دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروب شناسی صنعتی (بیوتکنولوژی میکروبی)

الف) تهیه کشت آسپرژیلوس نایجر بر روی محیط کشت PDA(کشت خالص)

ب) تولید اسید سیتریک

ج) تست و بررسی اسید سیتریک تولید شده

دکتر سهیلا عباسی

زمینه نظری

اسید سیتریک یک اسید آلی ضعیف می باشد که در مرکبات یافت می‌شود.

اسید سیتریک یک ماده نگه دارنده خوب مواد غذایی و یک چاشنی خوب برای ایجاد مزه ترش در غذا ها و نوشابه ها می‌باشد. همچنین یک عامل آنتی اکسیدان خوبی هم می‌باشد. اسید سیتریک در اکثر مرکبات و مخصوصا در لیموترش و آبلیمو یافت می‌شود که شامل ۸٪ از وزن میوه خشک می‌باشد اسید سیتریک دارای فرمول شیمیایی $C_5H_6O_7$ بوده و یک اسید کربوکسیلیک با سه عامل COOH می‌باشد.

اسید سیتریک (۲-هیدروکسی پروپان، ۱و۲و۳ -تری کربوکسیلیک اسید) با وزن مولکولی دویست و ده دالتون، یک ترکیب شیمیایی تجاری می باشد که با توجه به میزان تقاضای زیاد جهانی، یکی از بزرگترین محصولات تخمیری می باشد که در جهان با تناژهای زیادی تولید می شود و ۷۰ ٪ مصرف کل اسید سیتریک تولیدی در صنعت غذا و ۱۲ ٪ در صنایع دارویی و ۱۸ ٪ بقیه در سایر کاربردهای صنعتی مورد استفاده قرار می گیرد.

تاریخچه

اسید سیتریک در قرن هشتم توسط جابر بن حیان کشف شده است. دانشمندان قرون وسطی در اروپا در قرن سیزدهم با خواص اسیدی لیمو و آبلیمو آشنا شدند. اسید سیتریک اولین بار در سال ۱۷۸۴ توسط شیمیدان سوئدی بوسیله متبلور کردن آبلیمو جداسازی شد.

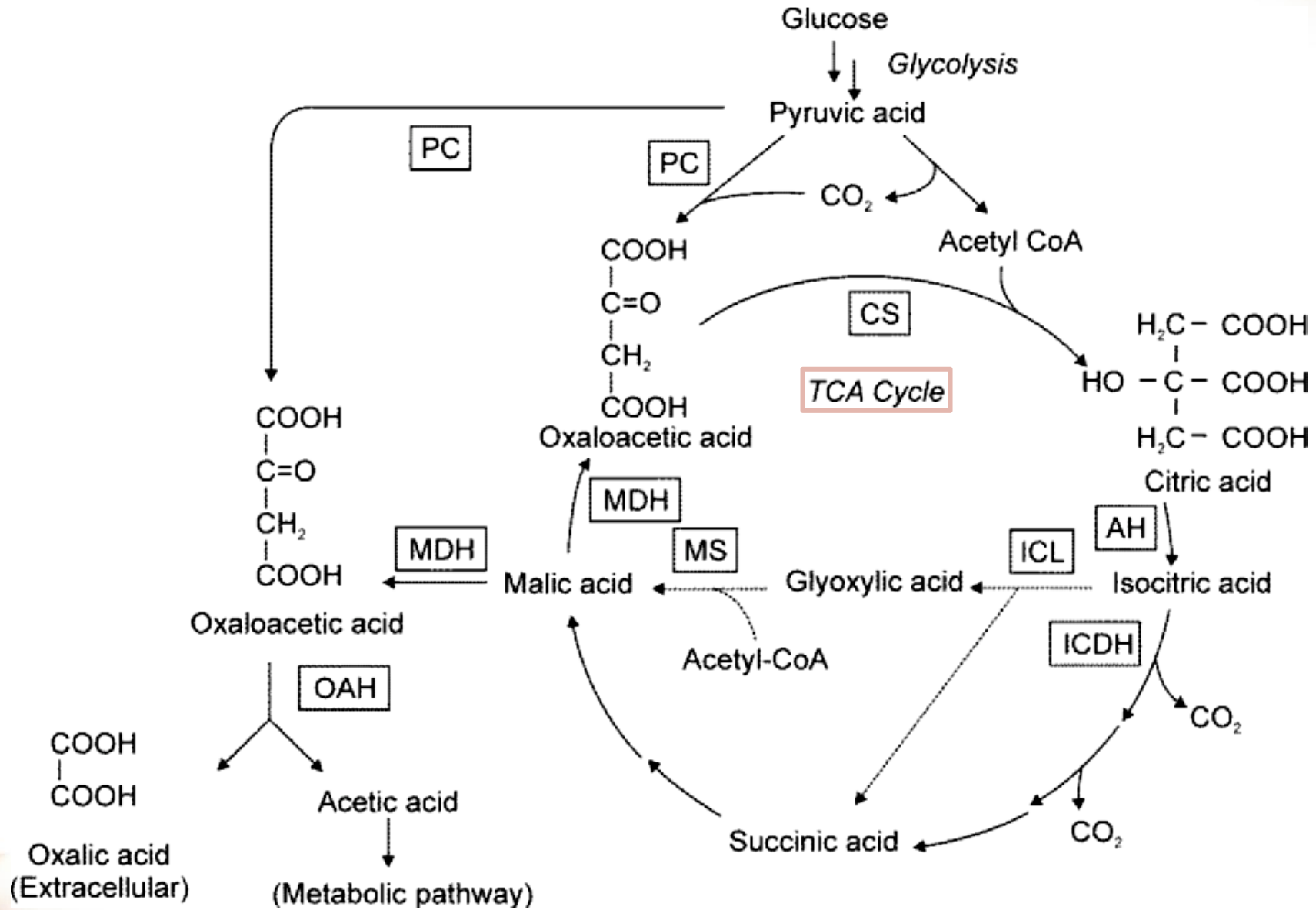
در سال ۱۸۹۳ C.Wehner با کشف کپک پنی سیلیوم توانست اسید سیتریک را بوسیله شکر تولید کند.
هر چند که تولید میکروبیولوژیکی اسید سیتریک تا جنگ جهانی اول روش صنعتی مهمی کشف کرد که در تولید اسید سیتریک کار آمد بودند. امروزه بیشتر اسید سیتریک تولیدی در جهان با این روش استفاده از کپک آسپرژیلوس انجام می‌گیرد.

