

الظروف المثلى لإنتاج حامض الستريك من عزلة فطر *Aspergillus niger* محلية بطريقة تخمرات الحالة الصلبة

محمد عمر محي الدين

قسم علوم الأغذية/ كلية الزراعة/ جامعة بغداد

أيمن مازن حسين

قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة(ابن الهيثم)/ جامعة بغداد

استلم في: ١٨/ كانون الأول / ٢٠١٤ ، قبل في: ٢٥ / شباط / ٢٠١٥

الخلاصة

تم في هذه الدراسة الحصول على ١٤ عزلة محلية من الأعفان من مصادر مختلفة اشتملت بعض الفواكه التالفة ونماذج من التربة. أخضعت هذه العزلات الى الغرلة الأولية النوعية لتحديد قابليتها في إنتاج حامض الستريك تبعثها الغرلة الثانوية الكمية. واعتمدت في الغرلة الثانوية طريقة تجمع التخمرات المغمورة وتخمرات الحالة الصلبة، باستعمال قطعة من الاسفنج كمادة سائدة، شُبعت بالمغذيات المطلوبة لنمو العفن وإنتاج الحامض. فُتبين أن العزلة A7 أغزر إنتاجاً من بين العزلات جميعها. أظهرت الفحوصات المظهرية تحت المجهر الضوئي، وعلى الأوساط الزرعية للعزلة A7 عائدتها الى العفن *Aspergillus niger*. استعملت مواد أولية مختلفة لإنتاج الحامض من العزلة المذكورة وبطريقة تخمرات الحالة الصلبة. ووجد أن مسحوق الذرة أفضل من غيرها فأكملت الدراسة عليها. تبين من خلال تحديد الظروف المثلى لإنتاج حامض الستريك من العزلة المذكورة أن أفضل تلك الظروف تمثلت بنسبة ترطيب ١:٠,٧٥ (ماء: وسط) ودرجة حرارة ٢٥ م° ورقم هيدروجيني ٣ وحجم لقاح ١٠^٧ بوغ / مل وخلال ٣ أيام من الحضان، حيث بلغت إنتاجية حامض الستريك ٢٠,٨ غم/١٠٠غم من الوسط. ولوحظ في الدراسة أن تدعيم الوسط بمستخلص الخميرة بتركيز ١ % مصدر للنتروجين ، وإضافة ٣ % من الميثانول الى ماء الترطيب، يساهمان في تحقيق زيادة إنتاجية الحامض بلغت ٢٣,٠ غم / ١٠٠غم من الوسط. أما تأثير إضافة الإيثانول فكان محدوداً. تم تشخيص حامض الستريك المنتج كماً ونوعاً بطريقة (HPLC) High Performance Liquid Chromatography فوجد أن كمية الحامض المنتجة بعد ثلاثة أيام من الحضان تحت الظروف المثلى تبلغ ١٣,٥٤ غم/١٠٠غم من الوسط. وهي أقل من تلك التي قدرت بالطريقة الكيميائية وباستعمال Pyridine، وإن ثمة مركب آخر رافق إنتاج الحامض بكمية غير قليلة، لم يتم التعرف عليه، قد يكون أحد الحوامض العضوية لدورة كربيس، الذي يحتمل أنه يتداخل مع حامض الستريك عند تقديره بطريقة البريديين. وبناءً على نتائج تقدير حامض الستريك بطريقة HPLC يمكن القول أن الإنتاجية الفعلية للحامض من العزلة قيد الدراسة بلغت القيمة المذكورة أعلاه وليس تلك التي احتسبت على أساس الطريقة الكيميائية.

الكلمات المفتاحية: حامض الستريك، تخمرات الحالة الصلبة ، العفن *Aspergillus niger*

المقدمة

يُعد حامض الستريك من الحوامض الشائعة في الطبيعة، إذ يوجد، وبالدرجة الأساس، في مجموعة الفواكه التي تدعى بالحمضيات كالبرتقال والليمون والكريب فروت واليوسفي وغيرها، فضلاً عن وجوده في الفواكه الأخرى ولكن بنسب متفاوتة وضئيلة. في الحقبة التي سبقت إنتاج حامض الستريك بواسطة الأحياء المجهرية كان الاهتمام ينصب على إنتاجه من الحمضيات كالليمون والبرتقال علماً بأن أول من قام بعزله وبلورته الباحث السويدي Carl Wilhelm Scheele من عصير الليمون عام 1784 [١]. إن أحد أهم المعايير التي توضح الأهمية التجارية لهذا الحامض هو حجم السوق الضخمة له حيث يصل إنتاجه العالمي إلى ١,٧ مليون طن لكل سنة ويزيادة سنوية تقدر بحوالي ٥% [٢]. يُستهلك حامض الستريك في تصنيع الأغذية بكميات كبيرة تقدر بحوالي ٧٠% من مجمل وإنتاجه تليها الصناعات الصيدلانية التي تستنفذ ١٢% منه تقريباً، أما ما تبقى فيجد طريقه في تطبيقات أو صناعات أخرى متنوعة [٣]. وتُعد الفطريات الخيطية التي تعود إلى جنس *Aspergillus* الأكثر استعمالاً لهذا الغرض لاسيما *Aspergillus niger* [٤]. وتتنوع طرائق إنتاج حامض الستريك بين طريقة المزارع السطحية Surface Culture وطريقة المزارع المغمورة Submerged Culture وطريقة تخمرات الحالة الصلبة Solid state fermentation [5]. وذكر [٦] أن حامض الستريك ينتج بطريقة تخمرات الحالة الصلبة وطريقة المزارع المغمورة. يستعمل حامض الستريك كمادة مضادة للأكسدة ومادةحافظة أو لإعطاء النكهة الحامضية للمشروبات وفي صناعة الجلي والمرببات و الكانديز والنبيد وغيرها ، كما أنه من المنظمات الجيدة للحموضة فضلاً عن كونه يمتلك خاصية مخلبية تربط المعادن. وهذه الخاصية قادت إلى استعمالاته المتزايدة كمادةحافظة مانعة لأكسدة الدهون والزيوت، كما يستعمل في الصناعات الصيدلانية وفي مواد التجميل وغيرها [٧،٨،٩،١٠،١١] وتتنوع الأحياء المجهرية المنتجة لحامض الستريك ، ما بين البكتيريا والخمائر والأعفان. غير أن معظم الدراسات تناولت إنتاجه من الأعفان. وأستعمل العفن *A. niger* منذ أمد بعيد لهذا الغرض، وهو من الفطريات الخيطية الذي يتميز بسهولة التعامل معه، فضلاً عن قابليته في تخمير مختلف المواد الرخيصة وإنتاجه لكمية وفيرة من الحامض [١٢] بسبب نظامه الأنزيمي المتطور [١٣] وثمة سلالات من الخمائر معروفة بإنتاجيتها العالية منه، ومن بعض المركبات الهيدروكربونية مثل n-alkanat. وهناك عوامل عدة تؤثر في إنتاج حامض الستريك مثل مكونات الوسط الغذائي من مصادر الكربون والنيتروجين والفوسفات والعناصر المعدنية وتركيزها، فضلاً عن ظروف التخمر وتشمل الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة والتهوية والمحتوى الرطوبي للوسط. واستعملت في هذه الدراسة تخمرات الحالة الصلبة Solid State Fermentation لغرض الإنتاج. ويعرف هذا النوع من التخمر بأنه عملية تتم فيها تنمية الأحياء المجهرية على مواد أساس صلبة تحتوي على نسبة واطئة من الماء [١٤] وتفضل تخمرات الحالة الصلبة على التخمرات المغمورة لإمكانية الحصول على ريع مركز [15] وقلة المخلفات المطروحة، وليس ثمة قلق من تصريف هذه المخلفات إلى البيئة لكون معظم المغذيات فيها تكون قد استنفذت أثناء التخمر [١٦]، وتفضل على المغمورة أيضاً من حيث محدودية احتمالات تلوثها بالأحياء المجهرية الدخيلة غير تلك المستعملة في الإنتاج [17]. وبصورة عامة، فإن الباحثين والعلماء ما زالوا يتحررون عن مخلفات رخيصة غنية بمصادر الكربون للتحويلات الحيوية، إلى جانب المخلفات المستعملة في الوقت الحالي مثل المولاس الذي لاقي رواجاً أكثر من غيره في إنتاج حامض الستريك بسبب توفره نسبياً ورخص ثمنه [١٨].

المواد وطرائق العمل:

مصادر العزل:

استعملت في هذه الدراسة عدد من الفطريات التي تتوافق خواصها المزرعية والمجهرية مع الجنس *Aspergillus* تم الحصول عليها من مصادر متعددة اشتملت على التربة والفواكه الحامضية النافثة ، فضلاً عن ثلاث عزلات من مختبر التقنية الحيوية.

