إنتاج حامض اللاكتيك من مولاس قصب السكر باستخدام عزلة محلية من بكتريا *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*

كاظمية والي منصور الغزي ، اسعد محمد رضا الطائي ، لمى جاسم محمد العنبر

مركز علوم البحار ــ قسم الكيمياء البيئية البحرية ــ جامعة البصرة

الخلاصة

أظهرت الدراسة بأن مولاس قصب السكر بتركيز ١٢ و ١٨ % سكريات كلية وسط تخمر مناسب لإنتاج حامض اللاكتيك الخام عند استخدام عزلة محلية من بكتريا *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* في درجة حرارة ٤٥-٥٠ م° ودالة حامضية ٦,٠ بعد ٧٢ - ٩٦ ساعة من الحضن وجد أن كمية حامض اللاكتيك المنتجة هي ٦,٤٥-٩,٥٨ غم/١٠٠ مل وسط تخمر وبكفاءة تحويل ٦٩,٠١-٧٠,٨٠ % بعد ٧٢-٩٦ ساعة من التخمير في درجة حرارة٤٥ م° و٦,٩٩-١٠,١١ غم/١٠٠ مل وسط تخمير وبكفاءة تحويل ٧١,٠-٧٢,٧٨% بعد ٦٦-٩٠ ساعة في درجة حرارة ٥٠م°.

المقدمة

حامض اللاكتيك (٢ – ألفا هيدروكسي حامض البروبيونيك) حامض عضوي $CH_3CHOHCOOH$ ، له مجموعة ألفا – هيدروكسيل واحدة وذرة كاربون غير متناظرة asymmetrical carbon atom واحدة، وللحامض نظيران ضوئيان هما L (+) Lactic acid و D(-) Lactic acid بالإضافة إلى الصيغة غير النشطة وعادة ما يكون الحامض التجاري غير النشط ضوئيا inactive optically (٤، ١١). تعتمد الصفات الفيزياوية للحامض على نوع النظير الضوئي وبصورة عامة الحامض عديم اللون والرائحة، سائل ثقيل قابل للامتزاج بالماء والكحول و الايثر ولا يذوب في الكلوروفورم وهو حامض ضعيف التفكك ($K=1.38x10^{-4}$) ، وزنه النوعي (1.249(15C°/4C°))، قليل التطاير ، لا يتبلور من المحلول كالأحماض الأخرى ،غالبية أملاحه قابلة للذوبان في الماء وقابل للبلمرة (١٤ ، ١٣). حامض اللاكتيك أول منتوج كيميائي تقني حياتي ادخل ضمن مواصفات FDA وGRAS للمضافات الغذائية لأغراض متنوعة وبطرائق مختلفة فهو يستخدم في معلبات الزيتون الاسبانية لمنع التلوث وتدعيم التخمير ، يضاف لزيادة ثباتية مساحيق البيض المجفف ، يحسن مذاق العديد من المخللات عند إضافته مع الخل ، يضاف لتحميض عصائر الفاكهة في صناعة النبيذ ، يضفي مذاق لكعكة الحليب لحلوى الفاكهة المجمدة (السكاكر) بدون أن

تطغي على النكهات الطبيعية الأخرى ، يدخل في صناعة الحبوب و المعجنات ويدخل في صناعة بعض أنواع المستحلبات الداخلة في المعجنات (١١،٧،٢١). كما يدخل في تصنيع منتجات لحوم الأبقار والدواجن والسالمون المدخن هذا فضلاً عن استخدامه مادة حافظة في التصنيع الغذائي ويثبط نمو الأحياء المجهرية ويطيل العمر الخزني للأغذية ولكونه حامض عضوي أمين فهو يستخدم في تصنيع مستحضرات التجميل ومزيلات القشور(٨) وللحامض استخدامات طبية وصيدلانية فهو مصدر للاستهلاك اليومي من الكالسيوم و مخثرات الدم (١٨) . يمكن استخدام بكتريا حامض اللاكتيك في تحضير العديد من الأغذية والمنتجات الغذائية كتصنيع منتجات الألبان واللحوم والفواكه والخضروات و المخللات والنبيذ وغيرها. يضاف الى ذلك الاستخدامات التقنية الحديثة للبكتريا في العديد من المجالات كإنتاج الدكسترون والنيسين وتستخدم أنواع عديدة من بكتريا حامض اللاكتيك في الإنتاج التجاري في بعض الحوامض العضوية مثل حامض ألخليك والبوربيونيك والستريك اللاكتيك (٢،١٠).إن الغاية من هذه الدراسة تحويل مولاس قصب السكر والذي ينتج بكميات كبيرة في صناعة السكر والذي لا يتم الاستفادة منه الى مادة حامض اللاكتيك ذات القيمة الاقتصادية العالية باستخدام عزلة محلية مشخصة من بكتريا حامض اللاكتيك *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* .

