

تولید سیتريك اسيد از ملاس نيشكر تیمار شده شیمیایی توسط سلول های تثبیت یافته قارچ آسپرگیلوس - نایجر

سهیل امیری
کارشناسی ارشد

فرزانه وهاب زاده
دانشیار

دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

چکیده

در این تحقیق تولید سیتريك اسيد به روش ناپيوسته از ملاس نيشكر تیمار شده شیمیایی (استفاده از تری کلسیم فسفات) و با بکار گرفتن اسپرجیلوس - نایجر به شکل سلول های تثبیت یافته در دانه های زلی کلسیم الژینات مورد بررسی قرار گرفته است. جهت مقایسه و ارائه برآوردی معقول از تخمیر تحت بررسی چند روند تخمیری دیگر نیز در این زمینه مورد نظر و ملاحظه قرار گرفت: استفاده از ملاس تیمار نشده به عنوان سابسترات تخمیر و به کار گرفتن اسپرجیلوس - نایجر به شکل سلول های آزاد و نیز به شکل سلول های تثبیت یافته، استفاده از ملاس تیمار شده و همراه با به کار گرفتن میکروارگانیزم مورد اشاره به شکل سلول های آزاد. تغییرات سیر زمانی سه متغیر اصلی عملیاتی در تخمیر سیتريك اسيد اندازه گیری و تعیین گردید: قند (با توان احیاکنندگی) باقیمانده موجود در محلول تخمیری، قند (با توان احیاکنندگی) به مصرف رسیده در طی تخمیر، و نیز سیتريك اسيد تولید شده در تخمیر. در زمان پایانی تخمیر (۱۴ روز) نیز برای هر يك از روندهای تخمیری مورد اشاره، توده سلولی حاصله اندازه گیری شد. با توجه به نتایج بدست آمده و توجهات تفصیلی ارائه شده روند تخمیری ملاس تیمار شده با استفاده از سلول های تثبیت یافته در مقایسه با روندهای تخمیری دیگر در موقعیت ترجیح یافته ای قرار می گیرد. میانگین غلظت سیتريك اسيد تولیدی در این تخمیر 7.76 g/l و با در نظر گرفتن مقدار قند (با توان احیاکنندگی) به مصرف رسیده در این تخمیر که در حد 75.6 g/l بوده است، بازدهی تولید سیتريك اسيد (به صورت درصد) 10.3% است. در مطالعات فرایندهای تخمیری ارائه رابطه ای ریاضی جهت بیان شدت و سرعت تبدیل امری مطلوب و مفید بوده و کسب اطلاعاتی از این قبیل برای مطالعه مکانیزم عمل تسهیلاتی را نیز به همراه خواهد داشت. در بیان رابطه ای ریاضی در تعیین شدت و سرعت تبدیلات تخمیری در بیشتر موارد از تغییرات غلظتی سابسترات در مقابل زمان استفاده می شود. در تحقیق در دست در سیر زمانی تغییرات سیتريك اسيد تولیدی نوساناتی مشاهده گردید. از سویی قند خود سابسترات تخمیر سیتريك اسيد به شمار می آید و ضمن آنکه روند کاهشی قند باقیمانده موجود در محلول تخمیری سیری معمول را داشته است، در تخمیر با ملاس تیمار شده و با استفاده از سلول های تثبیت یافته سیر افزایشی قند به مصرف رسیده وضعیتی کمابیش نمایی از خود ابراز نموده است. قند به مصرف رسیده خود می تواند به عنوان شاخصی در جهت تولید سیتريك اسيد و نیز تولید توده سلولی منظور گردد. سیر تغییرات غلظتی قند به مصرف رسیده در طی تخمیر لذا جهت ارائه رابطه ای در این فرایند تخمیری مورد ملاحظه قرار گرفته است $\frac{ds'}{dt} = K (s')$ و ثابت شدت واکنش درجه اول (قند به مصرف رسیده) در حد $3.452 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ تعیین گردید.

Production of Citric Acid from Chemically Treated Cane Molasses by Immobilized Cells of Aspergillus niger

F. Vahabzadeh
Associate Professor

S. Amiri
M.Sc Student

Chemical Engineering Department,
Amirkabir University of Technology

Abstract

Citric acid was produced from cane molasses treated chemically with tricalcium phosphate, by *Aspergillus niger* which was entrapped in calcium alginate beads. The citric acid fermentation was carried out in shake flasks and in order to get comparable results some other treatments were also conducted: treated and untreated-cane molasses as the substrate for the fermentation and using *A. niger* in the form of free cells, untreated cane molasses and using *A. niger* in the form of immobilized cells. Time course(s) of three main operational variables in the citric acid fermentation were determined: citric acid produced, sugar utilized, sugar available (residual sugar) (both of these sugars were calculated as reducing sugar). Moreover, at the end of fermentation period (14 days) biomass yield was also determined (amount of biomass produced dry weight based on amount of sugar utilized). With approach taken for comparing the trend of changes in concentration of the main fermentation parameters over time, results were discussed in detail and it was concluded that production of citric acid from treated cane molasses with using the immobilized cells was the most suitable conditions for the fermentation among other treatments. Citric acid concentration was 7.76 g/L (average value) and its yield based on amount of sugar utilized was 10.3%.

In studying fermentation processes, it is desirable to use a mathematical model to present the kinetic behavior of product formation. Using such a mathematical formula to present the results could make some simplicity in studying the mechanism of the fermentation. In order to provide a rate expression for a fermentation in most cases, however, one uses data from the plot of changes in substrate concentration versus time. In this research trend of decrease in substrate concentration over time (residual sugar in fermentation medium) showed to have a typical pattern, on the other hand changes in citric acid concentration during fermentation time had some fluctuation. The trend of increasing in sugar utilized during fermentation showed an exponential form and could be treated as first-order reaction. Rate of increasing in sugar utilization was taken as index for citric acid production along the biomass formation. First order rate constant was calculated as $3.452 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$.

مقدمه

بالایی برخوردار می باشد (1). اگرچه این امکان هست که تولید سیتریک اسید از طریق شیمیایی نیز به انجام رسد، ولی این فرایند در مقایسه با تولید از طریق تخمیر، از هزینه های عملیاتی به مراتب بالاتری برخوردار بوده و تخمیر، عمده طریق تولید این اسید آلی است (32). در فرایند تخمیر از انواع گوناگونی از ترکیبات آلی به عنوان ماده اولیه (سابسترایت) استفاده شده است. البته در این میان ملاس به عنوان محصولی جانبی از صنعت قند در موقعیت ترجیح یافته ای جای گرفته است (در این رابطه به صورتی معمول به سهولت در دسترس و موجود بودن ملاس و به قیمت نسبتاً پایین آن اشاره می شود)

سیتریک اسید $[\text{COOH-CH}_2\text{C(OH)-COOH-CH}_2\text{-COOH}]$ ماده ای حد واسط در چرخه TCA نخست بار در ۱۷۸۴ از منبعی طبیعی از مرکبات (آب لیمو) جداسازی شده و بلورینگی آن نیز به صورت کلسیم سیترات به انجام رسیده است (6, 1). این اسید آلی در منابع طبیعی متعدد و مختلف از حضوری گسترده برخوردار است (1). باتوجه به مشخصه هایی چند، نظیر حل شدگی بالا، مطبوع بودن مزه و طعم و به ویژه غیر سمی بودن، کاربرد این اسید آلی در صنایع غذایی در گستره وسیعی قرار گرفته است. ضمن آنکه سیتریک اسید در سایر بخش های صنایع شیمیایی از قبیل صنعت داروسازی و مواد آرایشی، بهداشتی، شوینده، ... نیز از مصرف

