بهینه سازی تولید اسیدسیتریک با استفاده از طراحی آزمایش‌ها در روش تخمیر حالت جامد با بکارگیری قارچ آسپرژیلوس نایجر

سیّدصفاعلی فاطمی
دانشجوی دکترا

سیّدعباس شجاع الساداتی
استاد

دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده فنی و مهندسی،
بخش مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی

چکیده

در این تحقیق برای بهینه سازی تولید اسید سیتریک از «روش آماری تاگوچی[1]» استفاده شد. تفاله سیب به عنوان سوبسترا و قارچ آسپرژیلوس نایجر BC1 به عنوان میکروب مولد، در کشت حالت جامد به کار گرفته شدند. تأثیر عوامل دما، رطوبت، متانول، منبع ازت و منبع فسفر مورد بررسی قرار گرفته و در شرایط بهینه ۱۳۳ گرم اسید سیتریک به ازاء یك کیلوگرم تفاله خشك حاصل شد.

Optimization of Citric Acid Production by Using Experimental Design in Solid-State Fermentation by Aspergillus Niger

S. S. A. Fatemi
Ph.D. Student of Bioprocess Engineering

S. A. Shojaosadati
Professor of Bioprocess Engineering

Biotechnology Group, Chemical Engineering
Department, Tarbiat Modarres University

Abstract

In this research project, the production of citric acid was optimized by using "Taguchi statistical method". Apple pomace was used as substrate and Aspergillus niger BC1 as producer organism in solid-state fermentation. The effects of temperature, moisture, methanol concentration, nitrogen and phosphorous sources were investigated. Under optimized condition, 133 g citric acid was producd from 1 kg dried apple pomace.

کلمات کلیدی

بهینه سازی، روش آماری تاگوچی، اسیدسیتریک، تخمیر حالت جامد، تفاله سیب، آسپرژیلوس نایجر.

مقدمه

صنعت تولید اسید سیتریک یکی از عمده ترین صنایع محصولات تخمیری است . این محصول به سه روش کشت غوطه ور، سطحی و حالت جامد تولید می شود. کشت حالت جامد یکی از روش های مهم در تولید محصولات تخمیری است. در حدود یک پنجم از تولید اسید سیتریک در کشور ژاپن به طریق کشت حالت جامد حاصل می شود [۱]. امروزه منابع کربنی متعددی برای استفاده در روش کشت حالت جامد بکار می روند. از آن جمله می توان تفاله سیب، تفاله انگور، پوست کیوی، پوست قهوه، ضایعات آناناس و کومارا را نام برد [۲-۷]. تفاله سیب شامل کیک فشرده حاصل از عملیات تولید عصاره، آب سیب و کمپوت می باشد [۸]. سالانه در حدود ۶۰۰ هزار تن سیب در ایران فرآوری می شود [۹] که از این میزان، مقدار قابل توجهی تفاله سیب (حدود ۲۰ درصد وزنی سیب فرایند شده) حاصل می شود. میزان قند نسبتاً بالا (حدود ۲۰درصد) و قیمت پایین آن را به عنوان سوبسترای مناسب برای تولید فرآورده های تخمیری مطرح می سازد. باتوجه به میزان مصرف نسبتاً بالای اسید سیتریک در کشور (بیش از ۴۰۰۰ تن در سال) [۹] و از طرف دیگر در دسترس بودن سوبسترای ارزان قیمتی چون تفاله سیب، در این تحقیق از روش تخمیر حالت جامد برای تولید اسید سیتریک از تفاله سیب استفاده شده است. تولید اسید سیتریک از تفاله سیب به روش تخمیر حالت جامد اولین بار در کشور در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده فنی و مهندسی این دانشگاه انجام گرفت [۱۰].