العزل والغربية: استعمل (PDA) Potato dextrose agar وسط لعزل وحفظ وتنشيط الفطريات. حيث حضر حسب

تعليمات الشركة المجهزة OXOID بإذابة ٣٩ غم في لتر من الماء المقطر. عقم في المؤصدة في ١٢١ باوند/انج^٢ لمدة ١٥ دقيقة. وأستعمل كذلك في تنقية العزلات وفي دراسة خواصها المزرعية وطبيعة نموها كخطوة باتجاه تشخيصها. أما عملية الغربية فقد تمت على وسط Czapek-Dox Agar وحضر بإذابة المكونات المذكورة ادناه في لتر واحد من الماء المقطر وحسبما ورد في [١٩] مع استبدال النشا بالكوكوز أو السكروز وبعض التحوير حسب الهدف من التجربة، وواقع ٣٠ غم/ لتر من الماء المقطر. والمكونات الأخرى هي: KCl ٠,٥ غم ، K₂HPO₄ ١,٠ غم ، MgSO₄ ٠,٥ غم ، NaNO₃ ٣,٠ غم، Fe₂(SO₄)₃ ٠,٠١ غم ، أكارو. ١٣ غم. ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط على ٦ بحامض الهيدروكلوريك بتركيز ٠,١ مولاري. وعقم اضيف إلى الوسط كاشف المثيل الأحمر المحضر بتركيز ١% في ٩٥% ميثانول وبواقع ٤-١ قطرات لكل ١٠ مل من الوسط بعد التعقيم. نقلت قطعة صغيرة من العزلات المنشطة على الوسط وحضنت في ٣٠ م ليوم ويومين وثلاثة أيام وستة أيام تم خلالها تقدير نسبة قطر تكوين الحامض/قطر النمو(سم) خلال مدد معينة من الحضانة. واتخذت هذه النسبة دليلاً أولياً على قابلية العزلات في إنتاج الحامض(السامرائي، ١٩٩٥).

تحضير اللقاح:

حضر لقاح من أبواغ العزلات قيد الدراسة بنقل عدد من قطع النمو من وسط العزل الي ٥٠ مل من الماء المقطر المعقم. تم تحريك القطع بهدف تفريغ الأبواغ ، مرور العالق عبر قمع معبأ بالقطن ومعقم سلفاً للتخلص من الهايفات. حُسب عدد الأبواغ في الراشح الذي تم استقباله في حاوية معقمة، وذلك باستعمال شريحة Hemocytometer. وخفف بالماء المقطر المعقم بحيث يحتوي ١ مللتر منه على $10^6 \times 5$ بوغ .

انتاج حامض الستريك:

أُعتمدت طريقتان لانتاج الحامض هما:

- طريقة الساند الصناعي: وفيها شبع ساند صناعي يتألف من قطعة إسفنجة بأبعاد ٢ سم \times ٨ سم بوسط جابك دو كس الخالي من الأكار والحاوي على السكروز [20]. لقت بلقاح العزلات قيد الاختبار وحضنت على ٣٠ م° ولمدة ٦ أيام. تم تقدير الحموضة الكلية بطريقة التسحيح. وحسبت كفاءة الإنتاج على أساس النسبة المئوية للحامض المتكون من السكريات الكلية في الوسط. اعتمدت هذه الطريقة في العزلة الثانوية للعزلات.
- طريقة تخمرات الحالة الصلبة: وفيها رطب ١٠ غم من المادة الأولية المتمثلة بأحد المخلفات الزراعية وبنسبة ١:١ من الماء وعقمت بالمؤصدة ولقت ب ١ مل من لقاح يحتوي على $10^6 \times 5$ بوغاً وذلك في دورق مخروطي بسعة ٢٥٠ مل. حضنت الدوارق في درجة ٣٠ م° لمدة ٦ أيام. استخلص الحامض من وسط التخمر ب ٥٠ مل من الماء المقطر ، ورشح عبر ورقة Whatman No. 1 ثم اخضع الراشح للتردد المركزي على قوة ٨٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٥ دقيقة للتخلص من الشوائب المحتملة. قدر حجم الراشح و رقمه الهيدروجيني وحموضته الكلية والسكريات المتبقية فيه، فضلا عن حامض الستريك وذلك بالطرائق المذكورة ادناه. اعتمدت هذه الطريقة عند تعيين الظروف المثلى لانتاج الحامض من العزلة الأكفا في الانتاج.

تعيين الظروف المثلى لإنتاج حامض الستريك من العفن *Aspergillus niger* A7 بأسلوب تخمرات الحالة الصلبة:

تم انتاج الحامض بالطريقة التي وردت اعلاه باستعمال مواد اشتملت على نخالة الحنطة وكسبة زهرة الشمس وسحالة الرز ومسحوق الذرة بعد تجفيف هذه المواد هوائياً ثم طحنها جيدا الى درجة تجانس الأجزاء تقريباً. اختير مسحوق الذرة لاكمال الدراسة عليها لافضليتها، وذلك تحت ظروف متباينة من نسبة الترطيب التي تراوحت ما بين ٠,٥ الى ١,٥ (ماء: مسحوق الذرة)، ودرجة الحرارة التي تراوحت ما بين ٢٠ الى ٤٠ م° ، وحجم اللقاح الذي تراوح بين $10^6 \times 5$ الى 10^8 بوغ/مل والرغم الهيدروجيني الابتدائي الذي تراوح من ٢ الى ٧. علما بان نتائج كل مرحلة من مراحل تعيين الظروف المثلى قد تم تسقيطها على المرحلة التالية وبالتسلسل المذكور. كما دُرس تأثير عدد من مصادر النتروجين في إنتاج الحامض وتحت الظروف المثلى التي تم التوصل إليها في التجارب السابقة واشتملت هذه المصادر على مستخلص الخميرة والبيتون و كلوريد الأمونيوم و نترات الأمونيوم إذ أضيفت الى محلول الترطيب وبتركيز ١%. كما درس تأثير تراكيز مختلفة من مستخلص الخميرة تراوحت من ٠,٥ الى ٢,٥ % بعد ان تبين انها افضل مصادر النتروجين في انتاج الحامض. واستعمل في هذه الدراسة كل من الكحول المثيلي والأثيلي (وبتركيز ٩٥%) كمادة محفزة للانتاج بإضافتهما الى وسط مسحوق الذرة بعد الترطيب والتعقيم وبمستويات هي ٠, ١, ٢, ٣, ٤, ٥ % من ماء الترطيب، وكلاً على حده.

طرائق التقدير :

تقدير الرقم الهيدروجيني: استعمل جهاز قياس الرقم الهيدروجيني pH-meter بعد ضبط الجهاز باستعمال نوعين من الدوائر أحدهما برقم هيدروجيني 4 والأخر برقم هيدروجيني 7 .

تقدير الحموضة الكلية:

قدرت الحموضة الكلية حسب طريقة [٢١] بتسحيح ٥ مل من راشح الانتاج مع هيدروكسيد الصوديوم بتركيز ٠,١ مولاري باستعمال دليل الفينو فتالين . وحسبت على اساس حامض الستريك.

تقدير حامض الستريك :

قدر حامض الستريك وفقاً لطريقة [٢2] ، إذ نقل ١ مل من راشح الانتاج الى أنبوبة اختبار ثم أضيف إليها ١,٣ مل من كاشف البريديين Pyridine ورجت الأنابيب بسرعة ثم أضيف إليها ٥,٧ مل من Acetic anhydrate ووضعت في حمام مائي على ٣٢ م° ولمدة ٣٥ دقيقة لغرض تطور اللون. أخذت قراءة الامتصاصية على طول موجي ٥٤٠ نانوميتر بواسطة جهاز المطياف الفوتومتري Spectrophotometer. واحتسبت كمية حامض الستريك المنتجة بالاستعانة بالمنحنى القياسي للعلاقة بين الامتصاصية وتراكيز متدرجة من حامض الستريك النقي.

