Production of Lactic Acid By *Rhizopus Oryzae* From Low Cost Medium

انتاج حامض اللاكتيك بوساطة الفطر *Rhizopus oryzae* في وسط قليل الكلفة

منال عبد الواحد صلبوخ
كلية الزراعة – جامعة كربلاء

زينب هادي عباس
كلية الزراعة - جامعة كربلاء

المستخلص

استخدمت سلالة الفطر Rhizopus *oryzae* (c-80) في انتاج حامض اللاكتيك بعد تنميتها في عدد من الاوساط الزرعية المحضرة بطريقة التخمر السطحي . جرى استبدال كلي او جزئي للكلوكوز باستخدام عصير التمر المحضر من تمر الزهدي كمصدر للكاربون في الوسط الاساسي . وانتخبت نسبة الاستبدال 5:5 عصير التمرالى الكلوكوز باعتبارها الافضل من الناحية الاقتصادية لانتاج حامض اللاكتيك . حيث بلغ انتاج حامض اللاكتيك فيه 63.3 غم / لتر واستخدم شرش الاجبان كمادة مغذية اضافية بدلا من الماء المقطر في تحضير الوسط الزرعي المنتخب (عصير التمر: كلوكوز 5:5 ، + الوسط 2R ، ولوحظ ارتفاع نسبة الحامض الى 90.4 غم / لتر .

ABSTRACT

Rhizopus oryzae (strain-80) was used for production of lactic acid from various medium in surface fermentation . carbon source in the basic medium was wholly or partially subsitituted by date syrub which *prepared from Zahdi date as acarbon source in basic medium. Aratio of 5:5 date syrub : glucose gave63,3gmlliter lactic acid and appeared to be economically valuable for commercial production for lactic acid . Additional increase in lactic acid production to90,4 gm l liter was achieved by substitution of distilled water with whey in the medium, According to the above_results it can be concluded that. The low modified medium consist of d*ate syrub : glucose , 5:5 + 2R medium + 50% d*iluted whey.*

المقدمة

يعتبر حامض اللاكتيك اول منتوج تقني حياتي ادخل ضمن المضافات الامنة صحيا (Generally Regarded As Safe) GRAS للمضافات الغذائية لاغراض متنوعة وبطرائق مختلفة فهو يستخدم في صناعة الالبان وتدعيم التخمير في صناعة المعلبات ، وزيادة ثباتية مساحيق البيض المجفف ويحسن مذاق المخللات ويضاف لتحميض العصائر والفواكه ، ويدخل في صناعة المعجنات وكذلك المستحلبات . (1 ، 2) . ينتج حامض اللاكتيك في اوساط تخمير سائلة وبطرق عدة منها طريقة الوجبات والطريقة المستمرة وتعد طريقة الوجبات الاكثر شيوعا و ينتج حامض اللاكتيك بالتخمرات السطحية والغاطسة باستخدام سلالات من الفطر *Rhizopus oryzae* وتتم عملية التخمر باستعمال الخلايا الحرة ويتوجب توفر عدد من الظروف مثل تهيئة المواد الاولية واللقاح وظروف اخرى .(3) تضاف السكريات المختلفة مثل الكلوكوز والسكروز لاوساط معروفة التركيب بهدف زيادة تركيز الحامض المنتج اولتحسين الانتاجية (4) .

يعد عصير التمر من المصادر الكاربوهايدراتية المتوفرة دائما كمصدر للكاربون كما انه يحتوي على تراكيز معتبرة من العناصر المعدنية منها الفسفور والنحاس والمغنيسيوم والبوتاسيوم والصوديوم والحديد والكبريت ، واستعمل عصير التمر كمصدر كاربوني نظرا لمحتواه العالي من السكر وخاصة السكر المحول (5) . يعرف الشرش بانه الناتج الثانوي لمصانع الجبن ، يحتوي على لاكتوز بنسبة (40 – 50) غم / لتر ونيتروجين عضوي بنسبة 1.3 غم / لتر (6) .

المواد وطرائق البحث

سلالة الفطر المنتخبة : استخدمت السلالة (c-80) *Rhizopus oryzae* المتحصل عليها من كلية الزراعة – جامعة كربلاء . دلت دراسة سابقة على ان لهذه السلالة كفاءة عالية في تحويل السكر الى حامض اللاكتيك تنشيط وادامة سلالة الفطر R . oryzae : تم تجديد اطباق potato dextrose agar المنمى عليها الفطر oryzae. R كل 21 يوم حيث حضر وسط جديد مضاف له 2مل من المضاد الحيوي الامبيسيـــــــــلين (250 ملغم / 25 مل ماء) ولقح بالسبورات الماخوذة من المزرعة الاصلية stock culture .