به طور کلی برای بهینه سازی متغیرها در تحقیق به سه صورت عمل می شود: الف) بررسی هر کدام از متغیرها به صورت مستقل[۲] ب) بررسی همزمان همه متغیرها در تمام حالت های ممکن با اثرات متقابل بین آنها[۳] و ج) بررسی همزمان متغیرها با استفاده از روش های آماری [۴]، که در روش سوم می توان تقریباً تمام نتایج حاصل از روش دوم را بدون انجام تمام حالت های آزمایش، از روابط و جدول های آماری به دست آورد [۱۱]. متخصصین زیادی در علم آمار و مهندسی روی پردازش این روش تحقیق کرده اند. این روش کم هزینه، سریع و قابل اعتماد است و برای به دست آوردن اثر هر متغیر به صورت مستقل و وابسته (اثرات متقابل بین متغیرها) به کاربرده می شود.

موضوع این تحقیق بررسی متغیرهای دما، رطوبت ، متانول، منبع نیتروژن و فسفر، بهینه سازی و افزایش تولید اسید سیتریک با استفاده از طراحی آزمایش ها به روش تاگوچی یکی از معروفترین شیوه های کنترل کیفیت می باشد.

۱ ـ مواد و روش ها

تفاله سیب مورد استفاده به عنوان سوبسترا در این تحقیق از کارخانه تولید آب میوه تاکستان تهیه شد. رطوبت اولیه آن در حدود %(w/w) ۷۰ بود و برای نگهداری آن از فریزر با دمای ۲۰°C- استفاده شد و قبل از استفاده در دمای ۴°C ضد انجماد [۵] شد.

میکروارگانیسم مورد استفاده در این تحقیق قارچ آسپرژیلوس نایجر BC1 بود که از مجموعه میکروبی آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. کشت اصلی، روی اسلنت و پلیت PDA قرار داشته و هر چند ماه یک بار کشت مجدد داده و در دمای ۴°C و در یخچال نگهداری شد.

۱ ـ ۱ ـ عملیات تخمیر

۴۸ گرم از سوبسترای مرطوب را در ارلن های ۵۰۰ میلی لیتری ریخته، pH آن را با سود نرمال به بالاتر از ۴ رسانده [۱۰] و پس از غنی سازی با متانول، منابع نیتروژن و فسفر در اتوکلاو در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱۵ psi به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. پس از خنک شدن، یک میلی لیتر سوسپانسیون اسپوری در شرایط استریل به هر ظرف تلقیح شد. شایان ذکر است که کلیه کشت ها با دوبار تکرار بررسی شدند. پس از ۵ روز به تخمیر پایان داده شد و کشت ها برای بررسی های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

۱ ـ ۲ ـ عملیات فروشوئی[۶]

استحصال اسید سیتریک تولید شده از محیط تخمیر حالت جامد، با افزودن دو مرحله آب مقطر در حجم های ۲۰۰ میلی لیتری به محیط کشت تخمیر شکه و هم زدن به مدت نیم ساعت در هر مرحله و سپس جداسازی فاز

مایع و جامد توسط سانتریفوژ و فیلتراسیون انجام شد. فاز مایع برای بررسی‌های تجزیه‌ای مورد استفاده قرار گرفت.

۱ـ۳ـ روش‌های تجزیه‌ای

میزان اسید سیتریک به روش اصلاح شده پیریدین و انیدرید استیک [۱۲] و قند باقیمانده به روش فنل اسید سولفوریک [۱۳] اندازه‌گیری شدند.

۱ـ٤ـ روش آماری تاگوچی

این روش براساس بررسی یک کیفیت در هر زمان با تمام متغیرهای مستقل و وابسته (در صورت لزوم) در چند سطح طراحی شده است. اساس کار، ارائه جدول‌های استانداردی است که می‌توانند متغیرها را همراه یا بدون اثرات متقابل بررسی کنند. مزیتی که این روش بر سایر روش‌ها دارد، خلاصه کردن تعداد مراحل آزمایش با پاسخ‌گیری خوب می‌باشد. مراحل بررسی متغیرها با این روش به صورت زیر است : (۱) انتخاب متغیرهای مهم (این انتخاب باتوجه به تحقیقات انجام شده در قبل و بررسی‌های انجام شده در این تحقیق صورت پذیرفته است)، (۲) انتخاب تعداد سطوح، (۳) انتخاب جدول تاگوچی، (۴) انجام آزمایش‌ها، (۵) به دست آوردن پاسخ‌ها، (۶) تجزیه پاسخ‌ها، (۷) به دست آوردن نقطه حداکثر تولید پیشنهادی و (۸) تأیید جواب به دست آمده توسط آزمایش. جدول مورد استفاده یک آرایش راست گوشه L_{16} [۷] بود که از منابع موجود انتخاب شد [۱۵ و ۱۴]. ارزیابی پارامترها در این تحقق توسط ANOVA[۸] با استفاده از نرم افزار روش تاگوچی انجام گرفت.

