# Production of Lactic acid from local isolateof the fungus *Rhizopus oryzae*

# انتاج حامض اللاكتيك بواسطة عزلة محلية من الفطر *Rhizopus oryzae*

منال عبد الواحد صلبوخ
كلية الزراعة - جامعة كربلاء

**المستخلص**

اجريت هذه الدراسة للكشف عن قابلية الفطر *Rhizopus oryzae* في انتاج حامض اللاكتيك و أظهرت النتائج قدرت سلالة الفطر *Rhizopus oryzae(c-80)* عن أنتاج حامض اللاكتيك في وسط غذائي تخمري محضر بطريقة التخمر السطحي . واستعملت تراكيز مختلفة من سكر الكلوكوز هي (5، 10، 15،20) % لمعرفة أي تركيز من السكر يعطي إنتاجية عالية من الحامض ، وقد أعطى تركيز 20% كلوكوز أعلى نسبة من الحامض بلغت 39.6 غم/لتر ولوحظ ارتفاع نسبة أنتاج الحامض بارتفاع تركيز الكلوكوز في وسط الإنتاج .

## Abstract

This study was carried out to detect the ability the fungus *Rhizopus oryzae* and The results showed the ability of fungus strain *Rhizopus oryzae* ( c-80) to produce lactic acid in fermented medium prepared at the surface fermented way . and uses for different concentration from glucose sugar it ( 5 , 10 .15 , 20 ) % to know , which concentrate from sugar gives higher production from acid . The concentration ( 20% ) glucose gave high production rate of acid reached to (39.6) gm per liter results of the present study reveuled that the production of lactic acid was propotional to the to the increase of glucose concentration in product medium.

**المقدمة**

يعد حامض اللاكتيك من أكثر الحوامض العضوية استخداما في الصناعات الغذائية حيث يستعمل كمادة محمضة (acidulant) ومادة حافظة (preservative) وله استعمالات صناعية كازالة الكالسيوم في الصناعات الجلدية والنسيجية ويستعمل في الصناعات الطبية والصيدلانية ويستعمل ايضا في صناعة مواد التلميع واللدانة والبوليمرات (2،1)ينتج حامض اللاكتيك بوساطة الفطر *Rhizopus oryzae* باستعمال طريقة المزرعة المغمورة (Submerged culture)باستعمال الخلايا الحرة وبطريقة الوجبات ( Batch culture) اذ تتم عملية التخمر بظروف هوائية وباستعمال دوارق ذات حجوم مناسبة (3) .

ينتج حامض اللاكتيك بصورة رئيسية في أوساط تخمير سائلة وبطرائق عدة منها طريقة تخمرات الوجبة (Bacth culture) والتخمرات المستمرة (Continuous culture) والطريقة الشبه المستمرة (12،4 ).

**المواد وطرائق البحث**

سلالة الفطر المنخبة : استخدمت السلالة (c-80) *Rhizopus oryzae* المستحصل عليها من قسم وقاية النبات كلية الزراعة - جامعة كربلاء وهي سلالة مشخصة حسب المفاتيح التصنيفية .

تنشيط وادامة الفطر *Rhizopus oryzae* : تم تجديد اطباق potato dextrose Agar (PDA) المنمى عليها الفطر R oryzae كل 21 يوما حيث حضر وسط جديد يضاف له 2مل من المضاد الحيوي الامبيسيلسن (250 ملغم / 25 مل ماء ) ولقح بالسبورات الماخوذة من المزرعة الاصلية (stock culture) .

