

تولید و جداسازی اسیدلاکتیک نوع ال (+) از پساب صنایع پنیرسازی

سید احمد عطایی

خلاصه

آب پنیر با شاخص آلودگی زیاد (حدود ۵۰ هزار PPM) از آلاینده‌های خطرناک محیط زیست به شمار می‌رود. این منبع مهم و غنی از لاکتوز (با حدود ۴ تا ۵ درصد لاکتوز) به عنوان سوبسترای مفیدی در تهیه بسیاری از مواد باارزش به کار می‌رود. اسیدلاکتیک یکی از این مواد است که کاربردهای زیادی در صنایع مختلف دارد. خصوصاً ایزومر ال (+) این اسید با قیمتی در حدود ۱۰ برابر نسبت به مخلوط ال (L) و دی (D)، برای بسیاری از مقاصد پزشکی مثل نخ‌های جراحی قابل جذب در بدن و یا پوشش داروهای با رهایش کنترل شده مورد استفاده قرار می‌گیرد. لاکتوباسیل‌ها عمدتاً مخلوط (ال) و (دی) این اسید را تولید می‌کنند. در این تحقیق لاکتوباسیلوس کازی که فقط تولید ایزومر ال (+) را می‌کند مورد استفاده قرار گرفت. یکی از مشکلات اساسی در تولید صنعتی اسیدلاکتیک از محیط تخمیری، این است که اسید تولید شده در غلظت‌های بالا، اثر سوء بر میکروارگانیسم‌ها داشته و تولید اسید را متوقف می‌کند. به طوری که فقط حدود نیمی از لاکتوز موجود در آب پنیر، به اسیدلاکتیک تبدیل می‌شود. بنابراین برای بالا بردن راندمان عمل بایستی اسید تولید شده، همزمان با فرایند تخمیر از محیط عمل جدا شده و غلظت اسید در محیط از مقدار مشخصی زیادتیر نشود. در این تحقیق برای حفظ حالت استریلیته محیط تخمیری، از فرایند جداسازی درجا توسط رزین‌های تبادل یونی تحت کنترل اتوماتیک pH استفاده شد. در مقایسه‌ای که بین فرایند بدون جداسازی با فرایند همراه با جداسازی درجا انجام گرفت، مقدار اسید تولید شده از ۲۲ گرم بر لیتر به ۴۳/۷ گرم بر لیتر افزایش یافت. خلوص محصول با استفاده از پلاریمتر به اثبات رسید.

واژه‌های کلیدی: آب پنیر، اسید لاکتیک ال (+)، لاکتوباسیلوس کازی، جداسازی درجا

مقدمه

چاهها دفع کرده که مشکلاتی را در سیستم فاضلاب و آب‌های زیرزمینی به بار می‌آورد.

لاکتوباسیل‌های موجود در محیط کشت آب پنیر، مخلوط (ال) و (دی) از این اسید را تولید می‌کنند. در سایر کشورها با استفاده از کشت همراه، مخلوط دی (-) و ال (+) این اسید را بدست آورده‌اند. اما لاکتوباسیلوس کازویی فقط ایزومر ال (+) را تولید می‌کند که قیمتی در حدود ۱۰ برابر نسبت به نوع مخلوط آن دارد و برای بسیاری از مقاصد پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲، ۶، ۹، ۱۱).

تولید تخمیری اسیدلاکتیک یک واکنش محدود شونده توسط خود محصول است و بالا رفتن غلظت اسید در محیط تخمیر، اثر بازدارندگی بر رشد میکروارگانیسم‌های تولید کننده اسیدلاکتیک دارد. روش استخراج حلال از جمله روش‌هایی است که برای جداسازی اسید از آن استفاده می‌شود، اما به دلیل به هم زدن حالت استریلیته محیط کشت چندان موفق نبوده است (۵، ۷، ۱۰، ۱۲).

در این پژوهش با استفاده از رزین‌های تبادل یونی، امکان جداسازی در جای (In-situ) اسید مورد نظر با ثابت نگه داشتن اتوماتیک pH در محدوده بهینه نیز در نظر گرفته شده است که ضمن استخراج اسید از محیط در حین عمل تخمیر، حالت استریلیته محیط نیز حفظ شده و راندمان تولید اسید حدود ۶۰ درصد افزایش می‌یابد. با مصرف لاکتوز موجود در آب پنیر، آلودگی فاضلاب کارخانه‌های پنیرسازی به مقدار زیادی کاهش می‌یابد.

