Archive of SID

**مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران**
**سال هشتم، شماره 2، تابستان 1392، صفحات 121-113**

# بررسی اثر کنترل pH بر میزان تولید اسید پروپیونیک، استیک و لاکتیک در سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده با پروپیونی‌باکتریوم و لاکتوباسیلوس

نگین احمدی[1]، کیانوش خسروی دارانی[2]، سلماز زارعان شهرکی[3]، سیدامیر محمد مرتضویان[4]، مرتضی مشایخ[5]، رزیتا کمیلی[6]، ابراهیم آزادنیا[6]

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

2- نویسنده مسئول: دانشیار گروه تحقیقات علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: kiankh@yahoo.com

3- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ساری، ساری، ایران

4- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

5- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

6- کارشناس آزمایشگاه، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/4/2 تاریخ پذیرش: 92/6/25

## چکیده

**سابقه و هدف:** پروپیونی‌باکتریوم‌ها می‌توانند بسیاری از محصولات مهم صنعتی مثل اسید پروپیونیک، ویتامین ب12 و باکتریوسین‌ها را تولید کنند. این باکتری‌ها علاوه بر داشتن فواید پروبیوتیکی دارای عوامل محرک رشد باکتری‌های مفید روده‌ای هستند. هدف تحقیق حاضر بررسی اثر کنترل pH بر میزان تولید توده سلولی و اسیدهای پروپیونیک، استیک و لاکتیک در سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده با استفاده از ملاس و لاکتوز به‌عنوان منبع کربن و کشت هم‌زمان *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* است.

**مواد و روش‌ها:** تخمیر در فرمانتور 3 لیتری با محیط پایه و ملاس به‌عنوان منبع کربن آغاز و خوراک‌دهی با قند لاکتوز پس از گذشت 36 ساعت از شروع فرایند با سرعت 0/03 لیتر بر ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. زمان فرایند تخمیر 96 ساعت بوده و هر 24 ساعت به‌منظور اندازه‌گیری توده سلولی و اسیدهای آلی از فرمانتور نمونه‌برداری انجام شد. اثر کنترل pH با مقایسه فرایند بدون کنترل pH با تخمیر انجام شده در pH (سود 1 نرمال) 6/5 بررسی گردید. مقدار توده سلولی با روش خشک کردن انجمادی و اسیدهای آلی با HPLC اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** غلظت نهایی متغیرهای وابسته برای دو تیمار بدون و با کنترل pH به‌ترتیب عبارت بودند از: توده سلولی 0/07± 1/79 و 0/07±1/72، اسید پروپیونیک 0/13±4/87 و 0/04±4/16، اسید استیک 0/13±4/87 و 0/04±4/16 و اسید لاکتیک 0/06±7/93 و 0/09±6/10 (گرم بر لیتر).

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه نشان داده شد که کنترل pH تخمیر با سود نرمال اثر معنی‌داری بر تولید اسیدهای آلی یاد شده ندارد.

**واژگان کلیدی:** *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی*، اسید پروپیونیک، سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده، ملاس

## • مقدمه

پروپیونی‌باکتریوم‌ها، ریزسازواره‌های گرم مثبت، غیر اسپورزا، غیرمتحرک، بی‌هوازی اختیاری و میله‌ای شکل هستند (1). این باکتری‌ها به دو دسته عمده‌ی لبنی و پوستی (Cutaneous) تقسیم می‌شوند که گروه اول سازواره‌های آغازگر مهم در تخمیر لبنی هستند و بعضی گونه‌ها مثل *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی*، لاکتات را تخمیر کرده و گاز تولید می‌کنند که علاوه بر کمک به ایجاد روزنه و طعم مناسب در پنیر (2)، می‌تواند بسیاری از محصولات مهم صنعتی مثل اسید پروپیونیک، ویتامین ب12 و باکتریوسین‌ها را تولید کنند (3). اخیرا،

www.SID.ir

Archive of SID



پروپیونی‌باکتریوم‌ها به دلیل فواید پروبیوتیکی (برای سلامتی انسان) و تولید پری‌بیوتیک‌های (برای تحریک رشد باکتری‌های مفید روده‌ای مثل گونه‌های بیفیدوباکتریوم) (2) توجه زیادی به خود معطوف کرده‌اند. این باکتری‌ها ضمن تنظیم فلور میکروبی روده و حفظ سلامتی دستگاه گوارش، از فعالیت آنزیم‌های مولد عوامل جهش‌زا جلوگیری و سیستم ایمنی بدن را تقویت می‌کنند (4). گونه‌های پروبیوتیک پروپیونی‌باکتریوم‌ها باعث افزایش جذب کلسیم و آهن از روده می‌شوند. پروپیونی‌باکتریوم از طریق تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر مثل پروپیونات باعث افزایش جذب آهن در روده می‌شوند. همچنین با تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره میزان بی‌کربنات را افزایش می دهند که به نوبه خود به دلیل افزایش pH روده منجر به افزایش جذب کلسیم می شوند (6، 5). اسیدهای چرب کوتاه زنجیره مانند اسیدهای استیک، پروپیونیک و بوتیریک به دلیل تحریک ترشح پپتید روده‌ای YY به عنوان مهار کننده اشتها (9-7) و هم‌چنین تأخیر تخلیه معده (10) نقش مهمی در ایجاد حس سیرکنندگی (Satiety ) دارند (11). پروپیونی‌باکتریوم‌ها با مهار سنتز کلسترول در کبد از طریق مهار فعالیت آنزیم هیدروکسی متیل–گلوتاریل Co.A سنتتاز و افزایش دفع اسیدهای صفراوی از مدفوع باعث مصرف کلسترول برای تولید مجدد اسیدهای صفراوی شده و سطح کلسترول پلاسما را کاهش می‌دهند (13، 12). برخی گونه‌های پروپیونی‌باکتریوم قادر به تولید ویتامین‌های ب2 و ب12 هستند (15، 14).

