مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال دوم، شماره۳، پاییز ۱۳۸۶ ، صفحات ۵۷ تا ۶۴

تولید اسید لاکتیک توسط سویه‌های مختلف لاکتوباسیل

سعید میردامادی[۱] ، افسانه رجبی[۲]، فرزانه عزیز محسنی[۳]، بهمن مومن[۴]

۱- نویسنده مسئول: استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران و سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
پست الکترونیکی: Mirdamadi@irost.ir
۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
۳- دکتری علوم آزمایشگاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
۴- کارشناس ارشد بیوشیمی، پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۷ تاریخ پذیرش: ۸۶/۷/۲۳

چکیده

سابقه و هدف: اسید لاکتیک با یک اتم کربن نامتقارن، دارای دو فرم ایزومر نوری (+) L و (-) D است. اسید لاکتیک در صنایع غذایی، چرم، نساجی، کشاورزی و پزشکی کاربرد دارد. امروزه فرم ایزومر نوری L(+) آن در صنایع دارویی و ترکیبات حدواسط دارویی، پلیمرهای تجزیه شونده، جهت ساخت تجهیزات پزشکی کاربرد وسیعی یافته است. از میکروارگانیسم‌های فراوانی به عنوان تولید کننده اسید لاکتیک نام برده شده است، اما با توجه به اینکه لاکتوباسیل‌ها GRAS تشخیص داده شده‌اند، در این تحقیق با هدف جداسازی بهترین سویه تولیدکننده اسید لاکتیک نوع L(+) سویه‌های مختلف لاکتوباسیل بررسی شد.

مواد و روش‌ها: آمپول‌های لیوفیلیزه لاکتوباسیل‌ها از بخش کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. این آمپول‌ها در شرایط کاملا استریل، روی محیط جامد شیب‌دار MRS کشت و سپس در محیط مایع MRS به عنوان پیش کشت تلقیح شدند. سپس ۲/۵میلی لیتراز محیط پیش کشت حاوی 10^8 باکتری در میلی‌لیتر به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیطِ تولید، تلقیح شد. و در دمای ۳۰°C و ۱۸۰ دور در دقیقه، گرماگذاری شدند. میزان تولید اسید لاکتیک، مصرف گلوکز و رشد هر یک از سویه‌ها حداقل با سه تکرار اندازه‌گیری شد.

یافته ها: بر اساس نتایج به دست آمده، در محیط تولید دارای ۱۰۰ گرم در لیتر گلوکز با حداقل هوادهی در ارلن‌های کاملا در بسته، سویه میکروبی *Lactobacillus casei ssp. casei* PTCC 1608 با تولید g/L ۹۵ لاکتات کلسیم و بهره‌دهی ۰/۹۸ گرم در لیتر ساعت با بازده واکنش ۹۵٪ و همچنین سویه *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637 با تولید ۸۱/۴۰ گرم در لیتر لاکتات کلسیم و بهره‌دهی ۰/۸۵ گرم در لیتر ساعت و بازده واکنش ۶۳٪ به عنوان بهترین باکتری‌های هموفرمانتاتیو تولید کننده نوع ایزومر نوری L(+) اسید لاکتیک مشخص شدند.

نتیجه‌گیری: سویه‌های *L. casei ssp. casei* PTCC 1608 و *L. rhamnosus* PTCC 1637 با تولید مقادیر مناسب اسید لاکتیک نوع L(+) جهت تولید اسید لاکتیکِ مجاز برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی و تدوین دانش فنی تولید در شرایط نیمه صنعتی به عنوان نگهدارنده غذایی، ارزشمند هستند.

واژگان کلیدی: اسید لاکتیک، تولید، بهینه‌سازی شرایط کشت، غربالگری، لاکتوباسیل

• مقدمه

اسید لاکتیک (۲- هیدروکسی پروپیونیک اسید) با فرمول $CH_3CHOHCOOH$ یک اسید آلی هیدروکسیل‌دار ضعیف با وزن مولکولی کم و PKa =۳/۸۶ در ۲۵°C است. اسید لاکتیک برای اولین بار توسط Scheele شیمیدان سوئدی در سال ۱۷۸۰ از شیر جدا شد (۳-۱)، سپس، لویی‌پاستور به بررسی روند تخمیر آن پرداخت و با جداسازی انواع باکتری‌های لاکتیک، از آنها در تهیه غذاهای تخمیری از شیر،

Archive of SID
www.SID.ir

سبزیجات، غلات و گوشت استفاده کرد و نشان داد که این اسید در برابر فساد میکروبی از غذاها محافظت می‌کند(۲، ۱).

