Production and Purification of Lactic Acid from LactobacillusImmobilized onAgar-agar

إنتاج وتنقية حامض اللاكتيك من بكتريا Lactobacillus المقيدة بأستخدام مادة الأكار- أكار

أ.م.د. علي عبد الكاظم الغانمي
جامعة كربلاء – كلية العلوم- قسم علوم الحياة

سهاد رضا متعب
جامعة كربلاء – كلية العلوم- قسم علوم الحياة

المراسلات الى : أ.م.د. علي عبد الكاظم الغانمي
البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الثاني

الخلاصة

تم تقييد (Immobilization)خلاياعزلتين بكتيريتين محليتين من جنس*Lactobacillus*هما بكتريا *L. acidophilus*و*Lactobacillus* sp.(25) بطريقة الحجزEntrapment() بأستخدام مادتين ساندتين مختلفتين هما الأكار-اكار والجينات الصوديوم وتبين ان المادة الاولى اكثر كفاءة في انتاج حامض اللاكتيك . ولدى دراسة العوامل المؤثرة في التقييد تبين أن استخدام تركيز 3 % من الأكار- أكار كمادة ساندة بعدد خلايا مقدارة (1×10^9) خلية/ مل أدى الى الحصول على أعلى إنتاج من الحامض.

درست بعض الظروف المؤثرة في انتاج حامض اللاكتيك من خلايا بكتريا *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp.(25) المقيدتين وأظهرت النتائج أن افضل تركيز من عصير التمر ومستخلص الخميرة لأنتاج الحامض كان (4 و0.3)% لكلا العزلتين على التوالي كما أن افضل مدة حضن لأنتاج الحامض كانت (60 و72) ساعة للعزلتين المشار اليهماعلى التوالي ايضاً, وتميزت الخلايا المقيدة لكلا العزلتين بثبوتيتها في انتاج الحامض لخمس دورات تخمرية إذ لم يلاحظ اي انخفاض في الأنتاج خلال المدة المدروسة .

أمكن تنقية حامض اللاكتيك من راشح المزرعة لبكتريا *L. acidophilus*sp.(25)*Lactobacillus* المقيدتين, وقد اشتملت خطوات التنقية على خطوة الترويق (Clarification) والتبادل الأيوني الأول بأستخدام المبادل الانأيوني (Amberlite IR- 400) , والتبادل الأيوني الثاني بأستخدام المبادل الكاتأيوني [Amberlite IR -120 (H)] . وأسفرت عملية الفصل عن الحصول على حامض اللاكتيك النقي بحصيلة (88.75 و 91.56)% للعزلتين *L. acidophilus*sp.(25)*Lactobacillus* على التوالي .

Summary

Cells of L. acidophilus and Lactobacillus sp. (25) were immobilized using entrapment method with two different supports . Results showed that agar – agar was more efficient in lactic acid production in compare with sodium alginate . Factors affect cells immobilization were studied and the results showed that (3)% agar – agar as a support with (1×10^9) cell / ml gave the highest production of lactic acid .

Some of the optimal conditions for lactic acid production from the immobilized cells of L. acidophilus and Lactobacillus sp.(25) were studied . The results revealed that the best date juice concentration and yeast extract for lactic acid production were (4 and 0.3)% for both isolates , respectively .The optimal incubation periods for lactic acid production were (60 and 72) hours for L. acidophilus and Lactobacillus sp. (25), respectively.The immobilized cells for both isolates were stable during five repeated cycles and no acid production loss was observed during the studied periods.

Lactic acid was isolated from culture filtrate of L. acidophilus and Lactobacillus sp.(25) . The isolation procedure included Clarification step, Ion exchange with anionic exchanger (Amberlite IR- 400) and Ion exchange with cationic exchanger [Amberlite IR 120- (H)]. Lactic acid yield obtained were (88.75 and 91.56)% for the above mentioned isolates , respectively .

المقدمة (Introduction) :

يعد حامض اللاكتيك 2- هيدروكسي حامض البروبيونيك 2-Hydroxy propionic) acid)الحامض الكاربوكسيلي الأكثر تواجداً في الطبيعة. ويلعب هذا الحامض دوراً مهماً في العديد من المجالات مثل الصناعات الغذائية والصيدلانية والكيميائية ومواد التجميل [1,2]. استخدمت بكتريا *Lactobacillus*بشكل واسع في انتاج حامض اللاكتيك وذلك عن طريق تخميرها للكربوهيدرات إذ تنتمي هذه البكتريا الى بكتريا حامض اللاكتيك (Lactic acid bacteria).

لقد حظيت تقنية تقييد الخلايا (Cell Immobilization) بأهتمام الباحثين فنالت النصيب الأوفر من الدراسات نظراً لما تحققه هذه التقنية من فوائد جمة لعل في مقدمتها زيادة ثبوتية الخلايا واطالة مدة استخدامها فضلاً عن تقليل استهلاك الطاقة وتقليل التكاليف.

وعلى الرغم من وجود طرائق عديدة لتقييد المحفزات الحيوية عموماً الّا أن الطرائق ذات العلاقة بتقييد الخلايا تكاد تنحصر بالحجز (Entrapment) والادمصاص (Adsorption) والتغليف (Encapsulation) والتكتيل [3](Flocculation). وقد استخدمت طريقة التقييد بالحجز بشكل واسع نظراً لبساطة هذه الطريقة فضلاً عن ان ظروف تحضيرها مناسبة .

وتعد عملية استخلاص وتنقية حامض اللاكتيك اهم مشكلة تجابة انتاجة بوساطة التخمرات المايكروبية , اذ تصل كلفتها احياناً الى 80% من كلفة الانتاج مما يحتم القيام بدراسات عاجلة لايجاد تقنيات استخلاص وتنقية جديدة اقتصادية وذات كفاءة عالية [4]

ونظراً لما يمتلكه حامض اللاكتيك من اهمية كبيرة فقد هدفت هذة الدراسة الى استخدام تقنية تقييد الخلايا (cell immobilization) وانتاج الحامض من الخلايا المقيدة فضلاً عن تنقية الحامض بالطرائق المتاحة.

المواد وطرائق العمل:

العزلة المستخدمة في الدراسة :

استخدمت عزلتان محليتان من بكتريا *Lactobacillus* في هذه الدراسة هما *Lactobacillus acidophilus* و*Lactobacillus* sp. 25 علماً بأن العزلتين كفوئتان في انتاج الحامض اثر عملية غربلة جرت في دراسة سابقة [5].

تقييد الخلايا (Cell Immobilization)

أجريت عملية تقييد خلاياالعزلتين المشار اليهما اعلاة بأستخدام طريقة الحجز(Entrapment) للخلايا داخل المواد الهلامية . تم تنشيط خلايا العزلتين وذلك بتحضير وسط (DeMan Rogosa and Sharp broth, MRS) الخاص ببكتريا *Lactobacillus*وتعقيمه وتلقيحه بعروة كاملة من خلايا العزلتين المذكورتين (كلاً على انفراد) اعقب ذلك حضن الوسط الملقح بدرجة حرارة 37°م لمدة 18 ساعة .

❖ دراسة العوامل المؤثرة في عملية التقييد

1- تحديد نوع المادة الساندة

قيدت خلايا العزلتين المستخدمتين في هذه الدراسة بأستخدام نوعين من المواد الهلامية هما الألجينات (Alginate) والأكار-اكار(Agar-agar).

أ- تقييد الخلايا بأستخدام مادة الألجينات

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل[6]في تقييد الخلايا اذ بلغ عدد الخلايا المستخدم في التقييد (1×10^8) خلية / مل.

