تولید نیمه صنعتی اسید لاکتیک بوسیله سویه *Lactobacillus casei subsp. casei*

سید سعید میردامادی*

سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی، تهران، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: Mirdamadi@irost.org
(دریافت مقاله: ۹۰/۴/۱۲ پذیرش نهایی: ۹۱/۳/۱۶)

چکیده

در این تحقیق مراحل تولید نیمه صنعتی اسید لاکتیک در فرمانتورهای همزن‌دار و به منظور طراحی خط صنعتی تولید اسیدلاکتیک با درجه خلوص مورد استفاده در صنایع غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این کار چهار سویه میکروبی استاندارد (*Staphylococcus aureus* PTCC 1113، *Micrococcus luteus* PTTC 1110، *Escherichia coli* PTCC 1330 و *Listeria monocytogenes* PTCC 1304) انتخاب و حداقل غلظت مهار کننده رشد برای هر یک بررسی گردید و تغییر منحنی رشد هر سویه در حضور و عدم حضور اسید لاکتیک و لاکتات کلسیم مقایسه شد. به منظور بدست آوردن دانش فنی تولید اسید لاکتیک، مراحل افزایش حجم تولید و تخلیص توسط سویه *Lactobacillus casei subsp. Casei* PTCC 1608 در دو فرمانتور همزن‌دار۲۰ و۷۵۰ لیتری انجام شد. محیط تولید بهینه‌سازی شده با منابع کربن متفاوت (گلوکز، لاکتوز و آب پنیر) و پودر خیسانده ذرت به عنوان منبع نیتروژن و به دو روش کشت غیر مداوم و کشت نیمه مداوم انجام شد. جهت تخلیص اسید لاکتیک از روش کلاسیک استفاده شد. پس از بهینه‌سازی محیط کشت، این سویه در بررسی‌های آزمایشگاهی در گرم‌خانه همزن‌دار بیشترین تولید را در محیط حاوی ۸۰g/l گلوکز و ۵۰ g/l آب پنیر داشت. در این سیستم ۷۲/۶۹ g/l لاکتات کلسیم با بهره‌وری ۰/۵۱ g/lh و بازده ۵۶٪ تولید شد. در فرمانتور۲۰ لیتری در تخمیر نیمه مداوم، در مدت زمان ٤٤ ساعت ۱۰۸/۷۵ g/l لاکتات کلسیم تولید شد. در این شرایط بازده واکنش ۸۳٪ ولی بدلیل کاهش زمان تولید افزایش قابل توجهی در بهره‌وری (۲/٤۷ g/lh) مشاهده گردید. سپس در فرمانتور۷۵۰ لیتری در کشت نیمه مداوم ۳۵۰ g/l لاکتات کلسیم با بهره‌وری ٥/٤ g/lh تولید شد.

واژه‌های کلیدی: **اسید لاکتیک، *لاکتوباسیلوس کازئی*، فرمانتور همزن‌دار، تخمیر، افزایش حجم تولید**

مقدمه

توسعه صنایع غذایی لزوم استفاده از پاره‌ای مواد شیمیایی را ایجاب می‌کند که دسته‌ای از آنها را افزودنی‌ها تشکیل می‌دهند. نقش اصلی افزودنی‌ها، به منظور افزایش ارزش غذایی، خواص حسی، حفاظت و نگه‌داری مواد غذایی است. پیشرفت‌های اخیر در افزودنی‌های مواد غذایی، تولید افزودنی‌های طبیعی با استفاده از علم بیوتکنولوژی می‌باشد، که روش تأمین

سلامتی و سالم و بدون خطر بودن آن (GRAS) به اثبات رسیده است. از طرفی محدودیت کاربردهای افزودنی‌های شیمیایی به دلیل اثرات جانبی متعدد باعث شده است که کشورهای پیشرفته به سمت تولید افزودنی‌های طبیعی از طریق بیوتکنولوژی روی آورند. (Mirdamadi et al., 2009; Tafreshi et al., 2010). از جمله این افزودنی‌ها که سالیان درازی است در کشورها استفاده می‌گردد، اسید لاکتیک، نمک‌های لاکتیک، و فرآورده‌های حاصل از تخمیر باکتری‌های لاکتیکی نظیر نیسین است (Mirdamadi et al., 2007; Mirdamadi et al., 2009; Tafreshi et al., 2010). اسید لاکتیک که با نام‌های ۲- هیدروکسی پروپیونیک اسید و ۲- هیدروکسی پروپانوئیک اسید نیز معرفی می‌شود یک اسید آلی هیدروکسیل‌دار ضعیف با فرمول شیمیایی $CH_3CHOHCOOH$است. این اسید با دارا بودن دو ایزومر نوری D(-) و L(+) کاربردهای زیادی در صنایع پزشکی، دارویی، غذایی و شیمیایی دارد (John, 1996; Mirdamadi et al., 2002; Mirdamadi, 2007).

اولین بار در سال ۱۷۸۰ در شیر ترش شده، توسط Scheele گزارش و Schulze در سال ۱۸٦۸ وجود باکتری‌های اسید لاکتیک را در مایه‌های کشت کارخانه-های تقطیر نشان داد و سویه *L. delbreckii* را برای تولید تجاری اسید لاکتیک به کار برد. این اسید دارای فعالیت نوری است و تنها ایزومر نوری L(+) آن در انسان متابولیزه می‌گردد. موارد عمده کاربرد اسید لاکتیک و مشتقات آن مربوط به صنایع غذایی، دارویی و صنایع مختلف شیمیایی می‌شود. از مهم‌ترین و جدیدترین کاربرد آن در صنایع غذایی و پزشکی تهیه پلاستیک‌های زیست تخریب از جمله پلی لاکتیک اسیدها(PLA)، کوپلیمرهای پلی‌لاکتیک اسید و پلی‌گلیکولیک اسید (PLA-PGA) است که در موارد بالینی و ساخت ابزار آلات پزشکی نظیر نخ‌های بخیه، ابزارآلات پیوندی، داروهای آهسته رها شونده از آن استفاده می‌شود (John, 1996; Mirdamadi et al., 2007; Mirdamadi et al., 2008).

