ارزیابی و مقایسه فرایند تخمیری تولید اسید لاکتیک توسط پنج سویه مختلف لاکتوباسیلوس در کشت غوطه‌ور ناپیوسته بر روی محیط آب‌پنیر

فضل الله رضوانی[1]، فاطمه اردستانی*[2]، قاسم نجف پور[3]

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی شیمی ، گروه مهندسی شیمی، واحد شاهرود،دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران

[2] استادیار گروه مهندسی شیمی، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران

[3] استاد دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی، بابل، ایران

چکیده

این پژوهش با هدف شناسایی بهترین سویه تولیدکننده اسید لاکتیک از میان سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس متداول در تولید اسید لاکتیک انجام گرفت. پنج سویه لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس لاکتیس، لاکتوباسیلوس دلبروکی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم مورد بررسی قرار گرفت. فرایند تخمیری تولید اسید لاکتیک در کشت غوطه‌ور ناپیوسته بر روی محیط آب‌پنیر به عنوان سوبسترای اصلی در شیکر انکوباتور انجام شد. روند تولید اسید لاکتیک و توده سلولی و مصرف لاکتوز در فرایند تولید در طی زمان ۵۰ ساعت اندازه‌گیری گردید. لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در محیط کشت حاوی ۵۰ گرم بر لیتر لاکتوز، با تولید ۲۶/۶ گرم بر لیتر اسید لاکتیک، بازده تولید ۰/۶۰۲ گرم اسید لاکتیک به گرم لاکتوز و بهره دهی معادل با ۰/۵۱۱ گرم اسید لاکتیک در لیتر در ساعت به عنوان بهترین سویه تولیدکننده اسید لاکتیک در بین سویه‌های مورد بررسی شناسایی شد. پس از آن، لاکتوباسیلوس کازئی نیز با تولید ۲۴/۱ گرم بر لیتر اسید لاکتیک، بازده ۰/۵۸۶ گرم اسید لاکتیک به گرم لاکتوز و بهره‌دهی ۰/۵۰۴ گرم اسید لاکتیک در لیتر در ساعت و بدون وجود تفاوت معنی‌داری با لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، در رتبه دوم قرار گرفت. سویه‌های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس کازئی با تولید مقادیر مناسب اسید لاکتیک، برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی مناسب تشخیص داده شدند.

واژه های کلیدی: آب‌پنیر، اسید لاکتیک، کشت غوطه‌ور ناپیوسته، لاکتوباسیلوس

*مسوول مکاتبات: ardestani_fatemeh@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

در دنیای صنعتی امروز، کارخانجات پنیرسازی هر روز مقادیر قابل توجهی آب‌پنیر را به سیستم فاضلاب وارد نموده و مشکلات زیست‌محیطی متعددی را به وجود می‌آورند. بررسی‌ها نشان داده که آب‌پنیر دارای بار آلی قابل ملاحظه‌ای از آلاینده‌های زیست-محیطی می‌باشد. به طوری که لازم است شاخص تقاضای اکسیژن بیولوژیکی (BOD) آن تا حد ۱۰۰ برابر کاهش یابد. بنابراین ارائه روش‌هایی برای استفاده از آب‌پنیر به عنوان خوراکی برای میکروارگانیسم‌های تولید کننده‌ی محصولات با ارزش افزوده بالا، علاوه بر ایجاد مزیت‌های اقتصادی، در جهت حفظ محیط زیست سالم نیز کارساز و ارزشمند می‌باشد (۲ و ۴). آب‌پنیر به طور متوسط دارای ۴ درصد لاکتوز می‌باشد که سوبسترای مناسبی در فرایند تولید اسید لاکتیک به شمار می‌رود. اسید لاکتیک (۲- هیدروکسی پروپیونیک اسید) با فرمول $CH_3CHOHCOOH$ یک اسید آلی هیدروکسیل دار ضعیف با وزن مولکولی کم و PK_a= ۳/۸۶ در ۲۵ درجه سانتی گراد است. اسیدلاکتیک برای اولین بار توسط یک شیمی‌دان سوئدی در سال ۱۷۸۰ از شیر جدا شد. سپس، لویی پاستور به بررسی روند تخمیر آن پرداخت و با جداسازی انواع باکتری‌های خانواده لاکتیک اسید، از آن‌ها در تهیه غذاهای تخمیری از شیر، سبزیجات، غلات و گوشت استفاده کرد. او نشان داد که این اسید قابلیت محافظت از مواد غذایی در برابر فساد میکروبی را دارد (۱۰ و ۱۶). اسید لاکتیک، دارای فعالیت نوری است و دو ایزومر L(+) و D(-) آن شناخته شده است. به دلیل عدم سنتز آنزیم D لاکتات دهیدروژناز در بدن انسان، مصرف زیاد اسیدلاکتیک D(-) و تجمع آن در بدن می‌تواند مخاطراتی را برای سلامتی انسان به همراه داشته باشد. بنابراین، وجود اسیدلاکتیک D(-) در فرآورده‌های غذایی و دارویی، چندان مناسب نیست و سازمان بهداشت جهانی برای مصرف آن محدودیت قائل شده است (۱۱).

