Preparation of local structural media for lactic acid production from commercial isolate *Lactobacillus delbrueckii*

تحضير أوساط تركيبية محلية لإنتاج حامض اللاكتيك من العزلة التجارية *Lactobacillus delbrueckii*

م.د. منال عبد الواحد صلبوخ السراج
كلية الزراعة – جامعة كربلاء
Wesali77@yahoo.com

م.د. زينب هادي العامري
كلية الزراعة – جامعة كربلاء
Lactoferen76@yahoo.com

المستخلص :

اكتشف حامض اللاكتيك عام 1780 وله استعمالات عديدة في الصناعات الغذائية منها مادة محمضة وحافظة ومادة تفاعل للتخليق العضوي واستخدمت عزلة تجارية من بكتريا *Lactobacillus delbrueckii* لانتاج حامض اللاكتيك من شرش الابقار الحلو والذي تم دعمه بمصادر متجددة محلية ، اذ استخدم مولاس قصب السكر وعصير حثالة التمر كمصدر للكاربون بنسب (5 ،10 ، 15 ،20 ،25) % (وزن/حجم) في حين دعم وسط التخمر بكل من خلاصة الخميرة واليوريا وكبريتات الامونيوم بنسب (0,2، 0,4 ، 0,6، 0,8) % (وزن/حجم) كمصدر للنتروجين حيث

- تمكنت العزلة للبكتريا من تخمير الشرش غير المدعم خلال 48 ساعة عند درجة حرارة 45م ورقم هيدروجيني 6 وكانت كمية حامض اللاكتيك الناتجة 3,5 غم /100مل شرش وبكفاءة تحويل بلغت 18,6 % .
- ادى اضافة المولاس بنسب (5 ، 10 ، 15 ، 15، 20 ، 25) % (وزن/حجم) الى زيادة كمية الحامض المنتجة وكانت كمية حامض اللاكتيك (4.7 ، 5.8 ، 6.9، 18.5 ، 33.9) غم/100 مل شرش وبكفاءة تحويل بلغت (44.7 ، 19.3 ، 22.5 ،28.3 ، 81.5) % على التوالي .
- كما اوضح اضافة عصير حثالة التمر بنسب (5 ، 10 ، 15 ، 20 ،25) % (وزن/حجم) الى زيادة كمية الحامض وكانت (4.8 ، 6.7 ، 10.7 ،20.7 ،29.5) غم/100مل شرش وبكفاءة تحويل بلغت (43.7 ، 22.8 ، 20.8 ، 44.7 ، 52.8) % على التوالي .
- انتخبت المعاملة (شرش +25 % مولاس) كوسط تخميري لانتاج حامض اللاكتيك ودعم بمصادر نتروجينية مختلفة حيث بينت النتائج بأن :
- اضافة كبريتات الامونيوم بنسب (0.2 ، 0.4 ، 0.6 ، 0.8) % (وزن/حجم) الى زيادة كمية الحامض وكانت (4.8 ،5.3 ، 5.5 ،5) غم/100مل شرش وبكفاءة تحويل بلغت (28.3 ، 75.73 ، 66.5 ، 71.42) % على التوالي .
- كما اوضح بأن اضافة اليوريا كمصدر نتروجيني الى زيادة ملحوظة في انتاج حامض اللاكتيك
- كما اوضح بأن اضافة خلاصة الخميرة الى زيادة كمية الحامض وكانت (4.9 ، 6.5 ، 21.7 ، 31.9) غم/100 مل شرش وبكفاءة تحويل بلغت (71.22 ، 66.77 ، 86.55 ، 89.65) % على التوالي .
- بين الوسط المكون من الشرش + (مولاس 25 +0.8 خلاصة خميرة) % بانه الوسط المثالي لانتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *Lb. delbrueckii*

Abstract:

Lactic acid discovered at 1780 and its had many application in food industries such as acidulant ,preservative and material for organic synthesis. Commercial Lactobacillus delbrueckii isolate of has been used in the production of lactic acid from sweet bovine whey supplemented with local renewable resources The study used cane sugar molasses and date waste juice (5,10,15,20,25)% (w/v) as carbon sources and yeast extract ,urea ,ammonium salphate percentage as nitrogen sources (0.2 , 0.4 , 0.6 , 0.8) % (w/v) . the study showed:

* The commercial isolate was ferment the un supplemented whey during 48 hr . at 45c and pH 6 , its lactic acid production as 3.5 gm/100 ml whey with conversion efficiency 18.6%.
* When the molasses was added (5, 10, 15, 20, 25)% (w/v) the study showed increased lactic acid amount to (4.7, 5.8, 6.9, 18.5, 33.9)gm/100 ml whey with conversion efficiency (44.7, 19.3, 22.5, 28.3, 81.5) % respectively.
*On the other hand our study showed the addition of date waste juice (5,10,15,20,25) % (w/v) increased lactic acid amount as (4.8, 6.7, 10.7, 20.7, 29.5) gm /100 ml whey with conversion

efficiency (43.7, 22.8, 20.8, 44.7, 52.8) % respectively.

