

دیباچه

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

از جمله اسیدهای آلی مورد استفاده، اسید سیتریک است که دارای مصارف متعددی در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و سایر صنایع می باشد که به دلیل غیرسمی بودن، اسیدیته مناسب، قابلیت بافری و ... هر سال به مقدار 2-3% بر میزان مصرف آن افزوده می گردد.

از اولین کشورهایی که در این زمینه 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 به تدریج روش غوطه وری جایگزین روشهای قبلی شد 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 به دلیل امکان استفاده از ضایعات فراوان و ارزان کشاورزی به عنوان سوبسترا 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.

فصل اول

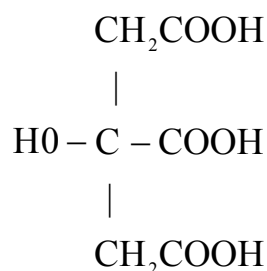
شناخت کلی

اسید سیتريك

مقدمه

اسید سیتریک یک تری کربوکسیلیک اسید ۶ کربنه با فرمول ساختمانی زیر است:

نام شیمیایی آن، ۲- هیدروکسی ۱ و ۲ و ۳ پروپان تری کربوکسیلیک اسید است.



فرمول شیمیایی: $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$

اسید سیتریک جزء طبیعی و متابولیت مشترک گیاهان و حیوانات است و به صورت

خیلی گسترده در صنایع غذایی، نوشیدنی و دارویی و غیره استفاده می شود. به علت

دارا بودن گروههای عاملی مختلف و قابلیت زیست تخریب پذیری، اسید سیتریک و

نمکهای آن (عمدتاً Na و K) کاربردهای صنعتی خیلی زیاد در زمینه های مختلف

دارند.

۱-۱) پیشینه:

این اسید اولین بار در سال 1784 توسط Scheel از آبلیمو جداسازی و کریستالیه شد. اولین بار به طور تجاری در سال 1826 توسط John و Edmond sturge در انگلستان تولید گردید. در سال 1869 در انگلستان از کلسیم سیتريت وارده در ایتالیا تهیه گردید. سیتريت کلسیم را یک کارتل دولتی ایتالیا به نرخ بالایی فروخته بود. این قیمت بالا توسعه خرید سیتريت کلسیم و تولید اسید سیتريك را به تعویق انداخت. در سال 1880 اسید سیتريك توسط Adam و Grimux سنتز شد. از آن زمان تا حال روشهای سنتزی متعددی ارائه شده‌اند که هیچ کدام به تولید صنعتی نرسیده‌اند و دلیل آن بازدهی کم و عدم توجه اقتصادی این روشها نسبت به سایر روشهای تولید است. شروع تولید اسید سیتريك به روش تخمیر به سال 1893 بر می گردد. زمانی که wehmer (گیاهشناسی آلمانی) تشخیص داد که اسید سیتريك متابولیت کپکهای سیترومایسس ففريا نیز (*citromyces pfefferionis*) و سیترومایسس گلابر (*glaber*) است.

کوشش های زیاد wehmer برای تولید اسید سیتريك ناموفق بوده‌اند تا اینکه کوری در سال 1917 تولید انبوه اسید سیتريك به روش تخمیر سطحی را با آسپرژیلوس نایجر پایه گذاری کرد. بعداً کوری به چاس فیرز پیوست و در سال 1923 کارخانه تولید اسید سیتريك به روش جدید را راه اندازی کردند. این تخمیر با رشد میکروارگانیسم به صورت کشت سطحی همراه بود. تولید میکروبی اسید سیتريك با روش کشت سطحی ادامه یافت تا اینکه اولین بار در سال 1951 فرآیند تخمیر غوطه وری پیشرفته در ایالت

متحدہ امریکا توسعہ دادہ شد۔ ابداع این فرآیند تحول عمدہ ای در تولید اسید سیتریک ایجاد کرد۔

از سال 1965 به بعد پیشرفت به سمت معرفی فرآیندهایی بود کہ در آن زمان از مخمرهای خاصی برای تولید اسید سیتریک استفادہ شد۔ در این فرآیندها ابتدا از کربوهیدراتها و سپس از آلکانهای نرمال استفادہ می شد۔ البتہ زمانی کہ هیدروکربنها به عنوان مادہ خام استفادہ می شدند، محصولات نفتی ارزان بودند و طبیعتاً تولید اسید در آن شرایط از نظر اقتصادی مقرون بہ صرفہ بود بہ طوری کہ چاس فیرز پس از یک دورہ استفادہ از هیدروکربن بہ سمت استفادہ از کربوهیدراتها تغییر جهت داد۔ علاوہ بر این، شرکت Liquichimica در ایتالیای جنوبی کارخانہ دیگری با ظرفیت تولید سالیانہ ۵۰ تن سیترات سدیم از آلکانهای نرمال، تأسیس کرد کہ پس از دورہ کوتاهی تعطیل شد۔ علاوہ بر دو روش تخمیر سطحی و غوطہ ور، روش کشت حالت جامد نیز برای تولید اسید سیتریک قابل استفادہ است۔ از این روش بیشتر در کشورهای آسیایی جنوب شرقی استفادہ می شود۔ بہ طوری کہ ہم اکنون ۲۰٪ اسید سیتریک مصرفی ژاپن از این روش تولید می شود۔ در سہ دہہ اخیر تمایل فزاینده ای برای استفادہ از مواد خام جامد و کم ارزش صورت گرفته است۔

(۲-۱) سوبستراهای استفاده شده برای تولید اسید سیتریک

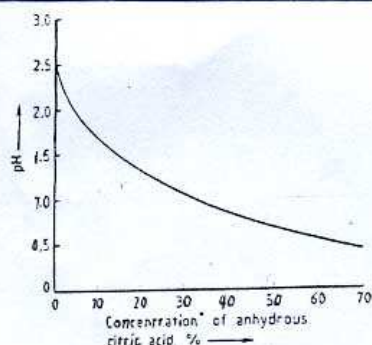
سوبسترا	سال تولید اسید
ملاس و با گاس هندی	۱۹۷۷
شیره خرما	۱۹۷۷
تفاله سیب	۱۹۸۴ و ۱۹۸۸
تفاله انگور	۱۹۸۶
پوست کیوی	۱۹۸۷
لجن فشرده نیشکر	۱۹۹۲
ضایعات قهوه	۱۹۹۳
ضایعات آناناس	۱۹۹۴
Kumara	۱۹۹۷ و ۱۹۹۸
Carob pod	۱۹۹۹
ضایعات کارخانه تولید صدف	۱۹۹۷
چوب ذرت	۱۹۹۸
Cassave bagasse	۲۰۰۰
Okara	۱۹۹۶
ضایعات کارخانه آبجوسازی	۱۹۸۶
ملاس چغندر قند	۱۹۹۱
روغن آفتابگردان	۲۰۰۳
نشاسته خام	۲۰۰۲
n-paraffin	۲۰۰۴
آب پنیر	

۳-۱) خواص فیزیکی اسید سیتریک

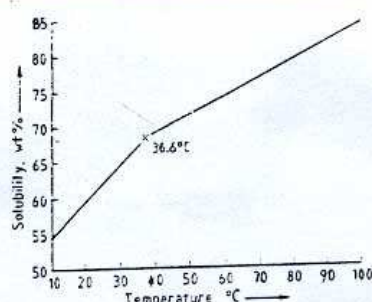
اسید سیتریک بی آب به صورت کریستالهای شفاف بی رنگ یا پودر کریستالی سفید است که به طبقه بلورهای منظم الاضلاع سیستم حاوی سه محور غیر مساوی با تقاطع اریب تعلق دارد. هر دو شکل تحت شرایط رطوبت معمولی وجود دارند، آگیری از شکل تک آبه در هوای خیلی خشک اتفاق می افتد و تحت خلأ در حضور اسید سولفوریک غلیظ این عمل سریعتر رخ می دهد. بلورهای بدون آب به تدریج در هوای مرطوب، آب را جذب می نمایند.

هر دو فرم بلورین تشکیل کلوخه داده و در هوای مرطوب سخت می شوند. حلالیت اسید سیتریک در آب تابعی از دماست. PH محلولهای اسید سیتریک به صورت تابعی از غلظت در شکل (۲-۱) نشان داده شده است. نقاط انجماد و جوش محلولهای اسید سیتریک نیز در جدول (۱-۱) داده شده است. ثوابت تفکیک اسید در 18°C به قرار زیر می باشند:

$$K_1 = 8.2 \times 10^{-4} \quad \text{و} \quad K_2 = 1.8 \times 10^{-5} \quad \text{و} \quad K_3 = 4.0 \times 10^{-6}$$



شکل ۲-۱) غلظت اسید سیتریک در آب بر حسب pH
غلظت بر حسب گرم اسید سیتریک بر ۱۰۰ میلی لیتر محلول $\times 100\%$



شکل ۱-۱) حلالیت اسید سیتریک در آب بصورت تابعی از دما

جدول ۱-۱. نقطه انجماد و جوش محلولهای آبی اسید سیتریک

Concentration, mol kg H ₂ O	Freezing point depression, °C	Boiling point elevation, °C
0.01	0.023	-
0.05	0.042	-
0.10	0.203	-
0.50	0.965	0.284
1.00	1.940	0.577
2.00	1.000	1.214
5.00	-	3.512
10.00	-	8.390
20.00	-	16.600

جدول ۲-۱. حلالیت اسید سیتریک بدون آب و هیدراته در حلالهای آبی در

۲۵ °C و دانسیته محلولها

Form Solvent	Solubility,* g/100 g	d_{25}
Monohydrate		
Amyl acetate	5.980	0.8917
Amyl alcohol	15.430	0.8774
Ethyl acetate	5.276	0.9175
Ether	2.174	0.7228
Chloroform	0.007	1.4850
Anhydrous		
Amyl acetate	4.22	0.8861
Ether (absolute)	1.05	0.7160

* Saturated solution.

جدول ۳-۱. توزیع اسید سیتریک بین آب و اتر

Concentration, mol L ⁻¹		Distribution coefficient
In water	In ether	
At 15 °C		
0.902	0.0077	117
0.460	0.0036	128
0.220	0.0017	129
0.297	0.0023	129
At 25 °C		
0.9175	0.0063	114
0.487	0.0031	155
0.241	0.00155	155
0.315	0.0020	158

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

$C_6H_8O_7$	فرمول مولکولی
192.13	وزن مولکولی
64.04	وزن اکی والان گرم
$153^{\circ}C$	نقطه ذوب
$175^{\circ}C$	دمای تخریب گرمایی
$1.665 \frac{gr}{mol}$	جرم حجمی
$1.96 \frac{mj}{mol}$	گرمای احتراق در $25^{\circ}C$
$117 \frac{j}{gr}$	گرمای انحلال

جدول (۴-۱): حلالیت اسید سیتریک بدون آب

دما	$G/100gr$ محلول اشباع در آب
10	54
20	59.2
30	64.3
40	68.6
50	70.9
60	73.5
70	76.2
80	78.8
90	81.4
100	84.0

غلظت % w/w	PH	چگالی در 25°C
0.1	2.8	-
0.5	2.4	-
01.0	2.2	-
5.0	1.9	-
10.0	1.7	1.035
20.0	-	1.084
30.0	1.2	1.131
40.0	-	1.182
50.0	5.8	2.243
60.0	-	1.294

جدول (۵-۱): PH و چگالی محلولهای آبی اسید سیتریک

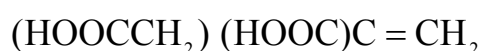
اسید سیتریک 0.1m	سیترات سدیم 0.1m	Ph محلول بافر
mlit	mlit	
46.5	3.5	3.0
33.0	17.0	4.0
20.5	29.5	5.0
9.5	41.5	6.0

جدول (۶-۱): محلولهای بافر اسید سیتریک

اسید سیتریک اسید ضعیف با ثابتهای یونیزاسیون $PK_1 = 3.14$ و $PK_2 = 4.77$ و $PK_3 = 6.39$ در $20^\circ C$ است. لذا وقتی به صورت جزئی در آب حل می شود، سیستم های بافری خیلی عالی تشکیل می دهد که در جدول بالا به آن اشاره شده است. اسید سیتریک یک آبه با وزن مولکولی 210.14 از محلول آبی سرد، کریستاله می شود. این شکل از اسید وقتی به آرامی حرارت داده می شود، در دمای $75^\circ C - 70^\circ C$ آب خود را از دست داده و در محدوده دمای $135 - 152^\circ C$ ذوب می شود.

۱-۴) خواص شیمیایی اسید سیتریک

اسید سیتریک در دمای $175^\circ C$ با از دست دادن آب به شکل اسید آکونیتیک $HOOCCH = (COOH)(CH_2 COOH)$ و با حذف دی اکسید کربن به انیدرید ایتاکونیک تبدیل می شود. انیدرید ایتاکونیک به انیدرید سیتراکونیک باز آرای می شود یا با آبگیری به شکل اسید ایتاکونیک در می آید.



افزایش آب به انیدرید ایتاکونیک خشک شده، اسید سیتراکونیک سیس $HOOCCH = C(CH_3)(COOH)$ را می دهد. تبخیر محلول اسید سیتراکونیک در حضور اسید نیتریک، ایزومرترانس اسید سیتراکونیک یعنی اسید میزاکونیک را ایجاد می نماید. اکسیداسیون اسید سیتریک در دمای $35^\circ C$ با پرمنگنات پتاسیم، ۱ و ۳- استن دی کربوکسیلیک اسید $HOOCCH_2 COCH_2 COOH$ را تولید می نماید. در $85^\circ C$ محصول، اسید اگزالیک $HOOC-COOH$ است.

ذوب اسید سیتریک با هیدروکسید پتاسیم، اسیدهای اگزالیک و استیک را بوجود می آورد. اسید سیتریک بلورهای نمک یک، دو و سه بازی را با بسیاری از کاتیونها تشکیل می دهد.

درجه هیدراسیون این نمکها متغیر است. تری سدیم سولفات می تواند با ۲ یا ۵/۵ مولکول آب کریستاله شود. مخلوط شدن آن با کاتیونهای فلزی، نمکهای کمپلکس نظیر $ZnNa_3H(C_6H_5O_7)_2$ و $ZnNa_4(C_6H_5O_7)_2$ ایجاد می نماید. اسید سیتریک با بسیاری از فلزات تشکیل کمپلکس های پایداری مثل فروآمونیم سیتراها را می دهد که می توانند کریستاله شوند. با بسیاری از یونهای فلزی در محلول، بوسیله تشکیل پیوند بین فلز و گروههای کربوکسیل یا هیدروکسیل می تواند شلات ایجاد کند. گاهی اوقات تعدادی مولکول یا بیشتر اسید سیتریک در بر هم کنش با یونهای فلزی تجمع می یابند. این خصوصیت برای هدایت رسوب دهی، تغییر پتانسیل شیمیایی و دیگر خصوصیات شیمیایی، ارزشمند است. اسید سیتریک به آسانی با بسیاری از الکلهای تحت شرایط معمولی در حضور کاتالیزورهایی نظیر اسید سولفوریک، پاراتولوئن، سولفونیک اسید، یک رزین تعویض یون، استری می شود.

کلریدهای اسیدی و انیدریدها با گروههای هیدروکسیل اسید سیتریک واکنش می دهند. اپوکسایدها نظیر اکسیداتیلن، اکسید پروپیلن و اکسیداستیرن طی واکنش با اسید سیتریک یا استرهای آن در گروههای قابل دسترسی هیدروکسیل و کربوکسیل تشکیل پلیمر می دهند.

آمونیاک، آمینها، آمیدها و کربامیدها به همان صورت واکنش با اسیدهای کربوکسیلیک ساده، با اسید سیتریک وارد واکنش می شوند.

۱-۵) منابع طبیعی اسید سیتریک

اسید سیتریک به صورت گسترده در گیاهان و جانوران وجود دارد. اسید سیتریک کل

سرم خون انسان تقریباً 1 mg/kg وزن بدن انسان است.

