● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ هفتم، شمارهٔ ۴، ص ۲۰۵ـ۲۰۰، ۱۳۷۹

مقالهٔ پژوهشی

تولید و جداسازی اسیدلاکتیک نوع ال (+) از پساب صنایع پنیرسازی

سید احمد عطایی[۱]

خلاصه

آب پنیر با شاخص آلودگی زیاد (حدود ۵۰ هزار PPM) از آلاینده‌های خطرناک محیط زیست به شمار می‌رود. این منبع مهم و غنی از لاکتوز (با حدود ۴ تا ۵ درصد لاکتوز) به عنوان سوبسترای مفیدی در تهیه بسیاری از مواد با ارزش به کار می‌رود. اسیدلاکتیک یکی از این مواد است که کاربردهای زیادی در صنایع مختلف دارد. خصوصاً ایزومر ال (+) این اسید با قیمتی در حدود ۱۰ برابر نسبت به مخلوط ال (L) و دی (D)، برای بسیاری از مقاصد پزشکی مثل نخ‌های جراحی قابل جذب در بدن و یا پوشش داروهایی با رهایش کنترل شده مورد استفاده قرار می‌گیرد. لاکتوباسیل‌ها عمدتاً مخلوط (ال) و (دی) این اسید را تولید می‌کنند. در این تحقیق لاکتوباسیلوس کازیی که فقط تولید ایزومر ال (+) را می‌کند مورد استفاده قرار گرفت. یکی از مشکلات اساسی در تولید صنعتی اسیدلاکتیک از محیط تخمیری، این است که اسید تولید شده در غلظت‌های بالا، اثر سوء بر میکروارگانیسم‌ها داشته و تولید اسید را متوقف می‌کند. به طوری که فقط حدود نیمی از لاکتوز موجود در آب پنیر، به اسیدلاکتیک تبدیل می‌شود. بنابراین برای بالا بردن راندمان عمل بایستی اسید تولید شده، همزمان با فرایند تخمیر از محیط عمل جدا شده و غلظت اسید در محیط از مقدار مشخصی زیادتر نشود. در این تحقیق برای حفظ حالت استریلیته محیط تخمیری، از فرایند جداسازی درجا توسط رزین‌های تبادل یونی تحت کنترل اتوماتیک pH استفاده شد. در مقایسه‌ای که بین فرایند بدون جداسازی با فرایند همراه با جداسازی درجا انجام گرفت، مقدار اسید تولید شده از ۲۲ گرم بر لیتر به ۴۳/۷ گرم بر لیتر افزایش یافت. خلوص محصول با استفاده از پلاریمتر به اثبات رسید.

واژه‌های کلیدی: آب پنیر، اسید لاکتیک ال (+)، لاکتوباسیلوس کازیی، جداسازی درجا

۱ـ مربی گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی کرمان

مقدمه

توسعه روزافزون کارخانه‌های پنیرسازی با توجه به رشد جمعیت و تأمین پروتئین مورد نیاز بشر، سبب شده است تا مقادیر قابل توجهی آب پنیر (Whey) به سیستم فاضلاب وارد شده و مشکلات زیادی را ایجاد کند. عدم وجود تکنیک‌های اقتصادی جهت کاهش آلودگی (BOD) زیاد (حدود ۵۰ هزار PPM) حاصل از پساب این کارخانه‌ها، که مستلزم صد برابر کاهش BOD برای ورود به سیستم فاضلاب می‌باشد، موجب بروز مشکلاتی در زمینه کنترل آلودگی محیط زیست گردیده است. بنابراین ارائه روش‌هایی برای تصفیه این گونه پساب‌ها، خصوصاً این که در جهت تولید محصولات با ارزش دیگری نیز باشد، هم به لحاظ اقتصادی و هم از لحاظ مسایل زیست محیطی حائز اهمیت است (۴،۱۰).

