چکیده

اسیدلاکتیک یک اسید آلی است که کاربردهای گسترده ای در صنایع غذایی، دارویی، چرم سازی و ... دارد و با روش شیمیایی و بیولوژیکی تولید می شود. در روش بیولوژیکی یا فرآیندهای تخمیری، اسیدلاکتیک توسط باکتری های مولد اسیدلاکتیک تولید می شود. در این پروژه اسیدلاکتیک در فرآیند تخمیر ناپیوسته از آب پنیر دپروتئینه و توسط باکتریهای لاکتوباسیلوس به عنوان باکتری مولد اسیدلاکتیک، تولید شد. به منظور بهینه سازی فرآیند، تاثیر منابع نیتروژنی مختلف بر بازدهی تولید اسیدلاکتیک بررسی شد. در طی این مطالعه منابع نیتروژنی مانند عصاره مخمر، سولفات آمونیوم، اوره و پپتون به منظور مقایسه و مشخص کردن موثر و کارآترین منبع نیتروژنی مختلف، مورد استفاده قرار گرفتند. عصاره مخمر بیشترین بازدهی را در تولید اسیدلاکتیک داشته است. همچنین غلظت لاکتوز با رقیق سازی آب پنیر مورد بررسی قرار گرفت و غلظت بهینه برای تولید اسیدلاکتیک به دست آمد. حداکثر اسیدلاکتیک تولید شده و بازدهی در محیط کشت حاوی $45\ gl^{-1}$ لاکتوز و $5\ gl^{-1}$ عصاره مخمر، به ترتیب $23/2\ gl^{-1}$ و ۰/۵۲ ٪ بوده است. برای تولید اسیدلاکتیک در تخمیر بی هوازی، فرآیند در مدت زمان انکوباسیون ۹۶ ساعت و بدون کنترل pH، انجام شد. دمای بهینه به منظور حداکثر رشد سلولی و تولید اسیدلاکتیک $32^{\circ}C$ و pH مناسب برای محیط رشد، در محدوده ۶/۵-۶ تعیین گردید.

کلمات کلیدی : اسیدلاکتیک، تخمیر پیوسته، آب پنیر، لاکتوباسیلوس

فصل اول
مقدمه

۱-۱. کلیات

آب پنیر[1] منبع مغذی لاکتوز و محصول جانبی در کارخانجات تولید پنیر می باشد. باتوجه به تولید و مصرف روز افزون پنیر ، میزان تولید آب پنیر در این کارخانجات رو به افزایش است. آب پنیر به علت حفظ مواد غذایی موجود در شیر، ارزش غذایی بالایی دارد. از سوی دیگر به علت داشتن COD[2] و BOD[3] بالا، فرآورده آلاینده به شمار می آید. در گذشته های دور، آب پنیر به محیط زیست دفع می شد که موجب کاهش اکسیژن منابع آبی بوده است. دفع آن به آب دریاها باعث به خطر افتادن زندگی آبزیان و هم چنین دفع آن به زمینهای کشاورزی، مانع رشد گیاهان و باعث تخریب محیط زیست می شده است. به علت خطرات زیست محیطی و هزینه سنگین دفع آب پنیر به محیط زیست، در سال های اخیر تلاش بسیاری برای استفاده از آب پنیر در تولیدات مختلف، شده و از دفع آن به محیط زیست پیشگیری شده است [۱]. بنابراین هم از هدر رفتن یک ماده با ارزش غذایی بالا جلوگیری شود، هم عامل موثری برای رفع آلودگی از محیط زیست باشد. میزان آب پنیر تولید شده در فرآیند تولید پنیر، بسته به نوع فرآیند متفاوت است. آب پنیر به دلیل داشتن منابع غذایی زیاد، می تواند به عنوان

