

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، انتستیتو 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، انتستیتو پاستور ایران

تاریخ پذیرش: ۸۶/۷/۲۳

تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۷

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 تولید کننده 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 کاملاً استریل، روی محیط جامد شیبدار MRS کشت و سپس در محیط مایع MRS به عنوان پیش کشت تلقیح شدند. سپس ۲/۵ میلی لیتر از محیط پیش کشت حاوی 10^8 باکتری در میلی لیتر به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط تولید، تلقیح شد. و در دمای 30°C و 18°C دور در دقیقه، گرم‌گذاری شدند. میزان تولید اسید لاکتیک، مصرف گلوكز و رشد هر یک از سویه‌ها حداقل با سه تکرار اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج به دست آمده، در محیط تولید دارای 100 گرم در لیتر گلوكز با حداقل هواهدی در ارلن‌های کاملاً در بسته، سویه میکروبی PTCC 1608 با تولید $Lactobacillus casei$ ssp. *casei* 100 گرم در لیتر 95 g/L لاكتات کلسیم و بهره‌دهی $98/98$ گرم در لیتر ساعت با بازده واکنش 95% و همچنین سویه PTCC 1637 با تولید $Lactobacillus rhamnosus$ $81/40$ گرم در لیتر لاكتات کلسیم و بهره‌دهی $85/80$ گرم در لیتر ساعت و بازده واکنش $63/63\%$ به عنوان بهترین باکتری‌های هموفرماناتیو تولید کننده نوع ایزومر نوری (+) L اسید لاکتیک مشخص شدند.

نتیجه‌گیری: سویه‌های PTCC 1608 و PTCC 1637 با تولید مقادیر مناسب اسید لاکتیک نوع (+) L. *rhamnosus* با تولید اسید لاکتیک 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

بار توسط Scheele شیمیدان سوئدی در سال ۱۷۸۰ از شیر جدا شد (۱-۳)، سپس، لویی پاستور به بررسی روند تخمیر آن پرداخت و با جداسازی انواع باکتری‌های لاکتیک، از آنها در تهیه غذاهای تخمیری از شیر،

اسید لاکتیک (۲- هیدروکسی پروپیونیک اسید) با فرمول $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ یک اسید آلی هیدروکسیل دار ضعیف با وزن مولکولی کم و $\text{PKa} = 3/86$ در 25°C است. اسید لاکتیک برای اولین

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 و صنعتی 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 کاملاً استریل روی محیط جامد^۱ MRS agar شیبدار کشت داده و در جار CO₂ و در دمای ۳۰°C به مدت ۴۸ ساعت گرم‌گذاری 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 در شرایط ۳۰°C و ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۳۶ ساعت گرم‌گذاری شدند. فرمولاسیون محیط کشت تولید اسید لاکتیک: بر اساس بررسی‌های آزمایشگاهی بهینه سازی، محیط کشت

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 شد (۴، ۵). 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 داروبی، چندان مناسب نیست و WHO برای مصرف آن محدودیت قائل شده است.

در صنایع تخمیری اسید لاکتیک، از سویه‌های میکروبی جور تخمیر (همو فرمانتایو) استفاده می‌شود که با راندمان بالا می‌توانند فقط (+L) اسید لاکتیک را تولید کنند (۶). از آنجا که تولید ایزومر نوری خالص، با روش شیمیایی امکان پذیر 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 (۷-۹).

موارد استفاده از اسید لاکتیک را می‌توان به دو دسته کاربرد اسید لاکتیک و مشتقات اصلی آن طبقه‌بندی کرد که به طور عمده به صنایع غذایی، داروبی 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 می‌شود (۱۰، ۱۱). 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

^۱ - Man, Rogosa and Sharpe medium

با مقدار گلوكز موجود در نمونه دارد. ۲۰ دقیقه کمپلکس رنگی ایجاد شده در طول موج ۵۰۰ nm برسی و مقدار گلوكز 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 آنژیمی D-لاکتات دهیدروژناز و L-لاکتات دهیدروژناز (Mannheim Biochemica) (Boehringer) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش، آنژیم اختصاصی، لاکتات حاصل را به پیرووات و NADH⁺H تبدیل می‌کند. جذب نوری NADH به همراه معرف در طول موج ۳۴۴ nm حدود ۳۴۴ nm در اندازه‌گیری شد. بدیهی است که میزان تولید NADH در حضور هر آنژیم، معرف میزان نوع ایزومر نوری مربوط به آن آنژیم است (۱).