آب پنیر با حدود ۵ درصد لاکتوز سوبسترای مناسبی برای تهیه اسیدلاکتیک به شمار می‌رود. این محصول که نتیجه تخمیر لاکتوز موجود در آب پنیر است، امروزه به عنوان ماده بسیار مهمی با کاربرد وسیع در صنایع متفاوت از جمله پزشکی (تهیه نخ‌های جراحی قابل جذب در بدن)، دارویی (پایه اصلی در داروهایی با آزادسازی کنترل شده)، غذایی (تهیه نوشابه‌های گازدار و ماده‌ای برای جلوگیری از فساد مواد غذایی و ...) مورد توجه قرار گرفته است (۱،۳،۶،۸،۱۲).

در ایران تنها کارخانه‌ای که از آب پنیر استفاده می‌کند، کارخانه شیر پاستوریزه است که با صرف هزینه زیاد آن را به پودر پنیر تبدیل می‌کند و به گفته صاحبان کارخانه، مخارج بسیار زیادی برای راه‌اندازی و نگهداری این واحد صرف می‌شود. سایر واحدهای تولید پنیر در کشور، آب پنیر را به سیستم فاضلاب وارد و یا آن را در چاهها دفع کرده که مشکلاتی را در سیستم فاضلاب و آب‌های زیرزمینی به بار می‌آورد.

لاکتوباسیل‌های موجود در محیط کشت آب پنیر، مخلوط (ال) و (دی) از این اسید را تولید می‌کنند. در سایر کشورها با استفاده از کشت همراه، مخلوط دی (-) و ال (+) این اسید را بدست آورده‌اند. اما لاکتوباسیلوس کازیی فقط ایزومر ال (+) را تولید می‌کند که قیمتی در حدود ۱۰ برابر نسبت به نوع مخلوط آن دارد و برای بسیاری از مقاصد پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲،۶،۹،۱۱).

تولید تخمیری اسیدلاکتیک یک واکنش محدود شونده توسط خود محصول است و بالا رفتن غلظت اسید در محیط تخمیر، اثر بازدارندگی بر رشد میکروارگانیسم‌های تولید کننده اسیدلاکتیک دارد. روش استخراج حلال از جمله روش‌هایی است که برای جداسازی اسید از آن استفاده می‌شود، اما به دلیل به هم زدن حالت استریلیته محیط کشت چندان موفق نبوده است (۵،۷،۱۰،۱۲).

در این پژوهش با استفاده از رزین‌های تبادل یونی، امکان جداسازی در جای (In-situe) اسید مورد نظر با ثابت نگه داشتن اتوماتیک pH در محدوده بهینه نیز در نظر گرفته شده است که ضمن استخراج اسید از محیط در حین عمل تخمیر، حالت استریلیته محیط نیز حفظ شده و راندمان تولید اسید حدود ۶۰ درصد افزایش می‌یابد. با مصرف لاکتوز موجود در آب پنیر، آلودگی فاضلاب کارخانه‌های پنیرسازی به مقدار زیادی کاهش می‌یابد.

مواد و روش‌ها

الف) میکروارگانیسم و محیط پیش کشت

میکروارگانیسم مورد استفاده لاکتوباسیلوس کازئی با شماره PTCC 1293 از انستیتو رازی تهیه شده بود. محیط پیش کشت به نام Media of Rogosa and Sharpe (MRS) حاوی پپتون ۱۰ گرم، عصاره گوشت ۵ گرم، عصاره مخمر ۵ گرم، گلوکز ۲۰ گرم، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۲ گرم، توین ۸۰ یک گرم، دی‌آمونیم هیدروژن سیترات ۲ گرم، استات سدیم ۵ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۵ گرم و سولفات منیزیم ۰/۱ گرم در لیتر که همگی از کمپانی مرک آلمان می‌باشند تهیه شد (۲). به یک صد میلی‌لیتر از محیط پیش کشت فوق یک لوپ از میکروارگانیسم مورد نظر تلقیح و پس از یک روز نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد توده سلولی به ۱/۸ گرم بر لیتر رسید.

