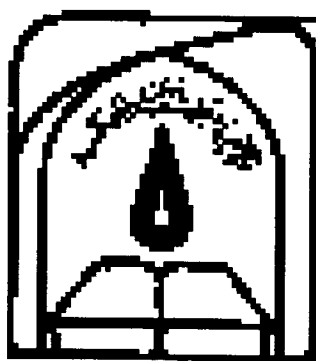


٢٧٠٩٧

بسم الله الرحمن الرحيم



مركز تحقيقات صنایع غذایی ایران

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی

عنوان:

بررسی اثرات غلظت یون آمونیوم و منابع کربن بر روی تولید اسید سیتریک
در روش تخمیری بستر جامد

توسط : محمد رضا گرشاسبی

استاد راهنما : دکتر ناصر قائمی

استاد مشاور: مهندس زهره حمیدی اصفهانی

۰۴۳۱۵

تابستان ۱۳۷۸

۲۷۰۹۷

"تأیید اعضای هیئت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد"

اعضای هیئت داوران نسخه نهائی پایان‌نامه آقای "محمد رضا گرشاسبی" را تحت عنوان
بررسی اثرات خلطت یون آمونیم و متیل کریل بر روی تولید اسید سیتریک در روش تخمیری بستر جامد از نظر
فرم و محتوا بررسی نموده، پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌نمایند.

اعضای هیئت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضا
۱- استاد راهنما	دکتر ناصر قائمی	استادیار	
۲- استاد مشاور	مهندس زهره حمیدی اصفهانی	مربی	
۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی - دکتر محمد علی سحری		استادیار	
۴- استاد ممتحن	دکتر سید عباس شجاع الساداتی	دانشیار	
۵- استاد ممتحن	دکتر بابک بنکدارپور	استادیار	

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به "مرکز نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:
"کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته علوم و صنایع غذایی است که در سال ۱۳۷۸ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر ناصر قائمی و مشاوره سرکار خانم زهره حمیدی اصفهان از آن دفاع شده است."

ماده ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵ دانشجوی تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶ اینجانب محمد رضا گرشاسبی دانشجوی رشته علوم و صنایع غذایی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت جرایمی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

تاریخ: ۷۸/۶/۸

امضاء:

تقدیم به:

خانواده گرامی

و دوستان همدم

تشکر و قدردانی :

با سپاس فراوان از اساتید محترم جناب آقای دکتر ناصر قائمی و سرکار خانم مهندس زهره حمیدی اصفهانی که زحمت راهنمایی و مشاوره را در اجرا و تدوین پایان نامه پذیرفتند و با تشکر از جناب آقای دکتر محمد علی سحری مدیریت محترم گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تربیت مدرس که همکاری لازم را در اجرا و تدوین پایان نامه با اینجانب مبذول داشته اند و همچنین کلیه دوستان و یارانی که اینجانب را در اجرای پایان نامه همراهی نمودند .

چکیده:

این تحقیق با استفاده از تفاله سیب کارخانجات آبمیوه گیری شهد سلماس و کاربرد اسپرژیلوس نایجر سویه T.U.108 جهت بهینه سازی شرایط برای تولید اسید سیتریک به روش تخمیری بستر جامد انجام شد. افزایش تولید اسید سیتریک به عوامل متعددی بستگی دارد که از آن جمله می توان به میزان رطوبت تفاله، مدت زمان تخمیر، دمای مناسب طی دوره تخمیر، افزایش متانول، اندازه ذرات تفاله، pH تفاله، میزان هوادهی و افزودن منابع کمکی کربن و نیتروژن اشاره نمود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد حداکثر تولید اسید سیتریک (۱۱۰ گرم اسید در کیلوگرم تفاله خشک) توسط اسپرژیلوس نایجر در رطوبت ۷۵ درصد، مدت زمان تخمیر ۷ روز، دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، افزایش ۳٪ متانول (w/w)، اندازه ذرات تفاله بین اندازه های مش الک ۳۰ > x > ۲۰، میزان هوادهی اجباری برابر ۰/۴ لیتر در دقیقه و افزودن منابع کمکی کربن (گلوکز) تا میزان ۲۰٪ (w/w) و نیتروژن (سولفات آمونیوم) تا حداکثر ۰/۱٪ (w/w) بدست می آید.

کلمات کلیدی: اسید سیتریک، روش تخمیری بستر جامد، اسپرژیلوس نایجر و تفاله سیب.

