تولید لاکتیک اسید به روش تثبیت سلولی و تخمیر استخراجی در جا

فهیمه قره خانی،[۱] ناصر قائمی[۲]
سید عباس شجاع الساداتی [۳]

چکیده

در فرآیند تولید لاکتیک اسید به روش تخمیر، اسید تولید شده اثر مهارکنندگی بر سلول ها داشته و از تولید بیشتر اسید جلوگیری می نماید . لذا با به کارگیری تکنیک‌های مختلف از جمله اضافه کردن کربنات کلسیم، سود و تخمیر استخراجی درجا سعی شده از این اثر جلوگیری شود، ترکیب محیط کشت بر میزان محصول دهی * *و راندمان موثر است که محیط سنتزی* p_2 *به علت نیاز میکرو اُرگانیسم مورد استفاده (لاکتوباسیلوس دلبروکی) به مقادیر کم عنصرهایی مانند آهن و منگنز محصول دهی و راندمان بالاتری داشت. با استفاده از سیستم تثبیت سلولی و با تغییر دادن پارامتر هایی مانند نسبت* $\frac{\text{جل}}{\text{محیط}}$*، اندازه مهره و وزن خشک اولیه سلول سعی گردید محصول دهی افزایش یابد . حداکثر محصول دهی (* $3/75 g/L.h$ *) در* $\frac{\text{جل}}{\text{محیط}} = \frac{۲}{۵}$*، اندازه مهره* $۱ \times ۳ \times ۳\ mm$ *و وزن خشک اولیه سلول ۲۴/۴۷ حاصل شد. ماتریسهای مختلف از نظر پایداری ارزیابی شد که با توجه به ترکیب محیط کشت و نوع سویه، ماتریس اگار نسبت به ماتریس سدیم الژینات و الژینیک اسید پایداری بیشتری (۲۰ روز) نشان داد .*

اثر رقیق کننده های مختلف از نظر سمیت کل و سمیت در سطح مولکولی بر روی سویه بررسی شد و معلوم شد که ترکیباتی مانند روغن زیتون، روغن پارافین ودکانول بهترین رقیق کننده ها می باشند، اما حلال های فوق درصد استخراج پائینی را در استخراج لاکتیک اسیدنشان می دهند و رقیق کننده هایی با پلاریته بیشتر درصد استخراج بالاتری را نشان می دهند لذا با انحلال آمین نوع سوم در حلال های فوق درصد استخراج بالا برده شد.دکانول با ۱۵٪ تری اکتیل آمین به عنوان یک رقیق کننده در تخمیر استخراجی در جا

*. Productivity

استفاده شد، چون رقیق کننده فوق سمیت در سطح مولکولی نداشته و درصد استخراج بالایی را نیز دارا می باشد.

بازیافت دوباره لاکتیک اسیدبا اسید کلریدریک و سود انجام شد که با استفاده از سود ۹۹/۲۷۶٪ بازیافت حاصل شد در حالی که با اسید کلریدریک تنها ۶۰٪ لاکتیک اسیدبازیابی گردید.

***واژه های کلیدی**: تخمیر استخراجی ، تولید لاکتیک اسید، تثبیت، لاکتوباسیلوس دلبروکی ، سیستم دو فاز مایع حلال آلی، آب*

مقدمه

اسید لاکتیک یا اسید α - هیدروکسی پروپیونیک اسید یک هیدروکسی اسید آلی است و مصارف زیادی در ارتباط با مواد غذایی، فرمولاسیون داروسازی و صنایع شیمیایی دارد (۱).

Yabannavar و همکارانش (۱۹۹۱) گزارش کردند که در فرایند تولید اسید لاکتیک به وسیله سلولهای تخمیری اسید لاکتیک تولید شده بسته به اینکه به شکل یونی باشد یا به شکل غیر تفکیک شده، اثر مهار کنندگی متفاوتی روی سویه تولید کننده اسید لاکتیک می گذارد و اسید لاکتیک غیر تفکیک شده باعث مهار کنندگی شدیدی می‌شود.[۱] از طرف دیگر اسید تولید شده باعث کاهش pH می شود که لاکتو باسلیوس دلبروکی در pH کمتر از ۴/۲ مهار می شود (۲). لذا سعی شد با تکنیک های مختلف از جمله اضافه کردن پودر کربنات کلسیم، اضافه کردن تدریجی سود ۲/۵ نرمال و تخمیر استخراجی درجا(۱۱) از کاهش pH و اثر مهار کنندگی اسید تولید شده ممانعت به عمل آید و همچنین سعی شد که با بهینه کردن محیط کشت برای میکرو ارگانیسم مورد استفاده و با استفاده از سیستم تثبیت سلولی و با تغییر دادن پارامترهای مختلف در سیستم تثبیت سلولی محصول دهی افزایش پیدا کند، در صورتیکه محدودیت در انتقال جرم سوبسترا و اسید تولید شده میان ماتریس و محیط کشت جزئی باشد.(۳) سیستم تثبیت سلولی دارای محاسن زیر می باشد:

۱- تثبیت سلولی با Load کردن جرم سلولی زیاد و استفاده از سلولها در شکل فعال تر باعث افزایش محصول دهی می شود.(۴ و ۱۳و ۱۴).