توانایی کپک آسپرژیلوس نایجر یا *Aspergillus niger* در تولید اسید سیتریک به عنوان یک محصول جانبی متابولیسم، توسط شیمی دان مواد غذایی آمریکایی جیمز کوری در سال ۱۹۱۷ کشف شد. فرایند کشت *Aspergillus niger* و اجازه دادن به آن برای متابولیزه کردن ساکارز یا گلوکز برای به دست آوردن اسید سیتریک کارآمد و ارزان بود.

هنگامی که تولید اسید سیتریک به ظاهر بی پایان، امکان پذیر شد، شرکت هایی مانند Pfizer و Citrique Belge تولید آن را در مقیاس صنعتی آغاز کردند. تکنیک دکتر کوری هنوز هم امروز برای تولید اسید سیتریک استفاده می شود.

بیوسنتز اسیدسیتریک

- مسیرهای متابولیکی که در بیوسنتز اسیدسیتریک شرکت می کنند مسیرEMP و چرخه تری کربوکسیلیک اسید می باشند.
- گونه *A.niger* مسیر فسفات پنتوز را نیز به کار می گیرد و می تواند با گلیکولیز برای واحدهای کربن رقابت کند.
- اولین مرحله تشکیل اسیدسیتریک، شکستن هگزوزها به پیروات از طریق گلیکولیز می باشد که پس از آن دکربوکسیله شده و استیل کوآنزیم A را تشکیل می دهد.
- از همه مهمتر ،CO_2 آزادشده در طی این واکنش هدر نمی رود بلکه از طریق پیروات کربوکسیلاز در تشکیل اگزالواستات به کار میرود.
- برای جمع آوری سیترات باید متابولیسم آن مسدود شود.این عمل بوسیله ممانعت از عمل آنزیم آکونیتاز صورت میپذیرد.


Glucose
Glycolysis
Pyruvic acid
PC
PC
CO_2
Acetyl CoA
COOH
C=O
CH_2
COOH
Oxaloacetic acid
CS
TCA Cycle
H_2C- COOH
HO – C – COOH
H_2C- COOH
Citric acid
MDH
AH
MDH
MS
ICL
Malic acid
Glyoxylic acid
Isocitric acid
Acetyl-CoA
ICDH
Oxaloacetic acid
OAH
CO_2
COOH
COOH
Acetic acid
Oxalic acid
(Extracellular)
(Metabolic pathway)
Succinic acid
CO_2

خواص

اسیدیته اسید سیتریک ناشی از وجود سه گروه کربوکسی می‌باشد که می‌توانند پروتون از دست دهند. یون اسید سیتریک به نام سیترات معروف است. سیتراتها بافرهای خوبی برای کنترل pH محلولهای اسیدی هستند. یون سیترات با بسیاری از فلزات نمک سیترات ایجاد می‌کند که مهمترین آن سیترات کلسیم (جوهر لیمو) می‌باشد که برای نگهداری غذا از فساد و خوش طعم کردن آن بکار می‌رود. یون سیترات می‌تواند با فلزات ترکیبات مهمی ایجاد کند.

در دمای اتاق اسید سیتریک ، یک پودر کریستالی سفید می‌باشد که می‌تواند به دو فرم بی آب و یا یک آبه وجود داشته باشد. فرم بی آب از کریستالیزه شدن اسید سیتریک در آب گرم ایجاد می‌شود در حالی که فرم یک آب از تبلور آن در آب سرد ایجاد می‌شود. فرم یک آبه با حرارت دادن در ۴۷ درجه سانتیگراد به فرم بی آب تبدیل می‌شود. اسید سیتریک در حرارت بالای ۱۷۵ درجه تجزیه شده و CO_2و آب آزاد می‌کند.

