١٤٣٤١

۱۵۳۹۱

دانشگـــــاه تهـــــران
دانشکده علوم

پایان نامه :
برای دریافت درجه کارشناسی ارشـــد
رشته میکروبیولوژی

موضوع :
بررســـی افزایش نیمه آسپرژیلوس نیجـــر مولـد ایدسیتریک با استفاده از روش تثبیت سلولـــــی

برا هنمایی :
دکتـــــر روح الله پاکروان
دکتـــــر ناصر قائمـــــــی

نگـــارش :
معصـــومه بحرینـــــی

سال ۱۳۷۰

تقدیم به : "امام عزیز"

ندا دهنده اسلام ناب محمدی (ص) وپرچمدار عدالت ورهایی ، کسیکه به ما افتخار بر مسلمان بودن ومقاومت دربرابر ظلم وجور را آموخت ، همو که تاب ماندنش نبود وبا دلی آرام وضمیری امیدوار به دیدار معبودش شتافت .

" شهیدان "

راهیان نور وناظران وجه الله ، آنان که آوای حق را شنودند ، ورضای اورا بررضای خود ترجیح دادند .

تقدیـــــم به : " پـــــدرم "

که همواره درتحصیل علم مشـــوق من بوده وبا -
را هنمایی وهدایت خودمرا یاری نموده ووجودش
مایهٔ پشت گرمی من بوده است . زبان وقلـــم ،
توان برشمردن زحمات فراوان وخالصانه اورا
نـــــدارند .

" مادرم "

که چون شمعی رونق جمع خانواده است ، همان
الگوی صبرومقاومت وایثار که با رنج وسختـــی
بسیار وتحمل فراق ، امیدبخش ادامهٔ راهـــم
بود . امیدوارم خداوندآنندورا موردعنایـــات
خاصهٔ خودقرار دهنـــد .

با تشکروتقدیر از :

اساتیدگرانقدروارجمند جناب آقای دکترپاکروان ودکترقائمی که باراهنمائیهای ارزشمندخود، برادر پژوهش ونگارش این پایان نامه یاری نموده‌اند وتشویقها ورهنمودهای آنان همواره درطول دوران تحصیل راهگشای مسیرعلمیم بوده است ودرتمام این مدت درس تواضع وفروتنی را به من آموختند ، موفقیت وشادکامی ایشان وهمهٔ دانش پژوهان متعهدرا ازخداوندمتعال خواهانم .

همچنین ازسرکارخانم دکترنوحی وجناب آقای دکترملکزاده اساتیدارجمندکه ازراهنمائیهای پربارشان درمدت تحصیل برخوردار بوده ام وعضویت درهیئت درهیئت داوران این پایان نامه راتقبل فرمودند تشکروقدردانی مینمایم . ازسایراعضای محترم هیئت داوران ، اساتیدبزرگوارسرکارخانم دکترسیاوشی، جناب آقای دکترسربلوکی ، جناب آقای دکترفرنیا که اینجانب راازارشادوراهنمائیهای خودبهره‌مند نموده‌اند بینهایت سپاسگزارم .

" فهرست مطالـــــب "

عنـــــوان	صفحـــــه:
خلاصه فارســـی	
مقدمـــــه	۱
تاریخچه	۳
اسیدسیتریک (جوهرلیمو)	۳
موارداستفاده وخواص اسیدسیتریک	۵
فرآیند تخمیر	۸
سویه های مولداسیدستیریک	۸
آسپرژیلوس نیجر	۹
کشت سطحی	۱۰
کشت غوطه ور	۱۳
استفاده ازمخمرها درکشت غوطه ور	۱۶
کشت مخمرها وبعضی ازباکتریها درمحیط حاوی آلکانهای طبیعی درکشت غوطه ور	۱۷
تخمیر Koji	۱۸
بیوشیمی تخمیراسیدسیتریک	۱۹
شرایط تغذیه	۱۹
روشهای متابولیکی تولیداسیدسیتریک در آسپرژیلوس نیجر	۲۲
شیمی تخمیراسیدسیتریک	۲۵
تولیداسیدسیتریک درمخمرها	۲۷
فرآیندتخلیص وبازیافت اسیدستیریک	۲۸

" فهرست مطالـــــــب "