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

۰ یافته‌ها

بر اساس بررسی‌های انجام شده، از گلوكز به عنوان بهترین منبع کربن (۶۰ g/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، تتعديل pH محیط تولید با افزودن متناوب ۱٪ کربنات کلسیم استریل انجام شد (۱۰، ۱۲، ۹، ۸، ۵).

همان گونه که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، تولید لاکتات کلسیم توسط سویه‌های *L.rhamnosus*، *L.casei* و *L.plantarum* در دو شرایط هوادهی و بدون هوادهی، بیشتر از سویه‌های دیگر بود. در تمام موارد، شرایط بی‌هوایی با تولید بیشتر، ارجحیت داشت. این نکته در مراحل افزایش حجم تولید و در فرماناتورها از اهمیت خاصی برخوردار است؛ زیرا عدم هوادهی باعث کنترل بهتر آلودگی و کاهش بسیار زیاد هزینه تولید می‌شود.

طراحی شده با مقادیر متفاوت گلوكز به عنوان منبع کربن مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات دیگر محیط کشت عبارت بودند از (بر حسب گرم در لیتر): عصاره مخمر ۱۵٪، استات سدیم ۱٪، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۵٪، دی‌هیدروژن پتاسیم فسفات ۰/۵٪، سولفات منیزیم ۰/۲٪، سولفات منگنز ۰/۰۳٪، سولفات آهن ۰/۰۳٪ pH ۶±۰/۱ تنظیم شد. pH محیط تولید در طول تخمیر، با افزودن متناوب ۱٪ کربنات کلسیم استریل تعديل شد (۸).

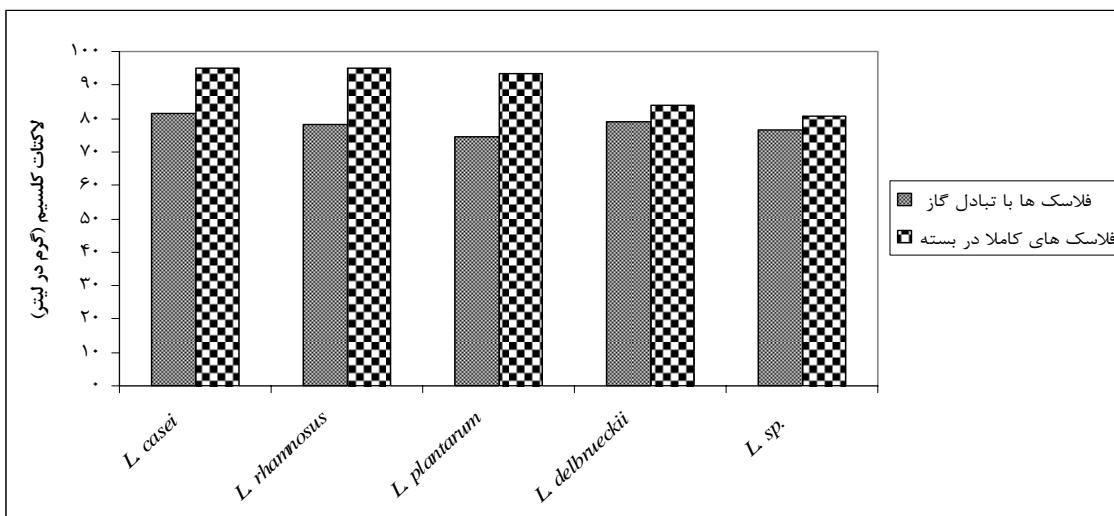
شرایط تخمیر: ۵۰ ml محیط تولید به فلاسک‌های ۲۵۰ mlی لیتری اضافه شد. ۲/۵ ml از محیط پیش کشت حاوی ۱۰^۴ باکتری در میلی لیتر به محیط تولید، تلقیح شد و سپس ارلن‌ها در دمای ۳۰°C و ۱۸۰ دور در دقیقه گرم‌آگذاری شدند. میزان تولید محصول و میزان مصرف سوبسترا برای هر یک از سویه‌ها اندازه‌گیری شد. با توجه به اینکه لاکتو باسیل‌ها به صورت میکروآتروفیل رشد می‌کنند، شرایط کشت به دو صورت فلاسک‌های کاملا در بسته و فلاسک‌های با شرایط تبادل گاز مناسب، طراحی شد. در فلاسک‌های کاملا بسته، توسط گاز پنبه فشرده به وسیله پارافیلم و فویل آلومینیومی و در فلاسک‌های با شرایط تبادل گاز مناسب با گاز پنبه‌های غیر فشرده استریل بسته شد.