تخمیر و تولید اسید سیتریک

تخمین زده می شود که بیش از ۶۵ درصد اسید سیتریک تولید شده برای غذا و نوشیدنی مصرف شود. در حال حاضر حدود ۹۹ درصد اسید سیتریک جهان از طریق **تخمیر** با برخی از باکتری ها و قارچ ها تولید می شود.

قارچ رشته ای ***Aspergillus niger*** به دسته میکروارگانیسم هایی با اهمیت بیوتکنولوژیکی فوق العاده تعلق دارد، زیرا از آن برای تولید متابولیت های مختلف اولیه (اسیدهای آلی) و آنزیم ها استفاده می شود. در حقیقت، تولید اسید سیتریک توسط این قارچ از نظر بهره وری یکی از کارآمدترین فرآیند های زیستی است، زیرا *Aspergillus niger* می تواند تا ۸۰٪ از بستر را به محصول نهایی تبدیل کند. از آنجا که اسید سیتریک یک ماده شیمیایی کالا است، استفاده از مواد اولیه ارزان قیمت و در دسترس برای تولید تجاری ضروری است. مواد ای بسترهای مناسب تری برای تولید اسید سیتریک هستند زیرا تجدید پذیر هستند و در منشاستهقادیر زیاد و با نرخ ارزان تر در دسترس هستند.

❖ کاربرد اسید سیتریک در صنایع غذایی

از این اسید به صورت گسترده در بسیار از صنایع از جمله صنایع پخت و پز و فرآوری نواد غذایی استفاده می شود. در ادامه با مهمترین کاربردهایی این اسید در صنایع غذایی آشنا خواهید شد

❖ کاربرد اسید سیتریک به عنوان تقویت کننده طعم

حدود ۵۰ درصد از تولید اسید سیتریک در جهان به عنوان تقویت کننده طعم در نوشیدنی ها استفاده می شود. اسید سیتریک کمی مزه و طعم ترش و طراوت ایجاد می کند و شیرینی موجود در نوشابه ها، چای، آب میوه ها و سایر نوشیدنی ها را متعادل می کند.

❖ نگهدارنده مواد غذایی

اسید سیتریک همچنین آن را به عنوان ماده نگهدارنده مفید می کند. از آنجا که بسیاری از باکتری ها قادر به رشد ph میزان و سطح در محیط اسیدی نیستند، اسید سیتریک اغلب به عنوان نگهدارنده به مربا، ژله، آب نبات، کنسرو و حتی محصولات گوشتی اضافه می شود. نگهدارندگی از جالب ترین کاربرد اسید سیتریک است

❖ جایگزین آب لیمو

از آنجا که اسید سیتریک می تواند به صورت پودر تهیه شود، در صورت تمایل به طعم ترش می توان از آن در غذاهای خشک نیز استفاده کرد. اسید سیتریک یک جایگزین خشک برای آب لیمو یا سرکه در غذاهای خشکی مانند نمک چاشنی، پودرهای طعم دهنده و میان وعده های ترش است.

❖ تسریع در تولید انواع پنیر

این اسید گاهی اوقات برای ایجاد یک محیط اسیدی و تسهیل فرآیند رسیدن در هنگام تهیه پنیر به ویژه موزارلا استفاده می شود. اسید سیتریک همچنین برای تنظیم pH محلول ها هنگام تولید آبجو و شراب نیز استفاده می شود.

❖ مکمل غذایی

pH اسید سیتریک نیز به عنوان یک مکمل غذایی مفید است. بسیاری از مواد معدنی برای جذب به pH اسیدی احتیاج دارند. اسید سیتریک به مکمل های ویتامین اضافه شده است تا برخی ویتامین ها از نظر بیولوژیکی برای جذب در دسترس باشد

کاربردهای ویژه

- اسید سیتریک عمدتا به عنوان ماده محافظ مواد غذایی و چاشنی غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد. نمکهای سیترات با فلزات گوناگون در افراد مریض به عنوان کمکهای غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد.
- از خواص بافری سیتراتها در کنترل pH در مواد تمیزکننده خانگی استفاده می شود.
- اسید سیتریک به دلیل توانایی تشکیل کیلیت با فلزات در ترکیب شوینده ها استفاده می‌شود. این ماده با ترکیب شدن با یونهای فلزی مانع مزاحمت آنها در ترکیب با اجزا تمیز کننده شوینده‌ها می‌شود. اسید سیتریک در داروسازی هم کاربرد دارد و به عنوان ماده‌ای بی‌خطر برای مصرف در غذاها شناخته شده است.

نحوه تولید اسید سیتریک

در روش تولید اسید سیتریک با کپک آسپرژیلوس ، این کپک را روی شکر کشت می‌دهند تا اسید سیتریک تولید کند بعد از جداسازی از محلول حاصل، اسید سیتریک را بوسیله ته نشین کردن با آب آهک به صورت نمک سیترات کلسیم جداسازی می‌کنند. سیترات کلسیم در حضور اسید سولفوریک، اسید سیتریک تولید می‌کند.

