

استفاده از ملاس در تولید اقتصادی اسید لاکتیک به روش تخمیر غیر پیوسته

Lactobacillus casei spp. casei توسط (feed-batch)

دکتر سید سعید میر دامادی **, لیلا بیگ محمدی * ، افسانه رجیبی، دکتر فرزانه عزیز محسنی
Mirdamadi@irost.ir سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران ، پژوهشکده بیوتکنولوژی
انستیتو پاستور ایران ، پایلوت بیوتکنولوژی ، تهران صندوق پستی ۱۳۱۶۴
دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد علوم و تحقیقات تهران ، گروه تخصصی زیست‌شناسی

اسید لاکتیک ماده شیمیایی است که از دو طریق شیمیایی و تخمیری تولید می‌گردد. تولید تخمیری اسید لاکتیک از دیدگاه بیوتکنولوژی اخیراً توجه زیادی را جلب کرده است ، چراکه در تولید تخمیری ایزومرهای خالص نوری همچون L(+) و D(-) را می‌توان از منابع قابل تجزیه زیستی بدست آورد و از آن‌ها در تولید پلاستیک‌های قابل تجزیه زیستی استفاده کرد. در این تحقیق تولید تخمیری اسید لاکتیک از ملاس تحت شرایط ناپیوسته در فرمانتور همزن‌دار (STR) بررسی شد . از سویه همو فرمنتاتیو تولید کننده L- اسید لاکتیک

Lactobacillus casei spp. casei PTCC 1608

استفاده شد. مایع تلقیحی را که ۱۰٪ حجم کل محیط تولید بود در شرایط استریل به فرمانتور همزن‌دار ۲۰ لیتری با حجم کار ۷٫۵ لیتر اضافه کردیم. محیط تولید بهینه شده دارای ۱۲٪ ملاس، ۵٪ پودر خیس‌انده ذرت، ۶٪ گلوکز بود؛ با توجه به املاح و فاکتورهای رشدی که در ملاس وجود دارد هیچ املاح دیگری اضافه نشد. البته حضور پودر خیس‌انده ذرت بعنوان منبع نیتروژن در کنار ملاس بسیار ضروری می‌باشد به طوریکه بالاترین بهره وری زمانی مشاهده شد که از ۵٪ پودر خیس‌انده ذرت استفاده شد. میزان اسید لاکتیک با روش رنگ سنجی در ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد و نتایج توسط HPLC تأیید شد. غلظت نهایی اسید لاکتیک ۱۳۰ گرم در لیتر با بهره وری ۲٫۷ gr /lh بود. (۹۸٫۴۸٪ بازده)

کلمات کلیدی: اسید لاکتیک، ملاس، پودر خیس‌انده ذرت، تخمیر ناپیوسته ، فرمانتور STR ، سویه *Lactobacillus casei*

Utilization Of Molasses For Economical L(+)-Lactic Acid Production By Feed-Batch Fermentatin Of Lactobacillus casei spp. casei PTCC 1608

Mirdamadi S. **, Beikmohammadi L. *, Rajabi A, Aziz Mohseni F.

Iranian Research Organization for Science and Technology, Biotechnology Dept., Tehran, Iran

Mirdamadi@irost.ir

Pilot Biotechnology Dept., Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, P.O. Box 13164

Dept of Biology, Science & Research Center, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Lactic acid is a commodity chemical that can be produced synthetically or by fermentation. It has potential use as a monomer for biodegradable plastics so that demand for it could rise rapidly in the near future. In this article , we describe the biotechnological production of Lactic Acid from molasses , in order to maximize the Lactic Acid produced and productivity and to reduce the manufacturing cost of Lactic acid. For these objectives, the effects of various fermentation parameters such as nitrogen source concentration , and molasses concentration on lactic acid fermentation from molasses were studied. *Lactobacillus casei* spp. casei PTCC 1608 was used in this study. (a homofermentative strain which produce L(+)-Lactic Acid) . the preculture was transferred into 20 l STR (steered tank reactor) containing 7.5 l of Lactic Acid production medium (molasses 12% , corn steep powder 5% , glucose 6%) . Using molasses was significantly affected by corn steep powder. Molasses, a by-product of sugar manufacturing process, generally contains approximately 50% (w/w) of total sugars , but it is currently used almost as an animal feed.