۲- در تثبیت سلولی با استفاده از بچ تکرار شده توانایی تولید اسید لاکتیک میکرو ارگانیسم برای مدت زمان بیشتری حفظ می شود.(۳و ۱۳و ۱۴).

۳- در تثبیت سلولی امکان آلودگی به میکروارگانیسم های بیگانه کمتر است (۳ و ۱۳و ۱۴).

۴- در تثبیت سلولی باز یافت محصول تولید شده راحت می باشد (۳و ۱۳و ۱۴).

۵-تثبیت سلولی با حذف سمیت فازی حلال در سیستم تخمیر استخراجی، محیطی مطلوب برای سلولها فـراهـم می کند (۲و۵ ۱۳و ۱۴).

ماتریسی که عموماً برای تثبیت سلول های کامل مورد استفاده قرار می گیرد ژلهای یونوتروپیک مانند آلژینات، آگار، کاراگینان می باشد (۳). مکانیسم اتصال در ماتریس های ژل یونوتروپیک برگشت پذیر است . بنابراین پایداری شبکه ماتریـس به ترکیب یونی محیط اطـرافش وابسته می باشد (۳).

Yabannavar و همکارانش (۱۹۹۱) ، بیان داشتند که محصول دهی افزایش می یابد بدون آنکه بر کارایی استخراج تاثیر بگذارد با استفاده از مهره های کوچک تر، قراردادن جرم سلولی زیاد در مهره ها و گذاشتن مقدار زیادی ژل به فرمنتور (۹و۴و۲).

در توسعه موفق یک پروسه تخمیر استخراجی، احتیاج به انتخاب دقیقی از حلال از جهت غیر سمی بودن و درصد استخراج بالا می باشد(۲و۴و ۵و۸).

Yabanavar و همکارانش از آمین های آلیفاتیک برای استخراج اسید استفاده کرده اند.

استفاده از آمین های آلیفاتیک برای استخراج اسید به خوبی شناخته شده است (۲و۴و۸و۹و۱۰).

رافائل بارو و همکارانش (۱۹۸۶) گزارش کردند که حلال هایی با قطبیت بالا استخراج کننده بهتری نسبت به حلال هایی با قطبیت پایین می باشند (۵و۷) و بخش محلول در آب و غیر قابل اختلاط در آب حلال ها فعالیت میکروبی را به طور متفاوتی تحت تاثیر قرار می دهند (۵ و۶).

اثر بخش غیر قابل اختلاط درآب (سمیت در سطح فازی) را از طریق تثبیت کردن میکرو ارگانیسم در ژل می توانیم تا حـد زیادی کاهـش دهیم (۸و۵و۶). اما بخش محلول در آب (سمیت در سطح مولکولی) می تواند به ماتریکس نفوذ کرده و سلولها را بکشد (۸ و۵). لذا رقیق کننده ای را که سمیت در سطح مولکولی نداشته باشد را انتخاب کرده و با اضافه کـردن آمین نوع سوم، درصـد استخراج را بالا می بریم و حلالیت در آب آمیـن نوع سوم کم بوده لذا اثر سمیت در سطـح مولـکولی آنها در غلظت های پایین جزئی می باشد (۲و۵). لذا در این بررسـی ازمخلـوط (V/V) ۱۵٪ تری اکتیل آمین و دکانول استفاده شد که در نسبت مولی $\frac{\text{آمین}}{\text{اسید}} = ۰/۶۹$ دارای درصد استخراج ۷۸/۱٪ و ضریب توزیع ۳/۵۶ بوده و سمیت در سطـح مولکولی آن جزئی می باشد (۱۰) .

مواد و روش های اندازه گیری:

دستگاه ها و لوازم مورد نیاز :

۱- اتوکلاو ۲- فور الکتریکی ۳- سـانتریفوژ ۴- دستگاه pH متر ۵- انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حاوی ۵٪ CO_2 ۶- اسپکتروفتومتر SHIMATSU uv-vis مدل UV- 1201، هیتر همزن دار .

روش های اندازه گیری :

تهیه کشت مادر (تهیه محیط نگهداری):

L.delbrueckii ptcc به صورت آمپول لیوفیلیزه شده خریداری شد و توسط پی پت پاستور و در شرایط استریل، ۰/۵ میلی لیتر از محیط کشت T.J.B (Tomato.Juice.broth) به آمپول اضافه و قسمتی

از این مخلوط به محیط کشت مایع و باقی مانده به محیط جامد منتقل شـد. کشت ها در دمای ۳۷ °C و درآنکوباتور حاوی ۵٪ دی اکسید کربن به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شده و بعد در یخچال در دمای ۴ °C نگهداری شده و از محیط فوق (محیط مادر) اسلنت هایی را با همان شرایط در محیط T.J.A(Tomato .Juice .Agar) تهیه کرده و آنها نیز در یخچال در ۴°C نگهداری شد.

۲)تهیه محیط کشت و پیش کشت :

دو نوع محیط کشت انتخاب شد و با بهینه کردن محیط کشت یکی از محیط ها به عنوان بهترین محیط کشت انتخاب گردید که ترکیب محیط ها در جدول (۱) داده شده است. ترکیب محیط پیش کشت و محیط کشت یکسان انتخاب شده و از تلقیح ۱۰٪ (V/V) استفاده گردید و در همه سیستم های مورد استفاده محیط تخمیر در انکوباتور حاوی ۵٪ دی اکسید کربن ودر دمای ۳۷ °C قرار داده شد.