*The generally treatment (whey and 25% molasses) was selected as a fermentation medium for the production of lactic acid it is also supplemented by different nitrogen sources, the results showed:

*The addition of ammonium salphate (0.2, 0.4, 0.6, 0.8) % (w/v) increased lactic acid amount to (4.8, 5.3, 5.5, 5) gm /100 ml whey with conversion efficiency (28.3, 75.73, 66.5, 71.42) % respectively. and The addition of urea as nitrogen source did not exert any change in the amount of lactic acid product. While The addition of yeast extract (0.2, 0.4, 0.6, 0.8) % (w/v) the result illustrated increased lactic acid amount was (4.9, 6.5, 21.7, 31.9) gm /100 ml whey with conversion efficiency (71.22, 66.77, 86.55, 89.65) % respectively. On the other hand molasses 25% and whey +0.8%yeast extract was selected as best medium for lactic acid production.

Key words: Lactic acid production , *Lactobacillus delbrueckii*

المقدمة :

يعد حامض اللاكتيك اول حامض عضوي انتج بالطريقة الميكروبية وفي عام 1880 انتج النوع L(+) lactic acid وباستعمال انواع مختلفة من بكتريا حامض اللاكتيك وخاصة الانواع الاتية *Lactobacillus delbrueckii* ، *Lactobacillus bulgaricus* ، *Lactobacillus leichmanni* (1) . تتم عملية التخمر تحت ظروف قليلة التهوية وعند درجات بلغت حرارةعالية نسبيا 45-50م وباستعمال مصادر كربوهيدراتية محلية منها مصادر متجددة مثل (لشرش والمولاس والسيليوز) .ويستعمل حامض اللاكتيك كمادة حافظة ومادة محمضة ومنكهة للأغذية وتدخل في صناعة مواد الأدوية والتجميل وكذلك أصبحت مادة كيميائية تدخل في صناعات عديدة lactate esters propylene , glycol,propyleneoxid,acrylic acid,2,3-dillactide and pentauedione propionoic acid aldehyde (2) .

ويعد المولاس من المواد الخام كثيرة الاستعمال في التقنيات الحياتية كمصدر كاربوني وهو ناتج عرضي من صناعة السكر سواء من البنجرالسكري (beet) أو قصب السكر (cane) وهو سائل ثخين اسود أو غامق اللون ويطلق عليه احيانا بالعسل الأسود ويتبقى بعد بلورة السكر ويعد سكر السكروز من السكريات الاساسية في المولاس ويوجد بتركيز عالي نسبيا وقد استعملت بكتريا *Lb .delbruckii* لإنتاج الحامض من المولاس إذ استعمل كوسطا تخميريا بعد تدعيمه ببعض المغذيات الضرورية لأجل نمو البكتريا (3). كما أظهرت الدراسة أن تدعيم المولاس بإضافة مستخلص الخميرة واللحم بتراكيز مختلفة وإضافة الشعير المنبت بنسب (1- 4) % قد أسهم في حصول زيادة معنوية لكمية الحامض المنتجة من قبل بكتريا *Lb. delbrueckii*(3) .استعمل عصير التمر كمصدر كاربوني وذلك لمحتواه العالي من السكر وخاصة السكر المحول ويعد الشرش الناتج الثانوي لصناعة الجبن ويتواجد حامض اللاكتيك في الشرش بكميات متفاوتة تبعا لطول مدة الخزن للحليب لذا فان استعمال الشرش لوحده كمصدر كاربوني يكون فقيرا بسبب افتقاره للعديد من المغذيات الضرورية فضلا عن ضعف قابليته في تنظيم الرقم الهيدروجيني خلال عملية التخمر لإنتاج الحامض لذلك يضاف منظم للرقم الهيدروجيني (4) . وذكر(5) بأنه عند تخمير الشرش الحلو والمحمض لحليب الأبقار والإبل باستعمال بكتريا *Lb.delbrueckii sub sp.bulgaricus*لمدة 28 ساعة تكون كمية حامض اللاكتيك متقاربة (14,22 ، 13,58 ، 14,08) غم/لتر لكل من الشرش الحلوللابقاروالإبل الحلو والشرش المحمض للإبل على التوالي .واختبر (6) خمسة أنواع تابعة لعصيات الحليب عزلت من اللبن الرائب لإنتاج حامض اللاكتيك فوجد أن المزرعة المختلطة من *Lb.bulgarricus* و *Lb.Casei* و*Lb. delbrueckii* هي الأفضل لإنتاج حامض اللاكتيك من وسط مترشح الشرش المدعم بالمخلفات الثانوية الزراعية مثل المولاس وسائل نقيع الذرة وحليب الخض للقشطة الحلوة . وتعتبر بكتريا *Lb.delbrueckiisubsp.bulgaricus*سلالة عزلت من اللبن الرائب والجبن تخمر القليل من الكاربوهيدرات ، نوع السلالة ATCC 11842 (American type culture collection) صنفت ضمن المجموعة A_a انواع *Lb.delbrueckii*المهمة صناعيا والتي تستعمل في إنتاج الأغذية المتخمرة النباتية والحيوانية الأصل وخلايا البكتريا عصوية ذات نهايات مستديرة قد تكون محببة مفردة أو بشكل سلاسل قصيرة تترتب غالبا بشكل متعامد موجبة لصبغة كرام قليلة التهوية ، غير مكونة للسبورات وغير متحركة وغير منتجة للكاتليز ،لا تنتج الامونيا من الارجنين ولاتنتج الامونيا وغاز ثاني اوكسيد الكاربون من اليوريا (7).وتحتاج البكتريا إلى العديد من الاحماض الامينية والنيوكليتيدات والفيتامينات لنموها فهي تحتاج الى حامض البانثونيك ،النياسين وبعض السلالات تحتاج الرايبوفلافين ،حامض الفوليك ،فيتامين B_{12} ، الثياميدين ، البيروكسيدين ،حامض النيكوتنيك والبايوتين وهذه البكتريا متجانسة التخمر اجباريا وهي غير نشطة ايضيا وتخمر فقط سكر الفركتوز والكلوكوز واللاكتوز والناتج النهائي لعملية التخمر هو حامض اللاكتيك (90 %) فضلا عن مركبات ثانوية مثل الاستالديهايد، الاسيتون وثنائي الاستايل عبر مسار امبدن – مايرهوف اذ تخمر السكريات السداسية بتحويلها الى مركب البيروفيت عن طريق الاكسدة اللاهوائية ويتحول البيروفيت الى اللاكتات بواسطة انزيم Lactate dehydrogenase بعد تحطيم سكر اللاكتوز الى سكر الكلوكوز والكالكنوز الا أنها لا تستطيع تحطيم سكر الكالكتوز عبر مسار ليلويلر لذلك يكون هناك سكر باقي في الوسط (8،9) . استعملت بكتريا حامض اللاكتيك منذ وقت بعيد في تخمير العديد من الاغذية والمنتجات الغذائية واليوم ولا تزال الاستعمالات الرئيسية لهذه البكتريا في نفس المجال كتصنيع الالبان ،اللحوم، الفواكه والخضروات ، المخللات ،النبيذ وغيرها يضاف الى ذلك الاستعمالات الحديثة للبكتريا في العديد من المجالات مثل انتاج الدكستران والنياسين واستعمالها كبكتريا داعمة للحيوية في تصنيع المنتجات الغذائية الصحية والحيوية