جدول (۱-۷): میزان اسید سیتریک در چند گیاه و میوه

نوع میوه	درصد وزن اسید سیتریک
مارچوبه	0.08-0.2
شلغم	0.05-101
نخود	0.05
دانه ذرت	0.02
کاهو	0.016
بادنجان	0.01
انگور فرنگی	1.0
تمشک	1.0-1.3
توت فرنگی	0.6-0.8
سیب	0.008
سیب زمینی	0.3-0.5
گوجه فرنگی	0.25
لیمو	4-8
گریپ فروت	1.2-2.1
نارنگی	0.9-1.2
پرتقال	0.6-1.0
انگور سیاه	1.5-3
انگور قرمز	0.7-1.3

جدول (۸-۱) اسید ستریک موجود در تعدادی از نسوج و مایعات بدن انسان

نوع نسج یا مایع	میزان یون سترات (ppm)
مایع نخائی	25-50
کلیه	20
استخوان	7500
ترشحات بینی	17-100
آب دهان	2-24
اشک	5-7
عرق	1-2
خون	15
پلاسمای خون	25
گلبولهای قرمز	10
شیر	500-1250
ادرار	100-750
غده پستان	3000
غده تیروئید	750-900

۱-۶) کاربرد اسید سیتریک

همانطور که اشاره شد، اسید سیتریک به دو شکل بدون آب و یک آبه تولید می شود. دمای انتقال بین دو فرم 36.6° است. شکل بدون آب توسط کریستالیزاسیون از محلولهای آبی داغ بدست می آید، در حالیکه شکل یک آبه توسط کریستالیزاسیون در دمای کمتر از 36.6° بدست می آید. هر دو صورت در صنعت مصرف می شوند. میزان کاربردهای اسید سیتریک در صنایع مختلف عبارتند از: غذا، شیرینی و نوشابه سازی ۷۵٪، داروسازی ۱۰٪ و سایر صنایع ۱۵٪ و در غذا، شیرینی و نوشابه سازی بیشتر مصرف داشته و به طور وسیع برای ترشی کردن فرآورده های غذایی استفاده می شود. میزان استفاده از آن به عنوان پایدار کننده روغنها و چربیها منجر می شود. از محلول اسید سیتریک در تمیز کردن بویلرهای ایستگاه قدرت و تجهیزات مشابه استفاده می شود. جایی که در شوینده ها روی فسفات محدودیت وجود دارد، تری سدیم سیترات در تمیز کننده های ویژه و آبهای سخت جایگزین می شود. سیترات آمونیوم آهن هنوز در درمان کم خونی استفاده می شود، اگر چه سایر نمکهای آهن به طور فزاینده ای ترجیح دارند. مخلوطی از اسید سیتریک و نمکهای آن دارای ظرفیت بافری خوبی هستند و بوفور در داروسازی، صنایع غذایی و آرایشی استفاده می شوند. برای حذف دی اکسید گوگرد خارج شده از دودکش ایستگاههای قدرت پیشنهاد شده از اسید سیتریک استفاده شود. محلول بافری شامل نمک سیترات به عنوان یک عامل ضد عفونی کننده مورد استفاده قرار می گیرد. استرهای اسید سیتریک حاصل از واکنش با طیف وسیعی از الکلهای شناخته شده اند. بویژه استرهای تری اتیل، تری

بوتیل و استیل تری بوتیل به عنوان نرم کننده های غیرسمی در روکشهای پلاستیکی برای محافظت مواد غذایی استفاده می شود.

از کاربردهای دیگر اسید سیتریک می توان به موارد ذیل اشاره نمود:

۱- نوشابه های الکلی و شربتها:

اسید سیتریک به دلیل طعم ترش مطبوع، کمک به جوشش و کربناسیون به عنوان نگاهدارنده در شربتها و نوشابه ها مورد استفاده قرار می گیرد. این اسید همچنین سبب جدا شدن فلزات که ایجاد تیرگی نموده و سبب تسریع فساد و رنگ و طعم می شوند، می گردد.

۲- عصاره میوه جات و سبزیجات:

به طور کلی مقادیر پایین PH، یک اثر حفاظتی بر روی پیگمانهای آب میوه جات اعمال می نماید. وجود اسید سیتریک در عصاره میوه جات و سبزیجات و نهایتاً افت PH سبب افزایش مقاومت در برابر فساد می گردد. در آب گوجه فرنگی توسط افزودن اسید سیتریک به میزان 0.1% از رشد میکروارگانیسمهای flatsour که سبب از بین رفتن طعم می گردند، جلوگیری می شود. همچنین طعم طبیعی عصاره گریب فروت و سایر میوه جات به علت طعم ترش و مطبوعی که اسید سیتریک ایجاد می کند، تشدید می شود.

۳- شیرینی جات:

اسید سیتریک به منظور تشدید طعم میوه های مختلف مانند توت فرنگی، شاتوت و انگور در شیرینی پزی و بخصوص آبنبات سازی استفاده می شود. در موارد بسیاری به علت حلاطیت کم ساکیارز نسبت به قندهای احیاء بهتر است که ساکارز به دو قند

ساده دکستروز و Lerulose هیدرولیز شود. اضافه نمودن اسید سیتریک در خلال فرآیند پخت سبب هیدرولیز ساکارز به قندهای ساده که به آسانی کریستال نمی شوند، می گردد.

۴- دسر ها:

در صنعت دسرهای ژلاتینی، کنترل PH از اهمیت خاصی برخوردار می باشد. زیرا که کیفیت ژلاتین تابع مقادیر PH است. اسید سیتریک نه تنها PH را در اپتیمم مقدار خود یعنی 2-3.5 تنظیم می نماید، بلکه طعم مطبوعی ایجاد می نماید. حالیت بالا و غیرسمی بودن اسید سیتریک نیز در این صنعت اهمیت بسیار زیاد دارد.

۵- ژله و مرباجات:

اسید سیتریک، PH ژله ها و مرباجات را به نحوی تنظیم می نماید که پکتین بتواند به خوبی عمل نماید. اضافه نمودن اسید سیتریک پس از تغلیظ نمودن مخلوط پخته شده قند، پکتین و عصاره ژله صورت می گیرد. مقدار اسید سیتریک مصرفی بسته به نوع و خصوصیات پکتین متفاوت است.

۶- میوه جات منجمد:

اکسیداسیون مواد تولید کننده رنگ مانند کاتکولز (Catechols) سبب بیرنگی میوه جات می گردد. هر چند اسید اسکوربیک که به طور طبیعی در میوه جات موجود است، به عنوان آنتی اکسیدانت عمل می نماید. لیکن اثر حفاظتی آن تا زمانی است که توسط آنزیمهای میوه از بین نرود. البته برای رفع این مسئله می توان از عمل blanching (از بین بردن آنزیمها توسط حرارت) استفاده نمود ولی این فرآیند سبب ایجاد طعم پختگی در میوه ها می شود که این طعم در محصولات که به صورت تازه منجمد می

شوند، مطلوب نیست. از طرفی وجود فلزات trace از قبیل مس و آهن نیز فساد اسید اسکورییک را سرعت می بخشد که در این مورد blan ching هیچ تأثیری روی حضور این فلزات ندارد.

اسید سیتریک به دو منظور در بسته بندی کردن میوه جات منجمد بکار می رود. اول آنکه چون عمل پوست گیری، معمولاً توسط مواد قلیایی صورت می گیرد، پس از شستشوی کامل میوه با آب باقیمانده قلیا توسط قرار دادن میوه جات سبزیجات و در محلول 1-2% اسید سیتریک خنثی می گردد. در غیر این صورت قلیایی باقیمانده، اسید اسکورییک را از بین می برد. اسید سیتریک با کاهش PH و در نتیجه غیرفعال نمودن آنزیمهای اکسید کننده، ثبات اسید اسکورییک و همچنین شرایط پایداری را فراهم می سازد. علاوه بر این با قرار دادن میوه جات و سبزیجات در محلول اسید سیتریک، نابودی اسید اسکورییک توسط فلزات trace به تعویق می افتد. ضمناً با اضافه نمودن اسید سیتریک به همراه اسید دی ریتروئیک و یا سدیم دی اریتروبات به محصولاتی از قبیل هلو، گلابی، گیلان و معجون میوه جات از تغییرات نامطلوب طعم و رنگ ناشی از اکسیداسیون، جلوگیری می شود. اسید سیتریک فلزاتی را که سبب تسریع اکسیداسیون می شوند، به صورت کمپلکس در می آورد که به این ترتیب بی رنگ شدن به تعویق افتاده و طعم ویتامینهای طبیعی حفظ می شود.

۷- صنایع دارویی:

اسید سیتریک در تهیه مواد دارویی به عنوان ایجاد کننده و تشدید کننده طعم شربت ها و محلولها بکار می رود. اسید سیتریک همراه با بی کربنات سدیم هنگام انحلال در آب ایجاد گاز کربنیک می نماید که از این خاصیت اسید در تهیه قرصها و پودرهای

جوشان استفاده می گردد. در تهیه این قرصها و پودرها در اشل صنعتی از نمکهای اسید سیتریک از قبیل سیترات سدیم و سیترات پتاسیم نیز استفاده می شود.

۸- لوازم آرایشی:

اسید سیتریک در صنایع آرایشی نیز مورد استعمال زیادی دارد. شستشوی موی سر با آب حاوی مقداری اسید سیتریک، باعث براق شدن آن می گردد. اسید سیتریک در لوسیونهای مخصوص پوستهای چرب که دارای منافذ بزرگ می باشند و همچنین در لوسیونهای سفید کننده پوست به عنوان تنظیم کننده PH بکار می رود.

۹- شستشوی فلزات:

اسید سیتریک با از بین بردن رنگ، جرم و لکه از سطوح فلزی، درخشندگی آنها را سبب می شود. به منظور تأثیر بیشتر این اسید ابتدا با ذرات گریس، روغن و گرد غبار از سطوح فلزی زدوده شود. این عمل توسط حلالهای آلی، امولسیونها و یا محلولهای قلیایی صورت می پذیرد. در فرمولاسیون اغلب شفاف کننده های آلومینیوم، اسید سیتریک نیز وجود دارد.

۱۰- حذف جرم و رنگ:

در اوایل سال ۱۹۱۳ کشف شد که محلولهای آمونیاکی داغ اسید سیتریک در از بین بردن زنگ از وسایل آهنی بسیار مؤثر است. با اضافه نمودن یک پوند هیدروکسید آمونیوم ۲۹/۴٪ به ۱/۶۶ پوند اسید سیتریک بدون آب در حضور مقدار مناسب آب، یک حلال شستشوی آماده برای مصرف بدست می آید. البته در دمای بیشتر از 100°F این حلال مؤثرتر است. این محلول گذشته از عمل پاک کنندگی مؤثر آن به دلیل

غیررسمی بودن از امتیاز خاصی برخوردار است و شخص با استفاده از این محلول، در معرض خطرات ناشی از استفاده از ترکیبات دیگر قرار نمی گیرد.

۱۱- شستشوی شیمیایی:

استفاده از اسید سیتریک در پاک کننده های شیمیایی در سالهای اخیر افزایش یافته است ژنراتورهای بخار با فشار زیاد، شامل قسمتهای مختلف هستند که از مواد austenitic ساخته شده اند. از آنجاییکه این مواد نسبت به شستشو با اسیدهای کلردار بسیار حساس می باشند، شستشوی آنها توسط محلول اسید سیتریک جهت تمیز نمودن تجهیزات شیمیایی و راکتورهای اتمی و وسایلی نظیر اینها نیز بکار می رود. پرداخت فلزات بوسیله جریان برق، آب مس کاری، بازیابی ثانویه نفت، چاپ و موارد متفرقه. اسید سیتریک نقطه شروع تولید انواع استرها، نیتراهای سدیم، آمونیوم، کلسیم، یون فریک منیزیم، پتاسیم، منگنز و استرانسیم است.

۷-۱) مشتقات اسید سیتریک

۱-۷-۱) نمکها

نمک سترات تری سدیم از اضافه کردن دقیق محلول 50% وزنی هیدروکسید سدیم به محلول اسید سیتریک تا رسیدن به $PH=8-8.5$ بدست می آید. واکنش گرمازا است و برای جلوگیری از جوشیدن محلول، لازم است سرد شود. محلول گرم با کربن فعال تیمار می شود تا قبل از کریستاله شدن و تبخیر ناخالصی های آن حذف شوند. برای جداسازی سترات سدیم محلول تغلیظ شده صاف می شود، سپس با آب شسته شده،

در خشک کن هوای گرم خشک شده، دانه بندی شده و به صورت های مختلف بسته بندی می شود.

نمکهای آمونیوم اسید سیتریک با اضافه کردن آمونیاک محلول یا گاز به محلول آبی اسید سیتریک بدست می آید. این نمکها ترجیحاً به صورت مایع استفاده می شوند.

۱-۷-۲) استرها

استرهای مهم اسید سیتریک عبارتند از تری متیل سیترات، تری اتیل و تری بوتیل سیترات استیله شده. استرهای زیاد دیگری نیز وجود دارند که هنوز در مقیاس، استفاده نشده اند. برای تولید استرهای اسید سیتریک تحت شرایط آزئوتروپیک با یک حلال، یک کاتالیست و الکل مناسب واکنش صورت می گیرد. معمولاً کاتالیست هایی مثل H_2SO_4 ، اسید پاراتولوئن سولفونیک، رزین های تبادل یونی، اسید سولفوریک و استفاده می شوند. هنگامی که شرایط آزئوتروپیک حاکم است برای جلوگیری از تجمع بیشتر آب، تشکیل شده بطور مداوم آب حاصل از واکنش استری شدن برداشت می شود. معمولاً در این حالت واکنش کامل است و حلال و الکل اضافی تحت خلاء معمولی تقطیر می شود. با استفاده از کربنات یا هیدروکسید سدیم کاتالیست خنثی شده و محصول خام باقی می ماند. اگر محصول خالص مورد نظر باشد، تقطیر در خلاء بالا انجام می گیرد. خواص استرهای اسید سیتریک در جدول (۱-۹) آمده است. استرهای اسید سیتریک به عنوان نرم کننده در پلاستیک هایی مثل پلی وینیل کلراید، پلی وینیلیدین کلراید، پلی وینیل استات، پلی وینیل بوتیرات، پلی پروپیلن، لاستیک

کلرینه شده، اتیلن سلولز و نیترات سلولز استفاده می شود. بیشتر استرها غیر سمی بوده و در بسته بندی های مواد غذایی بکار می رود.

جدول (۱-۹): استرهای اسید سیتریک

نام استر	وزن مولکولی	چگالی	نقطه جوش
تری اتیل سیترات	276.29	1.136	126-127
تری n- بوتیل سیترات	360.43	1.042	169-170
تری سیکلو هگزیل سیترات	438.57	1.7	357
استیل تری اتیل سیترات	318.31	1.135	131-132
استیل تری n- بوتیل سیترات	402.46	1.046	172-174
استیل تری ۲- اتیل هگزیل سیترات	570.81	0.983	225

فصل دوم

پیشینه تفسیر و

منابع تفسیر و تفسیر

۲-۱) نقش فیزیولوژیکی اسید سیتریک

اسید سیتریک متابولیت چرخه کربس است. در طی این چرخه کربوهیدراتها، چربیها، پروتئینها به دی اکسید کربن و آب تبدیل می شوند. ضمناً این چرخه انرژی لازم برای رشد، تولید مثل، حرکت، تولید شیمیایی مواد و . . . میکروارگانیسمها را فراهم می کند. چرخه کربس را می توان طوری هدایت کرد که در آن تولید اسید سیتریک به بیشترین مقدار خودش برسد. این موضوع اساس فرایندهای تخمیری تولید اسید سیتریک را تشکیل می دهد.

۲-۲) بیوشیمی تخمیر

شکل (۲-۱) یک روند ساده شده از انواع واکنشهای آنزیمی متناسب با سنتز و شکستن اسید سیتریک را نشان می دهد. اسید سیتریک در محیطهای کشت با $PH=1.8-2$ دفع و تولید می شود. یعنی در شرایط اسیدی که اکثر موجودات زنده قادر به تحمل آن نیستند. در مورد PH درون میتوکندری یا حتی سلول میکروارگانیسمهایی که در این محیط زندگی می کنند، اطلاع زیادی در دست نیست ولی برای رفع این تناقض تفاسیری وجود دارد. Blumenthal در سال ۱۹۶۵ مسیرهای متابولیک مختلف قارچها را توضیح داده است. در آسپرژیلوس نایجر ۷۸٪ از قند مصرفی در مسیر (EMP) Embden- Meyerhof- Parans مصرف می شود. در محیط تخمیر اسید سیتریک، این درصد تغییر می نماید. تحت این شرایط گلیکولیز هم از مسیر EMP و هم از مسیر هگز و منوفسفات (HMP) به طور مداوم فعال است. بطوریکه حداکثر فعالیت مسیر

