

بررسی افزایش تولید اسیدسیتریک توسط جدایه‌های جهش یافته‌ی بومی آسپرژیلوس نایجر

سید محمد رضا خوشرو^{*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۱۶

چکیده

قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر از خاک و سطح بذره‌های ذرت جدا سازی و بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی و خالص سازی شدند. میزان پرتودهی بر اساس مدت زمان دریافت پرتو با اشعه UV بر حسب ژول بر متر مربع محاسبه شد. از روش اختصاصی ماریر-بولت برای سنجش کمی تولید اسیدسیتریک استفاده شد. پرتودهی با زمان ۱۲۰۰ ثانیه بیشترین تاثیر را بر افزایش تولید اسیدسیتریک نشان داد. میانگین تولید اسیدسیتریک در جدایه‌های برتر جهش یافته و والدینی به ترتیب ۵۱/۰۱ و ۳۶/۸۷ میلی گرم بر لیتر بود که حدود ۱۴/۱۴ گرم بر لیتر افزایش نشان داد. در بررسی پایداری ژنوتیپ‌های جهش یافته، میانگین تولید اسیدسیتریک در ۱۲۰۰ ثانیه پرتودهی در چهارمین کشت متوالی از کشت اول تفاوت معنی‌داری از نظر آماری نداشت. عملکرد و کارایی جدایه‌ی جهش یافته ۵ (۵ UV) در مقایسه با جدایه‌ی والدینی ۳ برابر افزایش تولید اسیدسیتریک را نشان داد. در جدایه‌ی ۵UV و والدینی آن پارامترهای کنتیکی تشکیل محصول (اسیدسیتریک) ۲ برابر و پارامترهای کنتیکی سوستر (مصرف گلوکز) تقریباً مساوی بود، در حالی که وزن خشک توده‌ی سلولی در جدایه ۵UV نسبت به جدایه‌ی والدینی ۵ با شیب یکسان افزایش یافت. در اثر جهش، وزن توده‌ی سلولی در جدایه‌ی پرتو دیده‌ی UV ۵ در محدوده زمانی یکسان، افزایش معنی‌دار نشان داده است. در این مطالعه مشخص شد که، جهش‌های تصادفی توسط اشعه UV باعث بهبود پارامترهای کنتیکی تولید اسیدسیتریک در مقابل مصرف گلوکز به عنوان سوستر، شده است.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس نایجر، اسیدسیتریک، اشعه UV، جهش

مقدمه

اسیدسیتریک یک محصول مهم در صنایع بیوتکنولوژی صنعتی و تجارت جهانی است، که به دلیل انحلال پذیری در آب، طعم ترش مطبوع، خواص بافری، عدم سمیت، جذب آسان و شرکت در واکنش‌های شیمیایی، نقش آنتی‌اکسیدانی قوی و همچنین به عنوان یک مونومر برای تولید پلیمرهای سازگار با محیط زیست خصوصاً در زمینه‌های مختلف پزشکی، صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد (Soccol et al., 2006). بهبود سویه‌ی تولیدکننده‌ی میکروبی، بزرگترین فرصت برای کاهش هزینه برای سنتز این اسید است. از آنجایی که اسیدسیتریک یک واسطه‌ی متابولیسم در تولید انرژی است،

غلظت آن می‌تواند به مقدار معنی‌دار در شرایط عدم تعادل متابولیکی، افزایش یابد. سویه‌های دارای ویژگی‌های برتر، مانند سویه‌هایی که توانایی تولید اسیدسیتریک بیشتر و افزایش میزان تخمیر را دارند، بعد از اینکه ماده ژنتیکی آنها تحت تاثیر عوامل جهش‌زای شیمیایی و یا مکانیکی قرار گرفتند، می‌توانند به عنوان سویه‌های برتر انتخاب شوند (Lotfy et al., 2007).

تاثیر الکترون‌های کم سرعت، پرتوهای اشعه‌ی UV، گاما، X و یا مواد شیمیایی جهش‌زا با ایجاد جهش‌های تصادفی بر روی جوانه‌زنی اسپور، رشد و مورفولوژی ریسه در قارچ‌های آسکومیست به ویژه در قارچ *آسپرژیلوس نایجر* با ایجاد سویه‌های توانمند در تولید اسیدسیتریک مورد مطالعه قرار گرفته است (Khurshid et al., 2001).

در این تحقیق، به دلیل نیاز به اسیدسیتریک در مقیاس وسیع و در دسترس بودن سویه‌های بومی، افزایش توانایی جدایه‌های *آسپرژیلوس نایجر* وحشی جدا شده از خاک و سطح بذرهای ذرت در تولید اسیدسیتریک از طریق جهش‌های تصادفی با استفاده از غلظت‌های مختلف اشعه‌ی UV (بر اساس مقدار انرژی دریافت شده در مدت زمان تابش پرتو) مورد بررسی قرار گرفت و بهترین جدایه‌های والدینی (تیپ وحشی) و جهش یافته از نظر تولید اسیدسیتریک مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

آماده سازی محیط‌های کشت مورد استفاده: محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar): ۳۹ گرم پوتیتو دکستروز آگار (PDA) در یک لیتر آب مقطر سترون؛ محیط کشت QSPDA (Quarter Strength Potato Dextrose Agar): ۹/۷۵ گرم پوتیتو دکستروز برات (PDB)، ۲۰ گرم آگار و ۲ میلی لیتر اسید لاکتیک (برای ممانعت از آلودگی‌های باکتریایی) در یک لیتر آب مقطر سترون؛ محیط کشت CYEA (Czapek Yeast Extract Agar): ۳ گرم نیترات سدیم، ۱ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۵ گرم پتاسیم کلرید، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن آبدار، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۳۰ گرم گلوکز و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر سترون؛ محیط کشت CDA (Czapek Dox Agar): ۳ گرم نیترات سدیم، ۱ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۵ گرم پتاسیم کلرید، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن آبدار، ۳۰ گرم گلوکز (به عنوان منبع کربن برای تولید اسیدسیتریک)، رنگ رزبنگال (4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein) (به منظور تسهیل جداسازی، جلوگیری از گسترش بیش از حد رشد ریسه‌ی قارچ‌های ساپروفیت رشته‌ای در معرض نور و ممانعت از رشد سایر ساپروفیت‌ها)، ۰/۱ گرم کلرامفنیکل، رنگ برموکروزول گرین ۰/۱٪ (رنگ برموکروزول گرین به منظور تایید میزان تولید اسیدسیتریک با ایجاد هاله‌ی زرد رنگ) و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر سترون؛ محیط کشت FLCM (Fermented Liquid culture Medium): ۱۰۰ گرم گلوکز، ۲/۵ گرم سولفات دی آمونیوم، ۰/۵ گرم سولفات منیزیم ۷ آبه، ۲ گرم فسفات دی هیدروژن پتاسیم، ۰/۱ گرم سولفات آهن، ۰/۱ گرم سولفات روی ۷ آبه، ۰/۰۶ گرم سولفات مس ۵ آبه و ۰/۱۲۵ گرم رنگ رزبنگال در یک لیتر آب مقطر (تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد).