۴)اندازه گیری لاکتیک اسیدبا استفاده از معرف پارائیدروکسی دی فنیل :

در این روش لاکتیک اسید به کمک اسید سولفوریک غلیظ و حرارت به استالدهید تبدیل شده و افزایش معرف پارائیدروکسی دی فنیل به استالدهید تشکیل یافته ایجاد رنگ ارغـوانی مـی کند.

ودرصد اسیدلاکتیک بر حسب میلی گرم طبق رابطه زیر حساب می شود: (۱۶)

= مقدار میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر

$$= \frac{Ax - Ab}{As - Ab} \times ۲۰$$

Ax= دانسیته نوری محلول مجهول

Ab= دانسیته نوری شاهد

As = دانسیته نوری محلول استاندارد

چون برای تعیین مقدار لاکتیک اسید به وسیله اسپکتروفتومتر محلول باید حاوی ۱۰- ۵ میلی گرم لاکتیک اسید در ۱۰۰ میلی لیتر باشد لذا لازم است رقیق سازی انجام شد.

روش تثبیت کردن

تثبیت با آگار: ۰/۶ گرم آگار را به ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۷٪ اضافه کرده و در بن ماری به صورت هموژن درآورده سپس آن را در اتوکلاو در دما۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه استریل کرده و سپس ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون حاوی لاکتو باسیلوس دلبروکی که در فاز لگاریتمی است را به محلول آگار در دمای ۵۵°C اضافه کرده و مخلوط شد و سپس آن را به پلیت هایی که قبلاً استریل شده ریخته که در مدت ۵ دقیقه کاملاً جامد شده (سفت می شود) و آن را با تیغ استریل به اندازه مورد دلخواه بریده و برای شستشوی سلول های تثبیت نشده از کلروپتاسیم ۰/۷٪ استفاده شده و سلولهای تثبیت شده را به محلول کشت اضافه کرده، بایستی دقت کرد در تمام این مراحل شرایط استریل رعایت گردد.

تعیین اثر سمیت کل رقیق کننده ها در سیستم دو فازی براث حلال :

۲۰ میلی لیتر از حلال که قبلاً با محیط کشت تماس داده شده است روی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی میکروارگانیسم اضافه شد و اثر سمیت کـل رقیق کننده ها بر روی سویه از روی درصد مصرف ساکارز نسبت به حالت کنترل (بدون حلال) بررسی گردید.

تعیین سمیت مولکولی رقیـــق کننده ها درسیستم براث اشباع از حلال :

۰/۲ ملی لیتر ازحلال به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی میکرو ارگانیسم اضافه شد و اثر سمیت مولکولی رقیق کننده ها بر روی سویه از روی درصد مصرف ساکارز نسبت به حالت کنترل (بدون حلال) بررسی گردید.

تعیین ضریب توزیع و درصد استخراج

۰/۴ میلی لیتر لاکتیک اسید به ۱۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد، ۱۰ میلی لیتر از حلال (آمین + رقیق کننده) را برداشته و به محیط حاوی لاکتیک اسیداضافه شد. برای سنجش اسید در فاز آبی از سود ۰/۱ نرمال در حضور معرف فنل فئالئین استفاده شد و برای سنـجش لاکتیک اسیددر فاز آلی، ۲ میلی لیتراز فاز آلی را برداشته و با ۱۴ میلی لیتر اتانول و ۶ میلی لیتر آب مقطر مخلوط کرده و در حضور معرف فنل فتالئین با سود ۰/۱ نرمال تیتر شد و مقدار های به دست آمده در رابطه های زیر قرار داده شد :

$$E\% = \frac{[HLac]org}{[HLac]org + HLac} \times ۱۰۰$$

$$K_D = \frac{[HLac]org}{[HLac]aq}$$

روش کار سیستم تثبیت سلولی و تخمیر استخراجی

۵۰ میلی لیتر حلال ۱۵٪ تری اکتیل آمین + دکانول به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی میکرو ارگانیسم های تثبیت شده اضافه گردید و در طول مدت تخمیر هم زدن با دست صورت می گرفت. و بعد از ۲۴ ساعت مقدار لاکتیک اسیددر حلال و براث اندازه گیری شد و پارامترهای ضریب توزیع و محصول دهی محاسبه گردید.

نتایج و بحث

انتخاب سویه ومحیط کشت:

در این بررسی ازسویه *L.delbrueckii PTCC1333* استفاده شده است. این سویه لاکتوباسیوس، هموفرمانتاتیو اجباری بوده و لاکتیک اسید(+)L تولید می کند و به علت هموفرمانتاتیو اجباری بودن و راندمان بالای محصول، سویه مناسبی در تولید صنعتی لاکتیک اسید به شمار می رود. یکی از پارامترها در تعیین راندمان و محصول دهی، ترکیب محیط کشت می باشد لذا ما دو نوع محیط کشت را انتخاب کرده و با استفاده از مقدار لاکتیک اسید تولید شده و قند باقیمانده راندمان و محصول دهی را محاسبه کرده و با درنظر گرفتن پارامترهای فوق

بهترین محیط کشت برای سویه مورد استفاده انتخاب گردید از مقایسه راندمان ۰/۹۵ محیط p_2 با ۰/۹۴ محیط p_3 ومحصول دهی ۱/۸۷۵ $g/L^{-1}h^{-1}$ محیط p_2 با ۱/۶۶۴$g/L^{-1}h^{-1}$ محیط p_3 آشکار است ترکیب محیط سنتزی p_2 به دلیل راندمان و محصول دهی بالاتر نسبت به محیط سنتزی p_3 مناسب ترین محیط تشخیص داده شد که احتمالاً به خاطر نیاز سویه به عناصری به مقدار کم مانند آهن و منگنز می باشد.