(11,10) .واستعملت العديد من انواع جنس اللاكتوباسيللاي في انتاج العديد من البادئات ذات الاغراض المتعددة كبادئات الاجبان والالبان المتخمرة والبادئات الداعمة الحيوية التي تستعمل في تصنيع مايسمى بالمنتجات الصحية منها منتجات الالبان المتخمرة العلاجية وتصنيع المثلجات القشطية الداعمة للحيوية ، ومستحضرات بكتريا حامض اللاكتيك الداعمة للحيوية التي تساعد الانسان على تحسين الهضم وموازنة الاحياء المجهرية في الامعاء وتدعيم جهاز المناعة .(12 ، 13) . وقد هدفت الدراسة الحالية الى

- استعمال بكتريا *Lb. delbrueckii.* تجارية جاهزة ومشخصة لإنتاج حامض اللاكتيك .
- استعمال الشرش كمصدر كاربوهيدراتي وبنسب مختلفة لمعرفة كمية الحامض المنتجة
- استعمال المولاس وعصير التمر وبنسب مختلفة لانتاج الحامض .
- تدعيم وسط التخمر بمصادر نتروجينية مختلفة مثل اليوريا وكبريتات الامونيوم لاجل تحسين انتاجية الحامض .

المواد وطرائق العمل : Material and Methods

أجريت التجربة في مختبرات قسم علوم الاغذية والالبان Food and Dairy Department بدولة الهند – مدينة اله اباد للفترة م (1-8 الى 1-1 لعام 2015) ، كانت المواد التي استخدمت في الدراسة هي

- **الشرش الحلو الطازج**: تم الحصول على شرش الابفار الحلو الطازج من معمل قسم علوم الاغذية والالبان- اله اباد .
- **مولاس قصب السكر** : تم جلب المولاس من معمل تصنيع السكر .
- عصير حثالة التمر: تم تحضيره باضافة الماء المقطر الى حثالة التمر المستحصل عليها من معمل تصنيع الدبس محليا بمدينة اله اباد وتمت الاضافة بنسبة (1:1) .
- **عزلة نقية مجفدة** لبكتريا *Lb. delbrueckii.* تم الحصول عليها من مجهز تجاري (المكتب العلمي لتجهيز المواد العلمية – دلهي) استعملت لانتاج حامض اللاكتيك . اما وسط التخمير فاستعمل الشرش كوسط اساس ووزع بواقع 100 مل لكل دورق سعة 250 مل بعد ذلك دعم بمصدرين للكاربون هما مولاس قصب السكر بتركيز (75-77) % وعصير حثالة التمر بتركيز (15) % كلا على انفراد وكانت الاضافة بالنسب الاتية (5، 10، 15 ، 20 ، 25) % (وزن/حجم) وعقم وسط التخمير بجهاز التعقيم (121 م لمدة 5 دقائق) ، ثم انتخب افضل وسط لانتاج الحامض من المعاملات السابقة ودعم بالمصادر النتروجينية اليوريا وكبريتات الامونيوم وخلاصة الخميرة بنسب (0,2 ، 0,4 ، 0,6 ، 0,8) % ولم يعدل الرقم الهيدروجيني للوسط لانه ينخفض الى الرقم 6 بعد تعقيمه بجهاز التعقيم ووسط (MRSB (DeMan , Rogosa, Sharpe Broth المستعمل لأجل تنمية واغناء العصيات واستخدم الحليب الفرز المجفف من معمل قسم علوم الاغذية والالبان –اله اباد .