---

[1] Whey
[2]-Chemical Oxygen Demand
[3] -Biochemical Oxygen Demand

سوبسترا برای تولید مواد بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد. هم چنین امروزه آب پنیر را خشک می کنند و به شکل پودر در می آورند تا از آن در صنایع مختلف و برای تولیدات غذایی انسانی از قبیل شیر خشک و تولیدات دامی، استفاده کنند. آب پنیر در بسیاری از تولیدات غذایی، پزشکی و دارویی و تولیدات بیولوژیکی مورد استفاده است. یکی از این موارد تولید اسیدلاکتیک است. اسیدلاکتیک از کربوهیدرات های زیادی تولید می شود اما آب پنیر به علت داشتن لاکتوز زیاد برای تولید اسیدلاکتیک بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از اسیدلاکتیک پلیمرهای طبیعی تخریب پذیری تولید می شود که جایگزین مناسبی برای پلی لاکتیک های زیست تخریب ناپذیر می باشد[۱]. آب پنیر شامل باکتریهای لاکتوباسیلوس بولگاریکوس[1]است که عامل تولید اسیدلاکتیک در آب پنیر هستند. این میکروارگانیسم ها با مصرف قند موجود در آب پنیر رشد میکنند و طی چرخه EMP[2] که در ادامه این فصل بیان شده، اسیدلاکتیک تولید می کنند.

اسیدلاکتیک که به اسید شیر شناخته شده است ، برای اولین بار، توسط شیمیدان سوئدی، ویلهلم شیلی[3] در سال ۱۷۸۰ از شیر ترش شده جداسازی شد [۲] و در اواخر قرن نوزدهم برای اولین بار در مقیاس تجاری تولید شد[۱] . به دلیل مصرف فراوان اسیدلاکتیک و مشتقات آن در صنایع غذایی، نساجی، دارویی، آرایشی، شیمیایی و خصوصاً پلیمری (برای تولید پلی لاکتیک ها که جایگزین مناسبی برای پلیمر های زیست تخریب ناپذیرهستند)، تولید اسیدلاکتیک در جهان رو به افزایش است. در سال ۲۰۰۸ مصرف جهانی اسیدلاکتیک در حدود ۱۵۰۰۰۰-۱۳۰۰۰۰ تن در سال بوده است که بیانگر مصرف بالای اسیدلاکتیک در سال های اخیر می باشد [۳]. اسیدلاکتیک عموما به دو روش پیوسته و ناپیوسته تولید می شود. در سیستم ناپیوسته تولید اسیدلاکتیک بیشتر است اما نرخ بازدهی در سیستم پیوسته بالاتر است [۱].

هدف این پروژه تولید اسیدلاکتیک از آب پنیر بوده است که در آن سعی شده با مقایسه افزودن منابع مغذی مختلف و به دست آوردن مقدار بهینه از آن ها، بهترین شرایط برای رشد میکروارگانیسم ها، درصد تبدیل سوبسترا (لاکتوز موجود در آب پنیر) به محصول و در نتیجه آن تولید اسیدلاکتیک به دست آید. هم چنین تولید اسیدلاکتیک با حداقل منابع مغذی مکمل و حداقل هزینه و با فرآیند تخمیر ناپیوسته صورت گرفته است.

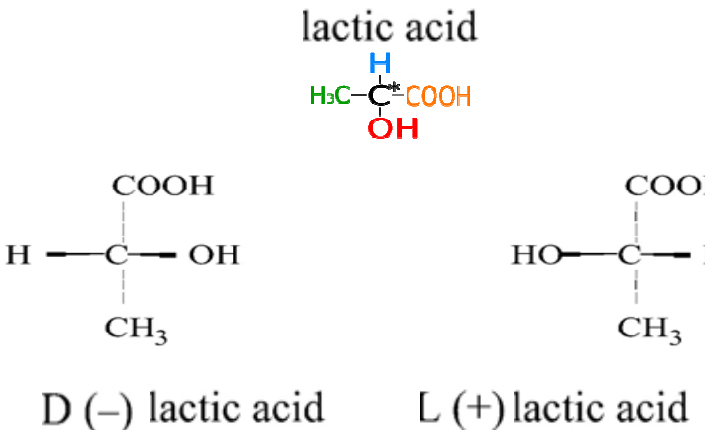
۱-۲. اسیدلاکتیک

اسیدلاکتیک یا اسیدآلفاهیدروکسی پروپانوییک یا ۲هیدروکسی پروپیونیک اسید، با فرمول شیمیایی CH_3-CHOH-COOH ترکیبی بی رنگ و اولین اسید آلی است که با روش تخمیر تولید شد . افزایش چشمگیر تولید اسیدلاکتیک در سال های اخیر، حاکی از مصرف بالای اسیدلاکتیک و مشتقات آن در