۳)تعیین غلظت قند به روش سوموگی-نلسون

چون قند مصرفی ساکاروز می باشد. باید اول آن را هیدرولیز کرد. برای این کار از روش هیدرولیز اسیدی استفاده شد. دانسیته نوری به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰nm خوانده شد.

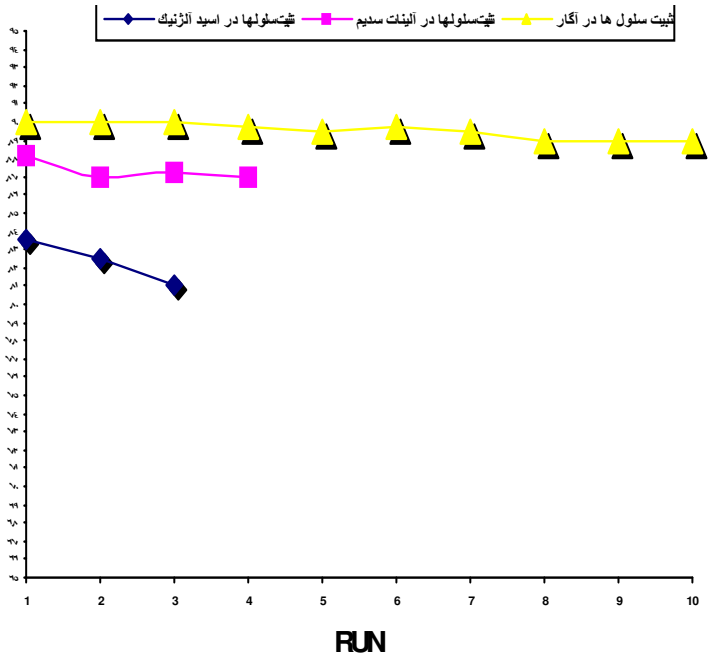
ارزیابی ماتریس های مختلف

بعد از بهینه کردن محیط تخمیر و انتخاب محیط p_2 ،فرایند تخمیر با استفاده از سیستم تثبیت سلولی دنبال شد.

و چون ماتریسهای مختلف با توجه به شرایط محیط تخمیر و نوع سویه پایداری یکسانی نشان نمی دهند لذا ماتریس های مختلف از نظر پایداری ارزیابی شد. همانطوری که در شکل (۲) نشان داده شده است ماتریکس آگار run ۱۰ (۲۰ روز) و ماتریس آلژینات سدیم ۴run (۸ روز) و اسید آلژینیک run ۳ (۶ روز) پایداری نشان می دهد که به علت ترکیب محیط کشت و نوع سویه می باشد. مهره‌های آلژینات کلسیم حاصل از سدیم آلژینات و آلژینیک اسید در حضور یونهای Mg^{2+}، Ca^{2+} پایداری زیادی نشان نمی دهند. بنابراین در محیط سنتزیp_2 از سه نوع ماتریس فوق، آگار مناسب تر تشخیص داده شد. در ضمن در طی تخمیر استخراجی خارجی و درجا اگر چه مقداری از اسید توسط حلال استخراج می شود ولی برای اینکه درصد استخراج خوبی داشته باشیم بایستی **pH** را در۴/۲ نگه داریم. چون در **pH** اسیدی درصد استخراج بالا می رود، در صورتیکه مهره های آلژینات کلسیم در pH = ۵-۱۰ پایدار تر هستند و غلظت زیاد اسید مثل درجه حرارت زیاد باعث دکربوکسیله شدن آلژینات ها می شود. مهره های آگار در محلول های قلیایی قوی حل می شوند و در محیط اسیدی پایدارتر می باشند. لذا با سیستم تخمیر استخراجی درجا ماتریس آگار مناسب تر می باشد.

جدول ۱. ترکیب محیط‌های کشت سنتزی برحسب (g/L^{-1})

محیط	گلوکز یا ساکاروز	عصاره مخمر	پپتون کازئین	سولفات سدیم	فسفات پتاسیم دی هیدروژن	فسفات دی پتاسیم هیدروژن	فسفات منیزیم ۷ آبه	سوالفات آهن ۷ آبه	سولفات منگنز، یک آبه
p_2	۱۰۰	۳۰	–	۲	۰/۲	۰/۲	۰/۳	۰/۰۳	۰/۰۳
p_3	۱۰۰	۲۰	۸	–	۰/۲	–	۰/۵	–	–



شکل ۱. پایداری ماتریس‌های مختلف

جدول ۲. اثر ترکیب محیط کشت با سوبسترای ساکاروز بر روی پارامترهای مختلف اندازه‌گیری شده

