Archive of SID

مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۰ شماره ۳/ سال ۱۳۹۹/ صفحات ۳۳ تا ۴۹

تولید اسید لاکتیک توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* BB12 در تخمیر ناپیوسته آب پنیر و پرمیات شیر

صابر امیری[۱]، رضا رضائی مکرم[۲]*، محمود صوتی خیابانی[۲]، محمود رضازاد باری[۳] و محمد علیزاده خالد آباد[۳]

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۳۰

[۱] دکترای میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
[۲] به‌ترتیب استادیار و دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
[۳] استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه
*مسئول مکاتبه: Email: rmokarram@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: اسید لاکتیک (۲- هیدروکسی پروپونیک اسید) یک اسید آلی مهم با کاربردهای گسترده در صنایع غذایی، داروسازی، مواد شوینده و کشاورزی است. **روش کار:** بدین منظور اثر مواد مغذی و فاکتورهای محیطی مهم در تولید اسید لاکتیک با استفاده از محصول جانبی حاصل از کارخانجات لبنی (آب پنیر و پرمیات شیر) به عنوان محیط کشت توسط کشت‌های خالص *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* BB12 مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** نتایج تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان دهنده اثر معنی‌دار pH اولیه، دمای گرمخانه‌گذاری، غلظت عصاره مخمر، نوع محیط کشت و نوع باکتری بر تولید اسید لاکتیک بود ($p<۰/۰۵$). زمان گرمخانه‌گذاری، نوع باکتری پروبیوتیک و غلظت عصاره مخمر اثر معنی‌دار بر تراکم سلولی داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین اثر pH اولیه، دما و زمان گرمخانه‌گذاری، غلظت عصاره مخمر، نوع محیط کشت و باکتری پروبیوتیک بر pH نهایی معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج این مطالعه نشان داد که پرمیات شیر و آب پنیر به علت محتوای بالای لاکتوز می‌تواند محیط کشت مناسبی برای تولید اسید لاکتیک باشد ولی بررسی هزینه‌های کاربرد مکمل‌های غذایی بویژه منبع نیتروژن ضروری است.

واژگان کلیدی: اسید لاکتیک، آب پنیر، پرمیات شیر، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* BB12

مقدمه

اسید لاکتیک (۲- هیدروکسی پروپیونیک اسید) یک اسید آلی مهم است که دارای فعالیت نوری می‌باشد و دو ایزومر D(-) و L(+) دارد. این اسید آلی ضعیف با pK_A ۳/۸۶ کاربردهای گسترده‌ای در صنایع غذایی، داروسازی، مواد شوینده و کشاورزی دارد. در صنایع غذایی L(+) لاکتیک اسید در گوشت فرآوری شده، سس سالاد و سس‌های گوجه فرنگی، نانوایی، نوشیدنی‌ها، شیرینی‌سازی و همچنین در فرآورده‌های لبنی (به عنوان نگهدارنده، طعم دهنده و تنظیم کننده pH) مورد استفاده قرار می‌گیرد (سیو و همکاران ۲۰۱۲؛ ایتمان و رامالینگام ۲۰۱۵؛ جوتورو و وو ۲۰۱۶؛ سکچی و همکاران ۲۰۱۲). میکروارگانیسم‌ها می‌توانند به طور انحصاری L- اسید لاکتیک[1] یا D- اسید لاکتیک[2] تولید نمایند، بسته به اینکه

[1] L-lactic acid
[2] D-lactic acid

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیم لاکتات دهیدروژناز[1]برای تبدیل پیروات به لاکتات به عنوان مرحله بیوشیمیایی نهایی بیان شود. از اینرو تقریبا ۹۰ درصد از تجارت جهانی این اسید آلی از طریق تخمیر میکروبی تولید می‌شود. این اسید توسط طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌گردد که باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک تولید کننده شاخص اسید لاکتیک محسوب می‌شوند. این باکتری‌ها از مسیرهای مختلف بیوسنتتیک برخوردار نیستند، به همین علت آنها میکروب‌های پرتوقع[2]هستند و به منابع نیتروژن مانند عصاره مخمر و پپتون نیاز دارند (ایتمان و رامالینگام ۲۰۱۵؛ جوتورو و وو ۲۰۱۶؛ عبدالرحمان و همکاران ۲۰۱۳).

آب پنیر (مایع شفاف مایل به سبز به دست آمده از شیر پس از رسوب کازئین) و پرمیات (مایع شفاف حاصل از فرآیند اولترافیلتیراسیون شیر یا آب پنیر) به عنوان محصول جانبی در کارخانجات پنیرسازی تولید می‌گردند (نبی‌زاده قولنجی و همکاران ۱۳۹۹؛ پسکوما و همکاران ۲۰۱۵؛ سوریانوپرز و همکاران ۲۰۱۲؛ پراساد و همکاران ۲۰۱۴). آب پنیر ۸۵-۹۵ درصد از حجم شیر را تشکیل می‌دهد که مواد مغذی مهم آن، لاکتوز (۴/۵-۵ درصد)، پروتئین‌های محلول (۰/۶-۰/۸ درصد)، چربی (۰/۴-۰/۵ درصد)، نمک‌های معدنی (۸-۱۰ درصد از ماده خشک)، ترکیبات نیتروژن غیر پروتئینی مانند اوره و ویتامین‌های گروه B است (سوریانوپرز و همکاران ۲۰۱۲؛ آمادو و همکاران ۲۰۱۶؛ پاراشار و همکاران ۲۰۱۶). پرمیات در حدود ۸۰ درصد لاکتوز اولیه از شیر فیلتر شده را حفظ می‌کند، اجزای عمده آن علاوه بر آب (۹۳ درصد) عبارت از لاکتوز (۵ درصد)، مواد معدنی (۰/۵۳ درصد) و پروتئین (۰/۸۵ درصد) است (پراساد و همکاران ۲۰۱۴). سالانه مقادیر زیادی آب پنیر و پرمیات تولید می‌گردد، زیرا حدوداً به ازای یک کیلوگرم پنیر تولیدی، ۹ کیلوگرم آب پنیر و پرمیات به دست می‌آید. اگر چه پرمیات و آب پنیر زیست تخریب پذیر هستند، ولی انتشار آن در محیط زیست به دلیل بالا بودن نیاز بیوشیمیایی (بیولوژیکی) به اکسیژن آن (۴۰،۰۰۰-۴۸،۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و همچنین اکسیژن مورد نیاز شیمیایی آن (۸۰،۰۰۰-۹۵،۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به طور قابل توجهی به آلودگی زمین و آب منجر می‌شود (پاراشار و همکاران ۲۰۱۶، کومار و همکاران ۲۰۱۲). در حال حاضر کارخانه‌های لبنیاتی در سراسر جهان به دنبال استراتژی‌های مناسب برای استفاده مقرون به صرفه از پرمیات و آب پنیر هستند. اگر چه پرمیات و آب پنیر، به ترتیب، به عنوان یک منبع مستقیم لاکتوز و پروتئین در فرمولاسیون مواد غذایی توسط برخی از کارخانجات صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این حال، این امر نیاز به فرآوری گسترده، از جمله دمینیرالیزاسیون و آبگیری دارد. یکی راه نویدبخش برای استفاده مستقیم از آب پنیر و پرمیات در تولید فرآورده-های زیستی و یا به عبارت بهتر در فرآیندهای بیوتکنولوژیکی است (پاراشار و همکاران ۲۰۱۶).

در رابطه با تولید تخمیری اسید لاکتیک تحقیقات متعددی صورت گرفته است. برای مثال، پراساد و همکاران در سال ۲۰۱۴، دو باکتری اسید لاکتیک را در محیط کشت سنتتیک برپایه پرمیات آب پنیر با کنترل و بدون کنترل pH کشت دادند. *لاکتوباسیلوس لاکتیس* ATCC 4797 ۱۲/۵ گرم در لیتر D(-) لاکتیک اسید را در یک بیوراکتور تولید کرد. مقادیر پارامترهای مدل Leudking-Piret نشان داد که لاکتات یک محصول وابسته به رشد است. تخمیر ناپیوسته نیز با استفاده از پرمیات آب پنیر (۳۵ گرم بر لیتر لاکتوز) با کازئین هیدرولیز شده به عنوان مکمل نیتروژن در بیوراکتور انجام شد. بعد از ۴۰ ساعت *لاکتوباسیلوس لاکتیس* ۲۴/۳ گرم بر لیتر اسید لاکتیک را با ۹۸ درصد خلوص نوری تولید کرد. آنها نتیجه گرفتند پرمیات آب پنیر به عنوان یک منبع تغذیه بالقوه برای تولید D(-) لاکتیک اسید می باشد (پراساد و همکاران ۲۰۱۴). همچنین بیتل و همکاران در سال ۲۰۱۶، برای اولین بار تولید موثر D(-) اسیدلاکتیک با یک گونه *اسپوروولاکتوباسیلوس ناکایاما* با استفاده از آرد بادام زمینی ارزان قیمت به عنوان منبع نیتروژن و ساکارز تجاری به عنوان منبع کربن گزارش کردند. غلظت ۱۱۲/۹۳ گرم بر لیتر D(-) اسید لاکتیک با استفاده تخمیر از ۱۱۰/۰۰ گرم بر لیتر