اسید لاکتیک به دو طریق بیولوژی (فرآیندهای تخمیری) و شیمیایی تولید می‌شود. امروزه بیشترین حجم تولید اسید لاکتیک در جهان به دلیل نیاز به تولید ایزومر L(+) و عدم کفایت نوع سنتز شده بصورت شیمیایی که بصورت مخلوطی از دو ایزومر نوری L(+) و D(-) می‌باشد، بصورت تخمیر است (Zyed and Winter, 1995; Mirdamadi et al., 2007). طبق گزارشات Chemical Economics Handbook (CEH)، در سال ۲۰۰۲ تولید جهانی اسید لاکتیک، نمک‌ها و استرهای آن ۲۰۱/۸ هزار تن بوده است. ۸۸ درصد مصرف جهانی آن در موارد صنعتی بخصوص صنایع غذایی است و با متوسط نرخ رشد سالیانه ۹/۷ درصد، پیش‌بینی شد که در سال ۲۰۰۷ تولید جهانی آن به ۳۲۰/۵ هزار تن در سال رسیده و ادامه یابد (Bizzari, 2003). کمپانی PURAC در آمریکا با تولید ۳٤۰۰۰ تن اسید لاکتیک در سال به روش مداوم (Continuous)یکی از بزرگترین تولیدکننده‌های تخمیری اسید لاکتیک در جهان است که کارخانه‌های متعددی در آمریکای لاتین و آمریکای جنوبی و اروپا دارد. از سویه *L. bulgaricus* برای تولید استفاده می‌کند (Bray, 1998).

در این پژوهش، *L. casei ssp. casei* PTCC 1608 به دلیل راندمان بالا، زمان تولید کوتاه و تولید نزدیک به

صد در صد نوع L(+) اسید لاکتیک به عنوان سویه تولیدکننده لاکتات‌ها استفاده شد. سپس بهینه‌سازی شرایط تخمیر و ترکیبات محیط کشت جهت افزایش حجم تولید در فرمانتورهای۲۰ و۷۵۰ لیتر (Scale up)، افزایش راندمان و میزان تولید در واحد زمان، تولید اقتصادی اسید لاکتیک در حجم نیمه صنعتی و بررسی کاربرد آن بصورت تنها و یا ترکیب با دیگر افزودنی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌ها: آمپول لیوفیلیزه سویه‌های استاندارد (Test strain) *Staphylococcus aureus* PTCC 1113، *Micrococcus luteus* PTTC 1110، *Escherichia coli* PTCC 1330، *Listeria monocytogenes* PTCC 1304 و سویه مولد اسید لاکتیک *Lactobacillus casei ssp. casei* PTCC 1608 از بخش کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران دریافت شد. این آمپول‌ها در شرایط کاملاً استریل باز و بر روی محیط‌های اختصاصی شیب‌دار کشت داده شدند. لوله‌های تلقیح‌شده در دمای مناسب گرم‌خانه‌گذاری شدند. *لاکتوباسیلوس کازیی* در محیط MRS Agar (Man, Rogosa and Sharpe) و باکتری‌های دیگر در محیط Nutrient agar کشت داده شدند. (Mirdamadi et al., 2007; Mirdamadi et al., 2002; Tafreshi et al., 2010).

محیط کشت رشد و تهیه پیش کشت لاکتوباسیلوس کازئی: آمپول لیوفیلیزه در شرایط کاملاً استریل باز و بر روی محیط MRS Agar شیب‌دار کشت داده شد. لوله‌های تلقیح‌شده در جار CO_2 و در دمای ۳۷ °C به مدت ٤٨ ساعت گرماگذاری شدند. برای تهیه پیش‌کشت ازمحیط مایع MRS استفاده شد و بعد از تلقیح کشت‌های باکتری‌ها درفلاسک حاوی محیط درشرایط ۳۰°C و۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۳٦ ساعت در گرم‌خانه همزن‌دار گرماگذاری شدند (Mirdamadi et al., 2007; Mirdamadi et al., 2008).

فرمولاسیون محیط کشت تولید اسید لاکتیک: با توجه به اهمیت منبع کربن در تولید اسید لاکتیک، محیط کشت طراحی شده با مقادیر و منابع متفاوت کربن بهینه گردید. محیط بهینه عبارت بود از (g/l): گلوکز ۱۳۰، پودر خیسانده ذرت ۲۰، استات سدیم ۱، سولفات منیزیوم ۰/۲، سولفات منگنز ۰/۰۳، سولفات آهن ۰/۰۳، pH محیط حدود ٦ ±۰/۱ تنظیم گردید.

در طول تخمیر، تعدیل نمودن pH محیط تولید با افزودن محلول هیدروکسیدکلسیم استریل و به صورت پیوسته صورت گرفت (Hofvendahl, 2000 and Hahn-Hagerdal).

شرایط تخمیر: باکتری‌های پیش‌کشت تهیه شده در محیط مایع MRS به میزان 10^8 CFU/ml سلول باکتری و به نسبت ۱۰٪ (v/v) در محیط تولید تلقیح شد. شرایط بهینه تخمیر دمای ٤٢ °C، ۵۰۰ دور در دقیقه و سیستم بی‌هوازی بود. میزان تولید لاکتات کلسیم در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری شد (Mirdamadi et al., 2008).

فرمانتور: جهت بررسی اثرات افزایش حجم تولید از فرمانتور همزن‌دار ۲۰ لیتری ساخت کمپانی Chemap آمریکا و فرمانتور۷۵۰ لیتری ساخت کمپانی MBR سوئیس استفاده شد.

بازیافت اسید لاکتیک: لاکتات کلسیم حاصل از تخمیر توسط اسید سولفوریک ٦٣٪ به اسید لاکتیک تبدیل گردید. در این مرحله ابتدا در ۱۰ لوله آزمایش، هر کدام ۱۰ ml از مایع حاصل از مرحله قبل ریخته شد. سپس به هر کدام مقادیر متفاوت اسید سولفوریک ٦٣٪ اضافه شد تا تیتر مناسب اسید سولفوریک جهت تبدیل لاکتات کلسیم به اسید لاکتیک مشخص گردد (Zyed and Winter,1995).

جداسازی رسوبات: رسوبات و ژیبس تولید شده توسط فیلتر پرس جداسازی شدند.

رنگبری: از زغال فعال جهت رنگبری استفاده شد. مقدار زغال فعال، زمان ماند در مجاورت زغال فعال، تأثیر همزدن مایع و دما برای رنگبری بررسی و بهینه‌سازی شد.