مواد و روش‌ها

الف) میکروارگانیسم و محیط پیش کشت
میکروارگانیسم مورد استفاده لاکتوباسیلوس کازویی با شماره ۱۲۹۳ PTCC از انستیتو رازی تهیه شده بود.

توسعه روزافزون کارخانه‌های پنیرسازی با توجه به رشد جمعیت و تأمین پروتئین مورد نیاز بشر، سبب شده است تا مقادیر قابل توجهی آب پنیر (Whey) به سیستم فاضلاب وارد شده و مشکلات زیادی را ایجاد کند. عدم وجود تکنیک‌های اقتصادی جهت کاهش آلودگی (BOD) زیاد (حدود ۵۰ هزار PPM) حاصل از پساب این کارخانه‌ها، که مستلزم صد برابر کاهش BOD برای ورود به سیستم فاضلاب می‌باشد، موجب بروز مشکلاتی در زمینه کنترل آلودگی محیط زیست گردیده است. بنابراین ارائه روش‌هایی برای تصفیه این گونه پساب‌ها، خصوصاً این که در جهت تولید محصولات با ارزش دیگری نیز باشد، هم به لحاظ اقتصادی و هم از لحاظ مسایل زیست محیطی حائز اهمیت است (۴، ۱۰).

آب پنیر با حدود ۵ درصد لاکتوز سوبسترای مناسبی برای تهیه اسیدلاکتیک به شمار می‌رود. این محصول که نتیجه تخمیر لاکتوز موجود در آب پنیر است، امروزه به عنوان ماده بسیار مهمی با کاربرد وسیع در صنایع متفاوت از جمله پزشکی (تهیه نخرهای جراحی قابل جذب در بدن)، دارویی (پایه اصلی در داروهای با آزادسازی کنترل شده)، غذایی (تهیه نوشابه‌های گازدار و ماده‌ای برای جلوگیری از فساد مواد غذایی و ...) مورد توجه قرار گرفته است (۱، ۳، ۴، ۸، ۱۲).

در ایران تنها کارخانه‌ای که از آب پنیر استفاده می‌کند، کارخانه شیر پاستوریزه است که با صرف هزینه زیاد آن را به پودر پنیر تبدیل می‌کند و به گفته صاحبان کارخانه، مخارج بسیار زیادی برای راه‌اندازی و نگهداری این واحد صرف می‌شود. سایر واحدهای تولید پنیر در کشور، آب پنیر را به سیستم فاضلاب وارد و یا آن را در

محیط پیش کشت به نام Media of Rogosa and Sharpe (MRS) حاوی پپتون ۱۰ گرم، عصاره گوشت ۵ گرم، عصاره مخمر ۵ گرم، گلوکز ۲۰ گرم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۲ گرم، تووین ۸۰ یک گرم، دی آمونیم هیدروژن سترات ۲ گرم، استات سدیم ۵ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۵ گرم و سولفات منیزیم ۰/۱ گرم در لیتر که همگی از کمپانی مرک آلمان می باشند تهیه شد (۲). به یک صد میلی لیتر از محیط پیش کشت فوق یک لوپ از میکروارگانسیم مورد نظر تلقیح و پس از یک روز نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد توده سلولی به ۱/۸ گرم بر لیتر رسید.

ب) محیط پایه تخمیر

محیط پایه تخمیری آب پنیر تهیه شده از کارخانه شیرپاستوریزه کرمان بود. مقدار لاکتوز اولیه موجود در آن حدود ۴۴ گرم در لیتر بود که به عنوان سوبسترای اصلی مورد مصرف میکروارگانسیم قرار می گیرد. آب پنیر به علت دارا بودن ویتامین ها و مواد معدنی موجود در شیر اولیه، از جمله محیط های غنی برای رشد باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک به شمار می رود (۳).

ج) تخمیر کننده و متعلقات

تخمیر کننده یک بالن ۱/۵ لیتری گرد شیشه ای خود ساخته است که مجهز به ۵ ورودی و ۲ خروجی می باشد به منظور هم زدن محلول، یک مغناطیس داخل آن گذاشته شده و همچنین یک فیلتر جهت صاف کردن محلول ورودی به ستون درون آن تعبیه شد. به دلیل این که میکروارگانسیم در شرایط کمبود اکسیژن فعالیت بیشتری از خود نشان می دهد (خاصیت میکرو آرو فیلی)، فضای بالای فرمنتور توسط گاز ازت اشباع شد.