اسید لاکتیک برای اولین بار در سال ۱۸۸۱ توسط Charles Avery در آمریکا به صورت تجاری تولید شد(۵،۴). این اسید، دارای فعالیت نوری است و دو ایزومر D(-) و L(+) آن شناخته شده است. از آنجا که بدن انسان فاقد آنزیم D لاکتات دهیدروژناز است، مصرف زیاد اسید لاکتیک D(-) و تجمع آن در بدن می‌تواند مخاطراتی برای سلامتی انسان داشته باشد. به همین دلیل، وجود اسید لاکتیک D(-) در صنایع غذایی و دارویی، چندان مناسب نیست و WHO برای مصرف آن محدودیت قائل شده است.

در صنایع تخمیری اسید لاکتیک، از سویه‌های میکروبی جور تخمیر (همو فرمانتاتیو) استفاده می‌شود که با راندمان بالا می‌توانند فقط L(+) اسید لاکتیک را تولید کنند (۶، ۱). از آنجا که تولید ایزومر نوری خالص، با روش شیمیایی امکان‌پذیر نیست، امروزه استفاده از روش‌های تخمیری در تولید آن افزایش یافته است. به طوری که تولید بیولوژیکی اسید لاکتیک در حدود بیش از نیمی از کل تولید جهانی را به خود اختصاص داده است (۹-۷).

موارد استفاده از اسید لاکتیک را می توان به دو دسته کاربرد اسید لاکتیک و مشتقات اصلی آن طبقه‌بندی کرد که به طور عمده به صنایع غذایی، دارویی و شیمیایی مربوط می‌شود. در صنایع غذایی از اسید لاکتیک در تولید پنیر، ماست، خیار شور، اسانس‌ها، شربت آبلیمو، استخراج آبمیوه‌ها و سایر فراورده‌های غذایی و همچنین جلوگیری از فساد میکروبی غذاهای کنسرو شده و به عنوان افزودنی طبیعی در ایجاد طعم و مزه در غذاها استفاده می شود (۱۱، ۱۰). همچنین ممکن است از آن در تولید سایر اسیدهای آلی، اسیدهای آکریلیک، استالدئید و اتانول استفاده شود (۱۲). جدیدترین کاربرد اسید لاکتیک در ارتباط با تهیه پلاستیک‌های زیست تجزیه‌پذیر و از جمله پلی‌لاکتیک اسیدها (PLA) است که در موارد بالینی و ساخت ابزارآلات پزشکی نظیر نخ بخیه، ابزار آلات پیوندی، داروهای آهسته رهایش کنترل شونده و حشره‌کش از آن استفاده می‌شود (۷).

تعدادی از لاکتوباسیل‌ها می‌توانند میزان بالایی اسید لاکتیک تولید کنند. موضوع حاضر در سویه‌های مختلف لاکتوباسیل مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که جهت تولید نیمه صنعتی هر محصول تخمیری باید مراحل تولید با مواد اولیه موجود در همان کشور بررسی شود. از آنجا که گلوکز حاصل از هیدرولیز نشاسته، یکی از منابع تولید صنعتی (۴) اسید لاکتیک است و همچنین بهترین سوبسترای تولید نیز هست(۱)، ابتدا مراحل آزمایشگاهی بر مبنای استفاده از گلوکز با درجه خلوص مناسب برنامه‌ریزی شد تا پس از بهینه سازی شرایط در بهترین حالت، شرایط تولید به سمت منابع سوبسترای تولید داخل مانند گلوکز و لاکتوز صنعتی و در نهایت، آب پنیر هدایت شود و میزان تولید در مراحل نیمه صنعتی با شرایط و مواد استاندارد، قابل قیاس شود.

• مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌ها: از بخش کلکسیون میکروبی سازمان پژوهشهای علمی وصنعتی ایران آمپول‌های لیوفیلیزه لاکتوباسیل تولید کننده اسید لاکتیک شامل

Lactobacillus sp. PTCC 1332
L. delbrueckii ssp. delbrueckii PTCC 1333
L. plantarum PTCC 1058
L. rhamnosus PTCC 1637
L.casei ssp.casei PTCC 1608

دریافت شد. این آمپول‌ها در شرایط کاملا استریل روی محیط جامد MRS agar[1] شیب‌دار کشت داده و در جار CO_2 و در دمای ۳۰°C به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند.

محیط کشت رشد و پیش کشت: برای رشد مناسب از محیط مایع MRS استفاده شد و بعد از تلقیح سویه باکتری‌ها در محیط رشد، فلاسک‌ها درشرایط ۳۰°C و ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۳۶ ساعت گرماگذاری شدند.