محیط‌های کشت و لوله‌های پلاستیکی درب پیچ‌دار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع اتوکلاو و ظرف‌ها شیشه‌ای قبل از استفاده در خشک کن (Oven) در دمای ۲۴۰ درجه سانتیگراد کاملاً سترون شدند.

جداسازی قارچ‌های *آسپرژیلوس* از نمونه‌های خاک و سطح بذرهاى ذرت: ۲۰ نمونه خاک از مزارع مختلف

استان کرمان جمع آوری شد. یک گرم از مخلوط خاک‌ها به ۳ میلی لیتر آب سترون در یک لوله پلاستیکی ۱۰ میلی لیتری اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه بر روی هم‌زن برقی کاملاً مخلوط شد. سپس رقت‌های ۱/۱۶ (۴^{-۲}) و ۱/۶۴ (۴^{-۳}) از نمونه ساخته شد. ۱ میلی لیتر از هر رقت بر روی سطح محیط کشت سترون CYEA در داخل پلیت کاملاً پخش شدند. پلیت‌ها به مدت ۳ روز در دمای ۳۱ درجه سانتیگراد در تاریکی، گرم‌خانه‌گذاری شدند. تعداد ۲۰ بذر ذرت به مدت یک دقیقه در محلول ۲ درصد هیپو کلرید سدیم، سترون و ۳ مرتبه با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. سپس بذرها بر روی محیط کشت QSPDA حاوی لاکتیک اسید، (۵ بذر در هر پلیت) قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۳ روز در دمای ۳۱ درجه سانتیگراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. کلونی قارچی تشکیل شده، برای جداسازی و شناسایی کلونی‌های *آسپرژیلوس نایجر* توسط میکروسکوپ تشریحی و نوری مورد بررسی قرار گرفتند (Pitt & Hocking, 2009).

شناسایی قارچ *آسپرژیلوس نایجر*: برای به‌دست آوردن کشت خالص از قارچ *آسپرژیلوس نایجر*، کشت‌های تک

اسپوری (تقریباً ۱×۱۰^۷ اسپور/ ۲۰ میلی لیتر) روی محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ تا ۷ روز گرم‌خانه‌گذاری شدند. برای اطمینان از خالص بودن نمونه‌های قارچ، از کشت‌های خالص شده، کشت‌های متوالی (۴ کشت متوالی) بر روی محیط CDA انجام شد. کشت‌های خالص در لوله‌های پلاستیکی ۱۰ میلی لیتری در پیچ‌دار در آب مقطر استریل برای استفاده‌های بعدی، در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Guchi *et al.*, 2014). از کشت خالص قارچ برای مطالعه‌ی ویژگی‌های مورفولوژی استفاده شد. برای شناسایی مورفولوژی کلنی‌ها و خصوصیات میکروسکوپی قارچ‌های جدا شده، برای تعیین جنس و گونه، از روش رنگ آمیزی با Lactophenol Cotton Blue (LCB) و مقایسه با سوش استاندارد استفاده شد (Nyongesa *et al.*, 2015; Zulkifli & Zakaria, 2017). از سوش *آسپرژیلوس نایجر* با شماره PTCC ۵۰۱۰ خریداری شده از بانک قارچ و مخمر سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به عنوان سوش استاندارد برای مقایسه با قارچ‌های جدا شده استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ و القاء جهش: از ۵ جدایه‌ی برتر (جدایه‌های ۱ تا ۵) که بیشترین توانایی تولید

اسیدسیتریک را داشتند به‌منظور ایجاد جهش (جدایه‌ی ۱UV تا ۵UV) استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ، از کشت شش روزه‌ی قارچ بر روی محیط کشت CYEA در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی (برای افزایش توانایی اسپورزایی) استفاده شد. ابتدا ۱۰ میلی لیتر محلول ۰/۰۰۵ درصد وزنی/حجمی دی اکتیل سولفو سوکسینات سدیم سترون شده (Dioctyl

(به منظور سست کردن دیواره هیف‌های قارچ) بر روی محیط کشت اضافه و توسط لوپ سترون توده‌های قارچی خرد و قارچ‌ها از روی محیط کشت جمع‌آوری و در لوله‌های پلاستیکی سترون در پیچ‌دار با حجم ۲۵ میلی لیتر جمع‌آوری شدند. سپس با آب مقطر سترون حاوی ۰/۹ درصد وزنی/حجمی NaCl یا ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ به مدت ۲ دقیقه کاملاً و به شدت با دستگاه هم‌زن لوله با ۹۰ دور بر ثانیه شستشو داده شدند. قطعات میسلیموم قارچ با لوپ سترون از داخل محیط جمع‌آوری و محلول باقی‌مانده در لوله‌ها توسط یک لایه گاز پانسمان سترون، صاف شدند. محلول صاف شده حاوی اسپورها با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و اسپورهای رسوب داده شده مجدداً با محلول نمکی یا توئین ۸۰ شستشو داده شدند. از هر نمونه اسپور، ۲ میلی لیتر با مقدار تقریبی 10^5 اسپور در هر میلی لیتر (CFU/ml) (از طریق ساخت رقت‌های سریالی تنظیم و توسط لام هموسیتومتر (نئوبار) شمارش شدند) در ۰/۰۵ درصد (v/v) توئین ۸۰ تهیه و در میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتری ذخیره شدند (Ikram-ul et al., 2004; Lotfy et al., 2007).

الفاء و مدت زمان جهش: برای ایجاد جهش، از لامپ اشعه UV (MINERAL LIGHT LAMP مدل UVG-54)

۲۰ وات با طول موج ۲۵۴ نانومتر به عنوان منبع اشعه UV استفاده شد. شدت تابش پرتو از طریق اندازه‌گیری سطح تابش لامپ UV ($J/m^2/s$) و غلظت نور (J/m^2) از طریق اندازه‌گیری سطح تابش لامپ UV و محاسبه وات بر مترمربع (W/m^2)، شدت تابش بر حسب $J/m^2/s$ محاسبه شد. بر اساس رابطه $W/m^2 = J/m^2/s$ (وات = ژول بر ثانیه)، غلظت پرتو UV بر مبنای J/m^2 از طریق ضرب $J/m^2/s$ در مدت زمان تابش مورد نظر بر حسب ثانیه، محاسبه شد. با توجه به رابطه مستقیم زمان با غلظت پرتو (انرژی دریافت شده) در زمان‌های ۳۰۰ تا ۲۱۰۰ ثانیه (۵ تا ۳۵ دقیقه) با فاصله زمانی ۳۰۰ ثانیه، غلظت پرتو دریافتی محاسبه شد (Rattanukul & Oguma, 2018; Rodrigues et al., 2009; Valero et al., 2007).