پژوهش‌ها نشان می‌دهد که برای رشد گونه‌های پروپیونی‌باکتریوم دمای 37-30 درجه سانتی‌گراد و pH 6 تا 7 مطلوب است (16). حداکثر pH برای رشد 8/5 و حداقل 4/6 گزارش شده است و در pH کم‌تر از 4/5، رشد باکتری متوقف و تولید اسید کم خواهد شد (17). پروپیونی‌باکتریوم-ها قادرند منابع کربنی مختلفی مانند گلوکز (19، 18)، مالتوز (20)، ساکارز (21)، لاکتوز (23، 22)، لاکتات (24، 19) و گلیسرول (26، 25) را استفاده کنند. از آن‌جایی‌که غلظت و بهره‌وری تولید کم کاربرد سیستم‌های متداول و گران تخمیر را محدود کرده است، لذا افزایش بازده تولید اسید پروپیونیک با تخمیر ضایعات صنعتی ارزان قیمت مثل گلیسرول یا منابع تجدیدپذیر مانند ملاس، به توجیه اقتصادی تولید کمک کرده و ضایعات صنعتی را نیز کاهش می‌دهد (27، 16). ملاس نیشکر منبعی تجدیدپذیر است که جزء ضایعات کارخانجات قند نیز محسوب می‌شود و منجر به به تولید مقدار زیادی توده سلولی می‌شود به عنوان مثال هنگام تولید متابولیت ثانویه‌ای مثل ویتامین ب12 توسط پروپیونی‌باکتریوم‌ها می‌توان با استفاده از ملاس به مقدار زیادی از توده سلولی دست یافت که برای دستیابی به بهره‌وری بالای تولید ویتامین شرط اساسی است (28).

عمده‌ترین مشکل تخمیر در سامانه ناپیوسته رشد آهسته باکتری، اثر بازدارندگی شدید محصول (30، 29) و مشکل استخراج از محیط کشت است (31). سایر فرایندها شامل تثبیت سلول (32)، سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده (24)، پیوسته (33) و چند مرحله‌ای (34) با هدف بهبود بازده و بهره‌وری تخمیر ارزیابی شده‌اند. تخمیر ناپیوسته خوراک-دهی‌شده متداول شامل افزودن قند در فواصل زمانی متناوب است که می‌تواند کمبود مواد مغذی را برطرف کرده و از تجمع محصول بازدارنده جلوگیری کند (24). تاکنون پژوهش‌های اندکی در ارتباط با تولید اسید پروپیونیک به روش خوراک‌دهی‌شده و همچنین به‌کارگیری ملاس به‌عنوان منبع کربن انجام شده است. کرال و همکاران (2008) فرایند تخمیر دو مرحله‌ای را برای تولید هم‌زمان اسید پروپیونیک و ویتامین ب12 پیشنهاد دادند (28).

تاکنون مطالعه‌ای بر مصرف ملاس به‌عنوان منبع کربن برای تولید اسیدهای آلی از پروپیونی‌باکتریوم در سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده انجام نشده است. جایی که هدف استفاده از پروپیونی‌باکتریوم‌ها خواص سلامتی بخش آن‌ها در قالب یک محصول فراسودمند است، استفاده از سود جهت کنترل pH می‌تواند معضل مهمی را مطرح کند. فرهادی و همکاران (2012) به بیشترین میزان اسید پروپیونیک در پی تلقیح با نسبت 1 به 4 *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* رسیدند (3).

در این تحقیق تلاش بر این است تا اثر pH در دو تیمار مختلف با استفاده از کشت همزمان پ. *فرئودنریچی‌یی* و *ل. اسیدوفیلوس* بر تخمیر و تولید اسیدهای آلی بررسی شود. در مرحله اول از منبع کربن ملاس برای تولید توده سلولی بیشتر استفاده شد و در مرحله بعد خوراک‌دهی با لاکتوز صورت گرفت. استفاده از این مونوساکارید علاوه بر تامین منبع کربن مناسب برای رشد لاکتوباسیلوس و پروپیونی-

www.SID.ir

Archive of SID



باکتریوم، امکان تولید یک نوشیدنی لبنی تخمیری را فراهم می‌کند.

## • مواد و روش‌ها

**ریزسازواره:** *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* (PTCC1661) و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (PTCC1643) به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکربی سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران خریداری و در محیط کشت پروپیونی‌باکتریوم به مدت 6 روز در دمای 30 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. محیط یاد شده شامل کازئین، عصاره مخمر و لاکتات سدیم به میزان 1، 0/5 و 1 درصد در آب مقطر بود که در دمای 121 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 15 دقیقه اتوکلاو شد. سپس باکتری فعال شده به محیط مایع پروپیونی‌باکتریوم منتقل و گرمخانه‌گذاری در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 48 ساعت انجام شد. *ل. اسیدوفیلوس* نیز در محیط مایع MRS کشت و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت گرمخانه‌گذاری شد.