الوسط الزرعي : لاجل انتخاب الوسط الزرعي الامثل لتنمية السلالة المنتخبة تم اختيار الوسط الاساسي الذي وصل اليه (7)والمكون من

المادة	الوزن (غم)
Glucose	15
MgSo4.7H2o	0.025
NH4NO3	0.05
KH2PO4	0.03
ZnSo4.5H2O	0.004
CaCo3	5
Dis water PH=7	1000مل

قورن هذا الوسط مع اوساط مختلفة تم تحضيرها بتعديل تركيز السكر ونوع السكر المستعمل . جدول (1)

جدول(1) المكونات الداخلة في مختلف الاوساط الزرعية التي استخدمت لانتاج حامض اللاكتيك بوساطة الفطر R . oryzae في الدراسة .

المكونات (غم / لتر ماء مقطر)	الاوساط الزرعية المحضرة عندالرقم الهيدروجيني (7)					
	الوسط الاساسي	1R	2R	3R	4R	5R
مصدر الكاربون (غم)	15 كلوكوز	15 كلوكوز	15 كلوكوز	15 كلوكوز	15 عصير تمر	15 عصير تمر
MgSO4.7H2O	0.025	0.050	0.0125	-	1	1
NH4NO3	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
KH2PO4	0.03	0.03	0.03	0.06	0.01	0.01
ZnSO4.5H2O	0.004	0.004	0.004	0.004	0.003	0.003
CaCO3	5	5	5	2.5	2.5	6

*R (الوسط الاساس الامثل لانتاج حامض اللاكتيك)

الرقم الهيدروجين لوسط النمو : درس تاثير قيمة الرقم الهيدروجين للوسط الزرعي المحضر في انتاج حامض اللاكتيك من خلال اختبار مدى مختلف من رقم هيدروجيني تراوح ما بين (4-7) ، (8).

ظروف تنمية الفطر لانتاج حامض اللاكتيك : تم تنمية الفطر R . oryzae في قناني زجاجية تحتوي كل منها على 200 مل من الوسط الزرعي (PDA) المعقم بدرجة 121 م / 15 دقيقة ، ولقحت القناني بالفطر باضافة قطعة نصف قطرها 5 ملم من اكار المزرعة بعمر 5 ايام والمنماة على وسط(PDA(potato Dextros Agar . ثم حضنت القناني لمـــــدة 7 ايام بدرجة حرارة 30 م في حاضنة مكيفة لهذه الظروف . فصل الخيط الفطري ورشح المستخلص بقماش من الململ ومن ثم بورق ترشيح من نوع whattman.NO3 تحت تاثير التفريغ .

تحضير عصير التمر : استخدم التمر الزهدي لحصول على عصيره كمصدر للكاربون حيث حضر عصير التمر بخلط التمر مع الماء المقطر بنسبة (3:1) (وزن/ حجم) وترك المزيج في حرارة 80 لمدة ساعة . ثم هرس المزيج جيدا ثم رشح خلال قطعة قماش لاستعماله كمصدر رئيسي للكاربون والطاقة في وسط التخمر بدلا من الكلوكوز واستعمل عصيرالتمر لوحده في تهيئة الاوساط الطبيعية . حيث اعتمدت نتائج تحليل عصير تمر الزهدي الواردة في براءة اختراع الحكيم (9) . حيث اشارت الى ان العصير يحتوي على 78% سكر وان هذا السكر يتكون من الكلوكوز والفركتوز والسكروز بنسبة (10 : 9:1) على التوالي .

اضافة محلول الشرش لوسط النمو : تم اضافة محلول شرش الاجبان الحلو (بدون تخمير) والذي تم الحصول عليه من معمل البان الوسام – كربلاء تمت بسترته بدرجة حرارة 71 م لمدة 30 دقيقة ثم اضيف الى وسط النمو المنتخب R 2 المبينة تفاصيله في جدول (1) والحاوي على نسبة عصير التمر الى كلوكوز (5:5) بدلا من الماء المقطر المستخدم لتحضير مكونات الوسط 2R وحضرت منه معاملتان رئيسيتان الاولى شرش بدون تخفيف والثانية شرش مخفف بالماء المقطرالمعقم بنسبة 50 % للاستفادة من البروتين والعناصر المعدنية والفيتامينات في زيادة انتاج حامض اللاكتيك بوساطة الفطر (10) .