مواد و وسایل لازم:

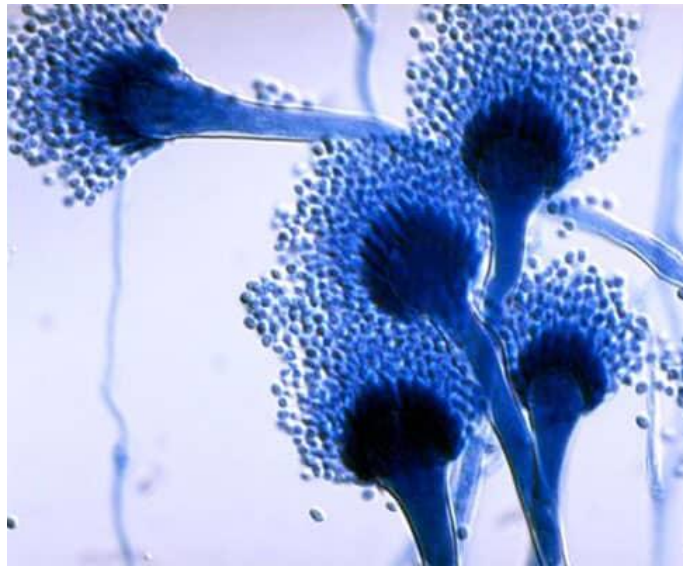
- ✓ محیط کشت PDA
- ✓ لوپ
- ✓ محیط کشت آسپرژیلوس نایجر
- ✓ ارلن حاوی ۱۵۰ سی سی محیط کشت لاکتوز براث
- ✓ شیکر، بن ماری ، انکوباتور
- ✓ کاغذ pH
- ✓ کاغذ صافی
- ✓ قیف
- ✓ پودر ذغال فعال
- ✓ کربنات کلسیم

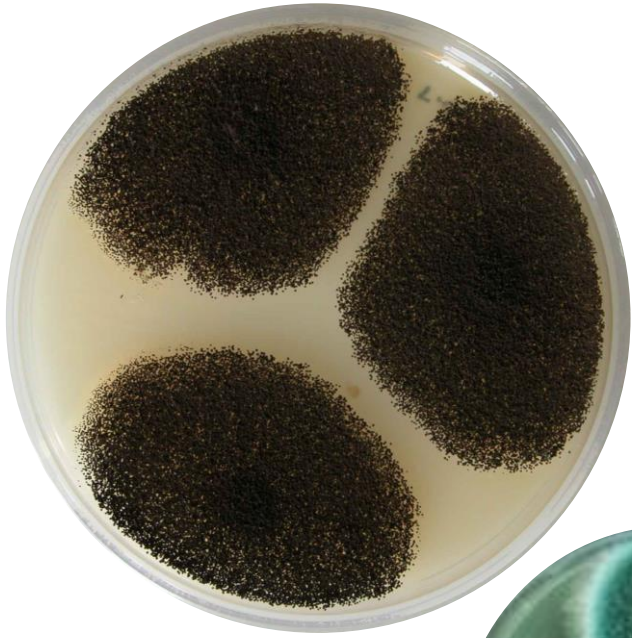
مراحل انجام آزمایش:

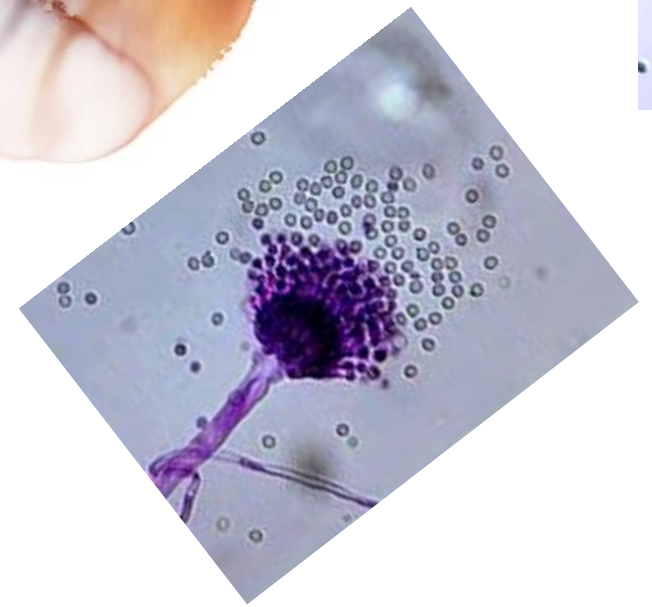
❖ جداسازی آسپرژیلوس

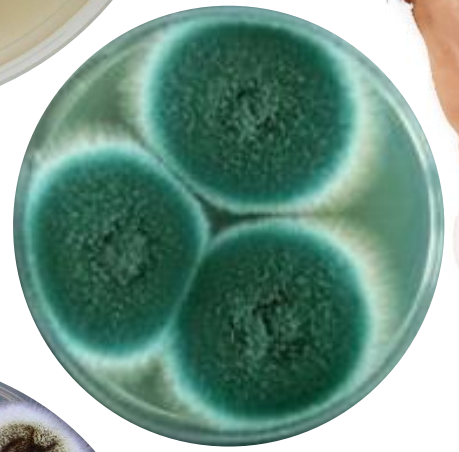
- در این آزمایش برای جداسازی آسپرژیلوس از نمونه نان کپک زده استفاده کردیم، ابتدا نمونه رنگ امیزی شده روی لام را زیر میکروسکوپ مشاهده کردیم که مشخصات کپک مورد نظر را داشت.
- سپس با کمک لوپ مقداری از کپک های تشکیل شده را روی محیطPDA بصورت نقطه ای کشت می دهیم.
- پس از طی انکوباسیون،دوباره به کمک رنگ آمیزی آن را زیر میکروسکوپ مشاهده می کنیم.