روش اندازه‌گیری اسید لاکتیک: اندازه‌گیری اسید لاکتیک به روش رنگ سنجی انجام شد. با اضافه نمودن اسید سولفوریک غلیظ به اسید لاکتیک و حرارت در بن ماری جوش بعد از ۱۰ دقیقه، استالدئید حاصل شد. استالدئید در حضور سولفات مس ٤٪ و پارافنیل فنل (۱/۵٪ در اتانول)، بعد از ۳۰ دقیقه کمپلکس رنگی ایجاد کرد که میزان جذب نوری آن درطول موج nm ۵۷۰ اندازه‌گیری شد (Mirdamadi et al., 2008).

اندازه‌گیری کیفیت اسید لاکتیک تولیدی: جهت بررسی کیفیت اسید لاکتیک تولید شده نمونه‌ها با ستون C18 به روش analytical reverse phase HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت (Mirdamadi et al., 2009).

روش اندازه‌گیری گلوکز باقیمانده در محیط کشت. غلظت گلوکز به روش آنزیمی اندازه‌گیری شد. واکنش-های انجام شده در این آزمایش بدین ترتیب است که گلوکز توسط آنزیم گلوکز اکسیداز به گلوکونیک اسید و آب اکسیژنه تبدیل می‌گردد. آب اکسیژنه تحت تأثیر آنزیم پر اکسیداز و در حضور فنل و ٤- آمینوآنتی پیرین به کینون قرمز رنگی تبدیل می‌شود که رنگ ایجاد شده نسبت مستقیم با مقدار گلوکز موجود در نمونه دارد. که بعد از ۲۰ دقیقه کمپلکس رنگی ایجاد شده درطول موج ۵۰۰ nm بررسی و مقدار گلوکز نمونه بر اساس منحنی استاندارد اندازه‌گیری شد (Bruno-Barcena, 1999; Bergmeyer, 1974; Mirdamadi et al., 2007).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC): از مواد نگه‌دارنده در محیط کشت رقت متوالی تهیه شد. باکتری‌ها در محیط اختصاصی کشت و پس از رشد ۱۰۰ میکرولیتر از کشت حاوی 10^8 عدد در میلی لیتر (CFU/ml) به محیط کشت حاوی ماده نگه‌دارنده افزوده شد. پس از ٢٤ ساعت گرم‌خانه‌گزاری، رشد در لوله‌ها بررسی گردید. آخرین لوله عدم رشد به عنوان حداقل غلظت بازدارنده رشد انتخاب گردید.

رسم منحنی رشد: میکروارگانیسم‌ها در محیط اختصاصی فاقد نگه‌دارنده و حاوی نگه‌دارنده با حداقل غلظت بازدارنده کشت و برای باکتری‌ها میزان رشد بر اساس جذب در ٦۰۰ نانومتر در ساعت‌های متوالی محاسبه و منحنی رشد در هر حالت رسم گردید.

مواد: کلیه مواد شیمیایی و محیط‌های کشت تجاری استفاده شده در این تحقیق از کمپانی‌های Merck, Fluka و PanReac بود.

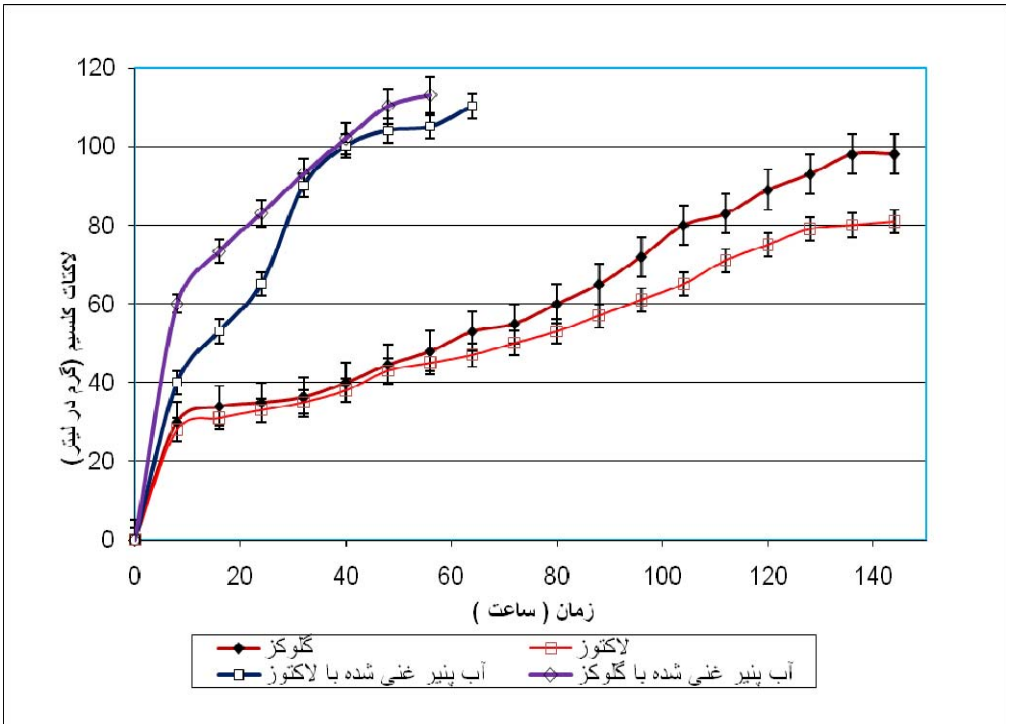
یافته‌ها

در بررسی‌های آزمایشگاهی، پس از بهینه‌سازی محیط کشت، سویه *L. casei ssp. casei* بیشترین تولید را در محیط حاوی ۸۰ گرم در لیتر گلوکز و ۵۰ گرم در لیتر آب پنیر داشت. در این سیستم ۷۲/۶۹ گرم در لیتر لاکتات کلسیم با بهره‌وری g/lh ۰/۵۱ و بازده ۵۶٪ تولید شد. سپس با هدف افزایش حجم تولید، تخمیر در دو فرمانتور همزن‌دار ۲۰ و ۷۵۰ لیتری به دو روش کشت غیرمداوم و نیمه مداوم انجام شد.

در فرمانتور همزن‌دار (STR) ۲۰ لیتری، محیط تولید بهینه سازی شده با پودر خیسانده ذرت به عنوان منبع نیتروژن و نیز شرایط تخمیر بهینه دمای ۴۲ °C، rpm:۵۰۰ و سیستم بی‌هوازی مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا محیط تولید با ۱۳۰g/l لاکتوز استفاده شد. بعد از گذشت ۱۴۱ ساعت، g/l ۷۳/۹۱ لاکتات کلسیم (بهره‌وری: g/lh ۰/۵۲ و بازده: ۵۶٪ تولید شد (شکل ۱).