التقدير الكمي للحامض المنتج : تم فصل الفطر النامي بطريقة الترشيح باستعمال ورق ترشيح Whattman No1 وباستعمال التفريغ وتم التقدير الكمي للحامض المنتج بوساطة الفطر بتقنية High performance liqid chromatography (HPLC) . طبقا لما ورد في (11) حيث استعمل العمود نوع Shodex lonpak (C-811) الطور المتحرك حامض الفسفوريك (0.1%) واستعمل المحلول القياسي لحامض اللاكتيك 90 % وطول موجي 220 نانوميتر .

النتائج والمناقشة

وتوضح النتائج المدرجة في جدول (2) تاثير رقم الهيدروجين في انتاج حامض اللاكتيك بوساطة الفطر R. oryzae اذ وصلت الانتاجية الى 70.3 غم / لتر عند تنمية الفطر في وُسط 2R عند رقم هيدروجيني 6.5 وهي نتيجة مقاربة ومتفقة مع ما جاء به (12) بان افضل انتاجية للحامض باستعمال عدة سلالات من الفطر R. oryzae كانت باستعمال الرقم الهيدروجيني يتراوح مابين (5.5 – 6.5) وذلك لان عند هذه القيم من الرقم الهيدروجيني يعطي الفطر اعلى انتاجية من الحامض وتمثل هذه القيم هي الارقام الهيدروجينية المثلى لانتاج الحامض بسبب الفعالية العالية لانزيمات الفطر في انتاج الحامض تكون عند هذه القيم من الرقم الهيدروجيني .

جدول (2) تاثير رقم الهيدروجين فيي انتاج حامض اللاكتيك (غم / لتر) بوساطة الفطر R.oryzae المنمى في اوساط زرعية مختلفة .

نوع الوسط الزرعي	قيم الرقم الهيروجيني						
الوسط الاساسي	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7
	32.9	37.5	36.3	32.4	39.5	54.3	40.5
1R	25.3	30.9	32.8	40.5	30.5	59.3	44.5
2R	20.6	27.9	30.1	41.9	31.9	70.3	46.9
3R	21.9	20.8	22	21.8	32.8	65.9	41.7
4R	19.5	23.5	20.9	33.7	33.8	60.4	42.8
5R	20.3	21.2	22.9	25.2	36.9	61.5	51.8

ولاجل التوصل لتحضيروسط قليل الكلفة تم استبدال الكلوكوز بمصادر كاربون متاحة ورخيصة منها استخدام توليفة من عصير التمر والكلوكوز حيث يلاحظ في الجدول (3) حصول انخفاض في انتاج الحامض عند استعمال عصير التمر لوحده في وسط الانتاج ولوحظ ان اعلى نسبة خلط بين عصير التمر والكلوكوز هي 5:5اعطت اعلى انتاجية بلغت 63.3 غم / لتر وهذا يتفق مع ما ذكره (13) بان التدعيم بعصير التمر سوف يؤدي الى زيادة الانتاجية من الحامض وذلك للمحتوى العالي من عصير التمر من السكريات الاحادية والثنائية والسكريات المحورة التي يؤدي استهلاكها الى زيادة الانتاجية من الحامض (14) .

جدول (3) تاثير استخدام تراكيز مختلفة من مصادر الكاربون مكون من سكر الكلوكوز وعصير التمر في وسط 2R لانتاج حامض اللاكتيك بوساطة الفطر R.oryzae .

ت	المعاملة	مصدر الكاربون عصير التمر : الكلوكوز	حامض اللاكتيك (غم / لتر)
1	وسط 2R (بدون سكر) + عصير تمر 10 %	-	21.3
2	عصير تمر + كلوكوز + وسط 2R	8:2	25.5
3	عصير تمر + كلوكوز + وسط 2R	7:3	30.6
4	عصير تمر + كلوكوز + وسط 2R	5:5	63.3
5	عصير تمر + كلوكوز + وسط 2R	2:8	53.4
6	معاملة سيطرة وسط 2R + كلوكوز 10 %	10:0	50.9

وقد انتخبت المعاملة (عصير التمر: كلوكوز ، 5:5 + وسط 2R) لكون مصدر الكاربون هو عصير التمر قليل الكلفة وكذلك لارتفاع نسبة انتاج حامض اللاكتيك فيها وادخلت هذه المعاملة في تجربة التدعيم بمحلول شرش الاجبان.