نوع محیط	زمان (h)	غلظت قند باقیمانده (gL^{-1})	اسید تولید شده (gL^{-1})	راندمان	**productivity ($gL^{-1}h^{-1}$)**
محیط p_2	۱۲	۴۲/۱	۵۵	۰/۹۵	۴/۵۸۳
محیطp_3	۱۲	۶۲/۷۶	۳۵	۰/۹۴	۲/۹۱۶۶
محیط p_2	۲۴	۱۵/۲۵	۸۰/۵۱	۰/۹۵	۳/۳۵
محیط p_3	۲۴	۳۱/۵۷	۶۴/۳۳	۰/۹۴	۲/۶۸
محیط p_2	۳۶	۸/۴۲	۸۷	۰/۹۵	۲/۴۱۶
محیط p_3	۳۶	۲۰	۷۵/۲	۰/۹۴	۲/۰۸۸
محیط p_2	۴۸	۵/۲۶	۹۰	۰/۹۵	۱/۸۷۵
محیط p_3	۴۸	۱۵	۷۹/۹	۰/۹۴	۱/۶۶۴

جدول ۳. اثر تغییر پارامترهای مختلف بر روی لاکتیک اسید تولید شده و محصول دهی با سیستم تثبیت سلولی همراه با اضافه کردن سود N ۲/۵

محصول دهی ویژه ($gg^{-1}h^{-1}$)	محصول دهی ($gL^{-1}h^{-1}$)	قند باقیمانده ($g\ L^{-1}$)	اسید لاکتیک تولید شده ($g\ L^{-1}$)	اندازه مهره	دانسیته سلولی اولیه ($g\ L^{-1}$)	محیط/ژل
۰/۲۷۳	۳/۳	۱۵/۷۸۹	۸۰	۳×۳×۱	۱۲/۲۳۵	$\frac{۱}{۵}$
۰/۲۱	۲/۰۸۴	۳۴/۷	۶۲	۳×۳×۱	۱۲/۲۳۵	$\frac{۱}{۱۰}$
۰/۱۴۵	۳/۵۴	۱۰/۵۲۶	۸۵	۳×۳×۱	۲۴/۴۷	$\frac{۱}{۵}$
۰/۲۰۴	۲/۵	۳۶/۸۴	۶۰	۳×۳×۱	۱۲/۲۳۵	$\frac{۱}{۵}$
۰/۳	۳/۷۵	۵/۲۶۳	۹۰	۳×۳×۱	۲۴/۴۷	$\frac{۲}{۵}$

جدول ۴. درصد مصرف ساکارز به وسیله سلول‌های تثبیت نشده لاکتوباسیلوس دلبروکی در سیستم های دو فازی براث ـ حلال در $37\ ^oC$ بعد از (min) ۴۰ و h ۲۵.

درصد مصرف ساکارز	حلال	گروه حلال
۱۰۰	کنترل	بدون حلال
۱۰۰	روغن زیتون	لیپید
۱۰۰	روغن پارافین	هیدرو کربن
۳۰	هگزان	هیدروکربن
۱۰۰	ددکان	هیدروکربن
۰	اتیل استات	استر
۰	کلروفرم	هیدروکربن هالوژنی
۰	دی کلرومتان	هیدروکربن هالوژنی
۰	۱و۲ دی کلرواتان	هیدروکربن هالوژنی
۰	بنزن	آرماتیک
۰	فنول	آروماتیک
۰	اکتانول	الکل
۰	دکانول	الکل

جـــدول ۵. درصد مصـــرف ساکارز به وسیله سلول‌های تثبیت نشده لاکتوباسیلوس دلبروکی در دو سیستم مختلف بعد از ۴۰ (min) و ۲۵ h و در دمای ۳۷ ^{o}C

سیستم برات – حلال	برات اشباع از حلال	حلال
۰	۰	اکتانول
۰	۰	استات اتیل
۰	۳	دی کلرومتان
۰	۶	دی کلرواتان
۰	۲/۵	کلروفرم
۱۰۰	۱۰۰	روغن زیتون
۱۰۰	۱۰۰	روغن پارافین
۰	۱۰۰	دکانول

بهینـــه کـــردن پارامترهـــای مختلـــف در سیستم تثبیت سلولی:

بعـد از اینکـه مـاتریس آگـار بـا توجـه بـه ترکیـب محـیط کـشت و نـوع سـویه مناسـب تـر تـشخیص داده شـد سـعی گردیـد بـا تغییـر پـارامتر هـای مختلـف ماننـد نـسبت $\frac{\text{جل}}{\text{محیط}}$، انـدازه مهـره هـا، افـزایش وزن خـشک اولیـه سـلول، محـصول دهـی بـالاتری حاصـل شـود. زیـرا در سیـستم تثبیـت سـلولی زمـانی محـصول دهـی بـالا حاصـل مـی شـود کـه همـراه بـا بـارگیری وزن خـشک اولیـه سـلول بـالا، محـدودیت در انتقـال سوبـسترا و اسـید تولید شده نیز حداقل شود.

