إنتاج حامض الستريك بوساطة هايفات الفطر Aspergillus niger المنبتة حديثاً

احمد محمد علي
جامعة الموصل / كلية التمريض

تاريخ تسليم البحث : ٢٠٠٦/٧/١٧ ؛ تاريخ قبول النشر : ٢٠٠٦/١١/٢٩

ملخص البحث :

درس إنتاج حامض الستريك من محلول السكروز بالطريقة المغمورة وبوساطة الفطر A. niger في مخمر سعة (٥) لتر (بحجم عمل لترين ونصف) . ودرس حجم اللقاح بمدى (٠.٥-٢.٥%) وسرعة التحريك بمدى (١٠٠٠)دورة بالدقيقة والتهوية (٠.٧-١.٣) حجم/حجم ودرجة حرارة التخمر(٢٥-٤٠) درجة مئوية وفترة التخمر (٢٤-١٨٨)ساعة، فتبين ان حجم لقاح (١%) وسرعة التحريك بمرحلتين ٤٠٠ و ١٠٠٠دورة في الدقيقة وكمية هواء (٠.٧) حجم/حجم بالدقيقة ودرجة حرارة (٣٠) م○ وفترة تخمر (١٤٤) ساعة ، تعطي أعلى إنتاج من حامض الستريك حيث وصل الإنتاج الى (٥٣) 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 C^0) , 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,30C^0, 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 الإ ان المعامل الحديثة تستخدم طريقة المزارع المغمورة (Kamal et.al.,1999). وفي هذه الطريقة يستخدم التحريك والتهوية. (Moreira et.al.,1996)

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 أتجهت البحوث الحديثة الى عملية إنبات السبورات بصورة هايفة صغيرة ملساء قبل بدء عملية التخمر. (Gomez, et.al.,1988).

ومن أهم مميزات عملية الإنبات الأولية هو إنخفاض اللزوجة في محلول الإنتاج الذي تسببه هايفات الفطر مقارنة بالنمو الخيطي الكثيف الناتج من عملية النمو الأعتيادية (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 المنبتة 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 ، ١٩٨٨).

ثانياً. الوسط المستخدم لتنبيت السبورات :

استخدمت بيئة .(Shu & Johnson,1948) . أخذ (١٠٠) مل من وسط Shu & Johnson (١٤% سكر وPH ٦.٠) وضع في دورق مخروطي حجم (١) لتر ووضع مع المحلول خرز من هلام السليكا Silica gel Chips وبعد التعقيم أخذ (١.٢ × ١٠ ١٠) سبور/

لتر من طبق بتري، وحضن الدورق على(٣٠ ٥) م في حضان هزاز بسرعة (٢٠٠) دورة / دقيقة.

ثالثاً. تقنية التخمر:

استخدم مخمر سعة (٥) لتر. وضع فيه (٢.٥) لتر من محلول Shu & Johnson ، ونقل إلية اللقاح الخضري المنبت بمعدل ٥% (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

خامسا. قياس كمية الهواء :

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

سادسا. طرق التحليل:

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

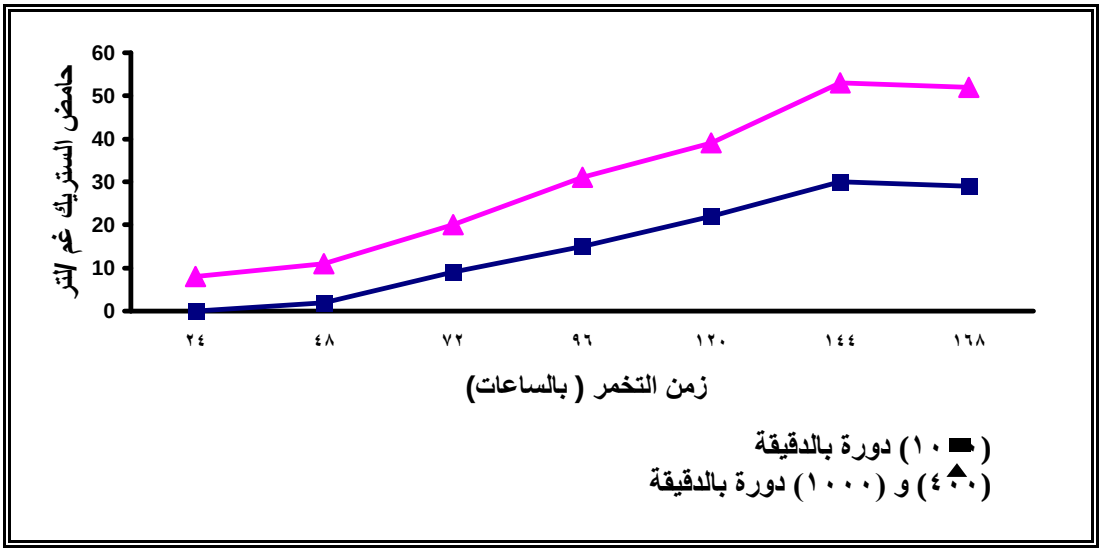
النتائج والمناقشة :