(19,30). در فرایند تخمیر سیتریک اسید همچنان از چندین نوع از گونه های میکروبی استفاده شده است. ضمن آنکه قارچ الیافی شکل اسپرجیلوس نایجر به داشتن نقشی بهتر و مطلوبتر در تولید سیتریک اسید شهرت یافته است (21). در تولید سیتریک اسید با استفاده از ملاس صنعت قند، عمده فرایندهای تخمیری رو به سوی به کارگیری اسپرجیلوس نایجر به شکل سلول های آزاد، جهت داشته است (21). در تولید سیتریک اسید به روش معلق سازی توده سلولی در مایع تخمیر (کشت غوطه ور) عملیات جداسازی محصول از محیط تخمیر و توده زیستی با مشکلاتی چند همراه است، ضمن آنکه ضرورت استفاده از دستگاه هایی نظیر سانتریفوژ و صافی های مخصوص در فرایندهای پیوسته برای نگهداری توده زیستی در فرمنتور موضوع شناخته شده و مشخصی می باشد (26). به علاوه در روند کنترل فرایند تخمیر نظیر کنترل وضعیت اکسیژن محلول نیز باید کارایی فرایند تخمیر پیوسته حفظ گردد. نکاتی از این قبیل استفاده از توده سلولی تثبیت یافته را در تولید تعدادی چند از محصولات تخمیری در موقعیت و وزنه سنگین تری قرار داده است (7). در تثبیت سلولی نیز از مفاهیم، روش ها و موادی که در اصل منتسب به موقعیت تثبیت آنزیمی می باشند، بهره گرفته می شود (8,28). تثبیت سلولی به روش احاطه سازی سلول ها در یک ژل آبدار درگیر مخلوط سازی سلول ها با یک پلیمر محلول در آب است، به گونه ای که در ادامه، ژلی شدن پلیمر با اضافه گردیدن عوامل شیمیایی مرتبط ساز به انجام می رسد. در مورد الژینات اضافه نمودن کاتیونهای نظیر کلسیم، نقشی القایی در ژلی شدن دارد. ورود قطره ای مخلوط سلول - سدیم الژینات به محلولی حاوی کاتیونهای چند ظرفیتی در لحظه به تشکیل ذرات ژلی کروی شکل می انجامد و سلول ها در یک شبکه سه بعدی پلیمری با ارتباطات عرضی یونی احاطه می گردند (8).

حضور ترکیبات متعددی در ملاس با ماهیت آلی و نیز به شکل فلزات اندک مقدار، به کاهش کارایی این سبسترات در تولید سیتریک اسید به روش تخمیر منتهی می گردد، از این رو بر استفاده از تیمارهایی با ماهیتی عمدتاً شیمیایی پیشنهاداتی ارائه شده است (2, 13).

در این تحقیق با انجام تیماری شیمیایی بر ملاس نیشکر (استفاده از برای کلسیم فسفات) و به کار گرفتن

قارچ الیافی شکل اسپرجیلوس - نایجر به شکل سلول هایی تثبیت یافته در دانه های ژلی کلسیم الژینات، تولید سیتریک اسید در سیستم تخمیر ناپیوسته مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. با توجهات ارائه شده بر نتایج کسب شده سپس از سیر زمانی تغییرات غلظت قند به مصرف رسیده استفاده و بر روند تخمیر در تولید سیتریک اسید تحلیلی کنترلی صورت گرفته است.

بخش عملیاتی - مواد و روش ها ارگانیسیم، محیط کشت، و تهیه سوسپانسیون میکروبی

در این تحقیق از قارچ مایسیلیومی اسپرجیلوس - نایجر ATCC9142 تهیه شده از مجموعه میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران استفاده گردید. در نخست برای رشد و نیز حفظ ارگانیسیم مزبور از محیط PDA² استفاده شد. با به کار گرفتن ابزار و وسایل معمول و متعارف آزمایشگاهی آنگاه بخش مناسبی از اسپوره های رشد یافته میکروارگانیسیم به لوله آزمایش های حاوی محیط³ PSA منتقل گردیده و دما و زمان گرمخانه گذاری به ترتیب 30°C و هفت روز در نظر گرفته شد (33, 7). پس از دو بار انتقال اسپوره های میکروارگانیسیم به محیط³ PSA، حجم معینی آب مقطر استریل به لوله های آزمایش حاوی میکروارگانیسیم اضافه شده و سوسپانسیون میکروبی تهیه شده آماده تثبیت سلولی گردید.

تثبیت سلولی

از الژینات سدیم⁴ محلول آبی با غلظت 3.3% و از کلراید کلسیم نیز محلولی با غلظت 2% تهیه و هر یک از محلول ها به صورت جداگانه در دمای 121°C به مدت زمان 15 دقیقه استریل گردیدند. با به کار گرفتن سرنگی مناسب به ازای هر 4 گرم از محلول الژینات سدیم حجمی برابر 1 میلی لیتر از سوسپانسیون اسپور را در نظر گرفته و مخلوطی از الژینات و سوسپانسیون میکروبی تهیه و در شرایطی کاملاً استریل این مخلوط به بورت منتقل گردید و با تنظیم باز و بسته نمودن شیر بورت مخلوط فوق را قطره به قطره به ظرفی حاوی محلول کلراید کلسیم وارد نموده و قطر تقریبی ذرات سلولی تثبیت یافته در حدود 2-3 میلی متر بوده و با جمع آوری این ذرات، دانه های سلولی به مدت زمان دو ساعت و در دمای معمول محیط در محلول کلراید کلسیم نگهداری

شدند. با استحکام یافتن تدریجی ذرات سلولی تثبیت یافته، دانه های مزبور سپس با استفاده از محلول نمک فیزیولوژیک شستشو داده شدند (33).

آماده سازی سابسترایت تخمیر

در این تحقیق از ملاس نیشکر کارخانجات قند به عنوان سابسترایت تخمیر استفاده گردید. باتوجه به برگه مشخصه های شیمیایی ملاس مزبور، محتوای قند نمونه برحسب کل قندها با توان احیاکنندگی در حدود 50% بوده است. از این رو جهت تنظیم مقدار قند سابسترایت تخمیر، رقیق سازی ملاس با آب مقطر در نسبت وزنی 1 به 1/2 (ملاس: آب) به انجام رسیده و در نهایت مقدار ملاس اولیه به واحد حجم محلول رقیق شده در حد 0.4% (w/v) قرار گرفت.

تیمار شیمیایی ملاس

با به کار گرفتن pH متر آزمایشگاهی و استفاده از محلول سدیم هیدرواکساید 1N و 0.1N، pH محلول ملاس رقیق شده در حد 7 pH تنظیم گردید. سپس به ملاس مزبور برای کلسیم فسفات اضافه گردید (2% w/v). با استفاده از یک گرمکن الکتریکی مخلوط حاصله تا به حد دمای 40°C حرارت داده شده و پس از همزنی مناسب و تهیه سوسپانسیونی تقریباً یکنواخت، مخلوط به مدت پنج ساعت در دمای 40°C حفظ گردیده و پس از طی این مدت از دمای مخلوط کاسته شده و با رسانیدن دما به دما معمول محیط سوسپانسیون مزبور با استفاده از سانتریفوژ آزمایشگاهی در 3000 rpm و به مدت زمان 15 دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی و شفاف حاصل از سانتریفوژ سپس جمع آوری شده و به مدت زمان 10 دقیقه در اتوکلاو و در دمای 105°C استریل گردید (9, 33).

شرایط تخمیر در تولید سیتریک اسید به روش ناپیوسته

به دنبال استفاده از برای کلسیم فسفات و انجام تیمار شیمیایی بر ملاس، تخمیر و تولید سیتریک اسید توسط سلول های آسپرژیلوس - نایجر، به شکل ناپیوسته و به ترتیب زیر صورت گرفت: حجم 50 میلی لیتر از محلول ملاس را به ارلن مایرهای 250 میلی لیتری منتقل نموده و برای مواردی که بررسی تولید سیتریک اسید توسط سلول های آزاد آسپرژیلوس -

نایجر مورد نظر بود حجمی معین از سوسپانسیون میکروبی (1ml) به ارلن مایرهای حاوی 50ml سابسترایت اضافه گردید. در مواردی که تولید سیتریک اسید توسط سلول های تثبیت یافته در نظر بوده است، مقدار 10 گرم از سلول های تثبیت یافته را به ارلن مایرهای حاوی 50ml سابسترایت اضافه شد. به منظور گرمخانه گذاری ارلن مایرهای آماده شده به شرح فوق از یک دستگاه شیکر انکوباتور^۵ و در دمای 30°C استفاده گردید - روند تخمیر به مدت زمان 336 ساعت (چهارده روز) تحت بررسی قرار گرفته است.