بنام خدا

شماره صفحه	فهرست
فصل اول : مقدمه	
۲-۳	۱-۱) مصرف اسید سیتریک در ایران
۴-۵	۱-۲) تاریخچه
۵	۱-۳) فراوانی اسید سیتریک
۵-۶	۱-۴) خواص فیزیکی و شیمیایی
۶-۹	۱-۵) کاربردها
فصل دوم : مروری بر مطالعات انجام شده	
۱۰-۱۴	۲-۱) بیوشیمی تخمیر و متابولیسم تولید اسید سیتریک
۱۴-۱۸	۲-۲) میکروارگانیسمهای مولد اسید سیتریک
۱۸-۱۹	۲-۳) روش جداسازی سویه مولد اسید سیتریک
۱۹	۲-۴) شناسایی اختصاصی اسپرژیلوس نایجر
۱۹-۲۹	۲-۵) فرآیند و روشهای تولید اسید سیتریک
۱۹-۲۳	۲-۵-۱) روش کشت سطحی
۲۳-۲۴	۲-۵-۱-۱) روش کشت بستر جامد
۲۴-۲۸	۲-۵-۲) روش کشت غوطه ور
۲۸-۲۹	۲-۵-۳) روش تخمیر کوچی
۲۹-۳۴	۲-۶) تاثیر شرایط محیطی بر تولید اسید سیتریک
۲۹-۳۱	۲-۶-۱) شرایط تغذیه ای اسپرژیلوس نایجر
۳۱-۳۲	۲-۶-۲) تاثیر عناصر (فلزات) نادر در تولید اسید سیتریک
۳۲-۳۳	۲-۶-۳) تاثیر نیتروژن و فسفر در تولید اسید سیتریک
۳۳	۲-۶-۴) تاثیر متانول در تولید اسید سیتریک
۳۴	۲-۶-۵) کنترل pH طی مراحل تخمیر و تولید اسید سیتریک
۳۴-۳۹	۲-۷) سوبستراهای مورد استفاده در تولید اسید سیتریک
۳۴-۳۵	۲-۷-۱) هیدروکربنها
۳۵-۳۷	۲-۷-۲) سوبستراهای دیگر
۳۷-۴۰	۲-۷-۳) تفاله سیب

- ۴۱-۴۲ روشهای تولید اسید سیتریک (۲-۸)
- ۴۲-۴۴ تهیه محیط کشت در روش بستر جامد و عوامل موثر در تولید اسید سیتریک (۲-۹)
- ۴۵-۴۶ انواع فرماتورها (بیوراكتورها) (۲-۱۰)
- ۴۶-۴۸ استخراج و خالص سازی اسید سیتریک (۱۸-)

فصل سوم : مواد و روشهای آزمایش

- ۴۹ شرح آزمایشات انجام گرفته
- ۵۰ وسایل مورد نیاز (۳-۱)
- ۵۰ طرز تهیه محلول سوسپانسیون اسپوری (۳-۲)
- ۵۱-۵۲ روشهای آماده سازی سوپسترا (۳-۳)
- ۵۲ روش سنجش اسیدیته کل (۳-۴)
- ۵۲-۵۴ سنجش اختصاصی و ترسیم منحنی اسید سیتریک به روش بولت، ماریر (۳-۵)
- ۵۴-۵۶ اندازه گیری میزان قند احیاکننده در تفاله سیب (۳-۶)

فصل چهارم : نتایج

- ۵۷ تاثیر مقادیر رطوبت بر تغییر pH قبل و پس از اتوکلاو گذاری (۴-۱)
- ۵۸ تاثیر مقادیر رطوبت بر میزان تولید اسید سیتریک در $pH = 4/5$ (۴-۲)
- ۵۹-۶۰ تاثیر دما بر میزان تولید اسید سیتریک (۴-۳)
- ۶۱ تاثیر افزایش متانول بر تولید اسید سیتریک (۴-۴)
- ۶۲ تاثیر pH اولیه محیط کشت (تفاله سیب) بر تولید اسید سیتریک (۴-۵)
- ۶۳ تاثیر زمان تخمیر بر تولید اسید سیتریک (۴-۶)
- ۶۴ تاثیر اندازه سوپسترا بر افزایش تولید اسید سیتریک (۴-۷)
- ۶۵ تاثیر هوادهی بر تولید اسید سیتریک (۴-۸)
- ۶۶ تاثیر منبع کمکی نیتروژن (سولفات آمونیوم) بر تولید اسید سیتریک (۴-۹)
- ۶۷ تاثیر منبع کمکی کربن (گلوگز) بر تولید اسید سیتریک (۴-۱۰)

فصل پنجم :

- ۶۸-۷۰ بحث و پیشنهادات (۱۱-)
- ۷۱-۷۹ مراجع (۱۲-)



فصل اول : مقدمه

بنام خدا

تولید اسیدهای آلی بدلیل کاربرد وسیع آنها در صنایع مختلف از دیرباز مورد مطالعه و بررسی بوده است.

