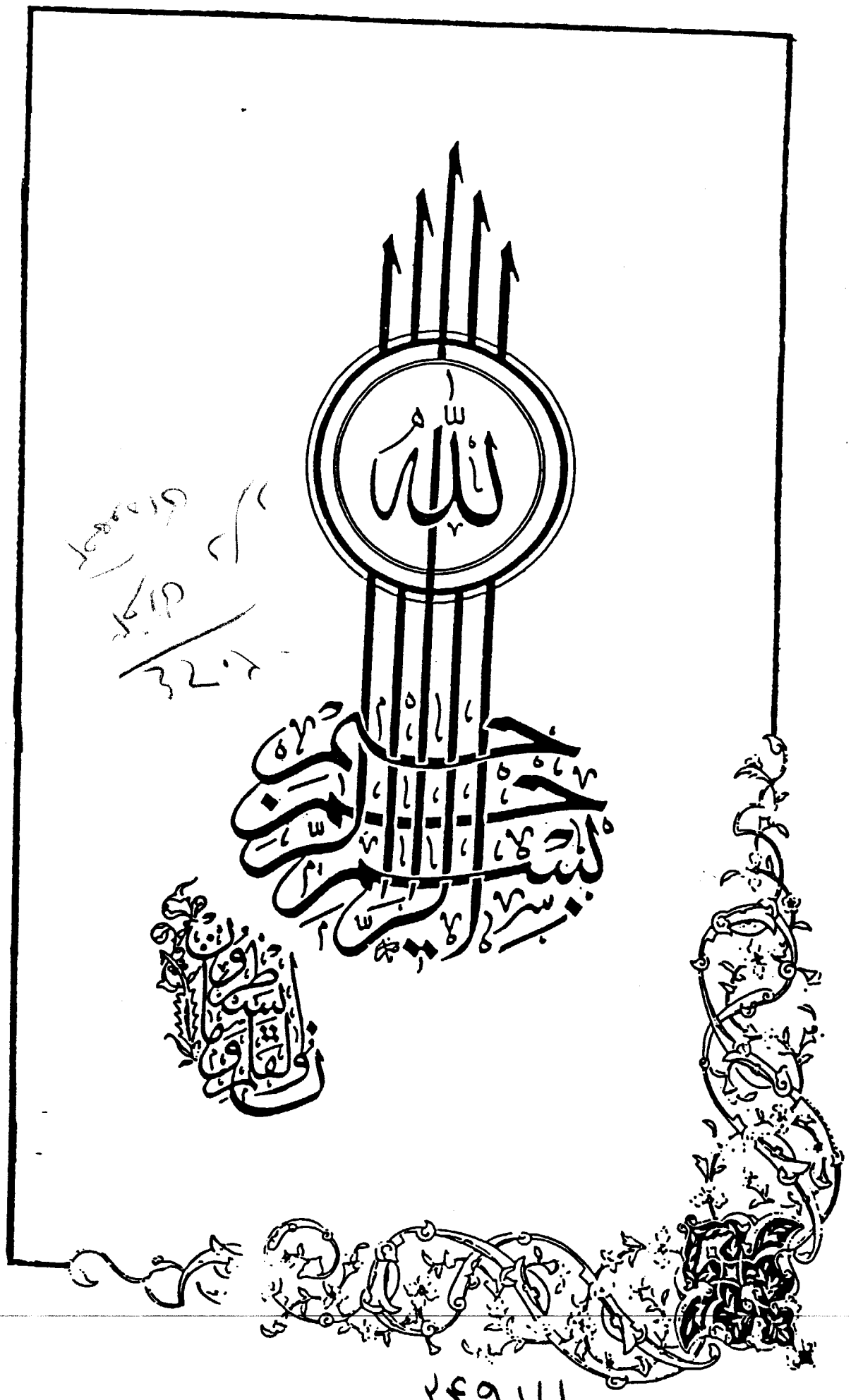

٢٤٩٧١

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده فنّی و مهندسی

پایان نامه کارشناسی ارشد

مهندسی شیمی

تولید و جداسازی در جای اسید لاکتیک توسط لاکتوباسیلوس کازئی در فرایند غیر مداوم تخمیر آب پنیر