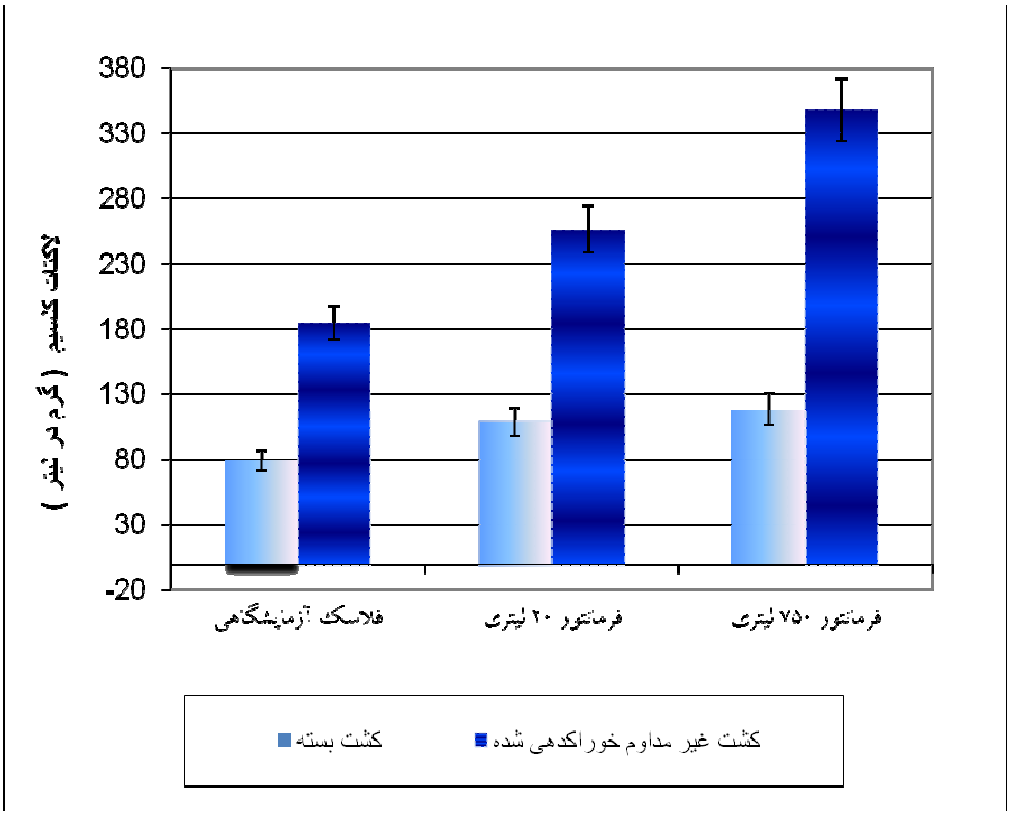
در آزمایش بعدی از گلوکز به میزان ۱۳۰g/l به عنوان منبع کربن استفاده شد. لاکتات کلسیم g/l ۹۵/۲۲ بعد از ۱۴۰ ساعت تولید شد که بهره‌وری g/lh ۰/۶۸ و بازده واکنش ۷۳٪ بود (شکل ۱).

سپس از آب پنیر (Whey) برای ساخت محیط تولید به میزان ۵۰g/l به همراه g/l ۸۰ لاکتوز استفاده شد. در این شرایط بعد از ۶۸ ساعت میزان تولید لاکتات کلسیم به g/l ۱۱۰ افزایش یافت و بهره‌وری g/lh ۱/۶۲ و بازده به ۸۵٪ رسید (شکل ۱).



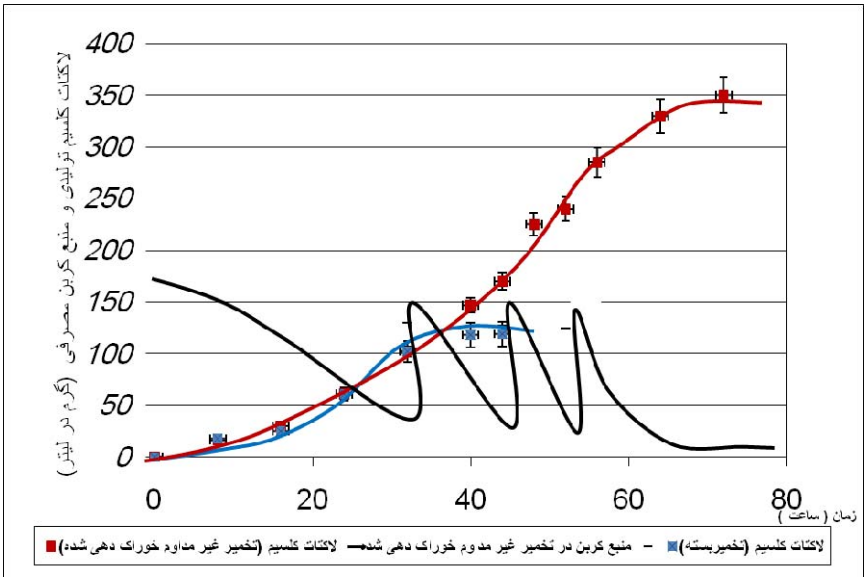
شکل ۱: میزان تولید لاکتات کلسیم در واحد زمان در محیط تولید با منابع کربن متفاوت

پس از موفقیت تولید در فرمانتور ۲۰ لیتر شرایط تولید اسید لاکتیک در فرمانتور همزن‌دار (STR) با حجم ۷۵۰ لیتر با دو شرایط کشت غیرمداوم (batch) و خوراک‌دهی نیمه مداوم (feed batch) بررسی شد. مقایسه میزان تولید در کشت غیرمداوم و نیمه مداوم نشان داد که افزایش تدریجی سوبسترا بصورت نیمه مداوم اثر افزاینده در تولید دارد (شکل ۲).



شکل۲: مقایسه دو روش تخمیر غیرمداوم و نیمه مداوم درمحیط تولید در شرایط آزمایشگاهی تا نیمه صنعتی

در کشت‌های خوراک‌دهی غیرمداوم زمان خوراک‌دهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تنظیم دقیق زمان از اثر کاهنده افزایش غلظت سوبسترا بدلیل خاصیت اسمز و کاهش آب فعال جلوگیری می‌شود. شکل ۳ ضمن مشخص کردن زمان خوراک‌دهی در سیستم نیمه مداوم، میزان تولید را در دو سیستم و در فرمانتور ۷۵۰ لیتر مقایسه می‌نماید.