بررسی کارایی غلظت‌های پرتو دهی: با استفاده از منحنی بقاء، کاهش درصد بقاء اسپورها بر حسب زمان با زمان

های ۳۰۰ تا ۲۱۰۰ ثانیه (۵ تا ۳۵ دقیقه) با فاصله زمانی ۳۰۰ ثانیه، بهترین زمان پرتو دهی برای جهش در اسپورها محاسبه شد. برای مشخص کردن زمان پرتو دهی مناسب، به منظور جهش اسپورها که اسپورها توانایی بقاء و رشد خود را حفظ نمایند، از شاخص PE و از کسر بقاء (Plating efficiency)، به عنوان کارایی غلظت پرتو دریافت شده توسط اسپور استفاده شد. کسر بقاء که رابطه بین کسری از سلول‌ها و حفظ توانایی تولید مثل را در دوز جذب تابش نشان می‌دهد، در مقیاس لگاریتمی محاسبه و محور y لگاریتم کاهش در مقابل دوز پرتو دهی در محور x ترسیم شد. از نمودار بقاء اسپور بر مبنای زمان پرتو دهی (میزان غلظت پرتو دهی یا میزان انرژی دریافت شده توسط اسپور)، بر اساس دوز موثر (Effective Dose) ۲۰ درصد (ED20) از اسپورهایی که بیشترین غلظت پرتو را دریافت و قدرت بقاء خود را حفظ نموده‌اند، زمان مناسب و میزان حساسیت اسپور به غلظت پرتو دهی

بر حسب مدت زمان تابش (ضریب k) محاسبه شد (Joiner, 2009; Matsuya et al., 2015). بعد از بررسی کیفی تولید اسید در زمان‌های مورد بررسی، زمان مناسب انتخاب و از کشت اسپورهای پرتو دیده در این زمان برای بررسی کمی استفاده شد.

برای اعمال تیمارها، ۲۰ میکرو لیتر از نمونه‌های اسپور ذخیره شده که تقریباً شامل ۲۰۰ اسپور است را با ۱ میلی لیتر آب مقطر سترون مخلوط و بر روی محیط CDA در پتری‌های با قطر ۱۰ سانتی متر تلقیح و پس از اعمال پرتو دهی با اشعه UV در ۴ تکرار در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. برای ابقاء جهش، پتری‌های حاوی اسپور قارچ‌های جدا شده‌ی تیپ والدینی و استاندارد/سپرزیلوس نایجر، با فاصله ۳۰ سانتی متر در معرض نور UV با مدت زمان‌های ۰ (شاهد بدون پرتو دهی)، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰، ۱۲۰۰، ۱۵۰۰، ۱۸۰۰ و ۲۱۰۰ ثانیه در یک محیط تاریک قرار داده شدند. به منظور ممانعت از مکانیسم ترمیم اثر جهش توسط نور (Rodrigues et al., 2009)، پتری‌ها در معرض منبع اشعه UV قرار گرفتند (Lotfy et al., 2007).

بررسی کیفی تولید اسیدسیتریک توسط جدایه‌های والدینی و جهش یافته: از هر یک از جدایه‌های خالص

شده، از یک تک کلنی (تقریباً 1×10^7 اسپور/ میلی لیتر) انتخاب و بر روی محیط CDA (حاوی قند گلوکز به عنوان منبع کربن جهت تولید اسیدسیتریک) در مرکز پلیت تلقیح و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرم‌خانه‌گذاری شد و هر ۲۴ ساعت یکبار به مدت ۶ روز از لحاظ بروز هاله‌ی زرد ناشی از تولید اسید مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی کمی تولید اسیدسیتریک توسط جدایه‌های والدینی و جهش یافته: برای اندازه‌گیری میزان تولید

اسیدسیتریک از ۱۵۰ میلی لیتر محیط کشت FLCM در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتر استفاده شد. میزان تولید کمی اسیدسیتریک بعد از شش روز کشت مورد سنجش قرار گرفت. پس از تلقیح در حدود 10^7 اسپور از جدایه‌های والدینی (جدایه‌های ۱ تا ۵)، جدایه‌های جهش یافته (جدایه‌ی ۱UV تا ۵UV) و جدایه‌ی ۵UVI جهش یافته‌ی کشت چهارم در محیط فوق، نمونه‌ها روی دستگاه تکان‌دهنده با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. به منظور سنجش اختصاصی اسیدسیتریک از روش ماریر-بولت (روش پیریدین انیدرید استیک) استفاده شد (Marier & Boulet, 1956). برای محاسبه مقدار اسیدسیتریک از ترسیم منحنی استاندارد اسیدسیتریک با معادله خط $y = 1/0.085x - 0/0.802$ (y جذب و x غلظت گرم بر لیتر اسیدسیتریک) و ضریب تشخیص $R = 0/98$ استفاده شد. در صورت بالا بودن غلظت اسیدسیتریک تولید شده، محلول رقیق شد و در نهایت برای محاسبه‌ی غلظت در عکس فاکتور رقت ضرب گردید.

بررسی پایداری ژنوتیپ‌های جهش یافته: میزان تولید اسیدسیتریک چهارمین کشت متوالی از جدایه‌های جهش

یافته، با زمان ۱۲۰۰ ثانیه پرتو دهی، بر روی محیط FLCM تحت همان شرایط تخمیر و کشت اولیه اندازه‌گیری شد و با ژنوتیپ های جهش یافته کشت اول در سه تکرار از نظر آماری با روش LSD (حداقل تفاوت معنی داری) در سطح $\alpha = 0/05$ مورد مقایسه قرار گرفتند.

بررسی توانایی (کنتیک) جدایی برتر جهش یافته در مصرف قند و تولید اسیدسیتریک: کارایی، بهره‌وری و

عملکرد تولید اسیدسیتریک جدایی برتر جهش یافته (ΔUV)، در محیط کشت FLCM (شامل ۱۰۰ گرم در لیتر گلوکز با pH=۶) با تلقیح 3×10^7 اسپور، مورد بررسی قرار گرفت. میزان قند مصرف شده در زمان تخمیر و قند باقی مانده با استفاده از روش دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) در طول موج ۵۴۰ نانومتر (Gonçalves *et al.*, 2010) اندازه‌گیری شد. برای سنجش مصرف گلوکز، از ترسیم منحنی استاندارد گرم بر لیتر گلوکز (x) و جذب (y) با معادله خط $y = 0.7697x + 0.1$ با ضریب تشخیص $R = 0.98$ استفاده شد. میزان تولید اسیدسیتریک در زمان‌های ۰، ۲۴ (روز اول)، ۴۸ (روز دوم)، ۷۲ (روز سوم)، ۹۶ (روز چهارم)، ۱۲۰ (روز پنجم)، ۱۴۴ (روز ششم)، ۱۶۸ (روز هفتم) و ۱۹۲ ساعت (h) (روز هشتم) اندازه‌گیری شد.