موارد استفاده اسیدلاکتیک را می‌توان به دو دسته کاربرد اسیدلاکتیک و مشتقات اصلی آن طبقه‌بندی کرد که به طور عمده به صنایع غذایی، دارویی و شیمیایی مربوط می‌شود. در صنایع غذایی از اسیدلاکتیک در تولید پنیر، ماست ، خیارشور ، اسانس‌ها ، شربت آبلیمو، استخراج آبمیوه‌ها و سایر فرآورده‌های غذایی و همچنین جلوگیری از فساد میکروبی غذاهای کنسرو شده و به عنوان افزودنی طبیعی به منظور ایجاد طعم و مزه در غذاها استفاده می‌شود (۱۲). جدیدترین کاربرد اسیدلاکتیک در ارتباط با تهیه پلیمرهای زیست تجزیه پذیر و از جمله پلی‌لاکتیک اسیدها است. این پلیمر طبیعی جایگزین بسیار مناسبی برای پلیمرهای نفتی (پلاستیک ها) در تهیه مواد مورد استفاده در بسته-بندی فراورده های غذایی می‌باشد که مهم ترین مزیت آن زیست تخریب پذیر بودن آن می‌باشد. از پلی لاکتیک اسید همچنین در ساخت ابزار آلات پزشکی نظیر نخ بخیه، مواد مورد استفاده در پیوند اعضا، داروهای با رهایش کنترل شونده و آهسته نیز استفاده می‌شود (۵).

اسید لاکتیک را می‌توان در فرایندهای تخمیر میکروبی با استفاده از باکتری‌های هموفرمانتیو تولید نمود. انواع لاکتوباسیلوس‌ها نظیر هلویتیکوس، بولگاریکوس، دلبروکی، لیچمانی، لیکنی فورمیس، کورینی فورمیس، کازئی، مانی هوتیورانس، رامنوسوس، لاکتیس و باکتری‌های ریزوپوس اوریزا، استرپتوکوکوس ترموفیلوس، لاکتوکوکوس لاکتیس، لاکتوکوکوس سرموریس را می‌توان نام برد (۲۰). سوبسترای مورد استفاده در این فرایند عموما از پسماندهای مواد غذایی (آب‌پنیر، تفاله میوه‌ها، ملاس چغندرقند، ضایعات قهوه و ...)، فاضلاب‌های صنعتی (پساب سولفیتی کارخانجات کاغذ سازی و گازهای سوختی) و ضایعات سلولزی (مثل کاه حاصل از جو و ضایعات کاغذی) تامین می‌شود .تخمیرهای صنعتی به صورت ناپیوسته، نیمه پیوسته و پیوسته انجام می‌شود. اکثر تخمیرها به صورت ناپیوسته بوده و پس از تلقیح، به جز اضافه کردن اسید یا قلیا برای کنترل پ‌هاش، نیاز به اضافه کردن ماده دیگری نیست. در صنایع تخمیری استفاده از گونه‌های متنوع لاکتوباسیلوس به دلیل میزان بالای تبدیل، بازدهی و نرخ متابولیسم بر ارگانیسم‌های دیگر ترجیح داده می‌شوند (۱۹).

در رابطه با تولید تخمیری اسید لاکتیک تحقیقات متعددی صورت گرفته است. به عنوان نمونه می‌توان به تحقیقات ذبیحی و اردستانی در سال ۱۳۹۳ در بهینه‌سازی فرایند تولید تخمیری اسید لاکتیک از باکتری لاکتوباسیلوس کازئی بر روی سوبسترای آب‌پنیر با روش آماری کسری از فاکتوریل کامل اشاره نمود. نتایج این تحقیق نشان داد که در شرایط بهینه برای دستیابی به بهترین بازده تولید اسید لاکتیک می‌بایست میزان مایه تلقیح ۸٪، غلظت سولفات منیزیم ۰/۲۵ گرم در لیتر، غلظت گلوکز ۲۵ گرم در لیتر و غلظت سولفات منگنز ۰/۰۵ گرم در لیتر را در دمای ۳۷