د) ستون های تبادل یونی

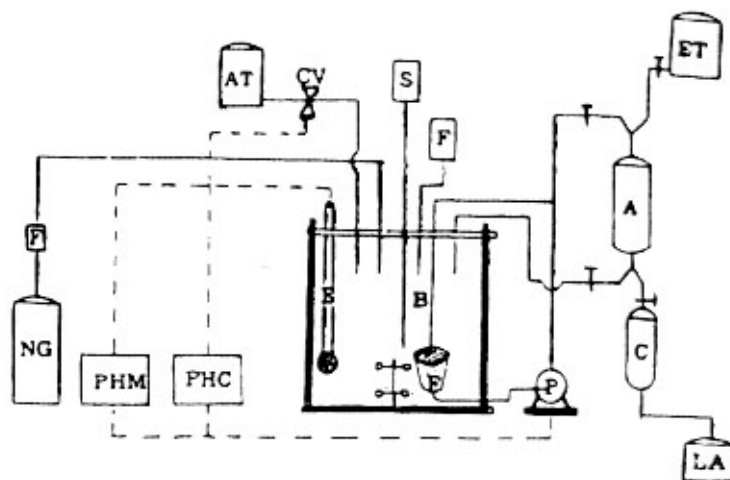
به منظور جداسازی اسید لاکتیک از محیط تخمیر، از رزین آمبرلیت (IRA-400, CL-) ساخت Rohmand Haas (USA) استفاده شد. ابتدا رزین توسط سود ۲/۵ نرمال به صورت هیدروکسید درآمده و پس از آن با عبور محیط تخمیری از درون ستون، یون های لاکتات جایگزین یون های هیدروکسید شده و عملیات جداسازی آغاز گردید. پس از اشباع ستون، عمل احیاء (Elution) توسط سود ۱/۵ نرمال صورت گرفته و نمک اسید لاکتیک به صورت لاکتات سدیم از انتهای ستون خارج شده و وارد ستون دوم که محتوی رزین آمبرلیت (IR-120, H+) است، می شود و با جایگزینی یون های سدیم با هیدروژن، اسید لاکتیک به صورت خالص از انتهای ستون دوم به دست می آید. ستون دوم با اسید کلریدریک ۱/۵ نرمال احیاء می شود (۱۲).

ه) آنزیم پروتئاز

برای تهیه آنزیم پروتئاز به ۱۰ میلی لیتر از محیط Nutrientbroth (آبگوشت مغذی) ساخت کمپانی مرک آلمان (۲)، یک لوپ از باکتری باسیلوس سوبتلیس تهیه شده از انستیتو رازی ((PTCC 1204) تلقیح گردید و به مدت یک روز در دمای ۳۰°C با دور هم زن ۲۵۰ rpm نگهداری شد. در این مدت توده سلولی به ۲/۴ گرم بر لیتر رسیده و آنزیم پروتئاز تولید شده در این محیط، در مرحله بعدی جهت هیدرولیز پروتئین های محلول آب پنیر مورد استفاده قرار گرفت (۱۳).

و) روش کار

یک لیتر آب پنیر با تیرگی حدود ۵۰ هزار PPM



E: الکترود متر

شکل ۱: دستگاه‌ها و تخمیر کننده مورد استفاده در تخمیر همراه با جداسازی

زانت‌های ستون اول خارج و وارد ستون دوم (مبادله کننده کاتیون) IR-120 می‌شود و اسیدلاکتیک به صورت خالص از انتهای ستون دوم به دست می‌آید (شکل ۱).

میزان لاکتوز توسط روش استاندارد سوموگی - نلسون (somogi-nelson) با اندازه‌گیری جذب محلول رنگی در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد (۱۰).

نتایج

میزان اسیدلاکتیک تولید شده توسط دستگاه کروماتوگراف با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد (نوع ستون PLO ODS، ساخت Waters associates, USA، حلال مخلوط آب - متانول با نسبت‌های مساوی و شدت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه با آشکارساز UV در طول موج ۲۷۵ نانومتر) نتایج حاصل از دستگاه HPCL مقدار اسید به دست آمده را پس از گذشت ۳۸ ساعت از شروع تخمیر، ۳۷/۴ گرم بر لیتر نشان داد.