[1] Lactate dehydrogenase
[2] Fastidious

www.SID.ir

Archive of SID

ساکارز تجاری، ۱۵۰/۴۰ گرم آرد بادام زمینی و ۰/۱۶ میلی‌لیتر بر لیتر توئین ۸۰[1] به دست آمد. ترکیب محیط کشت مطلوب با استفاده از طرح‌های آماری Plackett-Burman، طرح‌های فاکتوریل کسری و روش سطح پاسخ تعیین شد (بیتل و همکاران ۲۰۱۶). در تحقیقی دیگر اثر نوع و غلظت محصولات جانبی حاصل از تولید بیواتانول به عنوان منبع نیتروژن بالقوه بر فرآیند تولید اسید لاکتیک با استفاده از *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* CHB2121 مورد بررسی قرار گرفت. تقریباً، ۶/۷ گرم بر لیتر برای تولید ۹۰ گرم بر لیتر اسید لاکتیک در محیط حاوی ۱۰۰ گرم بر لیتر گلوکز نیاز بود. تخمیر ناپیوسته در محصولات جانبی حاصل از تولید بیواتانول به عنوان محیط کشت منجر به تولید ۹۰ تا ۹۵ گرم بر لیتر اسید لاکتیک اسید پس از حدود ۴۸ ساعت شد (مون و همکاران ۲۰۱۴). در مطالعه‌ای، آلونسو و همکاران در سال ۲۰۱۰، از پساب حاصل از حذف چربی و کازئین ماست‌های تاریخ انقضاء گذشته به عنوان یک منبع کربن برای تولید اسید لاکتیک توسط *لاکتوباسیلوس لاکتیس* استفاده کردند. تبدیل زیستی قند کل به اسید لاکتیک در فرآیند تخمیر با pH کنترل شده پس از ۳۴ ساعت در حدود ۴۴ درصد بود. کنترل pH و غنی‌سازی با عصاره مخمر در مرحله پیش از کشت، افزایش قابل ملاحظه عملکرد تخمیر را به دلیل کاهش سمیت و افزایش منبع نیتروژن به دنبال داشت (آلونسو و همکاران ۲۰۱۰).

هزینه منبع کربن برای رشد میکروب‌ها و تولید متابولیت‌های میکروبی یکی از عواملی است که به شدت بر قیمت تجاری فرآورده میکروبی مؤثر بوده و تا حد زیادی تولید و کاربرد آن‌ها در مقیاس صنعتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین استفاده از منابع کربن ارزان قیمت، به ویژه آنهایی که از فرآیندهای صنعتی یا کشاورزی تولید می‌شود، می‌تواند راهی برای کاهش هزینه‌های تولید متابولیت‌های میکروبی فراهم کند و زمینه کاربرد گسترده آن‌ها در صنایع غذایی را ایجاد می‌نماید (برتراند و همکاران ۲۰۰۱؛ شیرو و همکاران ۲۰۱۴). استفاده از این مواد ارزان قیمت به عنوان محیط-های کشت، راهکاری امید بخش در تولید محصولات بیوتکنولوژیکی با ارزش است که موجب کاهش هزینه تولید و تمام شده محصول می‌گردد (شیرو و همکاران ۲۰۱۴). از سوی دیگر در ایجاد بازار جدید دارای ارزش افزوده برای این فاضلاب مازاد لبنی در کاهش بار زیست محیطی دفع پرمیات آب پنیر نیز بسیار راهگشا خواهد بود (پاراشار و همکاران ۲۰۱۶). از این رو هدف از پژوهش حاضر، مقایسه استفاده از محصول جانبی حاصل از کارخانجات لبنی (آب پنیر و پرمیات شیر) به عنوان محیط کشت جهت تولید اسید لاکتیک توسط دو جنس پروبیوتیک پُرکاربرد درصنایع غذایی یعنی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 و *بیفیدوباکتریوم* لاکتیس BB12 است. بدین منظور اثر نوع محیط کشت، مواد مغذی و همچنین فاکتورهای محیطی مهم در تولید اسید لاکتیک توسط کشت‌های خالص پروبیوتیک‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده

گونه‌های باکتریایی مورد استفاده در پژوهش حاضر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 و *بیفیدوباکتریوم* لاکتیس BB12 محصول شرکت کریستن هانسن (Christian Hansen, DK-2970 Hørsholm, Denmark) از شرکت پیشگامان پخش صدیق، نمایندگی شرکت کریستن هانسن در ایران، خریداری شد. آب پنیر و پرمیات شیر، به ترتیب از کارخانه لبنیاتی تولید کننده پنیر پیتزا و پنیر سفید ایرانی فراپالایش شده، واقع در ارومیه تهیه گردید و بلافاصله پس از تولید در دمای ۴ °C به آزمایشگاه منتقل شد تا جهت تلقیح کشت آماده-سازی شود. محیط‌های کشت MRS براث (شرکت Merck، آلمان) از نمایندگی شرکت‌های تولید کننده در ایران خریداری شد. آب دیونیزه (شرکت زلال، کرج، ایران) مورد استفاده قرار گرفت. سایر مواد شیمیایی آزمایشگاهی مورد استفاده از Merck، آلمان بودند.

[1] Tween 80

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌ها

تعیین ویژگی‌های آب پنیر و پرمیات شیر

برای این منظور مقدار پروتئین کل با استفاده از روش لوری، مقدار قند کل با روش فنل–سولفوریک اسید، میزان چربی به روش ژربر، محتوای فسفر با استفاده اسپکتروفتومتر و همچنین محتوای پتاسیم و سدیم با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری شعله اندازه‌گیری گردید (سالا و همکاران ۲۰۱۶؛ گوئرا و همکاران ۲۰۰۱).

آماده‌سازی محیط کشت نمونه‌ها

هر دو محیط کشت آب پنیر و پرمیات به شرح زیر جهت کشت آماده‌سازی شدند؛ پس از تنظیم pH ۴/۵ با اسید هیدروکلراید ۵ نرمال، در دمای °C ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد تا پروتئین‌ها دناتوره شوند. سپس رسوب حاصله با استفاده از سانتریفیوژ (g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) جدا گردید. سوپرناتانت در pH مورد مطالعه تنظیم و در °C ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید و به عنوان محیط کشت استفاده شد (گوئرا و همکاران ۲۰۰۱).

آماده‌سازی مایه تلقیح

برای این منظور از روش دلاراپدروسو و همکاران در سال ۲۰۱۲ و فلورنس و همکاران در سال ۲۰۱۲، با کمی تغییر استفاده شد. به این ترتیب که پس از تهیه محیط کشت MRS براث مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، به آن ۱ درصد توئین ۸۰[1] اضافه گردید، جهت کشت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 ولی برای کشت *بیفیدوباکتریوم* لاکتیس BB12 به محیط کشت حاضر شده ۰/۰۵ درصد سیستئین و ۰/۱ درصد لیتیوم کلرید اضافه شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای °C ۱۲۱ استریل گردید. سپس ۱ گرم از سلول‌های باکتریایی آماده استفاده تولید شده به روش خشک کردن انجمادی در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول فوق حل گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۳۷، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 در شرایط هوازی و *بیفیدوباکتریوم* لاکتیس BB12 در شرایط بی‌هوازی، گرمخانه گذاری شد. سلول‌ها با سانتریفوژ شدن در g ۲۳۶۰ به مدت ۸ دقیقه برداشت شده و دو بار در محلول NaCl (۰/۸۵ درصد) شسته شدند. توده باکتریای در محلول نرمال سالین مجددا حل گردید تا حاوی حدود CFU/ml ۱۰^۱۰–۱۰^۹ باکتری زنده و فعال گردد (دلاراپدروسو و همکاران ۲۰۱۲؛ فلورنس و همکاران ۲۰۱۲).

تلقیح و کشت ناپیوسته پروبیوتیک‌ها

مطابق طرح آماری پس از آماده‌سازی محیط کشت هر نمونه آزمایشی، در حدود CFU/ml ۱۰^۱۰–۱۰^۹ باکتری زنده و فعال به عنوان مایه تلقیح باکتری‌های مورد مطالعه به محیط کشت اضافه گردید. کشت ناپیوسته در ارلن مایر ۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت در دمای فرآیند بر حسب °C و مدت زمان تخمیر مورد مطالعه بر حسب ساعت مطابق طرح آماری انجام شد (گوئرا و همکاران ۲۰۰۱).

اندازه‌گیری اسید لاکتیک

برای این منظور ابتدا مایع کشت داده شده برای جدا سازی سلول‌ها باکتریایی سانتریفوژ شد. مایع رویی را ۲۰ برابر با آب مقطر رقیق نموده و اسید لاکتیک موجود در نمونه با استفاده از روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید. غلظت اسید لاکتیک با استفاده از یک منحنی کالیبراسیون با در نظر گرفتن رقت ۲۰ برابر از نمونه محاسبه شد. محلول نمونه (۵۰ میکرولیتر) حاوی اسید لاکتیک به ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۲ درصد آهن (III) کلرید اضافه و هم زده شد. سپس جذب در ۳۹۰ نانومتر برابر محلول مرجع (۲ میلی‌لیتر از محلول $FeCl_3$ ۰/۲ درصد) اندازه‌گیری گردید (واکنش و اندازه‌گیری در °C ۵ ± ۲۵ انجام شد). جهت رسم منحنی کالیبراسیون، ۱/۲ گرم اسید لاکتیک با غلظت ۸۹ درصد (۱/۲ = ρ گرم بر میلی‌لیتر) را در یک بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری ریخته و با آب مقطر رقیق شد (محلول ذخیره). سپس مجموعه‌ای از محلول‌های اسید لاکتیک از محلول ذخیره با استفاده از رقت دو برابر آماده گردید. در ادامه محلول آهن (III) کلرید (۰/۲ درصد) آماده شد، به این ترتیب که آهن (III) کلرید (۰/۳ گرم) در یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری ریخته و تا خط نشانه با آب رقیق شد و جهت انحلال کامل هم‌زده شد (این محلول در دمای اتاق °C ۵ ± ۲۵

[1] Tween 80

www.SID.ir

Archive of SID

نگهداری گردید). محلول اسید لاکتیک (۵۰ میکرولیتر) با غلظت مربوط به ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۲ درصد آهن (III) کلرید اضافه و همزده شد. جذب محلول‌های رنگی به دست آمده در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (محلول مرجع ۲ میلی‌لیتر از محلول آهن (III) کلرید ۰/۲ درصد است). ارتباط جذب محلول‌های رنگی و غلظت اسید لاکتیک جهت تعیین پارامترهای معادله خطی مربوط به محدوده خطی منحنی کالیبراسیون استفاده شد (بورشچوسکایا و همکاران ۲۰۱۶).