[1]- *Lactobacillus Bulgaricus*
[2] -Embden-Myerhol-Parnas Pathway
[3] -Carl Wilhelm Scheele

صنایع غذایی، دارویی و... می باشد [۳]. اسیدلاکتیک به طور طبیعی در بدن انسان وجود دارد و هم چنین در گیاهان و جانوران، با فعالیت میکروارگانیسم ها، تولید می شود. اسیدلاکتیک تقریبا توسط تمامی بافت های بدن تولید می گردد. به هنگام انجام فعالیت های ورزشی، گلوکز قند خون، مورد استفاده و سوخت وساز سلول های عضلات قرار گرفته و به ماده شیمیایی پیرووات[1] تبدیل می شود. اگر فعالیت جسم به آرامی صورت گیرد، اکسیژن کافی به راحتی در دسترس سلول قرار گرفته و پیرووات را به دی اکسیدکربن و آب تبدیل می کند و دی اکسیدکربن از بدن خارج می شود اما اگر فعالیت جسم با شدت و سرعت بیشتری انجام شود برای تبدیل پیرووات به دی اکسیدکربن و آب، اکسیژن کافی در دسترس قرار نمی گیرد و در نتیجه بخشی از پیرووات ها به اسیدلاکتیک تبدیل می شود.

اسیدلاکتیک کوچکترین مولکولی است که دارای دوایزومر فعال نوری از نوع L(+) و D(-) و هم چنین ایزومر DL که ایزومری ازنوع راسمیک و ترکیبی از L(+) و D(-) ، است، می باشد و معمولا با روش شیمیایی تولید می شود[۳] (شکل۱-۱).



شکل ۱-۱ اسیدلاکتیک و ایزومرهای آن [۳]

ایزومر فعال نوری D(-) برای بدن انسان مضر است و سازمان بهداشت جهانی مصرف آن را محدود کرده است، از این رو ایزومر نوع L(+) کاربرد بیشتری دارد. ایزومر نوع L(+)، در بدن انسان با قابلیت سازگاری بالا وجود دارد و کاربرد های زیادی در صنایع غذایی و دارویی دارد[۳]. ایزومرهای اسیدلاکتیک به دو روش شیمیایی و بیولوژیکی تولید می شود. از روش شیمیایی تنها ایزومر راسمیک، و در روش بیولوژیکی، ایزومرL(+) و D(-) و راسمیک توسط باکتریهای تولیدکننده اسیدلاکتیک تولید می شوند[۴]. یکی از کاربرد های مهم اسیدلاکتیک تولید پلیمرهای زیست تخریب پذیر است که قابلیت سازگاری با محیط زیست را داشته و کاربرد زیادی در ساخت و تولید لوازم پزشکی و دارویی دارند. این پلیمرها زمان تخریب کوتاهی دارند. خصوصیات فیزیکی پلی لاکتیک تولید شده از اسیدلاکتیک، به نوع ایزومر مورد استفاده

[1] -Pyruvate

((L(+)،D(-)، DL) برای تولید دارد. پلی لاکتیک های به دست آمده از ایزومر L(+)[1]، پلیمرهای نیمه بلوری هستند که نقطه جوش آن ها در محدوده ۱۷۵-۱۷۸ ℃ می باشد و کاربرد های گسترده ای در تولیدات پزشکی و دارویی دارد [۳]. جدول ۱-۱ نشان می دهد که هریک از میکروارگانیسم های جنس لاکتوباسیلوس ها، منحصرا یکی از انواع ایزومرهای اسیدلاکتیک را تولید می کند [۵].

جدول (۱-۱). باکتریهای تولید کننده انواع اسیدلاکتیک [۵].