نوع ایزومر اسید با خواندن میزان چرخش نوری توسط دستگاه پلاریومتر انجام گرفت. به طوری که چرخش ویژه اسید تولید شده ۲/۶+ بود که مربوط به نوع (+) L می‌باشد (۹).

A: ستون تبادل کننده آنیون
B: یوراگور
C: ستون تبادل کننده کاتیون
F: فیلتر
S: محل نمونه‌گیری
ET: محفظه محلول elution
NG: کنترل گاز ارت
PHC: دستگاه کنترل
P: پمپ
AT: محفظه قلیا
CV: شیر کنترل
E: الکترود متر
LA: محفظه جعب آوری اسید لاکتیک
PHM: pH متر

قطره قطره به محیط تخمیر افزوده می‌شود تا اینکه pH به ۶/۸ برسد. در این صورت مجرای خروجی سود قطع می‌شود، بنابراین pH در محدوده ۶×۰/۱ ثابت می‌ماند.

پس از اتمام این دوره، غلظت فرم یونی لاکتات به اسیدلاکتیک در محیط حدود ۱۰۰ برابر است و ستون آمادگی جذب یون‌های لاکتات را دارد.

از طرف دیگر دستگاه کنترل pH، با پمپی که محیط تخمیر را درون ستون مبادله کننده آنیون (IRA-400) وارد می‌کند مرتبط بوده است و همزمان با عمل تخمیر و با کاهش pH، پمپ روشن شده و پس از جداسازی یون‌های لاکتات، مابقی مایع تخمیری خارج شده از انتهای ستون، وارد فرمنتور شده و pH را در محدوده ۵/۹-۶/۸ ثابت نگه می‌دارد و پس از کامل شدن عمل تخمیر (حدود ۳۸ ساعت)، ارتباط ستون با فرمنتور قطع می‌شود و با احیاء رزین (Elution) توسط سود ۱/۵ نرمال، لاکتات سدیم

ترتیب بهره‌وری سیستم از ۰/۱۸۳ گرم در لیتر در ساعت به ۰/۹۸۴ گرم بر لیتر در ساعت افزایش یافت مضافاً به اینکه در فرایند تخمیر همراه با جداسازی اسید، مقدار آلودگی فاضلاب به نحو چشمگیری کاهش یافت به طوری که اندازه‌گیری میزان COD (Chemical oxygen demand) پساب، حدود ۶۵ درصد کاهش آلودگی آن را نشان می‌دهد.

بنابراین با استفاده از روش فوق علاوه بر اینکه فاضلاب صنایع پنیرسازی تا حد مطلوبی تصفیه می‌شود و آلودگی آب پنیر کاهش می‌یابد ماده بسیار مهم صنعتی (اسیدلاکتیک نوع ال (+)) نیز تولید می‌شود.

Summary

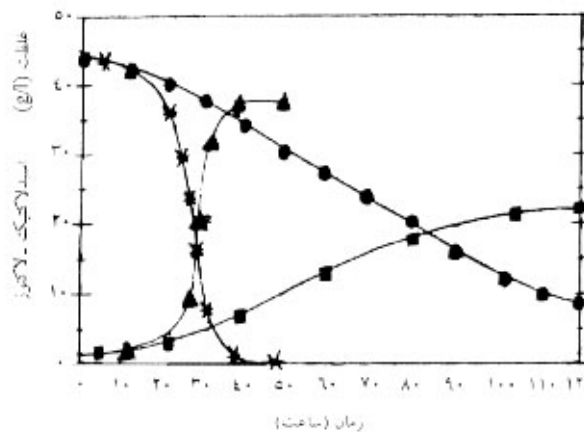
L (+) Lactic Acid Production and separation from Dairy Wastes (Whey): In Situ Separation of Lactic Acid Using Ion-Exchange Resins in Automatic Control of pH.