۲ـ نتایج و بحث

به لحاظ اهمیتی که متغیرهای دما، رطوبت، متانول، منبع ازت و فسفر در بازدهی تولید دارند در ۴ سطح طراحی و مورد مقایسه قرار گرفتند. جدولی که می‌توانست ۵ متغیر مذکور را در ۴ سطح پوشش دهد، آرایش راست گوشه L_{16} بود. در عمل ۳۲ ارلن محیط کشت برای ۱۶ آزمایش انتخاب شده و سطوح جدید متغیرهای مورد نظر تهیه و با اسپورهای آسپرژیلوس نایجر BC1 در شرایط استریل تلقیح شدند (جدول ۱). مدت زمان تخمیر ۵ روز بود که پس از آن کشت‌ها برداشته شده و برای تعیین بازدهی فرایند به مراحل بعدی (فروشویی و تجزیه) هدایت شدند.

مقادیر متوسط پاسخ برای سطوح چهارگانه متغیرهای مورد بررسی در جدول ۲ ارائه شده است. مشاهده می‌شود که متغیر دما در سطح اول یعنی ۲۷°C، رطوبت در سطح سوم (w/w%) ۷۵، متانول در سطح دوم %(v/v)۳، منبع ازت در سطح سوم %(w/w) ۱/۰ و منبع فسفر در سطح دوم %(w/w)۰/۰۰۵ حداکثر تولید اسید سیتریک را حاصل نموده است. تغییرات میزان تولید اسیدسیتریک نسبت به متغیرهای مورد بررسی در شکل‌های ۵ ـ ۱ آورده شده است.

۲ـ۱ـ اثر دما

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، افزایش دما از ۲۷ به ۳۶ درجه سانتیگراد سبب کاهش بازدهی تولید و افزایش قند باقیمانده شده است. باتوجه به شیب ضعیف نمودار تولید اسید سیتریک بین دمای ۳۰ و ۲۷ درجه سانتی گراد می‌توان ادعا کرد که نقطه واقعی دمای بهینه، مقداری نزدیک به این دو سطح داشته و در دماهای پایین تر، تولید کاهش می‌یابد. همچنین افزایش دما، به دلیل اسپورزائی بیشتر قارچ در محیط کشت، سبب کاهش بازدهی تولید شده است [۹]. شیب تند کاهش بازدهی پس از دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بیانگر تأثیر زیاد این پارامتر در عملیات تخمیر می‌باشد.

۲ـ۲ـ اثر رطوبت

شکل ۲ تغییرات بازدهی تولید اسید سیتریک را بر حسب درصد رطوبت اولیه سوبسترا نشان می‌دهد. افزایش رطوبت سوبسترا از ۵۵ تا ۶۵ درصد سبب بالا رفتن فعالیت متابولیکی میکروارگانیزم و در نتیجه تولید محصول مورد نظر شده است

. رطوبت ۶۵ تا ۷۵ درصد تغییرات فاحشی روی روند تولید نداشته ولیکن نقطه بهینه در رطوبت ۷۵ درصد حاصل شده است. لذا باتوجه به رطوبت تفاله خروجی از کارخانجات تولید آب میوه (۱۵/۷۸-۳۹/۶۶)، می‌توان سوبسترا را بدون تغییر رطوبت استفاده نمود. بالا رفتن رطوبت از این میزان سبب کاهش فضای خالی بین ذرات و افت انتقال جرم گاز (اکسیژن و CO_2) می شود [۶].

