

إنتاج حامض الستريك بوساطة هايفات الفطر Aspergillus niger المنبثة حديثاً

احمد محمد علي
جامعة الموصل / كلية التمريض

تاريخ تسليم البحث : 2006/7/17 ؛ تاريخ قبول النشر : 2006/11/29

ملخص البحث :

درس إنتاج حامض الستريك من محلول السكرورز بالطريقة المغمورة وبوساطة الفطر A. niger في مخمر سعة (5) لتر (بحجم عمل لترين ونصف) . ودرس حجم اللقاح بمدى (0.5-2.5%) وسرعة التحريك بمدى (1000) دورة بالدقيقة والتهوية (0.7-1.3) حجم/حجم ودرجة حرارة التخمر (25-40) درجة مئوية وفترة التخمر (24-188) ساعة، فتبين ان حجم لقاح (1%) وسرعة التحريك بمرحلتين 400 و 1000 دورة في الدقيقة وكمية هواء (0.7) حجم/حجم بالدقيقة ودرجة حرارة (30) م ° وفترة تخمر (144) ساعة ، تعطي أعلى إنتاج من حامض الستريك حيث وصل الإنتاج الى (53) غم / لتر .

Citric acid production by pellet growth of Aspergillus niger

Ahmed M. Ali
University of Mosul – Nursing College

Abstract:

Citric acid production by submerged fermentation with pellet growth of Aspergillus niger in stirred fermentor with five liter capacity and (2.5) liter working volume .Different cultural conditions such as inoculum volume with range (0.5-2.5%), air supply with range (0.7-1.3) v/v, agitation in one stage 1000 rpm and two stages (400) and (1000) rpm, incubation temperature with range (25-40 C⁰) , and time profile after inculcation with range of (24-188 hours) , and we found that inoculum volume (1%), air supply 0.7 v/v agitation with two satge 400 and 1000 rpm, incubation temperature, 30C⁰, were optimized for enhance citric acid production. Maximum amount of citric acid obtained during this study was (53.0 g/l).

المقدمة:

يعتبر إنتاج حامض الستريك بواسطة الفطر *Aspergillus niger* هو الأكثر شيوعاً من باقي الأحياء المجهرية بالرغم من إمكانية إنتاجه من كائنات مجهرية أخرى مثل *A.awamori* و *Penicillium resrictum* و *Trichoderma viride* و *Mucor pirifomis* و *Yarrowia lipolytica* (Arzumanov, et.al., 2000).

وبالرغم من أن طرق الإنتاج السطحية لا زالت مستخدمة إلا أن المعامل الحديثة تستخدم طريقة المزارع المغمورة (Kamal, 1999 et.al.). وفي هذه الطريقة يستخدم التحريك والتهوية. (Moreira, 1996 et.al.)

إن عملية إنبات السبورات وتطور نمو الهايفات يؤثر في عملية إنتاج حامض الستريك، لأن النمو الخيطي الكثيف سيؤثر في عملية التحريك وبالتالي عدم الحصول على الهواء الكافي للنمو والإنتاج، ولذلك أجهت البحوث الحديثة الى عملية إنبات السبورات بصورة هايفة صغيرة ملساء قبل بدء عملية التخمير. (Gomez, et.al., 1988).

ومن أهم مميزات عملية الإنبات الأولية هو انخفاض اللزوجة في محلول الإنتاج الذي تسببه هايفات الفطر مقارنة بالنمو الخيطي الكثيف الناتج من عملية النمو الاعتيادية (التلقيح المباشر بالسبورات) وهذا يعزز عملية الخلط لهايفات الفطر مع المحلول.

كذلك فأن عملية الفصل بين هايفات الفطر ومحلول الإنتاج عند إنتهاء عملية الإنتاج تكون سهلة، ويمكن إعادة استخدام الهايفات مع محلول إنتاج جديد. (Haq et.al., 2002). هدفت الدراسة الى استخدام هايفات الفطر *Aspergillus niger* المنبئة قبل بدء عملية الإنتاج أي ان التلقيح سيكون بالهايفات بدلاً من السبورات، ومعرفة الظروف المثلى لإنتاج حامض الستريك بهذه الطريقة.