عنـــــوان	صفحـــــه
فرآیندبازیافت کلاسیک اسیدسیتریک	۲۸
استخراج حلال	۲۸
تثبیت	۳۰
۱ـ جذب	۳۲
۲ـ ریزپوشینه کردن	۳۳
۳ـ پیوندهای کوءوالانت	۳۴
۴ـ اتصال سلول به سلول	۳۵
۵ـ محصورکردن درشبکه‌های پلیمری	۳۶
ژله‌ای شدن یونوتروپیک	۳۷
Polycondens	۳۹
پلیمریزاسیون	۴۰
روش آلژینات	۴۱
وسایل کاروروش تحقیق	۴۵
محیط کشت	۴۵
تهیه سوسپانسیون اسپوری	۴۶
روشهای اندازه‌گیری	۵۲
اندازه‌گیری میزان رشدقارچ	۵۲
اندازه‌گیری *pH*	۵۲
اندازه‌گیری میزان اسیدیته	۵۲
اندازه‌گیری غلظت قند	۵۳
اندازه‌گیری میزان اسیدسیتریک	۵۵
تثبیت	۵۸

عنوان	صفحه
روش کلسیم آلژینات	۵۸
روش تثبیت درکلسیم آلژینات	۵۹
مشاهده با میکروسکوپ الکترونی	۶۰
نتایج	۶۱
الف ـ تولیدا سیدسیتریک	۶۱
ب ـ اثر pH برروی تولیدا سیدسیترک	۶۳
ج ـ اثرنیتروژن برروی تولیدا سیدسیتریک	۶۳
د ـ اثرمنبع کربن برروی تولیدا سیدسیتریک	۶۵
هـ ـ اثرغلظت ساکاروز برروی تولیدا سیدسیتریک	۶۸
و ـ اثرغلظت فروسیانیدپتاسیم برروی تولیدا سیدسیتریک	۶۹
ز ـ اثرغلظت $MgSO_4$ و KH_2PO_4 برروی تولیدا سیدسیتریک	۷۰
ح ـ اثرمحیط کشت برروی تولیدا سیدسیتریک	۷۱
ط ـ اثرتجدیدکشت وسن کنیدی برروی تولیدا سیدسیتریک	۷۲
ی ـ اثر rpm برروی تولیدا سیدسیتریک	۷۲
تثبیت کنیدیهای آسپرژیلوس نیجر درکلسیم آلژینات	۷۵
الف ـ مشاهده میکروسکوپی مهره‌های ژلی کلسیم آلژینات همراه با کنیدیهای تثبیت شده	۷۸
ب ـ مقایسه تولیدا سیدستیریک بین سلولهای آزادو سلولهای تثبیت شده	۸۰
ج ـ اثرغلظت کلسیم آلژینات برروی تولیدا سیدسیتریک	۸۰
د ـ تولیدا سیدسیتریک درکشت batch wise	۸۳
هـ ـ تولیدا سیدسیتریک درمحیط حاوی نیتروژن کم	۸۵
و ـ افزایش نیمه عمرسیستم	۸۵

" فهرست مطالـــــب "

عـــــــنـــــوان	صفحـــــه
بحث وتفسیرنتا یـــــج	۸۷
نتیجه گیری	۹۸
خلاصه انگلیســـــی	۱۰۱
فهرست منا بـــــع	۱۰۳

خلاصـــــه :

هدف از این مطالعه بررسی دوموضوع میباشد اول تعیین عوامل محیطی مناسب برای تولیدبیشتر اسیدسیتریک ومشخص نمودن ارتباط بین رشدسلولی وتولیداسیدودوم افزایش نیمه‌عمرسیستم با تثبیت قارچ آسپرژیلوس نیجر .

برای انجام این کارکپک *Asp. niger PTCC 5010* که‌از سازمان پژوهشهای علمی صنعتی ایران تهیه شده‌بودموردا ستفاده قرارگرفت .

ابتدا عوامل مختلفی که برروی تولیداسیدسیتریک تاثیر داشته‌اندبررسی شددراین بررسی مشخص‌شدکه قارچ درشرایط اسیدی با $pH=3$ درشروع تخمیرونیتروژن محدودبا غلظت ۲ گرم درلیتر مقداری بیشتراسیدسیتریک تولیدمیکند .

بهترین منبع کربنی که استفاده میکنندقنداسکارزبا غلظت ۱۴۰ گرم درلیترمیباشد . بعلاوه بایدنمکهای فسفات پتاسیم ،سولفات منیزیم نیزهرکدام با غلظت ۰/۲۵ گرم درلیتر درمحیط کشت وجودداشته باشند .فلزات سنگین موجوددرمحیط کشت ازتولیداسیدسیتریک جلوگیری میکنند لذا برای حذف این یونها ازمحیط ، ازفروسیانور پتاسیم بافلظت $0/5 \times 10^{-3}$ میلیگرم درلیتر استفاده گردید .

سن کنیدیها ، تعداددفعات تجدیدکشت ، ونوع محیط کشت اسپورولاسیون بنزتاثیربسزایی درمیزان اسیدسیتریک داشتندبطوریکه کنیدیهای ۵ روزه‌که‌تنها یک بار برروی محیط سابرودکستروزآگار تجدیدکشت شده ورشدکرده اندبرای اینکارمناسب بودند .