۲ـ۳ـ اثر متانول

مطابق شکل ۳ سطح دوم (۳ درصد)، حداکثر میزان

تولید اسید را نشان می‌دهد. افزایش بیشتر متانول سبب کاهش تولید شده که می‌تواند به دلیل خاصیت بازدارندگی الکل در مقادیر زیاد باشد. نقطه ۵ درصد، نشان دهنده یک بی نظمی در روند نمودار است که احتمال می‌رود به دلیل اثرات متقابل با پارامترهای دیگر، یا اثر امدادی[۹] ناشی از عوامل دخیل در فرآیند (چه آنهایی که در نظر گرفته شده و چه آنهایی که در اینجا در نظر گرفته نشده‌اند) باشد. مقایسه این نمودار با کارهای قبلی [۱۰] می‌تواند اختلاف در روش یک متغیر در هر زمان با روش تاگوچی را روشن نموده و فرضیه فوق را مستدل نماید.

۲ـ۴ـ اثر منبع ازت

در بررسی تأثیر منبع ازت (سولفات آمونیم)، سطح سوم به عنوان نقطه بهینه به دست آمد (شکل ۴). افزایش میزان سولفات آمونیم از این حد باعث افزایش رشد و کاهش تولید اسید سیتریک می‌شود، شیب تند کاهش تولید محصول در مقابل شیب آرام افزایش قند باقیمانده در سطح ۳ و ۴، می‌تواند مصرف درصد بیشتری از قند، در مسیر رشد میکروارگانیزم را تأیید کند. روند نامنظم نمودار در سطح دوم نیز، احتمالاً به اثرهای بیان شده در بخش قبل مربوط می‌شود. به طور کلی، چون نسبت C:N پارامتر مهمی است، لذا رساندن میزان نیتروژن به حد مطلوب رشد و تولید در محیط های فقیر سبب غنی سازی کشت می‌شود.

۲ـ۵ـ اثر منبع فسفر

مقادیر مختلفی از KH_2PO_4 برای غنی سازی به محیط کشت افزوده شده و تأثیر آن در شکل ۵ مشهود است. ملاحظه می‌شود که افزایش ٪۰۰۵/۰ منبع فسفر به سوبسترا، سبب بالا رفتن بازدهی تولید به میزان ٪۱۴/۶ شده است. با عبور از این میزان، افزایش فسفات باعث کاهش تولید شده، لذا نقطه بهینه این نمودار در سطح دوم قرار دارد. تغییرات قند باقیمانده نیز گویای تغییرات فوق می‌باشد.

۲ـ۶ـ آنالیز واریانس

اگر V، واریانس؛ S، مجموع مربعات؛ 'S، جمع خالص مربعات: f، درجه آزادی؛ e، خطا (آزمایشگاهی)؛ F، نسبت واریانس؛ P، درصد توزیع؛ T، کل نتایج؛ N تعداد آزمایش ها و DOF، درجه آزادی باشد، نتایج حاصل از آنالیز به قرار زیر است که توسط نرم افزار روش تاگوچی محاسبه شده است (جدول ۳).

حداکثر بازدهی پیشنهاد شده با این روش، پس از اعمال نقاط بهینه ۱۳۲/۹۹ گرم اسید سیتریک به ازاء یک کیلوگرم تفاله خشک بود.

۲ـ۷ـ مرحله تأیید

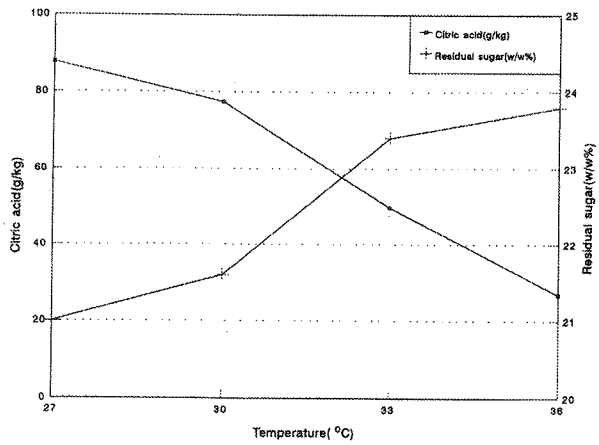
آخرین مرحله در این روش بهینه سازی، تأیید پاسخ های به دست آمده است. برای این کار کشت هایی در شرایط بهینه تهیه شده و مورد آنالیز قرار گرفت. با بررسی میزان تولید، مقدار ۱۳۳ گرم اسید سیتریک به دست آمد که بیانگر صحت عملیات بهینه سازی بود.