المواد وطرق البحث

اولاً. الفطر المستخدم:

استخدمت سلالة محلية من الفطر *Aspergillus niger* المعزولة من دراسة سابقة محفوظة على اكار مائل من وسط البطاطا والدكستروز اكار (PDA). (الزبير ، 1988).

ثانياً. الوسط المستخدم لتنبيت السبورات :

استخدمت بيئة (Shu & Johnson, 1948). أخذ (100) مل من وسط Shu & Johnson (14% سكر و 6.0 PH) وضع في دورق مخروطي حجم (1) لتر ووضع مع المحلول خرز من هلام السليكا Silica gel Chips وبعد التعقيم أخذ (1.2 × 10 10) سبور/

لتر من طبق بتري، وحضن الدورق على (30 5) م في حضان هزاز بسرعة (200) دورة / دقيقة.

ثالثاً. تقنية التخمر:

استخدم مخمر سعة (5) لتر. وضع فيه (2.5) لتر من محلول Shu & Johnson ، ونقل إلى اللقاح الخضري المنبت بمعدل 5% (حجم/ حجم) على أساس حجم الوسط المستخدم في عملية التخمر.

رابعاً. الاجهزة المستخدمة في التحريك :

تم استخدام (Khan-Shaker) و وضع في جهاز حضان نوع (memert) الماني الصنع

خامساً. قياس كمية الهواء :

استخدم ماطور هواء صغير و قيست كمية الهواء باستخدام اسطوانة مدرجة ممتلئة بالماء

سادساً. طرق التحليل:

1. قدر الوزن الجاف للهايفات وفقاً لطريقة (Haq and Daud,1995).
2. قدر السكر بالطريقة اللونية بواسطة طريقة DNS وفقاً لما ذكره (Tasun,1970)
3. حامض الستريك قدر وفقاً لما ذكره (Marrier and Boulet,1958).

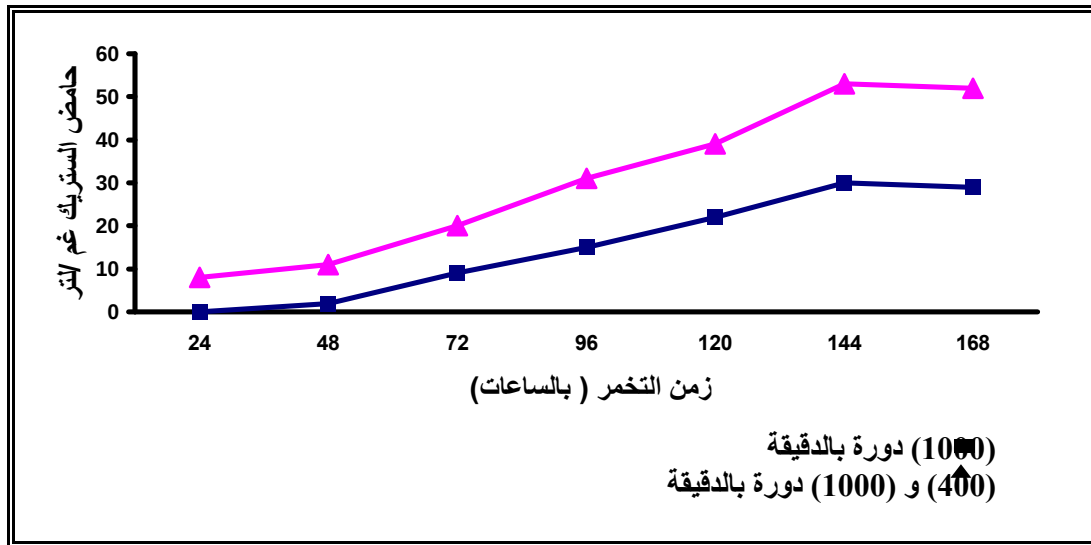
النتائج والمناقشة :

يعتمد إنتاج حامض الستريك على السلالة المستخدمة في الإنتاج وتوفير الظروف المثلى لعملية التخمر، وفي هذا البحث تمت دراسة الظروف المزرعية اللازمة لإنتاج الهايفات بالشكل الذي يضمن استمرار عملية التخمر بدون أي إشكالات في عملية التخمر مثل شكل الهايفة والتهوية والتحريك وكذلك درجة الحرارة وفترة التخمر.