از جمله اسیدهای آلی مورد نظر اسید سیتریک است که دارای مصارف متنوعی در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و سایر صنایع می باشد که بدلیل غیرسمی بودن اسیدیته مناسب قابلیت بافری و... هر سال بمقدار ۳-۲ درصد بر میزان مصرف آن افزوده میگردد. این اسید در برخی میوه جات مثل لیمو، آناناس، هلو، گلابی و... وجود دارد و اولین بار توسط آقای اسکال در سال ۱۷۸۴ از عصاره لیمو جدا گردید، از آن زمان تاکنون به طرق شیمیایی و بیوتکنولوژی تهیه شده و می شود (۴۳).

از اولین کشورهایی که در این زمینه (جداسازی و تولید اسید سیتریک) تلاش کردند ایتالیا، آمریکا، انگلستان و چند کشور اروپایی بودند که در قرون ۱۸ و ۱۹ به روش شیمیایی اقدام به این عمل نمودند و تقریباً از اوایل قرن ۲۰ روشهای بیوتکنولوژی در سراسر دنیا رایج شدند که هنوز هم کاربرد دارند.

ابتدا روش بستر جامد برای تولید آن استفاده می شد ولی بتدریج روش غوطه وری جایگزین روشهای قبلی شدند زیرا در روش غوطه وری کنترل بهتر و آسانتر صورت گرفته و نیز شرایط کار بهتر و راندمان بیشتر می باشد.

مجدداً پس از طی چند دهه روش بستر جامد برای تولید این اسید بدلیل امکان استفاده از ضایعات فراوان و ارزان کشاورزی بعنوان سوسترا رواج یافت. به هر حال در

سالهای اخیر تلاشهای فراوانی برای اصلاح گونه های میکروبی مولد اسید سیتریک مخصوصاً *آسپرژیلوس نایجر* صورت گرفته و از جهت افزایش راندمان تولید و استخراج اسید نیز مورد توجه بوده است (۴۳).

آمار جهانی نشان می دهد در سال ۱۹۶۰ مصرف جهانی این اسید ۳۰۰/۰۰۰ تن در سال بوده و پیش بینی می شود تا پایان قرن بیستم به حدود ۵۰۰/۰۰۰ تن در سال برسد بنابراین توجه به روشهای مناسبتر کشت میکروبی مربوطه و تولید بیشتر اسید حائز اهمیت است (۴۳).

کشور ما نیز از جمله کشورهایی است که میزان نسبتا بالایی از این اسید را مصرف می کند و تمامی اسید مصرفی و املاح آنرا وارد می نماید و هیچگونه شرکت یا موسسه ای بطور رسمی برای تولید صنعتی آن احداث نشده است و تحقیقات در این زمینه نسبتا کند، اما ادامه دارد .

۱-۱) مصرف اسید سیتریک در ایران :

مصرف این اسید و املاحش در صنایع مختلف غذایی (از جمله نوشابه سازی و محصولاتی مثل کیک بیسکویت و...) بیشتر از صنایع دیگر می باشد بطوریکه می توان گفت حدود ۷۰ درصد مصرف این اسید به صنایع غذایی مخصوصا نوشابه سازی اختصاص دارد و در صنایع بهداشتی حدود ۱۲ درصد و در صنایع دیگر حدود ۱۸ درصد مصرف این اسید بوده است .

جدول ۱-۱ آمار واردات اسید را طی سالهای ۱۳۶۵ تا ۱۳۷۶ نشان می دهد (۳):

کشورهای صادر کننده	مقدار کل اسید وارداتی (تن)	سال
سوئیس - امارات - آلمان - اتریش	۴۱۶	۶۵
سوئیس - امارات - دوبی - ترکیه - اتریش	۸۸۵	۶۶
سوئیس - امارات - آلمان - اتریش	۶۱۶	۶۷
سوئیس - امارات - اتریش - ترکیه	۵۵۹	۶۸
سوئیس - امارات - آلمان - اتریش - هند	۵۳۵	۶۹
سوئیس - آلمان - چین - تایوان	۸۶۷	۷۰
آلمان - اتریش - امارات - تایوان	۱۴۵۹	۷۱
آلمان - اتریش - امارات - تایوان	۱۴۶۴	۷۲
آلمان - اوکراین - اسپانیا - تایوان	۱۵۷۴	۷۳
چین - ارمنستان - روسیه - اوکراین	۱۵۶۰	۷۵
آلمان - اتریش - چین - کانادا - کوبا	۴۱۴۰	۷۶

همانگونه که ملاحظه می شود میزان مصرف این ماده رو به افزایش است بنابراین نیاز به طراحی و ساخت واحدهای صنعتی بیشتر برای تولید این اسید در داخل کشور احساس می شود .