الحصول على الابواغ الفطرية (اللقاح) : وزع وسط (PDA) بعد تحضيره في دوارق سعـــــة 250 مل وبواقع 25مل لكل دورق وبرد بعد تعقيمه في المؤصدة بدرجة حرارة 121 م لمـــــدة 15 دقيقة بوضع مائل بغية الحصول على مساحة ملائمة لنشر العفن وتنميته ثم حضنت الدوارق بعد تلقيحها من المزرعة الاصلية لمدة 7 ايام في درجة حرارة 30 م حيث تم الحصول على الابواغ بازالتها وذلك بإضافة كمية مناسبة من الماء المقطر المعقم لكل دورق مع التحريك بعناية لإطلاق الابواغ الفطرية ثم الترشيح من خلال القطن الموضوع في قمع ( تم تعقيم الاثنين معا بوساطة الاوتوكليف بدرجة حرارة 121 م لمدة 15 دقيقة ) . تم بعدها حساب عدد الابواغ باستعمال الHemocytometer وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال .

الوسط الغذائي (الزرعي) : استعمل الوسط الغذائي الذي ذكره (5) والمكون مما يلي :

| 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 |

حيث وزع الوسط الغذائي في دوارق سعة 300 مل وبواقع 100مل/ دورق ثم عقم في حرارة 121م لمدة 15دقيقة .

ظروف التخمر : اتبعت طريقة التخمر المستقرة (Static culture ) وكانت درجة الحرارة 30 م والأس الهيدروجيني(7) وحجم لقاح( $1*10^6$ ) بوغ/ مل ومدة التخمر 7ايام كما ورد في (6) .

**التقدير الأولي للحامض المنتج :**

ا - فصل الكتلة الحيوية : تم فصل اكتلة الحيوية النامية بطريقة الترشيح باستعمال ورق ترشيح Whattman No1 وباستعمال التفريغ ثم اخذ (50) مل من الراشح الناتج وقدرت الحموضة الكلية بطريقة التسحيح حسب الطريقة التي ذكرها (7،8) . واحتسابها كحامض لاكتيك حيث اخذ (10مل ) من الراشح في دورق صغير سعة (50) مل وأضيف له قطرات من دليل الفينوفثالين (1%) وسحح ضد القاعدة NaoH ( 00.1ع ) حتى تغير اللون وسجلت القراءات حسب القانون التالي :

نسبة الحامض المنتج % = حجم القاعدة NaoH (مللتر) * عياريتها * الوزن الملي مكافئ للحامض / حجم العينة * 100

ب- تم قياس الاس الهيدروجيني للوسط باستعمال جهاز ال PH-meter .

التقدير الكمي للحامض : تم التقدير الكمي للحامض المنتج بوساطة سلالة الفطر بوساطة تقنية ال(HPLC) ( High performance liquid chromotogrphy ) طبقا لما ورد في (9) . حيث استعمل العمود نوع shodex lonpak(c-811 ) الطور المتحرك حامض الفسفوريك 0.1 %) واستعمل المحلول القياسي لحامض اللاكتيك (90% ) وطول موجي (220 نانوميتر ) .

تحديد افضل تركيز للمصدر الكاربوني : أجريت عدة معاملات حيث تم تغيير تركيز الكلوكوز في الوسط الزرعي ، واستعملت التراكيز الآتية (5، 10، 15،20) % لأجل معرفة افضل تركيز لمصدر الكاربون الذي يعطي أفضل إنتاجية من الحامض .

## النتائج والمناقشة

أظهرت العزلة (c-80) *Rhizopus oryzae* كفاءة في قابليتها على أنتاج حامض اللاكتيك في وسط التخمر حيث كانت الحموضة الكلية المقدرة بالتسحيح والأس الهيدروجيني وكمية حامض اللاكتيك (غم / لتر ) مقدرة باستخدام تقنية الHPLC البالغة(2.55% ، 3.1، 39.6غم / لتر ) على التوالي وهي نتائج مقاربة لدراسة اعطت نتائج مقاربة باستعمال سلالة الفطر *Rhizopus oryzae* وباستعمال الكلوكوز كمصدركاربوني في وسط التخمر .(10) .