The maximum Lactic Acid productivity was obtained to 2.7 gr/lh at 5% corn steep powder . the amount of Lactic Acid was determined by colorimetric method and confirmed by HPLC. With optimized medium the concentration of Lactic Acid was 130 gr/l and the volumetric productivity was 2.7 gr/lh (yield=98.48%)

Keywords: feed- batch production, molasses , corn steep powder , *Lactobacillus casei* ,

مقدمه

اسید لاکتیک يك اسید آلي ضعيف با وزن ملكولي كم ميباشد. اين ماده يكي از كوچكترين مولكولهايي است كه داراي يك كرين نامتقارن در موقعيت آلفاعامل كربوكسيل مي باشد. اين خصوصيت وجود دو نوع مختلف استريو ايزومر $L(+)$ و $D(-)$ را سبب مي شود. اين اسيد در صنايع شيميايي، دارويي، چرم و پارچه، و غذايي کاربردهاي فراواني دارد، از آن جمله در داروسازي بعنوان ماتريس رهايش كنترل شده در جذب داروها و در ساخت نخ هاي بخيه قابل جذب و همچنين در صنايع شيميايي در توليد مواد اوليه شيميايي و ساخت پليمر هاي قابل تجزيه زيستي کاربرد وسيعي دارد. امروزه در صنايع اين اسيد به دو صورت تخميري و شيميايي توليد مي شود. با پيشرفت پروسه هاي تخميري امروزه توليد اسيد لاکتیک ۹۰٪ به صورت تخميري و فقط ۱۰٪ بصورت شيميايي انجام مي گيرد. از مزايای توليد تخميري مقرون به صرفه اقتصادي بودن آن است و يكي ديگر از ويژگيهاي خاص پروسه هاي تخميري انتخاب سويه هاي باکتریایی است که فقط يك نوع خالص از ايزومر را توليد مي کنند ولي در مقابل، در پروسه شيميايي مخلوط راسمیک اسيد لاکتیک توليد مي شود. همانطور که مي دانيم در ساخت پليمر هاي قابل تجزيه زيستي از ايزومر هاي خالص استفاده مي شود. مواد خام بخش وسيعي از هزينه توليد تخميري در مقیاس صنعتي را شامل مي شود. بهره وري اسيد لاکتیک توسط سويه هاي لاکتوباسیلوس بطور مستقيم وابسته به منبع نيترورژن است (۵و۷). تخمير غير مداوم هنوز يكي از روشهاي مورد استفاده معمول در توليد صنعتي اسيد لاکتیک است، اگر چه، بعلت مهار محصول نهايي بهره وري نسبتاً کمتری را نشان مي دهد.

(۲)

اخيرا تلاش هاي بسياري در بهبود پروسه هاي توليد پيوسته با راکتورهاي $Ilce-recycle$ انجام شده است. *Lactobacillus casei* سويه هموفرماتانتیو است که توليد کننده $L(+)$ اسيد لاکتیک و مقادير ناچيزي $D(-)$ اسيد لاکتیک است. (۱) در اين تحقيق از سويه ۱۶۰۸ *Lactobacillus casei subsp casei* PTCC استفاده شد. همچنين در اين تحقيق با بررسي منابع مختلف نيترورژن و کربن بهترين منبع نيترورژن و کربن انتخاب شد که هم مقرون به صرفه (بودر خيسانده ذرت و ملاس) ملاس محصول جانبي فرايند اقتصادي باشد و هم توليد بالايي از اسيد لاکتیک را نشان دهد. هاي توليد قند است که بطور کلي داراي تقريباً ۵۰٪ قند است ولي مقدار زيادي از آن بعنوان غذاي دام استفاده مي شود با توجه به ديدهگاه اين تحقيق ملاس سوبسترای مناسبی ميباشد و سبب کاهش هزينه هاي توليد مي شود.

مواد و روشها:

میکرو ارگانيسم: در اين تحقيق سويه *Lactobacillus casei subsp casei* مورد استفاده قرار گرفت.
محيط کشت: براي پيش کشت محيط MRS مورد استفاده قرار گرفت.
بودر خيسانده ذرت ۵٪، بود. و داراي ۶٪ گلوکز، ملاس ۱۲٪ توليد بهينه سازي شده محيط شرايط کشت: در فرمانتور همزن دار ۲۰ ليتر در شرايط بدون هوايي و به روش تخمير ناپيوسته (feed-batch) در دماي ۴۲ درجه سانتیگراد و دور شش ليکر ۴۰۰rpm صورت گرفت.

روشهاي آناليزي:

میزان اسيد لاکتیک به صورت رنگ سنجي در ۵۷۰ نانومتر اندازه گيري شد. میزان گلوکز نیز به روش رنگ سنجي تعيين شد توسط HPLC تائيد شد.