ب- تقييد الخلايا بأستخدام مادة الأكار-أكار

استخدمت الطريقه الموصوفه من قبل [7] في تقييد خلايا العزلتين قيد الدراسة مع بعض التحوير. حيث مزج 10 مل من محلول4% أكار- أكارقبل أن يتصلب مع حجم مكافئ من الخلايا المشار اليها (كلاً على انفراد) ومزجت جيداً بالمازج ليعطي تركيزاً مقداره 2% أكار-أكار بعدد خلايا(1×10^8) خلية /مل .وتم صب المزيج في أطباق بتري معقمة وتركت لتتصلب في ظروف مبردة .وتم حفظها في الثلاجة وقبل استخدامها في انتاج حامض اللاكتيك ثم تقطيعها الى مكعبات بأبعاد($4 \times 4 \times 4$) ملم.

2- تركيز الماده الساندة

حضرت تراكيز متدرجة من كل من الجينات الصوديوم ومادة الأكار –أكار ومزجت بخلايا *Lactobacillus* لتعطي تراكيز متدرجة (2 و4 و6)% لألجينات الصوديوم (2 و3 و4)%لمادة الأكار –أكار.

3- أعداد الخلايا المستخدمة في عملية التقييد

تم تقييد أعداد الخلايا(1×10^7و 1×10^8و1×10^9و1×10^{10}) خلية/مل بأستخدام مادة الأكار-أكار ودراسة تأثير عدد الخلايا المقيدة في إنتاج حامض اللاكتيك وذلك لتحديد عدد الخلايا الامثل في التقييد.

تحديدالظروف المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المقيدة

استخدم وسط إنتاج حامض اللاكتيك الموصوف من قبل [5] في دراسة عدد من العوامل المؤثره في انتاج الحامض من الخلايا المقيدة للعزلتين*L.acidophillus* و *Lactobacillus* sp.25 اشتملت هذه العوامل على تركيز عصير التمر ومستخلص الخميرة ومدة الحضن وثبوتية الخلايا المقيدة .

1- تركيز عصير التمر

تم تحضير تراكيز متدرجة من وسط عصير التمر هي (2 و3 و4 و6 و8 و10)% سكريات مختزلة في وسط الأنتاج المدعم بمستخلص الخميرة وكربونات الكالسيوم ولقح الوسط بأعداد خلايا مقيدة مقدارها (1×10^9) خلية/مل وذلك لتحديد تركيز العصير الأمثل لأنتاج حامض اللاكتيك من عزلتي *Lactobacillus* المقيدتين المستخدمتين في هذه الدراسة .

2- تركيز مستخلص الخميرة

أضيفت تراكيز متدرجة من مستخلص الخميرة اشتملت على (0.1 و0.3 و0.5 و0.7 و1.0)% الى وسط إنتاج حامضاللاكتيك الحاوي على عصير التمر بتركيز4% سكريات مختزلة مع كربونات الكالسيوم ثم لقح الوسط بالخلايا المقيدة .

3- مدة الحضن

تمت متابعة إنتاج حامض اللاكتيك من الخلايا الحرة والمقيدة لمدة 96 ساعة وذلك بسحب مكررين كل 12 ساعة لتقدير حامض اللاكتيك وقياس الرقم الهيدروجيني لوسط التخمر .

4- ثبوتية الخلايا المقيدة

لغرض دراسة ثبوتية الخلايا المقيدة تمت متابعة انتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المذكورة لمدة 15 يوم إذ تم استبدال الوسط الأنتاجي كل 72 ساعة مع تكرار استخدام نفس مكعبات الأكار-أكار الحاوية على خلايا بكتريا *Lactobacillus* قيد الدراسة وتم تقدير حامض اللاكتيك لوسط التخمر بعد كل دورة تخمرية .

حساب كفاءة التحويل

تم حساب النسبة المئوية لكفاءة تحويل بكتريا *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp.(25) للسكر الموجود في عصير التمر الى حامض اللاكتيك طبقاً لما ورد في [8] وحسب المعادلة الآتية:-

$$\text{نسبة التحويل} = \frac{\text{(تركيز السكريات قبل التخمر – تركيز السكريات بعد التخمر)}}{\text{تركيز السكريات قبل التخمر}} \times 100$$

تقدير حامض اللاكتيك :

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل [9]في تقدير كمية حامض اللاكتيك المنتج من عزلتي *Lactobacillus* المستخدمتين في هذه الدراسة.

تقدير السكريات المختزلة :

قدرت السكريات المختزلة في وسط عصير التمر ووسط التخمر بطريقة (10) واعتماداً على المنحنى القياسي للكلوكوز كسكر مختزل .

تنقية حامض اللاكتيك (Purification of lactic acid)

بعد تثبيت الظروف المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المقيدة للعزلتين المنتخبتين. تم انتاج كمية من حامض اللاكتيك بتنمية هاتين العزلتين تحت الظروف المثلى للأنتاج, وبعد انتهاء مدة الحضن رشحت نواتج التخمر بأستخدام الطرد المركزي بسرعة (5000) دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق إذ اهمل الراسب في حين احتفظ بالراشح الحاوي على حامض اللاكتيك الذي جرت عملية تنقيته بحسب الخطوات الآتية :-

1- الترويق (Clarification)

تم ضبط الرقم الهيدروجيني للراشح الى 10 بأستخدام هيدروكسيد الكالسيوم (1ع) ثم سخن الراشح الى درجة حرارة 80 مئوية لمدة 15 دقيقة ,اعقبته عملية نبذ مركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق , وبعد أن اهمل الراسب عدل الرقم الهيدروجيني في الراشح الى(6.5- 7.0) ,يمثل الراشح الموصوف أعلاه (المستخلص المروّق) الذي تم تقدير كمية حامض اللاكتيك فيه .

2- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني الأول بأستخدام المبادل Amberlite IR-400

حضر المبادل الانأيوني Amberlite IR-400في الماء المزال منه الايونات (Deionized water)و تمت تعبئة المبادل في عمود زجاجي ليعطي أبعاداً (1.3 × 15) سم واستخدم الماء المقطر المزال منه الأيونات في موازنة المبادل حتى اليوم التالي وبسرعة جريان 1مليلتر/دقيقة. أضيف 30 مل من الراشح الخارج من خطوة الترويق الى سطح المبادل بهدوء وغسل المبادل بـ 100 مل من الماء المقطر المزال منه الأيونات لأنزال المواد التي لم ترتبط بالمبادل وجمعت الأجزاء المفصولة من العمود بواقع 5 مليلتر/جزء وبسرعة جريان 1مل/دقيقة . وتم تقدير حامض اللاكتيك في الأجزاء المفصولة للتأكد من عدم نزول حامض اللاكتيك في هذه الخطوة .

- استرداد حامض اللاكتيك

استرد الحامض بواسطة 100 مل من محلول كربونات الأمونيوم 2 مولر وبعد أن جمعت الأجزاء المستردة بواقع 5 مليلتر/جزء قدر حامض اللاكتيك في الأجزاء المستردة ورسمت العلاقة البيانية بين تركيز حامض اللاكتيك وعدد الأجزاء ثم جمعت الأجزاء المستردة وتم قياس حجمها وتقدير حامض اللاكتيك فيها .

3- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني الثاني بأستخدام المبادل Amberlite IR-120 (H)

حضر هذا المبادل بنفس طريقة وظروف تحضير المبادل الأيوني (Amberlite IR-400) وتمت تعبئته في عمودزجاجي بأبعاد (1.3 × 14) سم . مرر حامض اللاكتيك الخارج من خطوة التبادل الأيوني الأول على المبادل Amberlite IR-120(H) وغسل المبادل بـ 100 مل من الماء المقطر . جمعت الأجزاء المفصولة وتم تقدير حامض اللاكتيك فيها .