**آماده سازی مایه تلقیح برای تزریق به فرمانتور:** ابتدا باکتری فعال شده در محیط ذخیره کشت خطی داده شد و در 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت گرمخانه‌گذاری شد. این محیط به ازای 1 لیتر آب دیونیزه، حاوی 1 پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، 2 دی آمونیوم هیدروژن فسفات، 0/005 فروسولفات 7آبه، 0/01 منیزیم سولفات، 0/025 منگنز سولفات، 0/01 کلرید کلسیم، 0/01 کلرید کبالت، 5 عصاره مخمر، 5 سدیم لاکتات و 7 آگار (گرم) بود. سپس یک کلنی از محیط کشت ذخیره برداشته و در 2 میلی‌لیتر محیط کشت پیش‌کشت (که همان محیط ذخیره بدون آگار) حل کرده و در 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس 0/4 میلی‌لیتر از آن به فلاسک بدون همزن حاوی 40 میلی‌لیتر به محیط کشت پیش‌کشت منتقل و در 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 36-24 ساعت گرمخانه‌گذاری شد. بعد از 36 ساعت، جذب نوری با اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد (در مورد پ. *فرئودنریچی‌یی* جذب نوری در طول موج 660 نانومتر ≈0/8 بود) (28). به‌منظور تعیین تعداد دقیق باکتری موجود در مایه تلقیح، یک ویال در رقت‌های $10^{-6}$ تا $10^{-12}$ روی محیط سدیم لاکتات آگار کشت داده شد. ترکیبات محیط کشت سدیم لاکتات آگار شامل 10 کازئین، 10 عصاره مخمر، 10 لاکتات سدیم، 2 پیرووات سدیم، 2 گلیسین، 1/5 کلرید سدیم، 0/5 تواین 80، 0/25 دی پتاسیم هیدروژن فسفات و 12 آگار (گرم مواد) در 1 لیتر آب مقطر بود. پس از تنظیم pH در دامنه 0/2±7 محیط کشت تهیه شده در دمای 121 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 15 دقیقه اتوکلاو شد. پلیت‌ها به‌مدت 7 روز در دمای 30 درجه سانتی‌گراد در شرایط غیرهوازی قرار گرفتند (3). شمارش میکربی پ. *فرئودنریچی‌یی* زیر گونه *شرمانی‌یی* در سوسپانسیون موجود در هر ویال CFU/ml $4/27\times10^{9}$ بود.

**سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده:** محیط پایه تخمیر برای سیستم ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده شامل 1 لیتر محیط کشت پیش‌کشت (حاوی سدیم لاکتات 20 گرم و عصاره مخمر 10 گرم) و 25 گرم بر لیتر ملاس به عنوان منبع کربن اولیه و 25 گرم بر لیتر قند لاکتوز به عنوان منبع کربن ثانویه بود. ملاس حاوی 52-50 درصد قند کل، 44-40 درصد ساکارز و 80-77 درصد بریکس بود. محیط پایه، ظرف فرمانتور و بطری‌های حاوی دو منبع کربن در دمای 121 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه استریل شدند. بطری‌های حاوی ملاس و لاکتوز طی شرایط استریل به فرمانتور متصل و فرمانتور در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت زمان 96 ساعت تنظیم شد. فرایند خوراک‌دهی 36 ساعت پس از شروع تخمیر با منبع کربن لاکتوز به مدت 8 ساعت با سرعت 0/03 لیتر بر دقیقه انجام شد (22). مایه تلقیح به میزان 1 درصد حجم فرمانتور شامل پ. *فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* و *ل. اسیدوفیلوس* با نسبت 1:4 به سامانه تزریق شد (3). برای بررسی اثر pH، در تیمار اول با تنظیم pH در 6/5 و افزودن خودکار سود 1 نرمال، pH ثابت نگه داشته و در تیمار دوم منبع سود از پمپ پرستالتیک دستگاه جدا شد. در هر لحظه امکان قرائت pH محیط از مانیتور و یا ثبت آن در ثبت کننده دستگاه وجود داشت. هر 24 ساعت نمونه‌های 20 میلی‌لیتری از دستگاه نمونه‌برداری شد.

**اندازه‌گیری وزن خشک توده سلولی:** پس از نمونه‌برداری از سیستم، 20 میلی‌لیتر نمونه با دور 12000 rpm به مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. فاز ته نشین شده پس از شستشو با آب به وزن خشک توده زیستی با روش خشک کردن انجمادی اندازه‌گیری شد.

**اندازه‌گیری میزان اسیدهای پروپیونیک، لاکتیک و استیک:** پس از همگن کردن مایع رویی حاصل از سانتریفوژ محیط کشت، 5 میلی‌لیتر اسید سولفوریک 0/5 نرمال به 6 میلی‌لیتر نمونه اضافه و به مدت 15 دقیقه با سرعت 5000 rpm سانتریفوژ شد. فاز شفاف رویی به کمک فیلتر سرسرنگی 0/45 میکرومتر فیلتر شد. میزان اسیدهای آلی

www.SID.ir

Archive of SID

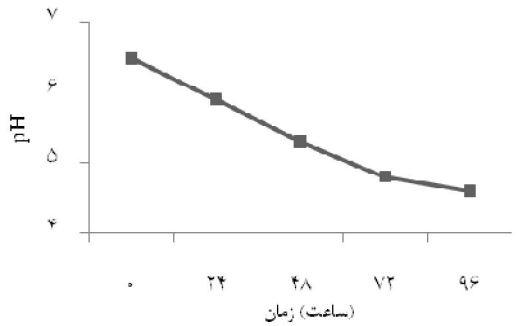


تولید شده در محصول با استفاده از دستگاه HPLC مجهز به ستون ODS-5 اندازه‌گیری شد. برای آنالیز از فاز متحرک شامل اسیدسولفوریک 10 مولار (فاز متحرک) و متانول (فاز متحرک) و سرعت جریان 1 میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده و آنالیز اسیدهای مذکور در طول موج استفاده و آنالیز اسیدهای مذکور در طول موج آشکارساز معادل 210 نانومتر انجام شد (3).