اندازه‌گیری تراکم سلولی

برآورد تعداد باکتری‌ها با اندازه گیری OD_{600} (چگالی نوری در ۶۰۰ نانومتر) با استفاده از اسپکتروفتومتر تک پرتو اندازه‌گیری شد. اسپکتروفوتومتر با محلول نرمال سالین ۰/۸۵ درصد به عنوان نمونه مرجع تنظیم گردید (لوگاوی و همکاران ۲۰۰۷).

اندازه‌گیری pH

برای این منظور از دستگاه pH متر پس از کالیبراسیون با بافرهای ۴ و ۷، استفاده شد (تریگوئروس و همکاران ۲۰۱۶).

اندازه‌گیری قند کل

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه را در یک لوله آزمایش با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول فنل ۴۰ گرم بر لیتر و یک میلی‌لیتر از محلول اسید سولفوریک غلیظ (۹۶ میلی‌لیتر اسید سولفوریک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) مخلوط گردید. پس از همزدن توسط ورتکس، لوله واکنش پس از سرد شدن در حمام یخ به مدت ۳۰ دقیقه، جذب محلول بدست آمده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. لاکتوز به عنوان استاندارد برای آماده‌سازی منحنی کالیبراسیون (۰/۰۶۲ تا یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر به جای محلول نمونه برای آماده‌سازی کنترل مورد استفاده قرار گرفت (فرومنتو و همکاران ۲۰۱۳).

طرح و تحلیل آماری

در این مطالعه از طرح پایه کاملاً تصادفی به صورت آرایش فاکتوریل با ۸ نقطه مرکزی، برای بررسی اثرات پنج فاکتور عددی شامل دمای تخمیر، pH اولیه، زمان گرمخانه گذاری، غلظت عصاره مخمر و غلظت لینولئیک اسید، به همراه دو فاکتور اسمی شامل نوع باکتری پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 و *بیفیدوباکتریوم* لاکتیس BB12) و نوع محیط کشت (آب پنیر و پرمیات شیر) بر تولید اسید لاکتیک استفاده شد (جدول شماره ۱). بررسی اثر معنی‌داری فاکتورها و بر هم‌کنش‌های آن‌ها با استفاده از توزیع فیشر به روش تجزیه واریانس در سطح $\alpha \leq ۰/۰۵$ مورد ارزیابی قرار گرفت. طرح و تحلیل آماری و همچنین رسم نمودارها با نرم افزار Design Expert v10.0.4.0 (Stat-Ease Int. Co., Minneapolis, MN, USA) انجام شد.

جدول ۱- مشخصات طرح آزمایشی و سطوح متغیرهای مستقل

Table 1- Experimental design and levels of independent variables

Study Type	Factorial					**Runs**	38		
Initial Design	Minimum Run Resolution V					**Blocks**	No Blocks		
Center Points	8								
Design Model	2FI								
Factor	**Name**	**Units**	**Type**	**Low Actual**	**High Actual**	**Low Coded**	**High Coded**	**Mean**	**Std. Dev.**
A	Initial pH	-	Numeric	5	7	-1	1	6	0.89
B	Temperature	°C	Numeric	30	38	-1	1	34	3.55
C	Incubation time	h	Numeric	12	48	-1	1	30	15.99
D	Linoleic acid	µl	Numeric	0	400	-1	1	200	177.71
E	Yeast extract	%	Numeric	0	4	-1	1	2	1.78
F	Culture media		Categoric	Cheese Whey (CW)	Milk Permeate (MP)			Levels:	2
G	Bacterial cultures		Categoric	*L. acidophilus* (LA5)	*B. lactis* (BB12)			Levels:	2

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

ترکیب آب پنیر و پرمیات در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- ویژگی‌های آب پنیر و پرمیات شیر مورد استفاده پس از استریلیزاسیون

Table 2- The characteristics of cheese whey and milk permeate after sterilization

	pH	Total sugars (g/L)	Total Protein (%)	Fat (%)	Phosphorus (%)	Potassium (ppm)	Sodium (ppm)
Cheese whey	6.54±0.02	4.64±0.12	0.3	0	3.35±0.14	36.51	10.99
Milk permeate	6.23±0.02	6.69±0.03	0.2	0	1.78±0.11	34.51	13.04

روند تولید اسیدلاکتیک طی دوره تخمیر

نتایج نشان داد pH اولیه، دمای گرمخانه‌گذاری، غلظت عصاره مخمر، نوع محیط کشت و نوع باکتری بر تولید اسید لاکتیک تأثیر معنی‌دار داشتند ($p<۰/۰۵$). همچنین اثر متقابل دمای گرمخانه‌گذاری با غلظت عصاره مخمر، نوع محیط کشت و نوع باکتری پروبیوتیک و نیز اثر متقابل غلظت عصاره مخمر با نوع محیط کشت، نوع باکتری پروبیوتیک و غلظت اسید لینولئیک بر تولید اسید لاکتیک از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). pH و دما فاکتورهای محیطی کلیدی در فرآیند تولید اسید لاکتیک است (سوریانوپرز و همکاران ۲۰۱۲). گزارش شده که طول فاز سکون تحت تأثیر pH می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط سوریانوپرز و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد، کوتاه‌ترین دوره تاخیر (۲/۵ ساعت) در pH ۵/۹ بدست آمد، در حالی که طولانی‌ترین فاز تأخیر (۱۰ ساعت) در pH ۵ مشاهده شد. بالاترین میزان تولید اسید لاکتیک ۳/۲ گرم در لیتر را در pH ۵/۹ بدست آوردند که این مقدار با نتایج محققان دیگر برای تولید اسید لاکتیک با تخمیر آب پنیر توسط *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* مشابه و با بهره‌وری حداکثر اسید لاکتیک به دست آمده از طریق تخمیر شربت خرما با مخلوط *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس لاکتیس* برابر است (سوریانوپرز و همکاران ۲۰۱۲). شکل ۱ و ۲ اثر متغیرهای مستقل مورد مطالعه دارای اثر معنی‌دار بر تولید اسید لاکتیک طی دوره تخمیر را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش دما میزان تولید اسید لاکتیک افزایش می‌یابد. مطابق با نتایج سیو و همکاران در سال ۲۰۱۲، تولید اسید لاکتیک به طور معنی‌داری تحت تأثیر دما قرار گرفت و بیشترین میزان تولید اسید لاکتیک در دمای ۳۷ °C به دست آمد. شایان ذکر است براساس همان نتایج همان مطالعه مقدار اسید لاکتیک تولید شده در ۳۵ °C از مقدار تولیدی آن در ۳۰ °C به طور معنی‌داری بیشتر بود ولی میزان اسید لاکتیک تولیدی در ۴۲ °C با میزان تولید آن در ۳۷ °C تفاوت معنی‌داری نداشت (سیو و همکاران ۲۰۱۲). سوریانوپرز و همکاران در سال ۲۰۱۲، گزارش کردند تولید اسید لاکتیک با افزایش دما بین ۲۳ °C و ۴۵ °C، افزایش یافت ولی تولید حداکثر اسید لاکتیک را در ۴۲ °C بود (سوریانوپرز و همکاران ۲۰۱۲). مطابق شکل ۱ که اثر متقابل دمای گرمخانه گذاری و غلظت عصاره مخمر را نشان می‌دهد با افزایش دمای گرمخانه‌گذاری و غلظت عصاره مخمر، تولید اسید لاکتیک افزایش می‌یابد ولی اثر دمای گرمخانه‌گذاری در غلظت صفر درصد عصاره مخمر بر تولید اسید لاکتیک بیشتر است. افزایش دمای گرمخانه‌گذاری باعث افزایش تولید اسید لاکتیک در محیط کشت آب پنیر شد ولی در محیط کشت پرمیات تأثیری نداشت. شکل ۱ نشان می‌دهد که هر دو باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* با افزایش دمای گرمخانه گذاری، اسید لاکتیک بیشتری تولید کردند. نتایج به دست آمده نشان داد که افزایش غلظت عصاره مخمر منجر به افزایش مقدار اسید لاکتیک تولیدی گردید. به دلیل داناتوره شدن بخشی از پروتئین موجود در محصولات جانبی مورد استفاده به عنوان محیط کشت در اثر استریلیزاسیون، منبع نیتروژن آنها محدود شد. فقط تعداد کمی از باکتری‌های اسید لاکتیک مانند *لاکتوباسیلوس دلبروکی*

