـpH الأمثل لإنتاج حامض الستريك 5.4 باستخدام وسط المولاس.

**الجدول (5) : تأثير الرقم الهيدروجيني الاولي على نمو عزلة الفطر *A. niger* 3 وانتاج حامض الستريك بعد 9 ايام من التحضين.**

| الرقم الهيدروجيني الاولي | الكتلة الحيوية غم/لتر | السكر المتبقي غم/لتر | كمية حامض الستريك المنتج غم/ لتر | الرقم الهيدروجيني النهائي |
|---|---|---|---|---|
| 1.0 | 8.77 (0.31) | 25.05 (0.00) | 16.35 (0.31) | 0.72 (0.22) |
| 1.5 | 14.27 (0.00) | 18.38 (0.01) | 22.42 (0.00) | 1.26 (0.51) |
| 2.0 | 18.76 (0.25) | 12.92 (0.51) | 26.69 (0.12) | 1.34 (0.90) |
| 2.5 | 21.99 (0.41) | 11.37 (0.32) | 31.09 (0.51) | 1.37 (0.00) |
| 3.0 | 22.62 (0.92) | 8.56 (0.65) | 34.47 (0.91) | 1.24 (0.92) |
| 3.5 | 16.97 (0.80) | 8.80 (0.82) | 28.39 (0.03) | 1.58 (0.31) |
| 4.0 | 15.11 (0.31) | 9.74 (0.90) | 25.65 (0.41) | 1.53 (0.81) |

كل قيمة هي معدل لمكررين والقيم بين الأقواس تمثل الانحراف المعياري

**تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الكحول الاثيلي :**

يضاف الكحول للأوساط الغذائية المعدة لإنتاج حامض الستريك في بعض الفطريات بتراكيز واطئة اذ يؤدي الى تحفيز الفطر لاستغلال مصادر الكاربون كما انه قد يحفز الفطر على استغلال المصدر النيتروجيني والفسفوري بشكل أفضل [34]. وعلى هذا الأساس أضيفت تراكيز مختلفة من الكحول الاثيلي الى الوسط الغذائي لغرض دراسة تأثيره في نمو الفطر وإنتاج حامض الستريك . بينت النتائج الجدول (6) ان اضافة الكحول أدى الى تحسين إنتاج حامض الستريك بكمية قليلة مقارنة مع معاملة السيطرة التي لم يضف إليها الايثانول اذ تم الحصول على أقصى إنتاج للحامض 30.83 (غم/لتر) عند إضافة الايثانول بتركيز 1% بينما إنتاج الحامض بلغ 24.51 (غم/ لتر) في معاملة السيطرة . أما التراكيز العالية من الكحول الاثيلي فقد أدت الى تثبيط في إنتاج حامض الستريك إذ تم الحصول على اقل كمية من الحامض 8.03 ( غم / لتر) في المعاملة التي اضيف إليها الكحول بتركيز 4% وهو أعلى تركيز مستخدم في هذه التجربة.

أما الكتلة الحيوية فعلى العكس من ذلك أدت إضافة الايثانول الى تحفيز الفطر على إنتاج الكتلة الحيوية وكان الإنتاج يتناسب طرديا مع زيادة تركيز الايثانول والى حد التركيز 2.5% أي إن إضافة الكحول أدت الى زيادة تدريجية في الكتلة الحيوية مع زيادة تركيز الكحول حيث أعطى التركيز 2.5% أقصى كتلة حيوية بلغت 21.25 (غم/لتر) وهو التركيز الأمثل من حيث إنتاجية الكتلة الحيوية في حين اتجهت الكتلة الحيوية نحو النقصان عند التراكيز الأعلى من هذا التركيز .

فيما يتعلق باستهلاك السكر فنلاحظ زيادة في استهلاك السكر في المعاملات التي بينت زيادة في نمو الفطر أي في معاملات التراكيز الواطئة من الكحول كان هناك استهلاك كبير للسكر على عكس المعاملات التي اضيف إليها هذا المركب بتراكيز عالية حيث كان هناك كمية لا بأس بها من السكر في الوسط عند انتهاء مدة التخمر .

الرقم الهيدروجيني النهائي كالعادة انخفض بشكل واضح عن الرقم الهيدروجيني الأولي في جميع تراكيز الكحول الاثيلي المستخدمة بسبب تراكم حامض الستريك في الوسط .

إن إضافة الكحول حالة شائعة في زيادة إنتاج حامض الستريك من سلالات الفطر *A. niger* ويعتقد ان سبب الزيادة يعود الى دور الميثانول في تكييف الغزل الفطري حيث يزيد نفاذية جدار الخلية وبذلك يسمح بإفراز السترات من الخلية [6] .إن هذه النتيجة مطابقة لما توصل إليه [1] إذ حصل على أعلى كمية من الحامض عند إضافة الايثانول بتركيز 1% في حين ذكرا [40] إن إضافة الكحول الى الوسط الغذائي أدى الى زيادة كمية حامض الستريك لضعفين.