مواد وطرائق العمل

المواد:

١- مولاس قصب السكر Sugar cane molasses من الشركة العامة لصناعة السكر (ميسان).

٢- عزلة محلية من بكتريا *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* تم تشخيصها في مختبرات قسم الصناعات الغذائية والألبان / كلية الزراعة – جامعة البصرة. و School of Food Biosciences بجامعة Reading البريطانية للتشخيص بطريقة 16 S rRNA من قبل Prof. Dr. Richard K. Robinson.

٣- أ- الأوساط الزرعية : حضرت حسب مواصفات الشركة المجهزة (Oxoid,UK) وشملت Rogosa agar ، MRS agar ، MRS broth ، Skim milk broth .

ب- المواد الكيميائية من النوع النقي التحليلي : سكريات (BDH) ، HCl (BHD) ، NaOH (BDH) ، حامض اللاكتيك (BDH) ، حامض الكبريتيك (Fluka) .

طرائق العمل

قدرت النسب المؤية لمكونات المولاس في مختبرات الشركة العامة لصناعة السكر / ميسان وقدرت النسبة المؤية للسكريات الكلية طبقا لما ورد في (٩) وحضر اللقاح كما ورد في (١٥) مع إجراء بعض التغيير، إذ تم تلقيح المولاس(١٢-١٨%) سكريات كلية المعقم بنسبة ٥% من العزلة النقية المنشطة مسبقا على MRS السائل و المحضنة بدرجة حرارة ٤٥م° لمدة ١٦-١٨ ساعة ثم الحضن بدرجة حرارة ٤٥م° لمدة ١٦-١٨ ساعة. اتبعت الطرائق الواردة في (١٢،١٣،٦) لإنتاج حامض الاكتيك من مولاس قصب السكر المخفف إلى تركيز ١٢-١٨% وذلك بتلقيح ١٠ مل من وسط التخمير Fermentation medium الموجود في دورق مخروطي سعة ٢٥٠ مل بنسبة ٥% من اللقاح بالتحضين في ظروف تهوية قليلة microphilic بدرجة حرارة ٤٥-٥٠ م° باستخدام حاضنة لاهوائية جهزت بـ ٥% ثاني أوكسيد الكاربون و ١٠% نيتروجين بعد تفريغها من الأوكسجين بواسطة مخلخلة ضغط ورقم هيدروجيني ٦,٠ لمدة ٣-٤ أيام مع تعديل الرقم الهيدروجيني كلما دعت الحاجة لذلك بإضافة كربونات الكالسيوم المعقمة وحتى انتهاء التخمير.أضيفت كمية إضافية من كربونات الكالسيوم لتثبيت الرقم الهيدروجيني عند pH ١٠ ثم تفصل المواد العالقة والخلايا البكتيرية بعملية الطرد المركزي (٥٠٠٠ دورة/١٠-١٥ دقيقة) وقصر لون السائل الناتج بإضافة الفحم الحيواني char cool بعدها ركز الراشح باستخدام المبخر الدوار Rotary evaporator من نوع Swiss / Rotavapor Büchl 011 RE-111 بمعدل (٦ دورة/ دقيقة) بدرجة حرارة ٥٠ م° حتى الحصول على تركيز ٢٥% مواد صلبة كلية ، استخلص حامض اللاكتيك من لاكتات الكالسيوم بإضافة حامض الكبريتيك المركز(٠,١ ع). تم قياس تركيز حامض اللاكتيك الخام الناتج طبق لما ورد في (٢٢) في حين استخدمت طريقة كروماتوكرافيا الصفائح الرقيقة TLC لقياس نقاوة الحامض كما ورد في (١٩) وحسبت النسبة المؤية لكفاءة التحويل طبق لما ورد في (١٧). وباستخدام المعادلة:

$$\text{كفاءة التحويل (\%)} = \frac{\text{كمية حامض اللاكتيك}}{\text{كمية السكر الكلية}} \times ١٠٠$$