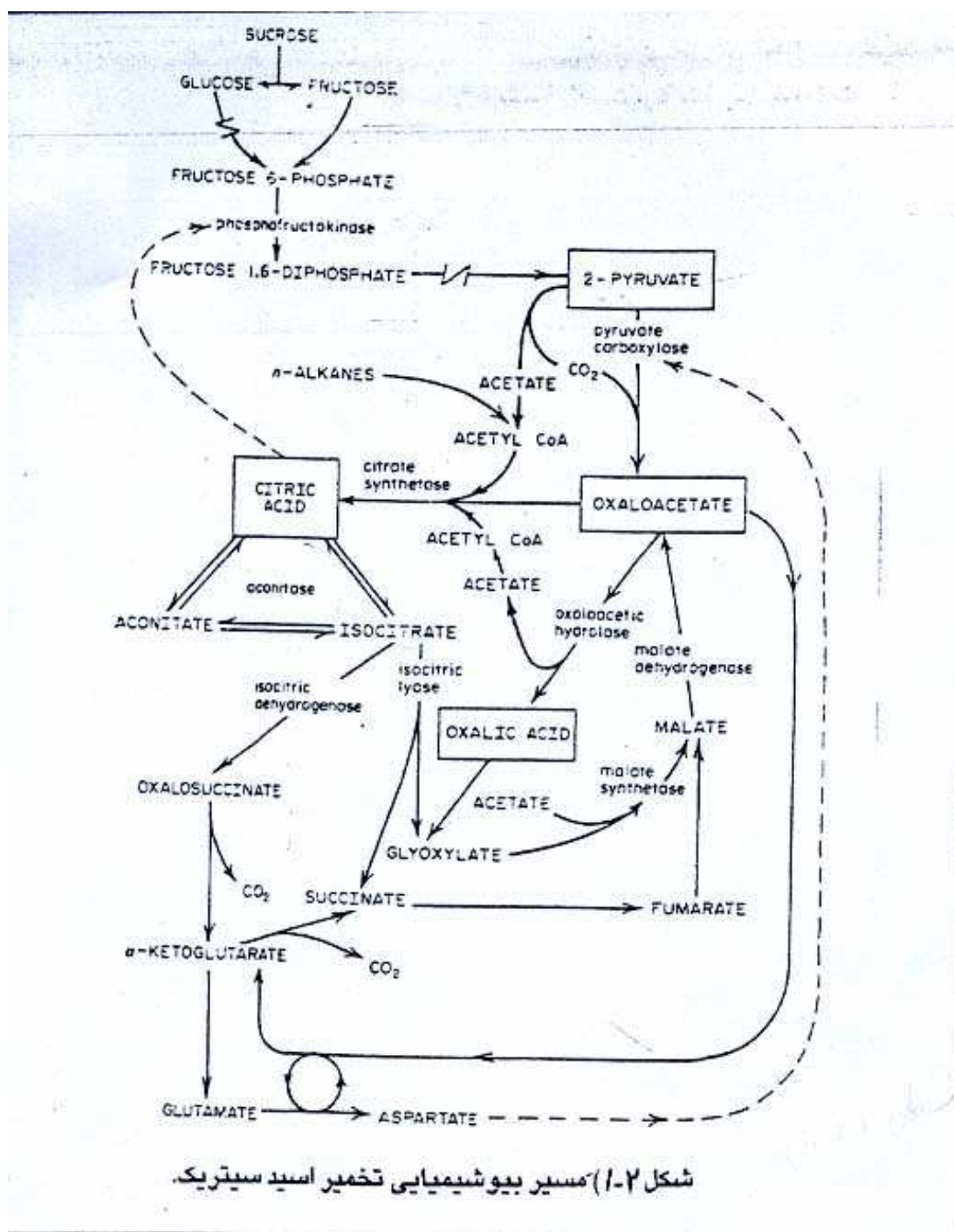
EMP در مرحله رویشی و حداکثر فعالیت HMP در مرحله تولید کونیدی رخ می دهد. در خلال رشد مقدار اسید سیتریک در محیط کشت کم است، در حالیکه بیشترین مقدار اسید سیتریک توسط سلولهایی تولید می شود که در فاز تکثیر نیستند. بنابراین کشتهایی که در آنها اسپورگذاری رخ می دهد، تقریباً فاقد اسید سیتریک هستند. بنابراین تصور می شود که مسیر EMP نقش اصلی را در گلیکولیز تخمیر اسید سیتریک دارد. Spradin و Verhoff در ۱۹۷۶ موازنه جرمی برای سیستمی که ورودی آن پیرووات و محصولاتش اسید سیتریک، اسید اگزالیک و دی اکسید کربن می باشند، برقرار نمود.

تجزیه نتایج به ارائه دو شماتیک متابولیک منجر گردید. یکی از این شماتیکها با کار cleland و johnson در ۱۹۵۴ یکی بود و دیگری شامل کربوکسیلاسیون دو ملکول پیرووات و تولید دو ملکول از اگزالواستات بود. یکی از اینها توسط اگزالواستیک هیدرولاز به اسید اگزالیک و استات هیدرولیز می شد. بخش استات در تراکم با مولکول دیگر اگزالواستات، اسید سیتریک تولید می کند. مطابق با این طرح، اگزالات به گلايوکسیلاتی که با سوکسینات، توسط عمل ایزوسیترات لياز در جهت مخالف ایزوسیترات متراکم شده، احیاء می گردد. دو مولکول دی اکسید کربن روی مسیری که برای کربوکسیلات دو ملکول پیرووات در شروع شماتیک استفاده شده، کم می شود.

مسیر EMP:

وجود آنزیمهای این مسیر در آسپرژیلوس نایجر محرز است. آلدولاز آسپرژیلوس - نایجر برای فعالیت به روی نیاز دارد. سیترات یک باز دارنده بازخور شناخته شده فسفو فروکتو کیناز (PEK) است و آشکارا تعدیل این بازداری برای تجمع خوب اسید

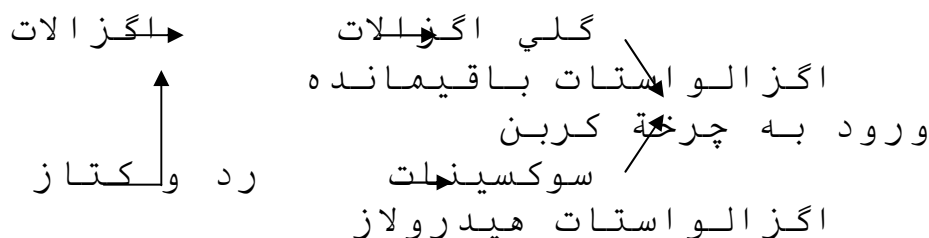
سیتریک نیاز دارد. چند تن از محققین نشان دادند که در اثر کمبود منگنز، تجمع یونهای NH_4^+ در سلول (طی تولید اسیدیته) رخ می دهد که این شرایط، روی حذف بازدارنده PEK توسط سترات مؤثر است.



۲-۱) تشکیل اسید سیتریک از پیرووات

ابتدا اگزالواستات به واحد بزرگتر متصل شده و در نتیجه باعث چرخش این واحد به مقدار ۱۵ درجه آنگستروم نسبت به واحد با جرم بزرگتر چرخش پیدا کرده و برای اتصال با استیل کوآنزیم A آماده می شود. این چرخش باعث پلاریزه کردن بعضی پیوندهای مشخص شده و نیز گروه هیستیدین آنزیم با اکسیژن گروه کربونیل اگزالواستات واکنش داده و کربن اگزالواستات را برای اتصال به استیل کوآنزیم A آماده و مهیا می کند. از طرفی یک هیستیدین دیگر با گرفتن پروتون از گروه متیل، استیل کوآنزیم را به فرم انولات تبدیل نموده، بنابراین استیل کوآنزیم A را به اگزالواستات نزدیک می نماید و به این ترتیب پیوند کربن - کربن ایجاد شده و ساخت سیتریل کوآنزیم A را باعث می شود. تا این زمان جایگاه فعال آنزیم که تا بحال کاملاً پوشیده بود با یک چرخش ایجاد مکانی را می کند که دارای آسپارات می باشد. آسپارات با گرفتن یک مولکول آب باعث هیدرولیز تیواستری و در نهایت، آزاد شدن کوآنزیم A می شود. پس از این حالت آنزیم به حالت اولیه خود برگشته و سیترات را آزاد می کند. از نکات مورد توجه در چرخه کربن سرعت تولید سیترات است که کاملاً به ATP وابسته است. گزارشات حاکی از آن است که ATP یک مهار کننده آلوستریکی برای سیترات سنتتاز است و با کاهش درجه اشباعیت آنزیم در نهایت باعث کاهش تولید سیترات می شود. میکروارگانیسمها در مراحل اولیه تولید اسید و در هنگام ساخت کونیدی از مسیر هگزوز مونوفسفات استفاده می کنند و چنانچه پیشتر ذکر شد، در اکثر مواقع از طریق مسیر EMP عمل می کنند که در واقع ۸۰٪ کل متابولیسم نیز از این طریق صورت می گیرد.

با کاربرد کربن رادیواکتیو، دانشمندان ثابت کردند که در تولید اسید سیتریک، ۴۰٪ توسط استیل کوآنزیم A و ۶۰٪ توسط ترکیب اگزالواستات به اشتراک گذاشته می شود.



این فرآیند هنگامی که تولید اسید صورت نمی گیرد، با استفاده از آنزیم گلی اگزالواستات هیدرولاز بدست آمده از آسپرژیلوس نایجر مورد تأیید قرار گرفت. اسید سیتریک در چرخه کربس توسط آنزیم اکونیتاز به ایزوسیترات مبدل می شود. (این آنزیم یک کاتابولیزکننده در چرخه کربس است). در طی تولید و تجمع اسید سیتریک، اکونیتاز هیچگونه فعالیتی را نشان نمی دهد. همچنین با اندازه گیری اکونیتاز در میتوکندری به تعادل بین سیترات و ایزوسیترات پی می بریم و به این نتیجه می رسیم که مهار آنزیم اکونیتاز، تولید اسید را تا ۹۵٪ افزایش می دهد. اکونیتاز دارای یک اتم آهنی است که به چهار گوگرد در سیتین پیوند برقرار نموده است. به این ساختار کمپکس گروههای پروتئینی آهن- گوگرد نیز می گویند. اکونیتاز ابتدا با هیدراته و سپس دهیدراته کردن سیترات باعث تعویض H و OH بین کربن های ۲ و ۳ شده و سیترات را نهایتاً به ایزوسیترات تبدیل می کند و در نتیجه باعث کاهش سیترات کل می شود. مقادیر بسیار کم پراکسید هیدروژن، آهن و مس، آنزیم اکونیتاز را مهار و باعث افزایش تولید می شوند. از اثرات مستقیم بر روی تولید اسید سیتریک، عمل آنزیمهای ایزوسیترات دهیدروژناز و ایزوسیترات لیااز است که باعث شکسته شدن

ایزوسیرات شده و تعادل آنرا از سمت سیرات به ایزوسیرات پیش می برند و در واقع اکونیتاز را تقویت و فعالیت می کنند. مطالعات نشان می دهند که فروسیانید، اسید ستیریک، ATP و NADH باعث مهار آنزیمهای فوق شده و در نهایت باعث افزایش تولید اسید می شوند ولی NADP و NAD و ADP باعث تحریک این آنزیمها شده و باعث کاهش تولید می شوند. از اثرات غیر مستقیم آنزیمهای دیگر فعالیت پیرووات کربوکسیلاز است که پیرووات را به اگزالواستات، یعنی ترکیب اصلی در تولید اسید تبدیل می کند. این آنزیم بسیار مهم بوده و معلوم شده است که آسپارتات باعث مهار این آنزیم و در نهایت باعث کاهش تولید اسید می شود. دی اکسید کربن آزاد شده، توسط پیرووات کربوکسیلاز گرفته شده و پیرووات را به اگزالواستات مبدل می کند. بنابراین دی اکسید کربن آزاد نمی شود. گلوکز می تواند از طریق چرخه پنتوزفسفات نیز کاتابولیزه و تجزیه شود. آنزیمهای این سیکل در *A. niger* مشخص شده اند. از آنجایی که اسید ستیریک از طریق ترکیب استیل کوآنزیم A و اگزالواستیک اسید تحت تأثیر سیرات سنتتاز ساخته می شود و اگزالواستات در چرخه اسید ستیریک (کربس) ساخته می شود، هنگامی که اسید ستیریک تجمع یافته و غلظتش زیاد می شود، این چرخه با شدتهای متفاوتی محدود یا بسته می شود. بنابراین برای فراهم کردن اگزالواستات به یک سری واکنش نیازمندیم که به نام واکنشهای آناپلروتیک معروفند. اولین و کلیدی ترین آنزیم در این چرخه، آنزیم پیرووات کربوکسیلاز است و همانگونه که قبلاً ذکر شد، پیرووات و CO_2 را به اگزالواستات، فسفات معدنی و ADP تبدیل می کند. این واکنش بستگی به یونهای Mg و k داشته و استیل کوآنزیم A برای واکنش مورد نیاز است. آسپارتات از فعالیت پیرووات کربوکسیلاز جلوگیری می کند،

اما از آنجایی که ∞ کتوگلو تارات دهیدروژناز در مدت تجمع اسید سیتریک حضور نداشته، لذا غلظت آسپارتات باید کم بوده و بازدارند گیش حداقل باشد. دومین قسمت واکنش آناپلروتیک، تبدیل فسفوانل پیرووات و CO_2 به اگزالوات و ATP در حضور ADP توسط آنزیم فسفوانول پیرووات کربوکسی کیناز است که سیستم به Mg و Mn یا k و آمونیوم محتاج است.

البته اگر استات و یا ترکیبات الیفاتیکی نظیر آلکانهای خطی به عنوان منبع کربن بکار روند، سومین مرحله واکنش آناپلروتیک رخ می دهد. در غیاب گلوکز چرخه گلی اگزالات رخ می دهد که ایزوسیترات لیا و مالات ستتاز حضور دارند. در حضور گلوکز چرخه گلی اگزالات انجام نمی گیرد، اگر چه ایزوسیترات لیا هنوز به طور جزئی فعال است.

فصل سوم روشهای تولید اسید سیتریک

۳-۱) M.O های مولد اسید سیتریک

اسید سیتریک به میزان فراوانی توسط *A.niger*، برخی از مخمرها و باکتریها تولید می شود. این یک پدیده طبیعی در این موجودات نیست، بلکه تحت برخی از فشارهای متابولیکی در طی رشد میکروب، این اسید بدست می آید و البته انتخاب سویه های مناسب و بدست آوردن موتانهایی که متابولیسم آنها مستعد برای تولید اسید سیتریک می باشد، به این مسأله کمک می کند. بیشتر آزمایشات و تحقیقات انجام شده در تولید اسید بر روی محیطهای مناسب رشد و نمو *A.niger* انجام شده است. این آزمایشات با استفاده از بررسی نیازهای غذایی M.O و روشهای مؤثر در بهبود فعالیتهای آنزیمهای حیاتی آن در مراحل متعدد تخمیر انجام گرفته است.

برای تولید صنعتی از موتانهای *A.niger* و سویه های نزدیک به آن مثل *A.vantali* استفاده می کنند. آسپرژیلوس ها در مقایسه با سویه های پنی سیلیوم در زمان یکسان مقادیر بیشتری اسید تولید می کند. در ضمن محصولات نامطلوب فرعی مثل اسید اگزالیک، ایزوسیتریک و گلوکونیک در این موتانها کمتر تولید می شوند. تریکودرماها از نقطه نظر کاربردی و به دلیل تجزیه مطلوب سلولزی پس از آسپرژیلوس ها و مخمرها قرار دارند. تولید اسید سیتریک با مخمرها نسبت به *A.niger* دارای تفاوت های ذیل می باشد:

۱- مخمرها به مقادیر Mn حساس نیستند. (برخلاف *A.niger*)

۲- مخمرها به جای تولید اسید در PH پایین در PH=5 تولید اسید می کنند.

۳- برای شروع کار، آنزیم سیترات سنتتاز مخمرها برخلاف *A.niger* به محدودیت نیتروژن نیاز ندارد.

۴- مخمرها به فاکتورهای رشد مثل تیامین، بیوتین، اینوزیتول و احتیاج دارند.

۳-۱-۱) مخمرها

این M.O ها قادرند از منابع قندی و آلکانی استفاده کرده و اسید سیتریک تولید نمایند. مخمرها علاوه بر تولید اسید سیتریک در $PH=5$ قادرند اسید ایزوسیتریک نیز تولید کنند که در $PH=7-9.5$ قادر به تبدیل آن به اسید ایزوسیتریک می باشند. همچنین افزودن موادی مثل فلوئوراستات، فلوئورو استامید و استات سرب به محیط کشت، تولید اسید سیتریک را زیاد می کند.

۳-۱-۲) اسپرژیلوس نایجر:

این M.O از رده آسکومیستهای بوده، تولید مثل معمولاً غیرجنسی است و میسلیم آن به مقدار زیادی منشعب شده و دیواره عرضی بیرنگی را ایجاد می کند. سلولهای این M.O چند هسته ای می باشند. میسلیم هوایی آن در انتهای خود برجسته بوده و منتهی به وزیکول با استریگماهای متعدد می شود و از انتهای این استریگماها، کنیدیها به صورت دانه های تسبیح به دنبال هم قرار گرفته اند. به این M.O کپک سیاه هم می گویند که به دلیل منظره سیاه رنگی است که در محیط کشت مناسب بعد از اسپورزایی پدید می آورد. اصولاً رنگ کلونیهای این کپک ارتباط مستقیم با عناصر کمیاب محیط کشت دارد. حتی در بسیاری از موارد که به طریق شیمیایی یا فیزیکی نمی توانند وجود یا عدم بعضی از عناصر کمیاب را مشخص کنند، با کاربرد A.niger کمیت و کیفیت

آنها تعیین و اندازه گیری می کنند. در سال ۱۹۵۲ دو دانشمند به نامهای مارتین و واترز تأثیر مورفولوژیکی A.niger را در تولید اسید سیتریک از ملاس قند بررسی کردند. در سال ۱۹۸۲ B revic و Cimerman تجمع میسلیم به شکل کروی پایدار منشعب و در هم پیچیدگی جزئی شبکه هیف را به نام Pellete مطرح کردند. سپس در سال ۱۹۸۶ Brevic، پلتها را با چند mlit قطر تعریف نمود و نشان داد که سوسپانسیون پلتها نسبت به حالت شاخه دار و منشعب دارای ویسکوزیته کمتری می باشد. این کپک را به صورت طبیعی می توان از خاک آبمیوه های کپک زده و ... و با کمک محیطهای اختصاصی رشد کپک نظیر PDA و SAD جدا نمود.