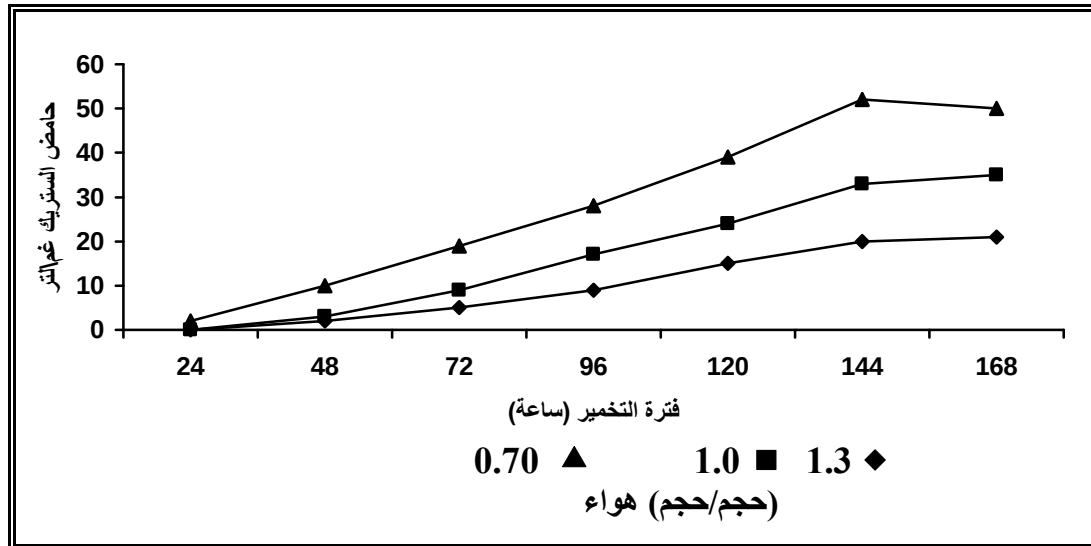
أولاً. التهوية والتحريك:

جريت عملية تحريك بسرعتين واحدة على (1000) دورة بالدقيقة والثانية لمرحلتين الأولى (400) دورة بالدقيقة والثانية (1000) دورة بالدقيقة وتم تزويد الهواء بمعدل (0.75 – 1.50) حجم / حجم بالدقيقة ، يبين الشكل (1) و(2) إن أقصى إنتاج لحامض الستريك وصل الى

(53) غم /لتر عند تحريك بمرحلتين (400) و (1000) دورة بالدقيقة وهواء بمعدل (0.7) حجم /حجم بالدقيقة، وهذا يعود الى أنها توفر الأوكسجين الملائم والمحافظة على مستوى أوكسجين مذاب (Do) في المخمر. وفي هذه الظروف فان نمو الفطر يأخذ الشكل القياسي للهايفة (هايفة صغيرة ملتفة كروية ملساء) و ذكر (Gomez et.al.,1988) بأن اغلب الاختلافات تحدث خلال فترة انتاج الحامض فعندما يكون التحريك على مرحلتين يرتفع الاوكسجين الى اعلى مستوياته (78%) تشبع بعد 72 ساعة من عملية التخمير .