Archive of SID

www.SID.ir

درجه سانتی‌گراد و سرعت همزدن ۱۷۰ دور در دقیقه برقرار نمود. در این شرایط بهینه انتظار می‌رود تولید اسید لاکتیک به ۲۳/۰۳۸ گرم در لیتر برسد (۱). همچنین سرنا و رودریگز در سال ۲۰۰۶ بهره‌دهی فرایند تولید اسید لاکتیک را با استفاده از لاکتوباسیلوس لاکتیس و مقدار ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز و پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان تخمیر، ۰/۲۹ گرم بر لیتر در ساعت گزارش کردند. در این مطالعه، مقدار کمتر سوبسترا (گلوکز کمتر از ۱۰ گرم بر لیتر) و زمان تخمیر کوتاه (کمتر از ۴۰ ساعت) منجر به دستیابی به بهره‌دهی بالاتر در تولید اسید لاکتیک شد (۱۷). پراچمون و همکارانش در سال ۲۰۰۸ اثر عصاره نیشکر به عنوان سوبسترا برای تولید اسیدلاکتیک را مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها پنج سویه از باکتری‌های اسید لاکتیک را در فلاسک‌های استاتیک با منابع کربن متفاوت مانند گلوکز، ساکاروز و عصاره نیشکر کشت دادند. نتایج نشان داد زمانی که از گلوکز یا ساکاروز به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود، در غلظت اسید لاکتیک تولید شده تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود ندارد. اسید لاکتیک با غلظت ۲۰/۶۳-۱۸/۱۹ و ۲۰/۲۷-۱۷/۷۸ گرم بر لیتر و بهره‌دهی ۰/۷۷-۰/۷۱ و ۰/۷۰-۰/۶۶ گرم بر لیتر بر ساعت به ترتیب با سوبستراهای گلوکز و ساکاروز به دست آمد. سویه لاکتوباسیلوس سالیواریس نامناسب‌ترین سویه در تولید اسید لاکتیک بود. هنگام استفاده از عصاره نیشکر به عنوان سوبسترا، به استثنای سویه لاکتوباسیلوس سالیواریس در سایر سویه‌ها غلظت اسید لاکتیک به ۱۰/۰۳-۵/۵۶ گرم بر لیتر و بهره‌دهی به ۰/۳۴-۰/۱۹ گرم بر لیتر بر ساعت کاهش می‌یابد (۱۳). روکاس و کوتزکیدو تولید اسید لاکتیک از آب‌پنیر در یک کشت ترکیبی از لاکتوکوکوس لاکتیس و لاکتوباسیلوس کازئی را مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها دو سیستم تخمیر غیر مداوم و نیمه مداوم را مورد بررسی قرار دادند و محصول‌دهی دو سیستم را با هم مقایسه کردند (۱۵). شیلادوی و همکارانش در سال ۲۰۱۱، تولید اسید لاکتیک با استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک تحت شرایط بهینه را مورد بررسی قرار دادند. پنج باکتری اسید لاکتیک از سویه‌های لاکتوباسیلوس، استرپتوکوکوس و پدیوکوکوس از شیر، کشک، پنیر و سرکه جداسازی شده و برای تولید تخمیری اسید لاکتیک استفاده شدند. این باکتری‌ها شامل لاکتوباسیلوس کازئی، استرپتوکوکوس لاکتیس، لاکتوباسیلوس دلبروکی، لاکتوباسیلوس پلانترام و پدیوکوکوس سروزیا بودند. این مطالعه نشان داد که برای هر پنج سویه مذکور، گلوکز نسبت به فروکتوز، ساکارز، لاکتوز و نشاسته سوبسترای بهتری بوده است و بیشینه رشد باکتری‌ها در غلظت ۱۵ درصد گلوکز مشاهده گردید. اثرات دما، پ‌هاش و ترکیب محیط کشت در تولید اسید لاکتیک توسط لاکتوباسیلوس کازئی نیز بررسی شد. بالاترین مقدار بهره-دهی تولید اسیدلاکتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پ‌هاش ۵/۵ به دست آمد (۱۸). کوک و همکارانش گزارش کردند که تولید اسید لاکتیک در سطح ۱۰ درصد مایه تلقیح، افزایش یافت. نتایج نشان داد که با استفاده از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس با استفاده از مقدار ۶۰ گرم بر لیتر گلوکز، مقدار ۵۴گرم بر لیتر اسید لاکتیک تولید شد. همچنین در مطالعه حاضر نتایج مشابهی درمورد رشد ۵ ایزوله یعنی لاکتوباسیلوس کازئی، استرپتوکوکوس لاکتیس، لاکتوباسیلوس دلبروکی، لاکتوباسیلوس پلانترام و پدیوکوکوس سروزیا به دست آمد به این ترتیب که مقدار رشد در سطح ۱۰ درصد از مایه تلقیح بالاتر از مقادیر ۳، ۵ و ۱۲ درصد مایه تلقیح بود (۶). کادام و همکارانش گزارش کردند که بیشترین غلظت اسید لاکتیک (۱۳۵ گرم بر لیتر) در فرآیند غیر مداوم تخمیر با استفاده از لاکتوباسیلوس دلبروکی به دست آمد که سوبسترای مورد استفاده عصاره نیشکر با غلظت ۱۵۰ گرم بر لیتر بوده و بازدهی تولید اسید لاکتیک، ۹۰ درصد بود (۹).

در تحقیق حاضر، فرایند تولید تخمیری اسید لاکتیک با استفاده از چند سویه باکتریایی شامل لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس دلبروکی، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، لاکتوباسیلوس دلبروکی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم در کشت غوطه‌ور ناپیوسته بر روی آب-پنیر غنی‌شده ارزیابی و مقایسه شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱-آماده‌سازی مایه تلقیح

در این پژوهش از سویه‌های زیر که از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شده استفاده گردید.

Lactobacillus casei subsp. casei PTCC1608
Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii PTCC1333
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus PTCC1737
Lactobacillus fermentum PTCC1744

Archive of SID

www.SID.ir

Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis PTCC 1743 سویه ها به صورت آمپول‌های لیوفیلیزه دریافت شد. سپس محتویات هر آمپول به طور جداگانه در شرایط کاملا استریل بر روی محیط مایع MRS کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند (۳).

۲-۲-آماده‌سازی آب‌پنیر به عنوان محیط کشت

آب‌پنیر مورد استفاده در این مطالعه از کارخانه پنیرسازی صالح در شهرستان آمل تهیه گردید. این آب‌پنیر دارای pH بین ۳/۵ الی ۴ بود. آب‌پنیر، حاوی مقادیر زیادی پروتئین می‌باشد که در هنگام استریل کردن، دناتوره شده و رسوب می‌کند. رسوب حاصله بر روی الکترود pH سنج فرمنتور نشسته و باعث گرفتگی الکترود مذکور و ایجاد اختلال در کنترل pH می‌شود. بنابراین لازم است تا قبل از فرایند تخمیر، پروتئین‌گیری از آب‌پنیر انجام شود. آب‌پنیر پروتئین‌گیری شده از نظر مواد غذایی ضعیف بوده و برای رشد لاکتوباسیلوس‌ها مناسب نمی‌باشد. بنابراین می بایست یک سری مواد و منابع غذایی دیگر به آن افزوده گردد (۱).
لاکتوز به عنوان منبع اصلی کربن مورد استفاده برای لاکتوباسیلوس‌ها تا غلظت ۵۰ گرم در لیتر به آب‌پنیر اضافه شد. سایر ترکیبات مغذی افزوده شده به آب پنیر عبارت از (بر حسب گرم در لیتر): عصاره مخمر ۱۰، استات سدیم ۵، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۲، سولفات منیزیم ۰/۲، سولفات منگنز ۰/۰۵، سولفات آهن ۰/۰۳، پپتون ۱۰ و تووین ۸۰ به مقدار ۱ گرم در لیتر بود. pH محیط کشت نیز در حدود ۶/۵ تنظیم شد (۸).