**اندازه‌گیری میزان ویتامین ب12:** آماده سازی نمونه‌ها برای اندازه گیری ویتامین ب12 نیاز بود. استخراج این متابولیت داخل سلولی با جوشاندن سلول‌ها در سیانات پتاسیم 0/1 مولار در pH=6/0 به‌مدت 15 دقیقه انجام شد. سپس محلول به‌دست آمده از فیلتر سرسرنگی 0/45 میکرومتر عبور داده شد و ویتامین ب12 با دستگاه HPLC مجهز به ستون C18 اندازه‌گیری شد. فاز متحرک، متشکل از متانول و محلول فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم 0/02 مولار و طول موج دتکتور UV، 361 نانومتر بود.

## • یافته‌ها

**تغییرات pH طی دوره تخمیر:** شکل 1 روند تغییرات pH طی دوره تخمیر را نشان می‌دهد. در این حالت بدون استفاده از سود و در نتیجه تولید اسیدهای آلی در محیط، pH از 6/5 به 4/6 کاهش یافت. همان طور که در نمودار مشاهده می‌شود کاهش pH محیط از لحظه شروع تخمیر تا زمان خوراک‌دهی مقدار قابل توجهی بود و این میزان کاهش با شروع خوراک‌دهی منبع کربن (لاکتوز) ادامه یافت و با رسیدن به انتهای زمان تخمیر، روند کندتری داشت. باکتری در مدت زمانی حدود 36 ساعت قادر به مصرف سریع منبع کربن و تولید سریع اسید و کاهش pH محیط است.




**شکل 1.** روند تغییرات pH طی تخمیر در سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و مدت زمان 96 ساعت

**روند تغییرات توده خشک سلولی طی دوره تخمیر:** روند تغییرات توده خشک سلولی در دو تخمیر (تیمار 1 با کنترل pH و تیمار 2 بدون کنترل pH) در شکل 2 نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود مقدار توده سلولی در تیمار 2 تا حدود ساعت 36 (زمان شروع خوراک‌دهی)، یعنی هنگامی که منبع کربن فقط ملاس است بیشتر از حالت دیگر است ولی پس از شروع خوراک‌دهی لاکتوز مقدار توده سلولی در تیمار 1 به طور معنی‌دار از تیمار 2 بیشتر می‌شود ($P<0/05$). با اینکه میزان توده خشک سلولی در پایان تخمیر هر دو تیمار تقریبا نزدیک هم هستند (غلظت نهایی توده خشک سلولی برای تیمار 1 و 2 به‌ترتیب عبارتند از 1/79±0/07 و 1/72±0/07 گرم بر لیتر) ولی روند افزایش غلظت توده سلولی هم اختلاف معنی‌دار دارد.

**روند تغییرات اسید پروپیونیک، اسید استیک و اسید لاکتیک طی دوره تخمیر:** روند تولید اسید پروپیونیک در شکل 3 نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که در تیمار 1 تا ساعت 24 و در تیمار 2 تا ساعت 48 میزان اسید پروپیونیک تولید شده قابل تشخیص نبود. مقدار اندکی تولید اسید پروپیونیک در نمونه ساعت 48 تیمار 1 مشاهده شد و غلظت نهایی اسید پروپیونیک در ساعت 96 برای تیمار 1 و 2 به ترتیب 3/95±0/08 و 3/52±0/07 گرم بر لیتر بود. از لحاظ آماری اختلاف روند تولید اسید در دو تیمار معنی‌دار نیست ($P> 0/05$).

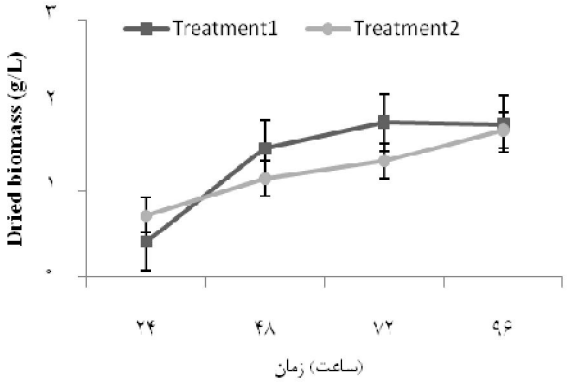
هم‌چنین در نمونه‌های نهایی حاصل از هر دو تیمار وجود ویتامین ب12 بررسی شد که استفاده از HPLC تولید این ویتامین در هر دو تیمار را تأیید کرد. غلظت ویتامین تولیدی در انتهای تخمیر (ساعت 96) در تیمار 1، 1/52±34/66 و در تیمار 2، 1/14±30/01 میلی‌گرم بر لیتر بود.

با توجه به جدول 2 میزان بهره‌وری تولید توده خشک سلولی و اسید پروپیونیک، استیک و لاکتیک در نمونه نهایی (ساعت 96) در همه موارد در تیمار 1 بیشتر از تیمار 2 است که می‌توان نتیجه گرفت به طور کلی بهره‌وری فرایند تخمیر در تیمار 1 بهتر است.

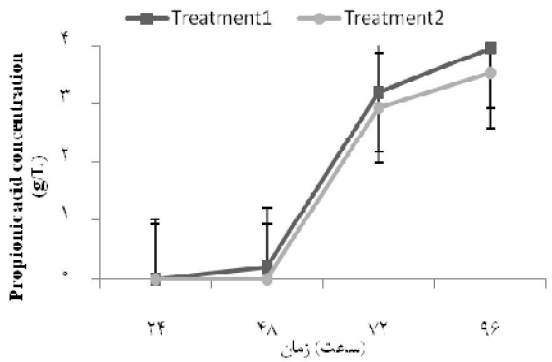
www.SID.ir

Archive of SID






**شکل 2.** روند تغییرات غلظت توده خشک سلولی طی دوره تخمیر در دو تیمار مختلف در سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و طی مدت 96 ساعت؛ مربع توپر مربوط به تیمار1 (تخمیر با کنترل pH محیط با سود 1 نرمال) و دایره توپر مربوط به تیمار2 (تخمیر بدون کنترل pH محیط) است.