تقدير السكريات الكلية والامتبقية بعد الانتاج:

قدرت السكريات الكلية في وسط الانتاج قبل انتاج الحامض، والامتبقية فيها بعد انتاجه بإتباع طريقة [23] وحسبت كمية السكريات المستهلكة بطرح الثاني من الاول.

$$\text{كفاءة التحول \%} = \frac{\text{حامض الستريك (غم/100 غم من الوسط)}}{100 \times \text{كمية السكريات المستهلكة (غم/100 غم من الوسط)}}$$

تشخيص حامض الستريك كما ونوعا باستعمال HPLC:

تم تقدير حامض الستريك المنتج من العفن *Aspergillus niger* A7 كما ونوعاً في عدد من العينات باستعمال جهاز High Performance Liquid Chromatography (HPLC). وحسب ظروف استخدام الجهاز في ادناه

ظروف استعمال جهاز HPLC

Column نوع العمود	HITACHI LaChrom C18-AQ (5µm) (4.6 mmI. D.×250 mm)
Elute محلول الغسل	1mmol/L H ₂ SO ₄ + 8 mmol/L Na ₂ SO ₄ (pH 2.8)
Flow rate معدل الجريان	1.0 mL/min
Column Temperature درجة حرارة العمود	25°C
Detection وحدة الامتصاصية	UV 210 nm
Injection vol. حجم الحقن	15 µL

النتائج والمناقشة

١- العزل والغربلة:

تم انتقاء ١٤ عزلة محلية من الأعفان من عينات من تربة أخذت من كلية الزراعة ومن الفواكه التالفة، على وسط آكار دكستروز البطاطا، وتم تنقية العزلات على الوسط نفسه وبعده نقلات. وروعي ابتداءً أن تكون هذه العزلات من النوع الذي ينطبق عليها الخواص المزرعية والمجهرية للعفن *Aspergillus niger* والمتمثلة بتكوين مستعمرات قطنية سوداء وتكوين هايفات تنتهي بخلايا قديمة من جهة، وبرؤوس كونيديا داكنة، تتوزع عليها أبواغ سوداء عارية متسلسلة، ذلك لتمييز هذا النوع من العفن على انتاج حامض الستريك. اخضعت هذه العزلات مع ثلاث عزلات مشخصة تم الحصول عليها من مختبر التقنية الحيوية، الى الغربلة الأولية لمعرفة قابليتها في انتاج حامض الستريك، بتنميتها على وسط آكار جابك دوكس الحاوي على السكروز مصدرا للكربون وكاشف أحمر المثيل وبدرجة حرارة ٣٠ م لمدة ٦ أيام. أتخذ تحول لون الوسط من الأصفر الى الأحمر جراء تغيير الحموضة دليلاً على تكون الحامض. قورنت كفاءة العزلات في انتاج الحامض بحساب النسبة بين قطر المنطقة الملونة الى قطر منطقة النمو خلال ٢ و ٣ و ٦ يوماً من التنمية. ويوضح الجدول (١) كفاءة العزلات، إذ تراوحت بين ٣,٢ - ٧,٦ سم. وتميزت ست عزلات من أصل ١٧ عزلة بأن أعطت نسبة إنتاج عالية بلغت ٥ سم أو أكثر. اختيرت هذه العزلات لاختبارها في مرحلة الغربلة الأولية الثانية باستعمال الوسط نفسه بعد استبدال السكروز بالكوكوز. فنتبين وكما هو موضح في الجدول (٢) أن ثلاث عزلات منها وهي A7, A8, A13 ذات انتاجية عالية من الحامض بدلالة نسبة قطر تكون الحامض الى قطر النمو بعد ١ و ٢ و ٦ أيام (الشكل: ١). وفي خطوة لاحقة أخضعت العزلات الثلاثة هذه، لخطوة إضافية من الغربلة للوقوف على أغزرها انتاجاً للحامض. أجريت هذه الخطوة

بطريقة تجمع بين تخمرات الحالة الصلبة والسائلة وباستعمال سائد صناعي تمثل بقطعة من الأسفنج. تم تقدير الحموضة الكلية بطريقة التسحيح. وحسبت كفاءة الانتاج على أساس النسبة المئوية للحمض المتكون من السكريات الكلية في الوسط. فوجد أن العزلة A7 كانت أكثر كفاءة الانتاج الحامض حيث بلغت 12,66 % بينما كانت كفاءة الانتاج للعزلة A8 والعزلة A13 قد بلغت 11,66 و 8,66 على التوالي. عليه وقع الاختيار على العزلة A7 لاكمال الدراسة عليها

تعيين الظروف المثلى لانتاج حامض الستريك من العفن *A. niger* A7 بأسلوب تخمرات الحالة الصلبة :

١- اختبار الوسط الأفضل لانتاج الحامض:

أستعمل عدد من المخلفات الزراعية والمتوفرة أثناء الدراسة وسطا صلبا لانتاج حامض الستريك تضمنت سحالة الرز ونخالة الحنطة وكسبة زهرة الشمس ومسحوق الذرة. ويلاحظ من الشكل (٢) أن العفن A7 قد أعطى أعلى إنتاجية للحامض بلغت 2,25 غم / 100 غم من وسط مسحوق الذرة و 1,08 غم / 100 غم من وسط نخالة الحنطة بينما أظهرت كسبة زهرة الشمس إنتاجية بلغت 0,37 غم / 100 غم أما إنتاجية الحامض من سحالة الرز فكانت واطنة للغاية إذ بلغت 0,19 غم / 100 غم من الوسط. ولكون إنتاجية الحامض باستعمال مسحوق الذرة وسطاً كانت أعلى من غيرها، عليه تم إعتماها في المراحل اللاحقة من هذه الدراسة. ويُعزى تباين إنتاج الحامض في الأوساط الصلبة المختلفة الى عدد من الأسباب أبرزها تباين مكونات الوسط من المواد العضوية واللاعضوية وتكوين معقدات ما بين المواد العضوية مع مكونات الوسط اللاعضوية من الأملاح والمعادن، فضلا عن الخواص الفيزيائية للمواد المستعملة في تخمرات الحالة الصلبة تأثيرات متباينة في انتاج المركبات الأيضية والانزيمات ، كحجوم الدقائق والمساحة السطحية ومسامية الوسط .

٢- نسبة الترطيب الأمثل لانتاج الحامض:

أجري الترطيب بتوزيع الكمية المطلوبة من الماء على سطح 10 غم من مسحوق الذرة في دوارق مخروطية توزيعاً متجانساً ما أمكن ذلك. جرت عملية انتاج الحامض في درجة حرارة حضان 30 م ولمدة ستة أيام . ويبين الشكل (3) أن أفضل نسبة ترطيب كانت عند 1:0,75 (ماء : وسط الانتاج) إذ بلغت إنتاجية الحامض 4,40 غم / 100 غم من الوسط بينما كانت 2,70 غم / 100 غم من الوسط عند نسبة ترطيب 1:1. كما لوحظ تدهور الإنتاجية عند زيادة نسبة ترطيب الى 1:1,25 إذ كانت 1,30 غم / 100 غم من الوسط. انخفضت الى 0,90 غم / 100 غم من الوسط عند نسبة الترطيب 1:1,5 . عليه عدت نسبة الترطيب 1:0,75 النسبة المثلى. إن محتوى الرطوبة يعد عاملا حرجا وحاسما في تخمرات الحالة الصلبة لأنه يؤثر على نمو الكائن وتخليق وإفراز المركبات الأيضية المختلفة التي يقوم بتخليقها. إن زيادة نسبة الترطيب عن المستويات المطلوبة قد تسبب انخفاضاً في الحصيللة لأنها تحُد من انتقال الأوكسجين أو تعيقه لانعدام الفراغات البينية بين أجزاء الوسط. كما ان انخفاض المحتوى الرطوبي يؤدي الى اختزال ذوبان المواد المغذية للمادة الخاضعة وانخفاض درجتي الانتفاخ والشد المائي العاليتين وبذلك فإن القيم المثلى للمحتوى الرطوبي تعتمد على كل من الكائن الحي المجهرى المنتج والوسط الصلب المستعمل [24] .

٣- درجة الحرارة المثلى للحامض:

يوضح الشكل (4) تأثير درجة الحرارة في إنتاج الحامض من العفن ويُلاحظ إنخفاض الإنتاجية بارتفاع درجة الحرارة مع تقارب الإنتاج عند درجتي الحرارة 20 و 25 م فقد كانت الإنتاجية للحامض 10,60 غم / 100 غم من الوسط عند 20 م . شهدت زيادة عند درجة الحرارة 25 م فبلغت 11,80 غم / 100 غم من الوسط ثم بدأت بالتدهور عند درجات الحرارة أعلى من 30 م. أن تأثير درجة الحرارة في إنتاج حامض الستريك من الأحياء المجهرية يرتبط بتأثيراتها الفسلجية لاسيما في فعالية الأنزيمات ومنها (citrate synthase) مما تتسبب في تراكم بعض المنتجات الأيضية الأخرى مثل حامض الاوكزاليك [25] . وتوصل [26] الى أن درجة الحرارة العالية (40 م) تجعل الأعفان تميل نحو إنتاج حامض الاوكزاليك بشكل يفوق حامض الستريك بكثير.