محمّد صادق عبدالعلی زاده

استاد راهنما:

دکتر ابراهیم واشقانی فراهانی

استاد مشاور:

دکتر مهوش خدابنده

زمستان ۱۳۷۷

۱۹۱۱/۲

۲۴۹۷۱

۱۳۷۸ /۴/ ۲۰

دانشگاه تربیت مدرس

تاییدیه هیات داوران

آقای محمدصادق عبدالعلی‌زاده پایان‌نامه ۹ واحدی خود را با عنوان تولید و جداسازی در جای اسید لاکتیک توسط لاکتوباسیلوس کازئی در فرآیند غیرمداوم تخمیر آب پنیر در تاریخ ۷۷/۱۲/۲۳ ارائه کردند. اعضای هیات داوران نسخه نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی تایید و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد رشته مهندسی شیمی با گرایش —— پیشنهاد می‌کنند. ۱۶ب ۱۲

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
۱ـ استاد راهنما :	آقای دکتر واشقانی	
۲ـ استاد مشاور :	سرکار خانم مهوش خدابنده	
۳ـ استادان ممتحن :	آقای دکتر شجاع‌السادات	
	آقای دکتر منوچهر وثوقی	
۴ـ مدیر گروه :	آقای دکتر پهلوانزاده	
(یا نمایندهٔ گروه تخصصی)		

این نسخه به عنوان نسخه نهایی پایان‌نامه/رساله مورد تایید است.

امضای استاد راهنما

شماره:.....

تاریخ:.....

پیوست:.....

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادّهٔ ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مرکز نشر دانشگاه اطلاع دهد.

مادّهٔ ۲ در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد/رسالهٔ دکتری نگارنده در رشتهٔ محمدی سیمی است که در سال ۱۳۷۷ در دانشکدهٔ منابع محمدی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی ~~سرکار خانم~~/جناب آقای دکتر ابراهیم ~~و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر~~ محرّش خدانده از آن دفاع شده است.»

مادّهٔ ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های نشریات دانشگاه تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به مرکز نشر دانشگاه اهدا کند دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّهٔ ۴ در صورت عدم رعایت مادّهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرّس، تأدیه کند.

مادّهٔ ۵ دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّهٔ ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّهٔ ۶ اینجانب محمدصادق عبدالهی راد دانشجوی رشته محمدی سیمی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

۸۱۰

تقدیم به محضر مبارک ولی عصر(عج)

تقدیم به روح پدرم که معلم زندگیم بود

تقدیم به مادر بزرگوارم به پاس تمام زحماتش و

تقدیم به خواهران و برادرانم به خاطر تمام محبتهایشان

من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق

با حمد و سپاس خداوند منان، در اینجا بر خود لازم می دانم از همـه عزیزانـی کـه در امـر انجام این پایان نامه بنده را یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایم.

ابتدا بر خود لازم می دانم از زحمات بی دریغ استاد گرانقدرم، جناب آقـای دکـتر واشـقانی فراهانی که امر راهنمایی بنده را در راستای انجام این پایان نامه داشتند، کمال تشکر و قدردانـی را بنمایم. سپاس بی منتهای خود را از زحمات بی دریغ استاد ارجمندم، خانم دکـتر خدابنـده کـه در طول انجام این تحقیق به عنوان استاد مشاور، بنده را یاری و راهنمایی نمودنـد، اعـلام مـی دارم.از استاد ارجمندم، جناب آقای دکتر شجاع الساداتی، رئیس محـترم بخـش مهندسـی شـیمی دانشـگاه تربیت مدرس، به خاطر راهنمائیهایشان در طول انجام این پایان نامه، تشکر و قدردانی می نمـایم. از زحمات دوستان در مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، آقایان و خانم ها، رهـبر، کشـاورز، رشـیدیان، مقدسـی و . . . تشـکر و قدردانـی مـی نمـایم.از جنـاب آقـای دکـتر رستگار مقدم، مسئول محترم آزمایشگاههای مرکز مهندسی ژنتیک، به خاطر همکاریهایشان تشـکر و قدردانی می نمایم. و از تمام اساتید و دوستان که در امر انجام ایـن پایـان نامـه بنـده را مرهـون زحماتشان نمودند، تشکر و قدردانی خود را خالصانه اعلام می دارم.