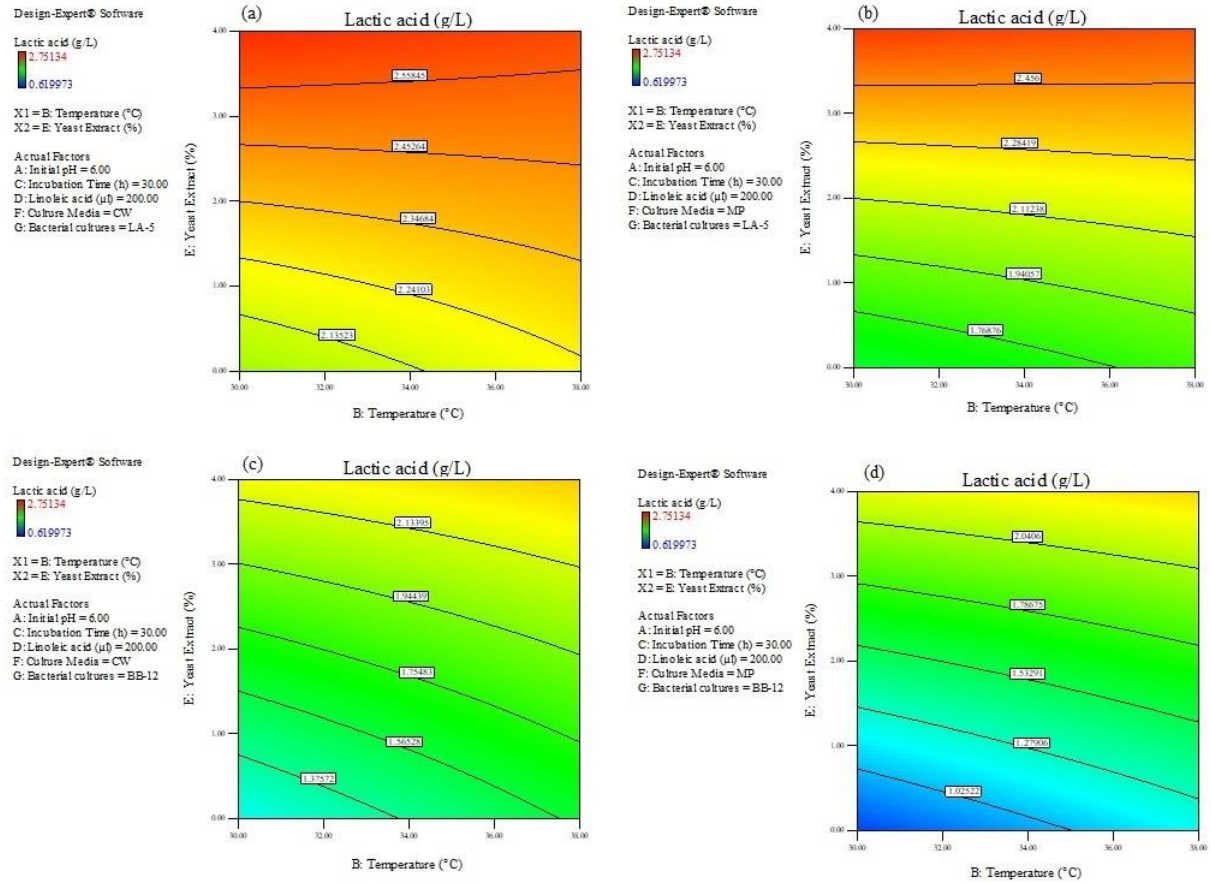
www.SID.ir

Archive of SID

زیرگونه بولگاریکوس و *استرپتوکوک ترموفیلوس* می‌توانند خود را با کمبود اسید آمینه وفق دهند (پسکوما و همکاران ۲۰۰۷؛ برتراندهارب و همکاران ۲۰۰۳). ولی، اکثر باکتری‌های این خانواده نیاز به یک منبع نیتروژن خارجی اسیدهای آمینه یا پپتید دارند تا بتوانند رشد کنند (دنادرا ۲۰۰۷). در پژوهشی حداکثر تولید اسید لاکتیک ۳/۷ گرم در لیتر ساعت با افزودن ۱۰ گرم لیتر عصاره مخمر و ۳/۱ گرم در لیتر ساعت بدون افزودن عصاره مخمر در شرایط مشابه کشت حاصل شد (سورینانوپرز و همکاران ۲۰۱۲). بر اساس یافته‌های سیو و همکاران در سال ۲۰۱۲، که از پودر پروتئینیزه شده پرمیات آب پنیر به عنوان محیط کشت استفاده کرده بودند، استفاده از منبع نیتروژنی مکمل برای تولید اسید لاکتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، به دلیل محدود بودن مقدار پروتئین محصول محیط کشت، ضروری است. همچنین سیو و همکاران در سال ۲۰۱۲، عنوان کردند که عصاره مخمر بیشترین تأثیر را بر تولید اسید لاکتیک داشت و غلظت عصاره مخمر و غلظت پرمیات آب پنیر اثر سینرژیستی در تولید اسید لاکتیک داشتند (سیو و همکاران ۲۰۱۲). بر اساس نتایج کولهو و همکاران در سال ۲۰۱۱، از بین ۴ منبع نیتروژن مورد مطالعه، عصاره مخمر بهترین منبع نیتروژنی، جهت تولید اسید لاکتیک بود (کولهو و همکاران ۲۰۱۱). یافته‌های دی و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که دما یکی از عوامل کلیدی محیطی بر فرآیند تخمیر اسید لاکتیک است و در ترکیب با عصاره مخمر و غلظت پپتون تاثیر زیادی بر تولید اسید لاکتیک داشت. همچنین از میان انواع منابع نیتروژن مورد مطالعه، عصاره مخمر به دلیل محتوای نیتروژن بالا از جمله اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها، بهترین نتیجه را در تولید اسید لاکتیک داشت. این محققان گزارش کردند که غلظت اسید لاکتیک در ابتدا با افزایش دما تا $41\ ^{\circ}C$ افزایش یافت، اما با افزایش درجه حرارت بیش از $41\ ^{\circ}C$، غلظت اسید لاکتیک شروع به کاهش کرد. اثر متقابل دما و عصاره مخمر بر اسید لاکتیک موثر بود به طوری که غلظت اسید لاکتیک در دمای پایین پایین‌تر از $41\ ^{\circ}C$ با افزایش غلظت عصاره مخمر زیاد نیست، اما با افزایش درجه حرارت به حدود $41\ ^{\circ}C$، غلظت اسید لاکتیک با افزایش غلظت عصاره مخمر افزایش داشت (دی و همکاران ۲۰۱۲). مون و همکاران در سال ۲۰۱۴، گزارش کردند در میان منابع مختلف پیچیده نیتروژن، عصاره مخمر بهترین انتخاب برای تولید اسید لاکتیک است که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد (مون و همکاران ۲۰۱۴). نتایج حاصل از پژوهش حاضر با یافته‌های لونللی و همکاران در سال ۲۰۱۰، مطابق داشت که دمای گرمخانه‌گذاری و عصاره مخمر از عوامل مهم دارای تأثیر مثبت بر تولید اسید لاکتیک هستند (لونللی و همکاران ۲۰۱۰). *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* هموفرمنتاتیو است و فقط اسید لاکتیک تولید می‌کند ولی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* اسید استیک و اسید لاکتیک را در نسبت مولی ۳: ۲ تولید می‌نماید (لی و سالمینن ۲۰۰۹؛ راسل و همکاران ۲۰۱۱).

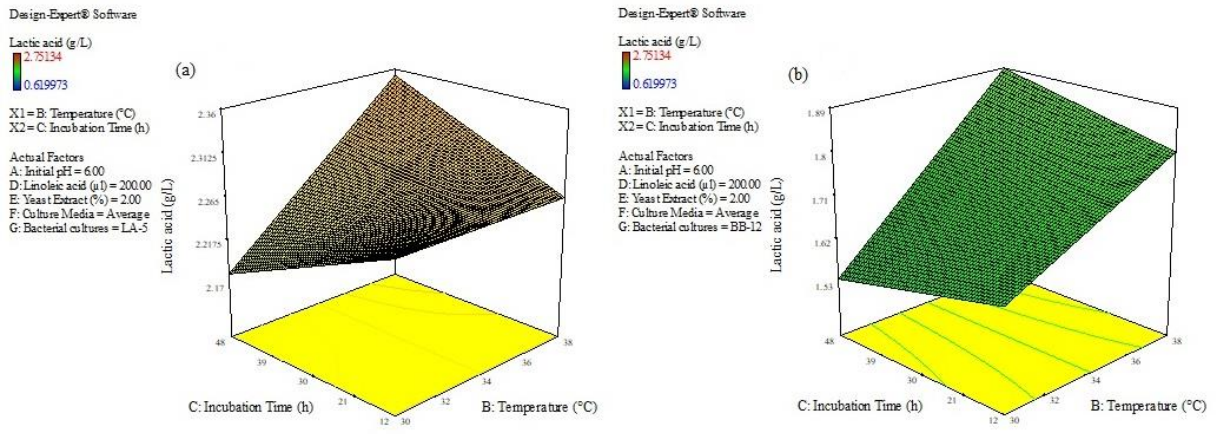
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تأثیر اثر متقابل دما با غلظت عصاره مخمر و نوع محیط کشت بر تولید اسید لاکتیک توسط LA5 و BB12

Figure 1- The interaction effect of temperature with yeast extract concentrations and type of culture on lactic acid production by LA5 and BB12



شکل ۲- تأثیر اثر متقابل دما و زمان گرمخانه گذاری بر تولید اسید لاکتیک توسط LA5 و BB12

Figure 2- The interaction effect of incubation temperature and time on the production of lactic acid by LA5 and BB12