ب) محیط پایه تخمیر

محیط پایه تخمیری آب پنیر تهیه شده از کارخانه شیر پاستوریزه کرمان بود. مقدار لاکتوز اولیه موجود در آن حدود ۴۴ گرم در لیتر بود که به عنوان سوبسترای اصلی مورد مصرف میکروارگانیسم قرار می‌گیرد. آب پنیر به علت دارا بودن ویتامین‌ها و مواد معدنی موجود در شیر اولیه، از جمله محیط‌های غنی برای رشد باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک به شمار می‌رود (۳).

ج) تخمیر کننده و متعلقات

تخمیر کننده یک بالن ۱/۵ لیتری گرد شیشه‌ای خود ساخته است که مجهز به ۵ ورودی و ۲ خروجی می‌باشد به منظور هم زدن محلول، یک مغناطیس داخل آن گذاشته شده و همچنین یک

فیلتر جهت صاف کردن محلول ورودی به ستون درون آن تعبیه شد. به دلیل این که میکروارگانیسم در شرایط کمبود اکسیژن فعالیت بیشتری از خود نشان می‌دهد (خاصیت میکروآیروفیلی)، فضای بالای فرمنتور توسط گاز ازت اشباع شد.

د) ستون‌های تبادل یونی

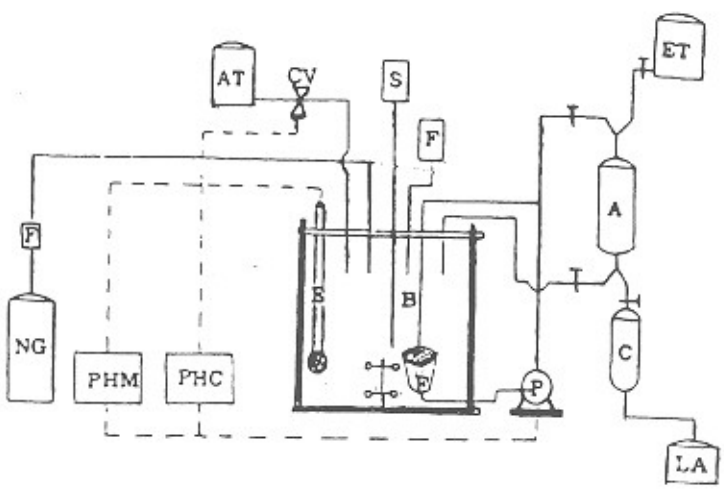
به منظور جداسازی اسیدلاکتیک از محیط تخمیر، از رزین آمبرلیت (IRA-400,CL ساخت Rohmand Haas, USA) استفاده شد. ابتدا رزین توسط سود ۲/۵ نرمال به صورت هیدروکسید درآمده و پس از آن با عبور محیط تخمیری از درون ستون، یون‌های لاکتات جایگزین یون‌های هیدروکسید شده و عملیات جداسازی آغاز گردید. پس از اشباع ستون، عمل احیاء (Elution) توسط سود ۱/۵ نرمال صورت گرفته و نمک اسیدلاکتیک به صورت لاکتات سدیم از انتهای ستون خارج شده و وارد ستون دوم که محتوی رزین آمبرلیت ($IR-120, H^+$)است، می‌شود و با جایگزینی یون‌های سدیم با هیدروژن، اسیدلاکتیک به صورت خالص از انتهای ستون دوم به دست می‌آید. ستون دوم با اسیدکلریدریک ۱/۵ نرمال احیاء می‌شود (۱۲).