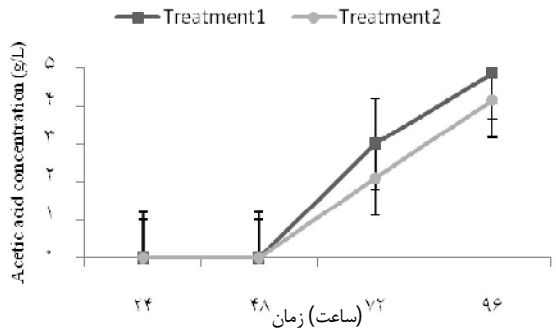



**شکل 3.** روند تغییرات غلظت اسید پروپیونیک طی دوره تخمیر در دو تیمار مختلف در سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و طی مدت 96 ساعت؛ مربع توپر مربوط به تیمار 1 (تخمیر با کنترل pH محیط با سود 1 نرمال) و دایره توپر مربوط به تیمار 2 (تخمیر بدون کنترل pH محیط) است.

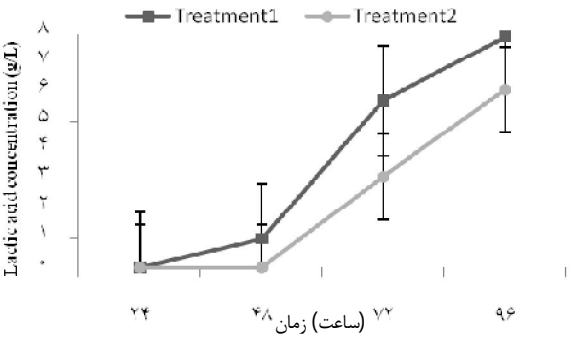
**جدول 1.** اثر کنترل و عدم کنترل pH بر میزان تولید توده خشک سلولی و اسید پروپیونیک، استیک و لاکتیک در سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده در دمای 30 درجه سانتی‌گراد بعد از 96 ساعت.

| زمان تخمیر (ساعت) | نوع تیمار | pH | غلظت (گرم بر لیتر) | | | | نسبت P/A |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | [a]X | [b]P | [c]A | [d]L | |
| 24 | تیمار1 | 6/5 | 0/41±0/06 | تشخیص داده نشد | تشخیص داده نشد | تشخیص داده نشد | - |
| | تیمار2 | 5/9 | 0/72±0/03 | تشخیص داده نشد | تشخیص داده نشد | تشخیص داده نشد | - |
| 48 | تیمار1 | 6/5 | 1/55±0/04 | 0/20±0/01 | تشخیص داده نشد | 0/98±0/04 | - |
| | تیمار2 | 5/3 | 1/15±0/04 | تشخیص داده نشد | تشخیص داده نشد | تشخیص داده نشد | - |
| 72 | تیمار1 | 6/5 | 1/81±0/02 | 3/19±0/08 | 3/00±0/01 | 5/73±0/10 | 1:0/94 |
| | تیمار2 | 4/8 | 1/36±0/06 | 2/93±0/09 | 2/10±0/02 | 3/11±0/11 | 1:0/72 |
| 96 | تیمار1 | 6/5 | 1/79±0/07 | 3/95±0/08 | 4/87±0/13 | 7/93±0/06 | 1:1/23 |
| | تیمار2 | 4/6 | 1/72±0/07 | 3/52±0/07 | 4/16±0/04 | 6/10±0/09 | 1:1/18 |

(a) وزن خشک توده سلولی (b) اسید پروپیونیک (c) اسید استیک (d) اسید لاکتیک




**شکل 4.** روند تغییرات غلظت اسید استیک طی دوره تخمیر در دو تیمار مختلف در سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و طی مدت 96 ساعت؛ مربع توپر مربوط به تیمار1 (تخمیر با کنترل pH محیط با سود 1 نرمال) و دایره توپر مربوط به تیمار 2 (تخمیر بدون کنترل pH محیط) است.




**شکل 5.** روند تغییرات غلظت اسید لاکتیک طی دوره تخمیر در دو تیمار مختلف در سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و طی مدت 96 ساعت؛ مربع توپر مربوط به تیمار 1 (تخمیر با کنترل pH محیط با سود 1 نرمال) و دایره توپر مربوط به تیمار 2 (تخمیر بدون کنترل pH محیط) است.

www.SID.ir

Archive of SID



**جدول 2.** اثر کنترل و عدم کنترل pH بر روی میزان بهره‌وری و بازده تولید توده خشک سلولی و اسیدپروپیونیک، استیک و لاکتیک در سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده در دمای 30 درجه سانتی‌گراد بعد از 96 ساعت