**الجدول(6) : تأثير تراكيز مختلفة من الكحول الاثيلي على نمو عزلة الفطر *A . niger* وانتاج حامض الستريك بعد 9 ايام من التحضين .**

| تركيز الايثانول% (حجم/ حجم) | الكتلة الحيوية غم/لتر | السكر المتبقي غم/لتر | كمية حامض الستريك المنتج غم/ لتر | الرقم الهيدروجيني النهائي |
|---|---|---|---|---|
| 0.00 | 15.75 (0.31) | 8.51 (0.00) | 24.51 (0.01) | 1.69 (0.40) |
| 0. 50 | 16.83 (0.06) | 8.99 (0. 21) | 24.76 (0.21) | 2.45 (0.00) |
| 1.0 | 20.63 (0.42) | 6.65 (0.70) | 30.83 (0.02) | 2.07 (0.31) |
| 2.0 | 20. 71 (0.31) | 5.22 (0.82) | 27.10 (0.38) | 1.96 (0.62) |
| 2.5 | 21.25 (0.00) | 9.36 (0.21) | 18.53 (0.92) | 1.82 (0.00) |
| 3.0 | 20.04 (0.21) | 10.45 (0.48) | 15.60 (0.00) | 1.55 (0.21) |
| 3.5 | 13.95 (0.46) | 13.18 (0.90) | 8.74 (0.21) | 1.52 (0.78) |
| 4.0 | 12.40 (0.31) | 15.23 (0.00) | 8.03 (0.31) | 1.16 (0.90) |

كل قيمة هي معدل لمكررين والقيم بين الأقواس تمثل الانحراف المعياري

## References


1. Tsay ,S.S. and K.Y. To.1987. Citric acid Production using immobilized conidia of *Aspergillus niger* TMB 2022. Biotechnol and Bioeng .Vol .XXIX .: 297- 304.
2. Ishaq .A.,S. Ali and M.A.Qadeer .2002. Time course profile of citric acid fermentation by *Aspergillus niger* and kinetic relactions. Biological Sciences. 2 (11).760-761.
3. Peksel,A . and C.P.kubicek .2003. Effects of sucrose concentration during citric acid accumulation by *A. niger* J.Chem.27: 581- 590.
4. Karerboz , I. and Pirdal .1990. Apreliminary study on citric acid Fermentation by using *A. niger* (TEM) as organism and tubers of a sphodelus aestvus as substrate J.Fac.Sci .EGE Univ.,12: 13-15.
5. chanda , S .; S . Chakrabarty . and S . Matai . 1990 . Citric acid production in liquid waste from a leaf protein production plant : effects of sugar and potassium ferrocyanide . Biotechnol . Waste . 34 : 77 – 81 .

٦. العاني . فائز عزيز .1993. التكنولوجيا الحيوية . دار الكتب للطباعة والنشـر . مطبعـة جامعة الموصل . العراق .

٧. الخفاجي ، زهرة محمود .1990. التقنية الجيوية . مطبعه دار الحكمة للطباعة والنشر . الموصل . العراق .

٨. النعيمي ، هناء نجم عبدالله . ١٩٩٧ . انتاج حامض الليمون من مولاس البنجر باستخدام عزلة محلية للفطر *Aspergillus niger* . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الموصل . العراق .