فصل حامض اللاكتيك المنقى من العزلتين المقيدتين بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

استخدمت صفائح السليكا في ترحيل حامض اللاكتيك المنقى من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus sp.* (25) اضافةً الى الحامض القياسي . استخدم الدايوكسان 90% كمذيب في عملية الترحيل , وعند انتهاء عملية الترحيل وتجفيف الصفائح تم رش النماذج بمحلول الاظهار المتمثل بكاشف (Bromocresol green) حيث لوحظت البقع المتكونة وتم حساب قيمة Rf .

النتائج والمناقشة:

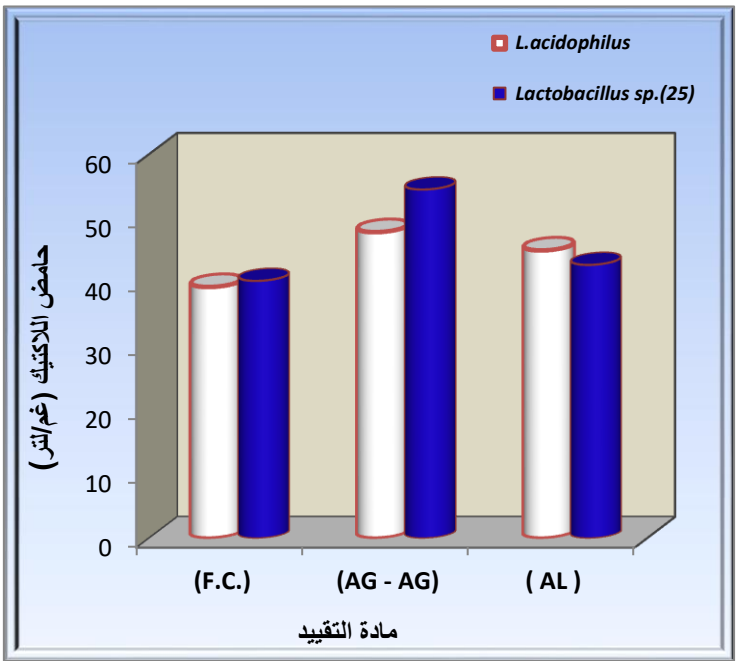
تقييد خلايا العزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp.(25)

استخدمت تقنية تقييد بكتريا حامض اللاكتيك بشكل ناجح لأجراء عمليات تخمرية مختلفة [11]التي تحقق في إستخدامها فوائد عديدة منها إمكانية الأستخدام المتكرر للعوامل المساعدة الخلوية المقيدة لأكثر من مرة وحمايتها من التلوث والحصول على كمية إنتاج عالية وسهولة عمليات الفصل للنواتج [12]. تم تقييد بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) ودراسة العوامل المؤثرة في تقييدها والتي إشتملت على نوع المادة الساندة وتركيزها والعدد الأمثل من الخلايا المناسب للتقييد.

1- نوع المادة الساندة

استخدم نوعان من المواد الساندة في تقييد بكتريا *L.acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) هما الألجينات والأكار-أكار وبتركيز 2% ويتضح من الشكل(1) تفوق مادة الأكار-أكار على الألجينات بوصفها مادة ساندة في تقييد الخلايا المستخدمة في هذه الدراسة إذ بلغ إنتاج حامض اللاكتيك (47.86 و54.52) غم /لتر لكل من بكتريا *L.acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) على التوالي, بينما بلغ إنتاج الحامض عند استخدام مادة الألجينات (45 و42.74) غم /لتر لكلا العزلتين على التوالي ايضاً.

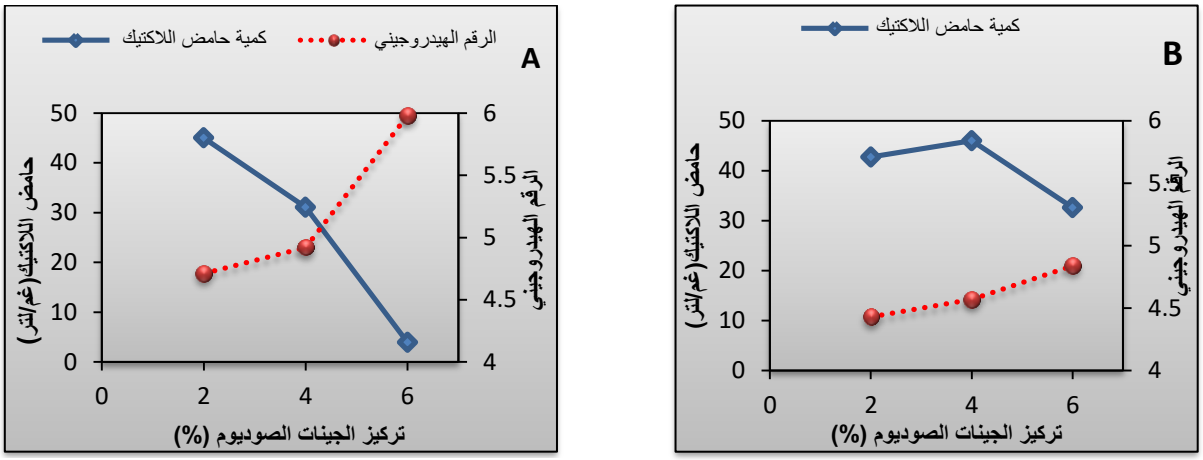
يمكن أن يعزى تفوق الأكار-أكار بوصفها مادة ساندة على الجينات الكالسيوم في تقييد الخلايا وإنتاج حامض اللاكتيك الى كون مادة الألجينات غير ثابتة عند ملامستها لبعض العوامل الخلابة للأيونات (Cation chelating agents) مثل الفوسفيت والستريت واللاكتيت, [11] فضلاً عن عدم متانة هلام الجينات الكالسيوم المستخدم في هذه الدراسة عند التركيز 2% والمتصلب في كلوريد الكالسيوم وعلى الرغم من إمكانية إستخدام أيونات عديدة لتحقيق الصلابة (Rigidity) لهلام الألجينات الا أنه تم اختيار أيون الكالسيوم في هذه الدراسة لقلة سميته [13]. إن قابلية الألجينات لتكوين الهلام يعود لمحتواه من حامض الكلويورونيك (Gluuronic acid) اذ ترتبط مجاميع الحامض بشكل ثنائي المحور مكونة تجويفاً يعمل كموقع إرتباط للأيون [14].



الشكل (1): انتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) الحرة (F.C.) والمقيدة في كل من مادة الأكار-أكار (AG- AG) والجينات الكالسيوم (AL) بتركيز 2%.