۳-۱-۲-۱) روش جداسازی سویه آسپرژیلوس نایجر مولد اسید سیتریک

سویه ای که قادر به تولید اسید سیتریک باشد از محیطهایی که خود به طور طبیعی در این جهت غنی سازی شده اند، آزمایش و استفاده می شود. بدین منظور از خاک اطراف درختان مرکبات و ... نمونه برداری انجام می شود. روش جداسازی عمومی A.niger از نمونه خاک بدین ترتیب است که ابتدا از خاک توسط آب مقطر سوسپانسیونی تهیه می شود که پس از رسوب ذرات خاک و مواد معلق آن از مایع رویی شفاف برای ادامه کشت استفاده می شود. سپس توسط پی پت، ۰.۱ میلی لیتر از مایع رویی برداشته و به تدریج حدود ۷ تا ۸ قطره روی محیطهای انتخابی (MEA, PDA, SDA) کشت داده می شود. این سه محیط به دلیل دارا بودن PH اسیدی به عنوان محیط انتخابی برای رشد کپکها بکار می روند. پس از ریختن این محیطها در پلیت با کشت قطره ای یا

پس از سه بار تجدید کشت می‌توان اطمینان حاصل نمود که نمونه جدا شده *A.niger* است. این *M.o* را روی محیط شیبدار در دمای 4°C نگهداری نموده و به ترتیب مورد آزمایش قرار می‌دهند.

۳-۲-۱) شناسایی اختصاصی اسپرزیلوسی نایجر

برای تعیین اختصاصی گونه‌های آسپرژیلوس، کلونیهای آنرا روی محیط کشت Czapeck Agar بررسی می کنند. این محیط شامل: ساکارز، نیتрат سدیم، فسفات دی پتاسیم، سولفات منیزیم با هفت مولکول آب، سولفات آهن با هفت مولکول آب، آگار و آب مقطر می باشد. چهار نکته اصلی در تشخیص سویه *A.niger* به ترتیب عبارتند از:

- ۱- رنگ کلونی
۲- شکل کلونی
۳- نوع ستونک (کروی و صاف)
۴- نوع استریگما

جدول (۱-۲): M.o های مولد اسید سیتریک

باکتری ها	مخمرها	قارچها
Bacillus subtilis	Candida sp.	A.niger
Brevibacterium sp.	Hansenula sp.	A.awamori
Bacillus licheni formis	Pichia sp.	A.fonsecaeus
Comyebacterium sp.	Deba romyces sp.	A.fuchensis
	Torulofsis sp.	A.ureentii
	Rhodotorula sp.	A.saitol
	Sporobolomyces sp.	A.usami
	Endomyces sp.	A.fumaricus
	Nocardia sp.	A.phoenicus
	Saccharomyces sp.	A.tanosus
	Zy gosaccharo my ces sp.	A.flavus
		Penicillium janthinellam
		p.restrictam
		Trichoderma riride
		Mucor piriformis
		U stulina vulgaris
		Botrytis sp.
		Ascoclyta sp.
		A bsidia sp.
		Talaromyces sp.
		Acremoniam sp.
		Eupenicillium sp.

۲-۳) روش کشت سطحی

این روش اولین بار در سال ۱۹۱۹ توسط انجمن تولید محصولات آلی بلژیک معرفی شده و متعاقب آن در سال ۱۹۲۳ چاس فیرز کارخانه تولید اسید سیتریک به این روش را افتتاح کرد. در این روش محیط کشت به داخل سینی استیل ضد زنگ یا آلومینیومی که در داخل اتاقک های سترون تخمیر قرار گرفته هدایت می شود. در بیشتر اتاقکها درجه حرارت، رطوبت نسبی و سرعت هوا کنترل می شود محیط کشت با A.niger تلقیح می گردد و حدود ۸-۱۲ روز در دمای $28-30^{\circ}\text{C}$ در رطوبت نسبی ۶۰-۴۰ نگهداری می شود. پس از اتمام فرآیند، PH محیط کشت اندازه گیری شده و سپس اسید سیتریک آن جداسازی می شود. هر چند که این فرآیند قدیمی ترین روش است ولی هنوز هم در بسیاری از موارد به جای کشت غوطه ور استفاده می گردد.

۳-۳) روش کشت غوطه ور

کشت غوطه ور شامل تلقیح محیط کشت مایع و به دنبال آن همزدن و هوادهی کنترل شده در فرماتورهای بزرگ است. مدت زمان تخمیر ۳-۵ روز در دمای $25-30^{\circ}\text{C}$ می باشد. بعد از پایان فرآیند تخمیر، اسید سیتریک تولید شده جداسازی می شود. روش اصلاح شده کشت غوطه ور شامل یک فرآیند دو مرحله ای است که ابتدا محیط کشت رشد با اسپورها، تلقیح می شود و پس از ۳ تا ۴ وز میسلیم جدا شده و به محیط کشت تولید اسید سیتریک اضافه می شود. بعد از ۳-۴ روز هوادهی در دمای $25-30^{\circ}\text{C}$ اسید سیتریک تولید شده، استخراج می شود.

۳-۴) تخمیر در بستر جامد

هر چند این روش قابلیت های زیادی دارد، به علت برخی از مشکلات، خیلی کمتر از روش غوطه ور مورد استفاده قرار می گیرد. در این روش ماده خام جامد خیس شده ای که با M.O مناسب تلقیح شده است، روی فرماتورهای سینی دار و یا بیوراکتورهای بستر ثابت قرار داده می شود. در حین تخمیر، هوا دهی، رطوبت و دمای بیوراکتور کنترل می شود. پس از پایان عمل تخمیر با فروشویی، اسید ستریک استخراج می شود.

۳-۴-۱) روش تخمیر کوجی

روش کار تقریباً مشابه روش فرآیند بستر جامد می باشد. در این نوع تخمیر در ابتدا از موادی که پس از گرفتن نشاسته سیب زمینی شیرین باقی می ماند، استفاده می شد. سپس سبوی گندم و سویا جانشین آنها شدند. از نظر عملی شرایط تخمیر اغلب با تولید پروتئازها و آمیلازهای آسپرژیلوس اوریزه ای یکسان می باشد. قبل از سترون کردن، PH سبوس بین 4-5 تنظیم میشود و حداکثر رطوبت نهایی به ۷۰-۸۰٪ می رسد. زمانی که سبوس تا دماهای $36-30^{\circ}\text{C}$ خنک شده، به آن محلول کوجی که سویه خاصی از *A.niger* می باشد، اضافه می کنند. این سویه احتمالاً نظیر سویه های دیگری که در این فرآیند بکار می روند، نسبت به آهن حساسیت دارد. دمای خیساندن طی تخمیر از 28°C تجاوز نمی کند. نشاسته موجود در سبوس توسط آمیلاز *A.niger* هیدرولیز می شود. افزودن ∞ - آمیلاز به سبوس پس از سرد کردن نیز مفید است. سبوس تلقیح شده در ظروف یا سینی هایی به عمق ۳-۵ cm در اتاق مخصوص پخش

می شود. پس از طی ۵-۸ روز کوچی جمع آوری شده به یک صافی منتقل شده و اسید سیتریک با آب استخراج می شود. در این روش به دلیل عدم کنترل فلزات کمیاب و عوامل دیگر، محصول تولیدی در مقایسه با دو روش قبلی کم است، لذا از درجه خلوص کمتری نیز برخوردار می باشد.

۳-۵) تأثیر شرایط محیطی بر تولید اسید سیتریک

۳-۵-۱) شرایط تغذیه ای A.niger

این M.o برای رشد خود و تولید اسید سیتریک به منبع کربن همراه با منابع ازت، فسفر، پتاسیم، منیزیم و گوگرد محتاج است. در ضمن مقدار کمی روی، آهن، منگنز و مس نیز لازم است. و اگر نیتрат را متابولیزه کند، به مولیدن نیز نیازمند است. هنگامی که مقادیر کافی از این مواد و عناصر در دسترس A.niger نباشد، این میکروب در انتهای رشدش وارد فاز اسپورزایی می شود. افروندن مقادیر مناسب و مطلوب عناصر منگنز و آهن مشخص کرده است که برای تولید بهتر و بیشتر اسید سیتریک لازم می باشند. میزان کمی یون آزاد فرو سیانید در محیط پس از حذف فلزات، منجر به افزایش بازده تولید می شود. مقادیر خاصی از فروسیانید منجر به ساخت شکل مناسب هیف ها می شود و مقادیر باقیمانده باعث افزایش راندمان تولید اسید می شوند.

۳-۵-۲) تأثیر فلزات trace در تولید اسید سیتریک

نقش آهن در بین عناصر مورد نیاز رشد میکروب، اهمیت بیشتری دارد، زیرا آهن برای آنزیم آکونیتاز نقش کوفاکتوری را ایفا می کند و از طرفی کمبود منگنز هیفهای خشن منشعب جوانه دار و کوتاه را ایجاد می کند و افزایش آن باعث تحریک تولید اسپور شده که باعث کاهش قابل ملاحظه ای در بازده اسید سیتریک می شود. یونهای دو ظرفیتی Ca ، Co ، zn و آهن، مس، Mg و Ni و یون سه ظرفیتی Al مورفولوژی پلت ها را تغییر نمی دهند. ولی یونهای Al ، آهن و روی در غلظتی نسبتاً بالا راندمان اسید را کاهش می دهند.

۳-۵-۳) تأثیر نیتروژن و فسفر در تولید اسید سیتریک

تجمع اسید سیتریک به محدودیت نیتروژن نیاز دارد. وقتی هیفها به محیط کم ازت یا فاقد ازت اضافه شوند، $A.niger$ به اندازه تولید اسید سیتریک، اسید اگزالیک تولید می کند. محدودیت فسفات در تولید اسید سیتریک به روش تخمیری غوطه ور توسط $A.niger$ نقش بسیار مهمی را ایفا می کند.

طی تحقیقی در سال ۱۹۸۹ در اتریش و روی محیط مصنوعی، تأثیر سولفات آمونیوم روی تولید اسید سیتریک بررسی شد و از بین مقادیر ۰ تا ۶ درصد وزنی در حجم محلول سولفات آمونیوم، بهترین میزان تولید اسید سیتریک ۳۵ گرم در لیتر محلول در غلظت ۵٪ آن بدست آمد.

۳-۵-۴) تأثیر متانول در تولید اسید سیتریک

الکلهای سبک نظیر متانول به منظور حذف اثر عناصر نادر می توانند بکار برده شوند. اثر متانول روی افزایش تولید اسید سیتریک یک پدیده عمومی برای سویه های A.niger است. چنین به نظر می رسد، در محیطهایی که حاوی میزان زیادی فلزات نادر هستند، متانول دارای تأثیر بیشتری است و تحمل M.o به این فلزات را بیشتر می کند.

فصل چهارم

تخصیص در بستر جامد

(SSF)

۴-۱) تعریف کشت حالت جامد

ارائه تعریف واحد و دقیقی از کشت حالت جام مشکل است. مویانگ و همکاران در سال ۱۹۸۳ این واژه را چنین توصیف کردند: به تمامی فرآیندهایی که در آنها M.O ها از مواد نامحلول در آب، در شرایط بدون حضور آب آزاد استفاده می کنند، کشت حالت جامد گفته میشود. با افزایش میزان مولکولهای آزاد آب، کشت از حالت جامد به حالت دوغابی و سپس به حالت سوسپانسیونی از ذرات جامد تبدیل می شود. در کشت حالت جامد، رطوبت به طور جذب شده، کمپلکس در شبکه جامد یا در حالت پیوند با مواد جامد است. در این نوع کشت نمی توان مرز مشخصی برای میزان آب آزاد موجود. معین کرد. حد نهایی مقدار رطوبت، تابعی از قدرت جذب سوبسترا است.

۴-۲) تفاوت‌های اساسی بین کشت حالت جامد و کشت غوطه‌ور

جدول (۴-۱): برخی تفاوت‌های اساسی بین دو روش کشت حالت جامد و غوطه‌ور

مایع

کشت حالت جامد	کشت غوطه‌ور مایع
محیط کشت سیالیت ندارد	معمولاً محیط کشت سیالیت آزاد دارد
عمق محیط کشت معمولاً کم است	عمق محیط کشت همواره زیاد است.
مواد خام جامد غیر محلول در آب، تأمین کننده کربن، نیتروژن، مواد معدنی و انرژی است.	از چندین منبع محلول در آب به عنوان مواد ضروری و انرژی استفاده می‌شود. در مواردی نیز ممکن است ماده‌ای به عنوان منبع غذایی در آب حل نشود.
مواد خام جامد با جذب آب مرطوب شده و منظور از ماده غذایی همین ماده جامد مرطوب است.	مواد غذایی در آب حل می‌شوند و مصرف آنها به طور حل شده انجام می‌شود.
تشکیل شیب غلظت ماده غذایی با پیشرفت فرآیند کشت، امری معمول است.	مواد غذایی بطور یکنواخت توزیع شده و در تمام طول دوره کشت، این یکنواختی حفظ می‌شود.
سیستم کشت شامل سه فاز جامد، مایع و گاز است.	غالباً دو فاز مایع و گاز وجود دارد و گاهی فاز جامد نیز وجود دارد، اما غلظت آن بسیار پایین است و نهایتاً محیطی سوسپانسیونی ایجاد می‌کند.
فاز مایع در این سیستم به هم پیوسته نیست.	پیوستگی در فاز مایع یکی از موارد مشترک این سیستم‌هاست
آب موجود، فقط برای ایجاد رشد بهینه و متابولیسم ارگانیسم کافی است و به همین دلیل نسبت کمتری از کل حجم محیط کشت را اشغال می‌کند.	آب در دسترس به وفور و بیش از مقدار مورد نیاز M.O در محیط وجود دارد و به همین دلیل حجم زیادی از محیط کشت را شامل می‌شود.
معمولاً پس از مرحله پخت یا سترون سازی به سترون نگهداشتن سیستم نیاز نیست.	سیستم معمولاً در تمام مراحل در شرایط سترون نگهداری می‌شود.
معمولاً مقدار مایه تلقیح زیاد است.	مقدار مایه تلقیح به جز در برخی فرآیندهای خاص، بسیار کم است.

ادامه جدول (۴-۱)

کشت حالت جامد	کشت غوطه‌ور مایع
اکسیژن مورد نیاز برای رشد و متابولیسم، بیشتر از گاز تأمین می‌شود و فقط بخش ناچیزی از اکسیژن از طریق آب مورد استفاده برای رطوبت زنی تأمین می‌شود.	تأمین اکسیژن منحصراً از اکسیژن حل شده در محیط کشت مایع صورت می‌گیرد.
عمل هوادهی نه تنها اکسیژن مورد نیاز را فراهم می‌کند. بلکه فرآورده‌های گازی و حرارت ایجاد شده در اثر متابولیسم را نیز خارج می‌سازد.	هوادهی به منظور تأمین اکسیژن و خارج‌سازی گازهای حاصل انجام می‌شود، لیکن خارج‌سازی حرارت بوسیله آب سرد عبوری از جداره یا لوله‌های مارپیچی صورت می‌گیرد.
سیستم بر حسب شرایط با اختلاط یا بدون اختلاط همراه است.	معمولاً اختلاط مداوم برای حفظ یکنواختی سیستم به جز در حالت کشت بی‌هوازی ضروری است.
رشد قارچ با نفوذ هیف‌ها به عمق مواد خام جامد همراه است.	سلولهای میسلیوم قارچی به شکل میسلیوم تک یا گویچه‌های میسلیومی رشد کرده و به طور یکنواخت در محیط کشت توزیع می‌شوند.
سلولهای باکتری و مخمر با چسبیدن به ذرات مواد خام جامد رشد می‌کنند.	باکتری‌ها و مخمرها به طور یکنواخت در داخل مایع مخلوط شده و توزیع می‌شوند.
محیط کشت در زمان برداشت به شکل جامد مرطوب و حاوی محصولات با غلظت بالاست.	محیط کشت در زمان برداشت به شکل مایع و حاوی محصولات با غلظت کم است.