نتايج و بحث:

با توجه به ديدهگاه اقتصادي توليد صنعتي اسيد لاکتیک بايد منبعي انتخاب مي شد که هم بازده بالا و هم هزينه پايين داشته باشد بر برپايه نتايج بدست آمده ملاس و گلوکز به عنوان منبع کربن و بودر خيسانده ذرت به عنوان منبع نيترورژن بهينه انتخاب شدند. نتايج نشان داد که ماکزيم توليد زماني بدست مي آيد که ۱۲٪ ملاس با ۵٪ بودر خيسانده ذرت و ۶٪ گلوکز در محيط توليد بکار گرفته شود. ماکزيم توليد اسيد لاکتیک از اين محيط توليد، حدود ۱۳۰ گرم بر ليتر با بهره وري ۲،۷ گرم در ليتر ساعت بود. بررسي ها مطابق با مقالات ديگر نشان داد که اين سويه قادر به استفاده تنها از منبع غير آلي نيترورژن (سولفات آمونيم) نيست و از منابع آلي بهتر استفاده مي کند. حال در ميان منابع آلي نيترورژن منابع با خلوص بالا از جمله عصاره مخمر و پلي پپتون وجود دارد که چنانچه سبب افزايش سرعت تخمير و بهره وري بهتر مي شوند ولي هزينه بالايي آنها در مقیاس صنعتي مقرون به صرفه نيست و در بيشتر مطالعات به دنبال منبع ارزان قيمت نيترورژن با

uslactobacill bulgaricus با استفاده از ۱۰ گرم در لیتر عصاره مخمر تولید می شود ، هزینه عصاره مخمر به تنهایی حدود ۳۸٪ از هزینه کل تولید اسید لاکتیک را شامل می شود. در تحقیقی دیگر (۲۰۰۱) and et al M.Hujanen نشان دادند که جوانه مالت منبع خوبی از نیترژن است هر چند که غلظت نهایی اسید لاکتیک بدست آمده از آن کمتر از زمانی است که از عصاره مخمر استفاده شود . اما در پروسه های صنعتی تنها رسیدن به بالاترین مصرف سوبسترا مهم نیست و هدف مهمتر در پروسه صنعتی بازده بالا با هدف کاهش هزینه های مواد اولیه است . باکتریهای اسید لاکتیک میکروارگانیزم های سخت رشدی هستند که احتیاج به اسیدهای آمینه و ویتامینها برای رشدشان دارند و قابل توجه است که در ملاس ویتامینها و اسیدهای آمینه ای از جمله اسید آسپارتیک ، تیامین ، اسید پانتوتنیک ، نیاسین ، پیروکسین ، ربیوفلاوین و املاحی همچون پتاسیم ، سدیم ، منیزیم و ... وجود دارد که تا حدی تامین کننده ویتامینها و فاکتورهای رشد برای لاکتوباسیلوس کازئی هستند . در این تحقیق بهره وری به صورت تقسیم ماکزیم اسید لاکتیک به کل زمان تخمیر بدست آمد در نتیجه بالاترین بهره وری بدست آمده از پودر خیسانده ذرت و ملاس ۲,۷گرم در لیتر ساعت بود .

REFERENCES:

- 1- Rogosa M (1974) *Lactobacillus*. In: Cowan ST, et al. Pp 576-593
- 2- Borzani W, Podlech PAS, Luna MF, Stein MACF (1993) Kinetics of semicontinuous microbial transformation of whey by *Lactobacillus bulgaricus* varying the initial concentration of yeast autolysate. *J Biotechnol* 3:61-66
- 3- Holland S.J, Tighe B.J. and GOULD P.L. (1993) Polymers for biodegradable medical devices. *J. Controlled Release* 23(3):209-220
- 4- Cheryan M Tejayadi (1995) Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 242-248
- 5- Chiarini L, Mara L, Tabacchioni S (1996) Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Appl Microbiol biotechnol* 36:428-433
- 6- Abdeltif Amrane, Yves Prigent (1996) A novel concept of bioreactor: Specialized function two-stage continuous reactor , and its application to lactose conversion into lactic acid. *J Biotechnol* 45:195-203
- 7- Yoo A-K, Chang HN, Lee EG, Chang YK, Moon S-H (1997) Effect of B vitamin supplementation on lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *J Ferment Bioeng* 84:172-175
- 8- Kotzamanidis Ch, Roukas T , Skaracis G. (2002) Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130 . *World J Microbiol Biotechnol* 18:441-448