جدول (4) تاثيراستخدام الشرش لتحضير وسط 2R يحتوي على نسبة (5:5) عصير التمر الى الكلوكوز في انتاج حامض اللاكتيك بوساطة الفطر R يلاحظ من الجدول اعلاه زيادة انتاجية الحامض بالمعاملة المستخدم بها الشرش المخفف بالماء المقطر بنسبة 50% وهذا ناتج عن نسبة السكر الموجودة في الشرش كذلك فان تخفيف الشرش سوف يؤدي الى تنظيم تركيز ايونـــــــات العناصر المعدنية الموجودة في الشرش وهذا يعمل على توجيه الفعالية الحيوية للفطر R. oryzae لانتاج الحامض وهذا يتفق مع ما جاء في (15) .

وتوصلت هذه الدراسة الى امكانية استخدام عصير التمر مع الكلوكوز بنسبة 5:5 كمصدر كاربون كفوء ورخيص بدلا من الاعتماد على الكلوكوز وحده كليا في تحضير الوسط الانتاجي . وكذلك الاستفادة من الشرش الناتج العرضي لصناعة الاجبان بعد تخفيفه بالماء المقطر بنسبة 50% في تحضير وسط قليل الكلفة لانتاج حامض اللاكتيك بوساطة الفطر R. oryzae بطريقة التخمر السطحي وعلى مستوى واضح .

ت	المعاملة	حامض اللاكتيك (غم / لتر)
1	الشرش بمفرده	20.3
2	الشرش + 15% كلوكوز	33.5
3	الشرش + (عصير التمر : كلوكوز, 5:5)	44.9
4	الشرش + (عصير التمر : كلوكوز, 5:5 + وسط 2R)	50.1
5	الشرش مخفف بالماء المقطر 50% + (عصير التمر : كلوكوز, 5:5 + وسط 2R)	90.4

References:

1- Mattey, M. (1992). The production of organic acids . Crit. Rev. Biotechnol., 12:87-132.

2 - Kashket, E.R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria : Cytoplasmic PH and osmotolerance. FEMS Microbiol. Rev., 46: 233- 244.

3-Loockwood, L. B.; Ward, G.E. and Davidson, O.E. (1936). The physiology of *Rhizopus oryzae* . J. Agric. Res., 53: 849- 857.

4- Abd El- Hafes., M. A.; El- Sayed, A.A.; Gad, M. R. and El- Masry , F. H. (1994). Some nutrients affecting sweet cheese whey fermentation for lactic acid production . Annals of Agric. Sci. Moshtohor, 32 (1) : 341- 352.

5- Yousif, K.A.; Benjamin, N. D.; Kadoa , A.; Mahialddin, S .; and Ali , S. M. (1982). Chemical composition of four Iraqi date cultivars . The Date palm Journal, 1: 285- 294. (In Arabic).

6- FAO. (2000). Milk and milk product. FAO/WHO Food Standards Add . Ser. ., 29: 144- 148.

7- Prescott, S. C. and Dunn,C. G. (1959). Industrial Microbiology 3rd . ed McGraw – Hillbook company . New York . pp: 304- 331.

8- Aeschlimann, A.and Stockar, U. Von. (1989). The production of lactic acid from whey permeate by Lactobacillus helveticus . J . Biotechnol. Letters, 11(3): 195-201.

9- AL-Hakim,M.M(1995). New method for production of liquid suger from matured Zahdi date , Iraqi patent , No. 2387.(In Arabic).

10- Murad, H.A.; Abd El- Ghani, S.; Effat, B.A. and Tawfik, N.F. (1992). Utilization of some dairy and food industry wastes in the production of lactic acid . Egyptian J . of Dairy Sci., 20(1): 83- 90.

11- Omole, O. O., D.R. Brocks, G. Nappert, J. M. Naylor, and G. A. Zello. (1999). High- perchromotographic assay of (+) lactic acid and its enantiomers in calf serum. J. Chromatogr.

12- Mirdamadi., S.; Sedoghi, H. ; Sharafi, N.; Fallahpour, M.; Aziz, F.; Reza, M.M.(2002). Comparsion of lactic acid Isomers produced by fungul and bacterial strains . Iran Biomed.J . (283) : 69- 75.

13- pelezar, M. J. and Reid, R. D. (1965) . Microbiology . McGraw – HillBook company . New York .

14- Ruengruglikit, C. and Hang, Y.D. (2002). Production of L(+) lactic acid from corn cobs . Session 76A, Biotechnology- Cornell University. Geneva.

15- Yang, C.W.; Lu, Z. and Tsao, G.T. (1995). Lactic acid production by bellet- from Rhizopus oryzae in submereged system Appli. Biochemistry – and Biotechnology . 51: 57 – 71.