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

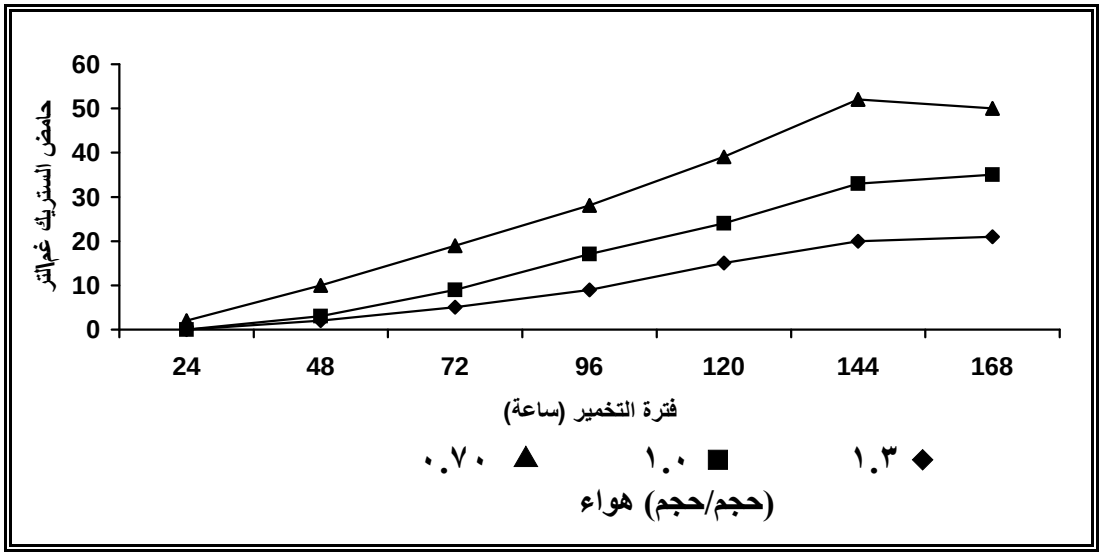
أولاً. التهوية والتحريك:

جريت عملية تحريك بسرعتين واحدة على (١٠٠٠) دورة بالدقيقة والثانية لمرحلتين الأولى (٤٠٠) دورة بالدقيقة والثانية (١٠٠٠) دورة بالدقيقة وتم تزويد الهواء بمعدل (٠.٧٥ – ١.٥٠) حجم / حجم بالدقيقة ، يبين الشكل (١) و(٢) إن أقصى إنتاج لحامض الستريك وصل الى

(٥٣) غم /لتر عند تحريك بمرحلتين (٤٠٠) و (١٠٠٠) دورة بالدقيقة وهواء بمعدل (٠.٧) حجم /حجم بالدقيقة، وهذا يعود الى أنها توفر الأوكسجين الملائم والمحافظة على مستوى أوكسجين مذاب (Do) في المخمر. وفي هذه الظروف فان نمو الفطر ياخذ الشكل القياسي للهايفة (هايفة صغيرة ملتفة كروية ملساء) و ذكر (Gomez et.al.,1988) بان اغلب الاختلافات تحدث خلال فترة انتاج الحامض فعندما يكون التحريك على مرحلتين يرتفع الاوكسيجين الى اعلى مستوياته (٧٨%) تشبع بعد ٧٢ ساعة من عملية التخمر .