فرمولاسیون محیط کشت تولید اسید لاکتیک: بر اساس بررسی‌های آزمایشگاهیِ بهینه سازی، محیط کشت

[1] - Man, Rogosa and Sharpe medium

Archive of SID

www.SID.ir

طراحی شده با مقادیر متفاوت گلوکز به عنوان منبع کربن مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات دیگر محیط کشت عبارت بودند از (بر حسب گرم در لیتر): عصاره مخمر۱۵ ، استات سدیم ۱، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۵، دی هیدروژن پتاسیم فسفات ۰/۵، سولفات منیزیم ۰/۲، سولفات منگنز ۰/۰۳، سولفات آهن ۰/۰۳ . pH حدود ۰/۱± ۶ تنظیم شد. pH محیط تولید در طول تخمیر، با افزودن متناوب ۱٪ کربنات کلسیم استریل تعدیل شد (۸).

شرایط تخمیر: ۵۰ml محیط تولید به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه شد. ۲/۵ml از محیط پیش کشت حاوی 10^8 باکتری در میلی‌لیتر به محیط تولید، تلقیح شد و سپس ارلن‌ها در دمای $30^{\circ}C$ و ۱۸۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. میزان تولید محصول و میزان مصرف سوبسترا برای هر یک از سویه ها اندازه‌گیری شد. با توجه به اینکه لاکتو باسیل ها به صورت میکروآئروفیل رشد می‌کنند، شرایط کشت به دو صورت فلاسک‌های کاملا در بسته و فلاسک‌های با شرایط تبادل گاز مناسب، طراحی شد. درِ فلاسک‌های کاملا بسته، توسط گاز پنبه فشرده به وسیله پارافیلم و فویل آلومینیومی و درِ فلاسک‌های با شرایط تبادل گاز مناسب با گاز پنبه‌های غیر فشرده استریل بسته شد.

روش اندازه گیری اسید لاکتیک: غلظت اسید لاکتیک به روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شد. با اضافه کردن اسید سولفوریک غلیظ به اسید لاکتیک و حرارت در بن ماری جوش بعد از ۱۰ دقیقه، استالدئید حاصل می شود. استالدئید در حضور سولفات مس ۴٪ و پارافنیل فنل (۱/۵٪ در اتانول)، بعد از ۳۰ دقیقه کمپلکس رنگی ایجاد می‌کند که میزان جذب نوری آن درطول موج ۵۷۰nm اندازه‌گیری شد (۹).

روش اندازه گیری گلوکز: غلظت گلوکز به روش آنزیمی، اندازه‌گیری شد. به این ترتیب است که گلوکز توسط آنزیم گلوکز اکسیداز به گلوکونیک اسید و آب اکسیژنه تبدیل می‌شود. آب اکسیژنه، تحت تاثیر آنزیم پراکسیداز و در حضور فنل و ۴- آمینو آنتی پیرین به کینون قرمز رنگی تبدیل می‌شود که رنگ ایجاد شده نسبت مستقیم با مقدار گلوکز موجود در نمونه دارد. ۲۰ دقیقه کمپلکس رنگی ایجاد شده درطول موج ۵۰۰nm بررسی و مقدار گلوکز نمونه بر اساس منحنی استاندارد اندازه‌گیری شد (۱۳).

بررسی نوع ایزومر نوری اسید لاکتیک: مایع تخمیر حاصل از کشت سویه‌های مولد در هر مرحله، توسط کیت آنزیمی D-لاکتات دهیدروژناز و L- لاکتات دهیدروژناز (Boehringer Mannheim Biochemica)مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش، آنزیم اختصاصی، لاکتات حاصل را به پیرووات و NADH+H تبدیل می‌کند. جذب نوری NADH به همراه معرف در طول موج ۳۳۴nm اندازه‌گیری شد. بدیهی است که میزان تولید NADH در حضور هر آنزیم، معرف میزان نوع ایزومر نوری مربوط به آن آنزیم است(۱).

مواد: کلیه موادشیمیایی و محیط‌های کشت تجاری استفاده شده در این تحقیق از شرکت‌های Fluka, Merck و PanReac تهیه شد.

• یافته‌ها

بر اساس بررسی‌های انجام شده، از گلوکز به عنوان بهترین منبع کربن (۶۰g/L) عصاره مخمر به عنوان منبع ازت، استات سدیم به عنوان منبع کربن و سدیم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات و دی‌هیدروژن پتاسیم فسفات به عنوان منابع بافری استفاده شد. املاح مورد نیاز عبارت بودند از: سولفات منیزیم، سولفات منگنز و سولفات آهن. در طول تخمیر، تعدیل pH محیط تولید با افزودن متناوب ۱٪ کربنات کلسیم استریل انجام شد (۱۲، ۱۰، ۹، ۸، ۵، ۱) .