شکل۳- تولید لاکتات کلسیم در فرمانتورL ۷۵۰ به روش تخمیر غیرمداوم و نیمه مداوم

افزایش حجم تولید (Scale up) یکی از مراحل مهم تولید صنعتی است که در فرمانتور ۷۵۰ لیتر انجام و در شرایط غیرمداوم g/l ۱۲۰ لاکتات کلسیم با بهره‌وری ۲/۸g/lh و بازده ۹۲٪ به دست آمد در حالیکه در کشت نیمه مداوم g/l۳۵۰ لاکتات کلسیم با بهره‌وری g/lh ۵/٤ تولید شد.

نتایج میزان تولید لاکتات کلسیم و بهره‌وری در تخمیر نیمه مداوم در فرمانتور ۷۵۰ لیتر در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول۱- میزان تولید لاکتات کلسیم و بهره وری در تخمیر نیمه مداوم در فرمانتور ۷۵۰ لیتر

زمان (ساعت)	۲۱	۳۱	٤۲	۵۸	٦۵
لاکتات کلسیم (گرم در لیتر)	۵۵	۹۲	۱۵۵	۲۹٦	۳۵۰
بهره‌وری (گرم در لیتر ساعت)	۲/٦	۳	۳/٤	۵	۵/٤

قابل ذکر است پس از انجام مرحله تخمیر، فرآیندهای بعد از تولید در حد نیمه صنعتی آغاز شد. با افزودن اسید سولفوریک ٦۳٪ سولفات به همراه کلسیم به صورت ژیپس رسوب می‌نماید و اسید لاکتیک آزاد می‌گردد. رسوبات ژیپس و پروتئین‌های تغلیب‌شده توسط فیلتر پرس حذف و اسید لاکتیک حاصل در تانک‌های نگه‌دارنده جمع‌آوری گردید. بدلیل واکنش‌های شیمیایی متعدد نظیر واکنش میلارد،

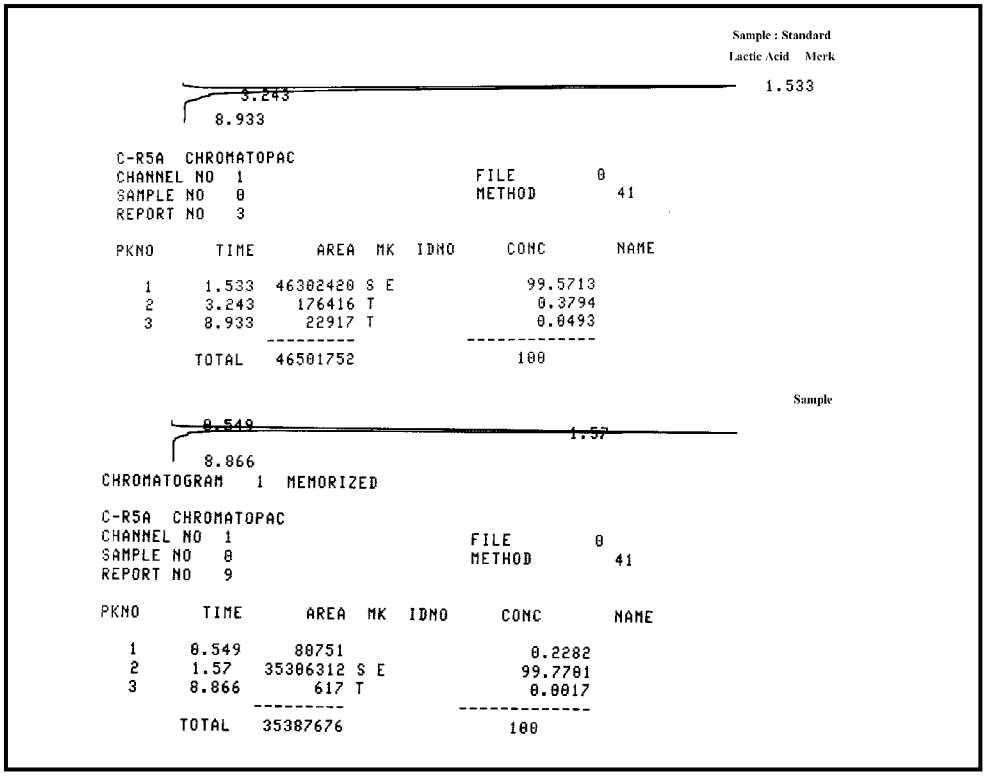
کاراملیزه شدن کربوهیدارات‌های باقیمانده و مواد رنگی موجود در مواد اولیه، اسید حاصل حاوی ترکیبات زرد رنگ بود که توسط زغال فعال رنگبری گردید. جدول ۲ مراحل تخلیص و میزان بازیافت محصول در هر مرحله را نشان می‌دهد.

جدول۲- مراحل تخلیص و میزان بازیافت اسید لاکتیک تولید شده در فرمانتور ۲۰ لیتر

نمونه	حجم (لیتر)	مقدار لاکتات (گرم)	درصد بازیافت
مایع تخمیر	۱۶	۲۶۲۴	۱۰۰
رسوبدهی پروتئین‌ها	۸	۲۶۱۳/۳۶	۹۹/۶
افزودن اسید سولفوریک و جداسازی ژیپس	۸	۲۴۷۳	۹۴/۲۵
تغلیظ	۳	۱۹۰۶	۸۸
رنگبری	۳	۱۹۰۰	۸۷/۷

بعد از پایان تخمیر در فرمانتور L ۷۵۰، و اجرای مراحل تخلیص از حدود ۱۰۰ لیتر مایع تخمیر نهایی دارای ۳۵۰ گرم در لیتر لاکتات کلسیم، حدود ۸۰ لیتر اسید لاکتیک ۲۷۰ گرم در لیتر حاصل شد.

جهت بررسی کیفیت اسید لاکتیک تولید شده، نمونه‌ها به روش HPLC با ستون C18 مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل٤).



شکل۴: نتایج HPLC جهت بررسی کیفیت اسید لاکتیک تولید شده

با توجه به کاربردهای مختلف این ترکیبات در صنایع غذایی، اثر بازدارندگی هر یک از ترکیبات اسید لاکتیک و لاکتات کلسیم مورد ارزیابی قرار گرفت. در جدول شماره ۳ طیف اثر اسید لاکتیک و لاکتات کلسیم حاصل در مقایسه با بازدارنده‌های دیگر مقایسه گردید.