۳-۴) مقایسه کشت حالت جامد با سایر فرآیندهای تخمیری

جدول (۴-۲): مقایسه کشت حالت جامد با سایر فرآیندهای تخمیری

فرآیند تخمیر	همزدن	ظروف بکار رفته در کشت	حالت ماده خام	حالت آب	نحوه رشد میکروب
غوطه‌ور نوع اول	بله	ارلن‌ها در حال بهم خوردن ظروف تخمیر با نسبت ارتفاع به قطر 2-3	محلول در آب	آب آزاد	تقریباً در سراسر محیط کشت
غوطه‌ور نوع دوم	بله	ارلن‌ها در حال بهم خوردن ظروف تخمیر با نسبت ارتفاع به قطر 2-3	ماده خام جامد نامحلول و معلق در آب	آب آزاد	تقریباً در سراسر محیط کشت
غوطه‌ور نوع سوم	بله	ارلن‌ها در حال بهم خوردن ظروف تخمیر با نسبت ارتفاع به قطر 2-3	ماده خام مایع نامحلول و معلق در آب	آب آزاد	تقریباً در سراسر محیط کشت
سطحی مایع	خیر	ارلن‌ها - سینی‌ها	محلول در آب	آب آزاد	روی سطح کشت مایع
سطحی روی ماده جامد غیر مغذی یا فیلتر چکاننده	خیر	بستر آکنده، سنگ و غیره	محلول در آب	آب آزاد	به صورت لایه نازک روی سطح جامد
ماده خام جامد ساکن	خیر	ارلن‌ها - سینی‌ها	جامد مرطوب نامحلول	بدون آب آزاد	روی سطح مواد خام جامد و نفوذ به داخل جامدات

فرآیند تخمیر	همزدن	ظروف بکار رفته در کشت	حالت ماده خام	حالت آب	نحوه رشد میکروب
ماده خام جامد با همزدن متناوب	به صورت متناوب	ارلن ها - سینی ها و تونلها	جامد مرطوب نامحلول	بدون آب آزاد	روی سطح مواد خام جامد و نفوذ به داخل جامدات
ماده خام جامد نیم مداوم	متناوباً در زمان خوراک دهی	ارلن ها در حال بهم خوردن استوانه های دوار	جامد مرطوب نامحلول	بدون آب آزاد	روی سطح مواد خام جامد و نفوذ به داخل جامدات
ماده خام جامد همزده	بله	ارلن ها در حال بهم خوردن استوانه های دوار	جامد مرطوب نامحلول	بدون آب آزاد	روی سطح مواد خام جامد و نفوذ به داخل جامدات
ماده خام جامد خشتی (از نظر تغذیه ای) و اشباع شده با مواد مغذی	بله / خیر	ارلن ها در حال بهم خوردن و ساکن، سینی ها، استوانه های دوار	اشباع شده روی مواد خام جامد خشتی	بدون آب آزاد	روی سطح مواد خام جامد و نفوذ به داخل جامدات
سطح جامد با ماده مغذی حبس شده در ماتریکس آن	خیر	ارلن ها - سینی ها	حبس شده در ماتریکس آگار، ژلاتین و غیره	آب آزاد غیر قابل دید	روی سطح مواد خام جامد و نفوذ به داخل جامدات

۴-۴) مزایای سیستم کشت حالت جامد

- ۱- در فرآیند SSF سوبسترا به آماده سازی کمتری نیاز دارد و آماده سازی سوبسترا فقط به منظور افزایش دسترسی به مواد غذایی توسط M.O صورت می گیرد.
- ۲- محدودیت رطوبت در دسترس در فرآیند SSF در مقابله با آلودگیهای ناخواسته خصوصاً باکتریها و مخمرها عامل مؤثری است.
- ۳- به علت غلیظ بودن محیط کشت، راکتور کوچکتری در مقایسه با فرآیند غوطه ور مورد نیاز است و بازدهی حجمی در SSF بیشتر است اگر چه بازدهی و سرعت رشد پایین تر است.
- ۴- به علت فضای خالی بین ذره ای، هوادهی اجباری کشت های حالت جامد راحت تر صورت می گیرد.
- ۵- برای فرایند SSF (که با قارچ سر و کار دارد) اغلب از تلقیح اسپوری استفاده می شود. به همین دلیل نیاز به مخازن بزرگ برای تولید بذر برطرف می شود.
- ۶- به علت غلیظ بودن محیط کشت، فرآیندهای جداسازی و مقدار ضایعات و پساب تولید شده، اغلب بسیار کم است.

۴-۵) معایب سیستم کشت حالت جامد

- ۱- فرآیند SSF محدود به M.O هایی است که توانایی رشد در محیطهای با رطوبت پایین را دارند به همین دلیل طیف فرایندها و تنوع محصولات بسیار محدود است.

۲- انتقال حرارت متابولیکی تولید شده در حین رشد، بخصوص در مقیاس بزرگ مشکل ساز است.

۳- به دلیل توزیع غیر یکنواخت ماده خام جامد، سنجش و ارزیابی مداوم عوامل فرایند، مشکل و غیر دقیق است.

۴- انتقال جرم در فاز جامد، با نفوذ محدود می شود. نفوذ بین ذره ای ممکن است مرحله محدود کننده رشد M.O باشد.

۵- بسیاری از جنبه های مهم علمی و فنی در فرآیند SSF هنوز ناشناخته است.

۶- به دلیل پایین تر بودن شدت رشد ویژه M.O ها در کشت جامد، مدت زمان فرآیند SSF بیشتر از حالت غوطه ور است.

۷- عصاره حاوی محصولاتی که توسط Leaching جامدات تخمیر شده بدست آمده، اغلب لزجهت بالایی دارد و باعث ایجاد محدودیت در تغلیظ و خشک کردن می شود.

۴-۶) مراحل اصلی فرآیند کشت حالت جامد

معمولاً تمامی فرآیندهای کشت حالت جامد مراحل یکسانی دارند که آنها را به ترتیب زیر بیان می کنیم:

۱- مرحله آماده سازی مواد خام جامد

۲- مرحله پخت (که سوبسترا را سترون یا حداقل پاستوریزه کند)

۳- تهیه مایه تلقیح مناسب با روشهای سنتی یا روشهای کشت خالص

۴- انجام تلقیح روی جامد مرطوب (سوبسترا)

۵- گرماگذاری در شرایط کشت مناسب

۶- برقراری شرایط بهینه و نگهداری آن در حد ممکن

۷- برداشت محصول به صورت ماده جامد مرطوب

۸- خشک کردن ماده جامد مرطوب یا استخراج محصول از مواد جامد

۴-۷) پارامترهای مؤثر بر فرایند SSF در تولید اسید سیتریک

۱- زمان تخمیر: مدت زمانی را که پس از عملیات تلقیح، طول می کشد تا کیفیت مورد نظر در تخمیر به حداکثر برسد، زمان تخمیر گویند. اگر هدف تولید بیومس باشد، رسیدن تخمیر به مرحله فاز سکون کافی است. برای تولید متابولیت یا کاهش آلودگی تمام نمودار رشد مد نظر قرار می گیرد. با توجه به بیوشیمی تخمیر اسید سیتریک، تجمع اسید زمانی آغاز می شود که رشد متوقف شود، یعنی بیشترین تولید مربوط به سلولهایی است که در فاز رشد نیستند. میزان تولید اسید سیتریک نسبت به زمان و دارای یک حداکثر است، با عبور از نقطه حداکثر، اسید سیتریک تولید شده در محیط کشت کم می شود.

۲- میزان تلقیح: این پارامتر بر اساس تعداد سلول یا اسپور یا وزن میسلیم بر واحد حجم و یا همچنین نسبتی از درصد وزنی کشت تخمیر بیان می شود. کاهش میزان تلقیح از یک حد، سبب طولانی شدن فاز سازگاری و در نتیجه کاهش بهره وری است. بالا رفتن میزان تلقیح از یک حد مشخصی در فرآیندهای تولید متابولیت مستقل از رشد، به دلیل مصرف کربن توسط تعداد زیاد M.O سبب افت و کاهش تولید محصول می شود.

۳- سن اسپور: منظور از این پارامتر، فاصله بین تلقیح میکروب به اسلنت تا زمان برداشت آن می باشد. افزایش سن اسپور در بعضی از موارد سبب کاهش رشد می شود.

۴- PH: یکی از فاکتورهای بحرانی در کشت حالت جامد است و معمولاً کنترل آن در طی تخمیر صورت نمی پذیرد. ظرفیت بافری جذب بعضی از سوبستراهای استفاده شده در کشت حالت جامد، به رفع نیاز کنترل PH کمک می کند. PH اولیه جامدات در طی عمل رطوبت زنی با آب در سطح مطلوب بین 4.5-5 تنظیم می شود. چنانچه M.O به شکل یک فیلم روی جامد گسترش یابد، تغییرات موضعی در PH رخ داده و می توان PH آنرا بررسی نمود و در نتیجه کشت در فرماتورها هم نخورده با کاهش بهره وری رو به رو است.

۵- دما: میزان عمده حرارت متابولیکی در طی تخمیر حالت جامد، ایجاد شده و این مورد مستقیماً با فعالیت متابولیکی M.O و عمق سوبسترا ارتباط دارد. حرارت تولید شده باید سریعاً از بین برود، زیرا حرارت، جوانه زنی اسپور، رشد و تولید محصول و اسپورزایی را تحت تأثیر قرار می دهد. روشهای ثابت نگهداشتن دمای فرماتور بین $25 - 32^{\circ}\text{C}$: وارد کردن مقدار زیاد هوا به درون فرماتور، نگهداری فرماتور در اتاقهایی با دمای کنترل شده، چرخاندن آب در جداره اطراف فرماتور و قرار دادن فرماتور در یک حمام آب با دمای کنترل شده.

۶- رطوبت : سطح رطوبت سوبسترا توسط طبیعت سوبسترا، نوع محصول نهایی و نیاز M.O معین می شود. میزان بالای رطوبت باعث کاهش تخلخل ، نفوذ کمتر اکسیژن، افزایش احتمال آلودگی باکتریایی، تشدید تشکیل میسلیمهای هوایی، کاهش حجم گاز و تغییر در سرعت تخریب لیگنین می شود.

فصل پنجم

گاه گنشم

۵-۱) تعریف کاه و ویژگی های ساختاری آن

کاه عبارت است از مجموع ساقه و برگ گیاهان تیره غلات و حبوبات که پس از رسیدن و جدا کردن دانه این گیاهان بدست می آید. به عبارت دیگر آنچه پس از کوبیدن و جدا کردن دانه گیاهان رسیده خانواده غلات و حبوبات باقی می ماند، کاه نامیده می شود.

دیواره سلولی کاه دارای ساختمان پیچیده ای است که از چندین لایه (میانی، اولیه و ثانویه) تشکیل شده است. جزئیات ساختمانی دیواره سلول کاه در شکل (۵-۱) نشان داده شده است. دیواره ثانویه خود از چند بخش S_1, S_2, S_3 ساخته شده است.

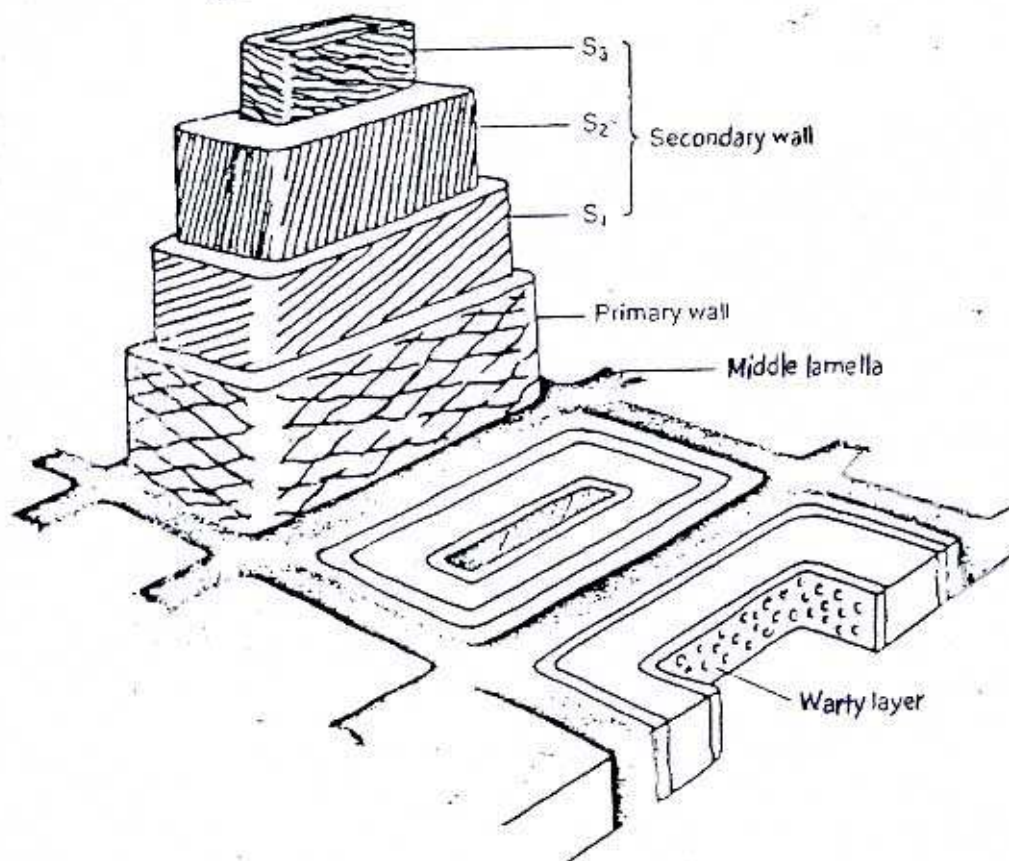
لایه های دیواره سلولی دارای ترکیبات شیمیایی مختلف هستند. ترکیبات شیمیایی عمده موجود در دیواره سلولی کاه، پلی ساکاریدهای سلولز، همی سلولز و پکتین به همراه لیگنین است.

سلولز = 40-50% از کل توده سلولی

همی سلولز = 25-40% کل توده سلولی

لیگنین = 18-23% کل توده سلول

کاه دارای صفاتی از قبیل دیواره سلولی زیاد (650-880gr در kg ماده خشک)، لیگنین زیاد (70-110 gr در kg ماده خشک). نیتروژن بسیار کم (4-9 gr در kg ماده خشک) می باشد.



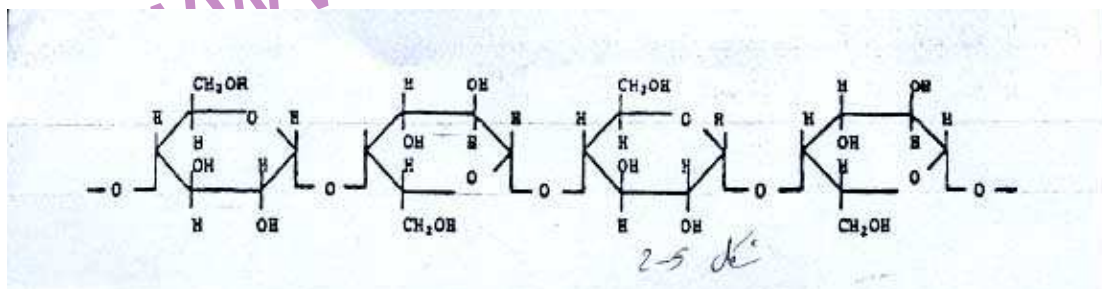
شکل (۵-۱): جزئیات ساختمانی دیواره سلولی کاه.

۵-۱-۱) کربوهیدراتهای ساختمانی

۵-۱-۱-۵) سلولز

سلولز ترکیب عمده ساختمانی دیواره سلولی کاه می باشد. سلولز به شکل میکروفیبریل یافت می شود. طول این میکروفیبریلها مشخص نیست. عمل آنها در استحکام دیواره سلولی حائز اهمیت است. سلولز یک پلیمر خطی است که از پیوستگی واحدهای D-آنهیدرا و ز گلوکو پیرانوز با پیوند $(\beta 1,4)$ بوجود می آید، زنجیره ها توسط پیوندهای هیدروژنی که بین اکسیژن پیوند گلوکوزیدیک زنجیره گلوکانی و گروه هیدروکسیل در موقعیت 6β های گلیکوزیل در زنجیره دیگر برقرار است، بهم متصل هستند.

میکروفیبریل های سلولز با یکدیگر و همچنین با پلیمرهای همی سلولز نیز توسط پیوند هیدروژنی متصلند.



شکل (۲-۵): ساختمان مولکول سلولز

۵-۱-۱-۲) همی سلولز

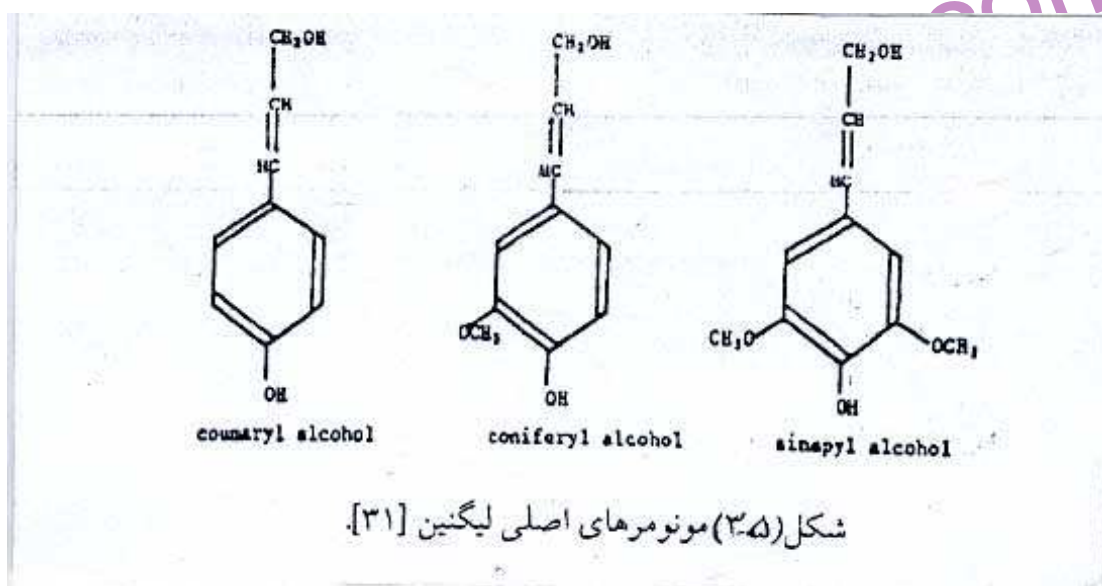
همی سلولز دارای تعداد واحد قندی محدود (درجه پلیمریزاسیون آن تقریباً ۲۰۰ است) همی سلولز هتروپلیمری متشکل از گلوکز، دیگر هگزوزها، پنتوزها و مشتقات اسید یورونیک آنهاست. ترکیب کربوهیدراتی همی سلولز در مواد لیگنو سلولزی مختلف، با هم فرق دارد. مونوساکاریدهای گلوکز، گزیلوز، گالاکتوز، مانوز، آرابینوز و همچنین اسید یورونیکهای گلوکز و گالاکتوز از طریق پیوندهای گلوکوزیدی ۱ و ۳، ۱ و ۶، او ۴ با هم پیوستگی دارند.