تشکر و قدردانی

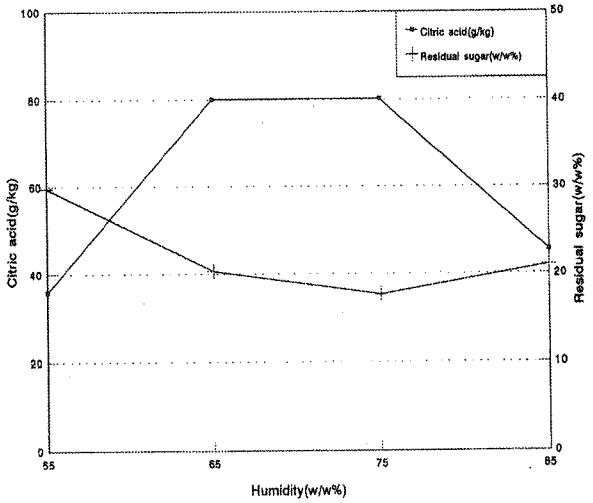
از آقای دکتر ناصر قائمی عضو هیئت علمی دانشگاه تهران و همچنین دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه تربیت مدرس که ما را در انجام این طرح یاری داده اند، تشکر می نماییم.

زیرنویس ها

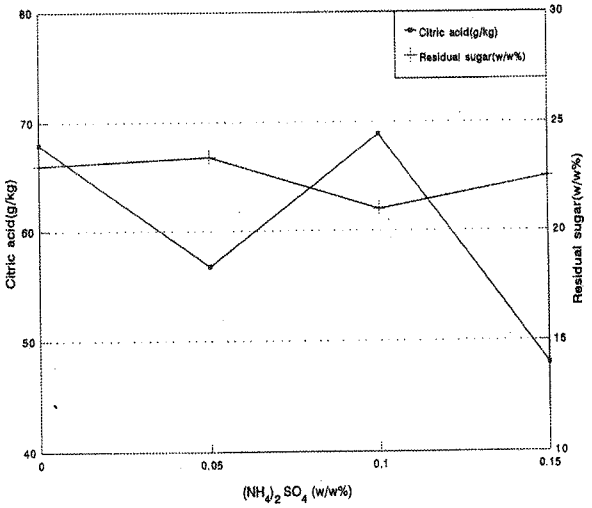
1 - Taguchi Statistical Approach
2 - One at a Time
3 -Matrix Method (Full factorial)
4 - Statistical Method (Fractional Factorial)
5 - Defreeze
6 - Leaching
7 - Orthogonal Array
8 - Analysis of Variance
9 - Synergism



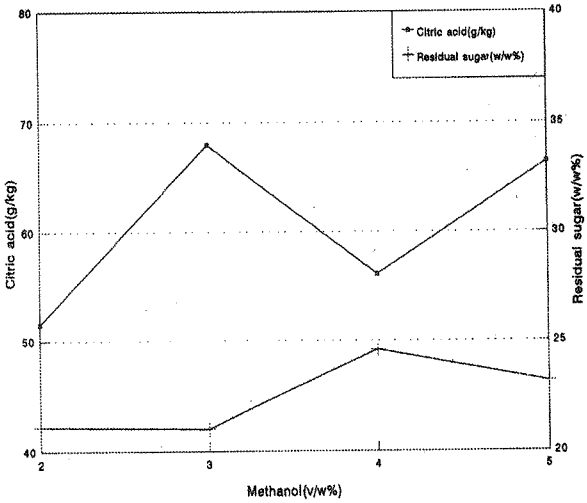
شکل (۱) اثر دمای تخمیر بر بازدهی فرایند تولید اسید سیتریک (گرم بر کیلوگرم تفاله خشک).