۲-۳-آماده‌سازی محیط کشت

جهت آماده‌سازی محیط کشت، مقدار مشخص از مواد مورد نظر با نسبت‌های معین در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتری ترکیب شده و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. البته محلول لاکتوز و آب‌پنیر به طور جداگانه آماده شدند. زیرا در فرایند استریل کردن در اتوکلاو، موجود ترکیباتی مانند عصاره مخمر و پپتون در محیط کشت، موجب کاراملیزه شدن لاکتوز می‌گردد. سپس فلاسک‌های حاوی مواد مغذی محیط کشت و همچنین فلاسک-های محتوی محلول لاکتوز و آب‌پنیر، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند تا میکروارگانیسم‌های احتمالی نیز از بین برود. بعد از اتوکلاو و همدما شدن فلاسک‌ها، محلول لاکتوز، آب پنیر و ترکیب مواد غذایی محیط کشت در شرایط سترون و زیر هود با رعایت شرایط بهداشتی و ایمنی با نسبت‌های مشخص تا حجم ۱۰۰ میلی لیتر با هم مخلوط شدند. سپس ۲/۵ میلی لیتر از محیط پیش کشت (مایه تلقیح) به هریک از فلاسک‌های محتوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت استریل اضافه شد و فلاسک‌ها به شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۱۷۰ دور بر دقیقه منتقل شدند. فرایند تولید اسید لاکتیک به مدت ۵۰ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. در این دوره، در فواصل زمانی ۵ ساعته نمونه‌هایی از هریک از فلاسک‌ها برداشته و غلظت اسید لاکتیک، لاکتوز و وزن توده سلولی باکتریایی در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (۱).

۲-۴-اندازه‌گیری غلظت اسید لاکتیک و لاکتوز

برای اندازه‌گیری غلظت اسیدلاکتیک و لاکتوز، از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. بدین منظور از دستگاه HPLC شیمادزو ساخت کشور ژاپن با ستون AminexHEX-87H با استفاده از ۵ میلی مولار اسید سولفوریک به عنوان فاز متحرک و با سرعت جریان ۰/۶ میلی لیتر بر دقیقه استفاده شد (۷).

۲-۵-اندازه‌گیری وزن خشک سلولی

چگالی نوری نمونه‌های رقیق شده و نمونه کنترل در ۴۸۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر شیمادزو (UV-1601) اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی کالیبراسیون، چگالی سلولی به وزن خشک سلولی تبدیل شد. برای تعیین منحنی کالیبراسیون، استانداردهای متعددی با رقیق‌سازی نمونه‌های فاز ساکن رشد، تهیه شد و چگالی نوری آن‌ها تعیین گردید. ۱۵ میلی لیتر از هر نمونه رقیق شده، از یک فیلتر غشایی از جنس استات سلولز که از قبل وزن شده و دارای سوراخ‌های ریز به اندازه ۰/۴۵ میکرومتر بود با استفاده از پمپ خلا عبور داده شد. باکتری‌های تجمع یافته روی فیلترها با استفاده از ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر شسته شدند و فیلترها تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای تقریبا ۲۴ ساعت خشک شدند (۱۴).

۲-۶-تجزیه و تحلیل آماری

Archive of SID

www.SID.ir

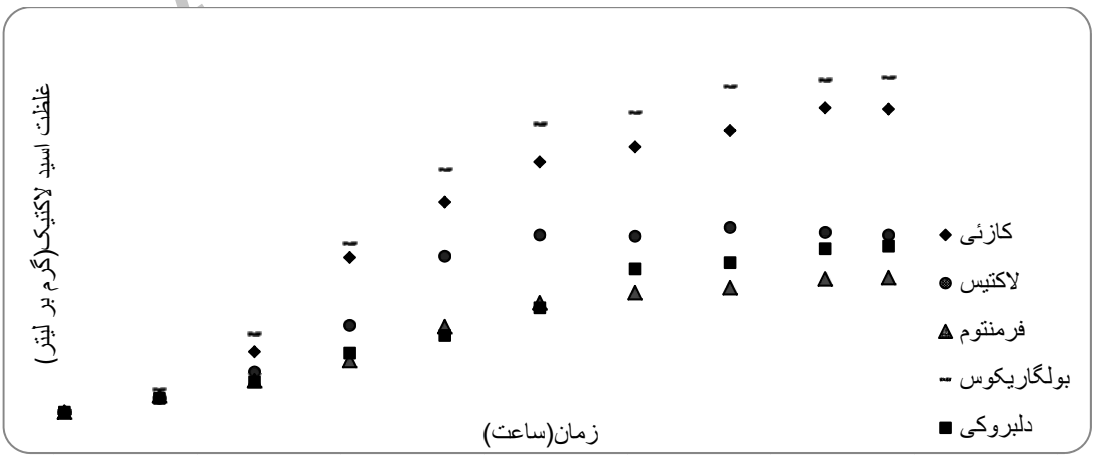
تمامی آزمایشات مربوط به تولید اسید لاکتیک با استفاده از سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس، در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل نتایج آزمایشگاهی با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. برای تحلیل میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. تیمارها در این تحقیق، پنج سویه مختلف از باکتری لاکتوباسیلوس بودند که برای هر تیمار، فاکتورهای غلظت اسید لاکتیک، غلظت لاکتوز و وزن خشک سلولی در زمان‌های ۰، ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۰، ۳۶، ۴۲، ۴۸ و ۵۴ ساعت بررسی گردید.