نام باکتری	اسیدلاکتیک D(-)	اسیدلاکتیک L(+)	اسیدلاکتیک DL
L. acidophilus	—	—	+
L. delbrueckii subsp. bulgaricus	+	—	—
L. casei	—	+	—
L. rhamnosus	—	+	—
L. plantarum	—	—	+
L. lactic	—	+	—
Leuconostoc.	+	—	—

تولید اسیدلاکتیک، به روش بیولوژیکی کارایی بهتری نسبت به تولید آن به روش شیمیایی دارد زیرا در تولید بیولوژیکی، می توان از مواد خام نسبتا ارزانی استفاده نمود که فاکتور بسیار مهمی در هزینه فرآیند و تولید اقتصادی دارد. محیط کشت برای رشد سلولی میکروارگانیسم ها، از منابع قندی مختلف چون آب پنیر، پساب کارخانه های تولید شکر مانند ملاس، مواد ژلاتینی مانند نشاسته، گندم، ذرت و... باشد [۶،۳] در این محیط ها، میکروارگانیسم ها در طی زمانی مشخص، از منبع قندی موجود، تغذیه و رشد می کنند و طی مراحل مختلف، در حین تخمیر، اسیدلاکتیک تولید می کنند. امروزه تولید اسیدلاکتیک با روش بیولوژیکی بسیار متداول و پرکاربردتر از روش شیمیایی است. روش بیولوژیکی اسیدلاکتیک با ایمنی بیشتری تولید می شود و هیچ خطری ناشی از حضور مواد شیمیایی در آن وجود ندارد. هرچه دانسیته سلولی زیاد شود میزان اسیدلاکتیک تولید شده نیز افزایش می یابد.

با مقایسه مواد خام مذکور به عنوان منبع قندی، زمانی که منبع قندی شکر تصفیه شده و خالص باشد، خالص ترین اسیدلاکتیک تولید می شود و به علت خلوص اسیدلاکتیک تولید شده هزینه خالص سازی تا حد زیادی کاهش می یابد. از آنجایی که ارزش اقتصادی شکر بیشتر از اسیدلاکتیک است بنابراین

[1]-L-polylactic

استفاده از شکر به عنوان منبع قندی، صرفه اقتصادی ندارد و از این رو از آب پنیر، ملاس، نشاسته و... به منظور تولید اسیدلاکتیک استفاده می شود [۷] ، در این مواد خام، گلوکز و یا هر قند ۶ کربنه که به گلوکز هیدرولیز شود مانند لاکتوز عامل تولید اسیدلاکتیک است. در آب پنیر قند اولیه موجود در آن، لاکتوز می باشد که از هیدرولیز آن، گلوکز و گالاکتوز تولید می شود. گلوکز طی چرخه گلیکولیز به اسیدلاکتیک تبدیل می شود و مقدار زیادی انرژی تولید می گردد [۸].

۱-۲-۱. خواص فیزیکی و شیمیایی اسیدلاکتیک

- نقطه ذوب اسیدلاکتیک نوع L(+) ← ۵۲ °C و نوع D(-) ← ۵۴ ℃ است.
- نقطه جوش اسیدلاکتیک وابسته به فشار است ودر فشارهای مختلف ، دمای جوش آن متفاوت است.
- نقطه جوش اتمسفری اسیدلاکتیک از نوع L وD در محدوده ۳۲-۱۶ °C می باشد.
- گرمای ویژه ۱۹۰ J/mol و ضریب تعادل شیمیایی آن $۳/۷ \times ۱۰^{-۴}$ می باشد [۱].

۱-۲-۲. تولید اسیدلاکتیک

اسیدلاکتیک به طور طبیعی در بدن موجودات زنده (انسان ها و حیوانات) وجود دارد. تولید اسیدلاکتیک به دو روش زیر می باشد :

۱. روش شیمیایی

- ترکیب استالدئید با مونوکسید کربن در دمای ۲۰۰℃ و فشار ۴۰۰ اتمسفر
- واکنش هیدروکسید نقره با اسید بروموپروپانوئیک
- اکسیداسیون ۱و۲ پروپان دی ال با پرمنگنات [۱]

۲. روش بیولوژیکی

- روشی بر مبنای تخمیر و بر اساس فعالیت های باکتریایی و میکروارگانیسمی می باشد که در آن می توان از رشد و فعالیت میکروارگانیسم های موجود در محیط کشت (باکتریهای تولیدکننده اسیدلاکتیک[1]) به محصول مورد نظر رسید. مواد خام مورد استفاده به عنوان سوبسترا در تولید بیولوژیکی اسیدلاکتیک در طبیعت به فراوانی یافت می شود. از این لحاظ این روش از روش شیمیایی بهتر و مفیدتر است. امروزه ۹۰٪ اسیدلاکتیک با روش بیولوژیکی تولید می شود[۹].