الشكل (1): تأثير سرعة التحريك على إنتاج حامض الستريك

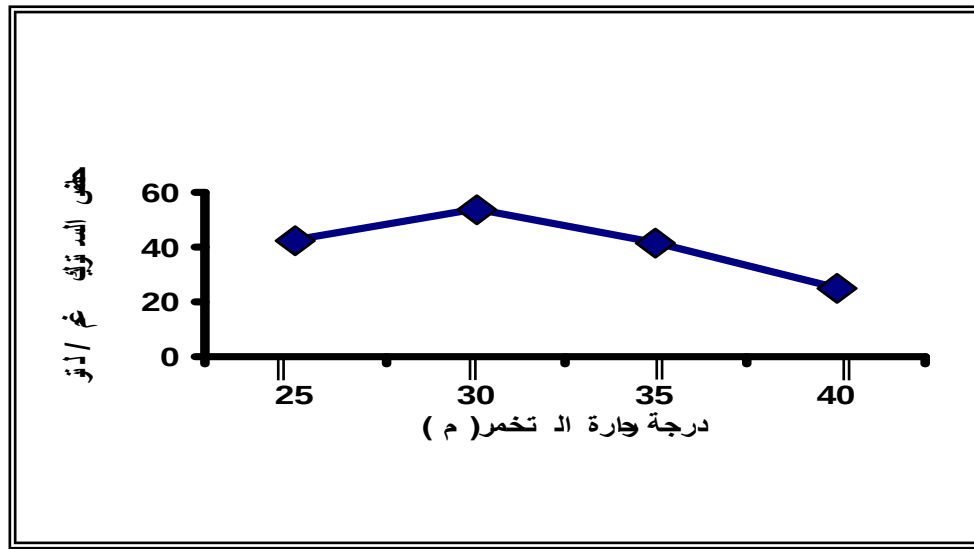


الشكل (2) تأثير كمية الهواء على إنتاج حامض الستريك

وذكر (Sharma and Sanay , 1994) بأن درجة التحريك والتهوية تعتمدان على نوع الكائن المجهرى المستخدم وتركيب الوسط الغذائي وحجم المخمر .

ثانياً. درجة حرارة التخمير:

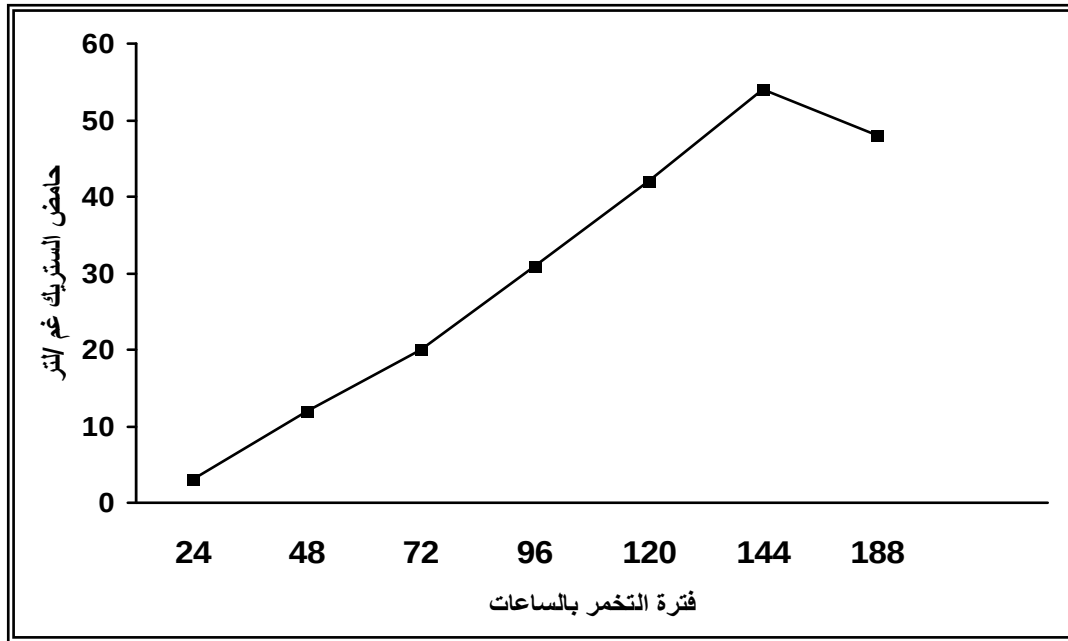
أجريت عملية التخمير على أربع درجات مختلفة (25 – 40 °م) والشكل (3) يبين بأن أقصى إنتاج كان عند 30 م° وصل الى (54) غم / لتر ، حيث أن انخفاض درجة الحرارة عن 30 م° ، فإن نشاط الأنزيمات ينخفض أيضاً (Haq et.al, 2002). وكذلك ارتفاعها عن 30 م° يؤدي الى انخفاض التخليق الحيوي للأنزيمات. وذكر (Panda et.al, 2002) بأن ارتفاع الحرارة عن 30 م° يؤدي الى زيادة إنتاج مواد ايضية أخرى خصوصاً حامض الاوكزاليك، وذكر ذلك أيضاً، (Hang and Woodams, 1998).



