جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ هفتم، شمارهٔ ٤، ص ۲۰۵-۲۰۰، ۱۳۷۹

مقالهٔ پژوهشی

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

سید احمد عطایی

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 باارزش به کار می‌رود. اسیدلاکتیک یکی از این مواد است که کاربردهای زیادی در صنایع مختلف دارد. خصوصاًایزومر ال (+) این اسید با قیمتی در حدود ۱۰ برابر نسبت به مخلوط ال (L) و دی(D)، برای بسیاری از مقاصدپزشکی مثل نخ‌های جراحی قابل جذب در بدن و یا پوشش داروهایی با رهایش کنترل شده مورد استفاده قرارمی‌گیرد. لاکتوباسیل‌ها عمدتاً مخلوط (ال) و (دی) این اسید را تولید می‌کنند. در این تحقیق لاکتوباسیلوس کازیی‌که فقط تولید ایزومر ال (+) را می‌کند مورد استفاده قرار گرفت. یکی از مشکلات اساسی در تولید صنعتی‌اسیدلاکتیک از محیط تخمیری، این است که اسید تولید شده در غلظت‌های بالا، اثر سوء بر میکروارگانیسم‌هاداشته و تولید اسید را متوقف می‌کند. به طوری که فقط حدود نیمی از لاکتوز موجود در آب پنیر، به اسیدلاکتیک‌تبدیل می‌شود. بنابراین برای بالا بردن راندمان عمل بایستی اسید تولید شده، همزمان با فرایند تخمیر از محیط‌عمل جدا شده و غلظت اسید در محیط از مقدار مشخصی زیادتر نشود. در این تحقیق برای حفظ حالت استریلیته‌محیط تخمیری، از فرایند جداسازی درجا توسط رزین‌های تبادل یونی تحت کنترل اتوماتیک pH استفاده شد. درمقایسه‌ای که بین فرایند بدون جداسازی با فرایند همراه با جداسازی درجا انجام گرفت، مقدار اسید تولید شده از۲۲ 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

مقدمه

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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

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

در ایران تنها کارخانه‌ای که از آب پنیر استفاده می‌کند،کارخانه شیر پاستوریزه است که با صرف هزینه زیاد آن را به پودرپنیر تبدیل می‌کند و به گفته صاحبان کارخانه، مخارج بسیارزیادی برای راه‌اندازی و نگهداری این واحد صرف می‌شود.سایر واحدهای تولید پنیر در کشور، آب پنیر را به سیستم‌فاضلاب وارد و یا آن را در چاهها دفع کرده که مشکلاتی را درسیستم 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 بااستفاده از کشت همراه، مخلوط دی (-) و ال (+) این اسید رابدست آورده‌اند. اما لاکتوباسیلوس کازیی فقط ایزومر ال (+) راتولید می‌کند که قیمتی در حدود ۱۰ برابر نسبت به نوع مخلوط آن‌دارد و برای بسیاری از مقاصد پزشکی مورد استفاده قرارمی‌گیرد(۱۱،۹،۶،۲).

تولید تخمیری اسیدلاکتیک یک واکنش محدود شونده توسط‌خود محصول است و بالا رفتن غلظت اسید در محیط تخمیر، اثربازدارندگی بر رشد میکروارگانیسم‌های تولید کننده اسیدلاکتیک‌دارد. روش استخراج حلال از جمله روش‌هایی است که برای‌جداسازی اسید از آن استفاده می‌شود، اما به دلیل به هم زدن‌حالت استریلیته محیط کشت چندان موفق نبوده‌است (۱۲،۱۰،۷،۵).

در این پژوهش با استفاده از رزین‌های تبادل یونی، امکان‌جداسازی در جای (In-situe) اسید مورد نظر با ثابت نگه داشتن‌اتوماتیک pH در محدوده بهینه نیز در نظر گرفته شده است که‌ضمن استخراج اسید از محیط در حین عمل تخمیر، حالت‌استریلیته محیط نیز حفظ شده و راندمان تولید اسید حدود ۶۰درصد افزایش می‌یابد. با مصرف لاکتوز موجود در آب پنیر،آلودگی فاضلاب کارخانه‌های پنیرسازی به مقدار زیادی کاهش‌می‌یابد.

مواد و روش‌ها

الف) میکروارگانیسم و محیط پیش کشت

میکروارگانیسم مورد استفاده لاکتوباسیلوس کازئی با شماره۱۲۹۳ PTCC از انستیتو رازی تهیه شده بود.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

محیط پیش کشت به‌نام Media of Rogosa and Sharpe (MRS) حاوی پپتون ۱۰گرم، 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 که‌همگی از کمپانی مرک آلمان می‌باشند تهیه شد (۲). به یک صدمیلی‌لیتر از محیط پیش کشت فوق یک لوپ از میکروارگانیسم‌مورد نظر تلقیح و پس از یک روز نگهداری در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد توده سلولی به ۱/۸ گرم بر لیتر رسید.