٤- حجم اللقاح الأمثل لانتاج الحامض:

يبين الشكل (5) نتائج إضافة اللقاح الى الوسط بحجوم مختلفة هي 10⁶ × 5، 10⁷ × 5، 10⁷ × 10⁸، 10⁷ × 10⁸ بوغ/مل. إذ يلاحظ ان انتاج الحامض يصل حدوده القصوى البالغ 12,30 غم / 100 غم من الوسط عند استعمال لقاح بحجم 10⁷ بوغ/مل . تتدهور الانتاجية بزيادة حجم اللقاح الى 10⁷ × 5 و 10⁸ بوغ/مل أو عند خفضه الى 10⁶ × 5 . في هذا الصدد ذكر [27] انه قد وجد حجم اللقاح الأمثل لانتاج حامض الستريك من العفن *Aspergillus niger* M-101 مع قليل من الكحول بطريقة المزارع المغمورة كان 10⁸ بوغ /مل.

٥- الرقم الهيدروجيني الأمثل لانتاج الحامض:

يلاحظ من الشكل (٦) زيادة قابلية العفن في انتاج الحامض مع زيادة الرقم الهيدروجيني الابتدائي، وبلغ حده الأقصى عند الرقم الهيدروجيني ٣ فكانت الإنتاجية ١٥,٣ غم/١٠٠ غم من وسط مسحوق الذرة، بدأت بالانخفاض تدريجياً مع ارتفاع الرقم الهيدروجيني الى ٤ أو أكثر. وعليه تم اعتماد الرقم الهيدروجيني ٣ كأفضل رقم لإنتاج الحامض في المراحل اللاحقة. بيد أن [28] وجد أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج حامض الستريك هو ٥ باستعمال المولاس وإضافة ١% سكرورز وبطريقة تخمرات الحالة الصلبة. بينما وجد [٢٩] إن أفضل رقم هيدروجيني لإنتاج حامض الستريك من مخلفات العنب باستعمال تخمرات الحالة الصلبة أيضاً وبوساطة عزلة محلية من العفن *Aspergillus niger* هو ٦,٥.

٦-المصدر النتروجيني الأمثل في انتاج الحامض:

لا بد من الإشارة أن النتروجين جزء أساسي ومؤثر في انتاج حامض الستريك ليس لكونه مهماً لنمو العفن فحسب وإنما في عمليات الأيض الأولي والثانوي. ويعد مستخلص الخميرة، مصدراً لعدد من الفيتامينات الى جانب كونه مصدراً للنيتروجين. ولعل هذا هو السبب الذي ساهم في أن يكون تأثيره في انتاج الحامض أكثر من غيره من المصادر النتروجينية الأخرى التي استعملت في هذه الدراسة. يوضح الشكل (٧) تأثير عدد من مصادر النتروجين التي استعملت لتدعيم الوسط في انتاج حامض الستريك واشتملت على مصادر منها ماهي عضوية وأخرى لاعضوية وهي كلوريد الأمونيوم ونترات الأمونيوم والبيبتون ومستخلص الخميرة وبتركيز ١%. ويتبين من الشكل أن مستخلص الخميرة كان له التأثير الأكبر في انتاجية الحامض، فكانت ١٦,٤٠ غم/١٠٠ غم من وسط مسحوق الذرة، بينما كانت الإنتاجية ١٤,٤٠ غم/١٠٠ غم من الوسط عند استعمال البيبتون و ١٠,٠٠ غم/١٠٠ غم و ٦,٥ غم/١٠٠ غم من الوسط بإضافة نترات الأمونيوم وكلوريد الأمونيوم للوسط وعلى التوالي. ويذكر في هذا الصدد أن [28] قد وجد أن انتاجية الحامض على وسط السكرورز كانت أعلى بتدعيمه بنترات الأمونيوم مقارنة مع مستخلص الخميرة والبيبتون. وفي تجربة مكمل جرت محاولة تحديد التركيز الأفضل من مصدر النتروجين الأمثل وهو مستخلص الخميرة وذلك بإضافته الى وسط الإنتاج بمستويات تراوحت من ٠,٥ الى ٢,٥ وبفارق ٠,٥% ما بين المعاملات. ويوضح الشكل (٨) أن أفضل انتاج للحامض قد تحقق عند استعمال ١%، كما في التجربة السابقة، حيث شهد إنتاج الحامض بالإنحراف عن هذه النسبة زيادة أو نقصاناً، فقد شهد تدهوراً واضحاً إذ بلغ ١١,٤٠ غم/١٠٠ غم من الوسط عند المستوى ١,٥% وبلغ ١٠,١٠ غم/١٠٠ غم عند المستوى ٠,٥%.

٧-مدة الحضانة المثلى (زمن الانتاج الأمثل) لإنتاج الحامض:

يوضح الجدول (٣) تأثير مدة الحضانة في انتاج الحامض. تم متابعة جميع المتغيرات الحاصلة في الوسط خلال مدة الحضانة، متابعة يومية، من الرقم الهيدروجيني و الحموضة الكلية وحامض الستريك والسكريات المستهلكة. ويلاحظ من الشكل زيادة الانتاجية مع الزمن وبلغها حدها الأقصى في نهاية اليوم الثالث إذ بلغت ٢٠,٨٠ غم/١٠٠ غم من وسط مسحوق الذرة إذا ما قورنت بنهاية اليوم الأول إذ كانت ٥,١٠ غم/١٠٠ غم من الوسط. ثم أخذت الانتاجية بالانخفاض فبلغت ١٧,٥٠ و ١٦,٧٠ و ١٦,١٠ غم/١٠٠ غم من الوسط بعد اليوم الرابع والخامس والسادس وعلى التوالي. ويلاحظ من الجدول أيضاً أن كفاءة تحويل السكريات الموجودة في الوسط الى حامض الستريك في ضوء هذه النتائج قد بلغت هي الأخرى حدها الأقصى في نهاية اليوم الثالث أيضاً، وكانت ٥١,٨٥%، مما يعني أن ما يقارب من ٥٢% من السكريات الكلية الموجودة في الوسط والبالغة ٧٣,٨٤% قد تم تحويلها الى حامض الستريك وما تبقى قد استغلّت من قبل العفن في انتاج الطاقة وتكوين الكتلة الحيوية. ومع هذا فإن كمية السكريات التي بقيت في الوسط دون استغلال كانت ٣٠,١١ غم/١٠٠ غم من الوسط في نهاية اليوم السادس. ومن الأسباب الرئيسة في إنخفاض إنتاجية الحامض بعد مدة من وصولها حدودها القصوى هو تراكم النواتج الثانوية والوسطية لعمليات الأيض الهدمي Catabolites، وفي المقدمة منها حامض الستريك، وظهور التأثير الكابح لهذه النواتج في فعالية المركبات المشاركة في العمليات الأيضية. غير أن [٣٠] أشاروا إلى أن أفضل مدة لإنتاج الحامض في ظروف التجارب التي قاموا بها كانت خمسة أيام.

٨-تأثير الكحول المثيلي والاثيلي في إنتاج الحامض:

درس تأثير خمسة مستويات من الكحول المثيلي ومثله من الكحول الأثيلي في إنتاج الحامض في الظروف المثلى التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة. ويلاحظ من الشكل (١٠) زيادة الإنتاجية عند إضافة ١% من الكحول المثيلي (حجم/حجم) إذ كانت ٢٠,٨٠ غم/١٠٠ غم من الوسط و ارتفعت بزيادة نسبتها الى ٢% وبلغت قيمتها القصوى عند ٣% الى ٢٣,٠٠ غم/١٠٠ غم من الوسط، ثم أخذت بالانخفاض والتدهور حتى وصلت الى ١٦,٨٠ غم/١٠٠ غم من الوسط وذلك عند نسبة الكحول المضافة ٥%. ويعزى التأثير السلبي للكحول المثيلي في الانتاج في التراكيز العالية، أنه ربما يحدث من نمو المايسيليوم ويؤخر تكوين السبورات، أما سبب الزيادة في الانتاج في التراكيز الواطئة فيعود الى دور الميثانول في تكييف المايسيليوم إذ يزيد من نفاذية الجدار الخلوي دون أن يضعف أيضاً العفن وبذلك يسمح للخلية بإفراز السبورات وتستجيب الخلية لهذا الوضع عن طريق زيادة انتاجها من السبورات من أجل أن تحافظ على مستوى كافٍ منها في داخلها [٥]. بيد أن [31] لاحظ أن إضافة الكحول المثيلي الى الوسط وبأي مستوى كان، يؤدي الى تدهور انتاج الحامض، مشيراً أنه ليس من

الضرورة أن يكون تأثيره في الانتاج إيجابيا مع جميع عزلات أو سلالات العفن *Aspergillus niger*. بينما انتاج الحامض يزداد بزيادة تركيز الكحول الايثيلي المضاف وصولا الى 3% حيث بلغ الانتاج 21,60 غم/100 غم من الوسط ثم بدأ الإنتاج بالتدهور تدريجيا حيث انخفض الى 14,70 غم/100 غم من الوسط نفسه عند التركيز 5%. وبمقارنة هذه النتائج مع تلك الخاصة بالميثانول يمكن القول أن تأثير الأخير كان أفضل من تأثير الإيثانول وبين [32]. أن إضافة الميثانول بتركيز 25 مل/100 غم الوسط قد حققت زيادة في إنتاج الحامض بلغ 45,85 غم/100 غم الوسط مقابل 40,65 غم/100 غم الوسط جراء إضافة الكمية نفسها من الإيثانول.