سه متغیر اصلی عملیاتی در تخمیر سیتریک اسید با استفاده از روش های ذیل اندازه گیری و تعیین گردیدند: تعیین و اندازه گیری سیتریک اسید به روش مورد اشاره در مرجع 16 صورت گرفت (منحنی معیار و استاندارد در روش طیف سنجی نوری استیک انهایدر و پایریدین^۶ ($\lambda = 420 \text{ nm}$) در محدوده 20-200ug/ml در تغییر می باشد). (16,33)

آبکافت سابسترایت ملاس نیشکر و تعیین و اندازه گیری قند با توان احیاکنندگی به روش مورد اشاره در مراجع (11, 17, 33) انجام پذیرفت (منحنی معیار و استاندارد در روش طیف سنجی نوری دای نیتروسالیسیلیک اسید^۷ ($\lambda = 540 \text{ nm}$) در محدوده 0.2-1.2mg/ml در تغییر می باشد).

تعیین و اندازه گیری فلزات اندک مقدار آهن، روی، منگنز با استفاده از روش طیف بینی جذب اتمی^۸ مطابق شرح موجود در مرجع 33 به انجام رسید (29, 33).

نتایج و تفسیر

سیر زمانی تغییرات غلظت سیتریک اسید تولید شده، مقدار قند (با توان احیاکنندگی) باقیمانده یا موجود در محلول تخمیری و نیز قند (با توان احیاکنندگی) به مصرف رسیده در طی روند تخمیر در شکل ۱ ارائه شده است.^۹ در محلول تخمیری ملاس تیمارنا شده و با استفاده از آسپرژیلوس - نایجر به شکل سلول های آزاد (untid. fr. cl.) در محدوده زمانی 70-72 ساعت پس از شروع تخمیر غلظت سیتریک اسید اگر چه در حد 9.88 g/L بوده است، ولی در روند تولید اسید مزبور سیری کاهشی آغاز می شود و به نحوی که در شکل ۱ - الف ملاحظه می گردد، غلظت در پایان زمان تخمیر (چهارده روز) افتی در حدود 46% را نشانگر است (شکل (۱) - الف). این سیر نزولی که به ویژه در مرحله

زمانی 1/5 پایانی تخمیر محسوس و مشخص می باشد، در مورد روند تغییراتی سه تخمیر دیگر حاصل نگردیده است (td.imb.cl. و td.fr.cl. و untd.imb.cl.) (شکل (۱) - ب تا ت). به واقع در تولید سیتریک اسید در محدوده زمانی 5-6 روز پس از آغاز تخمیر افتی مشاهده می شود که در سه روند تخمیری مورد اشاره قبلی این وضعیت کاهشی به صورت کمابیش ثابت و تا محدوده یازده روز حفظ می گردد، و لی در مرحله زمانی 1/5 پایانی تخمیر در نهایت تغییرات غلظتی اسید مزبور سیری صعودی از خود ابراز می دارد (به شکل (۱) - ب تا ت توجه نمایید). این تغییرات غلظتی در دو روند تخمیر به ویژه در مواردی که در آن از میکروارگانسیم به شکل سلول های تثبیت یافته در کلسیم الژینات استفاده شده است (td.imb.cl. و untd.imb.cl.) از شباهت نسبی خوبی به یکدیگر برخوردارند (شکل (۱) - ت و پ). تولید سیتریک اسید در مرحله پایانی از برای این دو روند تخمیر نسبت به تولید اسید در 72 ساعت به ترتیب در حدود 1.2 برابر (td.imb.cl.) و نیز 1.4 برابر (untd.imb.cl.) افزایش را نشانگر می باشد.

در روند تغییرات غلظت سیتریک اسید تولیدی در طی مسیر تخمیر چه در مواردی که در آن از سلول های قارچی به شکل آزاد استفاده شده است و چه در مواردی که از شکل تثبیت یافته سلول های قارچی در آن بهره گرفته شده باشد، نوساناتی مشاهده و گزارش گردیده است (26,31). پی گرفته شدن روندی کاهشی در طی مراحل پایانی تخمیر سیتریک اسید می تواند وضعیتی نسبتاً مشخص به شمار آید (4, 13, 15, 22, 26). ضمن آنکه در گزارشات چند به وجود سیر زمانی نوسانی در تغییرات غلظتی سیتریک اسید (افزایش - کاهش - افزایش) اشاره شده است (4, 26).

بررسی های بسیاری بر حضور فلزات در محیط کشت و نیز در محیط تخمیر و تولید سیتریک اسید توسط قارچ آسپرژیلوس - نایجر صورت گرفته است و نتایج حاصله به نقش مهم تعدادی از این فلزات اشاره دارند (21). برای مثال در مورد منگنز و در سطوح کاهش یافته آن، از فعالیت آنزیم های مطرح در مسیر بیوشیمیایی پنتوزفسفات^{۱۱} و چرخه سیتریک اسید کاسته شده و این وضع در به اجرا رسیدن واکنش های زیست ساختی تأثیری ناهماهنگ کننده دارد، از جمله تجمع یافتن یون های NH_4^+ است که خود ناشی از برهم خوردگی روند زیستی ساختی و نیز برگردان پروتئینها

است (21). غلظت های بالا NH_4^+ تنظیم کننده ای بسیار قوی بر نقش و فعالیت فسفوفروکتوزکیناز (PFK)^{۱۱} است و به عبارتی بارها گشتن PFK در سیستم از نقش بازدارندگی سیترات برگلایکولیز^{۱۲} کاسته می گردد (2, 21). در رابطه با حضور و نقش آهن و مس و نیز روی در محیط کشت و نیز در محیط تخمیر و تولید سیتریک اسید توسط آسپرژیلوس - نایجر مطالعات نسبتاً زیادی صورت گرفته است (2, 5, 20, 21). در تهیه محیط کشتی شیمیایی و نیز آماده سازی آن جهت تخمیر به غلظت آهن در حد 0.5 g/L اشاره شده که بازدهی تولید سیتریک اسید (به ازاء مقدار قند تأمین شده) در این زمینه در محدوده 88% بوده است. در حالیکه افزایش سطح آهن در محیط تخمیر به 10 mg/L کاهش بازدهی تولید اسید مزبور تا به حد 39% را به دنبال داشته است (20). از سوی دیگر همراه ساختن آهن در غلظت 10mg/L با مس در سطحی در حد 50mg/L منجر به بازدهی تولید سیتریک اسید در محدوده 78% گشته است (20).

از برای کلسیم فسفات^{۱۳} (TCP) به عنوان ماده ای شیمیایی جهت کاهش جزء غیر آلی و معدنی ملاس نیشکر استفاده شده است (13). در تحقیق در دست نتایج مربوط به اندازه گیری فلزات اندک مقدار حاصل از انجام تیمار TCP بر ملاس نیشکر به شرح زیر می باشد:

فلز	نمونه ملاس (mg/L)	ملاص تیمار شده (mg/L)
آهن	35	23.1
روی	15	13.35
منگنز	11.5	10.23

در این تحقیق به کار گرفتن TCP در اجرای تیمار بر نمونه ملاس نیشکر موجب کاهش آهن در سطح 34% و روی و منگنز هر یک 11% بوده است و این میزان کاهش برای روی و آهن در حدی به مراتب کمتر از کاهش این دو فلز در استفاده از TCP در تیمار ملاس نیشکر در تحقیق ارائه شده در مرجع 13 است. البته ذکر این نکته بی مناسبت نخواهد بود که مقدار فلز در مرحله اولیه و پیش از اجرای تیماری بر ملاس نیشکر مورد استفاده در تحقیق گزارش شده در مرجع در محدوده ای به شرح زیر قرار دارد (mg/L): روی (33.1)، آهن (48.8)، و منگنز (3.17). سیر زمانی تولید سیتریک اسید در شکل

۱ - الف ، و ب به نقش و عملکرد مؤثر TCP در تیمار ملاس اشاره دارد.