الشكل (١): تأثير سرعة التحريك على إنتاج حامض ألستريك



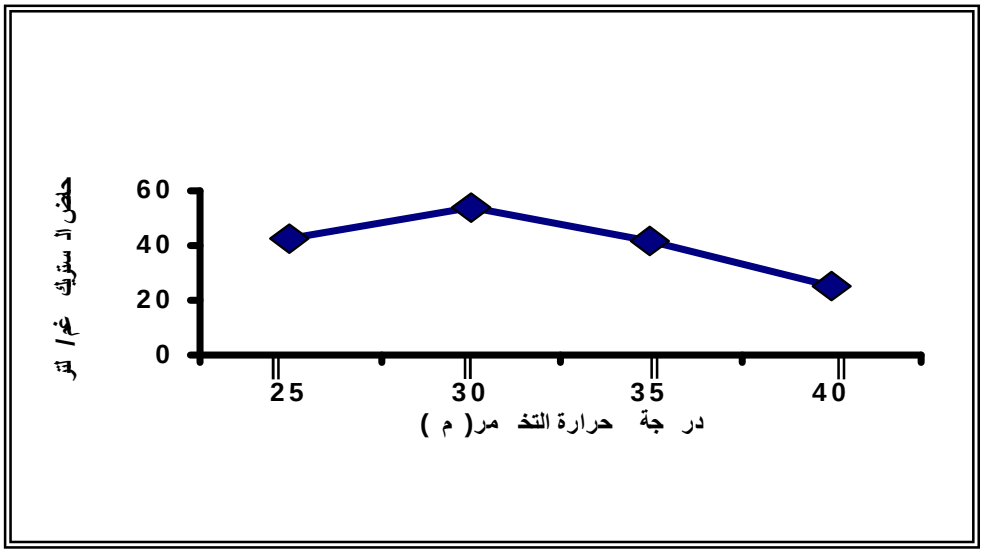
الشكل (٢) تاثير كمية الهواء على انتاج حامض الستريك

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

ثانياً. درجة حرارة التخمر:

أجريت عملية التخمر على أربع درجات مختلفة (٢٥ – ٤٠ م˚) والشكل (٣) يبين بأن أقصى إنتاج كان عند (٣٠) م˚ وصل الى (٥٤) غم / لتر ، حيث أن أنخفاض درجة الحرارة عن (٣٠) م˚ ، فإن نشاط الأنزيمات ينخفض أيضاً (Haq et.al ,2002).

وكذلك ارتفاعها عن (٣٠) م˚ يؤدي الى إنخفاض التخليق الحيوي للأنزيمات.وذكر (Panda et.al,2002) بأن ارتفاع الحرارة عن (٣٠) م˚ يؤدي الى زيادة انتاج مواد ايضية أخرى خصوصاً حامض الاوكزاليك، وذكر ذلك أيضاً، (Hang and Woodams,1998).



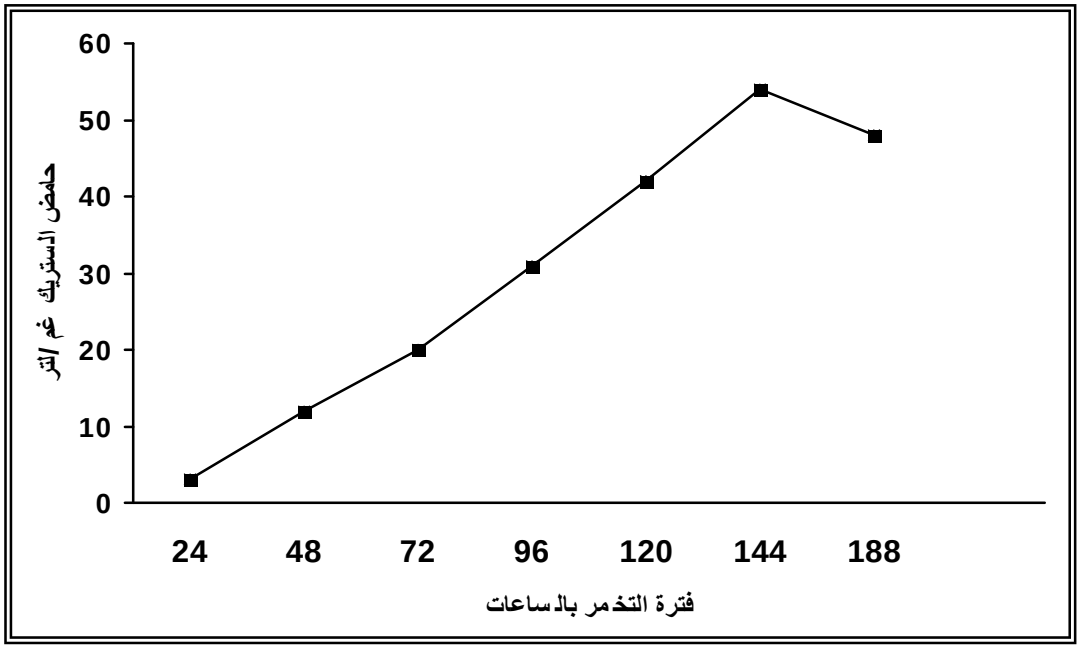
لشكل (٣) تاثير درجة حرارة التخمر في انتاج حامض الستريك