پارامترهای کننتیکی تشکیل اسیدسیتریک و مصرف گلوکز شامل، Q_p = اسیدسیتریک تولید شده بر لیتر بر ساعت ($g l^{-1} h^{-1}$) (بهره‌وری)، Q_s = گلوکز مصرف شده بر لیتر بر ساعت ($g l^{-1} h^{-1}$)، $Y_{p/s}$ = (بازدهی تولید اسیدسیتریک نسبت به مصرف گلوکز) گرم اسیدسیتریک تولید شده بر گرم گلوکز مصرف شده (عملکرد) ($g g^{-1}$)، $Y_{p/x}$ = (بازدهی تولید اسیدسیتریک نسبت به تولید توده زیستی) گرم اسیدسیتریک تولید شده بر گرم توده‌ی سلولی خشک تولید شده ($g g_x^{-1}$)، $Y_{x/s}$ = (بازدهی تولید توده‌ی سلولی نسبت به مصرف گلوکز) گرم بر لیتر توده زیستی خشک تولید شده به گرم بر لیتر گلوکز مصرف شده ($g l^{-1} / g l^{-1}$)، q_p = گرم اسیدسیتریک تولید شده بر گرم توده‌ی سلولی خشک بر ساعت ($g g_x^{-1} h^{-1}$)، P = غلظت اسید استیک تولید شده ($g l^{-1}$)، S = غلظت اولیه گلوکز ($g l^{-1}$)، t = زمان (ساعت h)، X = توده‌ی سلولی خشک ($g l^{-1}$)، μ (Specific growth rate) = نرخ رشد ویژه، q_p = گرم اسیدسیتریک تولید شده بر گرم توده زیستی خشک بر ساعت و q_s = گرم گلوکز مصرف شده بر گرم توده زیستی خشک بر ساعت (Najafpour, 2015; Nielsen *et al.*, 2003; Panikov, 2014). برای بررسی کارایی و بهره‌وری جدایی برتر والدینی و جهش یافته در تولید اسیدسیتریک و وزن خشک توده‌ی سلولی با مقدار گلوکز مصرف شده از مدل مونود (Monod) و موزر (Moser) استفاده شد (Ardestani & Kasebkar, 2014).

محاسبه وزن خشک توده‌ی سلولی: بعد از جمع‌آوری توده‌ی سلولی از طریق فیلتر کردن تحت خلاء محلول محیط

کشت بر روی کاغذ صافی، توده‌ی سلولی جمع‌آوری و دو مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد. پس از فیلتر کردن نهایی توده‌ی سلولی جمع‌آوری شده، در خشک کن ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار SPSS v.25 و رسم نمودارها توسط نرم افزار اکسل

انجام شد. هر تیمار پرتوده‌ی و سنجش کمی و کیفی تولید اسیدسیتریک در ۴ تکرار انجام، و میانگین و انحراف معیار (میزان خطا) محاسبه و مقایسه میانگین‌ها در سطح معنی داری ۰/۰۵ به روش دانکن انجام شد.

نتایج

جدا سازی و شناسایی قارچ *آسپرژیلوس نایجر*: حدود ۷۰ جدایه‌ی قارچی از مجموع نمونه‌های خاک و سطح دانه‌های ذرت

جدا سازی شدند. بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، ۱۵ جدایه‌ی *آسپرژیلوس نایجر* شناسایی شدند.

بررسی کیفی و کمی تولید اسیدسیتریک توسط جدایه‌های برتر *آسپرژیلوس نایجر* والدینی و جهش یافته: ۵ جدایه

ی برتر (جدایه‌های ۱ تا ۵) به همراه سوش استاندارد ۵۰۱۰ از نظر تولید کیفی اسیدسیتریک بر اساس میزان و شدت رنگ زرد

تولید شده (مساحت هاله‌ی زرد رنگ) مشخص شدند. جدایه‌های برتر (جدایه‌های ۱ تا ۵) به همراه سوش استاندارد ۵۰۱۰ برای

ایجاد جهش، در مدت زمان‌های ۰ (شاهد بدون پرتودهی)، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰، ۱۲۰۰، ۱۵۰۰، ۱۸۰۰ و ۲۱۰۰ ثانیه با غلظت پرتو

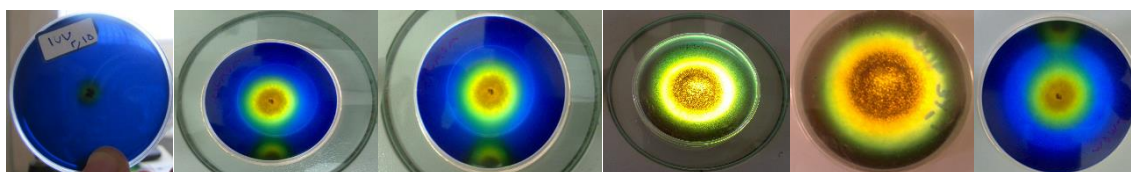
(میزان شدت انرژی دریافتی) به ترتیب ۰، $۸/۹۷ \times 10^{-۶}$ ، $۱/۷۹ \times 10^{-۵}$ ، $۲/۶۹ \times 10^{-۵}$ ، $۳/۵۹ \times 10^{-۵}$ ، $۴/۴۹ \times 10^{-۵}$ ، $۵/۳۸ \times 10^{-۵}$ و

$۶/۲۸ \times 10^{-۵}$ J/m² در فاصله‌ی ۳۰ سانتی متری از منبع نور تحت نوردهی با اشعه UV قرار گرفتند (جدایه‌های ۱uv تا ۵uv و

۵۰۱۰uv) (جدول ۱ و شکل ۱). جدایه‌ی ۵ جهش یافته با میزان پرتودهی ۱۲۰۰ ثانیه از نظر کیفی میزان تولید اسید بالاتری

را از خود نشان داد. سوبه‌ی استاندارد ۵۰۱۰ نیز افزایش میزان تولید اسید را با افزایش زمان پرتودهی تا ۱۲۰۰ ثانیه تایید کرد.

میزان تولید اسیدسیتریک در سایر جدایه‌های برتر نیز با افزایش زمان پرتودهی تا ۱۲۰۰ ثانیه، افزایش نشان داد.



شکل ۱: مقایسه‌ی کیفی تولید اسیدسیتریک توسط *آسپرژیلوس نایجر* بر روی محیط CDA شش روز کشت جدایه‌ی ۵ در

زمان پرتودهی با اشعه UV. راست به چپ: زمان صفر (شاهد)، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰، ۱۲۰۰ و ۱۵۰۰ ثانیه

جدول ۱: مقایسه‌ی کیفی تولید اسیدسیتریک در محیط CDA شش روز کشت جدایه‌های برتر و در زمان‌های پرتودهی با اشعه UV

(ثانیه)

۲۱۰۰	۱۸۰۰	۱۵۰۰	۱۲۰۰	۹۰۰	۶۰۰	۳۰۰	بعد از جهش	۰	قبل از جهش
-	-	+	++	++	++	+	جدایه ۱uv	+	جدایه ۱
-	-	+	++	+	+	+	جدایه ۲uv	+	جدایه ۲
-	-	++	+++	++	++	+	جدایه ۳uv	+	جدایه ۳
-	-	+	++	++	++	+	جدایه ۴uv	+	جدایه ۴
-	+	++	+++	+++	+++	++	جدایه ۵uv	++	جدایه ۵
-	-	+	+++	+++	++	++	سوبه ۵۰۱۰uv (شاهد)	++	سوبه ۵۰۱۰ (شاهد)