چکیده:

در این پژوهش، تولید (+)L- اسید لاکتیک در فرایند غیر مداوم تخمیر آب پنیر پروتئین گیری شده[1] همراه با کنترل pH، توسط باکتری لاکتوباسیلوس کازئی زیر گروه کازئی[2]، مورد مطالعه قرار گرفته است. به منظور بهینه سازی شرایط فرایند تولید اسید لاکتیک، از یک روش طراحی آماری[3] به نام روش تاگوچی[4]، استفاده شده است. در این روش اثر سه منبع ازت مختلف یعنی عصاره مخمر، پپتون و سولفات آمونیوم و دمای تخمیر و دور همزن بر بازدهی فرایند ارزیابی شده است. تحلیل آماری فرایند به این روش نشان داد که دما و غلظت عصاره مخمر بیشترین تاثیر را بر تولید اسید لاکتیک دارد. در شرایط بهینه فرایند، غلظت نهایی اسید لاکتیک در فرایند بدون کنترل pH، ۱۲/۵ گرم بر لیتر بعد از ۲۴ ساعت به دست آمده است. به کمک نتایج به دست آمده از تحلیل های روش تاگوچی، شرایط دیگری از نظر منابع ازت با هزینه کمتر و محصول دهی[5] قابل مقایسه با شرایط بهینه تعیین گردید. تحت این شرایط، میزان اسید تولید شده بعد از ۲۴ ساعت در فرایند بدون کنترل pH، ۱۰/۷ گرم بر لیتر می باشد. با کنترل کردن pH و انجام فرایند تخمیر تحت شرایط انتخاب شده، میزان تولید اسید لاکتیک بعد از ۱۵ ساعت به ۳۴ گرم بر لیتر رسید.

به منظور جداسازی در جای اسید لاکتیک از محیط کشت، از رزین های مبادله کننده آنیون[6] استفاده شده است. با استفاده کردن از این رزین برای جداسازی اسید لاکتیک، علاوه براینکه نیاز به افزایش قلیا برای ثابت نگه داشتن pH محیط کشت مرتفع می گردد، درجه خلوص بالایی از اسید لاکتیک حاصل خواهد شد.

کلمات کلیدی: (+)L- اسید لاکتیک، آب پنیر پروتئین گیری شده، لاکتوباسیلوس کازئی، طراحی آزمایش ها، روش تاگوچی، جداسازی در جا، رزین تبادل آنیونی