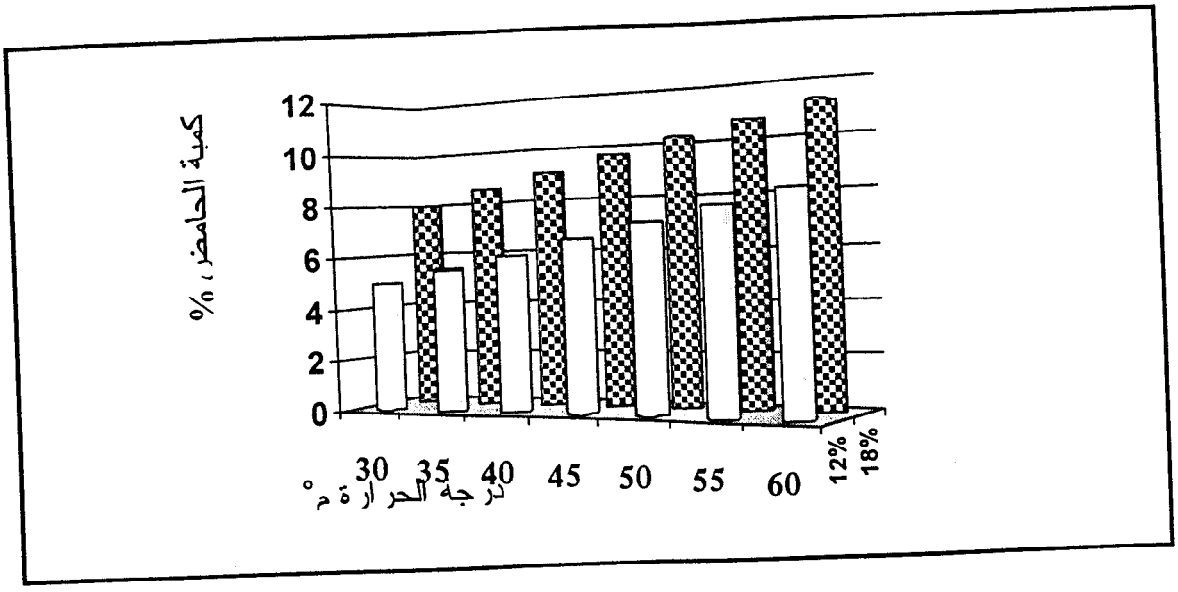
النتائج والمناقشة

يلاحظ من الجدول رقم (١) الذي يوضح التركيب الكيمياوي لمولاس قصب السكر والذي يحتوي على كمية كبيرة من السكريات الكلية ٦٥% وكمية جيدة من المواد النتروجينية ١٠% إضافة إلى نسب مختلفة من العناصر الضرورية لعملية النمو منها الكلوريد، الكالسيوم، الصوديوم، المغنيسيوم، البوتاسيوم، الفسفور وغيرها (٣، ١). علماً ان التحليل قد تم في مختبرات الشركة العامة لصناعة السكر – ميسان.

الجدول رقم (١) التركيب الكيمياوي لمولاس قصب السكر

المكونات	سكريات كلية	سكروز	كلوكوز فركتوز	المركبات النيتروجينية	المركبات غير النيتروجينية	SiO_2	K_2O	CaO	MgO	P_2O_2	Cl_2	Al_2O_3	SO_4
%	٦٥,٠	٣٤,٠	٣٠,٥	١٠,٠	٨,٠	٠,٥	٣,٥	١,٥	٠,١	٠,٢	٠,٤	٠,٢	١,٦