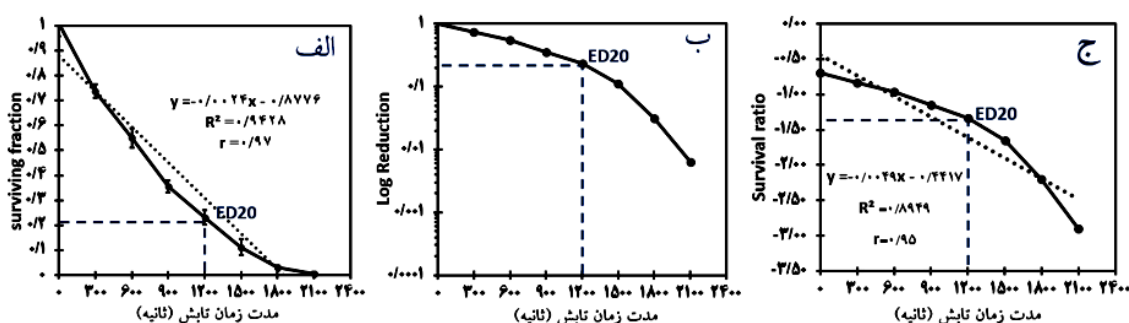
UV جدایه‌ی پرتو دیده دیده، - عدم تشکیل هاله‌ی زرد (عدم تولید اسید)، + هاله با مساحت کم، ++ هاله با مساحت متوسط، +++ هاله با مساحت

زیاد، ++++ هاله با مساحت زیادتر (تولید اسید بیشتر)

تعیین زمان مناسب القاء جهش با اشعه UV: پس از رسم نمودار بقاء اسپور بر اساس زمان پرتودهی (میزان غلظت پرتودهی

یا میزان انرژی دریافت شده توسط اسپور) (شکل ۲)، زمان بقاء ۱۲۰۰ ثانیه به عنوان بهترین زمان انتخاب شد. جدایه‌های جهش

یافته (پرتو دیده) نسبت به جدایه‌های والدینی از نظر کیفی توانایی تولید اسید بالاتری را نشان دادند. سویه ۵۰۱۰ (شاهد) بعد از جهش نیز توانایی تولید اسیدسیتریک بیشتری را نشان داد. از بین جدایه‌های برتر، جدایه ۵uv (پرتو دیده)، نسبت به جدایه‌های والدینی توانایی تولید اسیدسیتریک بالاتری را داشت. با افزایش میزان غلظت پرتودهی تا ۱۲۰۰ ثانیه (با غلظت پرتو ۵⁻ × ۱۰^۳ / m² J) میزان تولید اسیدسیتریک به‌طور فزاینده افزایش یافت. با افزایش میزان غلظت پرتودهی تا ۲۱۰۰ ثانیه معادل ۱۰^{-۵} × ۶ / ۲۸ J/m² مجدداً میزان تولید اسید به شدت کاهش نشان داد. این امر به دلیل کاهش توده‌ی زیستی و به دلیل کاهش بقاء اسپور بعد از افزایش غلظت پرتودهی در ۱۸۰۰ و ۲۱۰۰ ثانیه است. میزان حساسیت اسپور به غلظت پرتودهی بر حسب مدت زمان تابش (میزان انرژی دریافت شده) ضریب x، با مقدار ثابت $k = 0.049 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ به‌دست آمد (شکل ۲ ج).



شکل ۲: منحنی‌های بقاء اسپور جدایه‌ی ۵uv، الف: منحنی کسر بقاء، ب: Log کاهش بقاء، ج: نسبت بقاء اسپور بر اساس زمان پرتودهی

در بررسی کمی میزان تولید اسیدسیتریک در محیط کشت شش روزه، ابتدا یکنواختی واریانس بین جدایه‌های والدینی و جهش یافته با سویه استاندارد (۵۰۱۰) و پرتودهی با زمان ۱۲۰۰ ثانیه (با توجه به بهترین نتایج کیفی) مورد بررسی قرار گرفت. پس از مشخص شدن یکنواختی واریانس بین گروه‌های مورد مطالعه، تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه به‌منظور مقایسه‌ی میانگین تولید اسیدسیتریک بین جدایه‌های برتر والدینی و جهش یافته (پرتودهی شده با زمان ۱۲۰۰ ثانیه) با سوش استاندارد ۵۰۱۰ انجام شد. براساس این آزمون مشخص شد که بین جدایه‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌دار ($\alpha \leq 0.05$) از نظر تولید اسیدسیتریک وجود دارد (جدول ۲). براساس مقایسه‌ی میانگین به روش دانکن، جدایه‌های مورد بررسی از نظر تولید اسیدسیتریک در ۷ گروه قرار گرفتند. بیشترین مقدار تولید اسید مربوط به جدایه‌ی جهش یافته‌ی ۵uv و کمترین مقدار مربوط به جدایه‌ی ۱ و جدایه‌ی ۲ با زمان ۱۲۰۰ ثانیه پرتودهی مشاهده شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده و مقایسه‌ی میانگین‌ها (حروف a تا f) مشخص شد که سویه‌های جهش یافته توانایی تولید اسیدسیتریک بالاتری نسبت به سویه‌های والدینی کسب کرده‌اند (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه‌ی میانگین تولید اسیدسیتریک (گرم بر لیتر) توسط جدایه‌های برتر و جهش یافته (uv) با زمان پرتودهی ۱۲۰۰ ثانیه به روش دانکن ($\alpha=0/05$)

جدایه و سوش	جدایه ۱	جدایه ۲	جدایه ۳	جدایه ۴	جدایه ۵	سوش ۵۰۱۰	جدایه ۱uv	جدایه ۲uv	جدایه ۳uv	جدایه ۴uv	جدایه ۵uv	سوش ۵۰۱۰uv
میانگین	۲۵/۸۶	۲۵/۴۳	۲۹/۶۴	۲۶/۲۰	۲۷/۲۰	۲۶/۶	۴۸/۱۳	۴۵/۳۲	۴۵/۸	۴۵/۹۹	۶۷/۵۲	۴۷/۸۵
انحراف معیار	۰/۱۶	۰/۱۴	۰/۷۵	۱/۰۵	۰/۱۹	۰/۸۲	۰/۶۷	۰/۴۴	۱/۰۷	۰/۲۸	۰/۱۰	۱/۰۰
مقایسه میانگین	f	f	d	ef	e	ef	b	c	c	c	a	b

حروف مشابه نشان دهنده‌ی عدم تفاوت معنی‌دار در سطح $\alpha=0/05$ است.

مقایسه‌ی میانگین تولید اسیدسیتریک بین جدایه‌های برتر والدینی و جهش یافته با زمان ۱۲۰۰ ثانیه پرتودهی و سوش

استاندارد نشان داد که با ایجاد جهش، میانگین میزان تولید اسیدسیتریک افزایش یافته است (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه‌ی میانگین تولید اسیدسیتریک (گرم بر لیتر) توسط جدایه‌های برتر با والدینی جهش یافته در زمان ۱۲۰۰ ثانیه پرتودهی

جدایه و سوش	تولید اسیدسیتریک	کمترین تولید	بیشترین تولید
جدایه‌های برتر والدینی	۳۶/۸۷	۲۶/۲۳	۲۷/۲۱
جدایه‌های برتر جهش یافته	۵۱/۰۱	۴۵/۷۷	۴۹/۴۰
سوش ۵۰۱۰ (استاندارد)	۲۶/۰۶	۲۵/۲۷	۲۶/۹۰
سوش ۵۰۱۰ (استاندارد) جهش یافته	۴۷/۸۵	۴۶/۹۲	۴۸/۹۰

در بررسی پایداری ژنوتیپ‌های جهش یافته، میانگین تولید اسیدسیتریک جدایه‌های جهش یافته (۱uv تا ۵uv و

۵۰۱۰uv) در ۱۲۰۰ ثانیه پرتودهی و در چهارمین کشت متوالی از کشت اول (۱uv تا ۵uv و ۵۰۱۰uv) با زیست توده‌ی

یکسان در کشت اول و چهارم از نظر آماری تفاوت معنی‌دار بین هر یک از جدایه نشان نداد که این می‌تواند پایداری ژنوتیپ

های جهش یافته را توجیه کند (جدول ۴).