1- Whey permeate

2- *Lactobacillus casei subsp. casei.*

3- Experimental design

4- Taguchi method

5- Productivity

6- Anion exchanger resins

فهرست مطالب

عنوان — صفحه

فصل اول: مقدمه ۱

فصل دوم: مروری بر مطالعات و تحقیقات انجام شده ۵

۲-۱) اسید لاکتیک ۶

۲-۱-۱) مصارف و کاربردها ۶

۲-۱-۲) ایزومرهای اسید لاکتیک ۷

۲-۱-۳) خواص فیزیکی اسید لاکتیک ۸

۲-۱-۴) تولید اسید لاکتیک ۸

۲-۱-۴-۱) تولید اسید لاکتیک به طریق بیوشیمیایی ۹

۲-۱-۴-۲) تولید اسیدلاکتیک به طریق شیمیایی ۱۰

۲-۲) آب پنیر ۱۲

۲-۲-۱) تعریف ۱۲

۲-۲-۲) مشخصات و خواص فیزیکی آب پنیر ۱۳

۲-۲-۳) اجزاء تشکیل دهنده آب پنیر ۱۴

۲-۲-۴) مشکلات زیست محیطی آب پنیر ۱۴

۲-۲-۵) وضعیت تولید آب پنیر در ایران و جهان ۱۶

۲-۲-۶) بعضی از مصارف آب پنیر ۱۷

۲-۳) رزین های تبادل یونی ۱۸

۲-۳-۱) کلیات و تئوری ۱۸

۲-۳-۲) مکانیزم تبادل یونی ۱۹

۲-۳-۳) نقش pH بر ظرفیت مبادله کننده‌ها ۱۹

۲-۳-۴) انواع مبادله کننده‌ها ۲۰

۲-۳-۵) رزین‌های تبادل یونی ۲۰

۲-۳-۶) رزین آمبرلیت IRA-400 ..... ۲۳

۲-۴) مروری بر مطالعات انجام شده ۲۵

فصل سوم: مواد و روشها ۴۰

۳-۱) میکروارگانیسم ۴۱

۳-۲) محیط کشت ذخیره ۴۲

۳-۳) محیط پیش کشت ۴۲

۳-۴) رزینهای تبادل یونی و آماده‌سازی آنها ۴۳

۴-۵) اندازه گیری دانسیته سلولی ۴۴

۳-۶) اندازه‌گیری غلظت لاکتوز ۴۴

۳-۷) اندازه‌گیری غلظت اسیدلاکتیک ۴۵

۳-۷-۱) اندازه‌گیری غلظت اسیدلاکتیک به روش تیتراسیون ۴۶

۳-۷-۲) اندازه‌گیری غلظت اسیدلاکتیک به روش آنزیمی ۴۶

۳-۸) آماده‌سازی آب پنیر به عنوان محیط کشت ۴۹

۳-۸-۱) پروتئین‌گیری آب پنیر ۴۹

۳-۸-۲) افزایش یون منگنز به آب پنیر ۵۰

۳-۸-۳) افزایش تووین ۸۰ به آب پنیر ۵۰

۳-۱۰) بهینه‌سازی محیط کشت با استفاده از روش طراحی آماری .. ۵۲

۳-۱۰-۱) انتخاب پارامترهای موثر بر رشد و تولید ۵۲

۳-۱۰-۲) طراحی آزمایشها به منظور بهینه سازی شرایط تولید اسید لاکتیک ۵۴

۳-۱۱) انجام فرایند تخمیر تحت شرایط کنترل شده pH در فرمنتور ۵۸

۳-۱۲) جداسازی اسیدلاکتیک با استفاده از رزینهای تبادل کنندهٔ یونی، بازیابی اسید لاکتیک و احیاء رزین ۵۹

فصل چهارم: نتایج آزمایش ها و محاسبات ۶۰

۴-۱) نتایج حاصل از اندازه‌گیری دانسیته سلولی و تحلیل آنها ۶۱

۴-۲) نتایج آزمایشگاهی تهیه اسیدلاکتیک ۶۶

۴-۳) انتخاب شرایط برای تولید اسید لاکتیک در فرمنتور ۷۱

۴-۴)فرایند تخمیر در فرمنتور تحت شرایط کنترل شدهٔ pH ۷۵

۴-۵) مقایسهٔ اقتصادی مطالعه انجام شده حاضر و پژوهش قبلی[۶۶] در زمینه تولید اسید لاکتیک ۷۸

۴-۶) نتایج حاصل از جداسازی در جای اسید لاکتیک با استفاده از رزین

فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادها ۸۰

۵-۱) نتیجه‌گیری ۸۱

۵-۲) پیشنهادها برای ادامه کار ۸۲

مراجع ۸۴

فصـــــــل اول

مقـــدمـــــــه

در ایران، پنیر یکی از محصولات مهم لبنی تلقی می‌شود و به جهـت ارزش غذایـی خـاصی که دارد در تغذیه روزانه مردم مصرف قابل ملاحظه‌ای دارد. مصرف آن به دلیل افزایش قیمت مواد پروتئینی مشابه نظیر گوشت و تخم‌مرغ و رشد قابل ملاحظه جمعیت، به تدریـج افزایـش می‌یـابد. مصرف سرانه پنیر کشور در سال ۱۳۵۱ حدود ۲/۴ کیلوگرم بوده که این مقـدار در سـال ۱۳۶۵ بـه ۵/۵ کیلوگرم افزایش یافته است. این میزان طی سالهای ۵۹ - ۱۳۵۶ تغییرات چندانی نداشـته و در سالهای ۱۳۶۸ و ۱۳۶۹ به ۵ کیلوگرم کاهش یافته است.