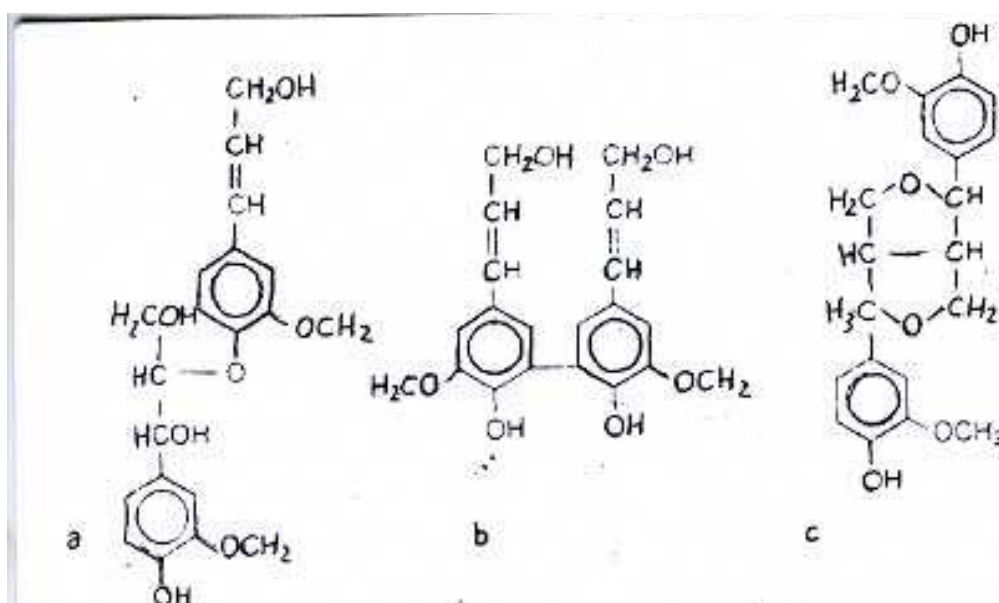
۵-۱-۱-۳) لیگنین

سومین ترکیب عمده دیواره سلولی کاه گندم، لیگنین است. با وجود اینکه لیگنین فراوانترین ماده آلی غیر کربوهیدراته در طبیعت می باشد، تنها پلیمر گیاهی است که

اجزای آن دقیقاً شناخته نشده اند. لیگنین در گیاهان باعث مقاومت مکانیکی گیاه و مقاومت آن در مقابل تجزیه می شود.

لیگنین یک کمپلکس پلیمر سه وجهی از واحدهای فنیل پروپان است. با وجود پیچیده بودن مولکولهای لیگنین و راههای مختلف سنتز آن، در ساختمان همه لیگنین ها سه نوع واحد فنیل پروپان، p- کوماریل الکل، کونیفریل الکل، سنا فیل الکل عمومیت دارد. عمده ترین تفاوت ساختمانی شیمیایی این مولکولها حضور یا عدم حضور گروه متوکسیل (OCH_3) در موقعیت 3 و 5 حلقه آروماتیک میباشد. نخستین مرحله در شکل گیری این منومرها که از طریق مسیر اسید shikimic صورت می گیرد، تولید آنها از اسید آمینه های فنیل آلانین و تیروزین می باشد.



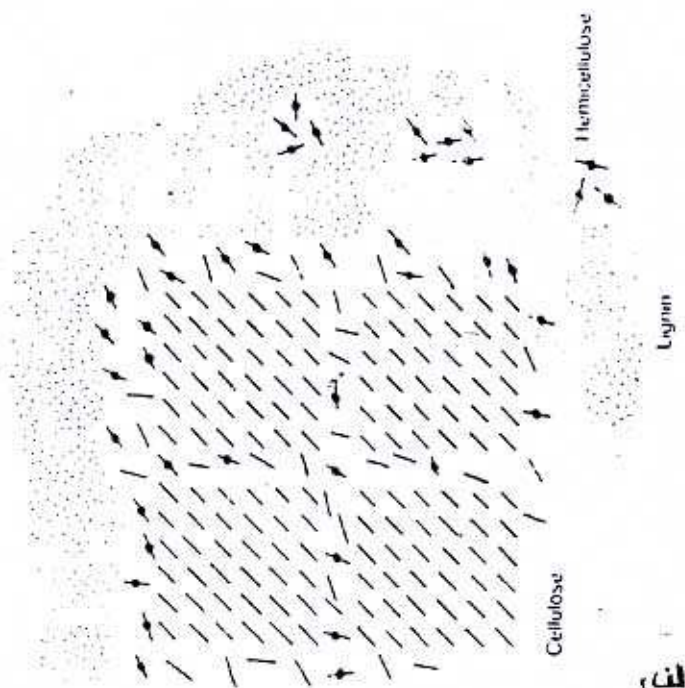
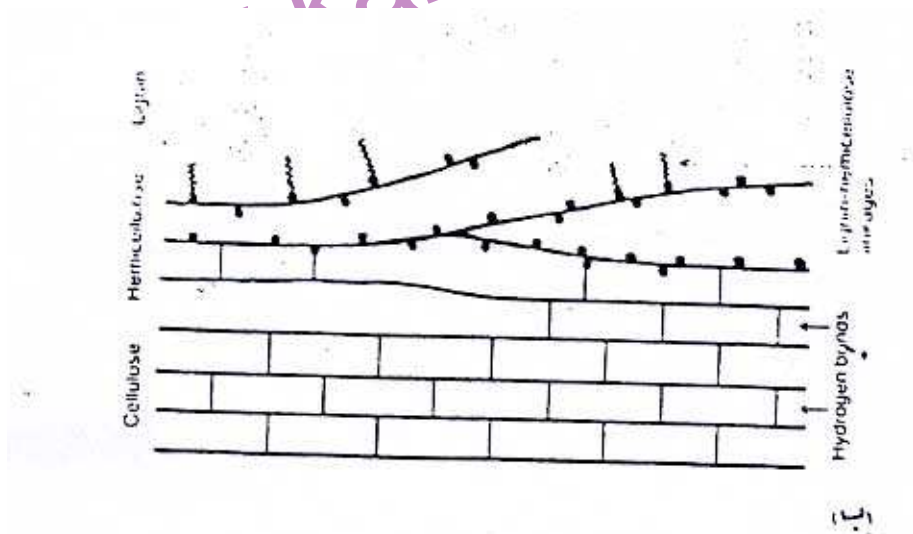


شکل (۵-۴): پیوندهای عمده بین دی مرهای لیگنین

a) گواراسیل گلیسرول - بنا کونیفریل اتر (b) دی هیدرو بیس-کونیفریل الکل
c) دی-ال-پیسورزینول (برگرفته از منبع فنجال و واگز (۱۹۸۹))

مدلهای زیادی جهت تشریح و ترسیم ارتباط بین لیگنین و ترکیبات دیواره سلولی ارائه شده است. آخرین مدل طبق نظریه فنجال و واگز (1989) بیان شده است. آنها اظهار داشتند که بین سلولز-همی سلولز و همی سلولز-لیگنین یک ارتباط بسته وجود دارد و با ترکیب این دو مدل ارتباط در دو طرف این ترکیبات را مشخص نمودند. از نکات برجسته این مدل، ارتباط جداگانه همی سلولز در داخل با ترکیب لیگنین می باشد.

شکل (۵-۵) این موضوع را تشریح می کند.



شکل (۵-۵) : نمودی از مدل پیشنهادی فنجال و واگنر (۱۹۸۸). ارتباط بین سلولز، همی سلولز و لیگنین در دیواره سلولی کاه [۳۴].

۵-۲) ترکیب شیمیایی کاه گندم

ترکیب شیمیایی کاه گندم بر حسب درصد ماده خشک:

پروتئین خام = 3.2	چربی خام = 1.5	خاکستر = 7.3
ماده خشک = 90.1	الیاف خام = 37.4	کلسیم = 0.16
فسفر = 0.04	سلولز = 30-50	آب = 12-15%
نشاسته و قند = 20-30		

۵-۳) پیش تیمار (Pretreatment) کاه گندم

مواد لیگنو سلولزی در برابر حمله آنزیمی M.O از خود مقاومت نشان می دهند و آن هم به عوامل ذیل بستگی دارد:

۱- ساختمان کریستالی سلولز: در ترکیبات لیگنو سلولزی، سلولز به دو صورت آمورف و کریستالی وجود دارد. قسمت آمورف یابی شکل نسبت به قسمت کریستالی توسط حمله آنزیمی راحت تر هضم می شود. لذا با افزایش نسبت قسمت بی شکل، سرعت هیدرولیز بیشتر می شود.

۲- محدود بودن مکانهای قابل دسترسی برای حمله آنزیمی: که از این موضوع ناشی می شود. که اندازه میانگین رشته های موئینه در ترکیبات لیگنو سلولزی آنقدر کوچک است که اجازه وارد شدن به مولکولهای آنزیمی بزرگ به درون ساختمان را نمی دهد لذا حمله میکروبی (آنزیمی) به سطح خارجی محدود می شود.

۳- لیگنین که سلولز را احاطه کرده است و یک منبع فیزیکی است، مهمترین عامل هضم آنزیمی سلولز، لیگنین می باشد. حضور یک مانع فیزیکی حمله آنزیمی را مشکل می کند با انجام یک پیش تیمار مناسب می توان در دسترس بودن سلولز و در نتیجه سرعت هیدرولیز آنرا افزایش داد.

۵-۳-۱) روشهای فیزیکی پیش تیمار کاه گندم

بعضی از انواع پیش تیمارهای فیزیکی عبارتند از: آسیاب کردن، خرد کردن، خیساندن و استفاده از بخار تحت فشار که در میان تیمارهای فیزیکی بیشترین استفاده را دارند. خرد کردن کامل کاه، مقادیری از لیگنین، مومها و سیلیس محتوی آنرا می شکند. یکی از اثرات مهم خیس کردن کاه، خروج مقادیر متنابهی از اگزالات موجود در آن است اگزالات از ۱/۱٪ به ۰/۲٪ می رسد.

۵-۳-۱) پیش تیمار کاه گندم با بخار

گرچه عمل آوری با بخار در فرآیندهای فیزیکی گروه بندی شده است، اما در حقیقت استفاده از بخار یک فرآیند ترموشیمیایی هیدرولیز اسیدی طبیعی می باشد. بخار آب تحت فشار در افزایش میزان کربوهیدرات قابل استفاده موجود در علوفه فیبری و محصولات فرعی آن مؤثر است. در درجه حرارت بالا و شرایط اسیدی ایجاد شده، اتصالات گروههای استیل و فرمیل همی سلولز و پکتین شکسته می شوند، علاوه بر

این آزاد شدن اسیدهای آلی داخلی نیز با عمل کاتالیزوری خود، هیدرولیز فیبر را تشویق نموده و قابلیت هضم ماده غذایی را افزایش می دهد.

۵-۳-۳) روشهای شیمیایی پیش تیمار کاه گندم

پیش تیمارهای شیمیایی به طور گسترده ای برای حذف لیگنین و اصلاح ساختمان ترکیبات لیگنوسلولزی استفاده می شود. ترکیبات قلیایی (بویره NaOH) با حل همی سلولز، لیگنین، سیلیکات و هیدرولیز استرهای اسید یورونیک و اسید استیک و متورم ساختن سلولز باعث متلاشی شدن دیواره سلولی می گردد.

مواد شیمیایی که به طور عمده در پیش تیمار شیمیایی استفاده می شوند عبارتند از: هیدروکسید سدیم، هیدروکسید سدیم- اسید استیک، کلروفرم، اسید هیدروکلریک، سولفیت سدیم، اسید پراستیک، اسید هیدروکلریک- کلروروزی، اسید استیک- پراکسید هیدروژن، آمونیوم، آمونیاک، دی اکسید گوگرد، گاز کلر، کلرورسدیم، کربنات سدیم، سولفات سدیم، اوره، هیدروکسید کلسیم و

جدول (۵-۱): ترکیب شیمیایی کاه گندم بعد از پیش تیمار

نوع پیش تیمار	درصد کاهش سلولز کاه گندم	درصد کاهش لیگنین کاه گندم
تیمار با بخار	6	12.13
$\text{Ca}(\text{OH})_2$ دو درصد	2.8	12.14
NaOH یک مولار	3.75	50
NaOH پنج مولار	4.25	60.12
HCl یک نرمال	4.67	13.75
HCl پنج نرمال	7.25	12.45
H_2SO_4 ۷۰ درصد	18.15	30

جدول (۵-۲)

کاه غنی نشده	پیش تیمار با آمونیاک	پیش تیمار با اوره	پیش تیمار با کربنات آمونیوم	بیکربنات آمونیوم	پیش تیمار با سولفات آمونیوم
درصد لیگنین	20.2	21	24	21.3	24
درصد الیاف	41.6	40.8	41.6	32	39.4

۵-۳-۱) پیش تیمار کاه با اوره

تأثیر اوره به عنوان یک عامل شیمیایی بر ترکیب دیواره سلولی بسیار متغیر است. نتایج آن به شدت وابسته به محیط و شرایط عمل آوری است. در غنی سازی کاه با اوره، گاز آمونیاک بوجود آمده، باعث نرم شدن دیواره سلولی و گسیختگی برخی پیوندهای بین لیگنین و پلی ساکاریدها می شود. در ایجاد محیط مناسب برای غنی سازی باید موارد زیر مورد توجه قرار گیرند:

الف- حضور آنزیم اوره آز.

ب- غنی سازی با اوره احتیاج به مقدار کافی رطوبت دارد (اغلب 25-60%)

ج- اطلاعات در مورد تأثیر درجه حرارت محیط بر تأثیر اوره بسیار اندک است (درجه حرارت باید بین 15°C - 25°C باشد)

د- مدت زمان غنی سازی بستگی به درجه حرارت، رطوبت و استفاده یا عدم استفاده از آنزیم اوره آز دارد.

۵-۳-۴) پیش تیمار بیولوژیکی کاه گندم

در این نوع پیش تیمار عمدتاً از قارچها (بویژه نئوروسپوراسیتو فیلا) به منظور غنی سازی پروتئین کاه گندم استفاده می شود، و هدف معمولاً تهیه منبع غذایی مناسب برای تغذیه دام و طیور می باشد.

فصل ششم جداسازی اسید سیتریک

۶-۱) استخراج اسید سیتریک

پس از تولید، اسید سیتریک استخراج شده و خالص سازی آن طی یکسری فرآیندهای جداسازی انجام می گیرد. با توجه به خصوصیات فیزیکی اسید سیتریک و نحوه تولید این اسید، جداسازی اسید سیتریک از چندین مرحله به شرح زیر تشکیل شده است:

۱- فروشویی محصول خروجی

۲- خالص سازی اسید سیتریک

۳- کریستالیزاسیون اسید سیتریک

۶-۱-۱) فروشویی (Leaching)

فروشویی یکی از قسمتهای عملیات واحد است که برای استخراج یک یا بیشتر مواد تشکیل دهنده مخلوط جامد بوسیله تماس با یک حلال به روش shanks یا تماس چند مرحله ای متقاطع معمولاً استفاده می شود، تا بیشترین غلظت را برای یک محصول در خروجی فراهم کند. در این روش عملیات فروشویی، محصول نهایی با خوراک تازه و حلال تازه با ماده جامد خروجی تماس داده می شوند.