تشخيص حامض الستريك كما ونوعاً باستعمال HPLC:

تم تشخيص حامض الستريك في العينات التي تم انتاجها بعد 3 و 5 و 6 أيام من الحضانة في الظروف المثلى، كما ونوعا وبالإستعانة بالمحاليل القياسية ، وذلك باستخدام جهاز HPLC . ويبين الشكل (10) أن قمة حامض الستريك القياسي يظهر في زمن إحتجاز مقداره 8,40 دقيقة وبمساحة بلغت 94,58 % من مجمل المساحة الكلية لمختلف القمم للمحلول القياسي الذي حقن في الجهاز بمقدار 15 مايكروليتر. أما عينات الحامض المنتجة بعد 3 و 5 و 6 أيام من الحضانة فكان زمن إحتجازها مطابقا الى حد بعيد لزمن إحتجاز حامض الستريك القياسي، وهي 8,417 و 8,296 و 8,447 دقيقة (الجدول: 4)، شغلت مساحة بلغت نسبتها من مجمل مساحة القمم 25,621 % و 19,191 % و 11,063 % وعلى التوالي. مما يعني أن العينات تتضمن هذا الحامض. قدرت كمية حامض الستريك في العينات مع الأخذ بنظر الإعتبار حجم مستخلصات الحامض وعدد مرات التخفيف قبل الحقن في الجهاز، فكانت 13,54 و 10,15 و 5,85 غم / 100 غم من الوسط بعد 3 و 5 و 6 أيام من الحضانة في الظروف المثالية للانتاج التي تم تحديدها في هذه الدراسة . ويلاحظ أن هذه القيم أقل من تلك التي قدرت بالطريقة الكيميائية باستعمال البريديين وهي 20,80 و 16,70 و 16,10 (الجدول: 3) وإن ثمة مركب آخر يرافق انتاج الحامض بكمية توازي أحيانا كمية حامض الستريك وفي مدة الإحتجاز 3,3 تقريبا (الشكل: 11) لم يتم التعرف عليه أو تشخيصه ، قد يكون أحد الحوامض العضوية لدورة كريبس، والذي يحتمل أنه يتداخل مع حامض الستريك عند تقديره بطريقة البريديين. وبناءً على نتائج تقدير حامض الستريك بطريقة HPLC يمكن القول ان الانتاجية الفعلية للحامض من العزلة قيد الدراسة تبلغ 13,54 غم / 100 غم من الوسط وليس تلك التي احتسبت على أساس طريقة البريديين وهي 20,80 غم / 100 غم من الوسط.

المصادر

- 1-Abou-Zeid, A.; and Mohamed, (1984). Production of citric acid : A review Agricultural wastes ., 9:51-76
- 2-Kana, E. B. G. ; Oloke J. K. , Lateef A. and Oyebanji A. ,(2012). Comparative evaluation of artificial neural network coupled genetic algorithm and respons surface methodology for modeling and optimization of citric acid Production by *Aspergillus niger* MCBN297.Chem Eng. Transac., 27:397-402.
- 3-Rodrigues, C. ;Vandenbergh L. P. S., Sturm W., Dergint,D. E. A. Spier,M.R. Carvaalho J.C.D. and Soccol,C. R. ,(2013).Effect of forced aeria on citric acid production by *Aspergillus sp.* Mutants in SSF. World. J. Micro. Biotech.,
- 4-Kirimura , K. ;Yoda, M. ; Kumatani, M. ; Ishii, Y. ; Kion, K. and Usami, S. (2002). Cloning and expression of *Aspergillus niger* icd A gen encoding mitocondria NADP+-specific Isocitrate Dehydrogenase J.Biosci. and Bioeng. 93: 136-144.
- 5-العاني ، فائز عزيز.(1993).التكنولوجيا الحيوية .دار الكتب للطباعة والنشر- جامعة الموصل.
- 6-Adham, N. Z. ; (2002). Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses medium. Bioresource Technology. 84(1) : 97 – 100 .
- 7-Baei, M.S. ; Mahmoud, M. & Yunesi, H. A. (2008) Kinetic model for citric acid production from apple pomace by *Aspergillus niger*. *Afr J Biotechnol*, 7(19), . 3487-3489.

- 8-Wasay, S.A. ; Barrington S. ; and Tokunaga.S. (2001). Organic acids for the in situ remediation of soils polluted by heavy metals: Solid flushing in columns. Water, Air, and Soil Pollution.127(1-4):301-314.
- 9-Majumder, L. ; khalil, I. Munshi,M.K. Alam,K. Harun- Rashid, Begum R. and N. Alam, (2010). Citric acid Production by *Aspergillus niger* using molasses and pumpkin as substrates. Eur. J. Biol. Sci., 2 : 01 – 08.
- 10-Amenaghawon, N.A. &Aisien, F.A. (2012). Modeling and Simulation of citric acid production from Corn Starch Hydrolysate Using *Aspergillus niger*. Res, 2(1), 73-85
- 11-Aysegul, P. ; and Christian P. K. (2003). Effects of Sucrose Concentration during Citric acid Accumulation by *Aspergillus niger* . Turk. J. Chem. 27:581-590.
- 12-Imandi, S. B. ; Bandarru,V. V. R. ; Somalanka S. R. and Garapati, H. R. (2007). Optimization of medium composition of citric acid from by product glycerol using Dehler experimental design . Enzyme. Microbial, Technol.1,40:13667-1372.
- 13-Munshi, M., Hossain F. ; H uque, R. . Rahman, Khatun. A.; Islam M. and M. I. Khalil, (2013) Effect of biomass and sugar on citric acid production by *Aspergillus niger* using molasses and jackfruit as substares. Am. J. Food Nutr.,1:1-6.
- 14- Mazutti , M., ;Bender , J.P. ;Treichel, H. and Luccio , M.D. (2006). Optimization of inulinase production by solid state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. Enzyme and microbial Technology, 39 : 56-59.
- 15-Mazaheri, M.A., and Nikkhah, M.(2002). Production of citric acid from date pulp by solid state fermentation. J. Agric Sci. Techno.
- 16-Kareem, S. O.; Akpan, I. and Alebiowu, O. O. (2010) Production of citric acid by *Aspergillus niger* using pineapple waste. Malaysian Journal of Microbiology. 6(2), 161-165
- 17-Imandi, S.B.; Bandaru, V.V.R.; Somalanka, S.R.; Bandaru, S.R. &Garapati, H. R. (2008) Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple wastes. Bioresource Technol, 99(10), pp 4445-4450.
- 18-Pazouki, M., Feles,P.A. Sinha J. and . Panda T,(2000). Comparative studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose. Bioprocess Eng., 22:353-361
- ١٩-Aspergillus السامرائي، سوسن مصطفى عبد الرحمن. (١٩٩٥). إنتاج حامض الستريك من النشا بواسطة الفطر *niger*. رسالة ماجستير. كلية الزراعة – جامعة بغداد.
- ٢٠-محي الدين، محمد عمر، رقيباء على جيجان ومصطفى محمد (٢٠١٣) استخدام ساند صناعي بدلاً من المخلفات الزراعية في إنتاج الأنزيمات بطريقة تخمرات الحالة الصلبة. براءة اختراع برقم ٣٩٢٣. وزارة التخطيط / الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية.
- 21-Pearson, D. (1973).The chemical anylases of food. 6th Ed. Chemical publishing Co., Inc., London.
- 22-Marier, J. R. and Boulet, M.(1958).Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine –acetic anhydrate method .
- 23-Whitaker, J. R. and Bernhard, R. A. (1972). Experiments for An Introduction to Enzymology. The Whiber press, Davis
- 24-Perez-Guerra, N.; Torrado-Agrasar, A.; Lopez-Marcias, C. and Pastrana , L.(2001). Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. Website: copyright 2001 electronic J. of Environ. Agri. And Food Chem.