طريقة العمل :

اجريت طريقتين لحفظ وادامة العزلات لكلا مزارع العمل ومزارع الادامة حيث زرعت البكتريا على وسط MRS السائل والحليب الفرز (10) % بنسبة لقاح بلغت 1% وحضنت بدرجة حرارة45 م لمدة 16-18 ساعة ثم خفضت درجة الحرارة 4-5م وتجدد هذه العملية كل أسبوعين (14) . بينما كانت مزارع الادامة تزرع فيها البكتريا في وسط الحليب الفرز 10% وحفظت بدرجة حرارة -18م وعند الحاجة تذوب وتنشط مرتين في الحليب الفرز 10% وتحضن بدرجة حرارة 45م ولمدة 24 ساعة ويمكن حفظ المزارع البكتيرية بهذه الطريقة لمدة 6 اشهر (14) . تم تحضير اللقاح كما ورد في (15)حيث تم تلقيح حليب الفرز المعقم بنسبة 5% من العزلة النقية المنشطة مسبقا على وسط MRS السائل والذي تم حضنه على 45م لمدة 16-18 ساعة ثم نقل اللقاح بنسبة 5% إلى الشرش المعقم وحضن على 45م لمدة 16-18 ساعة . واتبعت الطرائق المذكورة في (15) لانتاج حامض اللاكتيك من وسط التخمير باستعمال بكتريا Lb. delbrueckii. وذلك بتلقيح وسط التخمير بنسبة 5% من اللقاح والحضن بظروف تهوية قليلة بدرجة حرارة 45م ورقم هيدروجيني 6 لمدة 2-4 ايام مع مراعاة ضبط الرقم الهيدروجيني كل ساعة ونصف حتى انتهاء فترة التخمير . اتبعت الطريقة الواردة في (16) استخلاص حامض اللاكتيك من وسط التخمر حيث أضيفت كميات أضافية من هيدروكسيد الكالسيوم لاجل تثبيت الرقم الهيدروجيني عند 10 وسخنت المعاملات بدرجة حرارية بلغت 96م ولمدة 5-10 دقائق لاجل فصل المواد البروتينية والخلايا البكتيرية وعوملت بالطرد المركزي (5000 دورة/دقيقة) لمدة 5-10 دقائق . وقصر اللون للمحلول المحمض الناتج بإضافة الفحم الحيواني بنسبة (3) % (وزن/حجم) مع الرج لمدة 15 دقيقة . وركز الناتج باستعمال المكثف الدوار من نوع Rotavapor Rm 233-Swiss وبمعدل (5 دورة/دقيقة) بدرجة حرارية بلغت 55م حيث تم الحصول على تركيز 22% مواد صلبة كلية . واستخلص الحامض من لاكتاتات الكاسيوم باضافة حامض الكبريتيك (0,1) ع حيث تزال كبريتات الكالسيوم ويحفظ حامض اللاكتيك المتكون بعبوات محكمة الغلق وغامقة اللون . كما تم تقدير تركيز حامض اللاكتيك الناتج بطريقة التسحيح طبقا لما ورد في (17) . ،حسبت كفاءة التحويل بالنسبة المئوية كما ورد في (18) اعتمادا على المعادلة الاتية :

$$\text{كفائة التحويل \%} = \frac{\text{كمية حامض اللاكتيك}}{\text{كمية السكر الكلية}} \times 100\%$$

التحليل الإحصائي :Statistical Analysis

استعمل التصميم العشوائي الكامل (Complete Random Design(CRD وقورنت الفروقات المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي (L.S.D) واستعمل البرنامج SAS (2001) في التحليل الإحصائي للبيانات المدروسة .

النتائج والمناقشة : Results and Decisions

إنتاج حامض اللاكتيك :

أجريت العديد من التجارب الأولية لأجل تثبيت الظروف المثالية لإنتاج الحامض وكان لاختيار درجة الحرارة المثلى التي تم اختيارها من خلال التجربة الأولية وكذلك السيطرة على الرقم الهيدروجيني لوسط التخمير دور في تحسين إنتاجية الحامض والتقليل من تثبيط الناتج من الشرش الطازج (5) % لاكتوز بدون أي إضافات والذي يعتبر الوسط المناسب لنمو بكتريا *Lb. delbrueckii.* إذ لوحظ أمكانية الشرش لتوفير معظم الاحتياجات الغذائية لهذا النوع من البكتريا من (كاربوهيدرات ، دهون، املاح معدنية، بروتينات) وكما موضح في الجدول (1) الذي يتضمن التركيب الكيميائي للشرش الطازج المستعمل كوسط للتخمير (19) .