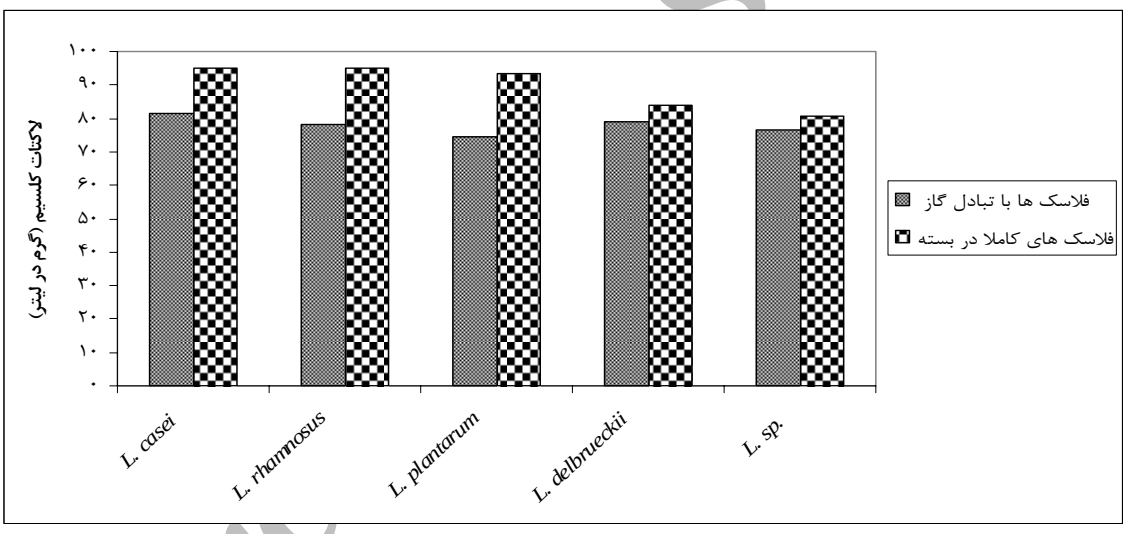
همان گونه که در شکل۱ ملاحظه می‌شود، تولید لاکتات کلسیم توسط سویه‌های *L.casei*، *L.rhamnosus* و *L.plantarum* در دو شرایط هوادهی و بدون هوادهی، بیشتر از سویه‌های دیگر بود. در تمام موارد، شرایط بی‌هوازی با تولید بیشتر، ارجحیت داشت. این نکته در مراحل افزایش حجم تولید و در فرمانتورها از اهمیت خاصی برخوردار است؛ زیرا عدم هوادهی باعث کنترل بهتر آلودگی و کاهش بسیار زیاد هزینه تولید می‌شود.

Archive of SID

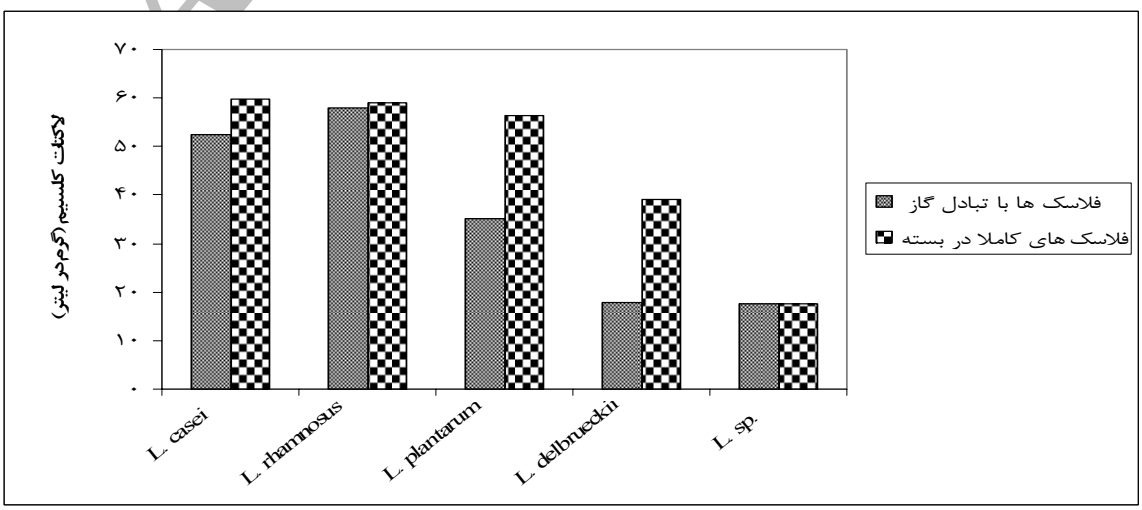
www.SID.ir

در شرایط تبادل مناسب گازها، سویه *Lactobacillus rhamnosus* با ۵۷/۸۳ گرم در لیتر و سویه *Lactobacillus casei subsp. casei* با ۵۲/۸۳ گرم در لیتر و تولید در ارلن‌های کاملا در بسته، سویه *Lactobacillus casei subsp. casei* با ۵۹/۸۷ گرم در لیتر و سویه *Lactobacillus rhamnosus* با ۵۸/۹۶ گرم در لیتر بالاترین میزان لاکتات کلسیم را تولید کردند. این دو سویه به این دلیل اهمیت دارند که بر اساس تست‌های انجام شده در این تحقیق (نتایج ارائه نشده است) این دو سویه فقط ایزومر نوری L(+)Lactic acid دارند در حالی که سویه‌های دیگر، مخلوط دو ایزومر نوری را تولید می‌کنند.