۳- نتایج و بحث

فرایند تولید تخمیری اسید لاکتیک با استفاده از پنج سویه متفاوت از لاکتوباسیلوس‌ها شامل لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس لاکتیس، لاکتوباسیلوس دلبروکی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم در کشت غوطه‌ور ناپیوسته بر روی محیط کشت آب‌پنیر پروتئین‌گیری و غنی شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در طی مدت ۵۰ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل ۱ نمودار تغییرات غلظت اسید لاکتیک با زمان را برای هریک از سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس نشان می‌دهد. همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، در آغاز فرایند، غلظت اسید لاکتیک در محیط کشت برابر با صفر بود. همچنین در ساعت‌های اولیه پس از تلقیح باکتری‌ها به محیط آب‌پنیر غنی شده و آغاز انکوباسیون فلاسک‌ها، غلظت اسید لاکتیک تولید شده بسیار ناچیز و در حد همان صفر بود. به دلیل اینکه لاکتوباسیلوس‌ها در این دوره زمانی چند ساعته در حال آداپته شدن با شرایط محیط کشت جدید بودند. در این مرحله لاکتوباسیلوس‌ها مقاومت نسبتا زیادی از خود نشان می‌دهند و غلظت مواد مغذی محیط کشت، حداکثر مقدار است. فاز تاخیر تقریباً ۵ ساعت به طول انجامید. سپس لاکتوباسیلوس‌ها با مصرف مواد مغذی محیط کشت از جمله لاکتوز و منابع ازت، رشد و تکثیر کرده و همزمان با آن، تولید اسید لاکتیک نیز مشاهده شد. در این مرحله که مقارن با فاز رشد نمایی باکتری است غلظت اسید لاکتیک نیز به صورت لگاریتمی افزایش یافت.

در شکل ۲ نمودار تغییرات غلظت لاکتوز به عنوان اصلی‌ترین منبع کربنی موجود در محیط کشت و شاخصی از غلظت سایر مواد مغذی موجود، تعیین گردید. غلظت لاکتوز در مرحله رشد نمایی باکتری‌ها، روند نزولی را نشان داد. در این مرحله لاکتوباسیلوس‌ها با بیشترین نرخ ممکن به مصرف لاکتوز و سایر مواد مغذی موجود در محیط کشت پرداخته و به همین نسبت با بیشترین نرخ ممکن، رشد نمودند.

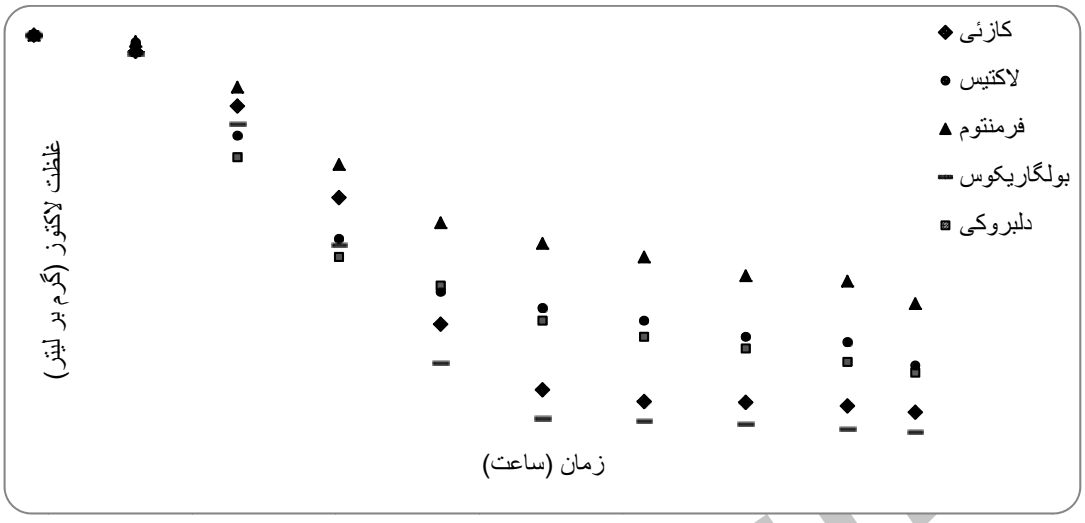
شکل ۳ نمودار رشد توده سلولی هریک از پنج سویه لاکتوباسیلوس مورد بررسی در این تحقیق را ارائه می‌دهد. همانگونه که در شکل ۳ قابل مشاهده می‌باشد، لاکتوباسیلوس‌ها در زمان تقریبی ۳۰ ساعت به حداکثر مقدار رشد خود رسیدند. بعد از این مرحله، کند شدن رشد لاکتوباسیلوس‌ها مشاهده شد. در زمان ۳۰ ساعت به بعد، رشد لاکتوباسیلوس‌ها تقریبا تابع ثابتی از زمان شده و پس از زمان تقریبی ۵۰ ساعت، مرگ و میر لاکتوباسیلوس‌ها به آهستگی شروع شد و سپس مرحله مرگ سریع اتفاق افتاد.



Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱- نمودار مقایسه‌ای تغییرات غلظت اسید لاکتیک بر حسب زمان فرایند برای پنج سویه از لاکتوباسیلوس‌ها در کشت غوطه‌ور ناپیوسته بر روی سوبسترای آب‌پنیر پروتئین‌گیری شده و غنی شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد



شکل ۲- نمودار مقایسه‌ای تغییرات غلظت لاکتوز بر حسب زمان فرایند برای پنج سویه از لاکتوباسیلوس‌ها در کشت غوطه‌ور ناپیوسته بر روی سوبسترای آب‌پنیر پروتئین‌گیری شده و غنی شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

محدوده زمانی فاز سکون از ۳۰ تا ۵۰ ساعت پس از انکوباسیون به دست آمد. با توجه به شکل ۱ می‌توان دریافت که نمودارهای غلظت اسید لاکتیک تا زمان ۵۴ ساعت پس از انکوباسیون، سیر صعودی داشت و پس از آن احتمالا تغییر محسوسی نخواهد داشت. به عبارتی تولید اسید لاکتیک بلافاصله پس از آغاز فاز رشد نمایی لاکتوباسیلوس‌ها آغاز شده و در فاز سکون نیز با شیب کمتری ادامه یافت. نمودار تغییرات غلظت لاکتوز در شکل ۲ نشان می‌دهد که مصرف سوبسترا توسط هر پنج سویه‌ی مورد بررسی تقریبا روند مشابهی داشت. مقایسه منحنی‌های رشد لاکتوباسیلوس‌ها و تولید اسید لاکتیک توسط آن‌ها نشان داد که در این موارد نیز هر پنج سویه مورد بررسی روند مشابهی را داشتند. این نتایج نشان داد که فرمولاسیون تعیین شده برای محیط کشت، در این تحقیق از نظر تامین نیازهای تغذیه‌ای و فاکتورهای مورد نیاز رشد، برای همه سویه‌های مورد بررسی، مناسب و در حد مطلوبی بود.