۱-۲-۳. موارد مصرف اسیدلاکتیک

اسیدلاکتیک در صنایع مختلف دارویی، غذایی، پلیمری و شیمیایی و به طور طبیعی در بدن موجودات زنده از انسان ها، حیوانات و گیاهان مورد استفاده است .

---

[1] - LAB=Lactic Acid Bacteria

- **صنایع دارویی :**

- در داروها برای کاهش pH، کاربرد در لوازم پزشکی و بهداشتی مثل نخ بخیه و...

- **صنایع غذایی :**

- در قنادی و شیرینی پزی ها برای کوتاه کردن دیرجوشی نبات وصمغ میوه جات، افزایش ماندگاری و کاهش چسبندگی در شیرینی جات، ایجاد طعم ملایم و...
- نقش ضد میکروبی در شیر و ماست و عامل اسیدی کننده در تولیدات لبنی
- در سالاد و چاشنی ها به عنوان طعم دهنده وعامل ایجاد پایداری در مقابل فرآیندهای میکروبی
- نگهدارنده گوشت، مرغ و ماهی و بالا بردن ماندگاری آ ن ها و استفاده در بسته بندی این مواد
- در تولید نوشابه و نوشیدنیهای جوشان برای تنظیم اسیدیته
- تولید شوری های مختلف مثل خیار، کلم و...
- افزودنی خوراک دام و طیور برای ترقی دادن خاصیت غذایی خوراک
- مکمل غذایی برای حفظ و بالا بردن عطر و طعم در مواد غذایی [۴،۲].

- **صنایع شیمیایی :**

- در پاک کننده ها عامل پوسته زدایی میکروبی و عامل آنتی باکتری درضدعفونی کننده ها
- کاربرد در چرم سازی، تثبیت رنگ در منسوجات، تولید دیسک کامپیوتری و تولید روکش ماشین [۹].

- **صنایع پلیمری :**

امروزه تولید اسیدلاکتیک رو به افزایش است و بیشترین کاربرد اسیدلاکتیک در تولید پلیمرهای پلی لاکتیک است. تولید این پلیمرها، نقش بسیار موثری در صنایع پلیمر دارد، چون پلی لاکتیک اسیدها[1] زیست تخریب پذیرند (زمان تخریب کوتاه) و جایگزین مناسبی برای پلیمرها و پلاستیک های زیست تخریب ناپذیرند و از این رو نقش موثری نیز در کاهش بار آلودگی محیط زیست دارند [۱۰]. پلی لاکتیک ها به علت مقاومت بالا ، شکل پذیری حرارتی و زمان تخریب کوتاهی که دارند، بسیار مفیدند و امروزه درصدد تولید روز افزون آن ها هستند [۱۱].

۱-۲-۴. باکتریهای تولید کننده اسیدلاکتیک

لاکتوکوکوس[2]، لاکتوباسیلیوس[3]، استرپتوکوکوس[4]، لیوکنوستوک[1] و پدیوکوکوس[2]، مهمترین باکتریهای تولید کننده اسیدلاکتیک هستند. این باکتری ها، گرم مثبت ، بی رنگ، بی هوازی اختیاری، غیر سمی،

---

[1] -PLA
[2] -*Lactococcus*
[3] -*Lactobacillus*
[4]- *Streptococcus*

کاتالاز منفی و بدون اسپور می باشند و برای رشد این میکروارگانیسم ها شرایط بی هوازی ترجیح داده می شود[۷]. در این میان لاکتوباسیلوس ها با ۱۰۰ شاخه و زیر شاخه بزرگترین دسته باکتری تولید کننده اسیدلاکتیک هستند که میله ای شکل هستند و به صورت زنجیره در کنار هم قرار می گیرند. این باکتری ها تخمیرکننده منبع قندی هستند و تحت شرایط بی هوازی بهتر رشد می کنند [۱۲].