از آنجا که نسبت C/N یک عامل اساسی در شرایط تولید است، باید در تولید اقتصادی محصول به سمت منابع کشت ارزان قیمت گام برداشت. بررسی میزان گلوکز واقعی مورد نیاز تولید، اولین گام تحقیق محسوب می‌شود. آزمایش‌هایی با مقادیر مختلف گلوکز طراحی شد تا مقدار بهینه، مشخص شود و مبنایی برای بیشترین تولید با محیط‌های استاندارد باشد. بیشترین میزان تولید با غلظت ۱۰۰ گرم در لیتر گلوکز به دست آمد. نتایج حاصل از محیط حاوی ۱۰۰g/l گلوکز در شکل۲ نشان داده شده است.



شکل۱- تولید لاکتات کلسیم توسط لاکتو باسیل‌های مختلف در محیط دارای ۶۰g/l گلوکز در شرایط متفاوت هوادهی



شکل۲ - تولید لاکتات کلسیم توسط لاکتو باسیل‌های مختلف در محیط دارای ۱۰۰g/l گلوکز در شرایط متفاوت هوادهی

www.SID.ir

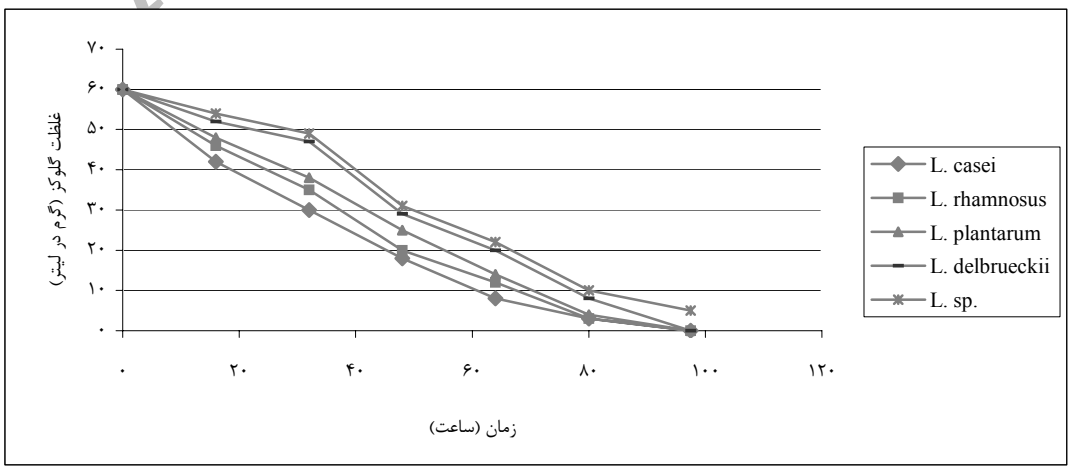
در این شرایط، تقریبا همه سویه‌ها تولید مناسبی داشتند. همان گونه که در شکل دیده می‌شود، در شرایط مناسب تبادل گازها، سویهٔ *L. casei subsp. casei* با تولید ۸۱/۴۰g/l لاکتات کلسیم و در ارلن‌های کاملا در بسته با تولید ۹۵g/l لاکتات کلسیم، بیشترین تولید را داشت. سویه *L. rhamnosus* با تولید ۹۴/۹۷ و *L.plantarum* با تولید ۹۳/۶۱ در رده‌های بعدی قرار داشتند که از نظر آماری تفاوت چشمگیری در تولید نشان ندادند و با اندکی بهینه‌سازی از تمام سویه‌های فوق می‌توان استفاده کرد. این نتیجه با توجه به اینکه از ابتدا سویه‌های خریداری شده با هدف تولید صنعتی، انتخاب شدند، قابل پیش بینی بود. نتایج مقایسه سویه‌های فوق در جدول۱ نشان داده شده است. بدیهی است که انتخاب بهترین سویه برای تولید اسید لاکتیک باید با تکیه بر بهره‌دهی، راندمان و میزان تولید در نظر گرفته شود. بر اساس نتایج ارائه شده، سویه *L. casei ssp casei* PTCC 1608 بهترین گزینه است.