سیر زمانی تغییرات مقدار قند باقیمانده (قند موجود) و نیز غلظت قند به مصرف رسیده همراه با تغییرات غلظتی سیتریک اسید در طی تخمیر در شکل ۱ و برای روندهای تخمیری مختلف ارائه شده است. همانند تخمیرهای گزارش شده در دیگر تحقیقات انجام شده در تولید سیتریک اسید، سیر تغییرات سطح و غلظت قند در این تحقیق از روندی معمول و متعارف برخوردار می باشد (افزایش در میزان قند به مصرف رسییده و کاهش در مقدار قند باقیمانده در محلول تخمیر) (9,10, 3, 12, 22, 25). میانگین غلظت قند باقیمانده موجود در محلول تخمیری و نیز میانگین قند به مصرف رسیده برای روندهای تخمیری مختلف در این تحقیق محاسبه شده و مقادیر در جدول ۱ ارائه گردیده است. مقدار قند باقیمانده موجود در روند تخمیر در تیمارهایی که در آن از میکروارگانیزم آسپرژیلوس - نایجر به شکل سلول های تثبیت یافته استفاده شده است، در حدود 149 g/L بوده است. در حالیکه با به کار گرفتن میکروارگانیزم مزبور به شکل سلول های آزاد و در مقایسه با روندهای تخمیری *td.imb.cl.* و *unttd.imb.cl.* مقدار قند موجود در محلول تخمیر در حدود 13% افزایش را نشانگر می باشد. البته از نظر «درصد» قند باقیمانده (میانگین) تفاوتی چندانی میان روندهای تخمیری مختلف مشاهده نمی گردد (جدول ۱). همچنین از سوی دیگر با به کار گرفتن آسپرژیلوس - نایجر به صورت سلول های تثبیت یافته، غلظت قند به مصرف رسیده در طی تخمیر (میانگین) در حدود 74-75 g/L بوده است که این مقدار در حدود 38% بیش از غلظت قند مصرف شده در مواردی است که در آن از میکروارگانیزم مورد اشاره به شکل سلول های آزاد استفاده گردیده است. از نظر «درصد» قند به مصرف رسیده در روندهای تخمیری *td.fr.cl.* و *unttd.fr.cl.* (33.3% و 27.3%) و در مقایسه با *unttd.imb.cl.* و *td.imb.cl.* کاهش می شود (53.6% و 51.4%) (جدول ۱). در تولید سیتریک اسید از ملاس چغندر با استفاده از آسپرژیلوس - نایجر به شکل سلول های تثبیت یافته، آن هنگام که 45% قند به مصرف رسیده در مسیر بیوشیمیایی به سیتریک اسید تبدیل شده است، تولید این اسید به حداکثر خود گزارش گردیده است (35 g/L) سیتریک اسید پس از طی 28 روز

تخمیر (22). در مواردی که ضمن به کار گرفتن آسپرژیلوس - نایجر به شکل سلول های تثبیت یافته از محیط شیمیایی آماده سازی شده حاوی سبوس (250 g/L) جهت تخمیر استفاده شده است، آن هنگام که درصد قند به مصرف رسیده در حدود 19% بوده است، سطح تولید سیتریک اسید در حد 21 g/L و به حداکثر خود گزارش شده است (7, 21).

نتایج حاصل از تعیین توده سلولی در روند تخمیر به ازاء مقدار قند به مصرف رسیده در شکل ۲ ارائه شده است (بازدهی تولید توده سلولی y_6^{14}). در روند تخمیر *td.imb.cl.* بازدهی تولید توده سلولی در مقایسه با این کمیت در سه روند تخمیری دیگر در پایین ترین حد قرار داشته و در مقایسه با بازدهی تولید توده سلولی در تخمیر *td.fr.cl.* و *y_6*، حدود 48% کاهش را نشانگر است (شکل ۲). در روند تخمیر با استفاده از سلول های آزاد آسپرژیلوس - نایجر توده سلولی با افزایش زمان تخمیر از دیاد یافته است، به نحوی که در مراحل پایانی تخمیر توده سلولی تمامی سطح ارلن مایر فلاسک را اشغال نموده بود. تأمین اکسیژن به این ترتیب با مشکلاتی همراه خواهد بود. تولید سیتریک اسید توسط آسپرژیلوس - نایجر با افزایش میزان اکسیژن محلول در سیستم تخمیر از دیاد می یابد (21). با توجه به اینکه تخمیر ناپیوسته در اغلب موارد در ارلن مایر فلاسک به انجام می رسد، تأمین اکسیژن برای سلول ها به ویژه در شبکه دانه های ژلی کلسیم الزیئات در نهایت با محدودیت هایی روبرو شده و لذا در روند تولید سیتریک اسید نیز اشکال و پیچیدگی هایی حاصل خواهد شد (21). در رابطه با تخمیر با استفاده از سلول های تثبیت یافته آسپرژیلوس - نایجر، مشاهدات به متورم گشتن دانه های ژلی کلسیم الزیئات اشاره داشته است، ضمن آنکه در مراحل پایانی تخمیر مشاهده رشته های الیافی شکل قارچی در محلول تخمیر به رشد سلولی خارج از دانه های ژلی نشان دارد. در گزارشات تحقیقاتی به تورم در دانه های ژلی کلسیم الزیئات در طی روند تخمیر سیتریک اسید اشاره شده است، ضمن آنکه در مواردی نیز گزارش بر این بوده است که پس از تثبیت سلولی با گذر زمان تخمیر اندازه ذرات و دانه های ژلی کاهش یافته است (7, 8). به واقع با گذر زمان در روند تخمیر سیتریک اسید به گونه ای مشخص از توان و قدرت مکانیکی دانه های کلسیم الزیئات حاوی آسپرژیلوس - نایجر کاسته می شود (8). نشأت کلسیم از پلیمر الزیئات

احاطه کننده سلول ها در ابتدای مرحله تولید سیتریک اسید و نیز رشد قارچ در دانه های ژلی و به اجرا رسیدن واکنش هایی آنزیمی و آبکافتی با نقشی پلیمرزدا بر شبکه مولکولی الژینات از جمله عوامل اصلی در کاهش توان مکانیکی دانه های ژلی به شمار می آیند (21). در تأیید این مطلب اینکه رشد قارچ آسپرژیلوس - نایجر به شکل سلول های آزاد در محیط تخمیری حاوی سدیم الژینات با کاهشی قابل ملاحظه در گرانشی محلول همراه می باشد (8). حال با توجه به شکل ۱ و مطالب ارائه شده در این رابطه (قابل مقایسه بودن سیر زمانی تغییرات غلظتی سیتریک اسید تولیدی در دو روند $td.imb.cl.$ و $unt.d.imb.cl.$ با یکدیگر و نیز افت قابل ملاحظه در تولید اسید مزبور در روند $(unt.d.fr.cl.)$ و نیز با ملاحظه داشتن نتایج y_0 ارائه شده در شکل ۲ (قابل مقایسه بودن حد و مقدار y_0 در دو روند تخمیری $td.imb.cl.$ و $unt.d.fr.cl.$ در نهایت به روند تخمیری $td.imb.cl.$ توجه شده و می توان اظهار نمود که سیر تغییرات غلظتی قند به مصرف رسیده از موقعیت افزایشی معقول و متناسبی برخوردار می باشد. (شکل ۱) - ت) ضمن آنکه میانگین درصد قند به مصرف رسیده از برای روند تخمیری $td.imb.cl.$ در حد 54% تعیین شده است (جدول ۱). از برای روند تخمیری $td.imb.cl.$ در شکل ۳ نمودار تغییرات غلظت سیتریک تولیدی در ارتباط با سیر در تغییر مقدار قند در تخمیر تهیه و ارائه شده است: مقدار سیتریک اسید تولید شده به ازاء سطح و میزان قند به مصرف رسیده در طی تخمیر^{۱۵}. در رابطه با سیتریک اسید تولیدی به ازاء قند به مصرف رسیده (درصد) ارقام و نتایج متعددی گزارش شده است که به چند مورد برای مثال اشاره می شود: 24-45% (از برای سابسترایت ملاس چغندر قند از آسپرژیلوس - نایجر تثبیت یافته در دانه های ژلی کلسیم الژینات)، 58% (از برای سابسترایت محیط شیمیایی آماده سازی شده (سوکروز) با استفاده از آسپرژیلوس - نایجر تثبیت یافته بر دانه های متخلخل سلولزی (13, 26). با توجه به شکل ۱ - ت میانگین غلظت سیتریک اسیدی تولیدی در روند تخمیری $td.imb.cl.$ در محدوده 7.76 g/L قرار می گیرد و با در نظر گرفتن میانگین مقدار قند به مصرف رسیده در این تخمیر 75.6% g/L (جدول ۱) بازدهی تولید سیتریک اسید به ازاء مقدار قند به مصرف رسیده در حدود 10.3% است. در تقسیم بندی رفتار کنتیکی تخمیرهای مختلف با