ب) محیط پایه تخمیر

محیط پایه تخمیری آب پنیر تهیه شده از کارخانه شیرپاستوریزه کرمان بود. مقدار لاکتوز اولیه موجود در آن حدود ۴۴گرم در لیتر بود که به عنوان سوبسترای اصلی مورد مصرف‌میکروارگانیسم قرار می‌گیرد. آب پنیر به علت دارا بودن‌ویتامین‌ها و مواد معدنی موجود در شیر اولیه، از جمله محیط‌های‌غنی برای رشد باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک به شمارمی‌رود (۳).

ج) تخمیر کننده و متعلقات

تخمیر کننده یک بالن ۱/۵ لیتری گرد شیشه‌ای خود ساخته‌است که مجهز به ۵ ورودی و ۲ خروجی می‌باشد به منظور هم زدن‌محلول، یک مغناطیس داخل آن گذاشته شده و همچنین یک‌فیلتر جهت صاف کردن محلول ورودی به ستون درون آن تعبیه‌شد. به دلیل این که میکروارگانیسم در شرایط کمبود اکسیژن‌فعالیت بیشتری از خود نشان می‌دهد (خاصیت میکروآیروفیلی)،فضای بالای فرمنتور توسط گاز ازت اشباع شد.

د) ستون‌های تبادل یونی

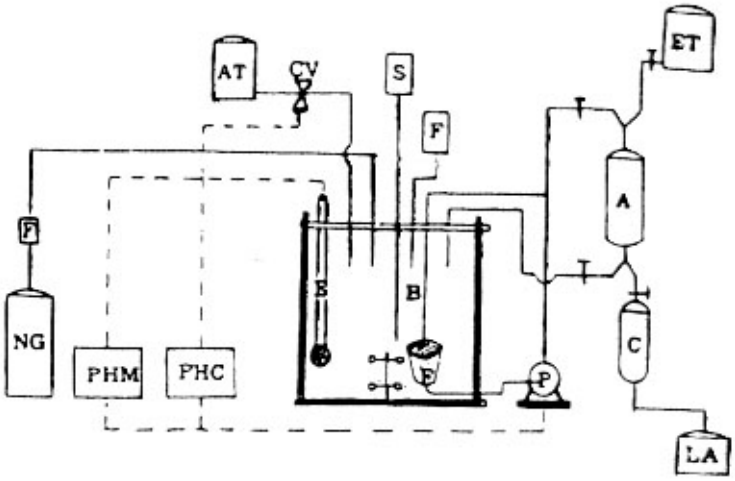
به منظور جداسازی اسیدلاکتیک از محیط تخمیر، از رزین‌آمبرلیت (IRA-400,CL- ساخت Rohmand Haas, USA)استفاده شد. ابتدا رزین توسط سود ۲/۵ نرمال به صورت‌هیدروکسید درآمده و پس از آن با عبور محیط تخمیری از درون‌ستون، یون‌های لاکتات جایگزین یون‌های هیدروکسید شده وعملیات جداسازی آغاز گردید. پس از اشباع ستون، عمل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

ه) آنزیم پروتئاز

برای تهیه آنزیم پروتئاز به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط Nutrientbroth (آبگوشت مغذی) ساخت کمپانی مرک آلمان (۲)، یک‌لوپ از باکتری باسیلوس سوبتلیس تهیه شده از انستیتو رازی((PTCC 1204 تلقیح گردید و به مدت یک روز در دمای ۳۰°c بادور هم‌زن ۲۵۰ rpm نگهداری شد. در این مدت توده سلولی به۲/۴ گرم بر لیتر رسیده و آنزیم پروتئاز تولیده شده در این محیط،در مرحله بعدی جهت هیدرولیز پروتئین‌های محلول آب پنیرمورد استفاده قرار گرفت (۱۳).

و) روش کار

یک لیتر آب پنیر با تیرگی حدود ۵۰ هزار PPM



A: ستون تبادل کننده آنیون
B: بیوراکتور
C: ستون تبادل کننده کاتیون
P: پمپ
F: فیلتر
S: محل نمونه گیری
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

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 ۶×۰/۱ ثابت می‌ماند.

پس از اتمام این دوره، غلظت فرم یونی لاکتات به‌اسیدلاکتیک در محیط حدود ۱۰۰ برابر است و ستون آمادگی‌جذب یون‌های لاکتات را دارد.

