

بررسی تأثیر غلظت گلوکز و سیترات بر تولید اسید سیتریک توسط یاروویا لیپولیتیکا (*Yarrowia lipolytica*)

تقی زاده مسعود*، موسوی نژاد گلاره**

دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی
تلفن: ۰۵۱-۸۷۹۶۶۱۸، دورنگار: ۰۵۱-۸۷۸۷۴۳۰، پست الکترونیک: masoud.tgh@gmail.com

چکیده

در چند سال اخیر، مطالعات زیادی در زمینه تولید اسید سیتریک با استفاده از فرآیندهای تخمیری و به کارگیری سویه های قارچی مختلف و همچنین بهینه سازی شرایط تولید در جهت دستیابی به بهره‌وری بالاتر صورت گرفته است. اگرچه تولید اسید سیتریک در صنعت با استفاده از نژادهای خاصی از قارچ اسپیرزیلوس نایجر در محیط ملاس، شربت گلوکز یا ساکارز صورت می‌گیرد، در این پژوهش از نژاد یاروویا لیپولیتیکا استفاده گردید و تأثیر شرایط مختلف محیط رشد بر تولید اسید سیتریک مورد بررسی قرار گرفته است. پارامترهای مورد اندازه‌گیری عبارتند از: میزان گلوکز باقیمانده، راندمان تولید اسید سیتریک تا زمان تولید اسید ایزوسیتریک، تولید اسید سیتریک. نتایج حاصله از غلظتهای متفاوت سوبسترا در محدوده ۲۰-۷۰ گرم در لیتر نشان می‌دهد که استفاده از غلظتهای اولیه بالاتر در فاز تولید دارای دو مزیت سرعت و ویژه بالاتر از متابولیت مطلوب و استفاده بهینه از منبع کربن است، البته اثر ناچیزی هم بر سرعت تولید اسید ایزوسیتریک دارد. شرایط بهینه عملیات پدین صورت مشخص گردید؛ غلظت سوبسترا در حداکثر میزان مورد استفاده، راندمان سیترات $0.059 - h^{-1}$ و میزان تولید 0.384 گرم / گرم.

Abstract

Special strains from *Aspergillus niger* in Molasses, glucose syrup or sucrose Media performs citric acid production in industry.

In this research, *Yarrowia lipolytica* growth was evaluated in cross-flow bioreactor on five different growth medium and citric acid production.

During the growth and acid production, the following parameters were determined:

Yield of citric acid production up to production of citric acid, remaining of citric acid and citric acid production.

In comparison with commercial processes of citric acid production using mold, acid production with yeasts, have this advantage that it needs less primary purification.

Study of this research with the aim of optimization of substrate concentration in medium for non-continuous production of citric acid from glucose by *Yarrowia lipolytica*.

Results from various concentration of substrate in the range of 70-250 gr/lit shows that usage from higher primary concentrations in production phase have two advantages such as: high specific rate from metabolite and optimum usage from carbon source of course if have little effect on rate of citric acid production.

مقدمه

اسید سیتریک در فرآورده‌های مختلفی مانند فرآورده‌های غذایی، دارویی و شیمیایی استفاده می‌شود و به طور عمده توسط فرآیندهای تخمیری تولید می‌شود. تولید اسید سیتریک در صنعت معمولاً به وسیله نژادهای خاصی از قارچ اسپیرزیلوس نایجر *Aspergillus niger* در محیط ملاس، شربت گلوکز یا ساکارز صورت می‌گیرد. از سایر سویه‌های قارچی و سوبستراها نظیر اسیدهای آلی، الکل‌ها، الکان‌ها و... نیز می‌توان استفاده نمود. اگرچه از مخمرها نیز می‌توان برای تولید این ماده بهره گرفت اما عیب عمده این روش تولید اسید ایزوسیتریک به عنوان فرآورده جانبی است. نسبت اسید سیتریک به اسید ایزوسیتریک بسیار متفاوت بوده و به نوع نژاد، سوبسترای استفاده شده و شرایط محیط بستگی دارد. مشخص شده است که تولید اسید سیتریک تنها پس از تمام شدن منبع نیتروژن محیط شروع می‌شود که در انتهای فاز تأخیر رشد است. به این دلیل تولید سیترات در دو مرحله صورت می‌گیرد: یک فاز رشد مقدماتی در یک محیط رشد کامل و در ادامه یک فاز تولید در محیط بدون منبع نیتروژن.