استفاده از مفاهیم معرفی شده توسط گدن^{۱۶} به صورتی سنتی تخمیر سیتریک اسید در نوع II این مجموعه رفتاری طبقه بندی شده است، محصول اصلی به گونه ای غیر مستقیم از اجرای سوخت و ساز زیستی انرژی زا در سیستم سلولی حاصل می گردد (24, 14). الگو واکنشی با پیچیدگی هایی چند همراه است: سیتریک اسید به عنوان محصولی اصلی در روند متابولیسی سلول در تحت شرایط معمول به میزان و مقدار مناسبی از سیستم به اصطلاح ترشح و رهاسازی نمی گردد. رهاسازی در حد و میزانی قابل ملاحظه منوط به برقراری وضعیتی به شدت بی نظم در روند متابولیسی است و از جمله در این زمینه به ایجاد ناتوانی در سوخت و ساز زیستی اشاره شده است (14, 21). از آنجا که ساخت زیستی محصول با به مصرف رسیدن قند (منبع سوخت زیستی) دو مقوله مرتبط به یکدیگر به شمار می آیند، انتظار بر برقراری نوعی ارتباط و هم بستگی معقول میان این دو متغیر تخمیری (تولید سیتریک اسید و به مصرف رسیدن کاربوهایدرات) است، ضمن اینکه این ارتباط از وضعیتی ساده و بدون پیچیدگی پیروی نمی نماید (19). همانگونه که اشاره شد در این تحقیق سیر زمانی تغییرات غلظتی سیتریک اسید تولیدی از روندی پیوسته در جهت افزایش برخوردار نبوده است. از سویی البته در روند تغییرات پیوسته و نیز در جهت افزایش مقدار قند به مصرف رسیده در روند تخمیر $td.imb.cl.$ نخست افزایشی نسبتاً سریع حاصل شده و این به مصرف رسیدن قند سپس به موقعیتی کمابیش ثابت منتهی می گردد، به عبارتی این تغییر به سیری نمایی در شباهت می باشد (شکل ۱ - ت). در این ارتباط لذا از رفتار کنتیکی واکنش های درجه اول مشابهی می توان بهره گرفت.

در تولید لاکتیک اسید از طریق تخمیر و با استفاده از باکتری های گونه لاکتوباسیلا^{۱۷} به منظور ارائه توضیحی برای سیر زمانی تحولات کاهشی سابسترایت تخمیر و نیز افزایش محصول (لاکتیک اسید) رفتار کنتیکی مشابهی مورد نظر و ملاحظه قرار گرفته است (18). همچنین در هیدروژناسیون زیستی^{۱۸} فیومرایت و تبدیل آن به اسید آلی سوکسنیک با استفاده از باکتریهای احیاکننده سولفات^{۱۹}، سیر زمانی در کاهش فیومرایت و افزایش محصول مربوطه، به نحوی در تغییر است که جهت ارائه توضیحی بر آن از یک کنتیکی درجه اول کمک گرفته شده است (27).

به منظور ارائه بیانی ریاضی برای رشد قارچ الیافی

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$$

$$q_p = \frac{1}{p} \frac{dp}{dt}$$

هر یک از دو ضریب $y_{x/s}$ و نیز $y_{p/s}$ را می توان عبارتی ضرب شده در سمت راست تساوی فوق فرض نمود. در این زمینه به نکته زیر توجه شود:

$$\frac{dx/dt}{-ds/dt} = y_{x/s}$$

$$\frac{dp/dt}{-ds/dt} = y_{p/s}$$

و

و باتوجه به روند تخمیری $td.imb.cl.$ و نیز اظهارات بیان شده در فوق شدت، سرعت افزایش در قند به مصرف رسیده می تواند جایگزین شدت کاهش در مقدار سابسترایت (کاهش در قند باقیمانده موجود) گردد

$$\left(\frac{ds}{dt} = + \frac{ds'}{dt}\right)$$

s' نمادی برای مقدار قند به مصرف رسیده در حین تخمیر است.

$$+ \frac{ds'}{dt} = \frac{\mu}{y_{x/s}} (x) + \frac{k}{y_{p/s}} (p)$$

تغییرات شدت و سرعت افزایش در قند به مصرف رسیده در حین تخمیر $\frac{ds'}{dt}$ را نیز می توان به صورت رابطه زیر نوشت: $\frac{dx'}{dt} = k (s')$ که پس از انتگرالگیری از رابطه فوق، تغییرات s' در مقابل زمان می تواند به شکل رابطه خطی زیر ارائه گردد:

$$\log (s')_{t_2} = \frac{k}{2.303} (t_2 - t_1) + \log s'_{t_1}$$

s'_{t_2} : غلظت قند به مصرف رسیده در زمان t_2

s'_{t_1} : غلظت قند به مصرف رسیده در زمان t_1

با به کار گرفتن رابطه خطی فوق از برای روند تخمیری $td.imb.cl.$ در نهایت شکل ۴ ارائه می شود. باتوجه به مفاهیم مورد اشاره در فوق ثابت شدت واکنش درجه اول افزایش در مقدار قند به مصرف رسیده در حین تخمیر، برابر است با: $K = 3.452 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$

ثابت شدت فوق به واقع می تواند منتج از دو جزء

شکل آسپر جیلوس - نایجر در تولید سیتریک اسید مدل هایی چند پیشنهاد شده و مورد استفاده قرار گرفته اند، از جمله به مدل های زیر اشاره شده است (23):

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu t$$

$$X_t = X_0 + Kt$$

$$X^{1/3}_t = X^{1/3}_0 + Kt$$

ارزیابی میزان خطی بودن هر یک از مدل های پیشنهادی فوق درجه سازگاری و متناسب بودن مدل کنتیکی به مشاهدات تجربی را نشانگر می باشد (23). باتوجه به تثبیت سلولی و به دور گشتن رشد قارچ آسپر جیلوس - نایجر از موقعیت رشد الیافی شکل گسترده در محلول تخمیری و نیز مشاهده سیر تغییراتی قند به مصرف رسیده در تخمیر $td.imb.cl.$ و نیز با ملاحظه داشتن به مفاهیم فوق در رابطه با تخمیر لاکتیک اسید و نیز هیدروژناسیون زیستی فیومرایت در روند تخمیری $td.imb.cl.$ شدت و سرعت افزایش قند به مصرف رسیده و در حین تخمیر به عنوان شاخصی در جهت بیان توضیحی برای تشکیل توده سلولی و در همراهی با تولید سیتریک اسید در نظر گرفته می شود. در ارائه توضیحاتی کمی برای رشد میکروبی و نیز تشکیل محصول، مفاهیم زیر می تواند مورد ملاحظه قرار گیرد (24):

$$- \frac{ds}{dt} = \frac{1}{y_{x/s}} \frac{dx}{dt} + \frac{1}{y_{p/s}} \frac{dp}{dt}$$

رشد به صورت تشکیل محصول (تولید سیتریک اسید) + رشد به صورت تشکیل توده سلولی = کاهش در میزان سابسترایت

در این کاهش سابسترایت $y_{x/s}$ ضریب تولید توده سلولی و $y_{p/s}$ ضریب تولید محصول، هر یک به ازای سابسترایت به مصرف رسیده تعریف می شوند (24):

$\frac{dx}{dt}$ و نیز $\frac{dp}{dt}$ عباراتی با توضیح ذیل می باشند:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\mu}{y_{x/s}} (x)$$

و

$$\frac{dp}{dt} = \frac{q_p}{u_{p/s}} (p)$$

از این رو شدت و سرعت ویژه در تولید توده سلولی و نیز در تشکیل محصول، عبارتند از:

قند به مصرف رسیده که وضعیتی نمایی از خود ابراز نموده و به رفتار واکنش‌های درجه اول منتسب می‌گردد، استفاده گردید. در این بیان ریاضی به علت وجود نوساناتی در سیر زمانی تغییرات غلظتی سیتریک اسید از موقعیت تشکیل محصول (سیتریک اسید) استفاده نشد. قند به مصرف رسیده در طی تخمیر، خود می‌تواند شاخصی در جهت تولید توده سلولی و نیز تولید سیتریک اسید منظور گردد. ثابت شدت واکنش درجه اول در این زمینه در حد $3.452 \times 10^{-3} \text{hr}^{-1}$ محاسبه و تعیین شده است.