SA. Ataie, MS.1

1. Instructor of Environmental Health Department, Health School, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran

Whey with a large amount of BOD (50000 PPM) is a dangerous environmental pollutant. This important source of lactose (4-5%) is a useful substrate for a range of fermentation processes. Lactic acid with several applications in industries is one of these products. Specially L (+) isomer of this acid worthing 10 times as much as the mixture of L & D, is used in medical purposes such as absorbable surgical filaments and controlled release drugs. Several strains of Lactobacillus produce a mixture of L & D isomers but the strain employed in this research (Lactobacillus casei) produces only L (+) form. The produced lactic acid prevents acid production in fermentation, so that almost half of lactose (about 22g/L lactic acid) is converted to Lactic acid. Therefore in order to increase the output the produced acid should be separated. In this research Lactobacillus Casei was used to produce L (+) Lactic acid and under sterile conditions requirement in situ separation of acid using Ion-exchange resins at automatic control of pH were employed. At the end, Lactic acid yield in non extractive fermentation compared with extractive process showed an increase from

اثر فرایند تخمیر همراه با جداسازی بر روی تولید اسیدلاکتیک در نمودار ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند که ۳۸ ساعت پس از شروع تلقیح، ۹۹/۳ درصد از لاکتوز به مصرف رسیده و مقدار اسید تولید شده ۳۷/۴ گرم بر لیتر بود.



نمودار ۱: مقایسه مقدار اسیدلاکتیک تولید شده و لاکتوز باقیمانده

در فرایند تخمیر بدون جداسازی با فرایند همراه با جداسازی
مقدار اسید در فرایند بدون جداسازی - مقدار اسید در فرایند همراه با جداسازی
مقدار لاکتوز در فرایند بدون جداسازی × مقدار لاکتوز در فرایند همراه با جداسازی

بحث و نتیجه‌گیری

آزمایشات پلاریمتری نشان داد که لاکتوباسیلوس کارژی، ایزومر خالص اسیدلاکتیک ال (+) را تولید می‌کند. چنانچه در نمودار ۱ مشهود است، در فرایند تخمیر بدون جداسازی، با شرایط مشابه پس از ۳۸ ساعت، مقدار اسید تولید شده تنها ۶ گرم بر لیتر بود به طوری که در مدت زمان ۵ روز این مقدار به ۲۲ گرم در لیتر رسید که حداکثر تولید آن در این فرایند است. اما در فرایند تولید و جداسازی همزمان توسط رزین‌های تبادل یونی، علاوه بر کاهش زمان تخمیر از ۵ روز (۱۲۰ ساعت) به ۳۸ ساعت، ۶۰ درصد افزایش در مقدار اسیدلاکتیک تولید شده حاصل شد و مقدار اسید به ۳۷/۴ گرم در لیتر رسید. بدین

Key Words: Whey, L (+) Lactic acid, Lactobacillus casei, In-situ separation

22g/L to 43.7 g/L. The polarimetric analysis showed pure L(+) product.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2000; 7(4): 200-205

1. Barrera Denise A. Synthesis and characterization of a novel biodegradable polymer. Poly (lactic acid Co lysine). *DAI-B*1993; 54(6): 3096-3099.
2. Budavari S: The merck index. 12th ed., USA, Merck Co. Inc, 1996; p911.
3. Faith WL: Encyclopedia of chemical technology. Interscience Pub, 1993; pp576-577.
4. Gerald Reed: Biotechnology "Food and production with microorganism." Verlag chemie. 1983.
5. Hatzini Kolaou DG and Wang HY. Extractive fermentation systems for organic acids production. *Can J Chem Eng*1992; 70: 543-552.
6. Holland SJ. Polymers for biodegradable medical devices. *J controlled release*1993; 23(3): 209-220.
7. Kulparathipanja SR: Adsorptive separation of organic acid by the sorbe process. *Sepr Technol Elsevier Science BV* 1994; pp17-23.
8. Lewis D: Biodegradable polymers and drug delivery systems. New York, Derkker 1990; pp203-208.
9. Moazami N: Persian type culture collection (P.T.C.C.). 3rded., Iranian Research Organization for Science & Technology, 1989; p291.
10. Roukas T and Kotzekidou P. Production of lactic acid from deprotonized whey by coimobilized lactobacillus casei and lactococcus lactic cells. *Enzyme microbiol Technol*1991; 13(4): 33-38.
11. Sigma. Biochemicals and Reagents for life science Research Molecular Biology. 1988; p657.
12. Srivastava A, Roychoudhurg P and Sahai V. Extractive lactic acid fermentation using Ion-exchange resins. *Biotech & Bioeng*1992; 39(1): 607-513.
13. Vaccari G, Gonzalez Vara A, Gampi AL, Dosi E and Brigidi P. Fermentative production of L-Lactic acid by lactobacillus casei. *Appl Microbiol Biotechnol*1993; 40: 23-27.