الشكل (3) تأثير درجة حرارة التخمير في إنتاج حامض الستريك

ثالثاً: فترة التخمير:

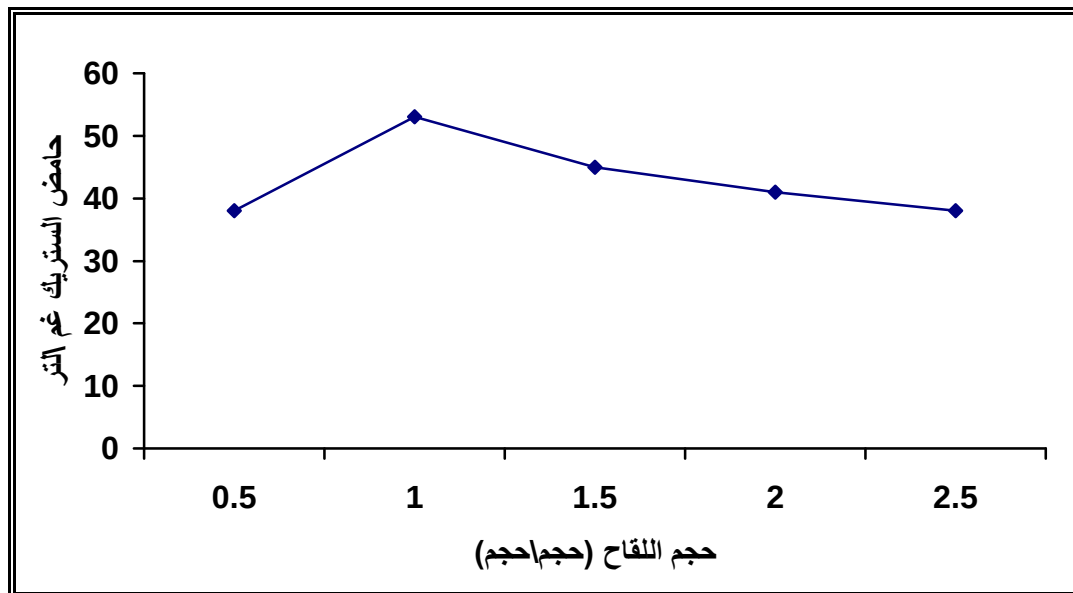
الشكل (4) يبين ان أعلى إنتاج من حامض الستريك تم الحصول عليه (144) ساعة حيث أعطت إنتاج قدره (53) غم / لتر من حامض الستريك. أما زيادة مدة التخمير فلا تؤدي الى زيادة الإنتاج من حامض الستريك وقد يعود هذا الى تقدم الفطر في العمر وكذلك نضوب السكر من الوسط الغذائي. وهذه النتيجة مشابهة للنتيجة التي ذكرها (Ali et.al., 2002)، وذكرها (Haq et.al, 2002) أن فترة التخمير تعتمد على نوع الكائن المجهرى المستخدم وظروف التخمير، ففي مزارع الوجبات يبدأ الإنتاج بعد طور الركود (Lage Phase) ويصل الى اقصاه في بداية طور الثبات (Stationary Phase) او مع نهاية الطور اللوغارتمي (Log. Phase) .



الشكل (4) يبين تأثير فترة التخمير على إنتاج حامض الستريك

رابعاً. حجم اللقاح:

الشكل (5) يظهر تأثير حجم اللقاح الخضري (0.5 – 2.5 %) في إنتاج حامض الستريك من الفطر (*A. niger*). فأعطى حجم اللقاح (1%) أعلى إنتاج من حامض الستريك وصل الى (53) غم /لتر، وهذه النتيجة جاءت مقارنة لما وجدته (Ali|et.al., 2002) و (Van Suijdam| et.al, 1980).