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

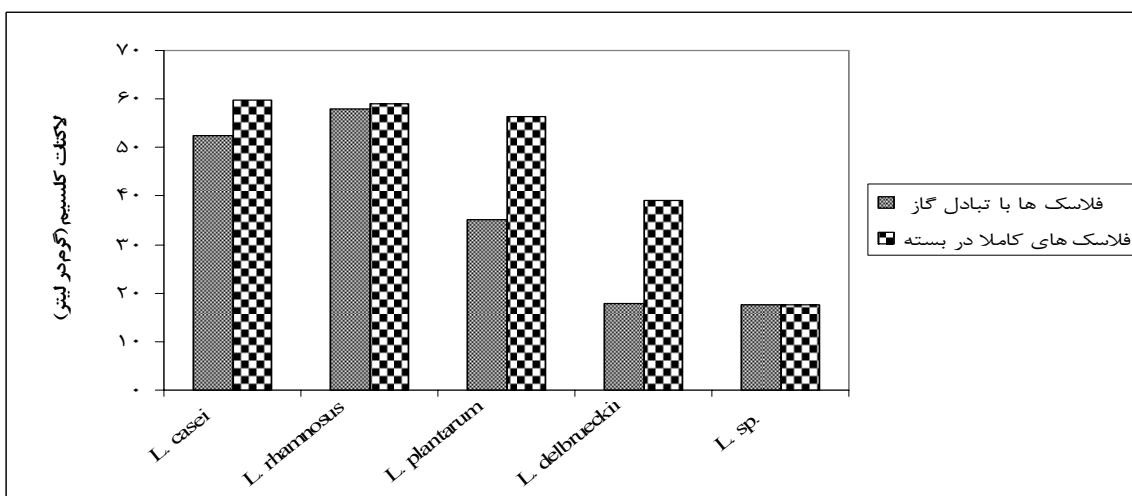
روش اندازه‌گیری گلوكز: غلظت گلوكز به روش آنژیمی، اندازه‌گیری شد. به این ترتیب است که گلوكز توسط آنژیم گلوكز اکسیداز به گلوكونیک اسید و آب اکسیژنه تبدیل می‌شود. آب اکسیژنه، تحت تاثیر آنژیم پراکسیداز و در حضور فنل و ۴-آمینو آنتی پیرین به کینون قرمز رنگی تبدیل می‌شود که رنگ ایجاد شده نسبت مستقیم

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 ۱۰۰ g/L گلوکز در شکل ۲ نشان داده شده است.

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 کاملاً 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.