بعدازبدست آوردن شرایط مناسب تولیداسیدسیتریک ،کنیدیهای

آسپرژیلوس نیجر را درون مهره های ژلی کلسیم آلژینات تثبیت گردید. غلظت مناسب برای تثبیت این کنیدیها سدیم آلژینات ۳% بود که هیچ‌گونه آلودگی ناشی از میسلیومهای آزادوکنیدی تشکیل شده نداشت

در مقایسه‌ای که بین کنیدیهای تثبیت شده وآزاد انجام گرفت، سلولهای آزاد میزان بیشتری اسیدسیتریک تولید می نمودند. ولی سلول‌های تثبیت شده درروش کشت batchwise بمدت ۷۳ روز توانستند زنده بمانند و به فعالیت خود ادامه دهند اما سلولهای آزاد بعد از ۲۱ روز افت شدیدی در تولید اسیدسیتریک داشتند.

علاوه براین نیمه عمر کارهای گزارش شده دراین زمینه حدود ۱۹ روز میباشد درصورتیکه درکار حاضر این نیمه عمر تقریبا "به دو برابر افزایش یافته و به ۳۷ روز رسید.

مقـــــدمـــــه

بعدا زموفقیت درتثبیت آنزیمها ، کا رها ی متعددی برروی تثبیت سلولها انجا م شدودرا ین زمینه نیزتوا نستندموفقیتها ی زیا دی بدســـت آورند ودرفرآیندها ی صنعتی موردا ستفا ده قرا ردهند. ا ستفا ده ا زا یـــن سیستمها ی تثبیت شده به‌عنوا ن کا تا لیزوها ی زنده ا زنقطه نظرا قتصا دی برتری زیا دی نسبت به سلولها ی آزا ددرصنا یع تخمیری دا رند ،کـــــه میتوا ن ا زا فزا یش بیوما س ، ا فزا یش محصول ، کا هش ویسکوزیته ما یـــع کشت ، سا ده شده با زیا فت محصول وبیوما س ، ا مکا ن ا ستفا ده ا زبیورا - کتـــورها با ا شکا ل فضا یی متفا وت ومهمترا زهمه سا لم وفعا ل نگهدا شتـــن سلولها برا ی چندین ما ه ودرنتیجه ا فزا یش‌عمرمفیدسیستم وهمچنیـــــن دربعضی موا ردا فزا یش‌تولیددروا حدحجم ووا حدزما ن را (۶) نا م بـــــرد.

تولیدا سیدسیتریک به وسیله آسپرژیلوس‌نیجر با ا ستفا ده ا ز - روشها ی مختلف تثبیت نیزتا کنون بوسیله تعدا دی ا زپژوهشـــگرا ن - بررسی شده ا ست .

جذب سطحی میسلیوها ی رشدکرده آسپرژیلوس‌نیجر برروی حا ملیـــن شیشه‌ا ی (*rasching rings*) دریک را کتوربا ستون ثا بـــــت (*Fixed bed reactor*) ویا برروی صفحا ت پلی پروپیلن دریـــــک را کتوربا صفحه چرخا ن (*Rotating disc reactor*) بررســـــــی شده ا ست . (۷۵) علاوه برآن گرا نولها ی آسپرژیلوس‌نیجر را درژلهـــا ی مختلف مثل غشا ها ی- کلاژنی ، مکعبها ی پلی آکریل آمیدی (۴۷) ،مهره- ها ی آگا رویا کا پا - کا را ژنا ن ونیزمهره‌ها ی‌کلسیم آلژینا ت تثبیـــــت کرده‌ا ند .

اما درتمام این تکنیکها گرانولهای قارچ که درابتدای رشدبودند با عمل تثبیت دردرون این ملین ، بعلت محدودیت انتشاربخصوص ازنظرمیزان اکسیژن وهمچنین تغییرشرایط فیزیولوژیکی صدمه دیده وتولیداسیدسیتریک درآنها نسبت به سلولهای آزادکاهش بیشتری یافت وبعلاوه میسلیومهای آزاد درطی دوره تثبیت نیزسبب کاهش تولید وآلودگی محیط میشدند .

Eikmeier (۷۵) و Isay (۷۰) برای حذف این مشکلات ازکنیدی آسپرژیلوس نیجربرای عمل تثبیت دردرون کلسیم آلژینات استفاده نمودند. روش محصورکردن (entrapment) دردرون - مهره‌های کلسیم آلژینات یکی ازبهترین روشهای انتخابی دربسیاری ازکارهای اخیرمیباشد. (۷۶) چون این روش دریک فرآیندتک مرحله‌ای تحت شرایط خیلی ملایمی انجام میشودوازلحاظ شرایط فیزیولوژیکی بابسیاری ازسلولهای زنده قابل انطباق میباشد .