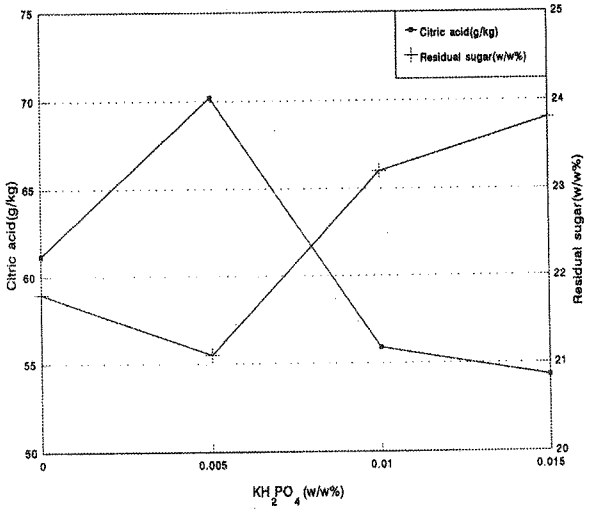
شکل (۲) اثر رطوبت سوبسترا بر بازدهی فرایند تولید اسیدسیتریک (گرم بر کیلوگرم تفاله خشک).



شکل (۴) اثر منبع نیتروژن بر بازدهی فرایند تولید اسید سیتریک (گرم بر کیلوگرم تفاله خشک).



شکل (۳) اثر متانول بر بازدهی فرایند تولید اسید سیتریک (گرم بر کیلوگرم تفاله خشک).



شکل (۵) اثر منبع فسفر بر بازدهی فرایند تولید اسید سیتریک (گرم بر کیلوگرم تفاله خشک).

فاکتور / آزمایش	دما °C	رطوبت w/w%	متانول v/w%	منبع ازت w/w%	منبع فسفر w/w	پاسخ ۱ g/kg	پاسخ ۲ g/kg
۱	۲۷	۵۵	۲	۰	۰	۷۵	۵۰/۲
۲	۲۷	۶۵	۳	۰/۰۵	۰/۰۰۵	۱۲۴/۶	۱۱۶/۹
۳	۲۷	۷۵	۴	۰/۱	۰/۰۱	۱۰۳/۹	۱۱۰/۶۵
۴	۲۷	۸۵	۵	۰/۱۵	۰/۰۱۵	۵۹/۷	۶۰/۹
۵	۳۰	۵۵	۳	۰/۱	۰/۰۱۵	۶۴/۲	۶۴/۲
۶	۳۰	۶۵	۲	۰/۱۵	۰/۰۱	۶۶/۳	۷۶/۴
۷	۳۰	۷۵	۵	۰	۰/۰۰۵	۱۱۵/۶	۱۲۵/۵
۸	۳۰	۸۵	۴	۰/۰۵	۰	۶۱/۲	۴۹/۶
۹	۳۳	۵۵	۴	۰/۱۵	۰/۰۰۵	۱۸/۱	۱۸/۱
۱۰	۳۳	۶۵	۵	۰/۱	۰	۸۳/۱	۸۶/۳
۱۱	۳۳	۷۵	۲	۰/۰۵	۰/۰۱۵	۵۰/۸	۵۰/۸
۱۲	۳۳	۸۵	۳	۰	۰/۰۱	۴۵	۴۵
۱۳	۳۶	۵۵	۵	۰/۰۵	۰/۰۱	۰	۰
۱۴	۳۶	۶۵	۴	۰	۰/۰۱۵	۴۱/۱	۴۶/۲
۱۵	۳۶	۷۵	۳	۰/۱۵	۰	۴۶/۵	۳۷/۷
۱۶	۳۶	۸۵	۲	۰/۱	۰/۰۰۵	۱۸/۶	۲۳/۹

جدول (۱) ترتیب سطوح بکار رفته و پاسخ های آن در تحقیق، با استفاده از روش تاگوچی.

جدول (۲) متوسط پاسخ سیستم نسبت به متغیرها در سطوح مختلف.