روند تغییرات تراکم سلولی طی دوره تخمیر

بر اساس نتایج و مطابق شکل‌های ۳ و ۴ زمان گرمخانه‌گذاری، نوع باکتری پروبیوتیک و غلظت عصاره مخمر بر میزان تراکم سلولی اثر معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین نتایج تجزیه تحلیل آماری نشان داد اثر متقابل دمای گرمخانه‌گذاری با مدت زمان فرآیند

www.SID.ir

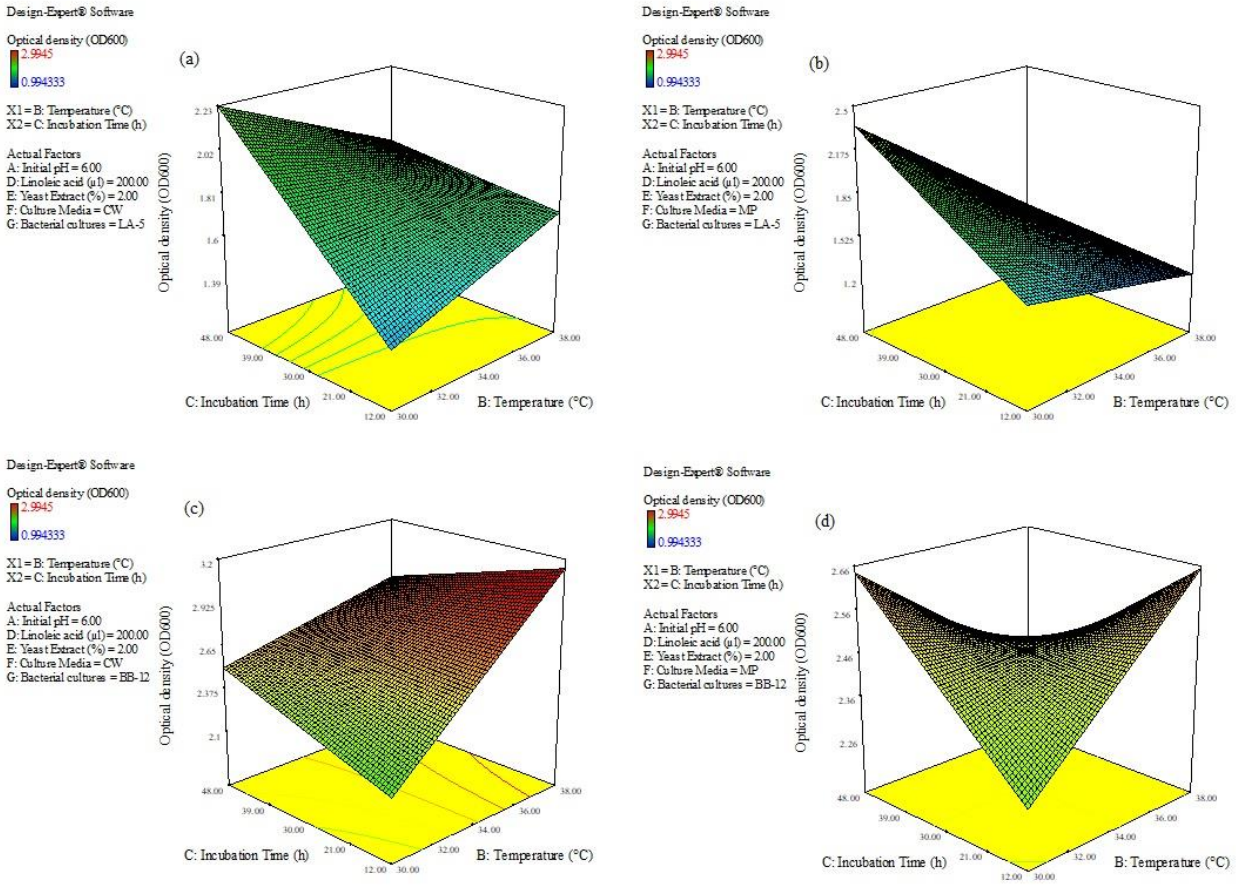
Archive of SID

تخمیر، غلظت لینولئیک اسید، نوع محیط کشت و نوع کشت باکتری و همچنین اثر متقابل غلظت عصاره مخمر و نوع کشت باکتریایی معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). با افزایش دما از ۳۰ °C به ۳۸ °C، تراکم سلولی افزایش می‌یابد، شکل ۳، که علت این امر تأمین دمای بهینه رشد باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد. درجه حرارت مطلوب رشد *بیفیدوباکتریوم‌ها* ۳۷ °C-۴۱ و درجه حرارت مطلوب برای رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ۳۷ °C است (لی و سالمینن ۲۰۰۹؛ راسل و همکاران ۲۰۱۱؛ رابینسون ۲۰۱۴). باکتری‌های پروبیوتیک از نظر نیازهای تغذیه‌ای پُر توقع هستند و محیط کشت غنی از اسیدهای آمینه (پپتون، عصاره مخمر و عصاره گوشت گاو) و ویتامین‌ها و نیز ترکیباتی مانند مونواولئات سوربیتان، استات سدیم و نمک منیزیم باعث تحریک رشد آنها می‌شوند (رابینسون ۲۰۱۴). در شکل ۳ مشاهده می‌شود که با افزایش دما، تراکم سلولی در محیط کشت پرمیات شیر نسبت به آب پنیر کاهش می‌یابد که ناشی از محدود بودن منابع نیتروژن در پرمیات است. در مورد تأثیر منبع نیتروژن بر تراکم سلولی، شکل ۴ (d)، با افزایش غلظت عصاره مخمر باعث افزایش تراکم سلولی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* می‌شود، ولی تراکم سلولی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تقریباً ثابت می‌ماند، زیرا ۳۸ °C در محدوده درجه حرارت مطلوب رشد *بیفیدوباکتریوم* قرار دارد (لی و سالمینن ۲۰۰۹؛ راسل و همکاران ۲۰۱۱). به طور کلی بر اساس مطالعات رشد سلول با افزایش مکمل نیتروژن در محیط کشت افزایش می‌یابد. گزارشات نشان می‌دهد که در زیست فرآیند تخمیر منبع نیتروژنی به طور کلی تغییرات زیستی را بهبود می‌بخشد (سورینانوپرز و همکاران ۲۰۱۲). آلونسو و همکاران در سال ۲۰۱۰، اثر آن بر رشد سویه باکتری اسید لاکتیک در آب پنیر مایع باقی مانده از عصاره مخمر تجاری استفاده شد. در شرایط آزمایش شده سلول‌ها پس از ۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری به مرحله رشد لگاریتمی رسید. در محیط کشت غنی شده، تراکم سلولی بیشتر (حدود ۱/۸ گرم در لیتر) در مقایسه با محیط کشت بدون مکمل (۱/۲ گرم در لیتر) به دست آمد (آلونسو و همکاران ۲۰۱۰). مطابق یافته‌های دی و همکاران در سال ۲۰۱۲، از میان انواع منابع نیتروژن مورد مطالعه، عصاره مخمر به دلیل محتوای نیتروژن بالا از جمله اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها، بیشترین سهم را در رشد زیست توده در فرآیند تولید داشت. بر اساس مون و همکاران در سال ۲۰۱۴، در میان منابع مختلف پیچیده نیتروژن، عصاره مخمر بهترین انتخاب برای رشد هر دو میکروب مورد مطالعه است (مون و همکاران ۲۰۱۴). مطابق با شکل ۴ (a)، با گذشت زمان تراکم سلولی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* کاهش جزئی دارد ولی تراکم سلولی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* افزایش می‌یابد که ناشی از اثر کاهش pH می باشد. pH یکی از عوامل مهم تأثیر گذارد بر بقای سویه های باکتری پروبیوتیک در مواد غذایی است (مرحمتی‌زاده و همکاران ۲۰۱۲). در مطالعه‌ای دیگر در مورد رشد سلول، بیشترین مقدار نیز در pH ۵/۹ بدست آمد که نشان می‌دهد بهترین عملکرد تخمیر آب پنیر در این pH است. تولید سلول با افزایش دمای تا ۴۵ °C افزایش داشت ولی ناچیز بود (سورینانوپرز و همکاران ۲۰۱۲). آنها گزارش کردند اثر ضد باکتری و مهار کننده pH پایین برای *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* قوی‌تر از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* است و به نظر می‌رسد که در طول زمان ذخیره‌سازی و فرآیند افزایش تخمیر، کاهش pH موجب کاهش رشد *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* می‌شود (مرحمتی-زاده و همکاران ۲۰۱۲). براساس پژوهش جایالالیتا و همکاران در سال ۲۰۱۲، نتایج مشابه با یافته‌های این تحقیق بود، زیرا مقاومت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در محیط معده بیشتر از سایر گونه‌ها از جمله *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* گزارش شد (جایالالیتا و همکاران ۲۰۱۲). پروبیوتیک‌ها اغلب زنده‌مانی ضعیفی محصولات لبنی تخمیری نشان می‌دهد، کاهش زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک و بقای ضعیف آن در طی زمان نگهداری و نیز کاهش در اثر آسیب‌های ناشی از افزایش اسیدی توسط محققان گزارش شده است (سرابی جماب و همکاران ۲۰۱۷؛ حکمت و همکاران ۲۰۰۹؛ لوکاس و همکاران ۲۰۰۴؛ گویموند و همکاران ۲۰۰۴). سیو و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند رشد و

www.SID.ir

Archive of SID

متابولیسم لاکتوز *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در پرمیات آب پنیر در هنگام غنی‌سازی با منابع نیتروژن آلی بویژه عصاره مخمر، راندمان بالاتری داشت (سیو و همکاران ۲۰۱۲).