جدول (1) النسبة المئوية للتركيب الكيمياوي للشرش

المكون	النسبة %
البروتين	0،8
اللاكتوز	6،7
دهن	0،2
رماد	0،7
TS	6،7
N_2	0،097
Ca	0،031
Na	0،076
K	0،019
P	0،034
Mg	0،015

لوحظ ان البكتريا استطاعت انتاج ال LA (lactic acid) عند درجات حرارة تراوحت بين (37-50) م ورقم هيدروجيني بين 5.3- 6.7 وان افضل درجة حرارة ورقم هيدروجيني للانتاج هما 45م و6.0 على التوالي مع ضبط الرقم الهيدروجيني بعد كل ساعة ونصف باضافة هيدروكسيد الكالسيوم المعقم تجنبا لانخفاض الرقم الهيدروجيني لاقل من 5 اذ يحصل تثبيط للبكتريا بفعل ال LA الناتج في وسط التخمير اذ يقل تركيز سكر اللاكتوز ويزداد تركيز LA الناتج مع استمرار عملية التخمير ولغاية 48 ساعة (19) . ويبين الجدول (2) تركيز الحامض الناتج عن استعمال مصادر كاربونية مختلفة اذ استعمل الشرش (5% لاكتوز) بالبداية كمصدر اساسي وكانت كمية الحامض المنتجة 3,5غم/100مل وتتفق هذه النتائج مع ماوجده (20) الذي وجد ان كمية الحامض المنتجة من شرش الابقار الحلو وباستعمال بكتريا *Lb. bulgaricus* (CCTA 8001) بلغت (4,2-3,2) غم/100مل وباستعمال طريقة الدفعة الواحدة Batch culture . ولاتتفق النتائج مع ماوجده (21) الذي استعمل الشرش لانتاج الحامض من بكتريا *Lb. casei* اذ بلغت كمية الحامض المنتجة (2غم/لتر) عند رقم هيدروجيني 5,5 ودرجة حرارة 37م . كما اشار (22) الى امكانية استعمال الشرش بدلا من رميه كمخلفت للمصانع لانتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *Lb. delbrueckii* اذ بلغت انتاجية البكتريا من الحامض 12,22 غم/لتر تحت ظروف تخمير رقم هيدروجيني 6,8 ، درجة حرارة 42م ،حجم لقاح 4% ووقت تخمر24ساعة وتمت استعمال 125مل من الشرش للانتاج . وتتفق النتيجة مع ماذكره (23) بان بكتريا *Lb. delbrueckii* هي افضل كائن حي مجهري يستعمل لانتاج حامض اللاكتيك تجاريا من الشرش عند درجة حرارة 40- 50م ورقم هيدروجيني 5,5-6,0 تحت ظروف لاهوائية خلال فترة 48 ساعة .

استخدام المولاس وعصير التمر :

اذ تم اضافته الى وسط التخمير لاجل زيادة نسبة الحامض المنتجة وبالتالي رفع كفاءة التحويل اذ يحتوي المولاس على كميات عالية من السكريات الكلية (65) % فضلا عن كميات جيدة من المواد النتروجينية (10) % فضلا عن نسب مختلفة من العناصر منها (الكلور ، الكالسيوم ، الصوديوم ، المغنيسيوم ، البوتاسيوم ، الفسفور) كذلك يحتوي على نسب متباينة من الفيتامينات (24) .

وادى تدعيم الشرش بالمولاس وعصير حثالة التمر ذو نسب مختلفة الى زيادة تركيز الحامض المنتج اذ بينت النتائج الموضحة في الجدول (2) ان افضل نسبة للتدعيم لانتاج حامض اللاكتيك كانت باستعمال وسط التخمير المكون من (شرش+ مولاس 25%) اذ بلغت كمية الحامض المنتجة 33,9 غم/100مل ويعزى السبب في زيادة تركيز السكريات في الوسط مما ادى الى زيادة انتاج الحامض في الوسط وانتخب هذا الوسط كافضل وسط للانتاج من البكتريا وتتفق هذه النتيجة مع ماذكره (15) الى