از طرف دیگر دستگاه کنترل pH، با پمپی که محیط تخمیر رادرون ستون مبادله کننده آنیون (IRA-400) وارد می‌کند مرتبط‌بوده است و همزمان با عمل تخمیر و با کاهش pH، پمپ روشن‌شده و پس از جداسازی یون‌های لاکتات، مابقی مایع تخمیری‌خارج 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 بااحیاء رزین (Elution) توسط سود ۱/۵ نرمال، لاکتات سدیم

E: الکترود متر

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

ازانتهای ستون اول خارج و وارد ستون دوم (مبادله کننده کاتیون(IR-120 می‌شود و اسیدلاکتیک به صورت خالص از انتهای‌ستون دوم به دست می‌آید (شکل ۱).

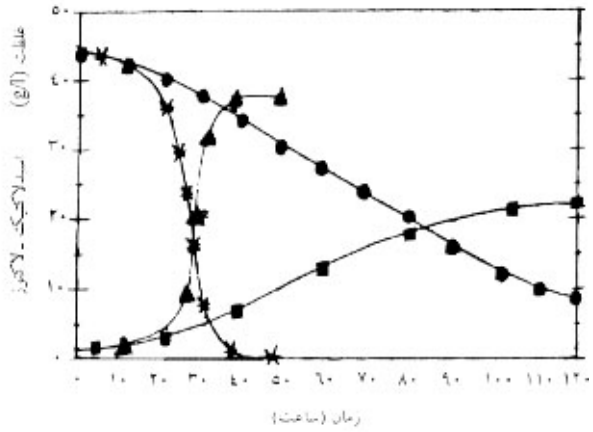
میزان لاکتوز توسط روش استاندارد سوموگی ـ نلسون(somogi-nelson) با اندازه‌گیری جذب محلول رنگی در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه‌شد (۱۰).

نتایج

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

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

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



نمودار ۱ : *مقایسه مقدار اسید لاکتیک تولید شده و لاکتوز باقیمانده درفرایند 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 نتیجه‌گیری

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

چنانچه در نمودار ۱ مشهود است، در فرایند تخمیر بدون‌جداسازی، با شرایط مشابه پس از ۳۸ ساعت، مقدار اسید تولیدشده تنها ۶ گرم بر لیتر بود به طوری که در مدت‌زمان ۵ روز این‌مقدار به ۲۲ گرم در لیتر رسید که حداکثر تولید آن در این فرایندست. اما در فرایند تولید و جداسازی همزمان توسط رزین‌های‌تبادل یونی، علاوه بر کاهش زمان تخمیر از ۵ روز (۱۲۰ ساعت)به ۳۸ ساعت، ۶۰ درصد افزایش در مقدار اسیدلاکتیک تولید شده‌حاصل شد و مقدار اسید به ۳۷/۴ گرم در لیتر رسید. بدین ترتیب‌بهره‌وری سیستم از ۰/۱۸۳ گرم در لیتر در ساعت به ۰/۹۸۴ گرم برلیتر در ساعت افزایش یافت مضافاً به اینکه در فرایند تخمیرهمراه با جداسازی اسید، مقدار آلودگی فاضلاب به نحوچشمگیری کاهش یافت به طوری که اندازه‌گیری میزان COD(Chemical oxygen demand) پساب، حدود ۶۵ درصد کاهش‌آلودگی آن را نشان می‌دهد.

بنابراین با استفاده از روش فوق علاوه بر اینکه فاضلاب‌صنایع پنیرسازی تا حد مطلوبی تصفیه می‌شود و آلودگی آب پنیرکاهش 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 AcidUsing 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 HealthServices, Kerman, Iran

Whey with a large amount of BOD (50000 PPM) is a dangerous environmental pollutant. Thisimportant source of lactose (4-5%) is a usefull substrate for a range of fermentation processes. Laciticacid with several applications in industries is one of these products. Specially L (+) isomer of this acidworthing 10 times as much as the mixture of L & D, is used in medical purposes such as absorbablesurgical 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. Theproduced lactic acid prevents acid production in fermentation, so that almost half of lactose (about 22g/L lactic acid) is converted to Lactic acid. Therefore in order to increase the output the produced acidshould be separated. In this research Lactobacillus Casei was used to produce L (+) Lactic acid and dueto strile conditions requirement in situe separation of acid using Ion-exchange resins at control automaticof pH were employed. At the end, Lactic acid yield in non extractive fermentation compared withextractive process showed an increase from

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

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

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 chemie. 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.). 3rded., 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 microbiolTechnol*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.