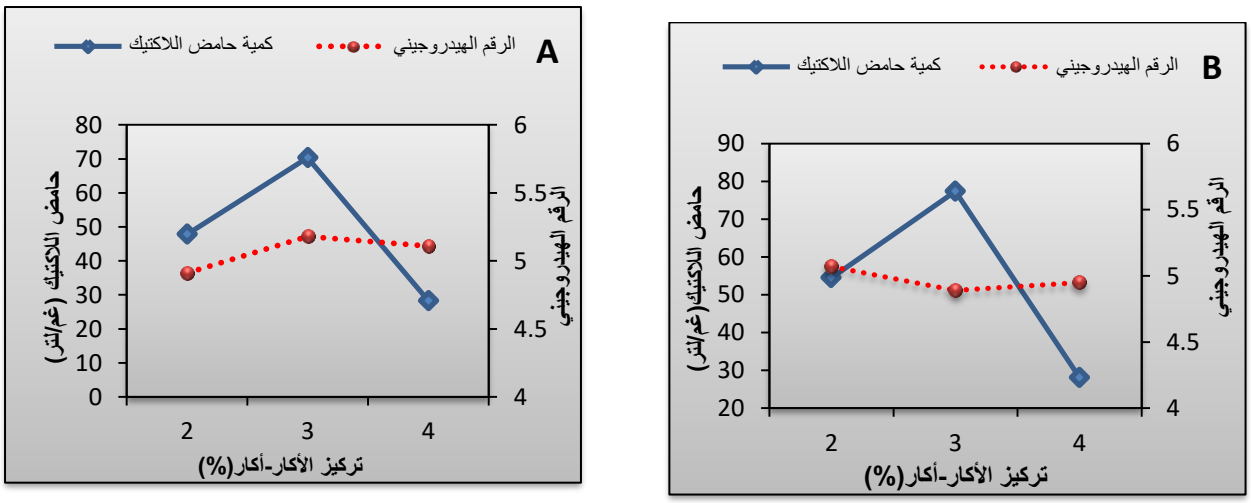
2- تركيز المادة الساندة

تظهر النتائج الموضحة في الشكل (B و A– 2) أن التركيز الأمثل لمادة الألجينات هو 2% إذ بلغ إنتاج الحامض (45 و42.74) غم/لتر للعزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus*sp. (25) على التوالي بينما كان التركيز الأمثل لمادة الأكار- أكار هو 3% إذ بلغ إنتاج الحامض (70.36و77.38) غم/لتر للعزلتين المشار اليهما على التوالي(شكل B و A–3) وفي ضوء ماتقدم من النتائج أختيرت مادة الأكار-أكار بتركيز 3% كأنسب مادة ساندة واستخدمت في جميع مراحل الدراسة اللاحقة .



الشكل (2):تأثير تركيز الجينات الصوديوم في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا:

-A*Lactobacillus* sp. (25) -B*L. acidophilus*



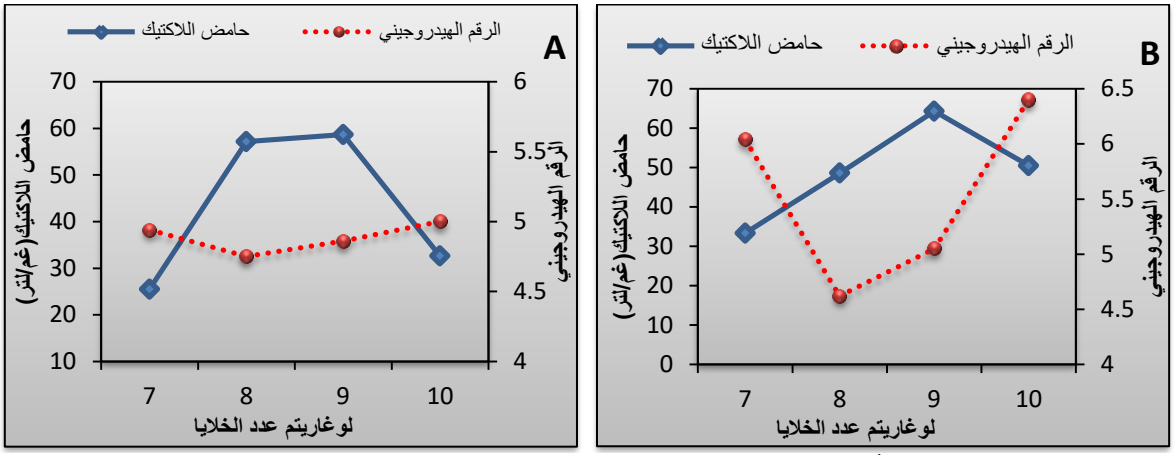
الشكل (3): تأثير تركيز الأكار-أكار في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا:

-A*Lactobacillus* sp. (25) -B*L. acidophilus*

تمتاز مادة الأكار- أكار بكونها رخيصة الثمن ومقاومة عموماً للتحلل بالأحياء المجهرية إلا أنها ليست ذات متانة عالية [15] ورغم عدم متانتها إلا أنها تعد مادة سائدة مناسبة لتقييد الخلايا في هذه الدراسة نظراً لأن ظروف التخمر هي ظروف ساكنة وليس بأستخدام الحاضنة الهزازة إذ قد يؤدي الرج الى تكسير الأكار-أكار.

3- إستخدام العدد الأمثل من الخلايا في التقييد

تم تحديد العدد الأمثل من الخلايا اللازم للتقييد على مادة الأكار-أكار باستخدام أعداد تراوحت بين ($10^{7}-10^{10}$)خلية/مل. اذ أن إنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) يزداد بأزدياد عدد الخلايا المستخدمة في التقييد لغاية(1×10^{9}) خلية /مل إذ بلغ إنتاج الحامض (58.66 و64.28) غم /لتر للعزلتين على التوالي. ثم ينخفض بعد ذلك . إن إنخفاض إنتاج حامض اللاكتيك عند إستخدام عدد خلايا مقيّد مقداره (1×10^{10}) خلية / مل يمكن أن يعزى الى أن هذا العدد من الخلايا يعد كبيراً مقارنة بوحدة المساحة في مادة الأكار-أكار ويؤدي ذلك الى نقص في الأوكسجين وبالتالي عرقلة الفعاليات الحيوية وتغير أنماطها [16]. تعد النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة مماثلة لما وصف في دراسات سابقة اذ استخدم عدد خلايا مقداره (1×10^{9})خلية / مل من بكتريا *L.gasseri* و*L. delbrueckii* المقيدة في مادة الاكار- الاكار لانتاج الحامض [7].



الشكل (4): تأثير عدد الخلايا المستخدم في التقييد في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا:
-A*Lactobacillus* sp. (25) -B *L. acidophilus*

تحديدالظروف المزرعية المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المقيدة

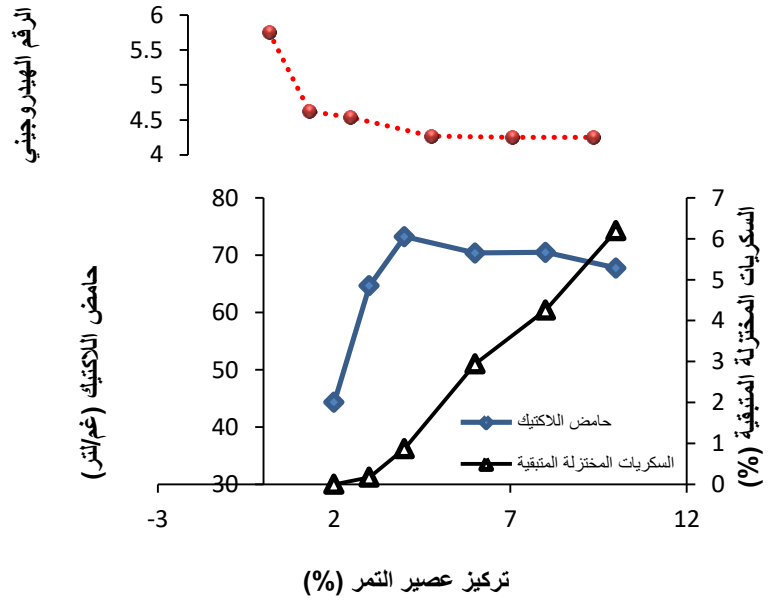
تمت دراسة عدد من الظروف المؤثره في انتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المقيدة التياشتملت على :