جدول(1 )يبين تأثير استخدام تراكيز مختلفة من الكلوكوز (مصدر الكاربون) لإنتاج حامض اللاكتيك بوساطة العزلة (c-80) *Rhizopus oryzae*

| ت | مصدرالكاربون (كلوكوز) % | الحموضة الكلية % | الاس الهيدروجيني | حامض اللاكتيك غم/ لتر |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 5 | 0.81 | 5.1 | 15.4 |
| 2 | 10 | 1.06 | 4.2 | 30.1 |
| 3 | 15 | 1.90 | 3.9 | 32.9 |
| 4 | 20 | 2.55 | 3.1 | 39.6 |

ويلاحظ من النتائج المدرجة في الجدول أعلاه تأثير استخدام تركيز عالي من مصدر الكاربون (الكلوكوز) في وسط الإنتاج قد أعطى إنتاجية عالية من الحامض كذلك الزيادة في الحموضة الكلية % وهذا يتفق مع ما جاء في (11) وان سلالات اخرى قد اعطت انتاجية عالية من الحامض تفوق حتى انتاجية بكتريا حامض اللاكتيك وهذا ما ورد في (13)

## المصادر


1-Vaccari, G., Gonzalez-Vara, Y.R.A., Campi,A.L., Dosi,E.,Brigidi,P. and Matteuzzi, D.(1993) Fermentative production of L- lactic acid by Lactobacillus Casei DSM20011 and product recover using ion exchange resins . Appl. Microbiol. Biotechn . 40 : 23-27.

2- Yin hua, L., Jianping, L., Shaozhang, L., Xuemeri, L., Yao , S., Peilin, C. (1997). Extractive L-lactic acid fermentation with immobilized Rhizopus orzyae in a three- phase fluidized bed . Chinese J. Biotech. 13 (3): 169-176.

3- Obayashi, A., H. Yorifuji, T. Yamagata, T. Ijichi, and M. Kanie.(1966).Respiration in organic acid forming molds . part I.Purification of cytochrome c, coenzyme Q and L- lactic dehydrogenase from lactate forming Rhizopus oryzae . Agric. Biol . Chem . 30: 717- 724.

4-Wang,C.W.,Z.Lu,and G. T.Tasao . (1995).Lactic acid production by pellet - from Rh*izopus oryzae* in a submereged system.Appl.Biochem.Biotechnol.51 /52: 1391-1399.

5- Prescott, S.C. and Dunn, C.G.(1959) . Industrial Microbiology .3 ed. McGraw-Hill Book company .New York.pp:631-635.

6- Yu , R.C. and Hang , D. (1989). Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L(+)- lactic acid by Rhizopus oryzae . Biotechnol.Lett. 11: 597-600.

7- Rychtera,M.,Melzoch, K., Habova, V., Vedlichova, Z., Patakova, P., Hammaci.,H. and Machek,.F.(1996). Optimization of microbial lactic acid production in integrated process. J. Biotechnik. Ankara, Turkey FM, CZ- 155-161.

8- Speck , M.C. (1976) . Compendium of method for Microbiological examination of food . Washington .American Public Health Association , pp : 222-229.

9- Hamakawa,H.;Shimzaki,K.;Sukegawa,K and Kato,I.(1983) Analysis of organic acid component in fermented whey and in commercial dairy by high performance liquid chromotochraphy . Japanese .J.of Dairy and Food Sci.,32(4):A139-144.

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

11- Margulies, M., and W. Vishniac. (1961). Dissimilation of glucose by the MX strain of Rhizopus . J. Bacteriol. 81: 1-9.(Abst).

12- Suntornsuk, W . and Hang,Y.D. (1994) . Strain improvement of Rhizopus oryzae for production of L (+) lactic acid and glucoamylase . Lett. Appl. Microbiol. 19: 249-252.

13- Senthuran, A., Senthuran, V., Mattiasson, B. and Kaul, R. (1997). Lactic acid fermementation in a recycle bacth reactor using immobilized Lactobacillus casei . Biotechnol. Bioeng. 55(6) : 841- 853.