زیر نویس‌ها

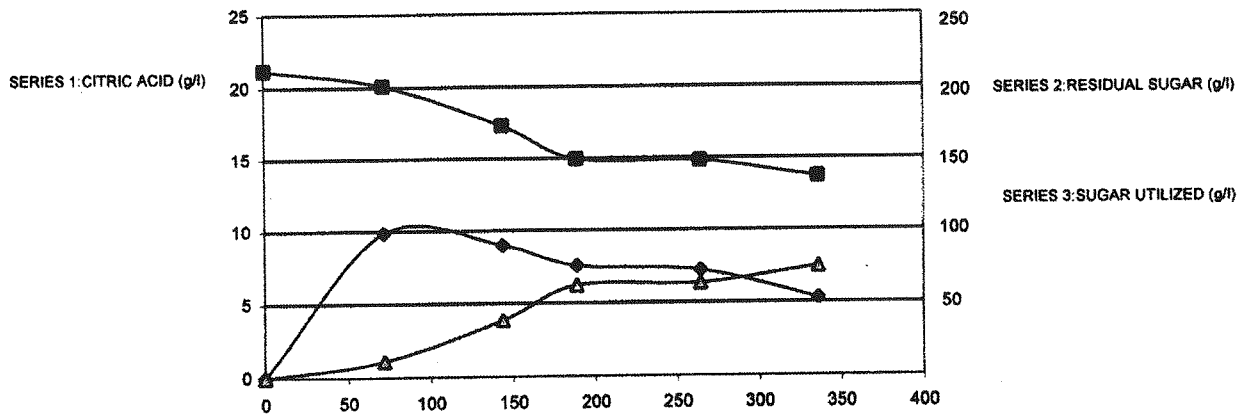
- 1- tricarboxylic acid cycle
- 2 - potato dextrase agar
- 3 - potato sucrose agar
- 4 - sodium alginate
- 5 - shaker incubator
- 6 - acetic anhydride - pytidine
- 7 - dinitrosalicylic
- 8 - atomic absorption spectroscopy
- ۹ - عبارات مورد اشاره در این متن اصطلاحات مخفف شده‌ای در این تخمیر به شرح ذیل می‌باشند:
td: ملاس تحت تیمار قرار گرفته (treated molasses)
unttd: ملاس تیمار نشده (untreated molasses)
imb.cl: میکروارگانسیم به شکل سلول‌های تثبیت یافته در کلسیم الژینات (immobilized cells)
fr.cl: میکروارگانسیم به شکل سلول‌های آزاد (free cells)
- 10 - pentose phosphate pathway
- 11 - phosphofructokinase (PFK)
- 12 - glycolysis
- 13 - tricalcium phosphate (TCP)
- 14 - biomass yield (y_p)
- 15 - yield of citric acid-based on amount of sugar utilized
- 16 - Gaden
- 17 - Lactobacilli
- 18 - biohydrogenation
- 19 - sulfate reducing bacteria

باشد: جزء مربوط به تشکیل توده سلولی، و جزء مرتبط به تولید سیتریک اسید. چنانکه شدت و سرعت افزایش در قند به مصرف رسیده در حین تخمیر نیز خود می‌تواند نشانه‌ای از حضور دو بخش (تشکیل توده سلولی، و تولید محصول) در به تکمیل رسیدن وضعیت افزایش در قند به مصرف رسیده باشد. باتوجه به تبعیت S, X, P و نیز S' از زمان تغییر زمانی شدت و سرعت قند به مصرف رسیده در روند تخمیر (ثابت شدت و سرعت ویژه یا $K = \frac{ds'}{dt} \times \frac{1}{(s')}$ تعیین و نتیجه در شکل ۵ ارائه شده است. داشتن سیر صعودی و رسیدن به نقطه‌ای حداکثر و سپس سیر کاهشی تدریجی تا پایان زمان تخمیر مشخصه‌ای است که با تغییرات شدت و سرعت ویژه پیشنهاد شده توسط مدل کنتیکی گدن در شباهت قرار دارد (4, 19, 24). البته در مدل کنتیکی تخمیری نوع II بنابر پیشنهاد گدن، تغییرات از برای هر یک از شدت سرعت‌های ویژه (μ, k_p) و سرعت ویژه در قند به مصرف رسیده (نقطه حداکثری متفاوت و به جدا از دیگری را دارا می‌باشند (4, 24). شکل ۵ و تغییرات در ثابت شدت k به وجود سیر تحولاتی پیچیده اشاره دارد و اینکه میکروارگانسیم اسپرجیلوس - نایجر به شکل تثبیت یافته در کلسیم الژینات، در به مصرف رسانیدن قند ملاس تیمار شده توسط ترای کلسیم فسفات و در نهایت تولید سیتریک اسید همراه با تشکیل توده‌ای زیستی، درگیر سیر تحولاتی پیچیده در سوخت و ساز زیستی است.

نتیجه گیری

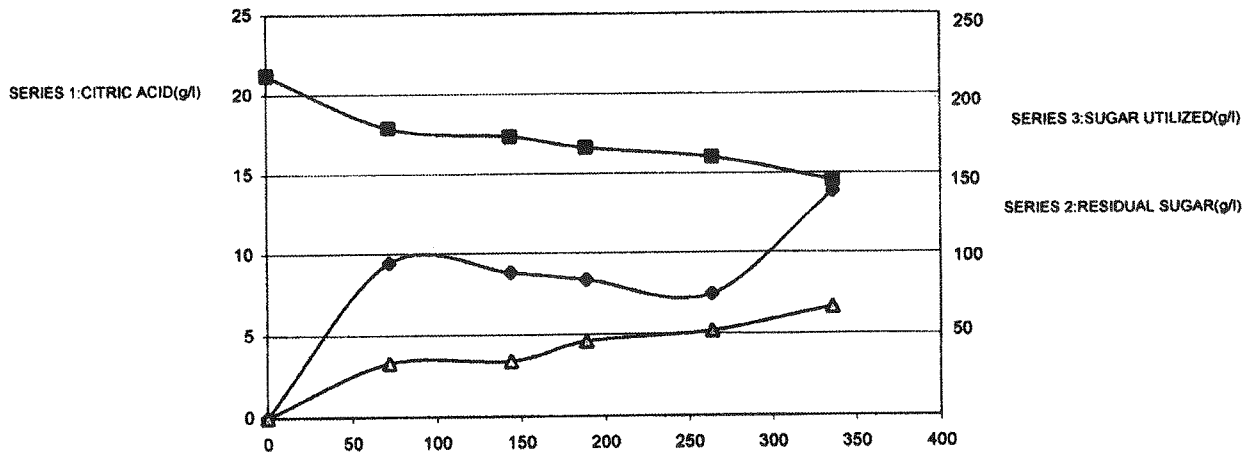
هدف اصلی در این تحقیق تولید سیتریک اسید از ملاس نیشکر توسط سلول‌های تثبیت یافته قارچ الیافی شکل اسپرجیلوس - نایجر بوده است. حضور ترکیباتی آلی و نیز فلزات اندک مقدار در ملاس انجام تیماری عمدتاً شیمیایی را بر ملاس به منظور به کار گرفتن آن به عنوان سابس‌ترایت در فرایند تخمیر، ضروری می‌سازد. در این تحقیق از ترای کلسیم فسفات استفاده گردید. عمده نقش ترای کلسیم فسفات تأثیر بر اجزاء غیرآلی و عناصر فلزی اندک مقدار سابس‌ترایت است. غلظت سیتریک اسید تولیدی در طول 336 ساعت روند تخمیر ناپیوسته پی گرفته شده (میانگین) 7.76 g/L بوده و بازدهی تولید به ازای مقدار قند به مصرف رسیده در طی تخمیر 10.3% بوده است. به منظور ارائه رابطه‌ای ریاضی در جهت بیان رفتار کنتیکی تولید سیتریک اسید از سیر افزایشی