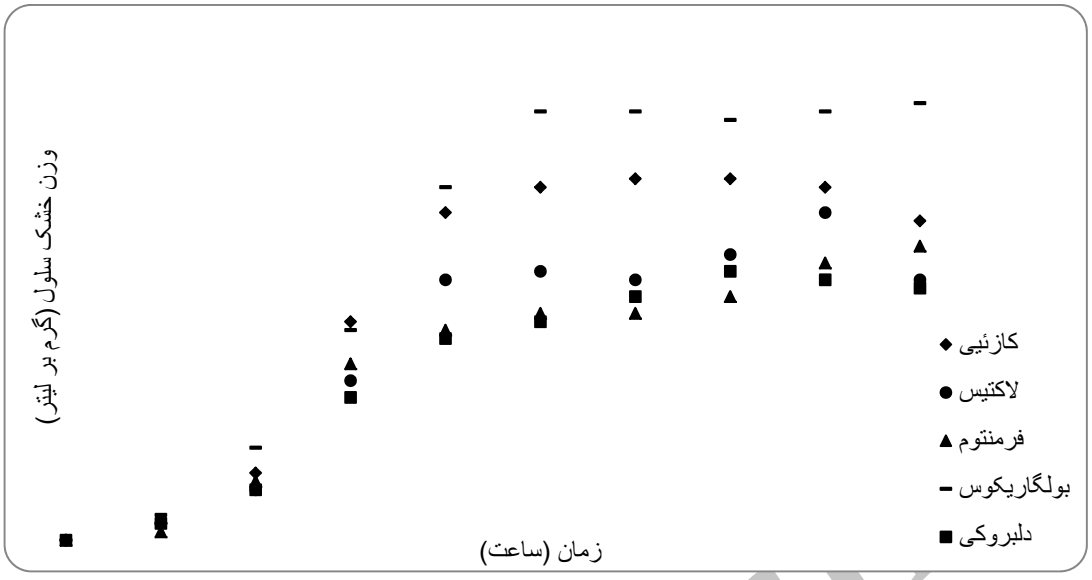
بر اساس نتایج به دست آمده (شکل ۱)، تولید اسید لاکتیک توسط سویه‌های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس کازئی نسبت به سه سویه دیگر به طور معنی‌داری ($P< ۰/۰۵$) بیشتر بود. با توجه به ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی برقرار شده در این فرایند، غلظت اسید لاکتیک تولید شده توسط سویه‌های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس کازئی به ترتیب برابر با ۲۶/۶ و ۲۴/۱ گرم بر لیتر بود. بدیهی است که انتخاب بهترین سویه برای تولید اسید لاکتیک باید بر اساس بهره‌دهی، بازده و میزان تولید محصول در نظر گرفته شود. بازده و بهره‌دهی تولید اسید لاکتیک توسط سویه های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس کازئی، تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۱). بنابراین در شرایط به کار گرفته شده در این تحقیق، سویه‌های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس کازئی بهترین گزینه در بین سویه‌های مورد مطالعه برای تولید اسید لاکتیک بودند.

راندمان تبدیل لاکتوز به اسید لاکتیک برای سویه‌های مختلف مورد بررسی در این تحقیق، متفاوت و از ۰/۳۵۱ و ۰/۳۵۸ گرم اسید لاکتیک تولید شده به گرم لاکتوز مصرفی برای لاکتوباسیلوس دلبروکی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم تا ۰/۶۰۲ گرم اسید لاکتیک تولید شده به گرم لاکتوز مصرفی برای لاکتوباسیلوس بولگاریکوس طبق جدول۱ متغیر بود. شیب منحنی مصرف لاکتوز با تولید محصول در سویه‌های بررسی شده نیز متفاوت بوده ولی از روند مشابهی برای تمامی سویه‌ها پیروی نمود. حداکثر میزان تولید اسید لاکتیک توسط هر سویه در شکل۱ و جدول ۱ ارائه شده است. در شکل۲ بر روند مصرف

Archive of SID

www.SID.ir

سوبسترا تاکید شده که نشان دهنده‌ی روند تولید اسید لاکتیک نیز می باشد.



شکل ۳- نمودار مقایسه‌ای تغییرات وزن خشک سلولی بر حسب زمان فرایند برای پنج سویه از لاکتوباسیلوس‌ها در کشت غوطه‌ور ناپیوسته بر روی سوبسترای آب‌پنیر پروتئین‌گیری شده و غنی شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

بدیهی است که بیشترین میزان تولید اسید لاکتیک توسط هر سویه در زمان حداکثر مصرف سوبسترا بوده و مناسب‌ترین منحنی تولید برای لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس کازئی با ضرایب تبدیل ۰/۶۰۲ و ۰/۵۸۶ سوبسترا به محصول بود. شیب تولید اسید لاکتیک نسبت به مصرف سوبسترا در مورد سایر سویه‌های مورد بررسی، به طور معنی‌داری کمتر از دو سویه مذکور بود. بازده تولید اسید لاکتیک توسط لاکتوباسیلوس دلبروکی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم تفاوت معنی‌داری نداشت اما بهره‌دهی تولید اسید لاکتیک توسط لاکتوباسیلوس دلبروکی به طور معنی‌داری بیشتر از لاکتوباسیلوس فرمنتوم بود (جدول ۱). بازدهی و بهره دهی تولید اسید لاکتیک توسط لاکتوباسیلوس لاکتیس به طور معنی‌داری بالاتر از لاکتوباسیلوس دلبروکی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم و کمتر از لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس کازئی بود (جدول ۱).