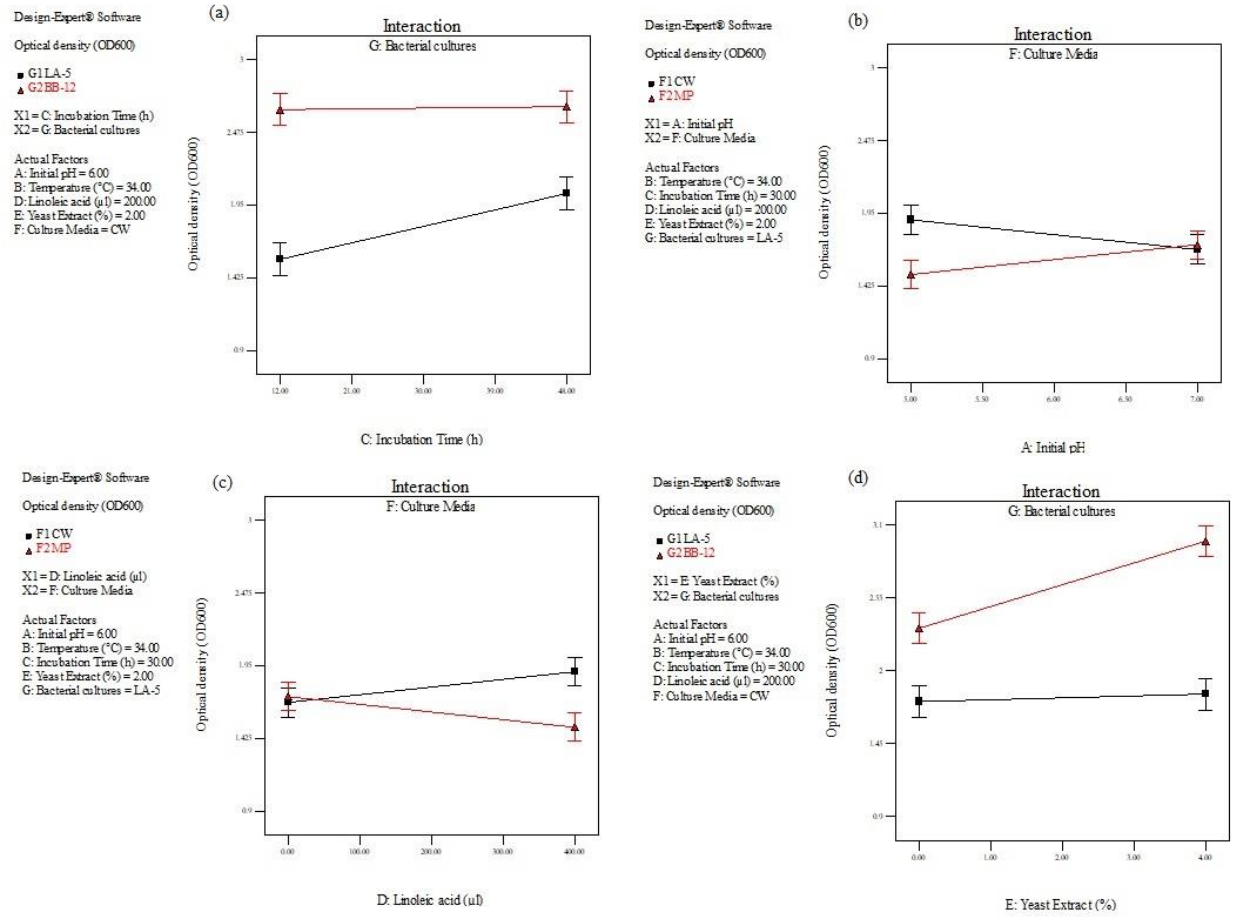


شکل ۳- تأثیر اثر متقابل دما با زمان گرمخانه‌گذاری بر تراکم سلولی (OD_{600})

Figure 3- The interaction effect of temperature with incubation time on cell density (OD_{600})

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- تغییرات تراکم سلولی (OD_{600}) در طول تخمیر

Figure 4. Changes of cell density (OD_{600}) during fermentation

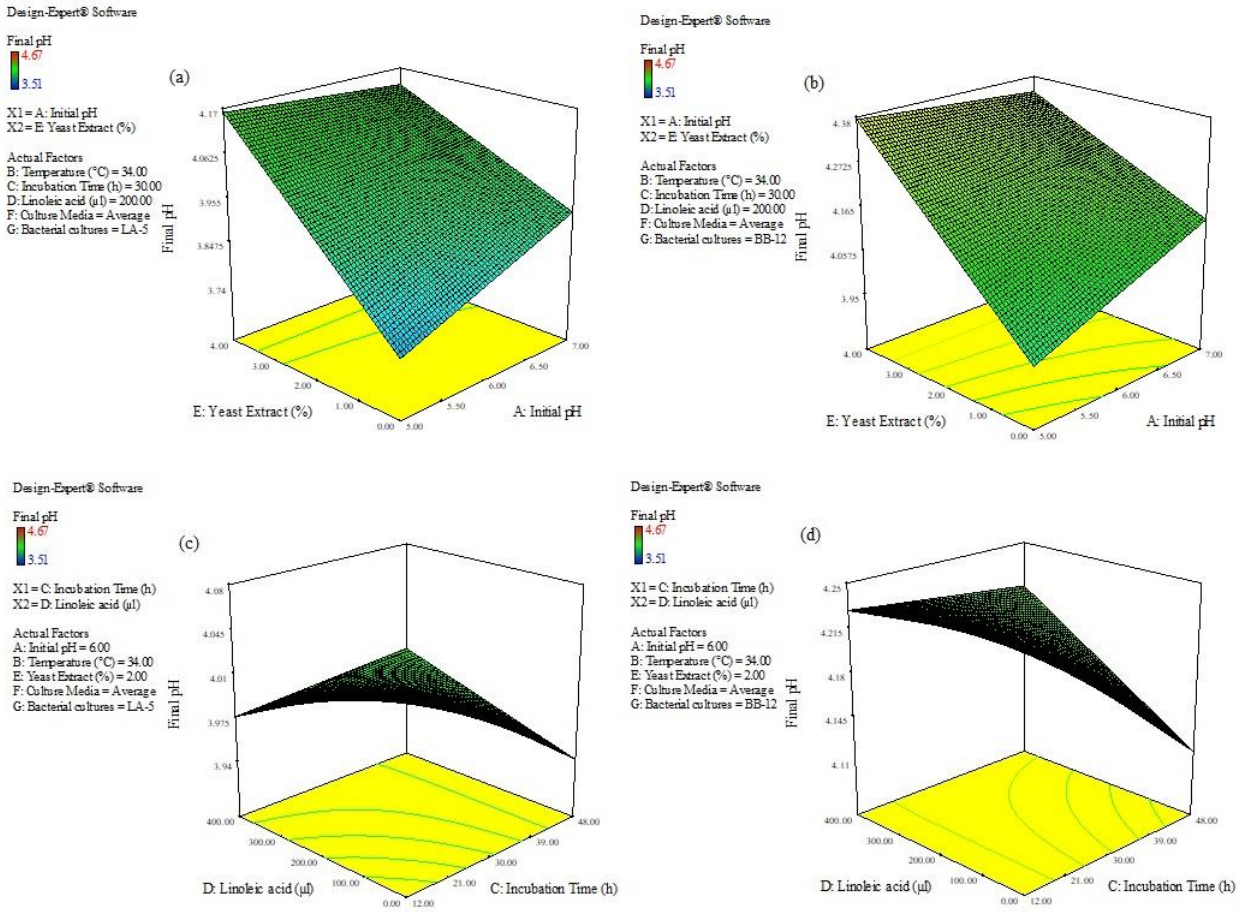
روند تغییرات pH طی دوره تخمیر

با توجه به نتایج تجزیه و تحلیل آماری pH اولیه، دما و زمان گرمخانه‌گذاری، غلظت عصاره مخمر، نوع محیط کشت و باکتری پروبیوتیک تأثیر معنی‌داری بر pH داشتند ($p<۰/۰۵$). شایان ذکر است نتایج حاکی از معنی‌داری اثر متقابل pH اولیه و غلظت عصاره مخمر، دمای گرمخانه‌گذاری با زمان تخمیر، نوع محیط کشت و نوع پروبیوتیک و همچنین غلظت لینولئیک اسید با مدت زمان تخمیر و نوع باکتری پروبیوتیک بود ($p<۰/۰۵$). همانطور که در شکل ۵ (a و b)، مشخص است با افزایش غلظت عصاره مخمر به دلیل افزایش رشد و فعالیت و در نتیجه تولید اسید بیشتر، pH کاهش می‌یابد. با افزایش دما به ۳۸ °C که منجر به افزایش رشد و تولید اسید لاکتیک می‌گردد، pH کاهش می‌یابد (شکل ۶). مطابق مطالعات انجام شده pH بهینه برای رشد غالب باکتری‌های پروبیوتیک ۶/۵-۷/۰ است (لی و سالمینن ۲۰۰۹؛ راسل و همکاران ۲۰۱۱؛ رابینسون ۲۰۱۴). باتوجه به شکل ۶، pH در محیط کشت آب پنیر به دلیل وجود منابع نیتروژنی در آن که منجر به رشد و فعالیت بیشتر می‌شوند، بیشتر کاهش می‌یابد. نتایج مشابه توسط سایر محققان به دست آمده است، برای مثال پریرا و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی تولید نوشیدنی تخمیری با تلقیح دانه‌های کفیر و پروبیوتیک‌های تجاری با استفاده از کنسانتره پروتئین آب پنیر مایع و پرمیات مطالعه کرده و گزارش کردند اسیدیته نوشیدنی‌های تخمیری با پرمیات اولترافیلتراسیون تغلیظ شده نسبت به کنسانتره پروتئین مایع آب پنیر، بسیار کمتر بود. در شکل ۶ مشاهده می‌گردد که *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* نسبت به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تغییرات بیشتری در pH دارد که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

گزارش شده که اسیدیته در محیط کشت حاوی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در مقایسه با *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بیشتر بود زیرا *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* اسید استیک و اسید لاکتیک را در نسبت مولی ۳: ۲ تولید می‌نماید ولی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* هموفرمنتاتیو بوده و فقط اسید لاکتیک تولید می‌کند (لی و سالمینن ۲۰۰۹؛ راسل و همکاران ۲۰۱۱؛ پریرا و همکاران ۲۰۱۵).