- 25-Arzumanov, T .E.; Shishkanova, N. V. and Finogenova, T. V. (2000) Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol J. Appl. Microbial and Biotechnol.53:525-529.
- 26-Haq , I., Ali , S.; Qadeer , M. A. and Iqbal , J. (2002) . Citric acid fermentation by mutant strain of *Aspergillus niger* GCMC-7 using molasses based medium . Elect. J. Biotechnol. 5 ; 125- 132.
- 27-Nadeem, A.; Syed, Q., Baig, S., Irfan, M. and Nadeem, M. (2010) Enhanced production of citric acid by *Aspergillus niger* M-101 using lower alcohols. Turkish . J. Biochem. 35(1):7-13.
- 28-Vasanthabharathi,V. N. Sajitha, N. and Jayalakshmi, S. ,(2013). Citric acid production from U-V Mutated Estuarine *Aspergillus niger* .Advances in Biological Research 7(3):89-94
- سليمان (٢٠٠٦) إنتاج حامض الستريك من مخلفات العنب بدوي ، امين و محمد تلج، كركز محمد و ، احمد ٢٩-علي ، 11 -مجلد الصرفة، للعلوم تكريت . مجلة *Aspergillus niger* باستخدام تخمرات الحالة الصلبة بواسطة الفطر ، 1 عدد
- 30-Shojaosadati, A. A. and Babaeipour, V. (2002) Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid state bioreactor. J. Process Biochem. 37: 909-914
- 31-Kuforiji, o; Kuboye, A. O. and Odunfa, S. A. (2010) Orange and pineapple wastes as potential substrates for citric acid production International journal of Plant Biology 1, 1
- 32-Ashraf, H. ; Rehman, A. and Haq ,I. (2004) Effect of alcohols on the production of citric acid by *Aspergillus niger*.using solid state fermentation .J. food Technol. 2:1-4.

جدول رقم (1). المرحلة الأولى من الغربلة الأولية لتحديد قابلية العزلات في انتاج الحامض في وسط Czapek Dox agar الحاوي على السكروز والمثيل الأحمر بدلالة نسبة قطر تكون الحامض الى قطر النمو

العزلات	مصدر العزلات	نسبة قطر تكون الحامض/قطر النمو(سم)لمدد مختلفة من الحضانة		
		يومان	ثلاثة أيام	سنة أيام
1A	التربة	4	4,2	4,2
2A	التربة	3,8	4	4,2
3A	التربة	4,3	4,9	5,7
4A	التربة	3,2	3,6	3,6
5A	التربة	3	3,2	3,2
6A	الفاكهة	4	4,2	4,5
7A	الفاكهة	5,3	5,9	7,6
8A	الفاكهة	4,5	4,5	5,5
9A	الفاكهة	3,3	3,7	4,5
10A	الفاكهة	4,5	5,5	6,2
11A	الفاكهة	4,1	4,4	4,9
12A	الفاكهة	3,6	4,3	4,6
13A	الفاكهة	5,2	5,5	7,1
14A	الفاكهة	2,3	3,7	4,6
15A	عزلة من مختبر التقنية	4,3	4,5	5,5
16A	عزلة من مختبر التقنية	3,0	3,2	3,3
17A	عزلة من مختبر التقنية	3,2	4,2	4,3

جدول رقم (2). المرحلة الثانية من الغربلة الأولية لتحديد قابلية العزلات في انتاج الحامض في وسط Czapek Dox agar الحاوي الكلوكوز والمثيل الأحمر بدلالة نسبة قطر تكون الحامض الى قطر النمو

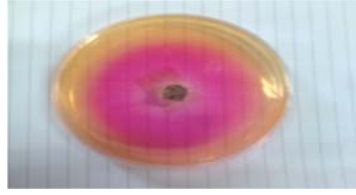
العزلات	مصدر العزلات	نسبة قطر تكوين الحامض/قطر النمو(سم)بعد الحضانة لمدة		
		يوم	يومان	سنة أيام
3A	التربة	4,1	4,3	5,9
7A	الفاكهة	4,7	5,5	7,2
8A	الفاكهة	5,1	5,6	6,3
10A	الفاكهة	5,0	5,2	5,6
13A	الفاكهة	4,7	5,3	6,7
15A	عزلة من مختبر التقنية	4,2	4,2	5,2

جدول رقم (3). إنتاج حامض الستريك من العفن *Aspergillus niger* A7 باستعمال مسحوق الذرة بطريقة تخمرات الحالة الصلبة المرطبة بنسبة ١:٠,٧٥ وبرقم هيدروجيني ابتدائي ٣ خلال المراحل المختلفة من الحضان لمدة ٦ أيام في درجة حرارة ٢٥ م^٠ وبحجم لقاح مقداره ١٠^٧ بوغ/مل

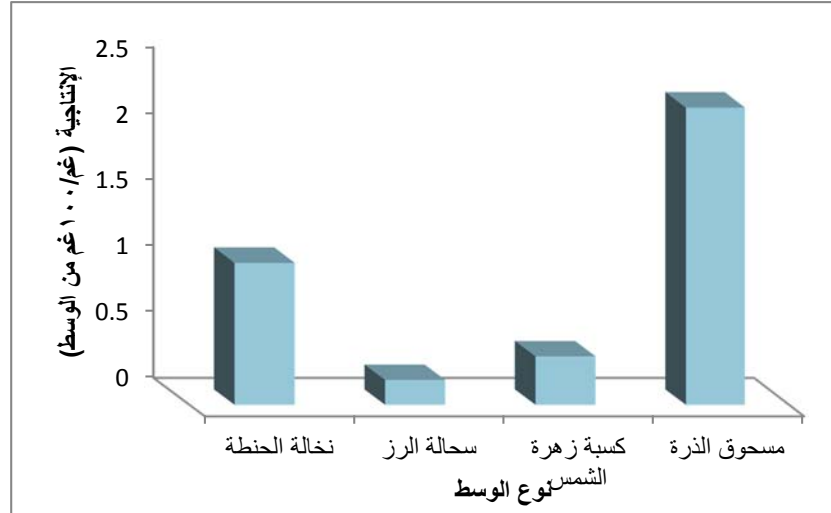
مدة الحضان بالأيام	الحموضة الكلية (غم/١٠٠ من الوسط)	حامض الستريك (غم/١٠٠ من الوسط)	السكريات الكلية المتبقية بعد الانتاج (غم/١٠٠ من الوسط)	السكريات المستهلكة (غم/١٠٠ من الوسط)	كفاءة التحويل* (%)
صفر	-	-	٧٣,٨٤	-	-
١	٥,٥٥	٥,٠٥	٥١,٢٣	٢٢,٦١	٢٢,٣٣
٢	١١,٦٠	٩,٧٥	٤٢,٣٠	٣١,٥٤	٣٠,٩١
٣	٢٣,٠٥	٢٠,٨٠	٣٣,٧٣	٤٠,١١	٥١,٨٥
٤	١٩,٣٠	١٧,٤٥	٣٣,٠٦	٤٠,٧٨	٤٢,٧٩
٥	١٨,٥٠	١٦,٧٠	٣٢,٨٤	٤١,٠٠	٤٠,٧٣
٦	١٧,٧٥	١٦,٠٥	٣٠,١١	٤٣,٧٣	٣٦,٧٠

جدول رقم (4). إنتاج حامض الستريك من العفن *A.niger* A7 باستعمال مسحوق الذرة بطريقة تخمرات الحالة الصلبة تحت الظروف القياسية بطريقة HPLC