unt.d.fr.cl



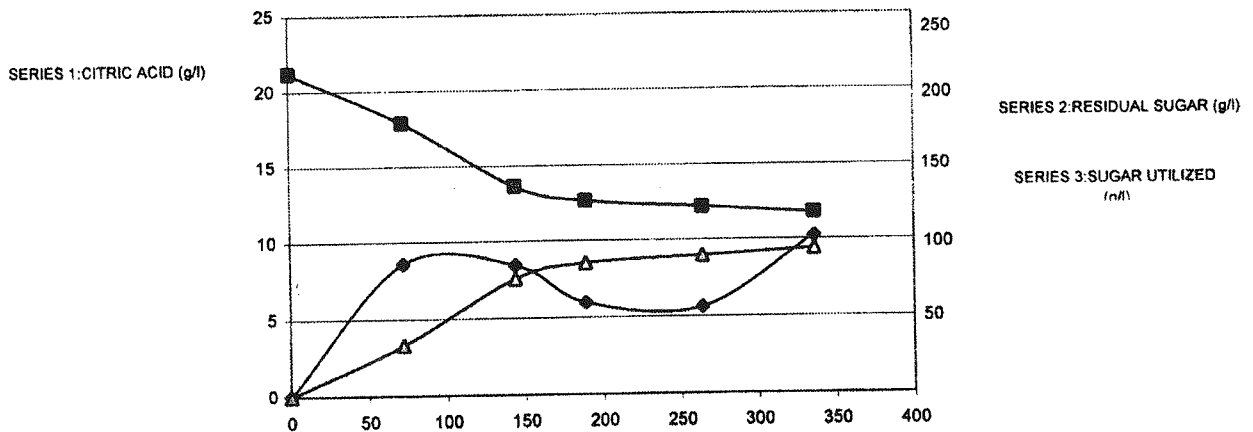
اشکل ۱ - الف) ملاس نیشکر تیمار نشده و استفاده از سلول های آزاد میکروارگانیسم ((unt.d.fr.cl))

td.fr.cl



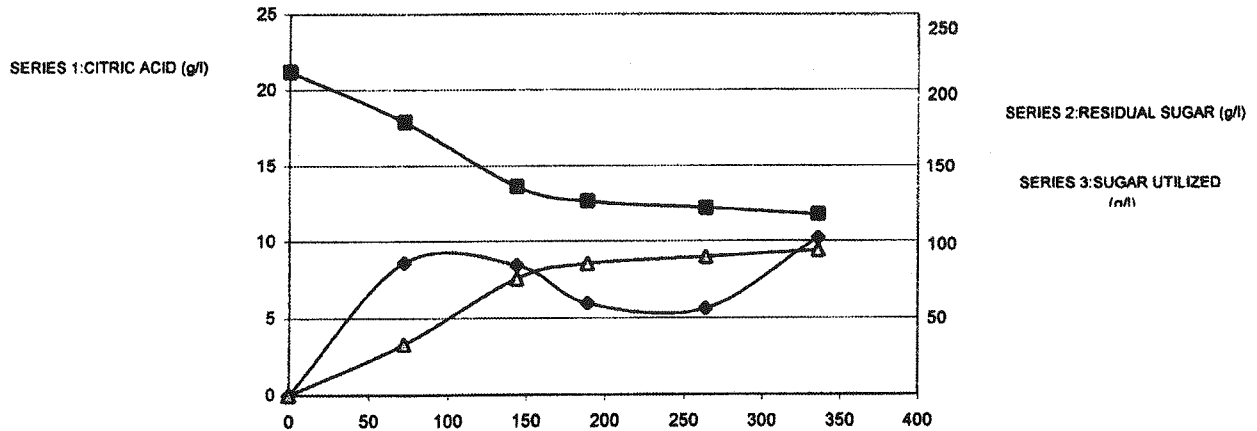
اشکل ۱ - ب) ملاس نیشکر تیمار شده و استفاده از سلول های آزاد میکروارگانیسم ((td.fr.cl))

td.imb.cl



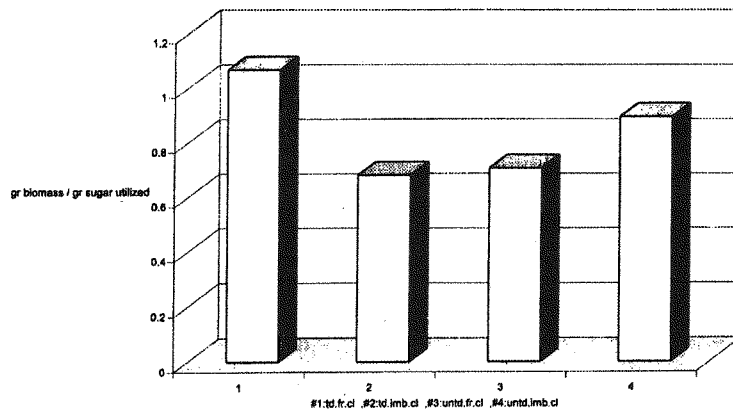
اشکل ۱ - پ) ملاس نیشکر تیمار نشده و استفاده از سلول های تثبیت یافته میکروارگانیسم ((td.imb.cl))

td.imb.cl



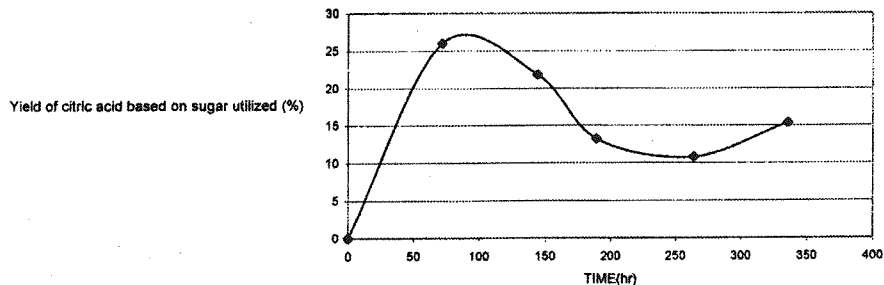
ت - ملاس نیشکر تیمار شده و استفاده از سلول های تثبیت یافته میکروارگانیسم (td.imb.cl)
 شکل (۱) سیر زمانی تغییرات در غلظت (g/L) : سیتريك اسيد توليدي، قند باقیمانده و موجود در محلول تخمیری، و قند به مصرف رسیده در طی تخمیر در تولید سیتريك اسيد (تخمیر ناپیوسته) از ملاس نیشکر توسط آسپر جیلوس - نایجر.