جدول ۴: مقایسه‌ی میانگین تولید اسیدسیتریک (گرم بر لیتر) جدایه‌های جهش یافته در کشت اول با کشت چهارم در زمان ۱۲۰۰ ثانیه پرتودهی به روش LSD ($\alpha=0/05$)

کشت اول (I)	کشت چهارم (J)	تفاوت میانگین (I-J)	سطح معنی‌داری
جدایه ۱uv	جدایه ۱uv	۰/۳۹	ns
جدایه ۲uv	جدایه ۲uv	-۰/۷۷	ns
جدایه ۳uv	جدایه ۳uv	۰/۴۹	ns
جدایه ۴uv	جدایه ۴uv	۰/۹۴	ns
جدایه ۵uv	جدایه ۵uv	-۰/۳۵	ns
جدایه ۵۰۱۰uv	جدایه ۵۰۱۰uv	۰/۸۹	ns

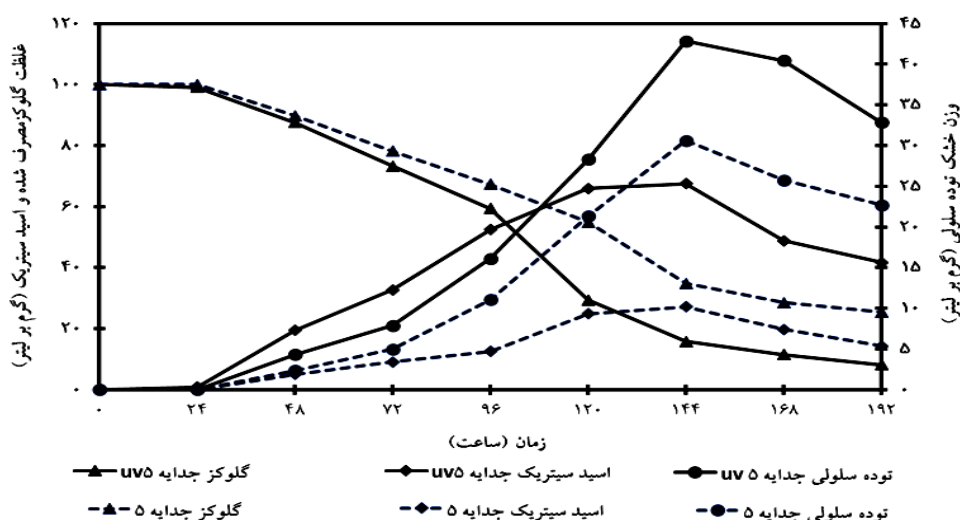
ns: معنی‌دار نبودن

در جدایی برتر بر اساس تولید اسیدسیتریک (جدایه ی ۵) و بهترین زمان پرتو دهی برای بقاء اسپورهای قارچ (۱۲۰۰ ثانیه پرتو دهی) (جدایه ی ۵uv)، توانایی و کارایی (پارامترهای کنتیکی) جدایه ی برتر جهش یافته ۵uv در مقایسه با جدایه ی والدینی (جدایه ی ۵) بهبود یافت. این بهبودی در تبدیل (تخمیر) قند گلوکز به عنوان منبع کربن به محصول (اسیدسیتریک) بر اساس مدل مونود و موزر است (جدول ۵ و شکل ۳).

جدول ۵: مقایسه ی تولید اسیدسیتریک (بهره وری) در جدایه ی برتر پرتو دیده با جدایه ی والدینی در محیط کشت FLCM با غلظت اولیه ۱۰۰ گرم بر لیتر گلوکز در روز ششم (۱۴۴ ساعت)

نمونه	P	X	S	پارامترهای کنتیکی تشکیل اسیدسیتریک				پارامترهای کنتیکی مصرف گلوکز			
				$Y_{p/x}$	Q_p	q_p	μ	$Y_{p/s}$	Q_s	q_s	
جدایه ۵	۲۷/۲۰	۳۰/۵۹	۶۵/۲۳	۰/۴۲	۰/۸۹	۰/۲۸	۰/۰۱	۰/۴۷	۰/۶۷	۰/۰۲	
جدایه ۵uv	۶۷/۵۲	۴۲/۸۴	۸۴/۲۴	۰/۸۰	۱/۵۸	۰/۷۰	۰/۰۲	۰/۵۱	۰/۸۸	۰/۰۲۱	

علائم اختصاری و کمیت ها در بخش مواد و روش ها توضیح داده شده است.
 $t_1 = 48$ ساعت، $X_1 = 2/34$ برای جدایه ۵ و $X_1 = 4/3$ برای جدایه ۵uv (بر اساس شکل ۳).



شکل ۳: مقایسه کارایی جدایه ی ۵ و ۵uv در تولید اسیدسیتریک و وزن خشک توده ی سلولی با مقدار گلوکز مصرف شده

بر اساس جدول ۵، جدایه ی جهش یافته ۵uv تقریباً ۳ برابر تولید بیشتر اسیدسیتریک نسبت به جدایه ی والدینی داشته است. مقدار قند اولیه (گلوکز) در محیط کشت (۱۰۰ گرم بر لیتر) تعیین کننده ی مقدار تولید اسیدسیتریک در محیط کشت است. مقدار تولید اسیدسیتریک در محیط کشت از روز دوم با دقت قابل اندازه گیری است. میزان تولید اسیدسیتریک در جدایه ی ۵ و ۵uv در روز ششم به بیشترین مقدار خود رسیده است. اما سرعت افزایش تولید اسیدسیتریک در جدایه ی پرتو دیده از روز سوم (بعد از ۷۲ ساعت) به شدت افزایش نشان داده است. پارامترهای کنتیکی تشکیل اسیدسیتریک (محصول) در جدایه ی ۵uv (جهش یافته) تقریباً دو برابر جدایه ی والدینی ۵ است در حالی که پارامترهای کنتیکی مصرف گلوکز (سوبسترا) در جدایه ی پرتو دیده ۵uv و والدینی آن (جدایه ی ۵) تقریباً مساوی است. این نتایج نشان دادند که جهش در این جدایه باعث افزایش

کارایی جدایه‌ی پرتو دیده دیده‌ی ۵uv نسب به جدایه‌ی والدینی خود در تبدیل گلوکز به اسیدسیتریک شده است (جدول ۵ و شکل ۳). ضمناً با توجه به این نکته که وزن خشک توده‌ی سلولی در جدایه ۵uv و جدایه‌ی والدینی ۵ با شیب تقریباً یکسان افزایش یافته است ولی در اثر جهش، وزن توده‌ی سلولی در جدایه‌ی پرتو دیده‌ی ۵uv در محدوده‌ی زمانی یکسان، افزایش معنی دار نشان داده است (شکل ۳).