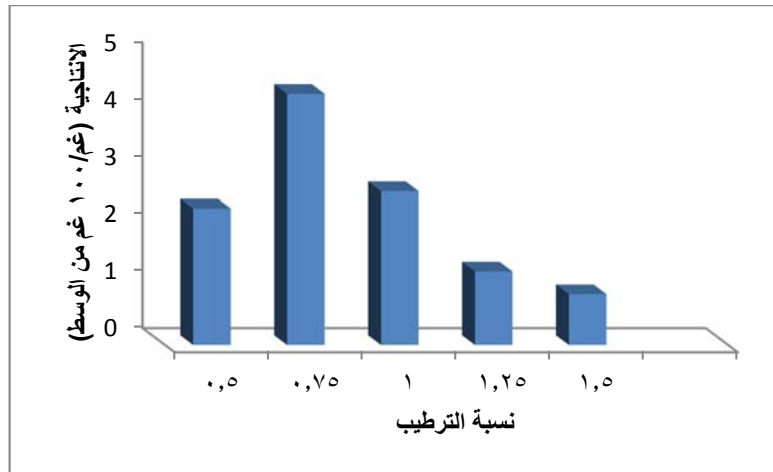
نوع العينة	رقم القمة	زمن الإحتجاز (دقيقة)	مساحة القمة من مجموع القمم (%)	عدد مرات التخفيف قبل الحقن في الجهاز	حامض الستريك (غم/١٠٠ من الوسط)
حامض الستريك القياسي (غم/١٠٠ مل)	٦	٨,٤٠	٩٤,٥٨	-	-
الانتاج بعد ٣ أيام من الحضان في الظروف المثلى	١٧	٨,٤١	٢٥,٦٢	١٠	١٣,٥٤
الانتاج بعد ٥ أيام من الحضان في الظروف المثلى	١٩	٨,٢٩	١٩,١٩	١٠	١٠,١٥
الانتاج بعد ٦ أيام من الحضان في الظروف المثلى	٢٠	٨,٤٤	١١,٠٦	١٠	٥,٨٥



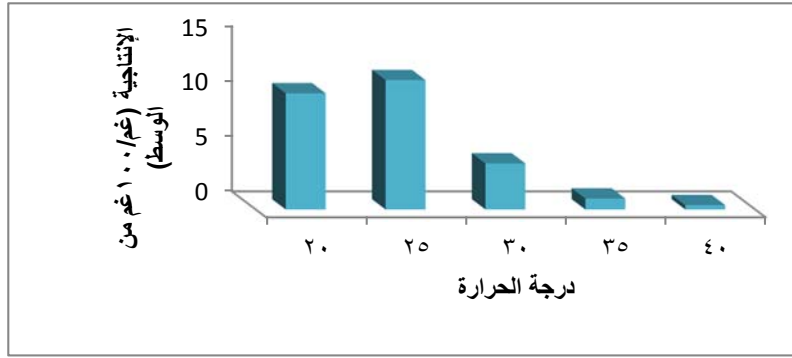
شكل رقم (1). قابلية العزلة A7 في انتاج حامض الستريك بدلالة تغيير لون المنطقة المحيطة بالنمو على الوسط
Czapek Dox الحاوي على الميثيل الأحمر



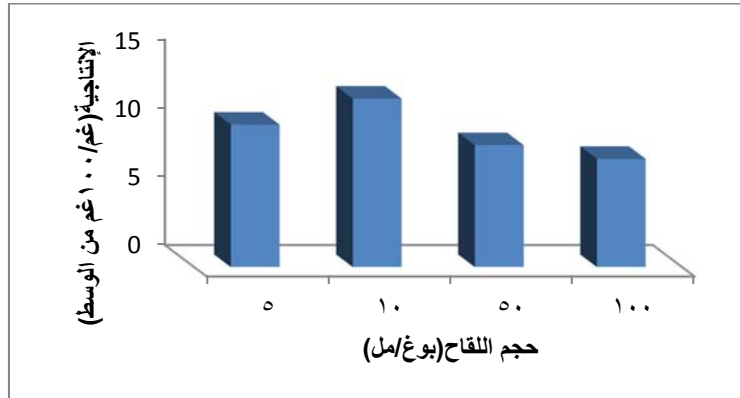
شكل رقم (2). إنتاجية حامض الستريك من العفن *Aspergillus niger* A7 على أوساط مختلفة بطريقة تخمرات الحالة الصلبة المرطبة بنسبة 1:1 وبلقاح حجمه $10^6 \times 5$ بوغاً/مل في درجة الحرارة 30م ولمدة 6 أيام



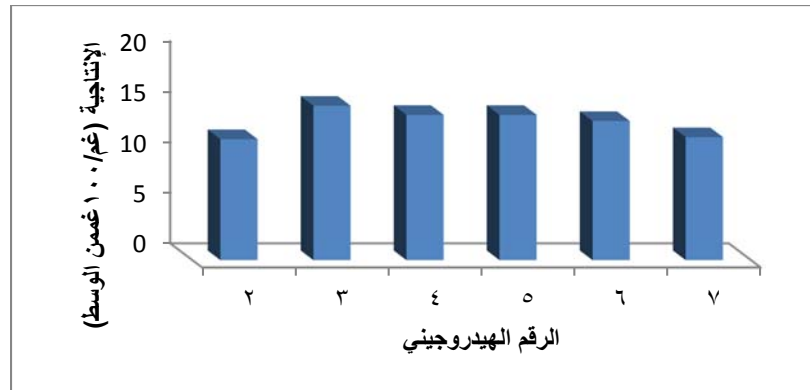
شكل رقم (3). تأثير نسبة الترطيب في انتاج حامض الستريك من العزلة *Aspergillus niger* A7 باستعمال مسحوق الذرة وسطاً لتخميرات الحالة الصلبة وبلقاح حجمه $10^6 \times 5$ بوغاً/مل في درجة الحرارة 30م ولمدة 6 أيام وبرقم هيدروجيني 7



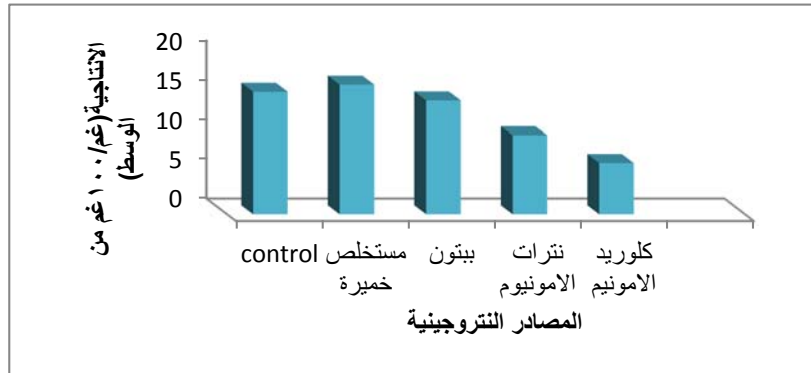
شكل رقم (4). تأثير درجة الحرارة في إنتاج حامض الستريك من العزلة *Aspergillus niger* A7 باستعمال مسحوق الذرة المرطبة بنسبة 1:0.75 وسطاً وبحجم لقاح $10^6 \times 5$ بوغ/مل ورقم هيدروجيني 7 للإنتاج بطريقة تخمرات الحالة الصلبة ولمدة 6 أيام



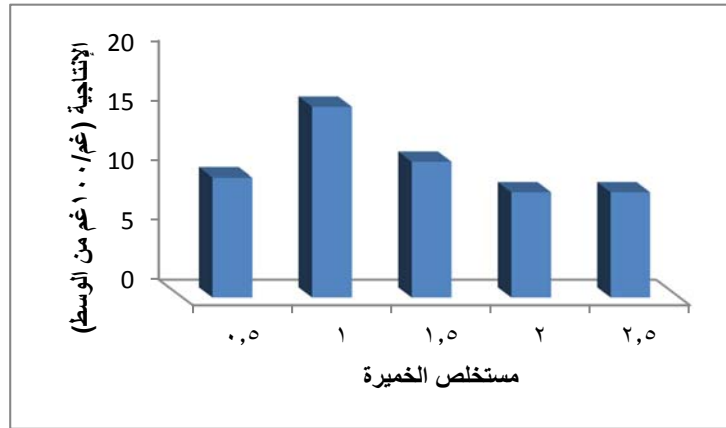
شكل رقم (5). تأثير حجم اللقاح في إنتاج حامض الستريك من العزلة *Aspergillus niger* A7 باستعمال مسحوق الذرة المرطبة بنسبة 1:0.75 وسطاً للإنتاج بطريقة تخمرات الحالة الصلبة بدرجة 25 م° ورقم هيدروجيني 7 ولمدة 6 أيام (حجم اللقاح المذكور $10^6 \times 1$)