| زمان تخمیر (ساعت) | نوع تیمار | pH | بهره‌وری (میلی‌گرم بر لیتر) | | | | | بازده (گرم بر گرم) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $^{a}P_X$ | $^{b}P_P$ | $^{c}P_A$ | $^{d}P_L$ | $^{e}Y_{P/X}$ | $^{f}Y_{A/X}$ | $^{g}Y_{L/x}$ |
| 24 | تیمار1 | 6/5 | 3/80±0/90 | - | - | - | - | - | - |
| | تیمار2 | 5/9 | 6/29±0/31 | - | - | - | - | - | - |
| 48 | تیمار1 | 6/5 | 13/46±0/38 | 0/12±1/79 | - | 0/38±8/51 | 0/01±0/14 | - | 0/03±0/62 |
| | تیمار2 | 5/3 | 10/21±0/89 | - | - | - | - | - | - |
| 72 | تیمار1 | 6/5 | 15/77±0/23 | 27/73±0/70 | 26/07±0/10 | 49/77±0/49 | 1/76±0/04 | 1/65±0/01 | 3/15±0/05 |
| | تیمار2 | 4/8 | 11/75±1/12 | 25/40±0/83 | 18/20±0/24 | 27/03±0/95 | 1/99±0/24 | 1/53±0/01 | 2/29±0/08 |
| 96 | تیمار1 | 6/5 | 15/77±0/23 | 34/28±0/70 | 42/29±1/20 | 68/88±0/48 | 1/21±0/04 | 2/35±0/72 | 4/44±0/03 |
| | تیمار2 | 4/6 | 15/51±0/65 | 30/58±0/64 | 36/16±0/39 | 53/00±0/78 | 2/05±0/04 | 2/54±0/22 | 3/55±0/05 |

(a) بهره‌وری توده خشک سلولی، (b) بهره‌وری تولید اسید پروپیونیک، (c) بهره‌وری تولید اسید استیک، (d) بهره‌وری تولید اسید لاکتیک، (e) بازده تولید اسید پروپیونیک نسبت به توده سلولی، (f) بازده تولید اسید استیک نسبت به توده سلولی، (g) بازده تولید اسید لاکتیک نسبت به توده سلولی

## • بحث

بر اساس نمودار 1 تغییرات pH با گذشت زمان ابتدا با شیب ثابت کاهش می یابد و سپس به حالت ثابت تمایل پیدا می‌کند. می‌توان این‌طور استدلال کرد که در ابتدا با توجه به فراوانی منبع کربن برای باکتری‌ها، به سرعت سوبسترا مصرف و اسید تولید می‌شود و pH با سرعت ثابتی شروع به کاهش می‌کند. هنگامی‌که منبع کربن رو به کاهش می‌رود با افزودن تدریجی لاکتوز به محیط باکتری‌ها این امکان را پیدا خواهند کرد که به تولید خود ادامه دهند ولی بعد از اتمام خوراک‌دهی و گذشت زمان بعد از ساعت 72 تا 96 مشاهده می‌شود که این کاهش pH تقریبا ناچیز است که می‌تواند به کاهش غلظت منبع کربن مربوط باشد.

با مقایسه روند تولید توده سلولی در دو تیمار مختلف می‌توان اهمیت تأثیر pH در روند رشد سلولی را مشاهده کرد زیرا در تیمار 1 که pH کنترل شد و روند تولید سلولی با سرعت بیشتری پیش رفت، اثر مهاری pH کم در چنین محیطی تعدیل شده و باکتری‌ها قادر به تولید بیشتر توده سلولی هستند که این روند به خصوص در ابتدای تخمیر و تجدید منبع کربن قابل مشاهده است و سپس با کاهش غلظت سوبسترا سرعت روند تولید کاهش می‌یابد. هنگامی که pH محیط کنترل نمی‌شود تولید سلولی با یک روند تقریبا مشابه افزایش می‌یابد و تغییر منبع کربن تأثیر خاصی بر تولید اسید ندارد. بهره‌وری تولید توده سلولی نشان می‌دهد که کنترل pH محیط تأثیر معنی‌دار و مثبت در تولید اسید دارد و هنگامی که میزان و بهره‌وری تولید توده سلولی مورد توجه باشد این نکته حائز اهمیت است. برای مثال در تولید متابولیت ثانویه ویتامین ب12 که تولید زیاد توده سلولی نیاز است کنترل pH پیشنهاد می‌شود.

نمودارهای تولید اسیدهای آلی (نمودارهای 3 تا 5) نشان می‌دهد که در ساعات قبل از خوراک‌دهی یعنی تا ساعت 36 و در بعضی موارد تا ساعت 48 در هر دو تیمار تولید اسید قابل تشخیص نبود ولی بعد از آن در همه موارد روند افزایش تولید مشاهده شد که این روند افزایش در مورد هر سه اسید آلی در هر دو تیمار مشابه بوده است. علت عدم تولید اسید پروپیونیک و اسید استیک از ملاس (علیرغم مناسب بودن این منبع کربن برای تولید این اسیدها) را می‌توان به شرایط دیگر تخمیر مانند دمای فرایند یا میزان مایه تلقیح ارتباط داد. نتیجه تحقیق Coral و همکاران در سال 2008 نشان داد دمای تخمیر 30 درجه سانتی‌گراد برای تولید اسید پروپیونیک بهتر از 37 درجه سانتی‌گراد است و درصد مایه تلقیح افزوده بر میزان تولید اسید پروپیونیک تأثیری ندارد. تناقض نتایج Coral و این تحقیق می‌تواند به تفاوت در شرایط ابتدای تخمیر به‌خصوص افزایش دما و میزان بیشتر مایه تلقیح باشد که به نوبه خود موجب تحریک رشد سریع‌تر سلولی و تولید اسیدهای آلی شده است.

با افزودن لاکتوز به محیط و مصرف آن توسط *ل. اسیدفیلوس* تولید اسید لاکتیک افزایش می‌یابد چون منبع کربن مناسب رشد *ل. اسیدفیلوس* است باعث تولید میزان زیاد اسید لاکتیک در محیط می‌شود. از طرفی پروپیونی‌باکتریوم‌ها قادر به مصرف اسید لاکتیک هستند. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که در تخمیر انجام شده توسط پ. *فرئودنریچی‌یی*، 3 مول اسید لاکتیک به 2 مول اسید

www.SID.ir

Archive of SID



پروپیونیک، 1 مول اسید استیک و 1 مول $CO_2$ تبدیل می‌شود (35). بنابراین می‌توان یکی از دلایل افزایش تولید این دو اسید آلی بعد از 48 ساعت را مربوط به مصرف اسید لاکتیک به‌عنوان منبع کربن دانست.