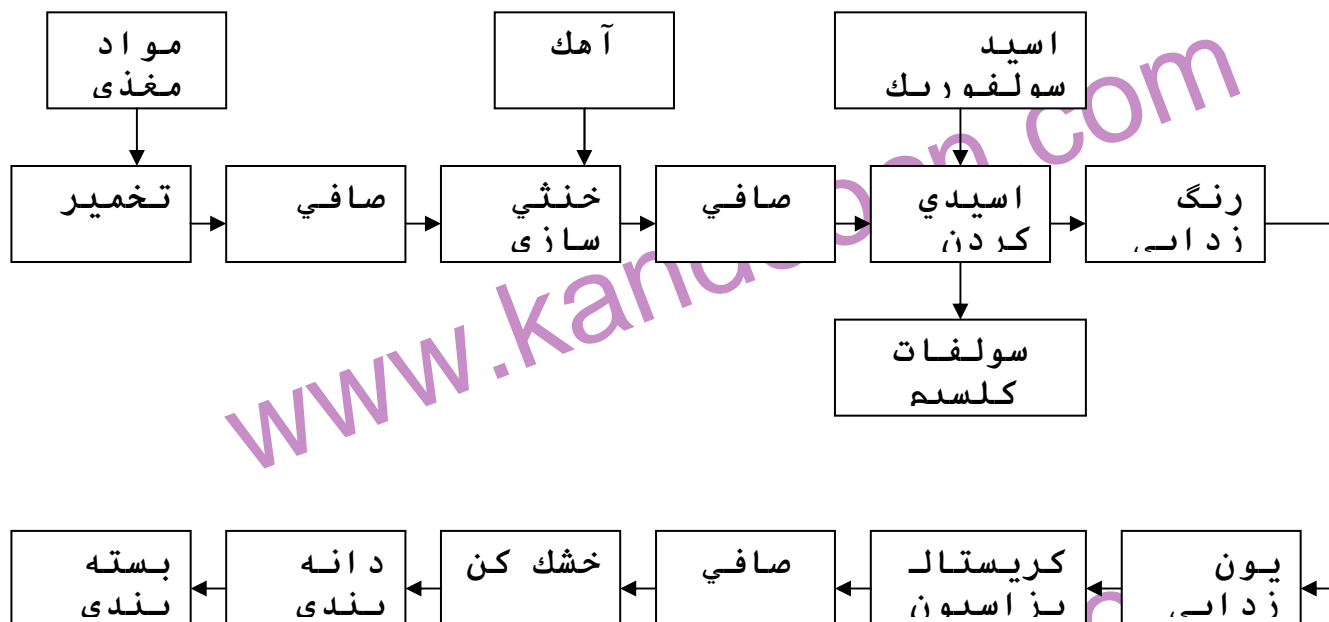
حلالهایی که برای عملیات استخراج اسید سیتریک استفاده می شوند، آب، استون و اتر می باشند که استن برای تعداد مراحل عملیاتی مساوی، دارای راندمان بالاتری است، ولی آب به علت ارزان بودن دارای کاربرد بیشتری است.

۶-۱-۲) روش رسوبگیری

روش متداول جداسازی اسید سیتریک، روش رسوبگیری است که پس از برداشت هیفها صورت می گیرد. اساس این روش بر پایه رسوب اسید سیتریک به صورت نمک آن و جدا نمودن رسوب حاصله از محیط تخمیر با استفاده از یک اسید قوی تر است که در نهایت به یک مرحله خالص سازی نیز نیاز است.

در مرحله اول هیفها توسط یک فیلتر گردش تحت خلاء از محیط تخمیر جدا می شوند. محلول حاصله که حاوی اسید سیتریک می باشد، برای استخراج اسید به داخل مخازن رسوبگیری فرستاده می شود. در این مخازن با افزودن آب آهک، توسط همزن، اختلاط کامل انجام می شود. در این مرحله که در دمای خاصی انجام می شود، واکنش اسید سیتریک با آهک موجب رسوب سیترات کلسیم می شود و این رسوب بوسیله یک فیلتر گردش تحت خلاء، پیوسته از محلول جدا شده و برای احیای اسید به مخازن بعدی فرستاده می شود. در مرحله بعد، رسوب حاصله با اسید سولفوریک غلیظ تماس داده می شود و واکنش فوق باعث احیای اسید سیتریک و رسوب سولفات کلسیم یا گچ می شود. محلول بدست آمده در این قسمت، توسط یک فیلتر از رسوب همراه جدا شده و برای عملیات بعدی به قسمت خالص سازی فرستاده می شود. البته برای حذف کامل رسوب، محلول توسط یک تبخیر کننده تا ۶۴ درصد وزنی تغلیظ می شود. و در اثر این عمل، سولفات کلسیم باقیمانده به حالت فوق اشباع رسیده و ته نشین می شود. ضمناً جهت کاهش مراحل خالص سازی می توان در این مرحله از تعویض کننده های یونی نیز استفاده کرد و میزان جریان برگشتی را کاهش داد.

شکل (۶-۱) فرآیند بازیافت اسید ستیریک به روشن رسوبگیری



۶-۱-۳) روش استفاده از استخراج با حلال

این استخراج خود شامل چندین روش مختلف است، از جمله:

الف- استخراج با غشاء مایی (Liquid membrain Permeation):

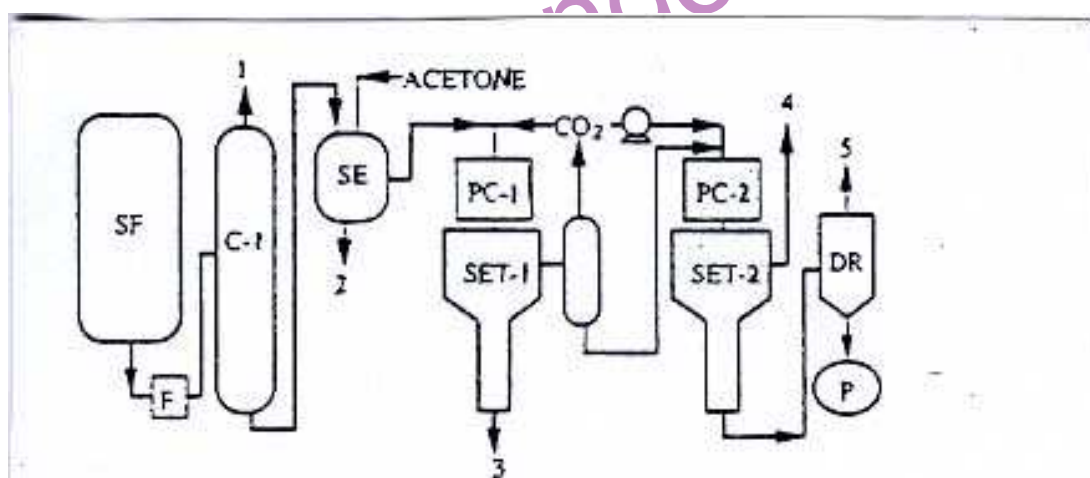
فازمائی ورودی (فاز I) که در یک فاز آلی (فاز II) بوسیله یک همزن با سرعت بالا به صورت امولسیون معلق می شود. فاز II یک فعال سطحی است که قطرات میکرونی فاز I در این فاز پایدار شده است. سپس امولسیون به درون محصول تخمیر جاری می شود. فاز II (امولسیون با یک همزن با سرعت پایین) به صورت امولسیونی دیگر در محصول تخمیر به ذراتی صد میکرونی تبدیل می شود. در این مرحله یک چند امولسیونه از قطرات ریز فاز I در قطرات درشت فاز II و این قطرات درشت به صورت امولسیون در فاز III تشکیل می شود.

ب- استخراج سه فازي:

محصولی که دارای بیشترین انتخابگری در رابطه با استخراج فعال باشد، از محیط تخمیر استخراج می شود. مکانیزم استخراج، یک نوع خشی شدن اسید- باز است. اسید با امین یک کمپلکس تشکیل می دهد و به فاز آلی منتقل می شود. این خوشه های یونی از فاز آلی بوسیله تشکیل یک لایه داخلی جدا می شوند. فاز سوم شامل اسید با غلظت بالاست که معمولاً ویسکوز می باشد. دانسیته اسید، تشکیل فاز سوم را در فصل مشترک آب- حلال امکانپذیر می کند.

ج- استخراج با مایع فوق بحرانی (Gas Anti solvent coystallization)

در فرآیند جداسازی اسید سیتریک دو نوع ناخالصی وجود دارد. یکی از این ناخالصی ها خود قند موجود در محلول است. در این حالت از گاز دی اکسید کربن فشرده شده به عنوان گاز ضد حلال استفاده می شود. به این صورت که گاز CO_2 فشرده شده از یک مخزن LG با محلول استون حاوی اسید سیتریک و ناخالصی مخلوط می شود و ناخالصی ها در این حالت زوتر رسوب می کنند.

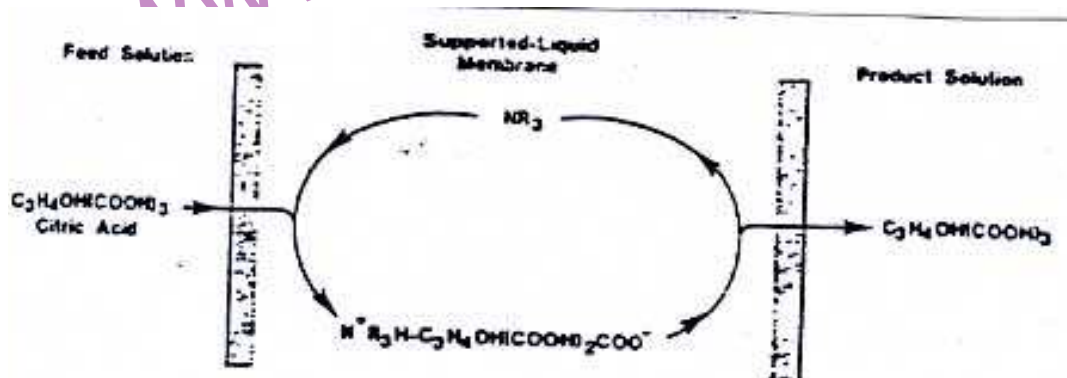


شکل (۶-۲) استخراج اسید سیتریک به روش استخراج با مایع فوق بحرانی

۶-۱-۴ روش استفاده از غشاء

در این غشاء ها یک حمل کننده به طور انتخابی با یک جزء یا بیشتر از محلول بر روی یک طرف غشاء واکنش می دهد و سپس کمپلکس تولید شده در طول غشاء نفوذ کرده و در طرف دیگر غشاء، کمپلکس به درون محلول رها شده و در آن نفوذ می کند تا به طرف دیگر محلول نگهدارنده برسد. سپس این کمپلکس، شکسته شده و یون

سیترات آزاد شده و به محلول خالص حاوی اسید سیتریک نفوذ می کند و عوامل کمپلکس دهنده به قسمت خوراک نفوذ عکس انجام می دهد.



شکل (۶-۳) خالص سازی اسید سیتریک با استفاده از غشاء نگهدارنده

۶-۱-۵) مقایسه بین روشهای مختلف جداسازی اسید سیتریک

روش استخراج با حلال در مقایسه با رسوب دهی به مراحل عملیاتی کمتر و در نتیجه به انرژی مصرفی کمتری احتیاج دارد. همچنین برای انجام واکنشهای رسوب دهی، احتیاج به یک انرژی اکتیواسیون و گرمایی هست در صورتی که برای استخراج با حلال انرژی کمی لازم است. از دیگر نواقص روش رسوب دهی، ایجاد ضایعات صنعتی بی ارزش مثل سولفات کلسیم است که هیچ کاربردی ندارد.

مقایسه بین روشهای مختلف استفاده از استخراج با حلال:

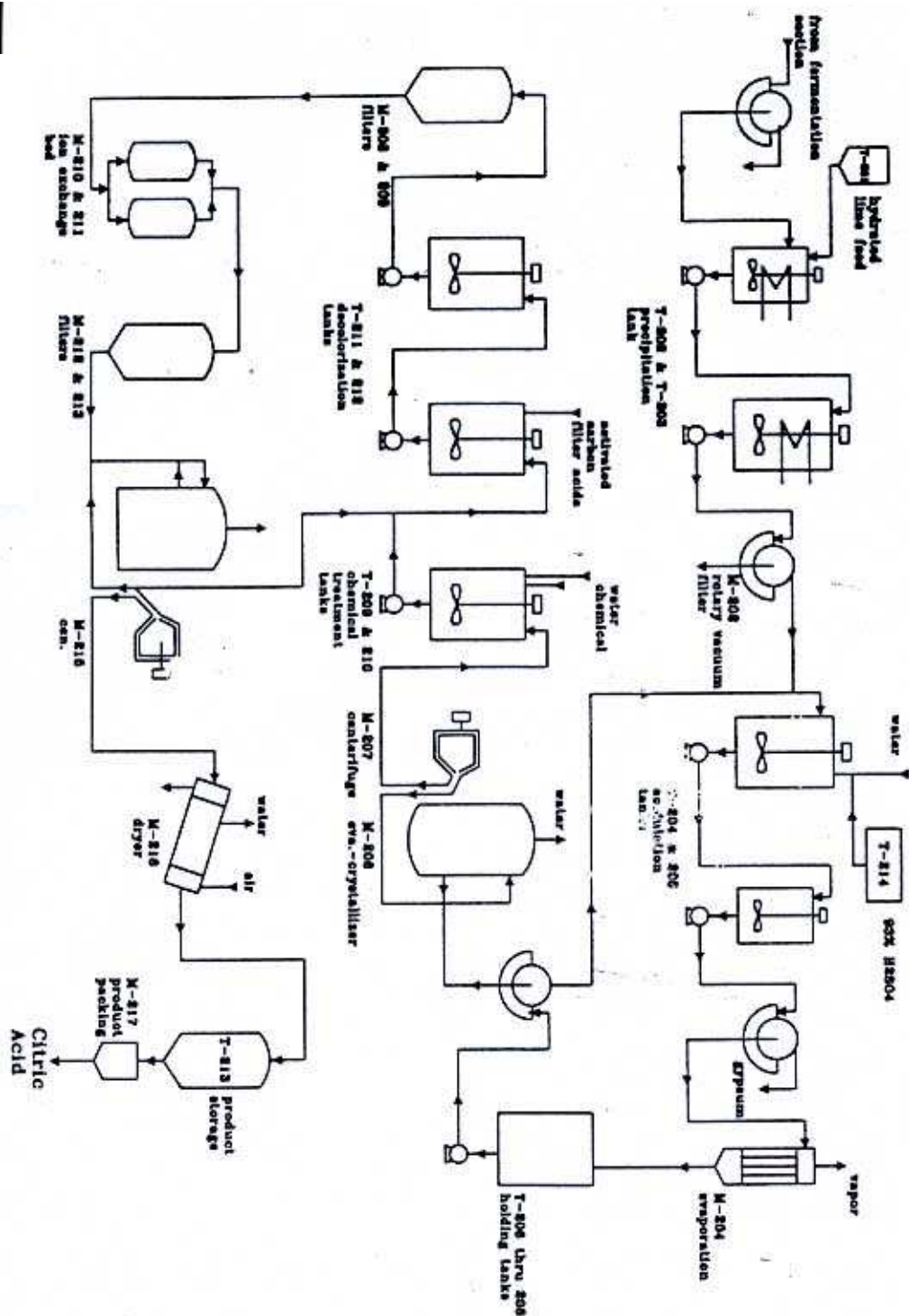
۱- استخراج با حلال بوسیله غشاء مایه، روشی است که برای استخراج محلولهای رقیق مورد استفاده قرار می گیرد.

۲- روش استخراج سه فازی در مقایسه با استخراج غشاء مایه برای محلولهای غلیظ مورد استفاده قرار می گیرد.

۳- استخراج با مایع فوق بحرانی، تکنیک استخراجی سریع و دقیق و بدون ایجاد آلودگی برای محیط زیست است. از نقاط ضعف این روش در خاصیت شیمیایی و رفتار حل شونده‌هایی است که رسوب داده می‌شوند.

۶-۲) خالص سازی اسید سیتریک

این قسمت در شش مرحله انجام می‌شود: کریستالیزاسیون ابتدای، رنگبری، فیلتراسیون، کریستالیزاسیون نهایی، سانتریفوژ و خشک کردن، در مرحله نخست، خالص سازی محلول حاوی اسید سیتریک توسط یک تبخیر کننده یا کریستال کننده، تا غلظت مشخصی تغلیظ شده و کریستالهای ساخته شده توسط یک سانتریفوژ از محلول جدا می‌شوند. با توجه به اینکه کریستالهای حاصله به دلیل ناخالصی، قهوه‌ای مایل به زرد می‌باشند، این کریستالها برای رنگبری در آب حل شده و پس از مخلوط شدن با یک سری مواد شیمیایی به تانک دیگری هدایت می‌شوند. و در این تانک مقداری کربن فعال جهت رنگزدایی اضافه شده و مخلوط می‌شود. سپس این مخلوط با عبور از فیلترهای متعدد و مبدل‌های یونی به محلول شفاف اسید سیتریک تبدیل می‌شود. محلول نهایی تحت یکسری فرآیند در دستگاه تبخیر کننده یا کریستال کننده در دمای $25-30^{\circ}\text{C}$ قرار گرفته و کریستالهای حاصله توسط یک سانتریفوژ از آن جدا می‌شوند. بالاخره کریستالها توسط خشک کن دورانی که تحت هوای خشک 120°C قرار گرفته، به طور مداوم خشک شده و بسته بندی می‌شوند.