بحث

روش‌های متعددی برای تولید اسیدسیتریک با استفاده از منابع مختلف وجود دارد. تولید اسید با استفاده از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و منبع گلوکز و روش تخمیر غوطه‌ور، بهترین و اقتصادی‌ترین روش می‌باشد و پژوهشگران متعددی سعی کردند تا با ایجاد شرایط مختلف به بالاترین بازده تولید برسند (Alvarez-Vasquez *et al.*, 2000; Sankpal *et al.*, 2001). تولید اسیدسیتریک از *آسپرژیلوس نایجر* دارای مزایای دیگری نسبت به استفاده از گونه‌های دیگر قارچی است. زیرا که این قارچ به آسانی از منابع مختلف همچون خاک، آب و هوا به دست می‌آید. این قارچ توانایی تخمیر، تولید طیف وسیع، فراوان و ارزان قیمت از ترکیبات حاوی مواد قندی و همچنین عملکرد تولید بالای ۷۰٪ اسیدسیتریک را به عنوان یک میکروارگانیسم امن در صنایع مختلف دارد.

ایجاد جهش‌های تصادفی توسط اشعه UV در قارچ‌ها بستگی به میزان حساسیت اسپور در مدت زمان در معرض اشعه UV یا مقدار انرژی دریافت شده در زمان پرتو دهی دارد. حساسیت اسپور قارچ *آسپرژیلوس نایجر* مرتبط با مقدار ثابت k (s^{-1}) یا ثابت $(Survival\ ratio = n_t/n_0 = \exp(-kt))$ یا ثابت سرعت غیر فعال شدن (ضریب x) که برای جدایه‌ی ۵uv برابر با ۰/۰۰۴۹ به دست آمد (شکل ۲)، نشان دهنده‌ی میزان حساسیت پایین اسپور قارچ در مقابل زمان پرتو دهی است. به طوری که هر چه مقدار k کمتر باشد، نشان دهنده‌ی مقاومت اسپور قارچ در مقابل میزان غلظت پرتو دهی می‌باشد. بنابراین زمان ۱۲۰۰ ثانیه که معادل انرژی $۳/۵۹ \times 10^{-5}$ ژول بر متر مربع است به عنوان زمان مناسب برای پرتو دهی انتخاب شد در حالی که اسپور قارچ توان تولید مثل و بقاء خود را نیز حفظ کرده است (شکل ۲). بنابراین مقدار k بسته به گونه و حتی سویه‌ی میکروبی متغیر است.

مقدار k در تحقیقات، برای *آلترناریا آلترناتا*، *آسپرژیلوس کربوناریوس*، *آسپرژیلوس نایجر*، *کلادوسپوریوم هرباروم*، *پنی سیلیوم جانتیلیوم* و *کاندیدا آلبیکانس* به ترتیب ۰/۰۲۵۱، ۰/۰۳۴، ۰/۰۱۲۳، ۰/۱۱۲، ۰/۱۸۲ و ۰/۱۱ گزارش شده است (Farrell *et al.*, 2009; Valero *et al.*, 2007).

ایجاد جهش توسط اشعه‌ی UV، به منظور دستیابی به بازده بالای تولید اسیدسیتریک، یک راهبرد موثر برای ایجاد سویه‌های میکروبی با کارایی بالا است (Gupta & Sharma, 1995; Wei *et al.*, 2014). در این مطالعه، بعد از پرتو دهی، گسترش ریشه‌ها کاهش و میزان تولید اسیدسیتریک افزایش معنی دار نشان داد؛ به طوری که میانگین تولید اسید توسط جدایه‌های جهش یافته، ۳۴/۲۶ درصد نسبت به جدایه‌های والدینی افزایش تولید

اسیدسیتريک را نشان داد (جدول ۳ و شکل ۱). تاثير جهش بر افزايش بازده توليد اسيدسيتريک نيز توسط لطفی و همکاران در سال ۲۰۰۷ تا ۶۰/۲۵ درصد گزارش شده است (Lotfy et al., 2007).

از عوامل موثر بر توليد اسيدسيتريک مدت زمان رشد قارچ می باشد. در بررسی های انجام گرفته مشخص شده است که میزان توليد اسيدسيتريک تا روز ششم سير صعودی داشته و از روز هفتم به بعد میزان توليد اسيدسيتريک روند ثابتی را نشان می دهد و سپس کاهش می یابد. علت ثابت ماندن و یا کاهش توليد اسيدسيتريک، در بررسی های انجام شده توسط محققين، کاهش و یا تمام شدن قند مصرفی در محیط کشت بیان شده است (Ikram-ul et al., 2004; Shetty, 2015).

از آنجایی که جهش باعث تغيير رفتار فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می شود، بنابراین بر تمامی شرایط تخمیر و تشکیل متابولیتها تاثير می گذارد. عوامل جهش را با ایجاد تغییرات در ساختمان DNA (جهش دگر قالب) باعث جهش های دائمی می شوند. میزان توليد اسيدسيتريک نسبت به زمان، دارای یک حداکثر است؛ با عبور از نقطه حداکثر، رشد و اسپورزایی شدید توسط قارچ سبب توقف رشد می شود و در نتیجه توليد اسيد پایين می آید. افزايش تعداد اسپور قارچ فرآیند تخمیر را به سمت انبوه شدن سلول و مصرف قند را به نفع توليد توده زیستی سوق می دهد، این امر باعث کاهش توليد محصول و در نتیجه کاهش بهره وری می شود. در این مطالعه مشخص شد که جهش باعث ثابت ماندن پارامترهای مصرف گلوکز و به دنبال آن باعث افزايش پارامترهای توليد اسيدسيتريک در جدایه ی جهش یافته شده است.

نتیجه گیری

در این بررسی سعی شد که توانایی جدایه های بومی *آسپرژیلوس نایجر*، با ایجاد جهش های تصادفی با استفاده از اشعه UV در افزايش توليد اسيدسيتريک، به همراه توجه به بهبود و افزايش کارایی دو مؤلفه ی کمی عملکرد و بهره وری، مورد توجه قرار گیرد. بررسی کمی فرآیندهای سلولی، ابزار حیاتی در طراحی فرآیندهای تخمیر است. دو مؤلفه ی عملکرد و بهره وری، از مهمترین مؤلفه های کمی هستند که چگونگی تبدیل پیش ساز به محصول را تعیین می نمایند. از آنجایی که اسيدسيتريک یک واسطه متابولیسم در توليد انرژی است، در یک جدایه ی جهش یافته ی ژنتیکی (پایدار) مانند جدایه ی ۵UV، ممکن است تجمع اسيدسيتريک از طریق تشکیل زیست توده، به دلیل ایجاد عدم تعادل متابولیکی انجام شود. علت احتمالی این است که سطوح پایین فعالیت آنزیم آکونیتاز در چنین سلول های جهش یافته، منجر به کاهش غیر طبیعی میزان مصرف سیترات شود. با توجه به بررسی انجام شده در خصوص پارامترهای کنتیکی مصرف گلوکز (به عنوان سوبسترا) و توليد اسيدسيتريک (به عنوان محصول) جهش های تصادفی پایدار، توانایی افزايش کارایی تبدیل سوبسترا به محصول را در این جدایه ی *آسپرژیلوس نایجر* (جدایه ۵) ایجاد کرده است.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان انجام شده است.