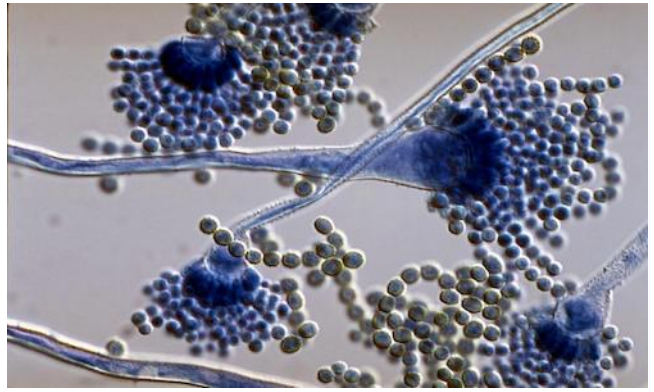
- وپس از اطمینان از درست بودن نمونه آن را روی محیط PDA **خالص** کردیم.
- برای تشخیص تولید اسیدسیتریک از محیط جامدBYG استفاده کردیم که در صورت تولید اسیدسیتریک از رنگ آبی به زرد تغییر رنگ می دهد.

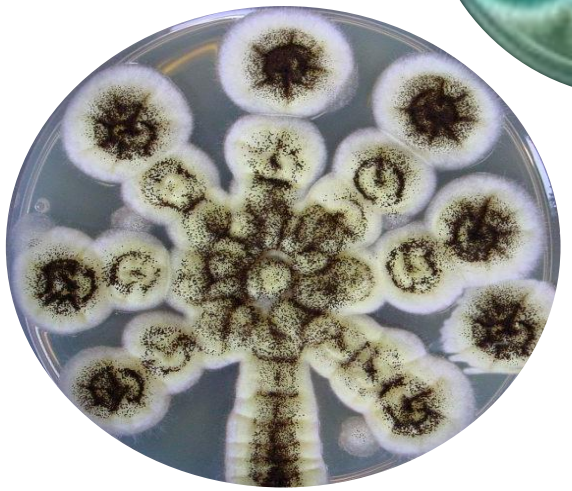












روش کار آزمایش

۱. تهیه پری کالچر

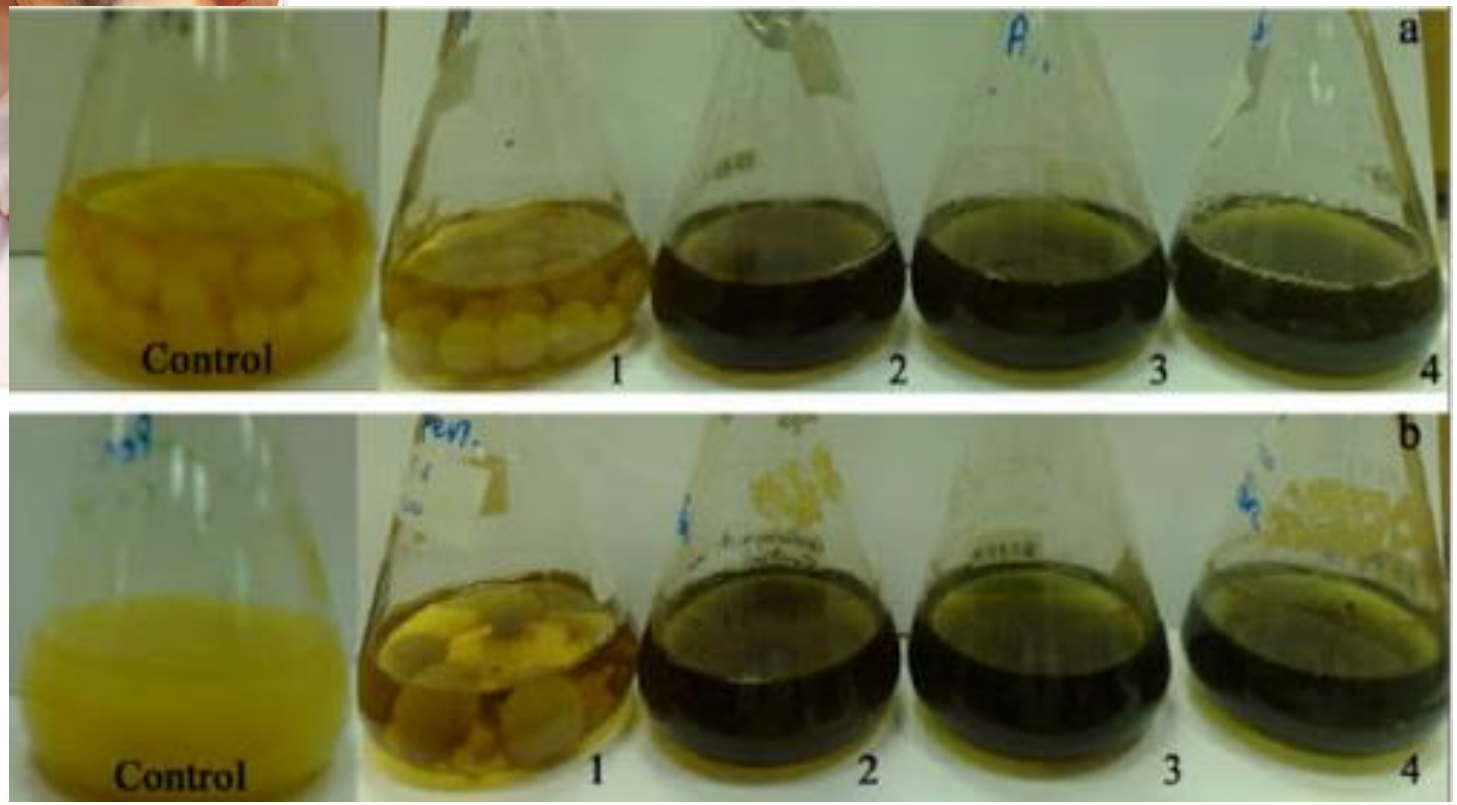
با استفاده از لوپ و در شرایط آسپتیک، از قارچ آسپرژیلوس نایجر بر روی محیط PDA تلقیح کرده و به مدت یک هفته در دمای آزمایشگاه قرار می دهیم.