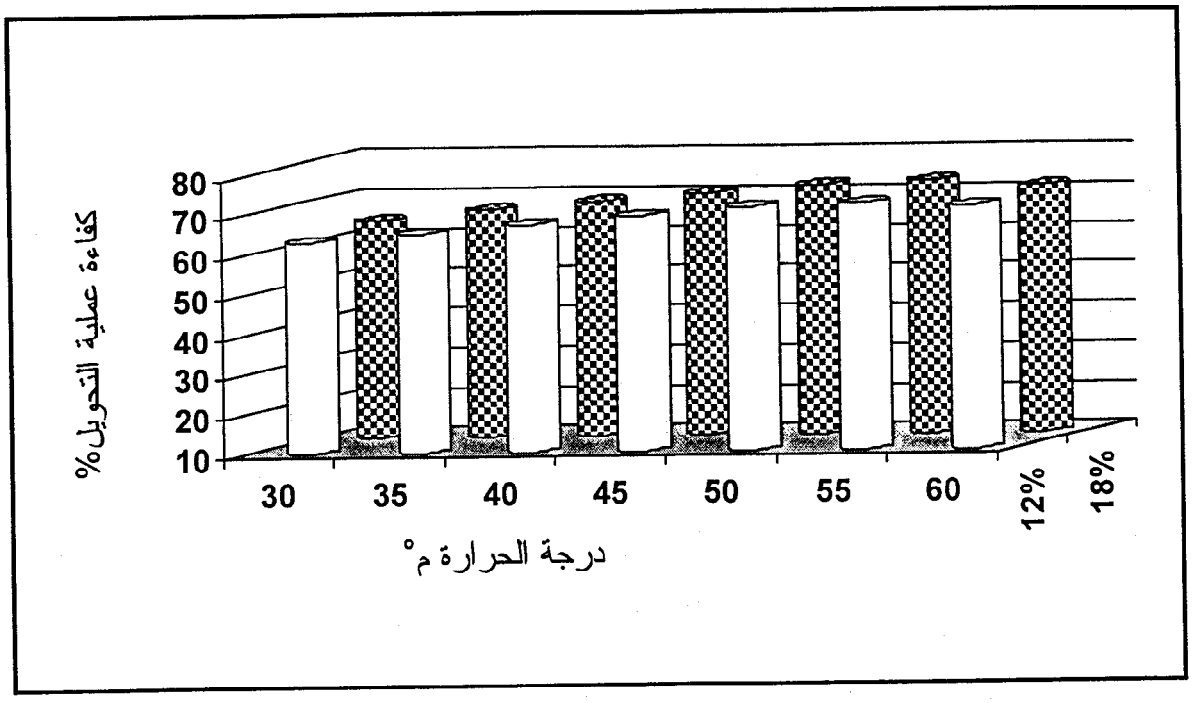
استخدم المولاس كوسط للتخمير بعد تخفيفه بالماء للحصول على تركيز ١٢-١٨% بعد إجراء العديد من التجارب الأولية لتثبيت الظروف المثالية لعملية التخمير و التي شملت تركيز مواد التفاعل (السكريات) ، درجة الحرارة و الدالة الحامضية للحصول على أفضل كفاءة تحويل لإنتاج حامض اللاكتيك خلال فترة تخمير مناسبة (٧٢-٩٦ ساعة) باستخدام عزلة محلية من بكتريا *Lactobacillus delbrueckii subsp. blgaricus* التي تستطيع تخمير الوسط المحتوي على تركيز (١٢-١٨%) سكر خلال٧٢-٩٦ ساعة عند درجة حرارة ٤٥-٥٠ م° و دالة حامضية ٦,٠ وهذا اتفق مع ما ذكره (١٦، ٥، ١٣). بين الشكل رقم (١) تأثير درجة حرارة التخمير على كمية حامض اللاكتيك الناتجة (غم/ ١٠٠ مل وسط تخمير) حصول زيادة في كمية الحامض الناتج بارتفاع درجة الحرارة كما حصلت زيادة في النسبة المؤية لكفاءة التحويل عند ارتفاع درجة حرارة الحضن.



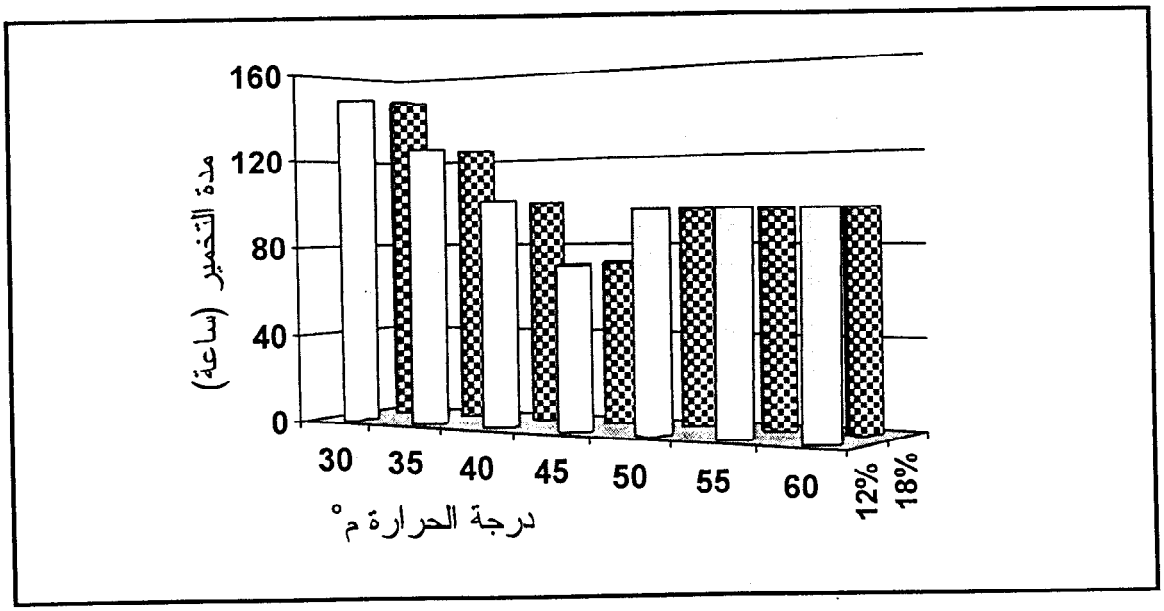
الشكل رقم (١) تأثير درجة حرارة التخمير على كمية حامض اللاكتيك الناتجة (غم/ ١٠٠ مل وسط تخمير)