جدول ۳: تعیین حداقل غلظت بازدارنده مواد نگه‌دارنده درمیلی لیتر محیط کشت در شرایط بهینه

ماده نگه‌دارنده	*لیستریا منوسیتوژنز*	*میکروکوکوس لوتئوس*	*اشریشیا کولای*	*استافیلوکوکوس ارئوس*
اسید لاکتیک	$۱۰^{-۴}$	$۱۰^{-۵}$	$۱۰^{-۴}$	$۱۰^{-۴}$
لاکتات کلسیم	$۱۰^{-۳}$	$۱۰^{-۳}$	$۱۰^{-۳}$	$۱۰^{-۳}$
بنزوات سدیم	$۱۰^{-۵}$	$۱۰^{-۵}$	$۱۰^{-۴}$	$۱۰^{-۴}$
نیترات سدیم	۵×۱۰^{-۳}	$۲/۵\times۱۰^{-۳}$	۵×۱۰^{-۳}	۵×۱۰^{-۳}
نیتریت سدیم	۲×۱۰^{-۴}	۲×۱۰^{-۴}	$۶/۲۵\times۱۰^{-۴}$	$۶/۲۵\times۱۰^{-۴}$

بررسی اثر مهاری ترکیبات لاکتات با بررسی اثر بر ضریب رشد میکروارگانیسم‌های استاندارد قابل بررسی و استانداردسازی می‌باشد. لذا اثر اسید لاکتیک و نمک لاکتات آن بر ضریب رشد میکروارگانیسم‌های استاندارد مهم در صنایع غذایی بررسی گردید (شکل ۵).

شکل۵: اثر اسید لاکتیک و نمک لاکتات بر ضریب رشد برخی میکروارگانیسم‌های مهم در صنعت غذا

بحث و نتیجه‌گیری

از آنجا که تنها ایزومر نوری L(+) اسید لاکتیک در بدن انسان متابولیزه می‌گردد و سویه مولد باید تنها این ایزومر نوری را تولید نماید. سویه *L. casei ssp. casei* به دلیل توان بالای تولید اسید لاکتیک، متابولیسم هموفرمانتاتیو و تولید ایزومر نوری نسبتاً خالص L(+) جهت تولید اسید لاکتیک انتخاب گردید (Bruno-Barcena et al., 1999; Gieese, 1994; Mirdamadi et al., 2007). از طرفی با توجه به هدف این تحقیق که صنعتی سازی تولید اسید لاکتیک بود، و در تولید در حجم نیمه صنعتی و صنعتی استفاده از سوبستراهای ارزان و در دسترس ضروری است (Anuradha et al., 1999)، ما در این تحقیق از مواد اولیه در دسترس نظیر گلوکز صنعتی، لاکتوز صنعتی، آب پنیر به عنوان منبع لاکتوز (Fitzpatrick et al., 2001)، خیسانده ذرت (پساب کارخانه‌های استخراج نشاسته از ذرت) استفاده نمودیم.

در حال حاضر، از سوکروز بدست آمده از ساقهٔ نیشکر و چغندر قند، لاکتوز موجود در آب پنیر (cheese whey)، مالتوز و دکستروز حاصل از هیدرولیز نشاسته به صورت تجاری در فرآیندهای تولید اسیدلاکتیک استفاده می‌شود. نتایج آزمایش‌های ما نشان داد که لاکتوز و گلوکز از مناسب‌ترین سوبستراها برای تولید اسید لاکتیک از این سویه است. بنابراین سوبستراهای لاکتوز، گلوکز و آب پنیر تقویت شده با هر یک از این دو سوبسترا به عنوان بهترین منبع انتخاب و پس از بهینه‌سازی نشان داده شد گلوکز در این سویه دارای راندمان بالاتری در تولید اسید لاکتیک می‌باشد.

معمولاً منابع نیتروژن‌داری نظیر جوانه جو، عصارهٔ جو، عصاره خیسانده ذرت (corn steep liquor)، عصاره مخمر یا شیر دلمه نبسته به عنوان منبع ازت و به منظور ایجاد رشد سریع و انبوه میکروارگانیسم‌ها به محیط کشت اضافه می‌نمایند. در این راستا ما عصاره خیسانده ذرت را به عنوان یک سوبسترای ارزان، در دسترس و صنعتی مورد استفاده قراردادیم. با توجه به اینکه عصاره خیسانده ذرت دارای املاح و ویتامین‌های متعددی است (Anuradha et al., 1999) از حداقل عناصر دیگر جهت تکمیل محیط تولید استفاده گردید.

پس از بهینه‌سازی محیط کشت، در بررسی‌های افزایش حجم تولید در دو فرمانتور همزن‌دار ۲۰ و ۷۵۰ لیتری به دو روش کشت غیرمداوم و نیمه مداوم انجام شد. در افزایش تولید استفاده از سوبسترای ارزان قیمت از اصول تولید صنعتی می‌باشد. لذا در فرمانتور همزن‌دار (STR) ۲۰ لیتری، محیط تولید بهینه‌سازی شده با پودر خیسانده ذرت به عنوان منبع نیتروژن و سیستم بی‌هوازی بهینه گردید. در شرایط وجود لاکتوز بهره‌وری g/lh ۰/۵۲ و بازده: ۵۶٪ حاصل شد. در آزمایش بعدی از گلوکز به عنوان منبع کربن استفاده شد. در این حالت میزان بهره‌وری و بازده افزایش و به ترتیب به g/lh ۰/۶۸ و ۷۳٪ رسید. پس از استاندارسازی شرایط با سوبسترای استاندارد از آب پنیر (Whey) برای ساخت محیط تولید استفاده شد. در این شرایط بدلیل وجود ترکیبات مناسبی نظیر برخی ویتامین‌ها و املاح در آب پنیر بهره‌وری، g/lh و بازده به شدت افزایش و به ۱/۶۲ و ۸۵٪ رسید (شکل ۱).

همان طور که مقایسه نمودارها در شکل ۱ نشان می‌دهد، هرچند لاکتوز سوبسترای بسیار مناسبی برای

لاکتوباسیل‌ها است اما استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن باعث افزایش تولید و بهره‌وری شده است و لازم به ذکر است، استفاده ازلاکتوز و آب پنیر که ماده تقویت کننده محیط محسوب می‌شود منجر به افزایش قابل توجه میزان تولید لاکتات کلسیم، بهره‌وری و بازده واکنش می‌شود.