۲. تولید میکروبی اسید سیتریک

جهت انجام این آزمایش به محیط کشت لاکتوز براث احتیاج داریم. میکروارگانیسم مورد نظر جهت تولید میکروبی اسید سیتریک قارچ آسپرژیلوس نایجر است که هفته‌ی قبل روی PDA تلقیح کرده و بعد از یک هفته که رشد کامل شد از این پری کالچر تهیه شده به عنوان مایع تلقیح به داخل ارلن‌های حاوی محیط کشت لاکتوز براث استفاده می‌کنیم.

قبل از تلقیح به روش نوار چسب اسکاچ از قارچ لام تهیه کرده و مورفولوژی آن را بررسی کنید، سپس به کمک پی پت استریل اقدام به اندازه‌گیری pH اولیه محیط کشت خواهیم کرد و بعد از مشخص کردن pH، اقدام به تلقیح قارچ به داخل ارلن‌های محیط کشت می-نماییم.

ارلن های تلقیح شده را به مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار قرار داده و هفته بعد با اندازه گیری pH و آزمایش لازم تولید اسید سیتریک را بررسی کنیم.


a
Control
1
2
3
4
b
Control
1
2
3
4

ارلن اسید سیتریک
250 ml
100

۳. روش شناسایی اسید سیتریک:

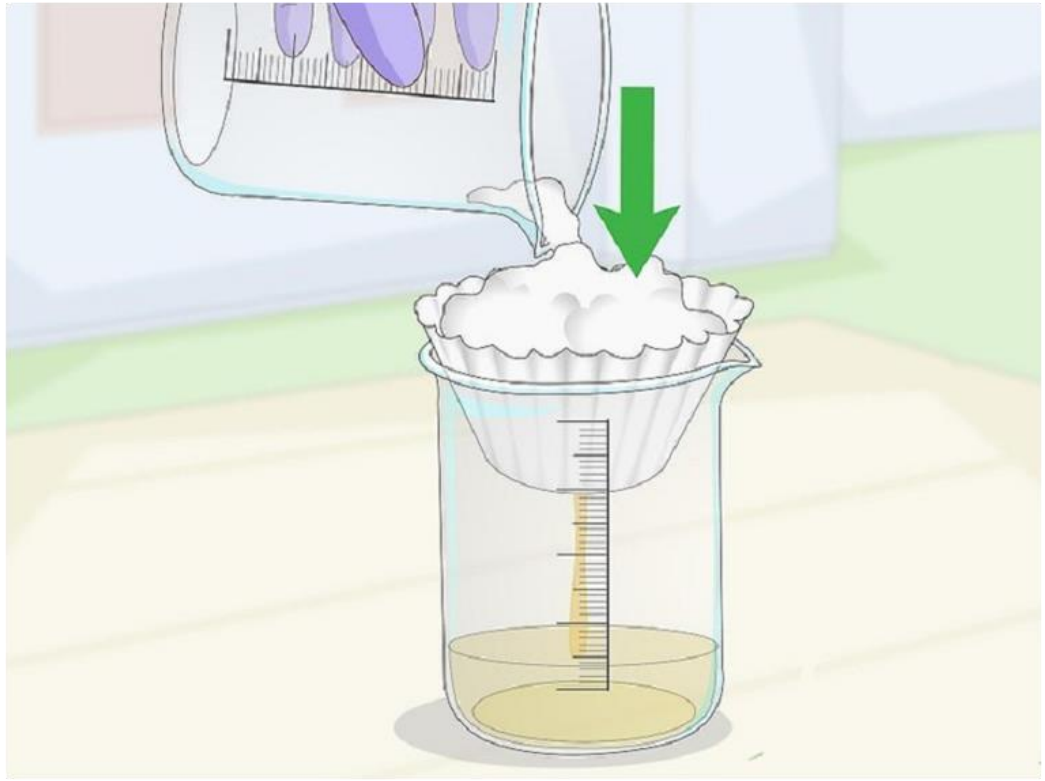
برای شناسایی اسید سیتریک ابتدا pH ارلن را اندازه گیری می‌کنیم و تغییرات رنج pH را تعیین می‌کنیم