چنانچه جمعیت کل کشور را در سال ۷۱ حدود ۶۰ میلیون نفر در نظر بگـیریم و بـر مبنـای رقم مصرف سرانه سال ۱۳۶۹ (۵ کیلوگرم)، کل مصرف انواع پنیر در ایران در سال ۱۳۷۱ بـالغ بـر ۳۰۰ هزار تن می‌گردد. در سال ۱۳۷۱ میزان تولید پنیر در داخل کشور، ۱۸۵ هزار تن و واردات آن از خارج ۹۰ هزار تن گزارش گردیده است.

آب پنیر دارای بار آلودگی بسیار زیاد (BOD_5 = ۴۰۰۰۰ ppm[1]) می‌باشد. بنابراین دفع آن به طبیعت مشکلات عدیده‌ای را برای محیط زیست ایجاد خواهـد کـرد. اگـر آب پنیـر اسـیدی را بـه زمینهایی که خاک آنها اسیدی است دفع کنیم، گیاهان قـابلیت رشـد و نمـو در چنیـن خاکهـایی را نخواهند داشت. بنابراین پیدا کردن راه‌حلی مناسب برای استفاده از آب پنیر در کشـور نـه تنهـا بـه

1- Biochemical Oxygen Demand

دفع آلودگی محیط زیست کمک می کند، بلکه از هدر رفتن یک ماده غذایی بسیار با ارزش نیز جلوگیری می‌نماید.

آب پنیر بطور متوسط دارای ۶ درصد مواد جامد بوده که معادل نیمی از مواد جامد شیر می‌باشد که حدود ۷۰ درصد از این مواد خشک لاکتوز، ۲۰ درصد پروتئین و بقیه آن مواد معدنی و ویتامین‌های موجود در شیر می‌باشند.

آب پنیر به دلیل داشتن منابع غذایی می‌تواند به عنوان سوبسترا برای تولید مواد بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد. تاکنون تلاشهای زیادی به منظور استفاده از آب پنیر در مقیاس آزمایشگاهی و صنعتی صورت گرفته است. یکی از این موارد تولید اسیدلاکتیک می‌باشد. تهیه اسید لاکتیک از دو جهت مورد توجه محیط زیست است. از یک طرف با کاهش بارآلودگی آب پنیر و هضم پساب کارخانجات پنیرسازی در فرایند تخمیر، نقش بسزایی در حفظ محیط زیست ایفا می‌کند. از طرف دیگر این ماده می‌تواند به عنوان مونومر در تهیه پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر[1] مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از این پلیمرها بجای پلیمرهای غیر قابل تجزیه در تولید بعضی از محصولات، علاوه براینکه تا حدود زیادی باعث کاهش بار آلودگی محیط زیست می‌گردد، در مصارف دارویی و پزشکی از اهمیت ویژه ای نیز برخوردار است.

اسید لاکتیک کوچکترین مولکولی است که دارای سه ایزومر نوری می‌باشد. ایزومرهای D(-) ، L(+) و DL که دو نوع اول فعال نوری می‌باشند و نوع سوم راسمیک می‌باشد. تولید شیمیایی ایزومرهای فعال نوری تقریباً غیر ممکن است درصورتی که در روش بیوشیمیایی، با انتخاب میکروارگانیسم مناسب می‌توان درصد بالایی از ایزومر مورد نظر را تولید کرد. از طرف دیگر برای تهیه پلیمرها، احتیاج به درجهٔ خلوص نوری بالایی از هر کدام از ایزومرهای نوری می‌باشد.

1- Biodegradeable

از میان دو ایزومر فعال نوری اسیدلاکتیک، ایزومر نوع D(-) به وسیله میکروارگانیسم‌های مختلف با درصد خلوص زیاد و راندمان بالایی قابل تولید است در صورتی که تولید L(+)- اسیدلاکتیک درفرایندهای بیوشیمیایی تا حدودی با مشکل مواجه است و معمولاً میزان تولید این ایزومر نسبت به دو ایزومر دیگر با سرعت و راندمان پایین‌تری صورت می‌گیرد. از نظر قیمت نیز ایزومر مذکور تفاوت زیادی با دو ایزومر دیگر دارد. از طرف دیگر ایزومر L(+)- اسیدلاکتیک در بدن انسان وجود دارد و دارای قابلیت سازگاری با بدن می‌باشد. پلیمرهای این ایزومر که L(+)- پلی‌لاکتیدها نام دارند، زیست سازگار[1] بوده و به عنوان ماده اولیه در ساخت وسایل و تجهیزات پزشکی و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