در هنگامی که از گلوکز به جای لاکتوز استفاده شد، یعنی در محیط تولید به g/l ۵۰ آب پنیر، g/l ۸۰ گلوکز اضافه شد، در مدت زمان ٤٤ ساعت g/l ۱۰۸/۷۵ لاکتات کلسیم تولید شد. در این شرایط بازده واکنش ۸۳٪ و بدون تغییر خاصی بود ولی بدلیل کاهش زمان تولید افزایش قابل توجهی در بهره‌وری (g/lh ۲/٤۷) مشاهده گردید (شکل۱).

پس از موفقیت تولید در فرمانتور ۲۰ لیتر شرایط تولید اسید لاکتیک در فرمانتور همزن‌دار STR با حجم ۷۵۰ لیتر با دو شرایط کشت غیرمداوم و نیمه مداوم بررسی شد که در افزایش حجم با وجود اثرات ممانعتی انتقال جرم و حرارت با بهینه‌سازی شرایط میزان راندمان به بهترین شرایط خود رسید. یعنی در شرایط غیرمداوم g/l ۱۲۰ لاکتات کلسیم با بهره‌وری g/lh ۲/۸ و بازده ۹۲٪ و در کشت نیمه مداوم g/l ۳۵۰ لاکتات کلسیم با بهره‌وری g/lh ٥/٤ تولید شد. این شرایط قابل مقایسه است با تولید صنعتی، کمپانی PURAC که با استفاده از سویه *L. bulgaricus* در سال ۳٤۰۰۰ تن اسید لاکتیک به روش مداوم (Continuous) تولید می-کند. کمپانی‌های چینی متعددی با روش غیر پیوسته و با راندمان کم این محصول را تولید می‌نمایند که بدیهی است افزایش راندمان از حالت غیر پیوسته به خوراک دهی نیمه پیوسته خود تأثیر بالایی در افزایش راندمان خواهد داشت (Bray, 1998).

پس از انجام مرحله تخمیر، فرآیندهای بعد از تولید (Down Steam Processing) با آغاز مرحله جداسازی سلول از مایع تخمیر و تخلیص در حد نیمه صنعتی آغاز شد که در فرمانتور L ۷۵۰ از حدود ۱۰۰ لیتر مایع تخمیر نهایی دارای ۳۵۰ گرم در لیتر لاکتات کلسیم، حدود ۸۰ لیتر اسید لاکتیک ۲۷۰ گرم در لیتر حاصل شد. جهت بررسی کیفیت و خلوص اسید لاکتیک تولید شده، از روش HPLC استفاده شد.

همانگونه که در جدول شماره ۳ ملاحظه می‌شود اثر بازدارندگی لاکتات کلسیم بسیار کمتر از اسید لاکتیک است و این نکته باعث رشد بهتر سویه‌های تخمیری در مواد غذایی حاوی کلسیم خواهد شد. افزودن این نمک جهت غنی‌سازی کلسیم و در خمیر نان علاوه بر جلوگیری از رشد کلی فرم‌ها، از طنابی شدن نان جلوگیری می‌کند (Shelef, 1994).

اثر بازدارندگی اسید لاکتیک در بسیاری موارد نظیر ترکیبات دیگری مثل نیتریت، نیترات، بنزوات می‌باشد. البته باید توجه دشت که اثرات جانبی استفاده از هر ترکیب در مواد غذایی مختلف متفاوت است و جایگزینی اسید لاکتیک در مواد غذایی ممکن است که بر خواص دیگر آن حداقل تأثیر را داشته باشد. از طرف دیگر بی‌خطر بودن و حداقل عوارض جانبی ما را به این نکته رهنمون می‌سازد که می‌توان با تأثیر همزمان این ماده (در حداقل غلظت) با نگه‌دارنده‌های دیگر، میزان مصرف نگه‌دارنده‌های مضر را تا حد ممکن کاهش داد (Oh and Marshall, 1996). از طرفی همانگونه که در مقدمه ذکر شد استفاده از اسید لاکتیک

و نمک‌های آن در بسیاری از فرآورده‌ها لازم می‌باشد. این اسید علاوه بر کاهش آلودگی میکروبی در بهبود طعم، بافت و قوام مواد لبنی نظیر پنیر نقش دارد. علاوه بر آن در کنترل آلودگی‌های میکروبی مواد غذایی دریایی و گوشت، بخصوص آلودگی لیستریایی مؤثر می‌باشد (Mejlholm et al., 2010). در شکل ۵ ملاحظه می‌شود که این اسید به شدت ضریب رشد (Specific growth rate) میکروارگانیسم‌ها را کاهش می‌دهد. یعنی علاوه بر توان ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌ها، در غلظت‌های کمتر ضریب رشد آنها را نیز کاهش و زمان تخمیر یک ماده غذایی را افزایش می‌دهد. لازم به ذکر است که ضریب رشد مخصوص این سویه‌های استاندارد که به عنوان سویه‌های ارزیابی کننده مواد ضد رشد بکار می‌روند، در عدم حضور ماده نگه‌دارنده بخوبی منحنی رشد طبیعی باکتری‌ها را نشان می‌دهد، اما در حضور لاکتات کلسیم به شدت کاهش و در حضور اسید لاکتیک به سمت صفر میل می‌کند. این اسید در محافظت گوشت، سبزیجات و ماهی‌ها به کار می‌رود. لاکتات‌ها در مهار آلودگی‌های بوتیریکی در فرآیند تخمیر، به تأخیر انداختن تولید سم در *کلستریدیوم بوتیلینوم*، کاهش آلودگی میکروارگانیسم-های هوازی در سوسیس تازه و همبرگر پخته و مهار *لیستریا منوسیتوژنز* در مرغ و گوشت گوساله پخته نقش دارند (Giees, 1994; Shelef, 1994). علاو بر این، اسید لاکتیک به سفیده تخم مرغ برای تنظیم pH در حد ۵/۱-٤/۸، توزیع پروتئین در سفیده تخم مرغ و بصورت لاکتات کلسیم برای حفظ سختی برش‌های سیب در طی فرآوری و جلوگیری از بی‌رنگ شدن میوه‌ها و سبزیجات و به عنوان عامل تشکیل دهنده ژله برای پکتین‌های دمتیله، بهبود کیفیت شیر خشک، شیر کندانسه و فرآورده‌های قنادی کاربرد دارد (Giees, 1994; Shelef, 1994). اداره کل غذا و داروی آمریکا (FAO) مصرف لاکتات‌ها را بصورت منفرد و یا همراه با افزودنی‌های مجاز دیگر در گوشت و فرآورده‌های آن تا ۲ درصد، به عنوان تشدید کننده طعم تا ۲ درصد و تا ٤/۸ درصد در فرآورده‌های پروتئینی پخته شده که بصورت بسته‌بندی غیرقابل نفوذ ارائه می‌شود را مجاز می‌داند. اسپری محلول ۱-۳ درصد آن برای ضد عفونی کردن سطح گوشت و کاهش بار میکروبی با وجود اثر منفی بر مزه توصیه شده است (Shelef, 1994).