ان زيادة تركيز السكريات في وسط التخمير الى 12-18% يؤدي الى زيادة تركيز الحامض المنتج وتتفق مع ماوجده (25) الذي استنتج ان اضافة المولاس الى وسط التخمر ادى الى رفع انتاجية الحامض الى 94,8 غم/لتر وفسرت الزيادة في تركيز السكريات الداخلة في تركيب المولاس لها دور في رفع نشاط البكتريا واستهلاكها وبالتالي زيادة الانتاجية من الحامض . وتتفق النتائج مع ما وجده (26) ان اضافة المولاس الى وسط التخمير ادى الى رفع تركيز الحامض المنتج الى 15غم /لتر/ساعة بعد ان كانت نسبت الانتاجية بالوسط القياسي 4غم /لتر/ساعة . وفي نفس الوقت وجد (27) ان اضافة المولاس الى وسط التخمير ادت الى رفع انتاجية حامض اللاكتيك من الفطر *Rhizopus arrhizus* اذ بلغت 103غم/ لتربعد مرور 48 ساعة كوقت للتخمر . وكما موضح بالنتائج ان التدعيم بعصير التمر ادى كذلك الى رفع الانتاجية من البكتريا للحامض وتتفق النتائج مع ماوجده (28) الذي تمكن من عزل وتشخيص 9 عزلات من بكتريا حامض اللاكتيك ذات انتاجية جيدة من حامض اللاكتيك عند استعمال عصير التمر لوحده كوسط للتخمير اذ تراوحت انتاجية العزلات (9-29) غم/لتر بعد 48 ساعة عل بداية التخمر وهذا يعزز ان للسكريات الموجودة في عصير التمر دور واضح في زيادة نشاط البكتريا بالتالي رفع تركيز الحامض المنتج . وتتفق النتيجة مع ما توصلت له (29) من ان تدعيم الشرش كوسط للتخمير باضافة عصير التمر بنسبة (20) % ادى الى رفع انتاجية بكتريا *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* الى 5غم/100مل شرش مدعم .

جدول (2) تأثير استعمال مصادر كاربونية مختلفة في انتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *Lb.delbrueckii*

ت	النموذج	حامض اللاكتيك غم/100مل	كفاءة التحويل %	الحموضة الكلية %
1	الشرش 5% لاكتوز	3.5	18.6	0,371
2	شرش+ مولاس 5%	4.7	44.7	0,442
3	شرش + مولاس 10%	5.8	19,3	0,492
4	شرش + مولاس 15%	6.9	22.5	0,514
5	شرش + مولاس 20 %	18.5	28.3	0,564
6	شرش+ مولاس 25%	33.9	81,5	0,913
7	شرش + عصير التمر 5 %	4.8	43,7	0,452
8	شرش + عصير التمر10 %	6.7	22,8	0,555
9	شرش +عصير التمر15 %	10.7	20,8	0,543
10	شرش + عصير التمر 20 %	20.7	44,7	0,597
11	شرش + عصير التمر 25 %	29.5	52,8	0,635

وتم تدعيم الوسط المثالي المنتخب لانتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *Lb. delbrueckii* والمكون من شرش +25 % مولاس بمصادر نتروجينية مختلفة different nitrogen sources منها اليوريا وكبريتات الامونيوم وخلاصة الخميرة yeast extract لغرض زيادة الانتاجية من حامض اللاكتيك اذ ان تدعيم الوسط المستعمل للتخمير بمصادر نتروجينية مختلفة يؤدي الى زيادة انتاج حامض اللاكتيك (6). يلاحظ من النتائج المبينة في الجدول (3) لم تؤدي اضافة اليوريا الى وسط التخمير بنسب مخلفة الى زيادة وفروقات معنوية واضحة بين المعاملات وهذا يفسر على على عدم امكانية الاستفادة من قبل البكتريا كمصدر نتروجيني في الوسط وهذا ممكن تفسيره طبقا لما ورد في (30) ان بكتريا ال *Lb. delbrueckii* انزيم اليويز اي غير قادرة على استهلاك اليوريا وانتاج الامونيا وغاز CO_2 . كما ادى تدعيم الوسط بكبريتات الامونيوم كمصدر نتروجيني الى ارتفاع الحموضة الكلية وكفاءة التحويل ونسبة الحامض المنتج من قبل البكتريا وهذا يتفق مع ماوجده (31) اذ بين ان اضافة كبريتات الامونيوم الى وسط التخمر ادى الى زيادة معنوية في كمية الحامض المنتجة اذ وضح ان اضافة كبريتات الامونيوم بنسبة 1و0 % فانها تضيف مايعادل 3و0 % نتروجين غير عضوي الى وسط التخمير والذي يتحول الى احماض امينية تستعمل من قبل بكتريا حامض اللاكتيك لاجل تخليق البروتين المطلوب للنمو وبالتالي التحفيز لانتاج حامض اللاكتيك . كما لوحظ زيادة معنوية واضحة في نسبة الحامض المنتجة عند التدعيم بخلاصة الخميرة وبنسب مختلفة وبلغت اعلى نسبة منتجة للحامض عند نسبة تدعيم0.8 % خلاصة خميرة وهذا يتفق مع ماورد في (32) من ان تدعيم وسط التخمر بخلاصة الخميرة بنسبة 0.5% ادى الى زيادة معنوية ملحوظة في كمية الحامض المنتجة بلغت 7و25غم/100 مل وسط تخمير وفسر ذلك على ان خلاصة الخميرة تزود البكتريا بالنتروجين العضوي وهذا يحفز على زيادة كتلة النمو لدى البكتريا وانتاج الحامض .وتتفق النتائج مع ماوجدته 33) من ان تدعيم وسط التخمير لبكتريا *Lb.plantarum* بخلاصة الخميرة بنسب مختلفة قد حققت نسبة اضافة 6و0% اعلى انتاجية من حامض اللاكتيك بلغت 5و92 غم/لتر ، وجاءت النتائج متقاربة مع ماتوصل له (3) اذ تم اضافة خلاصة الخميرة بنسب مختلفة الى وسط التخمير المستعمل لانتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130 باستعمال طريقة تخمرات الحالة المستقرة ولوحظ زيادة متدرجة وواضحة بكمية الحامض المنتجة وسجلت اعلى زيادة عند اضافة الخميرة بنسبة 5% الى وسط التخمير اذ بلغت كمية الحامض المنتجة 88غم/لتر ، كما لاحظ (34) ان تدعيم وسط التخمير المعد لانتاج حامض اللاكتيك بخلاصة الخميرة بنسبة 5و0 % ادى الى زيلدة ملحوظة في نشاط بكتريا *Lb. casei EMCC 11093* مما ادى الى زيادة واضحة في كمية الحامض المنتجة بلغت 09و16 غم/لتر .