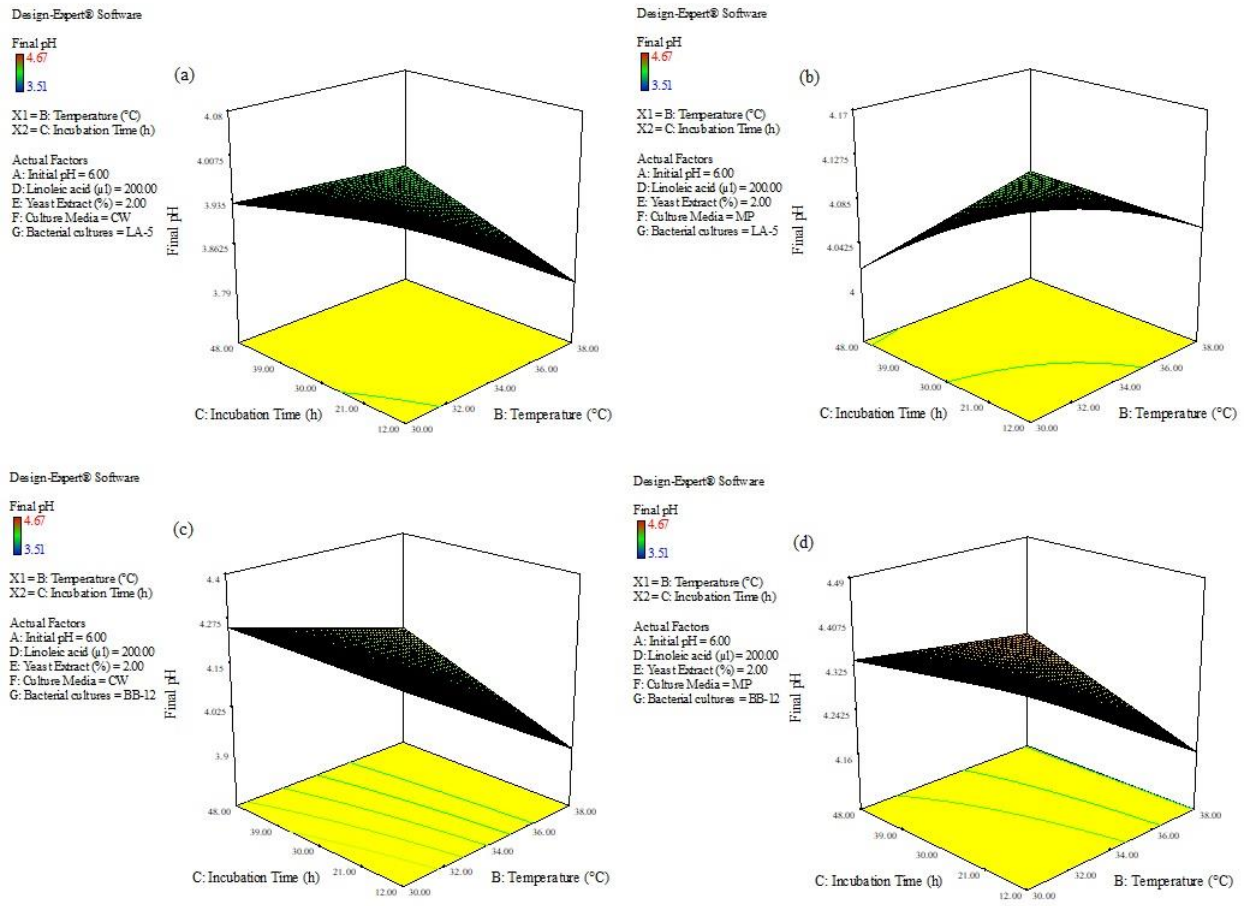


شکل ۵- تغییرات pH نهایی در طول تخمیر

Figure 5- Changes of final pH during fermentation

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶- تأثیر اثر متقابل دما با زمان گرمخانه‌گذاری بر pH نهایی

Figure 6- The interaction effect of temperature with incubation time on final pH

نتیجه‌گیری

تولید اسید لاکتیک با کاربرد طرح آزمایشات جهت تعیین شرایط محیطی و مواد مغذی موثر بر تولید اسید لاکتیک توسط دو سویه پروبیوتیک پُرکاربرد در صنایع لبنی (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس*) در پرمیات شیر و آب پنیر به عنوان محیط کشت بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که pH اولیه، زمان تخمیر، دمای گرمخانه‌گذاری و غلظت عصاره مخمر مهمترین فاکتورهای تأثیر گذار بر تولید اسید لاکتیک است که اثر معنی‌داری بر فرآیند تولید داشتند ($p<0/05$). عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن آلی به طور قابل توجهی تولید اسید لاکتیک و تراکم سلول از آب پنیر و پرمیات شیر را بهبود بخشید. به طور کلی پرمیات شیر و آب پنیر به علت محتوای بالای لاکتوز می‌تواند محیط کشت مناسبی برای تولید اسید لاکتیک باشد ولی بررسی هزینه‌های تولید اسید لاکتیک از آب پنیر و پرمیات شیر با و بدون مکمل‌های غذایی بویژه منبع نیتروژن ضروری است.

منابع مورد استفاده

نبی‌زاده قولنجی الف، رضازاد باری م، امیری ص و آتشبار ب، ۱۳۹۹. کاربرد آب پنیر بعنوان محیط کشت جهت کشت ریزجلبک *دونالیلا سالینا*. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۳۰(۲)، ۱۳-۲۸.

Abdel-Rahman MA, Tashiro Y and Sonomoto K, 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. Biotechnology Advances 31: 877-902.

www.SID.ir

Archive of SID

Alonso S, Herrero M, Rendueles M and Díaz M, 2010. Residual yoghurt whey for lactic acid production. Biomass and Bioenergy 34: 931-938.

Amado IR, Vázquez JA, Pastrana L and Teixeira JA, 2016. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus. Food Chemistry 198: 54-61.

Beitel SM, Sass DC, Coelho LF and Contiero J, 2016. High D (−) lactic acid levels production by Sporolactobacillus nakayamae and an efficient purification. Annals of Microbiology 66: 1367-1376.

Bertrand-Harb C, Ivanova IV, Dalgalarrondo M and Haertlle T, 2003. Evolution of β-lactoglobulin and α-lactalbumin content during yoghurt fermentation. International Dairy Journal 13: 39-45.

Bertrand N, Fliss I and Lacroix C, 2001. High nisin-Z production during repeated-cycle batch cultures in supplemented whey permeate using immobilized Lactococcus lactis UL719. International Dairy Journal 11: 953-960.

Borshchevskaya LN, Gordeeva TL, Kalinina AN and Sineokii SP, 2016. Spectrophotometric determination of lactic acid. Journal of Analytical Chemistry 71: 755-758.

Cui F, Wan C, Li Y, Liu Z and Rajashekara G, 2012. Co-production of lactic acid and Lactobacillus rhamnosus cells from whey permeate with nutrient supplements. Food and Bioprocess Technology 5: 1278-1286.

Coelho LF, de Lima CJB, Bernardo MP and Contiero J, 2011. D (−)-lactic acid production by Leuconostoc mesenteroides B512 using different carbon and nitrogen sources. Applied Biochemistry and Biotechnology 164: 1160-1171.

de Lara Pedroso D, Thomazini M, Heinemann RJB and Favaro-Trindade CS, 2012. Protection of Bifidobacterium lactis and Lactobacillus acidophilus by microencapsulation using spray-chilling. International Dairy Journal 26: 127-132.

de Nadra MM. 2007. Nitrogen metabolism in lactic acid bacteria from fruits: a review. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology 1: 500-510.

Dey P, Sikder J, Roy S and Pal P, 2012. Fermentative lactic acid production from a renewable carbon source under response surface optimized conditions without alkali addition: a membrane-based green approach. Clean Technologies and Environmental Policy 14: 827-835.

Eiteman MA and Ramalingam S, 2015. Microbial production of lactic acid. Biotechnology Letters 37: 955-972.

Florence ACR, Oliveira RP, Silva RC, Soares FA, Gioielli LA and Oliveira MN, 2012. Organic milk improves Bifidobacterium lactis counts and bioactive fatty acids contents in fermented milk. LWT-Food Science and Technology 49: 89-95.

Frumento D, do Espirito Santo AP, Aliakbarian B, Casazza AA, Gallo M, Converti A and Perego P, 2013. Development of milk fermented with Lactobacillus acidophilus fortified with Vitis vinifera Marc Flour. Food Technology and Biotechnology 51: 370.

Gueimonde M, Delgado S, Mayo B, Ruas-Madiedo P, Margolles A and de los Reyes-Gavilán CG, 2004. Viability and diversity of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium populations included in commercial fermented milks. Food Research International 37: 839-850.

Guerra NP, Rua ML and Pastrana L, 2001. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. International Journal of Food Microbiology 70: 267-281.

Hekmat S, Soltani H and Reid G, 2009. Growth and survival of Lactobacillus reuteri RC-14 and Lactobacillus rhamnosus GR-1 in yogurt for use as a functional food. Innovative Food Science & Emerging Technologies 10: 293-296.

Hossein Marhamatizadeh M, Ehsandoost E, Gholami P, Moshiri H and Nazemi M, 2012. Effect of permeate on growth and survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum for production of probiotic nutritive beverages. World Applied Sciences Journal 18: 1389-1393.

Jayalalitha V, Balasundaram B and Palanidorai R, 2012. In Vitro assessment of microencapsulated probiotic beads, International Journal of Agriculture: Research and Review 2: 1-6.

www.SID.ir

Archive of SID

Juturu V and Wu JC, 2016. Microbial production of lactic acid: the latest development. Critical Reviews in Biotechnology 36: 967-977.