نتـایج جـدول (۳) نـشان مـی دهـد: کـه وقتـی کـه نـسبت $\frac{\text{جل}}{\text{محیط}}$ افـزایش پیـدا مـی کنـد (البتـه در بیـشتر از یـک حـدی بایـستی نـوع راکتـور را عـوض کـرد، در $\frac{\text{جل}}{\text{محیط}}$ بـسیار زیـاد، راکتورهـای بـستر پرشـده مناسـب تـر از راکتورهـای همـزن دار مـی باشـد) و یـا انـدازه مهـره کـاهش پیـدا مـی کنـد(۹) و یـا دانـسیته اولیه سلـول افزایش پیدا می کند.

(البتـه تـا یـک حـدی، چـون بیـشتر ازیـک حـدی مهارکننـدگی محـصول تولیـد شـده و باقیمانـده در ماتریس روی سویه اثرمهارکنندگی ایجاد مـی کنـد) مقدار لاکتیـک اسیدتولید شـده و محـصول دهـی و محصول دهی ویژه افزایش پیدا می کند .

بررسی اثر سمیت حلال های مختلف بر روی سویه مورد استفاده:

در ابتدا تحقیقات در سیستم دو فازی براث – حلال روی سلول های تثبیت نشده انجام شد تا اثر سمیت کل (سمیت در سطح فازی + سمیت در سطح مولکولی) بررسی گردد و سپس تحقیقات در سیستم براث اشباع از حلال روی سلول های تثبیت نشده انجام شد تا تنها سمیت در سطح مولکولی حلال بررسی گردد چون در سیستم های براث – حلال که از میکروارگانیسم های تثبیت شده استفاده شده باشد، تنها سمیت در سطح مولکولی خواهد بود سمیت در سطح مولکولی بخاطر حلالیت در آب حلال ناشی می شود که می تواند در ماتریس نفوذ کرده و اثر مهارکنندگی روی میکروارگانیسم بگذارد.

همانطور که از نتایج جدول (۴) و (۵) در سیستم های دو فازی براث – حلال روی میکروارگانیسم های تثبیت نشده پیدا است، هر چه قطبیت حلال کاهش پیدا می کند و وزن مولکولی آن افزایش پیدا می کند سمیت کل کاهش پیدا می کند. یعنی هیدروکربن هایی با زنجیر طویل بهترین حلال از نظر غیر سمی بودن به میکروارگانیسم می باشد. خوشبختانه با محصور کردن میکروارگانیسم داخل ماتریس، سمیت در سطح فازی حذف گردیده و تنها سمیت در سطح مولکولی باقی می ماند لذا در تحقیقات بعدی تنها اثر سمیت در سطح مولکولی بررسی گردید که نتایج در جدول (۵) نشان داده شده است و طبق نتایج فوق، دکانول حلال مناسب تشخیص داده شد چون سمیت در سطح مولکولی اصلا ندارد.

اثر حلال بر میزان استخراج

برای انتخاب حلال مناسب در تخمیر استخراجی لازم بود نه تنها اثر سمیت روی میکروارگانیسم بررسی گردد بلکه بایستی توانایی استخراج لاکتیک اسیدنیز مطالعه می گردید، چون در سیستم تخمیر استخراجی حلالی مناسب است که نه تنها غیر سمی باشد بلکه توانایی بالایی در استخراج اسید نیز داشته باشد، متاسفانه رقیق کننده های غیر قطبی و هیدروکربن هایی با زنجیر طویل اگر چه غیر سمی می باشند اما توانایی استخراج اسید ها از جمله لاکتیک اسیدپایین دارند در صورتی که هر چه قطبیت رقیق کننده افزایش پیدا می کند درصد استخراج افزایش می یابد. لذا با افزایش آمین نوع سوم قطبیت رقیق کننده را افزایش دادیم (جدول ۶). اما چون با افزایش درصد آمین سمیت در سطح مولکولی افزایش می یابد لذا با توجه به نتایج جدول (۷) حلال (V/V)۱۵٪ تری اکتیل آمین + دکانول به علت غیر سمی بودن جزئی به میکروارگانیسم های تثبیت شده(۹) و به علت ضریب توزیع و در صد استخراج نسبتا بالا حلال مناسبی در تخمیر استخراجی تشخیص داده شد.

جدول ۶. اثر تغییر مقدار آمین بر روی ضریب توزیع و درصد استخراج

حلال ها	مقدار آمین	دما (°C)	مقدار اسید لاکتیک در فاز آبی mm^3	ضریب توزیع	درصد استخراج	آمین اسید
دکانول + تری اکتیل آمین	٪۵ (v/v) mm ۱۱۲/۳۴۹	۳۷	۴۸۴	۰/۸۲۶	۴۶/۷۱	۰/۲۳
دکانول + تری اکتیل آمین	٪۵ (v/v) mm ۳۳۴/۰۴۷	۳۷	۴۸۴	۳/۵۶	۷۸/۱	۰/۶۹
دکانول + تری اکتیل آمین	٪۲۵ (v/v) mm ۵۵۶/۷۴۶	۳۷	۴۸۴	۸/۲۵	۸۹/۱۸	۱/۱۵
دکانول + تری اکتیل آمین	٪۳۵ (v/v) mm ۷۹۹/۴۴۴	۳۷	۴۸۴	۱۰/۹۳۵	۹۱/۶۲	۱/۶۵
دکانول + تری اکتیل آمین	٪۴۵ (v/v) mm ۱۰۰۲/۱۴۳	۳۷	۴۸۴	۱۳/۲۳	۹۲/۹۷	۲/۰۷
دکانول + تری اکتیل آمین	٪۵۵ (v/v) mm ۱۲۲۴/۸۴	۳۷	۴۸۴	۱۳/۲۳	۹۲/۹۷	۲/۵۳
دکانول + تری اکتیل آمین	٪۶۵ (v/v) mm ۱۴۴۷/۵۴	۳۷	۴۸۴	۱۳/۲۳	۹۲/۹۷	۲/۹۹