جدول (3) تأثير استعمال مصادر نتروجينية مختلفة في انتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *Lb.delbrueckii*

ت	النموذج	حامض اللاكتيك غم/100مل	كفاءة التحويل %	الحموضة الكلية %
1	الوسط المثالي +اليوريا 0,2%	3,5	61,60	0,532
2	الوسط المثالي +اليوريا 0,4%	3,5	61,55	0,591
3	الوسط المثالي +اليوريا 0,6%	4,9	71,56	0,811
4	الوسط المثالي +اليوريا 0,8%	4,9	71,43	0,815
5	الوسط المثالي +كبريتات الامونيوم 0,2%	4,8	28.3	0,564
6	الوسط المثالي +كبريتات الامونيوم 0,4%	5,3	75,73	1,122
7	الوسط المثالي +كبريتات الامونيوم 0,6%	5,5	66,5	1,120
8	الوسط المثالي+كبريتات الامونيوم 0,8%	5,0	71,42	0,820
9	الوسط المثالي +خلاصة الخميرة 0,2%	4,9	71,22	0,732
10	الوسط المثالي +خلاصة الخميرة 0,4%	6,50	66,77	1,20
11	الوسط المثالي +خلاصة الخميرة 0,6%	21,7	86,55	1,89
12	الوسط المثالي +خلاصة الخميرة 0,8%	31,9	89,65	2,08

المصادر:

1-**Adthalungrong**, C. and S. Temviriyanukul,(2010).Optimization of lactic acid production from tapiocastarch hydrolysate by *Lactobacillus casei*TISTR453. KKUJ., 15: 436-445.

2-**Dumbrepatil**, A., M. Adsul, S. Chaudhari, J. Khire and D. Gokhale, (2008). Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. Delbrueckii*mutant Uc-3 in batch fermentation. Applied Environ. Microbiol., pp: 333-335.

3- **Kotzamanidis** CH, Roukas T, Skaracis G (2002) Optimisation of lactic acid production frombeet molasses by *Lactobacillus delbrueckii*NCIMB 8130. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 441–448.

4- **Boumba**, V.A; Voutsinas,L.P. and Philppopoulos,C.D.(2001). Composition and nutritional value of commercial dried whey products from Feta cheese manufacure .International J.of Dairy Microbiol., 54(4):141-145.

5-**Gassem**,M.A.and Abu-Tarboush,H.M.(2000).Lactic acid production by *Lactobacillucdelbrueckii .subsp.bulgaricus* in camels and cows wheys.Milchwissenschaft,55(7)374-378.

6- **Gandhi**, D.N; Patel, R.S.; Wadhwa, B.K.; Manjeet, K. and Kumar. C.G. (2000). Effect of agro-based by products on production of lactic acid in whey permeate medium .J. of Food Sci. and Technol. Mysore,37(3):292-295.

7- **Hammes**,W.P. and Vogel,R.F.(1995).The genus Lactobacillus . In: The genera of lactic acid bacteria , 2nd . ed. Wood, B.J.B. and Holzapfel,W.H.(editors). Springr -Verlag. Berlin. Germay. PP, 19-50.

8-**Adsul**, M.G., A.J. Varma and D.V. Gukhale, (2007). Lactic acid production from waste sugarcane bagasse derived cellulose. Green Chem., 9: 58-62.

9-**Tamime**, A.Y.(2000).Microbiology of starter cultures . In: Dairy microbiology handbook , 3rd. ed . Robinson, R.K.(editor). Wiley-Interscience,Inc.Chap.7:261-366.

10-**Farkye**, N. Y. and Vedamutu, E. R.(2002). Microbiology of soft cheeses .In : Dairy microbiology handbook ,3rd . ed. Robinson, R. K.(edit2or) . Wiley – Interscience , Inc. Chap. 10: 479-513.