شکل ۱- تولید لاکتات کلسیم توسط لاکتو باسیل‌های مختلف در محیط دارای ۱۰۰ g/L گلوکز در شرایط متفاوت هوادهی



شکل ۲ - تولید لاکتات کلسیم توسط لاکتو باسیل‌های مختلف در محیط دارای ۱۰۰ g/L گلوکز در شرایط متفاوت هوادهی

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 از ۵۹٪ تا ۹۵٪ (جدول ۱) متفاوت است، شب 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 جدول ۱ ارائه شده، در شکل ۳ 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 سوبسترا به محصول است و شب تولید باکتری‌های دیگر نسبت به شب مصرف سوبسترا ضریب کمتری دارد.

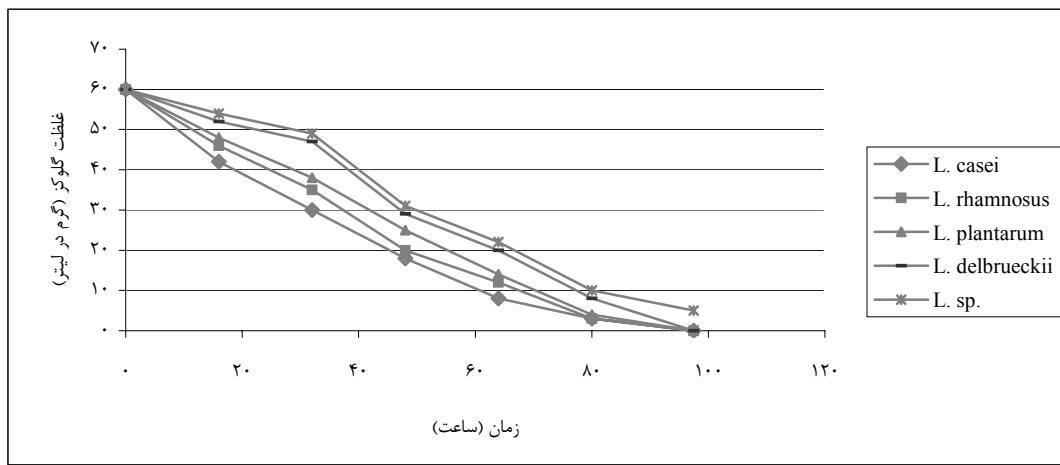
در این شرایط، تقریباً همه سویه‌ها تولید مناسبی داشتند. همان گونه که در شکل دیده می‌شود، در شرایط مناسب تبادل گازها، سویه *L. casei* subsp. *casei* با *L. casei* با ۸۱/۴۰ g لاکتات کلسیم و در ارلن‌های کاملاً در تولید ۹۵ g/۱ بسته با تولید ۹۳/۶۱ در رده‌های بعدی قرار داشت. سویه *L. rhamnosus* با تولید ۹۴/۹۷ داشت. سویه *L. plantarum* و *L. paracasei* 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 شدن، قابل پیش‌بینی بود. نتایج مقایسه سویه‌های فوق در جدول ۱ 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.

جدول ۱- میزان حداکثر تولید، پهنه وری و بازده سویه‌های لاکتوباسیل در شرایط بھینه

شماره سویه‌ها (PTCC)	۱۶۰۸	۱۶۳۷	۱۰۵۸	۱۳۳۴	۱۳۳۲
لاکنات 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*.



شکل ۳ - غلظت گلوکز در محیط دارای $100\text{ g}/\text{L}$ گلوکز در فلاسک‌های کاملاً در بسته

۵۲/۸۳ گرم در لیتر تولید دارای بهره‌دهی ۰/۷۳ ۰/۵۲ گرم در لیتر ساعت و بازده ۸۷٪ بود.

باتوجه به میکرو آئروفیلیک بودن سویه‌ها و نیاز به حضور CO₂ در مراحل رشد، تولید در ارلن های کاملا درسته، شرایط بهتری دارد؛ زیرا در این شرایط، تولید لاکتانس کلسیم افزایش می‌یابد و سویه‌ها مسیر متابولیک هموفرماناتیو را طی می‌کنند. در این شرایط، سویه Lactobacillus casei subsp. *casei* با ۵۹/۸۷ گرم در لیتر تولید دارای بهره‌دهی ۰/۸۳ ۰/۵۹ گرم در لیتر ساعت و بازده ۹۹٪ و سویه *Lactobacillus rhamnosus* با تولید ۵۸/۹۶ گرم در لیتر دارای بهره‌دهی ۰/۸۲ ۰/۵۸ گرم در لیتر ساعت و بازده ۹۸٪ بود.