در تولید صنعتی، زندگی متابولیک مناسب از جمعیت یاروویا لیپولیتیکا سه مرحله مشخص دارد؛ فاز تأخیر رشد، فاز لگاریتمی تولید سیترات و فاز تولید خطی. در این تحقیق اثر غلظت اولیه گلوکز بر تولید اسید سیتریک به وسیله یاروویا لیپولیتیکا و اثرات ممانعت کنندگی سیتراتها تحت شرایط عملکرد بررسی شده است.

مواد و روشها

در این پژوهش، رشد نژاد یاروویا لیپولیتیکا در یک بیوراکتور کاملاً مجهز cross flow بر روی ۵ محیط رشد مختلف و تولید اسید سیتریک مورد بررسی قرار می‌گرفت. محیط‌های رشد دارای گلوکز، نیترات آمونیوم، ذی فسفات پتاسیم، سولفات آهن، سولفات منیزیم، سولفات منگنز، عصاره مخمر، تیامین بود و PH آن روی ۵ تنظیم گردید. در طی دوره رشد و تولید اسید، پارامترهای زیر نیز مورد اندازه‌گیری قرار گرفت: راندمان تولید اسید سیتریک تا زمان تولید اسید ایزوسیتریک، میزان گلوکز باقیمانده و تولید اسید سیتریک.

بحث و نتایج

پروفیل‌های غلظت گلوکز، توده سلولی، اسید سیتریک و اسید ایزوسیتریک و نیتروژن سلولی در یک دوره تخمیر غیرمداوم در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. (ضمیمه)

فاز رشد در حدود ۲۰ ساعت طول می‌کشد، غلظت سیترات تقریباً به صورت خطی افزایش و غلظت گلوکز تقریباً به صورت خطی کاهش می‌یابد. سرعت افزایش غلظت توده سلولی در ابتدا خوب و به دنبال آن با کاهش مقدار نیتروژن داخل سلولی به یک حد ثابت می‌رسد.

نتایج حاصل از تأثیر غلظت گلوکز اولیه بر روی راندمان اسید سیتریک، راندمان اسید ایزوسیتریک و سرعت مصرف گلوکز و مقایسه با پژوهش انجام شده توسط راین و سیمز Rane and sims در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. (ضمیمه)

رفتار سرعت مصرف گلوکز (m_g) با غلظت اولیه گلوکز در محیط کاملاً خطی و کاهشی بود، همچنین راندمان تولید اسید سیتریک (mp) نیز دارای رفتاری خطی و افزایشی بود.

نسبت راندمان اسید سیتریک به راندمان ایزوسیتریک (mp/mi) نیز دارای رفتاری خطی و افزایشی بود که این مورد و مورد قبل نشان‌دهنده این است که تولید سیترات به مقدار گلوکز اولیه محیط رشد کاملاً وابسته است که با نتایج پژوهش راین و سیمز در تطابق است.

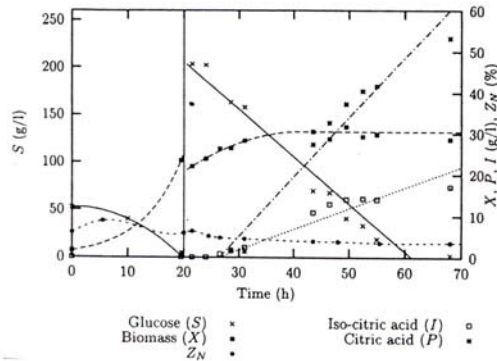
البته این نکته نیز بایستی ذکر گردد که محدوده گلوکز مورد استفاده در پژوهش راین و سیز در حدود ۷۵-۲۵ گرم در لیتر بود و در این تحقیق بین ۲۵۰-۷۰ گرم در لیتر بود.