سینتیک مصرف سوبسترا و تولید محصول در شرایط بهینه از موارد دیگری است که در تولید یک ماده بیولوژیک اهمیت دارد. از آنجا که راندمان تبدیل گلوکز به اسید لاکتیک برای سویه‌های مختلف، متفاوت و از۵۹٪ تا ۹۵٪ (جدول ۱) متفاوت است، شیب مصرف گلوکز با تولید محصول در سویه‌های بررسی شده متفاوت بود، ولی از روند مشابهی پیروی می‌کرد. از آنجا که حداکثر تولید هر سویه در شکل‌های ۱ و ۲ و جدول۱ ارائه شده، در شکل۳ بر روند مصرف سوبسترا تأکید دارد که نشان دهنده روند تولید نیز هست. بدیهی است که بیشترین میزان تولید هر سویه در زمان حداکثر مصرف سوبسترا است و مناسب ترین منحنی تولید برای *L. casei ssp casei PTCC 1608* با ضریب تبدیل ۹۵٪ سوبسترا به محصول است و شیب تولید باکتری‌های دیگر نسبت به شیب مصرف سوبسترا ضریب کمتری دارد.

جدول۱ - میزان حداکثر تولید، بهره وری و بازده سویه‌های لاکتوباسیل در شرایط بهینه

شماره سویه‌ها **(PTCC)**	۱۶۰۸	۱۶۳۷	۱۰۵۸	۱۳۳۳	۱۳۳۲
لاکتات کلسیم(گرم در لیتر)	۹۵	۸۱/۴۰	۹۳/۸۱	۷۹/۱۴	۷۶/۴۳
بهره‌دهی (گرم در لیتردر ساعت)	۰/۹۸	۰/۸۵	۰/۹۸	۰/۸۲	۰/۸۰
بازده **(%)**	۹۵	۶۳	۷۲	۶۱	۵۹

PTCC 1332: *Lactobacillus sp*, PTCC 1333*: L.delbrueckii ssp delbrueckii*, PTCC 1058 : *L. plantarum* , PTCC 1637: *L. rhamnosus*, PTCC 1608: *L. casei ssp casei.*



شکل۳ - غلظت گلوکز در محیط دارای ۱۰۰g/l گلوکز در فلاسک‌های کاملا در بسته

Archive of SID

www.SID.ir

• بحث

در فرایند تولید تخمیری اسید لاکتیک، گزارش‌های متعددی دربارهٔ سویه‌های میکروبی مختلف از جمله لاکتوباسیل‌ها و رایزوپوس اوریزآ وجود دارد (۱۵، ۱۴). سویه‌های لاکتوباسیل به دلیل بازده بالاتر تولید، از شاخص‌ترین گونه‌های صنعتی محسوب می‌شوند باید به این نکته هم اشاره کرد که در فرایند تخمیر اسید لاکتیک، به علت pH اسیدی، غلظت کم اکسیژن و غلظت بالای لاکتات تولید شده، احتمال بروز آلودگی میکروبی، محدود است.

از آنجا که در فرایند تولید اسید لاکتیک، اسید تولید شده، اثر مهارکنندگی روی سویه تولید کننده اسید لاکتیک دارد و سبب کاهش رشد و تولید می‌شود، pH نمونه‌ها در طول تخمیر به طور متناوب تعیین شد و با افزودن کربنات کلسیم استریل ضمن تعدیل pH از اثر مهار کنندگی اسید حاصل هم جلوگیری به عمل آمد. برای انتخاب سویهٔ مناسب تولیدکننده اسید لاکتیک، پنج سویه گزارش شده در مقالات مورد بررسی قرار گرفت. هریک از سویه‌ها در محیط تولید پایه حاوی ۶۰ گرم در لیتر گلوکز به عنوان منبع کربن، کشت داده شدند. مقدار اسید لاکتیک تولید شده توسط هر سویه تعیین شد. غلظت گلوکز موجود در محیط به عنوان منبع کربن نیز در فواصل زمانی به طور مرتب به روش آنزیمی اندازه‌گیری شد و تا به پایان رسیدن آن، فرایند تخمیر ادامه یافت. نتایج به دست آمده بر اساس میزان تولید لاکتات کلسیم بعد از به پایان رسیدن گلوکز محیط در محیط دارای ۶۰g/l گلوکز با شرایط هوادهی و بدون هوادهی در شکل۱ نشان داده شده است.

در شرایط تبادل مناسب گازها، سویهٔ *Lactobacillus rhamnosus* با ۵۷/۸۳ گرم در لیتر تولید دارای بهره‌دهی ۰/۸۰ گرم در لیتر ساعت و بازده ۹۶٪ بود و سویه *Lactobacillus casei subsp. Casei* با ۵۲/۸۳ گرم در لیتر تولید دارای بهره‌دهی ۰/۷۳ گرم در لیتر ساعت و بازده۸۷٪ بود.