جدول ۷. اثر نوع رقیق‌کننده بر روی ضریب توزیع و درصد استخراج

حلال	مقدار آمین	دما (°C)	مقدار لاکتیک اسیددر فاز آبی	ضریب توزیع	درصد استخراج	آمین / اسید
ددکانول + تری آکتیل آمین	٪۱۵(V/V) ۳۳۴/۰۴۷mm	۳۷	۴۸۴	۳/۵۶	۷۸/۱	۰/۶۹
کلروفرم+تری اکتیل آمین	٪۱۵(V/V) ۳۳۴/۰۴۷mm	۳۷	۴۸۴	۴/۸	۸۲/۷۵	۰/۶۹
استات اتیل+تری اکتیل آمین	٪۱۵(V/V) ۳۳۴/۰۴۷mm	۳۷	۴۸۴	۳/۸۹۷	۷۹/۵۷	۰/۶۹
۱و۲ – دی کلرواتان + تری اکتیل آمین	٪۱۵(V/V) ۳۳۴/۰۴۷mm	۳۷	۴۸۴	۲/۱۷۴	۶۸/۴۹	۰/۶۹
اکتانول + تری اکتیل آمین	٪۱۵(V/V) ۳۳۴/۰۴۷mm	۳۷	۴۸۴	۳/۳	۷۶/۷۴	۰/۶۹
روغن زیتون +تری اکتیل آمین	٪۱۵(V/V) ۳۳۴/۰۴۷mm	۳۷	۴۸۴	۰/۶۰۶	۳۷/۳۷	۰/۶۹
روغن پارافین + تری اکتیل آمین	٪۱۵(V/V) ۳۳۴/۰۴۷mm	۳۷	۴۸۴	۰/۱۵۹	۱۳/۹	۰/۶۹

جدول ۸. نتایج اندازه‌گیری با سیستم تثبیت سلولی و تخمیر استخراجی

محصول دهی ویژه ($g\ L^{-1}h^{-1}$)	محصول دهی ($g\ L^{-1}$)γ	اسید لاکتیک درحلال ($g\ L^{-1}$)	ضریب توزیع	اسید لاکتیک کل($g\ L^{-1}$)	$\frac{\text{حلال}}{\text{محیط}}$	اندازه مهره	دانسیته سلولی اولیه ($g\ L^{-1}$)
۰/۲۳۸	۲/۹۱	۳۵	۱/۳	۷۰	$\frac{۱}{۵}$	۳×۳×۱	۱۲/۲۳۵
۰/۱۳۶	۳/۳	۴۷/۵۱۷	۱/۳۲	۸۰	$\frac{۲}{۵}$	۳×۳×۱	۲۴/۴۷

جدول ۹. مقایسه محصول‌دهی در سه سیستم مختلف

محصول دهی بعد از ۲۴ ساعت ($g\ L^{-1}$)	
۳/۳۵	سلولهای تثبیت نشده همراه با کربنات کلیسیم
۳/۷۵	سلولهای تثبیت شده همراه با اضافه کردن سود ۲/۵ N
۳/۳	سلولهای تثبیت شده همراه با تخمیر استخراجی

جدول ۱۰. بازیافت لاکتیک اسید به وسیله اسید کلرید ریک

اسید کلریدریک ($g\ L^{-1}$)	درصد بازیافت	لاکتیک اسیدحاصل شده $g\ L^{-1}$	غلظت اولیه اسید کلریدریک($g\ L^{-1}$)	اسید کلریدریک: حلال	لاکتیک اسیدحلال ($g\ L^{-1}$)
۳/۹۶	۶۰	۳۱/۰۲	۲۵	۱:۱	۵۱/۷

جدول ۱۱. بازیافت لاکتیک اسید به وسیله سود

مقدار سود باقیمانده ($g\ L^{-1}$)	درصد بازیافت	غلظت سود اولیه ($g\ L^{-1}$)	سود : حلال	لاکتیک اسیددر حلال
۱۷/۲۰۶	۹۹/۲۸۶	۴۰	۱ : ۱	۵۱/۷

سیستم تثبیت سلولی وتخمیر استخراجی:

همانطور که از جدول (۸) پیدا است در سیستم تثبیت سلولی و تخمیر استخراجی نیز در دو حالت با اندازه مهره یکسان، در حالتی که جرم سلولی بیشتری بارگیری شود و $\frac{\text{جرم}}{\text{حجم}}$ بالاتری انتخاب شود محصول دهی بالاتری حاصل می گردد(gL^{-1} ۳/۳، در مقایسه با ۲/۹۱) اگر چه محصول دهی ویژه کاهشی را نشان می دهد.

کاهش محصول دهی ویژه بیانگر این مطلب است که افزایش مقدار اسید تولید شده به طور خطی با افزایش بارگیری جرم سلولی بالا نمی رود زیرا در انتقال اسید تولید شده از ماتریس به محیط محدودیت ایجاد می شود.