BIOMASS YIELD



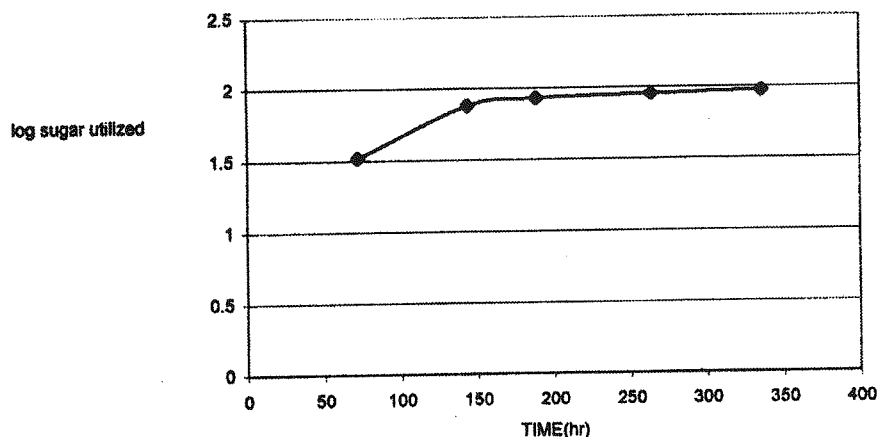
شکل (۲) مقایسه وضعیت مقدار توده زیستی تولیدی به ازای میزان قند به مصرف رسیده در تولید سیتريك اسيد (تخمیر ناپیوسته) از ملاس نیشکر توسط آسپر جیلوس - نایجر. در رابطه با اختصارات عناوین برای تیمارها و نیز شکلی از سلول های میکروبی که در تخمیر مورد استفاده قرار گرفته است به توضیحات ارائه شده در شکل ۱ توجه نمایید.

td.imb.cl



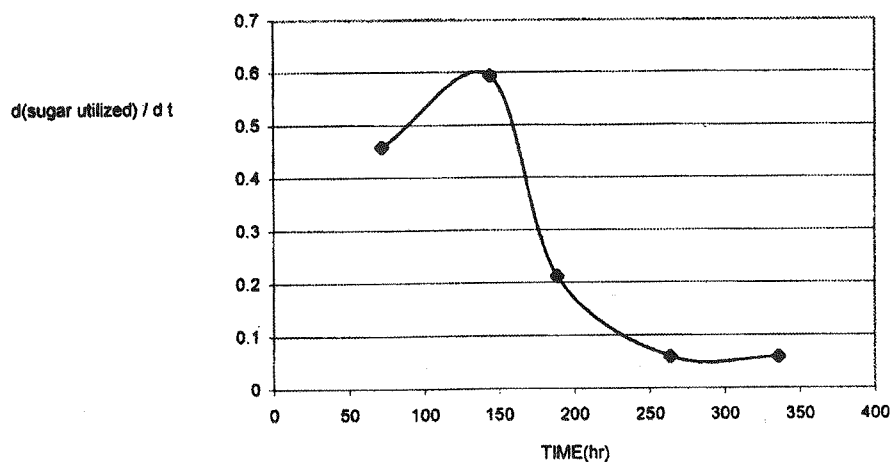
شکل (۳) سیر زمانی تغییرات در بازدهی تولید سیتريك اسيد (%): مقدار سیتريك اسيد توليدي به ازای قند به مصرف رسیده در طی تخمیر در تولید سیتريك اسيد (تخمیر ناپیوسته) از ملاس نیشکر تیمار شده با استفاده از سلول های تثبیت یافته آسپر جیلوس - نایجر.

td.imb.cl



شکل (۴) پیروی نتایج بدست آمده از تغییرات غلظتی قند به مصرف رسیده در طی تخمیر td.imb.cl از رفتار واکنشهای درجه اول.

td.imb.cl



شکل (۵) تغییرات شدت و سرعت (حجمی) قند به مصرف رسیده در طی تخمیر td.imb.cl با زمان.

جدول (۱) میانگین قند به مصرف رسیده و نیز قند باقیمانده و موجود در محلول تخمیری.

	قند باقیمانده موجود (میانگین)		قند به مصرف رسیده (میانگین)	
	g/L	%	g/L	%
untd.fr.cl.	170.3	91.8	50.1	33.3
td.fr.cl.	172.7	93	47.2	27.3
untd.imb.cl.	149.6	88.9	74.7	51.4
td.imb.cl.	149.1	89.2	75.6	53.6

- [1] Bouchard, E and Merritt, E. 1979. Citric Acid, In: Encyclopedia Chemical Technology, 3rd ed., vol. 6, p. 150, Wiley Interscience.
- [2] Clark, D. et al. 1966. Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses. *Biotechnol. Bioeng.* VIII: 465.
- [3] Clark, D. and Leutz, C. 1963. Submerged citric acid fermentation of beet molasses in tank type fermenters. *Biotechnol. Bioeng.* V:193.
- [4] Chandhary, K. et al. 1978. Citric acid production from Indian cane molasses by *Aspergillus niger* under solid state fermentation conditions. *J. Ferment. Technol.* 36:554.
- [5] Clark, D. 1962. Submerged citric acid fermentation of ferrocyanide-treated cane molasses. *Biotechnol. Bioeng.* IV:17.
- [6] Currie, J, 1917. The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*, *J. Biological Chem.* 31:15.
- [7] Eikmeier, H. and Rehm, H. 1984. Production of citric acid with immobilized *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20:365.
- [8] Eikmeier, H. and Rehm, H. 1987. Stability of calcium alginate during citric acid production of immobilized *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:105.
- [9] Hang, Y. et al. 1987. Microbial production of citric acid by solid state fermentation of kiwifruit peel. *J. Food Sci.* 52 (1): 226.
- [10] Hang, Y. et al. 1977. Citric acid fermentation of brewery waste. *J. Food Sci.* 42 (2): 383.
- [11] James, C. S. 1996. *Analytical Chemistry of Foods*. Chapman and Hall.
- [12] Karow, E. and Waksman, S. 1947. Production of citric acid in submerged culture. *Industrial and Eng. Chem.* 39 (7): 821.
- [13] Kundu, S. et al. 1984. Pretreatment of Indian cane molasses for increased production of citric acid. *Biotechnol. Bioeng.* XXVI:1114.
- [14] Luedeking, R. 1967. Fermentation process kinetics, In: *Biochemical and Biological Engineering Science*, N. N. Blakebrough (ed.), Academic Press.
- [15] Martin, S. and Waters, W. 1952. Production of citric acid by submerged fermentation. *Industrial and Engineering Chemistry* 44 (9): 2229.
- [16] Marrier, J. and Boulet, M. 1958. Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method, *J. Dairy Sci.* 41: 1683.
- [17] Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31 (3): 426.
- [18] Mercier, P. et al. 1992. Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus anylophilus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 55: 111.
- [19] Panda, T. et al. 1984. Studies on citric acid production by *Aspergillus niger* using treated indian cane molasses. *Process Biochemistry* 19: 183.
- [20] Prescott, S. and Dunn, C. 1959. *Industrial Microbiology*, Avi Publishing.
- [21] Rohr, M. et al. 1986. Citric acid In: *Biotechnology: a Comprehensive Treatise* vol. 3, H. J. Rehm and G. Reed (eds.), Verlag Chemie.
- [22] Roukas, T. 1991. Production of citric acid from beet molasses by immobilized cells of *Aspergillus niger*, *J. Food Sci.* 56 (3): 878.
- [23] Roehr, M. et al. 1981. Kinetics of biomass formation and citric acid production by *Aspergillus niger* on pilot plant scale. *Biotechnol. Bioeng.* XXIII. 2433.
- [24] Schugerl, K. 1987. *Bioreaction Engineering*, John Wiley and sons Ltd.
- [25] Shu, P. and Johnson, M. 1948. Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*. *Industrial Eng. Chem.* 40 (7):

- 1202.
- [26] Sakurai, A. et. al. 1997. Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on porous cellulose beads. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 70:157.
- [27] Schieche, D. et al. 1997. Biohydrogenation of fumarate using *Desulfovibrio desulfuricans*: experimental results and kinetic rate modelling. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 70:316.
- [28] Smidsrod, B. and Skjak, B. 1996. Alginate gelsome structure-function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells. In: *Immobilized Cells: Basics and Applications*, Wijffels, R. et al. (eds.), Elsevier Science.
- [29] Siclesteri, L. et al. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, American Public Health Association and Water Works Association and Water Environment Federation, 20th ed. 303H p. 3-9.
- [30] Shadafza, D. et al. 1976. Comparison of citric acid production from beet molasses and date syrup with *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Technol.* 54 (2): 67.
- [31] Tsay, S. and To, K. 1987. Citric acid production using immobilized conidia of *Aspergillus niger* TMB 2022. *Biotechnol. Bioeng.* XXIX:297.
- [32] Wiseman, A. (ed.) 1988. *Principles of Biotechnology* 2nd ed. Surrey University Press.
- [۳۳] امیری، س. ۱۳۷۸. تولید سیتریک اسید از ملاس نیشکر تیمار شده توسط سلول های تثبیت یافته آسپرگیلوس - نایجر. پایان نامه کارشناسی ارشد، مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی - دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی تکنیک تهران).