فاکتور / شماره سطح	دما (A)	رطوبت (B)	مناول (C)	منبع ازت (D)	منبع فسفر (E)
۱	۸۷/۷	۳۵/۸	۵۱/۵	۶۸	۶۱/۲
۲	۷۷/۴	۸۰/۱	۶۷/۶	۵۶/۷	۷۰/۲
۳	۴۹/۶	۸۰/۲	۵۶/۱	۶۸/۹	۵۵/۹
۴	۲۶/۸	۴۵/۵	۶۶/۴	۴۸	۵۴/۳

جدول (۳) آنالیز واریانس حاصل از آرایش راست گوشه L_{16}

عنوان / فاکتور	درجهٔ آزادی (DOF)	مجموع مربعات (S)	واریانس (V)	نسبت واریانس (F)	مجموع مربعات خالص (S')	درصد توزیع (P)%
دما	۳	۱۸۲۷۷/۸۵۲	۶۰۹۲/۶۱۷	۱۶۲/۷۷۶	۱۸۱۶۵/۵۶۴	۴۹/۳۲
رطوبت	۳	۱۲۸۶۹/۲۲۱	۴۲۸۹/۷۴	۱۱۴/۶۰۹	۱۲۷۵۶/۹۳۳	۳۴/۶۵۳
مناول	۳	۱۴۷۸/۳۷۶	۴۹۲/۷۹۲	۱۳/۱۶۵	۱۳۶۶/۰۸۹	۳/۷۰۸
منبع ازت	۳	۲۳۷۹/۷۰۳	۷۹۳/۲۳۴	۲۱/۱۹۲	۲۲۶۷/۲۱۵	۶/۱۵۶
منبع فسفر	۳	۱۲۲۸/۰۱	۴۰۹/۲۳۶	۱۰/۹۳۶	۱۱۵/۷۲۲	۳/۰۲۹
خطا	۱۶	۵۹۸/۸۶۸	۳۷/۲۲۹	-	-	۳/۱۵۲
مجموع	۳۱	۳۶۸۳۲/۰۳۴				

مراجع

[1] Shankaranand, V.S., Lonsane, B.K, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 9, pp. 377-380(1993).

[2] Hang, Y.D., Woodams, E.E, MIRCEN Journal,2,pp. 283-287 (1986).

[3] Hang, Y.D., Woodams, E.E, Am. J.Enol.Vitic., 37. No.2,pp.141-142 (1986).

[4] Hang, Y.D., Luh, B.S, Woodams, E.E, Journal of Food Science, 52. No.1, pp.226-227 (1987).

[5] Shankaranand, V.S., Lonsane, B.K, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 10, pp.165-168 (1994).

[6] Tran, C.T, Mitchell, D.A, Biotechology Letters. 17. No.10,pp.1107-1110 (1995).

[7] Lu, M., Brooks, J.D, Maddox, I., Enzyme and Microbial Technology.21,pp.392-397 (1997).

[8] Downing, D.L. "Processed Apple Products",First ed., Van Norstrand Reinhold. N.Y., pp.365-377 (1989).

[۹] آمار وزات صنایع ، وزارت صنایع، تهران (۱۳۷۷).

[۱۰] فاطمی، سیّدصفاعلی و شجاع الساداتی، سیّدعباس، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، سال هجدهم، شماره ۱، ۱۳۷۸.

[11] Haaland, P. D.,"Experimental Design in Biotechnology", Marcel Dekker. INC, New York pp. 1-17 (1989).

[۱۲] فاطمی سید صفاعلی وشجاع الساداتی، سید عباس . خلاصه مقالات نهمین سمینار شیمی تجزیه ایران، صفحه ۴۶، دانشکده شیمی دانشگاه تبریز، خرداد ۱۳۷۸.

[13] Dubois, M., Gilles, K. A. , Hamiclon, J. K, Rebers, P. A, Smith, F., Analytical chemistry. 28, pp. 320-356 (1956).

[14] Roy R. K. "A Primer on the taguchi method", Van Nostrand Reinglod, NewYork. (1990).

[15] Logothetis No, H. P. Wynn. "Quality through Desing", Clarendon Press, Oxford pp. 407 (1989).

[16] Doelle, H. W., D.A. Mitchell, C.E.Rolz" Solid substrate cultivation", Elsevier Applied Science. England (1992).

[17] Hang, Y. D., Woodams, E.E, Biotechnology Letters. 9, No. 3, pp. 183-186 (1987).

[18] XU, W.q., Hang, Y.D., Process Biochemistry, August, pp. 117-118 (1988).