1-تأثير تركيزعصير التمر

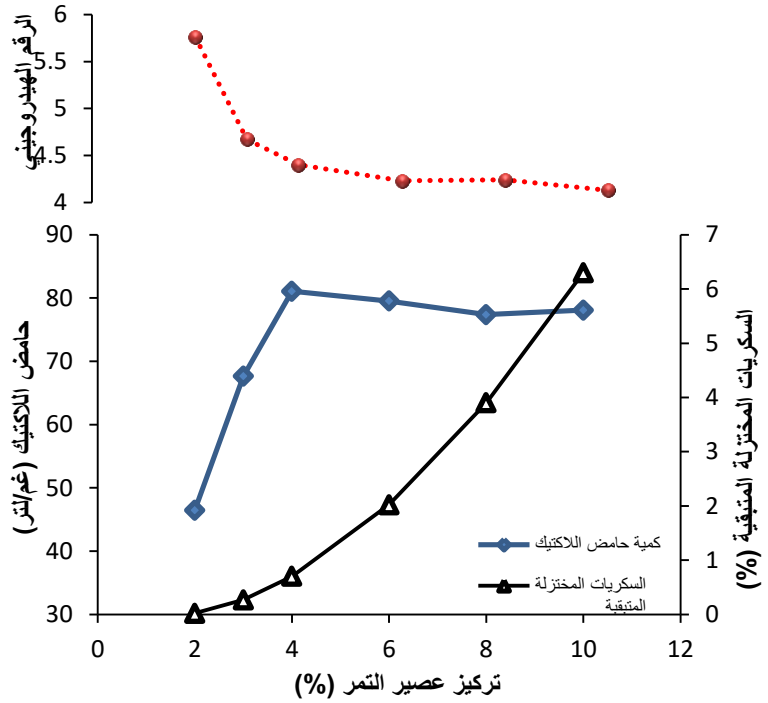
أظهرت النتائج في الشكلين (5و6) أن أفضل تركيز لعصير التمر لانتاج الحامض من العزلتين قيد الدراسة كان عند 4% إذ بلغ (73.21و81.07) غم/لتر للعزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp.(25)على التوالي .وإعتماداًعلى هذه النتائج فقد تم استخدام التركيز 4 % كأنسب تركيز من عصير التمر وتم استخدامه في جميع مراحل الدراسة اللاحقة .ويتضح من النتائج أن الخلايا المقيدة تستهلك مصدراً كربونياً بنسبة أقل مقارنة بالخلايا الحرة إذ أنه بالرجوع الى ماوجدته [5] يتضح أن التركيزين (6و8)% هما التركيزان الأمثلان من السكريات المختزلة لأنتاج الحامض من الخلايا الحرة للعزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) , على التوالي .ويمكن تفسير ذلك بأن الخلايا الحره تحتاج الى نسبة أعلى من المصدر الكربوني للنمو ولبناء كتلتها الحيوية , في حين تتميز الخلايا المقيدة بأنقسامات محددة فقط.

2- تأثير تركيز المصدر النيتروجيني

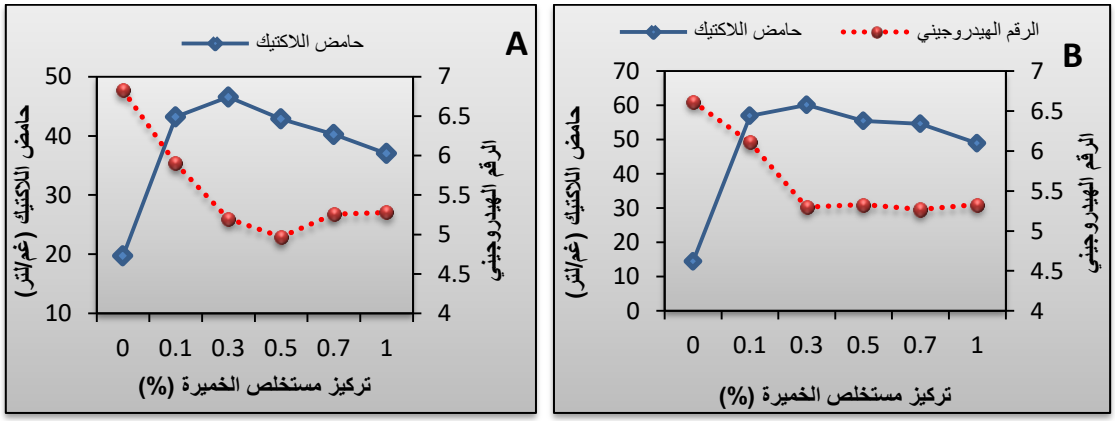
يتضح من النتائج المبينة في الشكل(B و A– 7)أن أفضل تركيز لمستخلص الخميرة (كمصدر نيتروجيني) الذي حقق أعلى إنتاج للحامض كان عند التركيز 0.3% إذ بلغت (46.55 و60.12) غم / لتر للعزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25)على التوالي وتأتي النتيجة المتحصل عليها من هذه الدراسة تأكيداً لما وجده[17] اذ استخدم مستخلص الخميرة بتركيز 0.3 % لانتاج الحامض من بكتريا *L.rhamnosus* يعد مستخلص الخميرة مصدراً نيتروجينياً شائعاً يجهز بكتريا حامض اللاكتيك بمعقد فيتامين B فضلاعن تجهيزه بالنيتروجين العضوي [18].



الشكل (5): تأثير تركيز عصير التمر في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. acidophilus* المقيدة.



الشكل (6): تأثير تركيز عصير التمر في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا (25).*Lactobacillus* sp المقيدة .

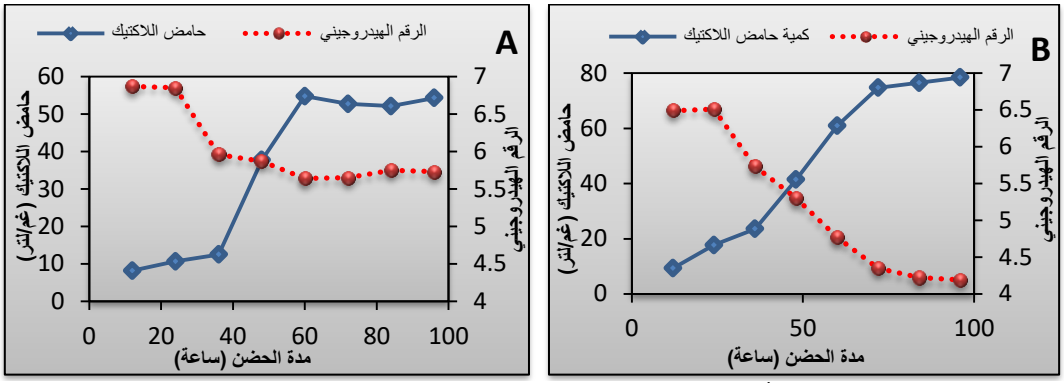


الشكل(7) : تأثير تركيز المصدر النيتروجيني في إنتاج حامض اللاكتيك من البكتريا المقيدة:
A - *L. acidophilus* -(25) *Lactobacillus* sp. .

لابد من إضافة مصادر نيتروجينية لأنتاج حامض اللاكتيك ويفضل أن لاتكون معقدة جداً مثل الببتون لأنة يعرقل عمليات التنقية والأستخلاص النهائية ولذلك تضاف بكميات قليلة بحيث تكون كافية لعمليات النمو[16].

3 -تأثير مدة الحضن

تمت متابعة إنتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المقيدة للعزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus sp.* (25) لمدة96ساعة , يلاحظ من الشكل (B و A -8) أن إنتاج الحامض يبدأ بعد 12 ساعة من التخمر إذ بلغت كمية الحامض المنتج (8.21 و9.29)غم/لتر للعزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus sp.*(25) على التوالي, ثم يرتفع بشكل تدريجي الى أن يصل الى اقصاه بعد 60 ساعة إذ بلغ 54.76 غم/لتر للعزلة *L.acidophilus* و 72 ساعة للعزلة *Lactobacillus* sp .(25) إذ بلغت كمية الحامض المنتجة 74.76 غم/لتر, ثم يستقر بعد ذلك. يتضح من النتائج ان الوصول الى أقصى إنتاج من الحامض في الخلايا المقيدة يستغرق وقتاً أطول , ويمكن أن يعزى ذلك الى ان الخلايا المقيدة يمكن ان تتعرض الى بطء في الفعاليات الأيضية نتيجة لقلة التهوية ونتيجة لبطء انتشارمواد الأساس او انتشار النواتج من البيئة المباشرة المحيطة بالخلايا [16]. تعد النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة مقاربة لما وصف في دراسات سابقة اذ بلغت مدة الحضن لانتاج الحامض من مزرعة مختلطة من بكتريا حامض اللاكتيك 72 ساعة [19], واشار [20] الى استخدام مدة الحضن ذاتها في انتاج حامض اللاكتيك من الفطر *R.oryzae* .