نتیجه‌گیری

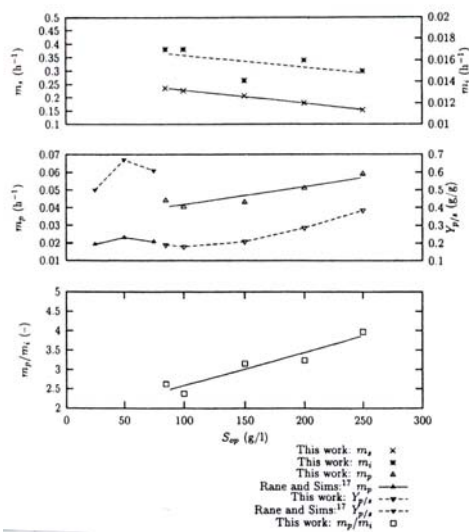
در مقایسه با فرایندهای تجاری تولید اسیدسیتریک با استفاده از کبک، تولید اسید به وسیله مخمر یاروویا لیسولنیکا دارای این مزیت می‌باشد که تصفیه اولیه کمتری مورد نیاز است. مطالعه آزمایش حاضر با بهینه سازی غلظت سوبسترا در محیط تولید برای عبور مداوم اسید سیتریک از گلوکز به وسیله یاروویالیولنیکا انجام شد. نتایج حاصله از غلظتهای متفاوت سوبسترا در محدوده ۲۵۰-۷۰ گرم در لیتر نشان می‌دهد که استفاده از غلظتهای اولیه بالاتر در فاز تولید دارای دو مزیت سرعت ویژه بالاتر از متابولیت مطلوب و استفاده بهینه از منبع کربن است، البته اثر ناچیزی هم بر سرعت تولید اسید ایزوسیتریک دارد.

شرایط بهینه عملیات بدین صورت مشخص گردید؛ غلظت سوبسترا در حداکثر میزان مورد استفاده، راندمان سیترات h^{-1} 0.059 و میزان تولید 0.384 گرم / گرم / گرم برای سیستم غیر مداوم یک مرحله‌ای و در نهایت برای تولید صنعتی سیترات توسط مخمرها، بایستی پژوهشهای تکمیلی برای انتخاب سوش با قدرت بالای تولید سیترات و همچنین بهینه‌سازی روشهای متابولیک و شرایط عملیاتی در جهت کاهش تولید اسید ایزوسیتریک صورت پذیرد.

ضمائم



شکل ۱- پروفیل‌های غلظت گلوکز، توده سلولی، اسید سیتریک و اسید ایزوسیتریک و نیتروژن سلولی در یک دوره غیر مدام تخمیر



شکل ۲- تأثیر غلظت اولیه گلوکز بر سینتیک و پارامترهای استوکیومتری

منابع:

- 1-Briffaud J. Engasser M. 1979. Citric acid production from glucose, 1. Growth and excretions in a stirred fermentor. *Biotechnol. bioeng*; 21: 2083-92.
- 2-Briffaud, J. Engasser M..1979. Citric acid production from glucose,. 2 Growth and excretions in a stirred fermentor. *Biotechnol bioeng* . 21: 2083-92.
- 3-Rane, KD. Sims KA. 1993. Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y 1095: effect of glucose concentration on yield and productivity. *Enzyme Microb Technol*; 15:646-51.
- 4-Moresi, M. 1994. Effect of glucose concentration on citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *J Chem Technol Biotechnol* 60: 384-95.
- 5-Antonucci, s. et al. 2001. Selectivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme and Microbial Technology* 28,189-195.