با توجه به مطالب بیان شده در بالا تولید اسید لاکتیک نوع L(+) از آب پنیر در فرایند تخمیر غیر مداوم[2] آب پنیر و تعیین شرایط بهینهٔ تولید، هدف اصلی این مطالعه قرار گرفت. میکروارگانیسم‌های تولید کنندهٔ این نوع ایزومر، از رشد کمتری نسبت به میکروارگانیسم‌های تولید کننده دو ایزومر دیگر برخوردارند. منبع ازت مهمترین مشکل میکروارگانیسم‌های مذکور است، زیرا باید نیتروژن به صورت اسیدهای آمینه در اختیار میکروارگانیسم قرار گیرد تا قابل استفاده برای میکروارگانیسم‌های مذکور باشد. بنابراین قسمت عمده این تحقیق صرف بهینه‌سازی منبع ازت مناسب برای رشد میکروارگانیسم تولید کننده اسیدلاکتیک شده است.

فرایندهایی که در آنها همزمان با تولید محصول، pH محیط کاهش می‌یابد، فرایندهای محدود شده توسط محصول[3] می‌باشند. تخمیر اسید لاکتیک نیز از جملهٔ این فرایندها می‌باشد. با توجه به اینکه اسیدلاکتیک تولید شده باعث کاهش شدید pH می‌گردد، اگر جداسازی و یا خنثی‌سازی محصول صورت نگیرد، عملاً فرایند تخمیر بسیار کند بوده و معمولاً زمان تخمیر، بیش

1- Biocompatible
2- Batch
3- Product inhibited

از ۱۲۰ ساعت طول خواهد کشید. بنابراین در این تحقیق جداسازی محصول از محیط کشت و تأثیر آن بر روی تولید مورد بررسی قرار گرفت.

در تولید اسیدلاکتیک به روش تخمیر بیش از ۷۰ درصد هزینه‌ها مربوط به فرایندهای جداسازی می‌باشد. فرایندهای جداسازی یا عمدتاً بسیار هزینه بر می‌باشند یا مواد مصرفی اثر بازدارندگی بر روی رشد میکروارگانیسم دارند و یا انجام فرایند جداسازی و بازیابی محصول بسیار مشکل و طاقت‌فرسا می‌باشد. بنابراین در این مطالعه رزین‌های تبادل‌یونی برای جداسازی اسید از محیط تخمیر استفاده شد. رزین مورد نظر دارای ذراتی با قطر تقریباً بزرگ می‌باشد، اثر بازدارندگی بر روی رشد میکروارگانیسم نداشته و مشکل جذب فیزیکی میکروارگانیسم بر روی رزین و گرفتگی[1] وجود ندارد. علاوه براین، فرایند جداسازی و بازیابی محصول بسیار ساده و آسان می‌باشد.

نحوه تنظیم پایان‌نامه به این صورت است که ابتدا در این فصل به عنوان مقدمه، اهداف کلی انجام این مطالعه بیان شده است. سپس در فصل دوم مطالب تئوری در مورد اسیدلاکتیک، آب پنیر و رزین‌های تبادل یونی[2] و مروری بر مطالعات انجام شده، بیان گردیده است. در فصل سوم، مواد و روشهای آزمایش ذکر شده و در فصل چهارم نتایج آزمایش ها و تحقیقات انجام شده و تحلیل نتایج، ارائه شده‌است. در فصل پنجم نیز نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادهایی برای ادامه کار عرضه شده است.

امید است با انجام این پایان‌نامه، گامی هر چند کوچک در جهت توسعه و آبادانی و استقلال میهن‌اسلامی برداشته شود و دریچه‌ای به سوی پاک‌سازی، سالم‌سازی و حفظ محیط زیست گشوده شود و روز به روز بر دانش فنی و علم بیوتکنولوژی جوانان مملکت اسلامیمان افزوده گردد. به امید داشتن ایرانی آزاد، آباد و سرافراز.

1- Fouling

2- Ion exchanger resins