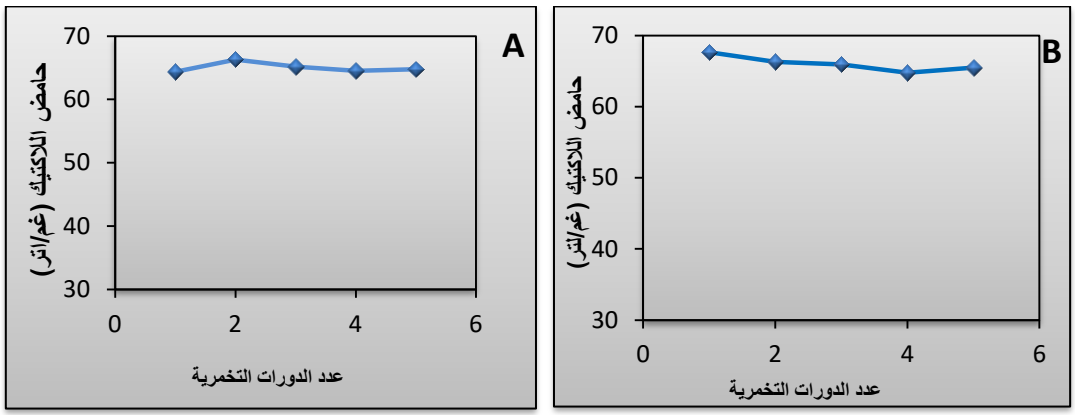
الشكل (8): تأثير مدة الحضن في إنتاج حامض اللاكتيك من البكتريا المقيدة:
L. acidophilus-A*Lactobacillus* sp. (25) -B

وبالرجوع الى الشكل السابق يتضح أن الرقم الهيدروجيني للوسط يبدأ بالأنخفاض بعد 36 ساعة من التخمر ويستمر بالأنخفاض الى أن يصل الى 5.64 بعد 60 ساعة للعزلة *L .acidophilus* و 4.22 بعد 84 ساعة للعزلة *Lactobacillus* sp. (25) ثم يستقر بعد ذلك , يمكن ان يعزى إنخفاض الرقم الهيدروجيني الى إنتاج حامض اللاكتيك كما أن لتجمع هذا الحامض تأثيراً تثبيطياً على عملية إنتاجه لتأثيره على الخلايا المنتجة لذا يجب إستخدام مواد لمعادلة تأثيره وهذا يفسر سبب إضافة كربونات الكالسيوم في وسط إنتاج الحامض من العزلتين قيد الدراسة.

4 - دراسة ثبوتية الخلايا المقيدة

تمت دراسة ثبوتية بكتريا *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp. (25) المقيدتين بمادة 3 % أكار-أكار لأستخدامها بشكل متكرر لأنتاج حامض اللاكتيك من عصير التمر . يتضح من الشكل (B وA– 9) إمكانية إستخدام البكتريا المقيدة في مادة الأكار-أكار بشكل ناجح لأنتاج حامض اللاكتيك من وسط عصير التمر لمدة 5 دورات تخمرية دون أي إنخفاض في مستوى إنتاج الحامض .

ولكون ثبوتية الخلايا المقيدة تعد معياراً لكفائتها في الأنتاج لذا حظي هذا الموضوع بأهتمام الباحثين فقد أشار[21] في دراسة عن بكتريا *L.helveticus* المقيدة بمادة (k-carrageenan) الى استمرارية ثبوتية الخلايا المقيدة في إنتاج الحامض أكثر من 100 يوم.



الشكل (9): ثبوتية الخلايا المقيدة لأنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا:
-A *L. acidophilus*Lactobacillus sp. (25) –B

كفاءة بكتريا *L. acidophilus*و*Lactobacillus* sp. (25) في تحويل السكر الى حامض اللاكتيك

تم حساب النسبة المئوية لكفاءة تحويل العزلتين قيد الدراسة للسكر الموجود في وسط عصير التمر. وأظهرت النتائجأن النسبة المئوية لكفاءة التحويل بلغت (78.25 و82.5)% للعزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus sp.* (25),على التوالي. عند أستخدام تركيز (4)% من عصير التمر كوسط انتاجي .وتعد النتائج المستحصلة من هذه الدراسة اعلى مما تم الحصول عليه في دراسات سابقة , فقد وجد[22] أن كفاءة تحويل بكتريا *L.delbrueckii* NCIM 2365 للسكريات الموجودة في (2)% من وسط المولاس بلغت (75.3 ±3.6)% .بينما كانت نسبة تحويل سكر اللاكتوز من قبل بكتريا *L. acidophilus* عند تركيز(5)% من حليب الجمل (74)% [23] .

تنقية حامض اللاكتيك

اختيرت الخلايا المقيدة لأنتاج حامض اللاكتيك المراد تنقيته في هذه الدراسة لأن نواتج التخمر تكون خالية عموماً من الخلايا وبعض فضلاتها العرضية مما يؤدي الى تسهيل عمليات الأستخلاص والتنقية النهائية [16] .

1- خطوة الترويق (Clarification step)

إن تعديل الرقم الهيدروجيني للراشح الحاوي على حامض اللاكتيك بهيدروكسيد الكالسيوم الى(pH10) ومعاملته حرارياً ونبذه مركزياً ساعد في تحويل حامض اللاكتيك الى لاكتات الكالسيوم اضافة الى قتل البكتريا وتخثير بروتينات الوسط والتخلص من كربونات الكالسيوم الزائدة وتكسير السكريات المتبقية في الوسط [24], وقد اطلق على المستخلص المتحصل عليه في هذه الخطوة بالمستخلص المروق (Clarified extract).

2-التبادل الأيوني الأول

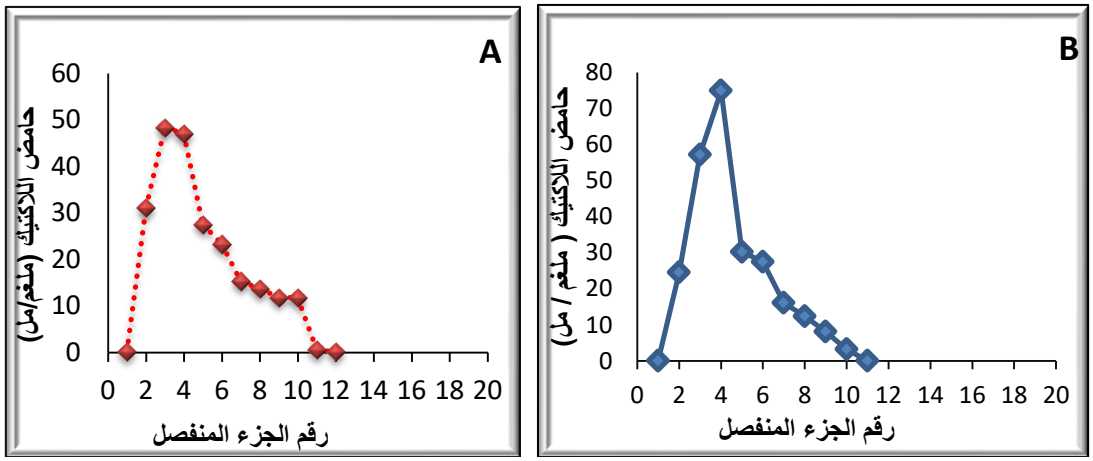
اجريت عملية التبادل الأيوني للراشح الحاوي على حامض اللاكتيك والخارج من خطوة الترويق بأستخدام المبادل الانأيوني (Amberlite IR-400) المحضر بالماء المزال منه الأيونات لأجراءعملية الفصل , وبعد التأكد من نزول جميع المواد التي لم ترتبط بالمبادل فضلاًعن التأكد من عدم نزول حامض اللاكتيك وذلك بتقدير حامض اللاكتيك للأجزاء الناتجة من عملية الغسل, تم استرداد الحامض بكربونات الأمونيوم . وقد تمخض عن عملية الاسترداد المذكورة ظهور الحامض في الأجزاء (2-10)(شكل B و A– 10) وبعد جمع الأجزاء الحاوية على الحامض وتقدير حامض اللاكتيك لها اظهرت النتائج الموضحة في الجدولين (1 و2) أن كمية الحامض كانت(32.92 و35.63) ملغم/مل وبحصيلة (92.63 و95.84)% للعزلتين*L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) على التوالي.