Eikmeier و Isay توانستند سلولهای آسپرژیلوس نیجر را بمدت ۳۵ روز دردرون مهره‌های ژلی زنده نگهدارند .

درکارحاضر ابتدارشدوشرایط اپتیمم آسپرژیلوس نیجربرای تولیداسیدسیتریک بررسی شدوسپس کنیدیهای آن دردرون کلسیم آلژینات محصورگردید تابااستفاده ازفرآیندتثبیت طول عمرسیستم بکارگرفته شده افزایش داده شود .

تاریخچه

اسیدسیتریک (جوهرلیمو) :

اسیدسیتریک یا ۲ - هیدروکسی ، ۱ ، ۲ ، ۳ ،پروپانوتری - کربوکسیلیک اسید ($C_6H_8O_7$) برای اولین بار در سال ۱۷۸۴ توسط شیل (Scheele) از آبلیمو استخراج گردید .

این اسید علاوه بر آبلیمو در مرکبات دیگر نیز وجود دارد و در طبیعت بصورت یک ترکیب واسطه در موقع تبدیل کربوهیدراتها به Co_2 در چرخه کربس تشکیل میشود . حضور گسترده اسیدسیتریک در موجودات گیاهی و حیوانی نشانه غیرسمی بودن آن میباشد و بهمین خاطر از زمانهای پیش ، از آن بعنوان یک ماده ترش کننده (acidulant)در تهیه نوشیدنیهای با طعم ترش استفاده میشده است و همچنین بعنوان آنتی - اکسیدان در جلوگیری از فساد و در صنایع شیرینی سازی استفاده میشده است .

در انگلستان در سال ۱۸۲۶ برای اولین بار توسط John و - Edmund Sturge ، این اسید را از سیترات کلسیم وارد شده از - ایتالیا بدست آوردند و به تولید انبوه رساندند ولی بعد ایتالیائیها خود تهیه اسیدسیتریک را آغاز کرده و در طی دودههٔ اول قرن بیستم ، ۹۰٪ اسیدسیتریک مصرفی جهان را تولید نمودند .

در سال ۱۸۸۰ Adam و Grimoux توانستند اسیدسیتریک را به طور سنتتیک از گلیسرول تهیه کنند و از آن زمان به بعد روشهای دیگر سنتزی با استفاده از مواد خام ابداع شد و تا حدود ۱۹۷۰ از این روشهای سنتزی استفاده میشد تا اینکه امکان استفاده وسیع از سدیم سیترات در شوینده‌ها به جای پلی فسفاتها عملی شد و نیاز به این ماده فزونی

یافت ودرنتیجه به‌علت گران بودن مواد خام وزیاد بودن مراحل واکنش ، روشهای سنتتیک ازنظر اقتصادی دیگرمقرون به‌صرفه نبودند لذا سعی نمودند ازروشهای دیگر استفاده کنند. امکان استفاده ازروش‌تخمیربرای تهیه اسیدسیتریک باکشف Wehmer در ۱۸۹۳ آغاز شد. وی متوجه شده بودکه بعضی ازگونه‌های پنی سیلیوم (که وی اصطلاحا" آنها را Citromyces نامید) ، وقتی برروی محلولهای قندی رشد میکنند قادربه‌تولید اسیدسیتریک میباشند . Wehmer سعی کرداین روش‌را بصورت یک فرآیندتجاری درتولیداسیدسیتریک به‌کاربرد ولی موفق نشد. چندی بعد Currie (۱۹۱۷) متوجه شدکه‌یکی ازسویه‌های آسپرژیلوس نیجر قادراست مقداربیشتری اسیدسیتریک تولیدکنند وبعدازمدتی تلاش وی همراه باکمپانی Chas. Pfizer & Co. در ۱۹۲۳ توانست تولیداسیدسیتریک به‌وسیله این سویه‌را به‌طور صنعتی درآمریکا پیاده کند .

بعدا" درانگلستان ، بلژیک ، چکسلواکی وآلمان این روش - تخمیری بکارگرفته‌شد. درتمام این کارخانه‌ها ازروشی که‌اصطلاحا" کشت سطحی می نامند استفاده میگردد . دراین روش‌آسپرژیلوس نیجر برروی سینی های ثابتی دراتاقهای تهویه دار واستریل کشت میشد.

درطی جنگ جهانی دوم ، روش تخمیرغوطه ور بوسیله Currie (۱۹۴۹) برای‌تولیداسیدسیتریک پیشرفت کردوترکیب محیط کشت ،شیره خالص‌شده گلوکزیا ملاسهای چغندرقندونیشکر بود .

ازسال ۱۹۶۵ به بعد، ازبعضی مخمرها درتولیداسیدسیتریک استفاده کردند وبه‌جای ملاس‌یا قند ازهیدروکربنها وآلکانهای نرمال استفاده نمودند.