ه) آنزیم پروتئاز

برای تهیه آنزیم پروتئاز به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط Nutrient broth (آبگوشت مغذی) ساخت کمپانی مرک آلمان (۲)، یک لوپ از باکتری باسیلوس سوبتلیس تهیه شده از انستیتو رازی (PTCC 1204) تلقیح گردید و به مدت یک روز در دمای ۳۰°C با دور همزن ۲۵۰ rpm نگهداری شد. در این مدت توده سلولی به ۲/۴ گرم بر لیتر رسیده و آنزیم پروتئاز تولید شده در این محیط، در مرحله بعدی جهت هیدرولیز پروتئین‌های محلول آب پنیر مورد استفاده قرار گرفت (۱۳).

و) روش کار

یک لیتر آب پنیر با تبرگی حدود ۵۰ هزار PPM را درون فرمنتور ۱/۵ لیتری با حجم کاری یک لیتر ریخته، pH را توسط سود یک نرمال به ۵/۲ می‌رسانیم، ۱۰ درصد حجمی از محیط آنزیمی تولید شده در قسمت (ه) را به آن می‌افزاییم و محتوی فرمنتور را در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت روی همزن با سرعت ۳۰۰rpm قرار داده تا پروتئین‌های آب پنیر به مقدار قابل ملاحظه‌ای هیدرولیز شوند. پس از آن محتوی فرمنتور را در ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو کرده و پس از سرد شدن، توسط ۱۰ درصد حجمی از محیط کشت باکتری لاکتوباسیلوس کازئی که میزان تولید سلولی آن به ۱/۸ گرم بر لیتر رسیده، تلقیح می‌کنیم.



A: ستون تبادل کننده آنیون
B: بیوراکتور
C: ستون تبادل کننده کاتیون
P: پمپ
F: فیلتر
S: محل نمونه‌گیری
AT: محفظه قلیا
ET: محفظه محلول elution
LA: محفظه جمع آوری اسید لاکتیک
NG: کپسول گاز ازت
CV: شیر کنترل
PHM: pH متر
PHC: دستگاه کنترل
E: الکترود متر

شکل ۱ : دستگاه‌ها و تخمیرکننده مورد استفاده در تخمیر همراه با جداسازی

فرمنتور را پس از متصل کردن به متعلقات و ستون‌های تبادل یونی در دمای ۳۷C قرار می‌دهیم. دستگاه کنترل pH به pH متر و خروجی آن به شیر کنترل برقی (control valve) که به انتهای مخزن سود وصل شده است، متصل می‌باشد و به محض اینکه pH به ۵/۹ می‌رسد، به شیر، فرمان باز کردن مجرای خروجی سود را می‌دهد و سود قطره قطره به محیط تخمیر افزوده می‌شود تا اینکه pH به ۶/۱ برسد. در این صورت مجرای خروجی سود قطع می‌شود، بنابراین pH در محدوده ۰/۱±۶ ثابت می‌ماند.

پس از اتمام این دوره، غلظت فرم یونی لاکتات به اسیدلاکتیک در محیط حدود ۱۰۰ برابر است و ستون آمادگی جذب یون‌های لاکتات را دارد.

از طرف دیگر دستگاه کنترل pH، با پمپی که محیط تخمیر را درون ستون مبادله کننده آنیون (IRA-400) وارد می‌کند مرتبط بوده است و همزمان با عمل تخمیر و با کاهش pH، پمپ روشن شده و پس از جداسازی یون‌های لاکتات، مابقی مایع تخمیری خارج شده از انتهای ستون، وارد فرمنتور شده و pH را در محدودهٔ ۶/۱-۵/۹ ثابت نگه می‌دارد و پس از کامل شدن عمل تخمیر (حدود ۳۸ ساعت)، ارتباط ستون با فرمنتور قطع می‌شود و با احیاء رزین (Elution) توسط سود ۱/۵ نرمال، لاکتات سدیم از انتهای ستون اول خارج و وارد ستون دوم (مبادله کننده کاتیون IR-120) می‌شود و اسیدلاکتیک به صورت خالص از انتهای ستون دوم به دست می‌آید (شکل ۱).