شکل (۴-۶) نمایی از فرایند استخراج و جداسازی اسید سیتریک

www.kandoocn.com

فصل نهم

بررسی جنبه اقتصادی

۷-۱) کشورهای عمده تولید کننده و مصرف کننده محصول

شرکتهای Pfizer آمریکا- Merck آلمان- Routh و schuchardt از عمده تولید کنندگان اسید سیتریک بوده ولی به دلیل وسعت مصرف این محصول، تمامی کشورها واردات خواهند داشت.

۷-۲) اهمیت اقتصادی طرح

با توجه به مصرف روز افزون اسید سیتریک، طراحی و اجرای طرح صنعتی این فرآیند الزامی به نظر می رسد. سالانه بیش از ۱۵-۱۳ درصد از گندم در صنعت تبدیل به کاه گندم می شود که میزان آن بالغ بر ۱۱۰۸۵۴۴۲ تن در سال است. چنانچه صرفاً مواد اولیه تولید اسید سیتریک در کشت های غوطه ور و سطحی و جامد مقایسه شوند، (جدای از تکنولوژی های پیشرفته و حساسیتهای روش کشت در محیط مایع) براحتی می توان دریافت که استفاده از روش کشت حالت جامد و استفاده از کاه گندم، بسیار صرفه اقتصادی بالاتری دارد. مخصوصاً اینکه کاه گندم عمل آوری نشده قابل استفاده برای دام نیست، زیرا کاه گندم دارای مواد سلولزی و لیگنین بوده که قابل هضم برای طیور نمی باشد، مگر اینکه با کمک یک سری عملیات پیش تیمار، کاه را عمل آوری کرده، مواد سلولزی آنرا شکسته و قابلیت تغذیه ای آنرا بالا ببریم، که در این صورت نیاز به هزینه بالایی داریم. به علت حجم زیاد کاه گندم تولیدی در سال، در حال حاضر سالانه کاه گندم موجود، سوزانده می شود. با توجه به این مسأله، نیاز به تولید

صنعتی اسید سیتريک از گاه گندم بسيار ضروري به نظر مي رسد. (به خصوص به اين علت که سويسترا بسيار بسيار ارزان قيمت و حتي به احتمال زياد رايگان مي باشد).

۷-۳) ميزان واردات اسيد سيتريک

نام کشور	وزن (kg)	ارزش ريالي	ارزش دلاري
آلمان	۱۶۳۳	۲۲۸۳۶۰۳۰	۱۳۰۱۲
اتريش	۱۸۱۰۰۰	۴۲۴۴۱۱۴۶۴	۲۴۱۸۳۰
امارات متحده عربي	۲۵۰۲۵۰	۴۵۱۳۳۳۴۵۹	۲۵۷۱۷۰
اوکراين	۴۰۶۴۰	۸۳۹۶۹۶۵۸	۴۷۸۴۶
بلژيک	۹۵۰۰۰	۳۲۱۶۵۹۵۲۹	۱۸۳۲۸۲
چين	۱۵۵۶۳۷۵	۳۰۷۹۰۹۱۲۷۶	۱۷۵۴۴۶۸

جدول (۷-۱): مقدار و ارزش واردات اسيد سيتريک در سال ۱۳۷۷

نام کشور	وزن (kg)	ارزش ريالي	ارزش دلاري
آلمان	۱۸۵۵	۲۹۷۶۲۴۴۷	۱۶۹۵۶
اتريش	۲۵۸۰۰۰	۷۴۰۲۴۹۸۹۳	۴۲۱۷۹۵
امارات متحده عربي	۵۳۲۳۰۰	۱۰۳۹۱۱۷۱۸۰	۵۹۲۰۹۰
بلژيک	۲۸۹۰۰۰	۹۷۶۸۵۷۸۳۵	۵۵۶۶۱۴
چين	۲۶۸۴۱۰۰	۴۸۶۱۴۷۰۲۶۸	۲۷۷۰۰۶۹

جدول (۷-۲): مقدار و ارزش واردات اسيد سيتريک در سال ۱۳۷۸

نام کشور	وزن (kg)	ارزش ریالی	ارزش دلاری
آلمان	۱۲۳۵	۶۴۰۴۹۳۱۷	۳۶۴۹۶
اتریش	۱۸۳۰۰۰	۴۹۱۸۰۸۳۹۱	۲۸۰۲۳۱
امارات متحده عربی	۴۶۲۵۰۰	۸۷۱۷۱۱۱۰۸	۴۹۶۷۰۲
بلژیک	۱۵۲۰۰۰	۴۱۹۹۶۸۷۹۴	۲۳۹۲۹۹
ترکیه	۲۰۰۰۰	۷۵۳۰۴۹۳۸	۴۲۹۰۹
چین	۲۸۹۴۰۰۰	۴۹۱۵۲۹۸۱۰۹	۲۸۰۰۷۴۰
سوئیس	۱۵۰	۲۶۱۴۴۱۶	۲۰۵۴

جدول (۳-۷): مقدار و ارزش واردات اسید سیتریک در سال ۱۳۷۹

نام کشور	وزن (kg)	ارزش ریالی	ارزش دلاری
اتریش	۱۰۲۰۰۰	۲۵۴۹۱۵۰۰۷	۱۴۵۲۰
امارات متحده عربی	۳۳۰۰۰۰	۵۰۸۸۶۲۴۷۵	۲۸۹۹۵۰
بلژیک	۴۲۰۰۰	۱۰۳۰۴۵۱۹۵	۵۸۷۱۵
چین	۵۱۲۳۹۰۰	۷۱۷۲۴۷۳۲۸۸	۴۰۸۶۸۸۰

جدول (۴-۷): مقدار و ارزش واردات اسید سیتریک در سال ۱۳۸۰

نام کشور	وزن (kg)	ارزش ریالی	ارزش دلاری
اتریش	۱۳۵۱۵۰	۱۱۵۷۹۶۶۰۶۳	۱۴۶۲۰۷
امارات متحده عربی	۷۹۳۵۰۰	۳۹۶۸۴۸۳۰۰۱	۵۰۱۰۷۲
بلژیک	۷۶۰۰۰	۷۶۲۵۴۶۱۶۶	۹۶۲۸۱
چین	۵۵۵۲۰۰۰	۲۵۶۰۴۹۶۰۰۳۵	۳۳۰۴۰۳۴
سوئیس	۵۳۰۰۰	۵۳۰۴۲۹۹۵۳	۶۶۹۷۳

جدول (۵-۷): مقدار و ارزش واردات اسید سیتریک در سال ۱۳۸۱

نام کشور	وزن (kg)	ارزش ریالی	ارزش دلاری
آلمان	۲۵۹۳۷	۴۲۸۹۱۰۹۹۳	۵۴۱۵۶
اتریش	۵۲۷۵۰	۴۹۷۳۱۳۵۳۱	۶۲۷۹۳
امارات متحده عربی	۱۱۹۶۸۲۰	۶۲۲۶۷۶۴۴۹۵	۷۸۶۲۰۸
بلژیک	۱۹۰۰۰	۲۱۳۱۹۲۷۳۴	۲۶۹۱۸
چین	۴۶۴۵۳۵۰	۲۴۰۰۴۸۲۶۰۵۶	۳۰۳۰۹۱۱
فرانسه	۳۱۹۳۰	۲۲۰۳۸۶۱۳۰۹	۲۷۸۲۶۵
لوگزامبورگ	۵۳۰۰۰	۵۳۰۸۹۳۷۵۰	۶۷۰۳۲
هند	۲۵۰۰۰	۱۴۵۰۶۹۷۵۶	۱۸۳۱۷

جدول (۶-۷): مقدار و ارزش واردات اسید سیتریک در سال ۱۳۸۲

۷-۴) واحدهای در دست اجرا و واحدهای تولیدی اسید سیتريك

نام واحد: حسین ارشدى					
آدرس گارگاه: شهرستان برازجان - وحدتیه					
ظرفیت	اشتغال	سرمایه ثابت	شماره مجوز	تاریخ مجوز	پیشرفت
۱۱۵۰۰۰ لیتر	۶۳ نفر	۶۳۶۰ میلیون ریال	۲۰۴۵۵۸	۷۹/۸/۲۵	۱۰ در دست اجرا

نام واحد: شرکت قطعه ریشهر					
آدرس گارگاه: بوشهر - کوی ریشهر - کوچه یاس					
ظرفیت	اشتغال	سرمایه ثابت	شماره مجوز	تاریخ مجوز	پیشرفت
۲۵۰۰ تن	۴۱ نفر	۱۸۰۰۰ میلیون ریال	۱۱۹۴۹۰	۸۲/۱/۱۶	۵ در دست اجرا

نام واحد: کشت و صنعت جوبین					
آدرس گارگاه: خراسان رضوى					
ظرفیت	اشتغال	سرمایه ثابت	شماره مجوز	تاریخ مجوز	پیشرفت
۱۰۰۰۰ تن	۱۶۵ نفر	۳۴۲۳۳۳ میلیون ریال	۲۸۶۷۲	۷۸/۷/۶	۵۲ در دست اجرا

نام واحد: داروسازی سپیداج					
آدرس گارگاه: شهرک صنعتی اشتهارد (کرج)					
ظرفیت	اشتغال	سرمایه ثابت	شماره مجوز	تاریخ مجوز	پیشرفت
Kg 5000	۱۵ نفر	۶۰۰ میلیون ریال	۶۳۹۸۲	۸۱/۹/۴	۱۰۰ فعال

نام واحد: شرکت نمک تصفیه هدیه					
آدرس گارگاه: گرمسار- شهرک صنعتی ایوانکی					
ظرفیت	اشتغال	سرمایه ثابت	شماره مجوز	تاریخ مجوز	پیشرفت
۱ تن	۱۰ نفر	۶۸۲۵ میلیون ریال	۱۶۲۴۰	۸۳/۷/۲۰	۱۰۰ فعال

نام واحد: الکل و مواد غذایی بیدستان					
آدرس گارگاه: قزوین - کیلومتر ۱۰ جاده قدیم کرج					
ظرفیت	اشتغال	سرمایه ثابت	شماره مجوز	تاریخ مجوز	پیشرفت
5000 تن	۲۱۷ نفر	۹۷۷۴۱ میلیون ریال	۲۱۶۱۱	۸۳/۱۲/۲۷	۱۰۰ فعال

نام واحد: مواد اولیه دارویی تهران شیمی					
آدرس گارگاه: ساوه- شهرک صنعتی					
ظرفیت	اشتغال	سرمایه ثابت	شماره مجوز	تاریخ مجوز	پیشرفت
200 تن	۳۵ نفر	۸۰۰۰ میلیون ریال	۱۲۳۲۰	۸۳/۸/۱۱	5 در دست اجرا

نام واحد: شرکت کیمیایی غرب گستر					
آدرس گارگاه: شهرک صنعتی فرامان					
ظرفیت	اشتغال	سرمایه ثابت	شماره مجوز	تاریخ مجوز	پیشرفت
14000 تن	۱۱۷ نفر	۳۴۲۰۰۰ میلیون ریال	۶۰۶۳	۸۳/۴/۱۶	81 در دست اجرا

21 واحد دیگر هم با ظرفیت کل 104710 تن مجوز تولید گرفته اند ولی هنوز پیشرفتی در کار ندارند.

میزان تولید اسید سیتریک در کشور (در حال حاضر) 51000 تن و 5000 kg می باشد.

منابع مورد استفاده:

- ۱- بیوتکنولوژی - میکروبیولوژی صنعتی، تألیف: ولف کروگر - آنالیز کروگر، مترجمان: دکتر سید علی مرتضوی - مهندس مهدی کریمی - مهندس رسول کدخدایی - مهندس سعید رحیمی یزدی، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
- ۲- میکروبیولوژی صنعتی، تألیف: اختر الملوک کاظمی و سیری (۱۳۷۲) دانشگاه صنعتی شریف.
- ۳- بیوتکنولوژی صنعتی، تألیف: دکتر سید عباس شجاع الساداتی، دانشگاه تربیت مدرس
- ۴- مبانی بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی صنعتی، تألیف: دکتر حسن لامع و دکتر محمد رضا احسانی، دانشگاه آزاد اسلامی (۱۳۷۵)
- ۵- بیوتکنولوژی میکروبی، تألیف: محمد رضا سعودی، دکتر فریدون ملک زاده، دکتر شیرین ملک زاده، دانشگاه تهران (۱۳۸۰)
- ۶- تکنولوژی آماده سازی و نگهداری غلات، تألف: دکتر ناصر رجب زاده (۱۳۷۵)
- ۷- مبانی فناوری غلات، تألیف دکتر ناصر رجب زاده، دانشگاه تهران (۱۳۸۰)
- ۸- غلات تألیف: ناصر خدا بنده دانشگاه تهران
- ۹- گندم تألیف: هادی کریمی
- ۱۰- سالنامه آمار بازرگانی خارجی جمهوری اسلامی ایران سالهای ۸۲-۱۳۷۷
- ۱۱- آمار وزارت صنایع (۱۳۸۳)، وزارت صنایع تهران

۱۲- سید صفاعلی فاطمی، سید عباس شجاع الساداتی، «بهینه سازی تولید اسید سیتریک با استفاده از طراحی آزمایشها در روش تخمیر حالت جامد با بکارگیری A.niger، دانشگاه تربیت مدرس، امیر کبیر، سال یازدهم، شماره ۴۳.

۱۳- سید صفا علی فاطمی، سید عباس شجاع الساداتی، «تولید اسید سیتریک از تفاله سیب با استفاده از تخمیر حالت جامد، مقالات علمی پژوهشی، سال هجدهم، شماره یک و دو (۱۳۷۸)

14- Y.D. Hang, E. E. Woodams, "A process for leaching citric acid from apple pomace fermented with A.nigr in SSF", MIRCEN jornal, (1989), 5, 379-382.

15- Y.D. Hang, E. E. Woodams, "Solid state fermentation of apple pomace for citric acid production." MIRCEN jornal, (1986), 2, 283-287

16- S.A. shojaosadati, V. Babaeipour. "Citric acid production from apple pomace in multi- layer Packed bed solid- state bioreactor.", process Biochemistry 37. (2002), 909-914.

17- W.Q.XU, Y.D. Hang, "Roller culture technique for citric acid production by A.niger", process Biochemistry, (1988)

18- Y.D. Hang. "Microbial production of citric acid in fixed- bed column. Bioreactors", Biotechnology letters, Vol 10, No.6 421-426 (1988)

19- Y. D/ Hang, E.E. woodams, "utilization of grape pomace for citric acid production by SSF." , Am.j Enol.vitic, vol/.37 , No.2, (1986)

20- Y.D. Hang, E.E. woodams, 'production of citric acid from corncobs. By A.niger". , Bioresource technology 65 (1998) 251-253.

21- T. Roukas, P. Kotze kidou, 'Pretreatment of date syrup to increase citric acid production". Enzyme and Microbial technology 21, 273-276 (1997) .

22- Al- obaidi, "The use of deionised date syrup as a substrate for citric acid production.", Biotechnology letters, (1979), 1, 153-158.

- 23- V.S. shankaranad, B. K. Lonsane, "coffee- husk; an inexpen sive substrate for production of citric acid by A.niger in SSF.", Jornal of microbiology & Biotechnology 10, 165-168, (1994)
- 24- P.S. randenberghe, C. R. soccol, A. pandey, J. M. Lebeault, "SSF for the synthesis of citric acid by A.niger.", Bioresource Technology 74, (2000), 175-178
- 25- S.K. Khare, Krishna Jha, A.P. Gandhi, 'citric acid production from okaraybg SSF.", Biore source Teehnology 54 (1995), 323-325.
- 26- M. Y. Lu, I. S. Maddox, J. D. Brooks, "Application of a multi- Layer Packed- bed reactor to citric acid production in SSF using A. niger.", process Biochemistry, vol. 33, No.2 PP.117-123, (1998)
- 27- M.Y. Lu, j.P. Brooks, I. S. Maddox, 'citric acid production by SSF in a packed – bed reactor using A.niger.", Enzyme and Microbial Technology 21, 392-397, (1997)
- 28- T. Roukas, P. Kotzekidou, "production of citric acid from Brewery wastes by surface fenmentation using A.niger.", journal of food science- 225, vol. 51 No. 1, (1986)
- 29- T. Roukas, E. Alichanidis, "citric acid production from beet molasses by cell recycle of A.niger,", Indus trial Micobiology, 7 (1991), 71-74.
- 30- G.N. Q azi, C. N. Gaind, S.K. chaturred, "pilot – scale citric acid production with A.niger under several conditions.", jornal of fermentation and bioengineering, vel. 69, No. 1, 72 – 74, (1990)

۳۱- اطلاعات اولیه مورد نیاز طرح تولید اسید سیتریک، وزارت صنایع، معاونت

توسعه صنعتی، میترا رزمجو (۱۳۷۷)

۳۲- قارچ شناسی پزشکی، تألیف: دکتر مسعود امامی، دکتر پریوش کردبچه، دکتر

مهین مقدمی، دکتر فریده زینی، انتشارات دانشگاه تهران، (۱۳۷۳).