منابع

- Alvarez-Vasquez, F., González-Alcón, C., & Torres, N. V. (2000). Metabolism of citric acid production by *Aspergillus niger*: Model definition, steady-state analysis and constrained optimization of citric acid production rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(1), 82-108. doi:10.1002/1097-0290(20001005)70:1<82::AID-BIT10>3.0.CO;2-V
- Ardestani, F., & Kasebkar, R. (2014). Non-Structured Kinetic Model of *Aspergillus niger* Growth and Substrate Uptake in a Batch Submerged Culture. *British Biotechnology Journal*, 4(9), 970-979. doi:10.9734/bbj/2014/11472
- Farrell, H., Garvey, M., & Rowan, N. (2009). Studies on the inactivation of medically important *Candida* species on agar surfaces using pulsed light. *FEMS yeast research*, 9(6), 956-966. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00543.x
- Gonçalves, C., Rodriguez-Jasso, R. M., Gomes, N., Teixeira, J. A., & Belo, I. (2010). Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, 2(12), 2046-2048. doi:10.1039/c0ay00525h
- Guchi, E., Ayalew, A., Dejene, M., Ketema, M., Asalf, B., & Fininsa, C. (2014). Occurrence of *Aspergillus* Species in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) along the Value Chain in Different Agro-Ecological Zones of Eastern Ethiopia. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 2(6), 309-317. doi:10.12691/jaem-2-6-7
- Gupta, S., & Sharma, C. B. (1995). Citric acid fermentation by the mutant strain of the *Aspergillus niger* resistant to manganese ions inhibition. *Biotechnology Letters*, 17(3), 269-274. doi:10.1007/BF01190635
- Ikram-ul, H., Ali, S., Qadeer, M., & Iqbal, J. (2004). Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. *Bioresource Technology*, 93(2), 125-130. doi:10.1016/j.biortech.2003.10.018
- Joiner, M. C. (2009). Quantifying cell kill and cell survival. In *Basic clinical radiobiology* (Vol. 4, pp. 41-55): Taylor and Francis.
- Khurshid, S., Ali, S., Ashraf, H., Qadeer, M., & Rajoka, M. I. (2001). Mutation of *Aspergillus niger* for hyperproduction of citric acid from black strap molasses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 35-37. doi:10.1023/A:1016625130070
- Lotfy, W. A., Ghanem, K. M., & El-Helow, E. R. (2007). Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. *Bioresource Technology*, 98(18), 3464-3469. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.007
- Marier, J., & Boulet, M. (1956). Direct determination of citric acid in milk by an improved pyridine acetic anhydride method. *J Dairy Sci*, 41, 1683-1692.
- Matsuya, Y., Tsutsumi, K., Sasaki, K., & Date, H. (2015). Evaluation of the cell survival curve under radiation exposure based on the kinetics of lesions in relation to dose-delivery time. *Journal of Radiation Research*, 56(1), 90-99. doi:10.1093/jrr/rru090
- Najafpour, G. (2015). Growth Kinetics. In *Biochemical Engineering and Biotechnology* (pp. 81-169): Elsevier.
- Nielsen, J., Villadsen, J., & Lidén, G. (2003). Modeling of Growth Kinetics. In *Bioreaction Engineering Principles: Second Edition* (pp. 235-314). Boston, MA: Springer US.

- Nyongesa, B. W., Okoth, S., & Ayugi, V. (2015). Identification key for *Aspergillus* Species isolated from Maize and Soil of Nandi County, Kenya. *Advances in Microbiology*, 05(04), 205-229. doi:10.4236/aim.2015.54020
- Panikov, N. S. (2014). Kinetics, microbial growth. In *Encyclopedia of Bioprocess Technology* (Vol. 1-5). Wiley.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519): Springer.
- Rattanakul, S., & Oguma, K. (2018). Inactivation kinetics and efficiencies of UV-LEDs against *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, and surrogate microorganisms. *Water research*, 130(2018), 31-37. doi:10.1016/j.watres.2017.11.047
- Rodrigues, C., Vandenberghe, L. P., Teodoro, J., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2009). Improvement on citric acid production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* LPB BC mutant using citric pulp. *Applied biochemistry and biotechnology*, 158(1), 72-87. doi:10.1007/s12010-008-8370-5
- Sankpal, N., Joshi, A., & Kulkarni, B. (2001). Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils: influence of morphology and fermenter conditions on productivity. *Process Biochemistry*, 36(11), 1129-1139. doi:10.1016/S0032-9592(01)00155-8
- Shetty, V. (2015). Production and optimization of citric acid by *Aspergillus niger* using molasses and corncob. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(5), 152-157.
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., & Pandey, A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 141-149.
- Valero, A., Begum, M., Leong, S., Hocking, A., Ramos, A., Sanchis, V., & Marin, S. (2007). Effect of germicidal UVC light on fungi isolated from grapes and raisins. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), 238-243. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02175.x
- Wei, H., Jihong, C., Wenjian, L., Jing, L., Shuyang, W., Juofang, W., & Dong, L. (2014). Mutant breeding of *Aspergillus niger* irradiated by 12C6+ for hyper citric acid. *Nuclear Science and Techniques*, 25(2), 20302-020302. doi:10.13538/j.1001-8042/nst.25.020302
- Zulkifli, N. A., & Zakaria, L. (2017). Morphological and molecular diversity of *Aspergillus* from corn grain used as livestock feed. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(1), 26-34. doi:10.1016/j.hjb.2017.05.002

Investigation of increase of Citric acid produced by *Aspergillus niger* native mutant strains

S.M.R.Khoshroo^{1*}

Received:2018.10.16

Accepted:2019.12.7

Abstract

Aspergillus niger was isolated from the soil and surface of corn seeds purified and identified according to morphological characteristics. The irradiation rate was calculated based on the duration of UV radiation in Jules per square meter. The specific method of Marier and Boulet was used to quantitatively measure the production of Citric acid. Radiation with 1200 seconds showed the greatest effect on the increase of production of Citric acid. The mean production of Citric acid in the preferable mutated isolates and parents cultures were 51.01 and 37.87 mg/l respectively, which increased by 14.14 g/l. In the study of the stability of mutated genotypes, the mean production of Citric acid with 1200 seconds of radiation in the fourth consecutive culture of the first culture was not statistically significant. The performance and efficiency of mutated isolates (5uv) showed an increase in the production of Citric acid by about 3 times compared to parent isolates. In isolation of 5uv and its parents, the kinetic parameters of product formation (Citric acid) were twice as much and the kinetic parameters of the substrate (glucose consumption) were approximately equal compared to parent isolates, while the dry weight of cell mass in the isolate 5uv increased relatively to the parental isolate 5 with the same gradient. In this study, it was found that random mutations with UV radiation have improved the kinetic parameters of the production of Citric acid versus glucose consumption as a substrate.

Key words: *Aspergillus niger*, Citric acid, Mutation, UV radiation.