3- التبادل الأيوني الثاني

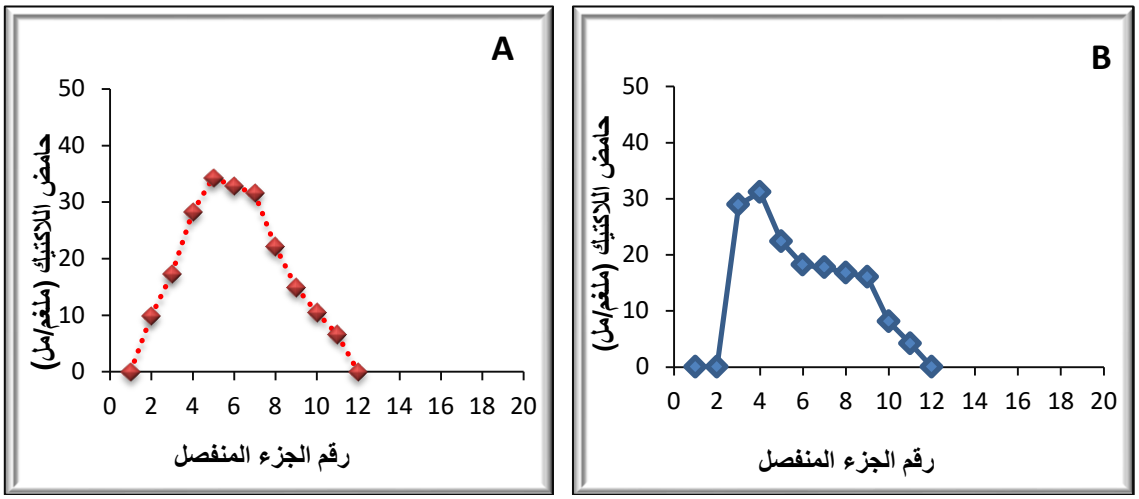
إن إضافة حامض اللاكتيك الخارج من خطوة التبادل الأيوني الأول الى المبادل الكاتأيوني [Amberlite IR-120 (H)] أسفرت عن نزول حامض اللاكتيك المنتج من العزلة *L. acidophilus* في الأجزاء (2-11) والأجزاء (3-11) للحامض المنتج من العزلة *Lactobacillus* sp.(25) وكما موضح في الشكل (A,B– 11) على التوالي. وقد أدت هذه الخطوة الى تنقية حامض اللاكتيك بالتخلص من المواد التي ترتبط بالمبادل الكاتأيوني وبلغت كمية الحامض (26.07 و28.25)ملغم/مل بحصيلة (88.75 و91.5)% للعزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp. (25) على التوالي(الجدولين 1و2) .

تتفق النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة مع ماوجده [25] اذ بلغت الحصيلة النهائية لحامض اللاكتيك 89.7% المنقى باستخدام المبادل الكاتأيوني .

استخدمت تقنية التبادل الأيوني في تنقية حامض اللاكتيك لكونها طريقة انتقائية وغير مكلفة ويتم انجازها بوقت قصير [26] . وقد ورد استخدام المبادل Amberlite في دراسات سابقة فقد اشار [27]الى استخدام المبادل الانأيوني Amberlite IRA-92 في تنقية حامض اللاكتيك وبلغت حصيلة الحامض 82.6% .



شكل (10): فصل حامض اللاكتيك بأستخدام المبادل الأنأيوني(Amberlite IR -400) من بكتريا :
-B*L. acidophilus* -A*Lactobacillus* sp.(25)



شكل(11): فصل حامض اللاكتيك بأستخدام المبادل الكاتأيوني [Amberlite IR 120(H)] من بكتريا:
A- *L. acidophilus* *Lactobacillus* sp.(25) –B

جدول (1) :تنقية حامض اللاكتيك من العزلة *L. acidophilus*

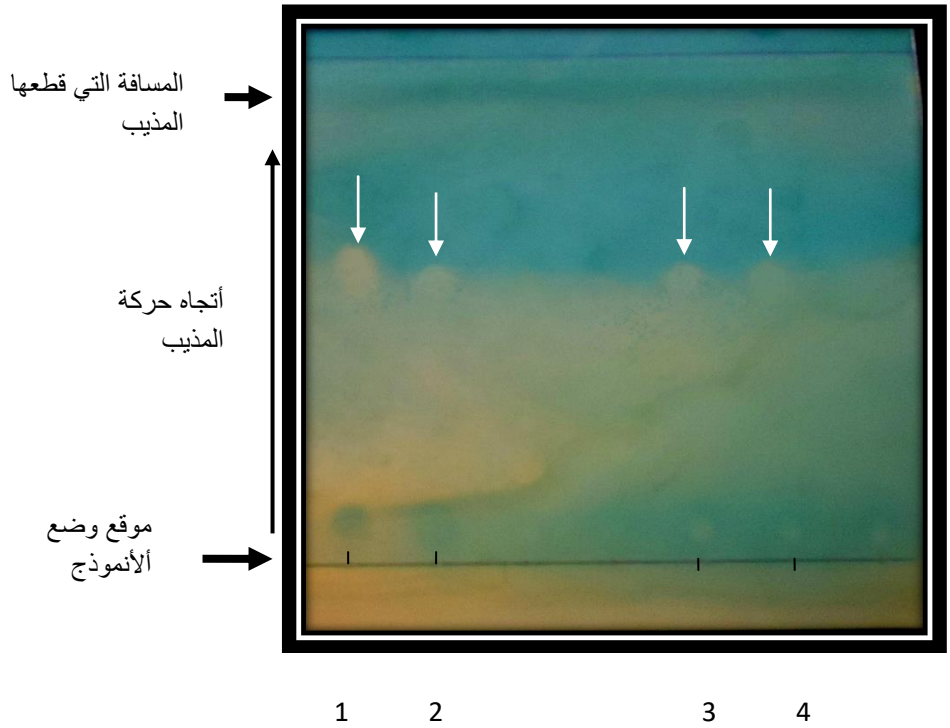
خطوة التنقية	الحجم (مليلتر)	تركيز حامض اللاكتيك (ملغم/مل)	كمية حامض اللاكتيك الكلية(ملغم)	الحصيلة (%)
1-المستخلص المروق	30	47.98	1439.4	100
2- التبادل الأيوني الأول بأستخدام المبادل (Amberlite IR-400)	40.5	32.92	1333.26	92.63
3- التبادل الأيوني الثانيبأستخدام المبادل Amberlite IR-120 (H)	49	26.07	1277.50	88.75

جدول (2): تنقية حامض اللاكتيك من العزلة *Lactobacillus* sp. (25)