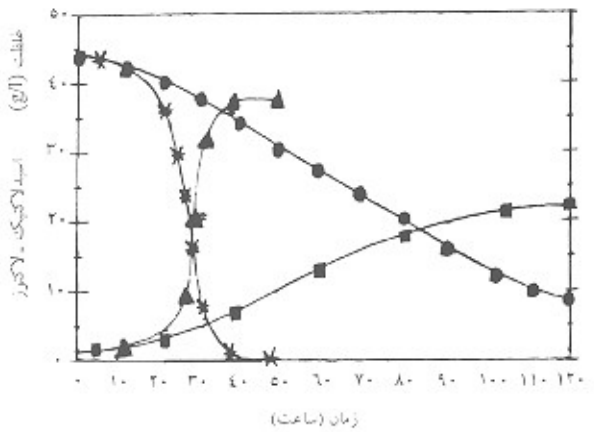
میزان لاکتوز توسط روش استاندارد سوموگی ـ نلسون (somogi-nelson) با اندازه گیری جذب محلول رنگی در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد (۱۰).

نتایج

میزان اسیدلاکتیک تولید شده توسط دستگاه کروماتوگراف با کارآیی بالا (HPLC) اندازه گیری شد (نوع ستون ODS, PLO، ساخت Waters associates, USA، حلال مخلوط آب ـ متانول با نسبت‌های مساوی و شدت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه با آشکار ساز UV در طول موج ۲۷۵ نانومتر) نتایج حاصل از دستگاه HPCL مقدار اسید به دست آمده را پس از گذشت ۳۸ ساعت از شروع تخمیر، ۳۷/۴ گرم بر لیتر نشان داد.

نوع ایزومر اسید با خواندن میزان چرخش نوری توسط دستگاه پلاریمتر انجام گرفت. به طوری که چرخش ویژه اسید تولید شده ۲/۶+ بود که مربوط به نوع (+) L می‌باشد (۹).

اثر فرایند تخمیر همراه با جداسازی بر روی تولید اسیدلاکتیک در نمودار ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند که ۳۸ ساعت پس از شروع تلقیح، ۹۹/۳ درصد از لاکتوز به مصرف رسیده و مقدار اسید تولید شده ۳۷/۴ گرم بر لیتر بود.



نمودار ۱: مقایسه مقدار اسید لاکتیک تولید شده و لاکتوز باقیمانده در فرایند تخمیر بدون جداسازی با فرایند همراه با جداسازی

■ مقدار اسید در فرایند بدون جداسازی ▲ مقدار اسید در فرایند همراه با جداسازی
● مقدار لاکتوز در فرایند بدون جداسازی * مقدار لاکتوز در فرایند همراه با جداسازی

بحث و نتیجه گیری

آزمایشات پلاریمتری نشان داد که لاکتوباسیلوس کازئی، ایزومر خالص اسیدلاکتیک ال (+) را تولید می‌کند.

چنانچه در نمودار ۱ مشهود است، در فرایند تخمیر بدون جداسازی، با شرایط مشابه پس از ۳۸ ساعت، مقدار اسید تولید شده تنها ۶ گرم بر لیتر بود به طوری که در مدت‌زمان ۵ روز این مقدار به ۲۲ گرم در لیتر رسید که حداکثر تولید آن در این فرایند است. اما در فرایند تولید و جداسازی همزمان توسط رزین‌های تبادل یونی، علاوه بر کاهش زمان تخمیر از ۵ روز (۱۲۰ ساعت) به ۳۸ ساعت، ۶۰ درصد افزایش در مقدار اسیدلاکتیک تولید شده حاصل شد و مقدار اسید به ۳۷/۴ گرم در لیتر رسید. بدین ترتیب بهره‌وری سیستم از ۰/۱۸۳ گرم در لیتر در ساعت به ۰/۹۸۴ گرم بر لیتر در ساعت افزایش یافت مضافاً به اینکه در فرایند تخمیر همراه با جداسازی اسید، مقدار آلودگی فاضلاب به نحو چشمگیری کاهش یافت به طوری که اندازه گیری میزان COD (Chemical oxygen demand) پساب، حدود ۶۵ درصد کاهش آلودگی آن را نشان می‌دهد.