Kumar M, Jain AK, Ghosh M and Ganguli A, 2012. Industrial whey utilization as a medium supplement for biphasic growth and bacteriocin production by probiotic Lactobacillus casei LA-1. Probiotics and Antimicrobial Proteins 4: 198-207.

Lee YK and Salminen S, 2009. Handbook of probiotics and prebiotics. John Wiley & Sons.

Loghavi L, Sastry SK and Yousef AE, 2007. Effect of moderate electric field on the metabolic activity and growth kinetics of Lactobacillus acidophilus. Biotechnology and Bioengineering 98: 872-881.

Lucas A, Sodini I, Monnet C, Jolivet P and Corrieu G, 2004. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. International Dairy Journal 14: 47-53.

Lunelli BH, Andrade RR, Atala DI, Maciel MRW, Maugeri Filho F and Maciel Filho R, (2010). Production of lactic acid from sucrose: strain selection, fermentation, and kinetic modeling. Applied biochemistry and Biotechnology 161: 227-237.

Moon SK, Wee YJ and Choi GW, 2014. Utilization of by-products derived from bioethanol production process for cost-effective production of lactic acid. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 41: 1525-1531.

Parashar A, Jin Y, Mason B, Chae M and Bressler DC, 2016. Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. Journal of Dairy Science 99: 1859-1867.

Prasad S, Srikanth K, Limaye AM and Sivaprakasam S, 2014. Homo-fermentative production of d-lactic acid by Lactobacillus sp. employing casein whey permeate as a raw feed-stock. Biotechnology letters 36(6), 1303-1307.

Pereira C, Henriques M, Gomes D, Gomez-Zavaglia A and de Antoni G, 2015. Novel Functional Whey-Based Drinks with Great Potential in the Dairy Industry. Food Technology and Biotechnology 53: 307.

Pescuma M, de Valdez GF and Mozzi F, 2015. Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology 99: 6183-6196.

Pescuma M, Hébert EM, Mozzi F and Valdez G, 2007. Hydrolysis of whey proteins by Lactobacillus acidophilus, Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus grown in a chemically defined medium. Journal of Applied Microbiology 103: 1738-1746.

Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF and Stanton C, 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. International Journal of Food Microbiology 149: 88-105.

Robinson RK, 2014. Encyclopedia of food microbiology. C. A. Batt (Ed.). Academic press.

Salla ACV, Margarites AC, Seibel FI, Holz LC, Brião VB, Bertolin TE, ... and Costa JAV, 2016. Increase in the carbohydrate content of the microalgae Spirulina in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. Bioresource Technology 209: 133-141.

Sarabi Jamab M, Rahnama vosough P, kate shamdhiri M and Karazhyan R, 2017. Survivability of Probiotic Bacteria in Simulated Gastric and Intestinal model. Journal of Food Science and Technology 68: 14.

Schirru S, Favaro L, Mangia NP, Basaglia M, Casella S, Comunian R, ... and Todorov SD, 2014. Comparison of bacteriocins production from Enterococcus faecium strains in cheese whey and optimised commercial MRS medium. Annals of Microbiology 64: 321-331.

Secchi N, Giunta D, Pretti L, García MR, Roggio T, Mannazzu I and Catzeddu P, 2012. Bioconversion of ovine scotta into lactic acid with pure and mixed cultures of lactic acid bacteria. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 39: 175-181.

Soriano-Perez S, Flores-Velez L, Alonso-Davila P, Cervantes-Cruz G and Arriaga S, 2012. Production of lactic acid from cheese whey by batch cultures of Lactobacillus helveticus. Annals of Microbiology 62: 313-317.

Trigueros DEG, Fiorese ML, Kroumov AD, Hinterholz CL, Nadai BL and Assunção GM, 2016. Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for Saccharomyces cerevisiae var. boulardii. Biochemical Engineering Journal 110: 71-83.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Food Researches/vol.30 No.3/ 2020/pp 33-49
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

Production of lactic acid by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium lactis* BB12 in batch fermentation of cheese whey and milk permeate

S Amiri[1], R Rezaei Mokarram[2*], M Sowti Khiabani[2], M Rezazade Bari[3] and M Alizadeh Khaledabad[3]

Received: January 27, 2018 Accepted: May 20, 2019

[1]PhD, Food Microbiology and Biotechnology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Assistant Professor and Associate Professor respectivly, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran
[*]Corresponding author: E-mail: rmokarram@tabrizu.ac.ir

Introduction: Lactic acid (2-hydroxyproponic acid) is an important organic acid with widespread applications in the food, pharmaceutical, detergent and agricultural industries. In the food industry, L-lactic acid is used in processed meat, salad dressing and tomato sauce, bakery, beverages, confectionery, as well as in dairy products as a preservative, flavoring and pH adjuster. Almost 90% of the global trade of this organic acid is produced by microbial fermentation. This acid is produced by a wide range of microorganisms, which are the family of lactic acid bacteria. Cheese whey (a clear, greenish liquid obtained from milk after casein coagulation) and milk permeate (clear liquid from the ultrafiltration process of milk) are produced as a by-product in dairy factories. Cheese whey makes up 95-85% of milk volume, its important nutrients are lactose (4.5-5% w/v), soluble proteins (0.6-0.8% w/v), fat (0.4-0.5% w/v), mineral salts (10-8% of dry matter), non-protein nitrogen compounds such as urea and B vitamins. Permeate retains about 80% of the initial lactose from filtered milk. Its major components in addition to water (93% v/v) are lactose (5% w/v), minerals (0.53% w/v) and protein (0.85% w/v). Large quantities of cheese whey and milk permeate are produced annually because 9 Kg of cheese whey and milk permeate is obtained for 1 Kg of cheese production. Although cheese whey and milk permeate are biodegradable, their release into the environment significantly leads to land and water pollution due to their high biochemical oxygen demand (40,000-48,000 mg/L) and chemical oxygen demand (80,000-95,000 mg/L). Dairy factories around the world are now looking for the right strategies for the cost-effective use of cheese whey and milk permeate. This study aimed to compare the use of dairy factories by-products (cheese whey and milk permeate) as a cultivation medium for producing lactic acid by two probiotic bacteria which were used in foods including *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium lactis* BB12.

Material and methods: For this purpose, the effects of nutrients and important environmental factors on the production of lactic acid using the by-products of dairy plants (cheese whey and milk permeate) as a culture medium with pure culture of *L. acidophilus* LA5 and *B. lactis* BB12 were investigated. A completely randomized design with factorial arrangement with 8 central points was used to study the effects of five numerical factors including fermentation temperature, initial pH, incubation time, yeast extract concentration and linoleic acid concentration, as well as two nominal factors including type of probiotics (*L. acidophilus* LA5 and *B. lactis* BB12) and culture media (cheese whey and milk permeate) were used for lactic acid production. The significance of the factors and their interactions were evaluated using Fisher's distribution by analysis of variance at

www.SID.ir

Archive of SID

$\alpha \leq 0.05$. Statistical design and analysis, as well as charting, were conducted with Design Expert v10.0.4.0 (Stat-Ease Int. Co., Minneapolis, MN, USA).

Results and discussion: The results showed that initial pH, incubation temperature, yeast extract concentrations, type of culture media and type of bacteria had a significant effect on lactic acid production ($p<0.05$). Also, the interaction effect of the incubation temperature with the yeast extract concentration, type of culture media and type of probiotic bacteria, as well as the interaction of yeast extract concentrations with culture medium, type of probiotic bacteria and linoleic acid concentrations on lactic acid production were statistically significant ($p<0.05$). Based on the results, the incubation time, type of probiotic bacteria and yeast extract concentrations had a significant effect on cell density ($p<0.05$). Also, the results of statistical analysis showed that the interaction of incubation temperature with the fermentation process time, linoleic acid concentrations, type of culture media and bacterial culture, as well as the interaction of yeast extract and bacterial culture were significant ($p<0.05$). With increasing temperature from 30 ºC to 38 ºC, cell density was increased, which was due to the optimum temperature of probiotic bacteria growth. The optimum temperature for *Bifidobactera* is between 37 ºC−41 ºC and the optimum temperature for the growth of *L. acidophilus* is 37 ºC. Probiotic bacteria are highly expected for nutritional needs, and the enriched medium with amino acids (peptone, yeast extract and beef extracts), and vitamins as well as compounds such as tween 80, sodium acetate and magnesium salts were necessary for their growth. According to the results of statistical analysis of initial pH, temperature and incubation time, yeast extract concentrations, culture medium and probiotic bacteria had a significant effect on final pH ($p<0.05$). The results indicate significant interaction between the initial pH and yeast extract concentrations, incubation temperature with fermentation time, type of culture medium and probiotic bacteria, as well as linoleic acid concentrations with the fermentation time and the type of probiotic bacteria ($p<0.05$). By increasing yeast extract concentrations, the final pH was decreased due to increased growth and activity of the bacteria that was resulted to higher lactic acid production. With a rise in temperature from 30 ºC to 38 ºC, the final pH was decreased because of increasing bacterial growth and production of lactic acid.

Conclusion: This study demonstrated that initial pH, fermentation time, incubation temperature and yeast extract concentrations were the most important factors affecting the production of lactic acid, which had a significant effect on the production bioprocess. Although the results of this study showed that milk permeate and cheese whey can be a suitable medium for the production of lactic acid due to their high content of lactose, the cost of using supplements, especially the nitrogen source, is essential.

Keywords: Lactic acid, Cheese whey, Milk permeate, *Lactobacillus acidophilus* LA5, *Bifidobacterium lactis* BB12

www.SID.ir