خطوة التنقية	الحجم (مليلتر)	تركيز حامض اللاكتيك (ملغم/مل)	كمية حامض اللاكتيك الكلية(ملغم)	الحصيلة (%)
1-المستخلص المروق	30	51.43	154.29	100
2- التبادل الأيوني الأول بأستخدام المبادل (Amberlite IR-400)	41.5	35.63	1478.65	95.84
3- التبادل الأيوني الثاني بأستخدام المبادل Amberlite IR-120 (H)	50	28.25	1412.70	91.56

فصل حامض اللاكتيك بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

تم استخدام هذا النوع من الكروماتوغرافيا لمعرفة نوع النظير الضوئي لحامض اللاكتيك (D أو L)form, وفحص نقاوة الحامض وقياس قيمة (Rf) باستخدام Dioxane (90)% كمذيب في عملية الفصل .وتمخضت عملية الترحيل عن ظهور بقعه غير منتظمة الشكل ذات لون اصفر على ارضيه زرقاء بعد رش الصفيحه بكاشف (Bromocresol green) شكل(12) وهي مشابهه للبقعه غير المنتظمة للحامض القياسي .لذا فأن النتيجة المتحصلة تشير الى احتمال كون حامض اللاكتيك نقي .وقد تم حساب قيمة (Rf) للحامض قيد الدراسه حيث بلغ (0.535) لحامض اللاكتيك المنتج من بكتريا *L. acidophilus* و(0.541) للحامض المنتج من بكتريا *Lactobacillus* sp.(25) وهي مقاربه لقيمة (Rf) للحامض القياس والتي بلغت (0.559). إن تقارب قيم (Rf) لحامض اللاكتيك مع قيمة (Rf) للحامض القياسي (L)form يعد أحد الأدله على ان حامض اللاكتيك المنتج من العزلتين المذكورتين أعلاه يكون (L)form. وأشارت إحدى الدراسات الى أن قيمة (Rf) لحامض اللاكتيك بلغت (0.45)[28].



الشكل (12) : كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة لحامض اللاكتيك :
المسار 1 : حامض اللاكتيك القياسي.
المسار 2 : لحامض اللاكتيك المنتج من العزلة *Lactobacillus* sp. (25) .
المساران 3و4 : حامض اللاكتيك المنتج من العزلة *L. acidophilus*.

المصادر (Refrences):

1- Wee , J.Y.; Kim, J.N. and Ryu, H.W. (2006). Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications . Food Technol. Biotechnol. 44(2). 163-172 .

2- Narayanan, N.; Roychoudhury, P. K. and Srivastava, A. (2004). L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. Electronic Journal of Biotechnology ISSN : 0717-3458. Vol. 7,No. 2, Issue of August 15 .

3- Jogdand, S. N. (1993). Advances in Biotechnology. Himalaya Publishing House. First Edition.

4- Habova, V.; Melzoch, K. and Rychtera, M. (2004). Modern Method of Lactic acid Recovery from Fermentation Broth. Czech J. Food Sci.Vol. 22, No. 3: 87-94 .

5- الطائي , سهاد رضا متعب . (2011) . إنتاج وتنقية حامض اللاكتيك من خلايا مقيدة لبكتريا *Lactobacillus* المعزولة محلياً. رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة كربلاء .

6- Champagne, C. P. and Gardner, N. J.(2001). The effect of protective ingredients on the survival of immobilized cells of *Streptococcus thermophilus* to air and freeze- drying . EJB Electronic, Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458. Vol.4, No.3.

7- EL- Hawary, F. ; Selim, I. A. and Omar, S. A.(2009). Production of L (+) Lactic Acid From Whey By Immobilized Whole Cells of *Lactobacillusdelbrueckii* and *Lactobacillus gasser*. The First International Conference of Food Industries and Biotechnology & Associateted Fair .

8- Cock, L. S. and de Stouvenel , A. R. (2007). Lactic acid fermentation production using wast from the harvest of green sugar cane substrate. Inerciencia . Vol. 32. No. 5 .

9- Taylor , K. A. (1996) . Asimple Colorimetric Assay For Muramic Acid And Lactic Acid . Appl. Biochem. Biotechnol. 56. 49-58 .

10- Miller ,G .I. (1959) . Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar . Anal. Chem. , 3r . 426-428 .

11- Mirdamadi, S.; Atashgahi, S.; Rajabi, A.; Mohseni,F. A.;Roayaei, M. and Hamedi, J.(2008). Cell entrapment of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 39392 for lactic acid production. Iranian Journal of Biotechnology, Vol. 6, No.1 .

12- Goksungur, Y. and Guvence, U. (1999). Production of Lactic acid From Beet Molasses by Calcium Alginate Immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202 . J. Chem.. Technol. Biotechnol. 74. 131-136.

13- Orive, G. ; Hernandez, R. M. ; Gascon, A.R. Et Al. (2004). History, challenges and promisis of cell microencapsulation . Trends Biotechnol . 22. 87-92.Cited from .(Guisan , 2008) .

14- Haug,A.; Larsen, B. and Smidsrod, O. (1966). A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis . Acta Chem . Scand. 20 . 183 . Cited from .(Guisan , 2008) .

15- Junyan,L.;Guangfei, Q.and Ping,N.(2006).Cell Immobilization Technology and Application. GMSARN International Conference on Sustainable Development: Issues and Prospects For GMS .

16- الخفاجي , زهرة محمود (1990) . التقنية الحيوية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / جامعة بغداد . مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر .

17- Hongxian, L. and Jianqiang, L. (2008). Study on production of lactic acid by immobilized cells. CNKI: SUN: ZNGZ .

18- Yoo, I. K.; Cheng, N. N.; Lee, E. G. ;Cheng, Y.K. and Moon, S.H. (1997). Effect of B vitamin supplementation on lactic acid production by *Lactobacillus casei* . J. Ferment. Bioeng. 84: 172-175.

19- Gardner, N. J.; Savard, T.; Obermeier, P.; Caldwell, G. and Champagne, C. P. (2001). Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. International Journal of Food Microbiology .64. 261-275 .

20- Zhan, X.; Wang, D. ;Tuinstra, M.R.; Bean, P.A.; Seib, X.S. and SUN, X.S.(2003). Ethanol and lactic acid production as affected by sorghum genotype and location. Industrial Crops and Products. 18 :245-255 .

21- Doleyres, Y. and Lacroix, C.(2004). Technologies with free and immobilized cells for probiotech bifidobacteria production and protection. Appl. Biotechnol. Food Sci. Pol. In press.

22- Rangaswamy, V. and Ramakrishna, S. V.(2008). Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a dual reactor system using paked bed biofilm reactor .Journal Compilation . The Society for Applied Microbiology ,Letters in Applied Microbiology .46 .661-666 .

23- Ahmed , T. and Kanwal. R.(2004). Biochemical Characteristics ofacid Producing Bacteria and Preparation of Camel Milk Cheese by Using Starter Culture. Pakistan Vet. J .,24 (2) .

24- Vijayakumar, J.;Aravindan, R .and Viruthagriri, T. (2008). Recent Trends in the Production, Purification and Application of Lactic Acid. Chem. Biochem. Eng. Q. 22 (2):245-264.

25- Sun, X.; Wang, Q. ; Zhao, W. ; Ma, H.and Sakata, K. Sep. Purif . Technol. 49. (2006). 43 . Cited from. (Vijayakumar *et al* ., 2008) .

26- Polat, Z. (2002). L(+) Lactic Acid Purification From Fermentation Broth Using Ion Exchange Resins. Ms. C. Thesis. Izmir Institute of Technology .Izmir, Turkey .

27- Tong, W.Y.; Fu, X. Y. ; Lee, S. M.; Jie, Y. ; Liu, J.W. ;Wei, D. Z. and Koo, Y. M. Biochem. Eng. J. 18 .(2004). 89. Cited Fro .(Vijayakumar *et al* ., 2008).

28- Allan, P. (1998). Chemistry Review. Volume 7, Number 3, Pages 24 and 25 .