۲-۱) تاریخچه:

اسید سیتریک^۱ یا ۲-هیدروکسی ۱-۲-۳- پروپان تری کربوکسیلیک اسید و یا جوهر لیمو یکی از مهمترین اسیدهای آلی است که فراوانی آن در گیاهان بخصوص مرکبات، گیلان، آلو، توت فرنگی، سیب و ذغال اخته بیانگر غیر سمی بودن آن است و بعنوان ترش کننده، طعم دهنده و پایدارکننده مورد استفاده قرار می گیرد.

آقای اسکال در سال ۱۷۸۴ این اسید را از عصاره لیمو استخراج و متبلور نمود. تا سال ۱۹۲۶ بیشتر از ۹۰ درصد اسید سیتریک مورد نیاز در ایتالیا تهیه و یا صادر می شد تا اینکه جان واستارج^۲ در اواخر همان سال توانستند از سترات کلسیم وارداتی این اسید را تهیه نمایند، البته دانشمندان قبلا در سال ۱۸۸۰ توانسته بودند از گلیسرول بصورت سنتزی، اسید سیتریک تهیه نمایند (۴۳). و همزمان در سال ۱۸۹۳ برای نخستین بار توانست از محیط پنی سیلیوم که قبلا سیترومایسس^۴ نامیده می شد اسید سیتریک ناچیزی استخراج نماید. اگرچه کاربرد این کپک هیچگاه در مقیاس صنعتی انجام نگرفت ولی زمینه کارها و تحقیقات بعدی گردید. در سال ۱۹۱۷ برای اولین بار کوری^۵ از یک سویه آسپرژیلوس نایجر توانست اسید سیتریک قابل ملاحظه ای بدست آورد و این کار پایه و اساس ایجاد کارخانه معروفی در آمریکا شد (سال ۱۹۲۳). چاس. فایزر^۶ اولین کارخانه ای بود که در مقیاس صنعتی با استفاده از میکروارگانیسمها توانست تولید اسید سیتریک نماید و سپس آلمان، انگلستان، بلژیک، ژاپن و چکسلواکی توانستند به روش بستر جامد این اسید را تولید نمایند (۴۳). در سال ۱۹۴۰ بهره گیری از روش کشت غوطه وری و استفاده از عصاره ملاس توسعه یافت و پس

^۱-C₆H₈O₇

^۳-Vehmer

5-Currie

^۲-John & Sturge

4-Citromyces

6-Chas.Pfizer

از آن در سال ۱۹۶۵ از مخمرها برای این هدف استفاده شد^۰

در اوایل کار بدلیل ارزانی از منابع کربن آلی نظیر آلکان های نرمال و هیدروکربنهای مشتق شده از منابع نفتی استفاده می شد ولی بتدریج با گرانی قیمت این ترکیبات به سمت استفاده از منابع کربوهیدراتی دیگر مثل ملاس و ساکاروز روی آوردند.

امروزه با کاربرد میکروبهایی مثل اسپرژیلوس نایجر در شرایط خاص و بهره گیری از منابع کربن متفاوت می توان مقدار زیادی اسید سیتریک تولید و روانه بازار کرد. علاوه بر گونه های اسپرژیلوس در برخی مقالات، استفاده از کاندیدا^۱ ساکارومایکوپسیس^۱ گزارش شده و دارای بازده بالای اسید سیتریک می باشد (۴۳).

۳-۱) فراوانی اسیدسیتریک

اسید سیتریک علاوه بر میوه جات در سبزیجاتی نظیر سیب زمینی، گوجه فرنگی، شلغم، چغندر و حتی دردانه و عصاره گلها هم یافت می شود. همچنین در بسیاری از بافتها و مایعات حیوانی مثل خون، ادرار، مایع آمنیوتیک، غده تیروئید، بزاق، اشک، کبد، قلب، مغز، ماهیچه ها و لوزالمعده نیز یون سترات وجود دارد (۴۷).

۴-۱) خواص فیزیکی و شیمیایی اسید سیتریک

۱) خواص فیزیکی:

این اسید به دو فرم مونوهیدراته و بدون آب یافت می شود. فرم بدون آب آن دارای وزن مولکولی ۱۹۲/۱۳ دالتون، نقطه ذوب ۱۵۳ درجه سانتیگراد و دانسیته ۱/۶۶۵ است و از نظر نوری نیز غیر

^۱-Candida.Saccharomycopsis