11-**Beresford**, T.P.; Fitzsimons, N.A.; Brennan, N.L and Cogan, T.M. (2001) . Recent advances in cheese microbiology . International. Dairy Journal , 11:259-274.

12- **Chr. Hansen** A/S. (2001). Product range dairy cultures : Overview; cheese , fermented milk and probiotic cultures . Denmark, Dot zero 1-25.

13- **Papademas**, P .andBintsis, T. (2002). Microbiology of ice cream and related products .In : Dairy microbiology handbook , 3rd . ed. Robinson , R.K.(editor) . Wiely-Interscience ,Inc. Chap. 6:213-260.

14- **Teixeria**, P. (1999). *Lactobacillusbulgaricus* .Escola Superior de Biotechnology , 85:1136-1143.

15- **Crueger**, W.; Cruger, A. and Brock, T.D. (1990). Biotechnology : A textbook of industrial microbiology . 2nd .ed . Science Tech publishers, Madison , Wisconsin, pp:147.

16- **Chakraborty**, P . and Dutta, S.K. (1999). Kinetics of lactic acid protection by *Lactobacillus delbrueckii* and *Lacobacillus bulgaricus* in glucose and whey media . J. Food Sci. Technol., 36(3)210-216.

17- **Roch-chui**, Y.U. and Hang, Y.D.(1986). Kinetics of direct fermentation of Agricultural commodities of L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzea*. Biotechnol. Lett., 11(8) :597-600.

18- **Rose**, A.H.(1976). Chemical microbiology : An introduction to microbial physiology , 3rd . ed. Butter worths. London . pp.:469-474.

19- **Burgos-Rubio**, CN,; Okos, MR. and Wankat, PC.(2000). Kinetics study of the conversation off different substrate to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus* . Biotechnol- Progress, 16(3): 305-314.

20- **Taleghania**, H.G. .;. Najafpoura , D.G.; and Ghoreyshi. AA.(2014). Batch and Continuous Production of Lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus* (ATCC 8001), Pak. J. Biotechnol. Vol. 11 (1) 1- 12.

21- **Ali**, O. B.(2000). L(+) Lactic acid Production from Whey by *Lactobacillus Casei* NRRL B-44, MS Thesis , izmir, Turkey.

22- **Guha**, A.; Banerjee, S.; and Bera,D.(2013). Production of Lactic acid from sweet meat industry waste by *Lactobacillus delbrueckii*, IJRET: International Journal of Research in Engineering and Technology, Vol: 02 Issue: 04, pp:630-634.

23- **Cox**, G.C.; MacBean, R.D. and Chandler, G. (1977) Lactic acid production by Lactobacillus bulgaricus in supplemented whey ultrafiltrate . Aust. J. Dairy Technol., 32:19-22.

24- **Paturau**, J.M. (1982). By-products of the cane sugar industry . 2nd . ed. Elsevier Sci. publishing company , Amesterdam- Oxford-New York.pp:270-274.

25- **Coelho**, L. F.; Lima, C. J. B.; Rodovalho, C.M .; Bernardo, M.P and Contiero, J. (2011). Lactic acid Production by new Lactobacillus planetarium LMISM6 GROWN in molasses : optimization of medium composition., *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* Vol. 28, No. 01, pp. 27 – 36.

26- **Rangaswamy**,V.,and Ramakrishna, S.V.(2008). Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a dual reactor system using packed bed biofilm reactor., Letters in Applied Microbiology, 46., (661–66).

27- **Zhang**, Z, and Jin, B. (2009). **L**(+)-Lactic acid production using sugar cane molasses and waste potato starch :An Alternative approach., Proc Aust Soc Sugar Cane Technol Vol 31 ,372-380.

28- **Sobrun**, Y.; Luximon, A.B.; Jhurry, D.; and Puchooa, D.(2012).
Isolation of lactic acid bacteria from sugar cane juice and production of lactic acid from selected improved strains, Advances in Bioscience and Biotechnology (3): 398-407

29- **ALghezzy**, K.W.M (2003). Identification of local isolate of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and using it to production lactic acid from local renewable resourses .

30- **Torriani**, S.; Vescovo, M. and Scolari, G. (1997). An overview on *Lactobacillus helveticus*, Ann. Microbiol. Enzymol., 44: 163-191.

31- **Zhang**, ZY.; Jin B, and Kelly, JM. (2007). Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi (review). *Biochemical Engineering Journal* 35, 251–263.

32- **Anuradha**, R,; Suresh, A.K. ,; and . Venkatesh, K.V .(2009). Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid, *Indian Institute of Technology, Bombay, Powai*, 367-375.

33- **Al-Asady,** G.A.A. (2012). Production of Lactic Acid by a Local Isolate of *Lactobacillus plantarum* Using Cheap Starchy Material Hydrolysates, Pakistan Journal of Nutrition 11 (1): 88-93.

34- **Afifi**, M.M.(2011). Enhancment of lactic acid production by utilizing liquid potato wastes, Int. J. Biol. chem, 1-12.