باتوجه به میکرو آئروفیلیک بودن سویه‌ها و نیاز به حضور CO_2 در مراحل رشد، تولید در ارلن های کاملا در بسته، شرایط بهتری دارد؛ زیرا در این شرایط، تولید لاکتات کلسیم افزایش می‌یابد و سویه‌ها مسیر متابولیکی هموفرمانتاتیو را طی می‌کنند. در این شرایط، سویهٔ *Lactobacillus casei subsp. casei* با ۵۹/۸۷ گرم در لیتر تولید دارای بهره‌دهی ۰/۸۳ گرم در لیتر ساعت و بازده ۹۹٪ و سویه *Lactobacillus rhamnosus* با تولید ۵۸/۹۶ گرم در لیتر دارای بهره‌دهی ۰/۸۲ گرم در لیتر ساعت و بازده ۹۸٪ بود.

به این ترتیب، با کاهش اکسیژن محلول در محیط افزایش تولید و بهره‌دهی دیده می‌شود. بیشتر سویه های میکروآئروفیلِ *Lactobacilli* در غیاب اکسیژن یا مقادیر ناچیز آن، فعالیت بالاتری از خود نشان دادند (شکل ۱).

Tsengو Montive نیز در بررسی‌های خود نشان دادند که در تعدادی از سویه‌های*Lactobacilli*، با افزایش غلظت اکسیژن محلول در محیط کشت، مکانیسم تخمیر هتروفرمانتاتیو جایگزین مسیر متابولیک همو فرمانتاتیو می‌شود که این موضوع، روند تولید اسید لاکتیک را تا حد قابل توجهی کاهش می‌دهد (۴).

برای افزایش میزان تولید اسید لاکتیک، غلظت گلوکز به ۱۰۰ گرم در لیتر افزایش یافت. افزایش گلوکز بر اساس بررسی‌های انجام شده در مرحله بهینه‌سازی در آزمایشگاه بود که نشان داد افزایش گلوکز تا ۱۰۰ گرم در لیتر باعث افزایش تولید می‌شود، بدون اینکه تأثیری بر بازدهی داشته باشد. به نظر می‌رسد که علت، عدم تاثیر گلوکز بر فعالیت آبی (aw) و نسبت کربن به ازت (C/N) محیط باشد. رشد این میکروارگانیسم‌ها در بهترین شرایط ثابت باقی می‌ماند. آزمایشات نشان داد که افزایش بیش از

Archive of SID

www.SID.ir

۱۰۰گرم در لیتر گلوکز، باعث کاهش میزان تولید می‌شود.

در محیط‌های دارای ۱۰۰g/l گلوکز بعد از گذشت ۹۶ ساعت، تقریبا گلوکزی باقی نمانده و زمان تخمیر خاتمه یافته تلقی می‌شد. نتایج آزمایشات بر اساس میزان تولید لاکتات کلسیم بعد از به پایان رسیدن گلوکز در محیط دارای ۱۰۰ گرم در لیتر گلوکز درشکل ۲ ارائه شده است. بیشترین میزان تولید در این محیط، به سویه *L. casei subsp. casei* با تولید ۸۱/۴۰g/l لاکتات کلسیم، بهره‌وری ۰/۸۵ گرم در لیتر ساعت و بازده ۸۱٪ تعلق داشت.

سپس میزان تولید در ارلن های کاملا در بسته بررسی شد که افزایش قابل ملاحظه تولید و بهره‌وری داشت. دراین شرایط، *Lactobacillus casei subsp. casei* تولید ۹۵g/l لاکتات کلسیم، بهره‌دهی ۰/۹۸ گرم در لیتر ساعت وبازده ۹۵٪ به دست آمد. Hujanen و همکاران تولید ۸۲g/l اسید لاکتیک را در محیط دارای ۱۰۰g/l گلوکز توسط *L. casei* گزارش کرده بودند که با توجه به آن، سویه مورد مطالعه در این تحقیق نیز از توان بالایی برخوردار است. آنها تولید ۶۸ گرم در لیتر اسید لاکتیک را توسط *L. rhamnosus* گزارش کردند که با توجه به تولید ۹۴/۹۷g/l لاکتات کلسیم ، سویه مورد مطالعه نیز از سویه‌های مناسب تولید محسوب می‌شود. میزان تولید سویه *L. delbrueckii* توسط Dermichi (۱۰) ۵۸ گرم در لیتر اسید لاکتیک گزارش شده، در حالی که سویه *L. delbrueckii* PTCC 1333 که در این تحقیق بررسی شد، ۷۶/۴۳g/l لاکتات کلسیم تولید کرد.

در مجموع، در محیط دارای ۱۰۰ گرم در لیتر گلوکز به عنوان منبع کربن و حداقل هوادهی، در ارلن‌های کاملاً در بسته، تولید و بهره‌دهی بالاتری مشاهده شد. میزان تولید لاکتات کلسیم، میزان بهره‌وری و بازده سویه‌های مطالعه شده در جدول۱ ارائه شده است.