شكل (5) يبين تأثير حجم اللقاح على إنتاج حامض الستريك

المصادر :

1. الزبير، مفاخر عبدالسلام . انتاج حامض الستريك من الفطر *A. niger* ومطفراته على بيئتي السكروز والدبس .رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة الموصل،(1988).
2. Ali, S.; Haq , I. and Iqbal ,J.(2002) The role of Mn^{++} ions for high consistent yield of citric acid in recycling fed – batch bioreactor system and its novelty on kinetic basis .Electronic Journal of Biotechnology, August, Vol.5, No.(2) .
3. Ali, S.; Haq , I. and Qadeer, M.A .(2001)Effect of mineral nutrient on the production of citric acid by *A. niger*. On line Journal of Biological sciences, April , Vol.32, No.(1) , p: 31-35.
4. Arzumanov,T.E.; Shishkanova ,N.V.and Finogenova, T.V.(2000) Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat – batch culture on ethanol. Applied Microbiology and Biotechnology, March, Vol.53, No.(5) ,p: 525-529 .
5. Dawson , M.W.; Maddox, I.S. and Brooks,J.D.(1986) Effect of interruption to the air supply on citric acid by *A. niger*.Biotechnology, February , vol.8, No.(1) ,p: 37-40 .
6. Gomez, R.; Schnabel , I. and Garrideo ,J .(1986) Pellet growth and citric acid yield of *A. niger* 100.Enzyme Microbiology and Technology ,March, vol.10 , p: 188-191 .
7. Hang,Y.D. and Woodams, E.E.(1998) Production of citric acid from corncobs by *A. niger*. Bioresource Technology, March, Vol.65, No.(3) ,p: 251-253 .
8. Haq ,P.B. and Daud, D.A.(1995) Process of mycelial dry weight calculation for citric acid.Journal of Biotechnology, March, Vol.9, p: 31-35.
9. Haq ,P.B .; Khurshid , S.; Ali,S.; Qadeer,M.A. and Rakoja,M.I.(2001) Mutation of *A. niger* for enhanced citric acid by black strap molasses. World Journal of Microbiology and Biotechnology , December, Vol.17, p: 35- 37.

- 10.Haq ,P.B.; Ali ,S. ; Qadeer,M.A. and Iqbal, J.(2002) Citric acid fermentation by mutant strain of *A. niger* GCMC-7 using molasses based medium. Electronic Journal of Biotechnology , August , Vol.5,No. (2) , p: 125- 132.
- 11.Kamal,K.P; Verma,U.N .; Nag . A.k . and Singh, S.P.(1999) Effect of antifoam and oxygen transfer rate on citric acid production by submerged fermentation. Asian Journal chemistry , October , Vol.11, No. (3) p: 1020- 1022.
- 12.Marrier, J.R.and Boulet , M.(1958) Direct determination of citric acid in milk with an improved . pyridine acetic anhydride method. Journal of Dairy Sciences , October, Vol.41, p: 1683.
- 13.Moreira, M.T.; Feijoo,G. and Lema, J.M.; Sanroman,A.(1996) Control of pellet morphology of filamentous fungi in fluidized bed bioreactors by means of a pulsing flow. Enzyme Microbial and Technology ,March, Vol.19 ,p: 261-266.
- 14.Panda, T.; Kundu, S. and Majumdar, S.K.(1984) Studies on citric acid production by *A. niger* using treated Indian can molasses. Journal of Microbiology, September , Vol.52, No.(2), p: 61- 66.
- 15.Sanjay,K. and Sharma , P.(1994) A highly performance fermentation process for production of citric acid from sugarcane molasses. Journal of Microbiology, April , Vol.23, p: 211- 217.
- 16.Shu , P.and Johnson,M.J.(1948) Effect of the composition of the sporulation medium on citric acid production by *A. niger* in submerged culture. Journal of Bacteriology, September , Vol.54, p: 162- 167.
- 17.Van – Suijam , J.C. ; Kossen , N.W.F. and Paul,. P.G.(1980) An inoculum technique for the production of fungal pellets . European Journal of Applied Microbiology , December , vol.8, p: 353- 359.