مقایسه محصول دهی در سه سیستم مختلف:

همانطور که از جدول (۹) پیداست (محصول دهی) در سیستم تثبیت سلولی وتخمیر استخراجی پایین تر از سیستم تثبیت سلولی همراه با اضافه کردن سود می باشد که احتمالاً :

۱- ناشی ازسمیت تری آکتیل آمین در سطح مولکولی حتی در (v/v) ۱۵٪ تری آکتیل آمین + دکانول می باشد.

۲- کاهش pH به کمتر از ۴/۲ به علت باقی ماندن مقدار لاکتیک اسیدزیاد در براث می باشد. لازم به تذکر است که *L. delbrueckii* در pH کمتر از ۴/۲ مهار می شود.

لذا پیشنهاد می شود که اثر مهار کنندگی موجود در سیستم تثبیت سلولی و تخمیر استخراجی درجا را با استفاده از کنترل pH و با استفاده از سیستم تخمیر استخراجی خارجی برطرف کرده تا محصول دهی بالاتری حاصل شود.

بازیافت دوباره اسید لاکتیک

برای بازیافت دوباره لاکتیک اسیداز حلال دو روش موجود است:

الف- با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم یعنی بازیافت دوباره لاکتیک اسیدبه شکل لاکتات سدیم.

ب- با استفاده از اسید کلریدریک، یعنی اسید کلریدریک جانشین لاکتیک اسیددر فاز الی شده و لاکتیک اسیدوارد فاز آبی می گردد.

همانطور که از جدول (۱۰، ۱۱) پیداست در روش اول با نسبت سود : حلال (۱:۱) و با غلظت اولیه سود $40\ g\ L^{-1}$ تقریباً ۱۰۰٪ (۹۹/۲۸۶٪) لاکتیک اسیدبه شکل لاکتات سدیم بازیابی می شود اما در روش دوم با مقدار اسید کلریدریک اولیه $g\ L^{-1}$

۲۵ و بـا HCI : حـلال (۱:۱) تنهـا ۶۰٪ لاکتیـک اسـیدبازیابی مـی شـود و مقـدار g/L ۳/۹۶ اسـید کلریدریک باقی می ماند .

بازیافت (احیاء) حلال بعد ا ز استخراج

وقتی که لاکتیک اسیدحلال با محلول هیدروکسید سدیم به شکل لاکتـات سـدیم بازیافـت مـی شـود لاکتات سـدیم در فـاز آبـی وارد مـی شـودو چـون تقریبا به ۱۰۰٪ بازیافت محصول می رسیم حلال بـه صورت خالص احیا می شود اما وقتی که لاکتیـک اسیدحلال با اسـتفاده از اسـید کلریـدریک بازیـابی می شود متاسفانه ۱۰۰٪ بازیافت حاصل نمی شـود بلکـه ۶۰٪ بازیافـت حـــاصل مـی شـود کـه ۴۰٪ لاکتیک اسیددر فاز آلی (حلال) بـاقی مـی مانـد و مقداری اسیـد کلریدریک نیز در حـلال بـاقی مـی ماند اسید کلریدریک باقیمانده را از طـریق تقطیـر می توان خارج کرد، اما برای بدست آوردن حـلال خـالص بایـستی عمـل اسـتخراج لاکتیـک اسـید باقیمانـده را دوبـاره بـا محلـول سـود (هیدروکـسید سدیم) انجام داد.

منابع

۱. قره‌خانی، فهیمه، تولید اسید لاکتیک به روش تثبیت سلولی و تخمیر استخراجی درجا، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۶.

2. Nurcan. T , Emine. B, , Journal of chemical Technology and Biotechnology 76-7 -764 (2001)

3. Yabannavar. V. M , Wang. D. Biotechnology and Bioengineering, 37, 1095 (1991).

4.Bugugungur. H, Journal. Chemical Technology and Biotechnology, 53, 173 (1987).

5.Yabannavar. V.M. and wang. D, Biotechnology and Bioengineering, 73, 544 (1991).

6.Bar. R., Jahn L.Gainer, Biotechnology Progress , 3 , 109 (1987).

8. Shen. X , Liming xia , world Journal of Microbiology and Biotechnology , 22, 11 (2006)

9. San. M - Marin , Carmen Pazos , Josecoca . Journal chemical technology Biotechnology 54-1 (1992).

10. Yabannavar. V.M. ,Wang, D , Biotechnology and Bioengineering., 37, 8, 716 (2004).

11. V.M.Yabannavar , D.I.C.Wang Biotechnology and Bioengineering 37,6,544 (2004).

12. Ataei. A. , Vasheghani . E, Chemical Engineerin and Technology, 31, 18, 1484 (2008)

13. Hong y.k, Hong W.H Biotechnology Technigues, 13, (1999).

14. Elezi. O, Kourkoutas.Y , Journal Agricalcheral . Food Chemistry. 15,18, 5285 (2003)

15. Gank.P, Dragowirs.Y , World Journal of Microbiology and Biotechnology , 22, 4, 334 (2006)

16. Goksungur.Y , Uvenc.U , Journal of Chemical Technology and Biotechnology . 34, (1999).

17. Nurcan.T , Emine.B, Journal of Chemical Technology and Biotechnology 76, 7, 662, 764 (2001)