میزان مصرف گلوکز توسط هر سویه در شرایط بهینه در شکل۳ نشان داده شده است. همان گونه که این منحنی نشان می‌دهد، مصرف سوبسترا توسط تمام سویه‌ها تقریبا روند مشابهی دارد. مقایسه منحنی‌های رشد و تولید سویه‌ها نشان داد که آنها نیز روند مشابهی در راستای مخالف منحنی مصرف سوبسترا دارند. این نتایج نشان می‌دهد که محیط فوق از نظر رشد و تولید برای همه سویه‌های بررسی شده، یکسان و در حد مطلوبی بوده است.

با اینکه *Lactobacillus plantarum* هم از تولید بالایی(۹۳/۸۱g/l لاکتات کلسیم) بر خوردار بود، اما آزمایش‌ها مشخص کرد که فقط دو سویهٔ *Lactobacillus casei ssp.casei* و *Lactobacillus rhamnosus* می‌توانند ایزومر نوع (+) L اسید لاکتیک را تولید کنند. با توجه به اینکه در بدن انسان فقط این نوع ایزومر نوری، متابولیزه می‌شود. این سویه‌ها به عنوان بهترین باکتری‌های همو فرمانتاتیو تولید کننده L(+) اسید لاکتیک برای ادامه مطالعات انتخاب شدند. در این پژوهش، علاوه بر مقایسه تولید سویه‌های گزارش شدهٔ مولدِ اسید لاکتیک، بررسی میزان تولید لاکتات در محیط حاوی ۱۰۰g/l گلوکز توسط سویه های مولد و بررسی تولید با سویه L.rhamnosus با ویژگی‌های ارئه شده در مقاله کاملا جدید است و راه را برای تولید نیمه صنعتی اسید لاکتیک با سویه‌های *L. casei ssp. casei* و *L.rhamnosus* هموار می‌کند. لازم به ذکر است که فرمولاسیون محیط کشت ارائه شده در این تحقیق که باعث افزایش میزان تولید در واحد زمان به نسبت افزایش غلظت سوبسترا شد کاملا جدید است.

Archive of SID

www.SID.ir

• References

1. Mirdamadi S, Sadegi H, Sharifi N, Fallahpour M, Mohseni F, Bakhtiari M.R, Comparison of lactic acid isomers produced by fungal and bacterial strains, Iranian Biomed J 2002; 6(2&3):69-75.
2. Buchta, K., Lactic acid, Rhem H.J, Reed G., (Biotechnology; Vol3: Biomass) microorganisms for special applications, microbial production, Energy from renewable resources, Weinheim: VCH,1996. pp. 410-417.
3. Mostafa N.A, Production of lactic acid from whey with agar immobilized Cells in a continuous packed tubular reactor energy concers Mgmt, 1996; 37 (3): 253-260.
4. Bizzari N S, Lactic acid , iIts salts and esters, The Chemical Economics Handbook _SRI International; 2003, SRI consulting ,Menlo California ,USA.
5. Senthuran A, Sethuran V, Mattiasson B, Kaul R, Lactic acid fermentation in a recycle batch reactor using immmobilized *Lactobacillus casei*. Biotech Bioeng 1997; 55(6): 841- 853.
6. Vickroy TB, Lactic acid, Moo-Young M, "Comprehensive Biotechnology", Vick Roy,T.B., Pergamon Press, Oxford, 1985, Vol.3 761-776, New York
7. Bruno-Barcena JM, Ragout A, Cordoba PR, Sineriz,F, Continuous production of L(+)-Lactic Acid by *Lactobacillus casei* in two- stage systems. appl microbiol biotechnol, 1999; 51: 316- 324.
8. Fitzatrick JJ, Ahrens M, Smith S, Effect of manganese on *Lactobacillus casei* Fermentation to produce lactic acid from whey permeate. Process Biochem 2001; 36: 671-675.
9. John HL, Microbial production of lactic acid , Advanced App Microb 1996; 4 : 45-88.
10. Dermichi A, Pometto A, Enhanced production of D (-) - lactic acid by mutant *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 9649. J. Indusl Microbiol , 1992; 11: 23-8.
11. Milcent S, Carrère H, Clarification of lactic acid fermentation broths, J of separation and purification technology. 2001; 23 : 393 – 401.
12. Hujanen M, Linko Y. Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)Lactic acid production by *Lactobacillus casei* . Appl Microbiol Biotechnolol 1996; 45: 307-13
13. Bergmeyer HB, Method of enzymatic analysis, D-Glucose determination with glucose oxidase and peroxidase in: Method of enzymatic analysis 2nd ed. Academic Press Inc., New York 1974; 1205-1215 ,. .
14. Hofvendahl K, Hahn-Hagerdal B, Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzym and Microbial Technology 2000; 26: 87-107.
15. Zyed,G, Winter J, Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of *Lactobacilli*. Appl Microbiol Biotechnol 1995; 44: 362-366.

Archive of SID

www.SID.ir