سپس باید میکروارگانیسم مورد استفاده یعنی قارچ آسپرژیلوس نایجر را از نمونه جدا کنیم. به این منظور نمونه کشت میکروبی را از کاغذ صافی رد می‌کنیم که محیط کشت همراه با اسید سیتریک احتمالی تولید شده در زیر قیف جمع می‌شود و معمولاً قارچ پشت کاغذ صافی می ماند.

اسپورهای قارچ نمونه ها را سیاه می‌کند، بنابراین باید عمل رنگبری انجام دهیم. برای این منظور ۲-۱ گرم پودر ذغال فعال را به ارلن حاوی محیط کشت اضافه کرده و ارلن ها را به مدت ۵ دقیقه روی شیکر قرار می‌دهیم تا عمل هوادهی صورت پذیرد و ذغال فعال به خوبی با محیط مخلوط گردد و دوباره محیط را از صافی عبور می‌دهیم تا صاف و شفاف شود.

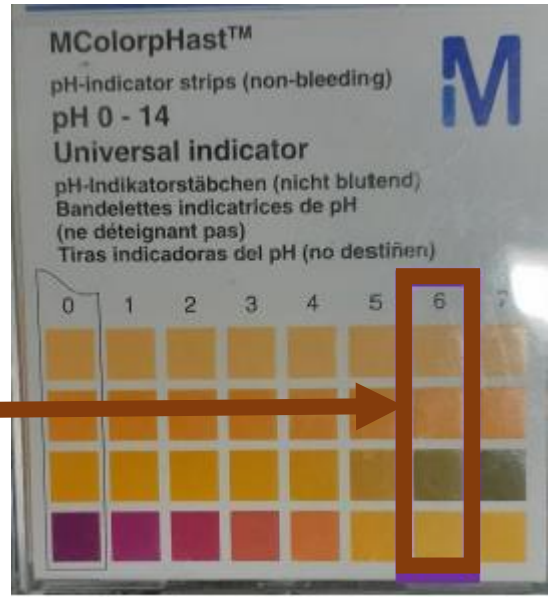
نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۸۰ درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم تا همدما شود. سپس ۲ گرم پودر کربنات کلسیم اضافه می کنیم. در صورت موجود بودن اسید سیتریک در محیط کشت، اسید سیتریک با کربنات کلسیم واکنش داده و تولید سیترات کلسیم می‌کند که بعد از عبور دادن از کاغذ صافی به صورت رسوب گچی در پشت کاغذ صافی قابل مشاهده است.