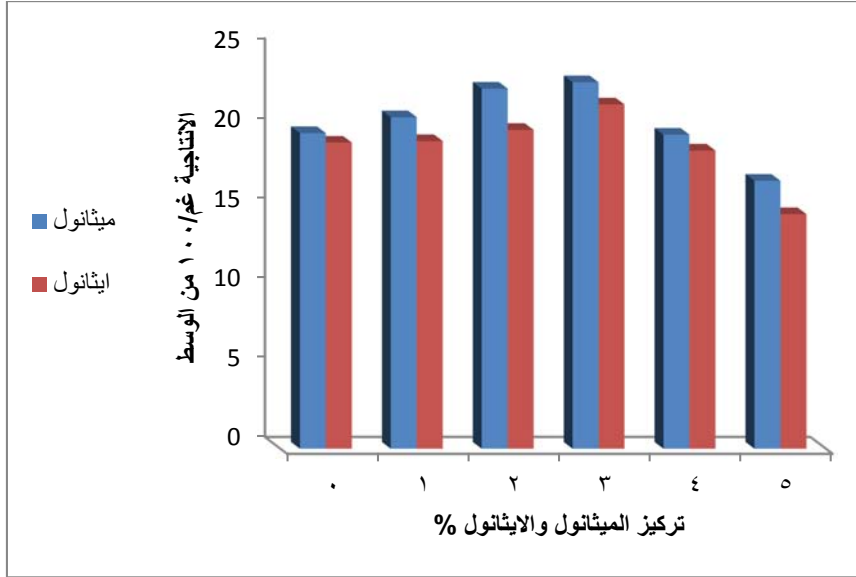
شكل رقم (6). تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج حامض الستريك من العفن *Aspergillus niger* A7 باستعمال مسحوق الذرة المرطبة بنسبة 1:0.75 وسطاً للإنتاج ولقاح حجمه 10^7 بوغ/مل بطريقة تخمرات الحالة الصلبة في درجة الحرارة 25 م° ولمدة 6 أيام



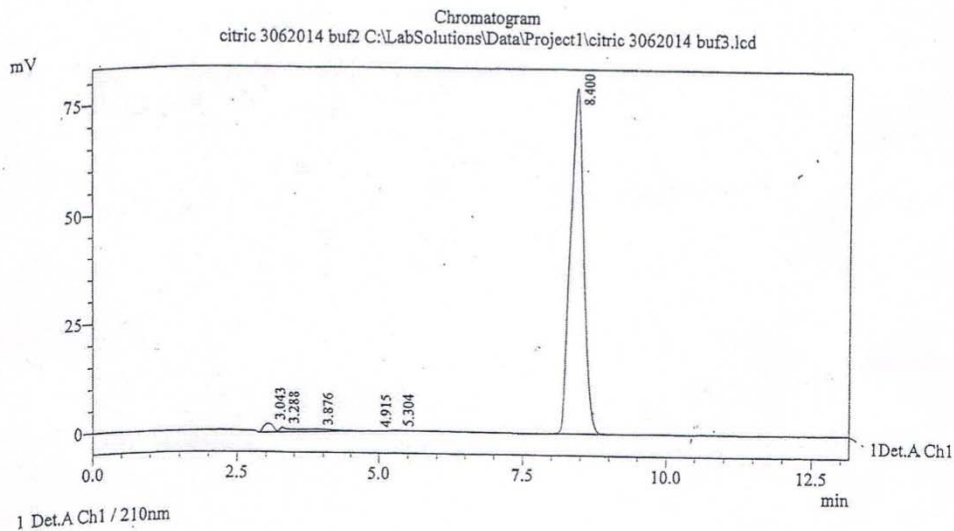
شكل رقم (٧). تأثير مصادر النتروجين في إنتاج حامض الستريك من العفن *Aspergillus niger* A7 باستعمال مسحوق الذرة المرطبة بنسبة ١:٠,٧٥ والملقحة بلفاح حجمه ١٠^٧ بوغ/مل وسطاً للإنتاج بطريقة تخمرات الحالة الصلبة برقم هيدروجيني ٣ في درجة الحرارة ٢٥م ولمدة ٦ أيام



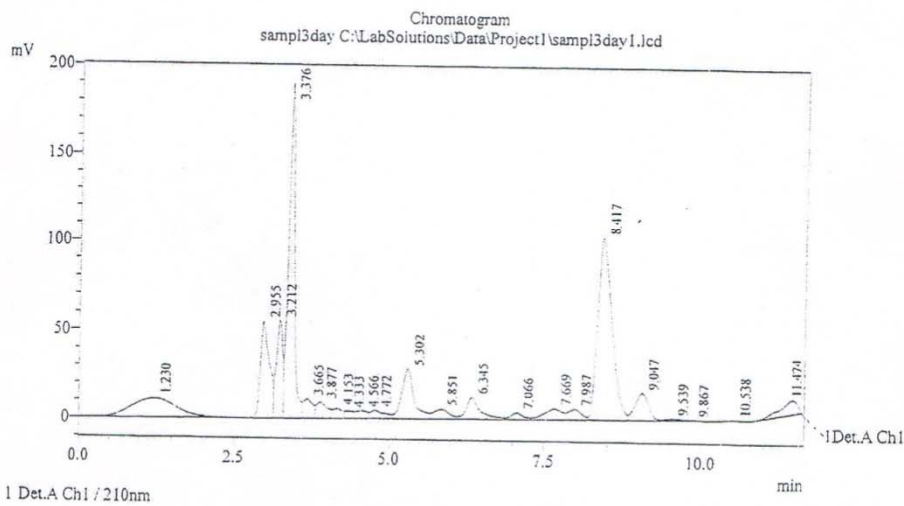
شكل رقم (٨). تأثير تركيز مختلفة من مستخلص الخميرة في إنتاج حامض الستريك من العفن *Aspergillus niger* A7 باستعمال مسحوق الذرة المرطبة بنسبة ١:٠,٧٥ وسطاً للإنتاج بطريقة تخمرات الحالة الصلبة برقم هيدروجيني ٣ والملقح بلفاح بحجم قدره ١٠^٧ بوغ/مل في درجة ٢٥م ولمدة ٦ أيام



شكل رقم (9). تأثير الكحول الميثيلي والاثيلي في انتاج حامض الستريك من العفن *Aspergillus niger* A7 بطريقة تخمرات الحالة الصلبة باستعمال مسحوق الذرة المرطبة بنسبة 1:0.75 ورقم هيدروجيني ابتدائي 3 وبلقاح حجمه 10⁷ بوغ/مل خلال مدة 3 أيام من الحضن على درجة حرارة 25م.



شكل رقم (10) منحنى تقدير حامض الستريك القياسي بطريقة HPLC



شكل رقم (11) منحنى تقدير حامض الستريك المنتج بعد 3 أيام في الظروف المثلى بطريقة HPLC

Optimization of Citric acid production from Locally isolate fungus *Aspergillus niger* by solid state fermentation

Mohammed O. Mohi-Aldin

Dept.Science of Food/ College Agriculture/ University of Baghdad

Aiden M. Hussain

Dept. of Biology/ College of Education for Pure Science(Ibn Alhatham)
/ University of Baghdad

Received in: 18/ December/2014 , Accepted in: 25/February /2015

Abstract

This study aimed to obtain an isolate of a mold that has well characteristic for production of citric acid from raw materials available locally by solid-state fermentation and determination of the optimum conditions for production .Fourteen mold isolates producing acid were obtained from different sources, involved decayed fruits and soils. These isolates were subjected to initial qualitative screening followed by secondary quantitative screening In secondary screening a method combined between the submerged fermentation and solid-state fermentation was followed using a piece of sponge saturated by nutrients required for growth and production of acid. It was found that the isolate of A7 was the highest producer for citric acid than any other isolates including three standard isolates obtained from the Laboratory of Biotechnology/ College of Agriculture. Morphological analysis under the light microscope and cultural characteristics on solid media showed that the isolate A7 belongs to *Aspergillus niger*. Different raw materials were used for the production of citric acid from this isolate by solid-state fermentation included sunflower waste, wheat bran, rice bran as well as ground corn. It was found that the latter was better than others,therefore it was used for optimization of production conditions of the acid. The optimum conditions were achieved on ground corn moistened with water at a ratio 1:0.75 with an initial pH 3 inoculated with 10^7 spores/ml during an incubation time of 3 days at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.The productivity of citric acid under these conditions was 20.8 gm/100 gm of the media. Supporting the media with 1% of yeast extract and adding 3% of methanol to moisten solution was found to increase the productivity to 23.0 g /100 g, while the effect of ethanol was limited. Citric acid produced in this study was detected quantitatively and qualitatively by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and it was found that the amount of citric acid produced after three days of incubation under optimum production conditions was 13.54 gm/ 100 gm of media. This value was less than that estimated by the chemical method using pyridine. It was also noted that, beside citric acid, there was another compound produced in visible quantity. Although this compound was not recognized in this study, it is thought to be any of organic acids of Kreb's cycle and this compound may be interact with citric acid when determined by pyridine. According to results of determination of citric acid by HPLC it can be said that the actual production of citric acid was as mentioned above (13.54 gm/ 100 gm) but not as estimated by the chemical method using pyridine

Keyword: Solid state fermentation , Citric acid, *Aspergillus niger*