بنابراین با استفاده از روش فوق علاوه بر اینکه فاضلاب صنایع پنیرسازی تا حد مطلوبی تصفیه می‌شود و آلودگی آب پنیر کاهش می‌یابد ماده بسیار مهم صنعتی (اسیدلاکتیک نوع ال (+)) نیز تولید می‌شود.

Summary

L (+) Lactic Acid Production and separation from Dairy Wastes (Whey): In Situe Separation of Lactie Acid Using Ion-Exchange Resins in Automatic Control of pH.

SA. Ataie, MS.[1]

1. Instructor of Environmental Health Department, Health School, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran

Whey with a large amount of BOD (50000 PPM) is a dangerous environmental pollutant. This important source of lactose (4-5%) is a usefull substrate for a range of fermentation processes. Lacitic acid with several applications in industries is one of these products. Specially L (+) isomer of this acid worthing 10 times as much as the mixture of L & D, is used in medical purposes such as absorbable surgical filaments and controlled release drugs. Several strains of Lactobacillus produce a mixture of L & D isomers but the strain employed in this research (Lactobacillus casei) produces only L (+) form. The produced lactic acid prevents acid production in fermentation, so that almost half of lactose (about 22 g/L lactic acid) is converted to Lactic acid. Therefore in order to increase the output the produced acid should be separated. In this research Lactobacillus Casei was used to produce L (+) Lactic acid and due to strile conditions requirement in situe separation of acid using Ion-exchange resins at control automatic of pH were employed. At the end, Lactic acid yield in non extractive fermentation compared with extractive process showed an increase from 22g/L to 43.7 g/L. The polarimetric analysis showed pure L (+) product.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2000; 7(4): 200-205

Key Words: *Whey, L (+) Lactic acid, Lactobacillus casei, In-situe separation*

1. Barrera Denise A. Synthesis and characterization of a novel biodegradable polymer. Poly (lactic acid Co lysine). *DAI-B* 1993; 54(6): 3096-3099.
2. Budavari S: The merck index. 12th ed., USA, Merck Co. Inc, 1996; p911.
3. Faith WL: Encyclopedia of chemical technology. Interscience Pub, 1993; pp576-577.
4. Gerald Reed: Biotechnology "Food and production with microorganism." Verlag chemic. 1983.
5. Hatzini Kolaou DG and Wang HY. Extractive fermentation systems for organic acids production. *Can J Chem Eng* 1992; 70: 543-552.
6. Holland SJ. Polymers for biodegradable medical devices. *J controlled release* 1993; 23(3): 209-220.
7. Kulparathipanja SR: Adsorptive separation of organic acid by the sorbe process. Sepn Technol Elsevier Science BV 1994; pp17-23.
8. Lewis D: Biodegradable polymers and drug delivery systems. New York, Derkker 1990; pp203-208.
9. Moazami N: Persian type culture collection (P.T.C.C.). 3rd ed., Iranian Research Organization for Secience & Technology, 1989; p291.

10. Roukas T and Kotzekidou P. Production of lactic acid from deprotonized whey by coimoblized lactobacillus casei and lactocaccus lactic cells. *Enzyme microbiol Technol* 1991; 13(4): 33-38.
11. Sigma. Biochemicals and Reagents for life science Research Molecular Biology. 1988; p657.
12. Srivastava A, Roychoudhurg P and Sahai V. Extractive lactic acid fermentation using Ion-exchange resins. *Biotech & Bioeng* 1992; 39(1): 607-513.
13. Vaccari G, Gonzalez Vara A, Gampi AL, Dosi E and Brigidi P. Fermentative production of L-Lactic acid by lactobacillus casei. *Appl Microbiol Biotecnol* 1993; 40: 23-27.