جدول ۱- بازده و بهره‌دهی تولید اسید لاکتیک برای پنج سویه از لاکتوباسیلوس‌ها در کشت غوطه‌ور ناپیوسته بر روی سوبسترای آب‌پنیر پروتئین‌گیری شده و غنی شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

سویه لاکتوباسیلوس	بازده (گرم محصول به سوبسترا)	بهره‌دهی (گرم محصول در لیتر در ساعت)
بولگاریکوس	۰/۶۰۲ ± ۰/۰۱ [a]	۰/۵۱۱ ± ۰/۰۱ [a]
کازیی	۰/۵۸۶ ± ۰/۰۱ [a]	۰/۵۰۴ ± ۰/۰۱ [a]
لاکتیس	۰/۴۳۷ ± ۰/۰۰۷ [b]	۰/۳۵۰ ± ۰/۰۰۷ [b]
دلبروکی	۰/۳۵۱ ± ۰/۰۰۸ [c]	۰/۲۵۴ ± ۰/۰۰۸ [c]
فرمنتوم	۰/۳۵۸ ± ۰/۰۰۴ [c]	۰/۲۰۶ ± ۰/۰۰۴ [d]

*حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معناداری در سطح احتمال آماری ۵ درصد در آزمون دانکن می‌باشد.

در مقایسه نتایج به دست آمده در این تحقیق با تحقیقات مشابه قبلی میتوان به نتایج گزارش شده توسط سرنا و ردریگز در سال ۲۰۰۶ اشاره نمود که تولید اسید لاکتیک با استفاده از سویه لاکتوباسیلوس لاکتیس را مورد مطالعه قرار دادند (۱۳). آن‌ها

Archive of SID
www.SID.ir

بهره‌دهی تولید اسید لاکتیک را با استفاده از لاکتوباسیلوس لاکتیس و مقدار ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز به عنوان منبع اصلی کربنی در محیط کشت در یک فرایند تخمیری ۴۸ ساعته، ۰/۲۹ گرم بر لیتر در ساعت گزارش کردند. تحقیق حاضر با استفاده از سویه لاکتوباسیلوس لاکتیس به بهره‌دهی ۰/۳۵ گرم در لیتر در ساعت برای تولید اسید لاکتیک دست یافت که در مقایسه با پژوهش مورد مقایسه، ۲۰٪ افزایش بهره دهی فرایند تولید حاصل گردید. البته نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بهره‌دهی فرایند تولید اسید لاکتیک با استفاده از لاکتوباسیلوس بولگاریکوس نسبت به لاکتوباسیلوس لاکتیس گزارش شده توسط سرنا و رودریگز، ۷۶٪ افزایش داشت. همچنین مقایسه بهره‌دهی تولید اسید لاکتیک توسط لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (دارای بیشترین بهره‌دهی) با لاکتوباسیلوس فرمنتوم (دارای کمترین بهره‌دهی) نشان داد که در شرایط یکسان، بهره‌دهی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس ۱۴۸٪ ، بیشتر از لاکتوباسیلوس فرمنتوم بود.

انتخاب بهترین سویه برای تولید اسیدلاکتیک باید با تکیه بر بهره-دهی، بازده و میزان تولید در نظر گرفته شود که در شرایط محیط کشت مناسب و یکسان، سویه لاکتوباسیلوس بولگاریکوس با تولید ۲۶/۶ گرم بر لیتر اسیدلاکتیک، بهره‌دهی ۰/۵۱۱ گرم بر لیتر بر ساعت و بازده تولید اسید لاکتیک معادل با ۰/۶۰۲ گرم اسید لاکتیک با ازای هر گرم لاکتوز مصرف شده به عنوان بهترین سویه در میان پنج سویه بررسی شده از لاکتوباسیلوس‌ها در این تحقیق، تعیین گردید. سویه لاکتوباسیلوس کازئی با تولید ۲۴/۱ گرم بر لیتر اسیدلاکتیک، بهره‌دهی ۰/۵۰۴ گرم اسید لاکتیک بر لیتر بر ساعت و بازده تولید ۰/۵۸۶ گرم اسید لاکتیک به ازای هر گرم لاکتوز مصرف شده، در رده دوم قرار گرفت. در بین سویه‌های لاکتوباسیلوس بررسی شده در این تحقیق، لاکتوباسیلوس فرمنتوم کمترین میزان بهره‌دهی را در حد ۰/۲۰۶ گرم اسید لاکتیک در لیتر در ساعت از خود نشان داد. این مقدار در مقایسه با بهره‌دهی سویه لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، از نصف هم کمتر بود. همچنین سویه لاکتوباسیلوس دلبروکی کمترین میزان بازده تولید محصول را در ۰/۳۵۱ گرم اسید لاکتیک به ازای هر گرم لاکتوز مصرف شده داشت. این میزان بازدهی نیز در مقایسه با لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، ۴۲٪ کاهش را نشان داد. در مجموع از نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که سویه‌های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس کازئی سویه‌های خوبی برای استفاده در فرایندهای تولید اسید لاکتیک هستند اما در شرایط مشابه، سویه‌های لاکتوباسیلوس دلبروکی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم برای این کار چندان مناسب به نظر نمی‌رسند.