نتایج آماری مقایسه غلظت‌های نهایی و هم‌چنین بهره‌وری تولید اسیدهای آلی در هر دو تیمار نشان می‌دهند که کنترل pH محیط تأثیر معنی‌داری بر میزان تولید اسیدهای آلی ندارد، لذا عدم استفاده از سود در تخمیر تولید اسید پروپیونیک با این روش پیشنهاد می‌شود.

اگر هدف تولید اسید پروپیونیک برای خواص تغذیه‌ای در محصولی فراسودمند باشد، عدم استفاده از سود اهمیت ویژه‌ای به تولید می‌بخشد. با توجه به دستیابی به میزان نسبتاً بالای اسید پروپیونیک در نمونه تولید شده و بی‌اثر بودن کنترل pH در کشت ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده و همچنین استفاده از ملاس به‌عنوان منبع ارزان قیمت و فراوان، نتایج این تحقیق تولید نوعی نوشیدنی فراسودمند را میسر ساخته است. البته، بررسی دقیق اثرات سیرکنندگی این محصول در قالب یک مطالعه تغذیه‌ای توصیه می‌شود.

با توجه به نقش مفید لاکتوز و *ل.اسیدوفیلوس* در کمک به افزایش تولید اسید پروپیونیک و اسید استیک، استفاده از منبع کربن حاوی لاکتوز مثل شیر برای تولید این محصول توصیه می‌شود. علاوه بر این، با در نظر گرفتن خاصیت ضدقارچی اسید پروپیونیک، محصول لبنی تولید شده به این روش علاوه بر داشتن خاصیت سیرکنندگی، پروبیوتیکی و خواص تغذیه‌ای ویتامین ب12، دارای نگهدارنده شیمیایی به‌طور طبیعی است و این موضوع به عدم استفاده‌ی احتمالی هرگونه نگهدارنده شیمیایی نظیر سوربات، کمک شایانی می‌کند.

**سپاسگزاری:** این تحقیق با حمایت علمی و فنی انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشدانجام شده لذا بدین‌وسیله مراتب سپاسگزاری اعلام می‌شود.

## • References


1. Dishisha T, Teresa Alvarez MT, Hatti-Kaul R. Batch- and continuous propionic acid production from glycerol using free and immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici*. Bioresource Technol 2012;118:553-62.
2. Kouya T, Tobita K, Horiuchi M, Nakayama E, Deguchi H, Tanaka T, et al. Production of Extracellular Bifidogenic Growth Stimulator (BGS) from *Propionibacterium shermanii* Using a Bioreactor System with a Microfiltration Module and an On-line Controller for Lactic Acid Concentration. J Biosci Bioeng 2008;105:184-91.
3. Farhadi Sh, Khosravi-Darani K, Mashayekh M, Mortazavian AM, Mohammadi A, Shahraz F. Effect of incubation temperature and inoculation ratio of starter culture on propionic acid production in dairy beverage fermented with *propionibacterium*. Iran J Nutr Sci Food Technol 2012;7:41-50.
4. Ekinci FY, Gurel M. Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. J Dairy Sci 2008;91:892-9.
5. Bougle D, Vaghefi-Vaezzadeh N, Roland N, Bouvard G, Arhan P, Bureau F, et al. Influence of short-chain fatty acids on iron absorption by proximal colon. Scand J Gastroenterol 2002;37:1008-11.
6. Trinidad TP, Wolever TM, Thompson LU. Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans. Am J Clin Nutr 1996;63:754-8.
7. Batterham RL, Heffron H, Kapoor S, Chivers JE, Chandarana K, Herzog H, et al. Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. Cell Metab 2006;4(3):223-33.
8. Cherbut C, Ferrier L, Rozé C, Anini Y, Blottière H, Lecannu G, et al. Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. Am J Physiol Gastrointest and Liver Physiol 1998;275(6):1415-22.
9. Dockray G. Gut endocrine secretions and their relevance to satiety. Curr opin pharmacol 2004;4(6):557-60.
10. Liljeberg H, Bjorck I. Delayed gastric emptying rate as a potential mechanism for lowered glycemia after eating sourdough bread: studies in humans and rats using test products with added organic acids or an organic salt. Am J Clin Nutr 1996;64(6):886-93.
11. Ruijschop RMAJ, Boelrijk AEM, Te Giffel MC. Satiety effects of a dairy beverage fermented with propionic acid bacteria. Int Dairy J 2008;18(9):945-50.
12. Demigne C, Morand C, Levrat MA, Besson C, Moundras C, Remesy C. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate


www.SID.ir

Archive of SID



metabolism in isolated rat hepatocytes. Br J Nutr 1995;74:209-19.