لوحظ من الشكل رقم (٢) تأثير درجة الحرارة على كفاءة عملية التحويل ، إلا إن أفضل كمية لحامض اللاكتيك ٦,٤٥-٦,٩٩ غم/١٠٠مل وسط تخمير بكفاءة تحويل ٦٩,٠١-٧١,٠٠% عند درجة حرارة ٤٥-٥٠ م°وتركيز مادة تفاعل ١٢% و ٩,٥٨-١٠,١١ غم/١٠٠مل وسط تخمير بكفاءة تحويل ٧٠,٨١-٧٢,٧٨% عند درجة حرارة ٤٥-٥٠ م°عندما يكون تركيز مادة تفاعل ١٨% ، ولوحظ انخفاض درجة الحرارة عن ٤٠ م° لان ذلك يؤدي الى طول فترة التخمير كما يلاحظ ذلك من الشكل رقم (٣) الذي وضح تأثير درجة الحرارة على فترة التخمير كما وقد روعي أن لا تزيد درجة الحرارة عن ٥٥ م° لان ذلك يؤدي إلى هلاك بعض البكتريا، إذ ينخفض معدل نمو بكتريا *Lactobacillus delbrueckii subsp. blgaricus* كلما ارتفعت درجة الحرارة ولغاية ٦٥ م°(٢٠). وبينت نتائج الدراسة بان المولاس بتركيز ١٢ و ١٨% وسط تخمير مناسب لإنتاج حامض اللاكتيك الخام (والذي يستخدم في المجالات الصناعية كدباغة الجلود والصناعات الغذائية والنسيجية والصناعات الطبية والصيدلانية وغيرها) باستخدام بكتريا *Lactobacillus delbrueckii subsp. blgaricus* لاحتوائه على نسبة مرتفعة من مادة التفاعل (السكريات) والمركبات النيتروجينية وغير النيتروجينية إضافة لاحتوائه على العديد من الفيتامينات والأملاح الضرورية لنمو البكتيريا مثل Riboflavin ، Pantothenic acid ، Niacin وكميات معتدلة من الـ Biotion ومركبات الفسفور العضوية وأملاح الكالسيوم والمغنيسيوم المعروفة بالفايتين والحديد (٥ ،١٣) ولا ينصح بزيادة التراكيز لصعوبة استخلاص حامض اللاكتيك من وسط التخمير بسبب زيادة لزوجة الوسط وصعوبة قصر لون سائل التخمير ويوصى بإجراء دراسة للحصول على ناتج جيد من حامض

اللاكتيك وتقصير فترة التخمير بإضافة المغذيات المعجلة والمساعدة لعملية التخمير وخاصة المغذيات النيتروجينية.



الشكل رقم (٢) تأثير درجة الحرارة على كفاءة عملية التحويل



الشكل رقم (٣) تأثير درجة الحرارة على فترة التخمير

١- الحكيم، مؤيد محمد و وركاء طعمة سلوم و باسم مدلول الفتلاوي.(٢٠٠١). طريقة جديدة لتنقية المولاس وإنتاج السكر السائل. المجلة العلمية لمنظمة الطاقة الذرية العراقية،المجلد ٣، العدد ١ ،ص ٥٧-٦١.