ثالثاً: فترة التخمر:

الشكل (٤) يبين ان أعلى إنتاج من حامض الستريك تم الحصول عليه(١٤٤) ساعة حيث أعطت إنتاج قدره (٥٣)غم /لتر من حامض الستريك.

أما زيادة مدة التخمر فلا تؤدي الى زيادة الإنتاج من حامض الستريك وقد يعود هذا الى تقدم الفطر في العمر وكذلك نضوب السكر من الوسط الغذائي.

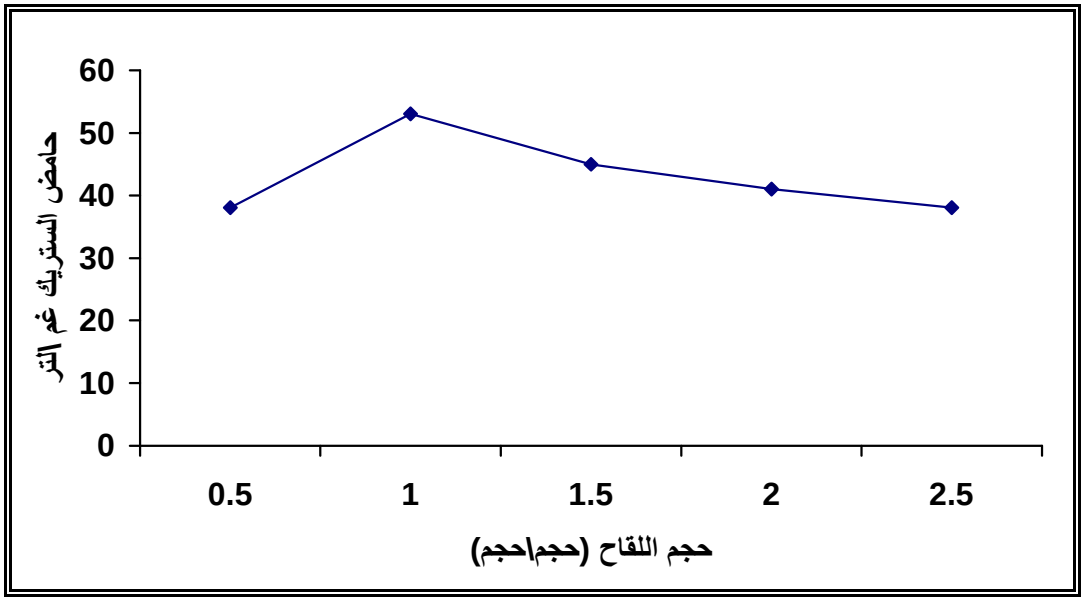
وهذه النتيجة مشابهة للنتيجة التي ذكرها (Ali et.al., 2002) ، وذكرالـ (Haq et.al ,2002) أن فترة التخمر تعتمد على نوع الكائن المجهري المستخدم وظروف التخمر، ففي مزارع الوجبات يبدأ الإنتاج بعد طور الركود (Lage Phase) ويصل الى اقصاه في بداية طور الثبات (Stationary Phase) او مع نهاية الطور اللوغارتمي (Log. Phase) .



الشكل (٤) يبين تاثير فترة التخمر على انتاج حامض الستريك

رابعاً. حجم اللقاح:

الشكل (٥) يظهر تأثير حجم اللقاح الخضري (٠.٥ – ٢.٥ %) في إنتاج حامض الستريك من الفطر (A. niger) .فأعطى حجم اللقاح (١%) أعلى انتاج من حامض الستريك وصل الى (٥٣) غم /لتر، وهذه النتيجة جاءت مقاربة لما وجده (Ali|et.al., 2002) و (Van – Suijdam| et.al, 1980)..



لشكل (٥) يبين تاثير حجم اللقاح على انتاج حامض الستريك

المصادر :

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

2. Ali, S.; Haq , I. and lqbal ,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.