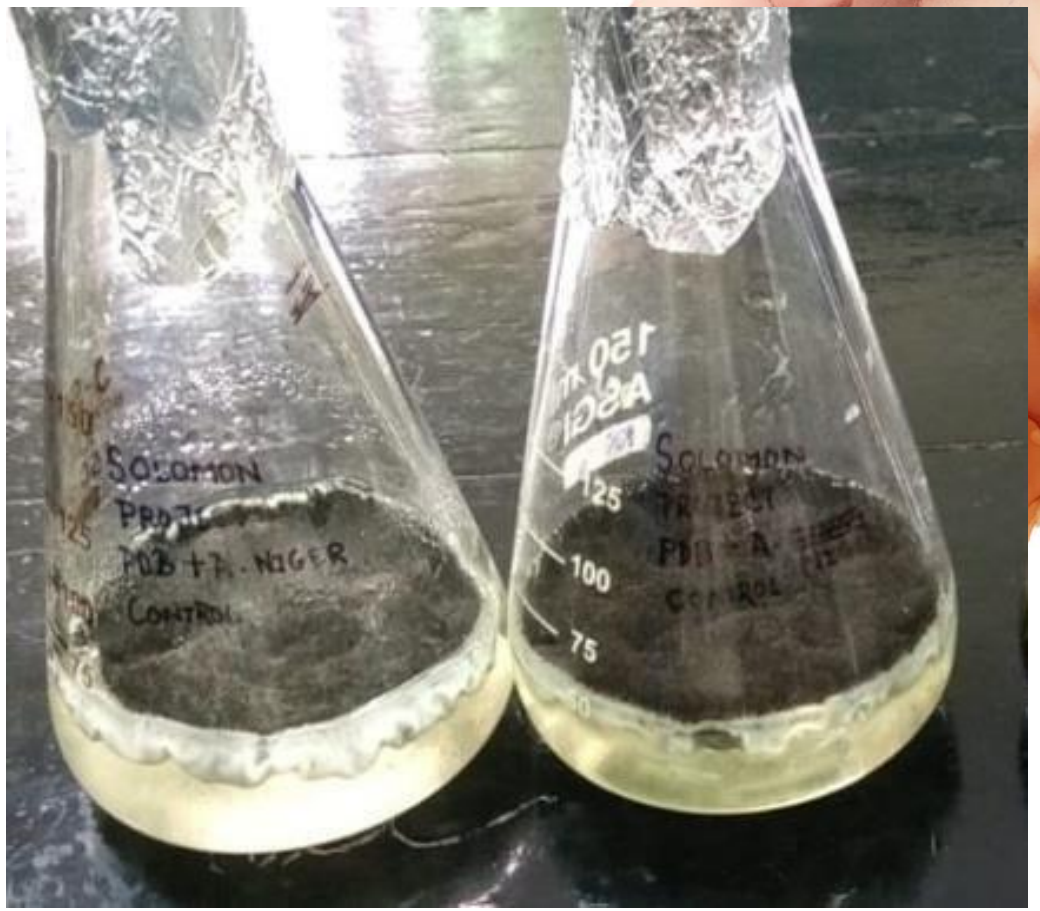
28.5 g
کلرید کلسیم
70 ml



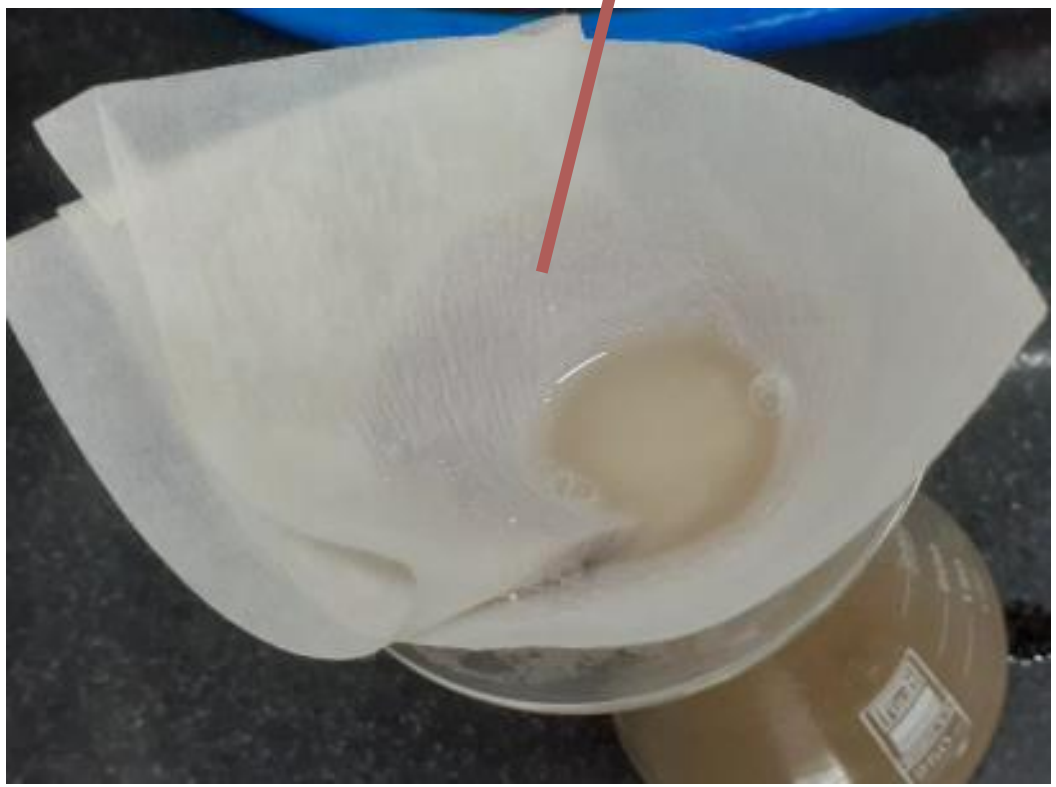
اگرچه روش ها برای سنتز اسید سیتریک با استفاده از ابزارهای شیمیایی نیز به خوبی توسعه یافته اند، اما موفقیت های بهتری با استفاده از تخمیرات میکروبی حاصل شد و در طی مدت زمان، این روش به دلیل انتخاب اقتصادی برای تولید تجاری، به روش اصلی تبدیل شده است، که این بیشتر به دلیل مزیت اقتصادی بیولوژیکی است.

دمای مطلوب برای تولید اسید سیتریک ۳۰ درجه سانتی گراد است، اما اگر درجه حرارت محیط بالاتر از ۳۰ درجه سانتی گراد باشد، بیوسنتز اسید سیتریک کاهش می یابد. این ممکن است به دلیل درجه حرارت بالا باشد که می تواند باعث دناتوراسیون آنزیم سیترات سنتاز و تجمع سایر اسیدهای فرآورده جانبی مانند اسید اگزالیک و سرکوب آنزیم کاتابولیت شود و همچنین از رشد آن جلوگیری می کند.


MColorpHast™
pH-indicator strips (non-bleeding)
pH 0 - 14
Universal indicator
pH-Indikatorstäbchen (nicht blutend)
Bandelettes indicatrices de pH
(ne déteignant pas)
Tiras indicadoras del pH (no destiñen)
0 1 2 3 4 5 6



اسید سیتریک



اسید سیتریک

با تشکر از توجه شما
با آرزوی موفقیت و سلامت