9. Kristiansen , B.; M. Mattey and J. Linden .1999 .Citric acid . Biotechnology , Taylor & Frances Ltd . London UK . February .P.7-9.
10. .Ali.S., I . Haq and M.A. Qadeer.2001. Effect of mineral nutrient on the Production of citric acid by *Aspergillus niger*. Online J . Biotogical Sciences April .Vol .32: 31-35.
11. Gupta . S . and C . B . Sharma . 1994 . Continuous production of citric acid from sugar cane molasses using a combination of submerged immobilized and surface stabilized culters of *Aspergillus niger* KCU 520 . Biotechnol . lett . 16 : 599-604 .
12. Arzumanov , T.E.; N.V. Shishkanova , and T.V . Finogenova .2000 . Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat – batch culture on ethanol .Applied Microbiology and Biotechnology .Vol.53.No.5.: 525- 529.
13. Pazouki ,M ;P.A. Felse .; J.Sinha . and T,Panda .2000 . Comparative studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose .Bioprocess .Engineering. 22: 353- 361.
14. Mattey ,M. And A. llan . 1990. Glycogen accumulation in *Aspergillus niger*. Transient Biochemical .Solicits ,Vol .18: 1020-1022.
15. Mattey , M.1992 .The Production of organic acids. Crit . Rev. Biotechnol. 12:87-132.
16. Guebal, D.V. and N.V.Torres .2000. Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* through ametabolic flux balance model . Process Biotechnol. 4:123 – 127.
17. Guebel,D.V.and N.V. T. Darias.2001. Optimization of the citric acid production by *Aspergillus niger* through a metabolic Flux balance model .J.Biotechnol. 4:1-12.
١٨. احمد ،. محمد علي والنواوي . محمد عبدالرزاق .1990. الفطريات الصناعية . الدار العربية للنشر والتوزيع . مصر .
١٩. العبيدي ، صفاء إسماعيل رشيد.1998 ظروف إنتاج وطبيعة السكر المتعدد ((البوليولان)) المنتج بوساطة إحدى العزلات المحلية للفطر*Aureobasidium pullulans* رسالة ماجستير . كلية التربية . جامعة الموصل.العراق.
20. Marrier ,J.R. and M.Boulet. 1958.Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine acetic anhydride method .J.Dairy Sci . 41:1683.
21. Dubois ,M.;K.Gilles .;K.A.Hamilton.J.K.; Robers and F.Smith . 1956.Colorimetric method for the determination of sugars .J.Anal.Chem.28(3).350-356.
22. Booth ,C.1971.Methods in Microbiology Commonwealth. Surrey ,England.U.K..
23. Ellis ,M.B.1971.Demnatacions hyphomycetes Common wealth mycological Institute ..Kew. Surrey,Endland.
24. Ditt,j.T.and A.D. Hocking.1985. Fungi and Food Spoilage Academic Press ,London ,405.U.K.
25. Tieghem , P. E . L . 2005 . *Aspergillus niger* http : // www. *Aspergillus* . man . ac . uk .
26. LeDuy ,A.and J.A.Boa.1983.Pullulan Production from beat hydrolysate . Can.J.Microbiol.,29:143-146.
27. Ali,S and M.A. Qadeer.2002 .Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor . J . Biotechnol . Vol .5.: 1-2 .
28. Roukas , T.and P. Kotzekidou.1986. Production of citric acid from brewery waste by surface fermentation using *A.niger* .J.Food Sci.,51:225-226
29. Grapulin ,M.G.and M. Legisa .1996.Comparsion of specific metabolic characteristics playing a role in citric acid excretion between some strains of the genus *Aspergillus* .J.Biotechnol.,45:265-270.
30. Daniel ,G.V.;Darias ,N.; V.Torrres, 2001.Optimization of the citric acid production by *A.niger* through a metabolic flux balance model. Electronic .J.Biotechnol. 4:1-2.
31. Maddox , I . S .; K . Spencer .; J . M . Greenwood .; M . W . Dawson . and J . D . Brooks . 1985 . Production of citric acid from sugars present in wood hemicellulose using *Aspergillus niger* and *Saccharomycopsis lipolytica* . Biotechnol . lett . 7 : 815-818 .
32. Grewal ,H.S. and K.L .Kalra .1995.Fungal production of citric acid. Biotechnology Advances . Vol. 13. :209-234.
33. Ettler ,P. ; Martin Kora ,L.; Ujvora ,E. And V.L . Seligy.1991. Application of scale-down experiments in the study of citric acid biosynthesis . Folia. Microbiol. 36:493-497.
٣٤. دنحا ، رياض فرنسيس والخزرجي ، طالب عويد . 1990. تغذية وعلم وظائف الفطريات . مطابع التعليم العالي في الموصل /العراق.
35. Jernejc , K.; A.Cinerman. and A.Perdih. 1982. Citric acid Production in chemically defined media by *Aspergillus niger* .J.Appl. Microbiol. Biotechnd. 14: 29-33.
36. Netik.A.; N.V .Torres .; J-M. Riol, and C.P.Kubicek . 1997.Uptake and export of citric acid by *Aspergillus niger* is reciprocally regulated by manganese ions. Biochemica et Biophysica Acta (BBA) –Biomembranes. Vol.132.:287-294.
37. Kristiansen, B. and R. C. Charley. 1981. Continuous Process for Production of citric acid .Advances in Biotechnoogy., Vol.1:221-227.
38. Roukas,T.and L. Harvey. 1988. The effect of pH on Production of citric acid gluconic acid from beet and cane molasses using continuous culture ,Biotechnol. Lett. 10: 289-294..
39. Sanjay, K. And P. Sharma.1994.Ahighly performance fermentation process for production of citric acid from suger cane molasses .J.Microbiology .23:211-217.
40. Manonmani,H.K.and K.R . Sreekantiah.1989.Citric acid Production by a selected isolate of *Aspergillus niger* in defined media .J.Microbiol. Biotechnol. 4:75-79.

# Citric acid production from a local isolate of the fungus *Aspergillus niger* by standerd medium

**Wala Hamdoon Shuker, Shimal Yuonis Abid Al Hadee and Safaa Ismail Rasheed**

*Department of biology, College of Education, University of Mosul, Mosul, Iraq*

**Abstract:**

In this study , five strains of *Aspergillus niger have* been isolated and characterized from different sources (air, soil, onion leaves , gulkan and sugar beet leaves ). These strains were used to produce citric acid by one of the structural medium . The production of citric acid from the different strains were compared . It was shown that the strain of *Aspergillus niger* 3 was best one in citric acid production and it was given the highest production (24.45 gm/L) after 9 days of incubation. Also it was clear that the sucrose and clucose were the best carbon sources for the maximum production of citric acid .The Production of citric acid was increased by the increasing of sucrose ,(29.86g/L) citric acid obtained when sucrose concentration was 18 % . Optimum initial pH for acid production was 2.5 . The addition of ethanol stimulate citric acid production especially at the concentration 1%.