٢- الغزي، كاظمية والي منصور (٢٠٠٣).تشخيص عزلة محلية من بكتريا *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* واستخدامها لانتاج حامض اللاكتيك من مصادر متجددة. رسالة دكتوراه ــ كلية الزراعة ــ جامعة البصرة.

٣- هيئة المواصفات القياسية (٢٠٠٠). المولاس molasses. مسودة المواصفة القياسية رقم ٣٦٩٢.

4- Benthin, S and Villadsen, J.(1995).Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* by D(-) and L(+) lactic acid effect on lag phase, growth rate and cell yield.Appl. Bacteriol. ,78: 647-654.

5- Casida, L.E.(1968). Industrial microbiology. John Wiley and Sons, INC. New York, London, Sydney, PP: 304-314.

6- Crueger, W.; Cruege, A. and Brokck, T.D. (1990). Biotechnology: A textbook of industrial microbiology. 2nd. ed. Science Tech publishers Madison, Wisconsin, PP:147.

7- Dailey, Jr. O.D.; Dowd, M.K. and Mayorga, J.C. (2000). Influence of lactic acid on the solubilization of protein during corn steeping. J.Agric. Food Chem.m48:1352-1357.

8- Datta, R.; Tsai, S.P.; Bonsigonre, P.; Moon, S.H. and Frank, J.R(1995).Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. FEMS Microbiol. Rev.,16:221-231.

9- Dubois, M.; Gilles, K.A. ;Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. and Smith, F.(1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28:350-356.

10- Haddadin, M.S. ; Al-Muhirat, S.R. ; Batayneh, N and Robinson, R.K. (1996). Production of acetic and propionic acids from labneh whey by fermentation with propionibacteria. J. of the Society of Dairy Technol., 49(3):79-81.

11- Houtman, P.K.E. (2002). L-Lactic acidic in acid cleaners a versatile ingredient. Sonderdruck aus SOFW-J., 125:2-4.

12- Inskeep, G.C. ; Taylor, G.G. and Breitzke, W.C. (1952). Lactic acid from corn sugar. Ind. Eng. Chem., 44: 1955-1966.

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

14- Peckham, G.T. (1944). The commercial manufacture of lactic acid. Chem. Eng. News, 22:440-443.

15- Pelczar, M.J. and Reid, R.D. (1965). Microbiology. McGraw-Hill Book Company. New York.

16- Prescott, S.C. and Dunn, C.G. (1959). Industrial microbiology. 3rd. ed. McGraw-Hallbook Company. New York. PP.: 304-331.
17- Rose, A.H. (1976). Chemical microbiology: An introduction to microbial physiology, 3rd . ed. Butter worths. London. PP:469.
18- Siebold, M. ; Frieling, P.V. ; Joppien, R.; Rindfleisch, D.; Schügerl, K. and Röper, H.(1995). Comparison of the production of lactic acid by three different Lacrobacilli and its recovery by extraction and electrrodialysis. Process Biochem., 30(1): 81-95.
19- Stahle, E. (1969). Thin layer chromatography. Springer, Berlin, New York.
20- Teixeria , P.; Castro, H. ; Mohâcsi-Farkas, C. and Kirby, R. (1997). Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. J. of Apll. Microbiol., 83: 219-226.
21- Teixeria, P.(1999).Lactobacillus bulgaricus Escola Superior de Biotechnologia,85:1136-1143.
22- Vasilisin, S.V. and Khramt sova, R.F. (1975). Determination of lactic acid in whey as lactates. Vcesoyuzyi Nauchno-issledovatel; Skii Inst. Moslodel noi I Syrodel noi promyshlennosti, 76(20): 44-49.

PRODUCTION OF LACTIC ACID FROM SUGAR CANE MOLASSES BY LOCAL STRAIN OF *LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS*

Kadhmia W. M. Al - Chezzy ; Asaad M.R. Al-Taee ; Luma J.M. Al-Amber

Marine Science Center - Dept. Marine Chemistry - Basra University

SUMMRAY

This study revealed that sugar molasses was suitable media at concentrations of 12 and 18% to produce lactic acid by a local strain of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* at 45-50 C°, pH 6.0, and 72-96 h. of incubation. The amount of lactic acid was found 6.45-9.58 gm/ 100ml and the transferring efficiency was 69.01% - 70.81% after 72-96h of fermentation at 45C° and 6.99 – 10.11 gm/ 100ml and transferring efficiency was 71.0% - 72.78% after 66-90h. at 50C° of incubation.