این مطالعه به خوبی روند تولید بیوتکنولوژی مواد بیولوژیکی نظیر نگه‌دارنده‌های شیمیایی و ارزیابی آن را نشان می‌دهد و می‌توان امیدوار بود با افزایش استفاده و جایگزینی افزودنی‌های طبیعی و بی‌خطر، نظیر اسیدهای آلی و املاح آنها، نیسین و غیره، امکان اقتصادی شدن تولید آنها در ایران نیز عملی گردد.

منابع

- Anuradha, R., Suresh, A.K. and Venkatesh, K.V. (1999). Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. Process Biotechemistry, 35: 367-375.
- Bergmeyer, H.B. (1974). Method of enzymatic analysis, D-glucose determination with glucose oxidase and peroxidase, 2nd Edition, wein heim: Ver lag chemie, 1205-1215.

- Bizzari, N.S. (2003). Lactic acid, Its Salts and Esters. The Chemical Economics Handbook-SRI International
- Bray, R. (1998). Lactic acid by fermentation, PEP (Process Economics Program) review, 96-7.
- Bruno-Barcena, J.M., Ragout, A.L., Cordoba, P.R. and Sineriz, F. (1999). Continuous production of L (+)-lactic acid by *Lactobacillus casei* in two-stage systems. Applied Microbiology Biotechnology, 51: 316-324.
- Fitzpatrick, J.J., Ahrens, M. and Smith, Sh. (2001). Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. Process Biochemistry, 36: 671-675.
- Gieese, J. (1994). Antimicrobials: Assuring food safety. Food Technology, 48(6): 102-110.
- Hofvendahl, K. and Hahn-Hagerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzme and Microbial Technology, 26: 87-107.
- John, H.L. (1996). Microbiol Production of lactic Acid. Advanced in Applied Microbiology, 4: 45-88.
- Mirdamadi, S., Sadegi, H., Sharifi, N., Fallahpour, M., Mohseni, F. and Bakhtiari, M.R. (2002). Comparison of lactic acid isomers produced by fungal and bacterial strains. Iranian Biomedical journal, 6(2-3): 69-75.
- Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D. and Dalgaard, P. (2010). Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes*-An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood, International Journal of Food Microbiology, 141(3): 137-150.
- Mirdamadi, S., Rajabi, A., Aziz Mohseni, F., Momen, B. (2007). Lactic acid Production by *lactobacillus* strains. Iranian Journal of Sciences and Food Technology, 2(3): 57-65.
- Mirdamadi, S., Rajabi, A., Akbarzadeh, A. (2005). Batch and fed batch production of L (+) lactic acid. Journal of Biotechnology, 118: 106-107.
- Mirdamadi, S., Atashgahi, S., Rajabi, A., Mohseni, F., Roayaei, M. and Hamedi, J. (2008). Cell entrapment of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 39392 for lactic acid production. Irainian Journal of Biotechnology, 6(1): 18-21.
- Mirdamadi, S., Agha Ghazvini, Sh., Taffresh, H. (2009). Production and nano-formulation of nisin in liposome as a slow release preservative against important food-born pathogens in Uf cheese. New Biotechnology, 25(1): 193.
- Oh, D.H. and Marshall, D.L. (1993). Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 20(4): 239-246.
- Shelef, L.A. (1994). Antimicrobials effects of lactates: A review, Journal of Food Protection, 57(5): 445-450.
- Tafreshi, S.H., Mirdamadi, S., Norouzian, D., Khatami, Sh. and Sardari, S. (2010). Effect of nonnutritional factors on nisin production. (2010). African Journal of Biotechnology, 9(9): 1382-1391.
- Tafreshi, S.H., Mirdamadi, S., Norouzian, D., Khatami, Sh. and Sardari, S. (2010). Optimization of non-nutritional factors for a cost-effective enhancement of nisin production using orthogonal array method. Journal of Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2(4): 267-273
- Zyed, G. and Winter, J. (1995). Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures o*f Lactobacilli*. Applied Microbiology Biotechnology, 44: 362-366.

Pilot Plant Production of Lactic acid by *Lactobacillus casei subsp. casei*

Mirdamadi, S.S.[*]

Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.
[*]Corresponding author email: Mirdamadi@irost.org
(Received: 2011/7/3 Accepted: 2012/6/5)

Abstract

The aim of present study, was to scale up the production of L (+) lactic acid from the laboratory to pilot plant using *Lactobacillus casei* subsp. *casei* PTCC 1608. Moreover, the minimum inhibitory concentration of the produced lactic acid and sodium lactate against 4 test strains including *Staphylococcus aureus* PTCC 1113, *Micrococcus luteus* PTTC 1110, *Escherichia coli* PTCC 1330 and *Listeria monocytogenes* PTCC 1304 were evaluated. According to the results, the specific growth rate of each test strain was decreased by lactic acid. The inhibitory effect of the sodium lactate was lower than lactic acid in all of the experiments. The best carbon (glucose, lactose and whey) and nitrogen (corn steep powder) sources were optimized in batch and fed batch system and also pH, temperature and aeration were improved in shake flask incubator, 20 l and 750 l stirred tank reactors (STR). Glucose (80 g/l) supplemented with (50 g/l) whey was found as the best production medium. Productivity and yield of calcium lactate production in laboratory scale were 0.51 g/lh and 0.56%, respectively. Fed batch production of calcium lactate in 20 l bioreactor increased the productivity and yield up to 2.47 and 0.83%. Production and productivity was increased up to 350 g/l and 5.4 g/lh, respectively in scaled up processes by 750 liters bioreactor (STR).

Keywords: Lactic acid, *L. casei*, Preservative, Stirred tank reactor, Fermentation.