۴-نتیجه گیری

فرایند تخمیری تولید اسید لاکتیک توسط پنج سویه متفاوت از لاکتوباسیلوس‌ها شامل لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس لاکتیس، لاکتوباسیلوس دلبروکی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر روی سوبسترای آب‌پنیر پروتئین‌گیری شده و غنی شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پ‌هاش ۶/۵ طی یک دوره زمانی ۵۰ ساعته در کشت غوطه‌ور ناپیوسته در شیکر انکوباتور با دور ۱۷۰ دور در دقیقه انجام شد. سویه‌های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس کازئی به ترتیب به عنوان بهترین سویه‌ها برای تولید اسید لاکتیک شناسایی شدند. در شرایط مشابه، سویه‌های لاکتوباسیلوس دلبروکی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم نیز به عنوان سویه‌های غیر اقتصادی و بدون توجیه جهت استفاده در فرایندهای تجاری تشخیص داده شدند.

۴-سپاس گزاری

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس خود را از پشتیبانی و حمایت معاونت‌های محترم پژوهش و فناوری دانشگاه‌های آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر و شاهرود و همچنین آزمایشگاه تحقیقاتی بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل در جهت اجرای مطالعات آزمایشگاهی مربوط به این طرح، ابراز می‌دارند.

۵- منابع

۱- اردستانی، ف. و ذبیحی، ح. ۱۳۹۳. بهینه‌سازی محیط کشت غیر پیوسته جهت افزایش راندمان تولید بیولوژیکی اسید لاکتیک توسط لاکتوباسیلوس کازئی با استفاده از روش آماری تاگوچی. نخستین همایش ملی الکترونیکی دستاوردهای نوین در علوم غذایی. سیستان و بلوچستان.

Archive of SID

www.SID.ir

۲- اصفهانیان، م. و ذبیحی، ن. ۱۳۹۳. تولید تخمیری اسید لاکتیک طی فرایند غیر پیوسته با استفاده از آب پنیر. پانزدهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران. ۱-۵.

۳- ذوالنوریان، ن. و محمد شریفی، ف. ۱۳۸۳. ماست - شناسایی میکروارگانیسم های پایه تولیدکننده ماست (لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه- بولگاریکوس واسترپتوکوکوس ترموفیلوس. استاندارد ملی ایران شماره ۷۷۱۳. ۴-۸.

۴- عبدالعلی زاده، م. ص.، واشقانی فراهانی، ا.، خدابنده، م. و هاشمی نجف آبادی، س. ۱۳۸۹. بهینه‌سازی شرایط تولید اسید لاکتیک در فرایند غیر مداوم تخمیر آب‌پنیر توسط باکتری لاکتوباسیلوس کازئی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. دوره ۷. شماره۲.

5- Buyukkileci, A. and Harsa, S. 2000. L (+) Lactic acid production from whey by Lactobacillus casei NRRL B-441. Izmir. Instit. Technol. 34-40.

6- Cock, L. S. and De Stouvenel, A. R. 2006. Lactic acid production by a strain of Lactococcus lactis subsp lactis isolated from sugarcane plants. Elec. J. Biotechnol. 9 (1): 1-7.

7- Cockrem, M. and Pride, D. 1991. Recovery of lactate ester and lactic acid from fermentation broth. US Patent. 718542.

8- Juturu, V. and Wu, J. C. 2016. Microbial production of lactic acid: the latest development. Crit. Rev. Biotechnol. In Press.

9- Kadam, S. R., Patil, S., Bastawde, B., Khire, M. and Gokhale, V. 2006. Strain improvement of Lactobacillus delbrueckii NCIM 2365 for lactic acid production. Pro. Biochem. 44 (1): 120-6.

10- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., Gonzalez, J. M. D., Converti, A. and Oliveira, R. P. S. 2013. Lactic acid properties, applications and production: A review. Trends. Food. Sci. Technol. 30 (1): 70-83.

11- Mirdamadi, S., Sadegi, H., Sharifi, N., Fallahpour, M., Mohseni, F. and Bakhtiari, M. R. 2002. Comparison of Lactic acid isomers produced by fungal and bacterial strains. Iran. Biomedic. J. 6 (2-3): 69-75.

12- Pal, P., Sikder, J., Roy, S. and Giorno, L. 2009. Process intensification in lactic acid production: A review of membrane based processes. Chem. Eng. Processing. Process. Intens. 48 (11-12): 1549-59.

13- Prachamon, T., Boonmee, M. and Hamsup, K. 2008. Lactic acid production using sugar cane juice as a substrate. KKU. Res. J. 8 (3):1-8.

14- Roslina, R. 2008. Optimization and modeling of lactic acid production from pineapple waste. Uni. Technol. Malaysia. 25- 6.

15- Roukas, T., Kotzamanidis, Ch. and Skaracis, G. 2002. Optimization of lactic acid production from beet molasses by Lactobacillus delbrueckii NCIMB 8130. World. J. Microbiol. Biotechnol. 18: 441-8.

16- Schepers, A. W., Thibault, J. and Lacroix, Ch. 2006. Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized Lactobacillus helveticus in a two-stage process: model and experiments. Enz. Microbial. Technol. 38: 324–37.

17- Serna, L. and Rodriguez, A. 2006. Lactic acid production by a strain of Lactococcus lactis subs lactis isolated from sugar cane plant. Elec. J. Biotechnol. 9 (1): 15-19.

18- Sheeladevi, A. and Ramanathan, N. 2011. Lactic acid production using lactic acid bacteria under optimized conditions. Int. J. Pharmacut. Biologic. Arch. 2(6): 1686-91.

19- Wee, Y., Kim, J. N., Yun, J. S. and Ryu, H. W. 2004. Utilization of sugar molasses for economical L(+) Lactic acid production by batch fermentation of Enterococcus faecalis. J. Enz. Microb. Technol. 35: 568-75.

20- Zannini, E., Santarelli, S., Osimani, A., Dellaquila, L. and Clementi, F. 2005. Effect of process parameters on the production of Lactic acid bacteria in batch fermentation. Ann. Microbial. 55: 273-8.

Archive of SID

www.SID.ir