13. Hara H, Haga S, Aoyama Y, Kiriyama S. Short chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. J Nutr 1999;129:942-8.
14. Quesada-Chanto A, Schmid-Meyer AC, Schroeder AG, Carvaiho-Jonas MF, Blanco I, Jonas R. Effect of oxygen supply on biomass, organic acids and vitamin $B_{12}$ production by *Propionibacterium shermanii*. World J Microbiol Biotechnol 1998;14:843-6.
15. Leblance JG, Rutten G, Bruinenberg P, Sesma F, Savoy de giori G, Smid EJ. A novel dairy product fermented with *Propionibacterium freudenreichii* improves the riboflavin status of deficient rats. Nutrition 2006;22:645-51.
16. Coral J. Propionic acid production by *Propionibacterium sp.* using low-cost carbon sources in submerged fermentation. Biotechnol. Bioprocesses Eng. Division Federal University of Parana; 2008.
17. Sheehan JJ, Wilkinson MG, McSweeney PLH. Influence of processing and ripening parameters on starter, non-starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses. Int Dairy J 2008;18(9):905-17.
18. Himmi EH, Bories A, Boussaid A, Hassani L. Propionic Acid Fermentation of Glycerol and Glucose by *Propionibacterium Acidipropionici* and *Propionibacterium Freudenreichii* ssp. *Shermanii*. Appl Biochem Biotechnol 2000;53:435-40.
19. Rickert DA, Glatz CE, Glatz BA. Improved organic acid production by calcium alginate-immobilized propionibacteria. Enzyme Microb Tech 1998;22(5):409-14.
20. Babuchowski A, Hammond E, Glatz B. Survey of propionibacteria for ability to produce propionic and acetic acids. J Food Prot 1993;56:493-6.
21. Quesada-Chanto A, S.-Afschar A, Wagner F. Microbial production of propionic acid and vitamin $B_{12}$ using molasses or sugar. Appl Microbiol Biotechnol 1994;41(4):378-83.
22. Goswami V, Srivastava AK. Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. Biochem Eng J 2000;4(2):121-8.
23. Sherman J, Shaw R. The propionic acid fermentation of lactose. J Biol Chem 1923;56(2):695-700.
24. Martinez-Campos R, Torre Mdl. Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose. Bioresour Technol 2002;24:427–31.
25. Barbirato F, Chedaille D, Bories A. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. Appl Microb Biotechnol 1997;47(4):441-6.
26. Zhu Y, Li J, Tan M, Liu L, Jiang L, Sun J, et al. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. Bioresour Technol 2010;101(22):8902-6.
27. Kumar S, Babua BV. Brief review on propionic acid: a renewal energy source. Proceedings of National Conference on Environmental Conservation 2006;4:58-64.
28. Coral J, Karp SG, Vandenberghe LPdS, Parada JL, Pandey A, Soccol CR. Batch fermentation Model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. Appl Biochem Biotechnol 2008;151:333–41.
29. Neronova NM, Ibragimova SI, Lerusalimskii ND. Effect of propionate concentration on the specific growth rate of *Propionibacterium shermanii*. Mikrobiologiya 1967;36:404-9.
30. Nanba A, Nukada R, Nagai S. Inhibition by acetic and propionic acids of the growth of *Propionibacterium shermanii*. J Ferment Technol 1983;61:551-6.
31. Yang ST, Zhu H, Li Y. Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed bioreactor. Biotechnol Bioeng 1994;43:1124-30.
32. Champagne CP, Baillargeon-Cote C, Goulet J. Whey fermentation by immobilized cells of *Propionibacterium shermanii*. J Appl Bacteriol 1989;66:175-84.
33. Blanc P, Goma G. Propionic acid and biomass production using continuous ultra filtration fermentation of whey. Biotechnol Lett 1989;11:189-94.
34. Playne MJ. Propionic and butyric acid. In: Moo-Young M, editor. Comprehensive Biotechnology. Vol. 3. Oxford: Pergamon Press; 1985.p. 731-59.
35. Zhang A, Yang S. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*. Process Biochem 2009;44:1346-51.

www.SID.ir

Archive of SID



# Fed-batch fermentation of propionic, acetic and lactic acid production

*Ahmadi N[1], Khosravi-Darani K[*2], Zarean shahraki S[3], Mortazavian AM[4],Mashayekh M[5], Komeili R[6], Azadnia E[6]*

*1-M.Sc in Food Science & Technology, Students' Research Committee,National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

*2-*Corresponding author: Associate Prof. (in Research), Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, Email:* kiankh@yahoo.com

*3- M.Sc in Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran*

*4-Associate prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

*5- Assistant prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

*6- Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute. Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran. Iran*

**Received 23 Jun, 2013** **Accepted 16 Sept, 2013**

**Background and objective:** Propionibacteria are capable of producing many important industrial products such as propionic acid, vitamin $B_{12}$ and bacteriocins. Also these bacteria show some probiotic health benefits and produce prebiotics as stimulator of intestinal bacteria. The aim of this research is evaluation of pH control on production of biomass propionic, acetic and lactic acids in fed-batch system, with feeding of molasses and lactose as carbon sources of co-fermentation of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* and *Lactobacillus acidophilus.*

**Materials and methods:** Fermentation was conducted in a 3-liter fermentor containing base medium and molasses as the carbon source in which lactose was fed after 36th hat temperature at 30 °C. Total fermentation time was 96 hand sampling was done in every 24 h intervals to measure the biomass and organic acids. Two treatments were compared to each other: in one trial, pH was maintained at 6.5 by using NaOH 1N, but in another, during fermentation pH was not controlled. Content of biomass and organic acid were measured by freeze drying and HPLC methods, respectively.

**Results:** The final concentration of the dependent variables for the two treatments with and without pH control obtained as following (g/L): biomass 1.97±0.07 and 1.72 ±0.07, propionic acid, 4.87±0.13 and 4.16±0.04, acetic acid 4.87±0.13 and 4.16±0.04 and lactic acid 7.93±0.06 and 6.10±0.09.

**Conclusion:** In this study it was shown that production of mentioned organic acids was not affected significantly by adding NaOH for control of pH in medium.

**Keywords:** *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, Propionic acid, Fed-batch system, Molasses

www.SID.ir