به این ترتیب، با کاهش اکسیژن محلول در محیط افزایش تولید و بهره‌دهی دیده می‌شود. بیشتر سویه‌های میکروآئروفیل *Lactobacilli* در غیاب اکسیژن یا مقادیر ناچیز آن، فعالیت بالاتری از خود نشان دادند (شکل ۱). Tseng و Montive نیز در بررسی‌های خود نشان دادند که در تعدادی از سویه‌های *Lactobacilli*، با افزایش غلظت اکسیژن محلول در محیط کشت، مکانیسم تخمیر هتروفرماناتیو جایگزین مسیر متابولیک همو فرماناتیو 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 میکرووارگانیسم‌ها در بهترین شرایط ثابت باقی می‌ماند. آزمایشات نشان داد که افزایش بیش از

• بحث

در فرایند تولید تخمیری اسید لاکتیک، گزارش‌های متعددی درباره سویه‌های میکروبی مختلف از جمله لاکتوباسیل‌ها و رایزوپوس اوریزا وجود دارد (۱۴، ۱۵). 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 لاکتانس 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 تعديل pH از اثر مهار کنندگی اسید حاصل هم جلوگیری به عمل آمد. برای انتخاب سویه مناسب تولید کننده 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 آزمیمی اندازه‌گیری شد و تا به پایان رسیدن آن، فرایند تخمیر ادامه یافت. نتایج به دست آمده بر اساس میزان تولید لاکتانس کلسیم بعد از به پایان رسیدن گلوکز محیط در محیط دارای ۱/۶۰ g گلوکز با شرایط هوادهی و بدون هوادهی در شکل ۱ نشان داده شده است.

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

تولید لاکتات کلسیم، میزان بهرهوری و بازده سویه‌های مطالعه شده در جدول ۱ ارائه شده است.

میزان مصرف گلوکز توسط هر سویه در شرایط بهینه در شکل ۳ نشان داده شده است. همان گونه که این منحنی نشان می‌دهد، مصرف سوبسترا توسط تمام سویه‌ها تقریباً 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 (۹۳/۸۱ g/L) لاکتات کلسیم) بر خوردار بود، اما آزمایش‌ها مشخص کرد که فقط دو سویه *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 شده مول د اسید لاکتیک، بررسی میزان تولید لاکتات در محیط حاوی ۱۰۰ g/L گلوکز توسط سویه‌های مولد و بررسی تولید با سویه *L. rhamnosus* با ویژگی‌های ارئه شده در مقاله کاملاً 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 کاملاً جدید است.

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

در محیط‌های دارای ۱۰۰ g/L گلوکز بعد از گذشت ۹۶ ساعت، تقریباً 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 در شکل ۲ ارائه شده است. بیشترین میزان تولید در این محیط، به سویه ۸۱/۴۰ g/L *L. casei* ssp. *casei* کلسیم، بهره‌وری ۸۵٪ ۰ گرم در لیتر ساعت و بازده ۸۱٪ تعلق داشت.

سپس میزان تولید در ارلن‌های کاملاً در بسته بررسی شد که افزایش قابل ملاحظه تولید و بهره‌وری داشت. در این شرایط، *Lactobacillus casei* ssp. *casei* کلسیم، بهره‌دهی ۹۸٪ ۰ گرم در لیتر ساعت و بازده ۹۵٪ به دست آمد. Hujanen و همکاران تولید ۸۲ g/L گلوکز توسط لاکتیک را در محیط دارای ۱۰۰ g/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 کردنده که با توجه به تولید ۹۴/۹۷ g/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، ۷۶/۴۳ g/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

• 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, Sethuram 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. Fitzpatrick 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 Biotechnol 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.