باکتریهای مولد اسیدلاکتیک از حدود ۴۰۰۰ سال پیش، به عنوان مخمر مورد استفاده بو ده اند و به دلیل امن و غیر سمی بودن، کاربرد زیادی در صنایع غذایی دارند [۳]. این ارگانیسم ها برای رشد خود به فاکتور های رشد چون ویتامین ها، آمینواسیدها، اسیدهای چرب، ویتامین ها و... نیاز دارند و با حضور این منابع مغذی اسیدلاکتیک بیشتری تولید می کنند[۱۴،۱۳]. باکتری های مولد اسیدلاکتیک بسته به نوع آن ها در محدوده دمایی ۵-۴۵ ℃ رشد می کنند. این میکروارگانیسم ها در محیط اسیدی مقاومت می کنند، اما تولید اسید و در نتیجه آن کاهش pH، نقش ممانعت کننده برای رشد آن ها را دارد و با کاهش آن رشد . دانسیته سلولی کاهش می یابد. سرعت رشد سلولی مستقیما به عواملی چون دما، pH، غلظت سوبسترا و غلظت محصول بستگی دارد. در این محیط محصول عامل محدودکننده فرآیند است [۱۵].

باکتریهای مولد اسیدلاکتیک به دو دسته تقسیم می شوند :

۱- هموفرمانتیو[۳] ۲- هتروفرمانتیو[۴]

باکتریهای هموفرمانتیو، بیش از ۸۵٪ اسیدلاکتیک تولید می کنند و به ازای تخمیر ۱ مول گلوکز، ۲ مول اسیدلاکتیک تولید می کنند و دو مول انرژی[۵] طی این فرآیند تولید می کنند. باکتریهای هتروفرمانتیو تنها ۵۰٪ اسیدلاکتیک تولید میکنند و قند باقی مانده، اسیداستیک، دی اکسید کربن و الکل تولید می کند. این نوع باکتری ها به ازای مصرف ۱ مول گلوکز تنها ۱ مول اسیدلاکتیک تولید و بقیه قند ۱ مول انرژی و ۱ مول از دیگر محصولات جانبی را تولید می کند. نوعی از باکتری های هتروفرمانتیو اسیدلاکتیک نوع DL ، اسیداستیک و دی اکسیدکربن تولید می کنند. اغلب باکتر ی های تولیدکننده اسیدلاکتیک جز هموفرمانتیوها می باشند. باکتریهای موجود در آب پنیر که به عنوان سوبسترا برای تولید اسیدلاکتیک مورد استفاده است هموفرمانتیو هستند یعنی باکتری هایی که در آب پنیر رشد داده می شوند (لاکتوباسیولوس دلبروئکی که زیر مجموعه لاکتوباسیلوس بولگاریکوس می باشند) بخش اعظم لاکتوز مصرفی را به اسیدلاکتیک تبدیل می کنند و مقدار بسیار اندک اسید استیک تولید می شود [۶،۳]

۱-۳. آب پنیر[۶]

---

[1] -*Leuconostoc*
[2] -*Pediococcus*
[3] -Homofermentative
[4] -Heterofermentative
[5]-Adenosine Triphosphate
[6] -Whey

آب پنیرمحصول جانبی کارخانجات پنیرسازی است و مایعی است که پس از حذف چربی و کازئین شیر طی فرآیند تولید پنیر حاصل می شود. به طور متوسط از هر ۱۰ کیلوگرم شیر ، یک کیلوگرم پنیر و ۹ کیلوگرم آب پنیر بدست می آید که نشان دهنده حجم بالای آب پنیر تولید شده است [۱]. آب پنیر بطور متوسط دارای ۹ درصد مواد جامد بوده که معادل نیمی از مواد جامد شیر میباشد که بخش عمده این مواد خشک محلول، لاکتوز و باقی آن پروتئین و مواد معدنی و ویتامینهای موجود در شیر می باشند. آب پنیر بخش زیادی از مواد مغذی شیر را دارد، و از این لحاظ ارزش غذایی بالایی دارد و به عنوان سوبسترا برای تولیدات بیولوژیکی، مورد استفاده قرار میگیرد. در این فرآیند شیر تحت دما و فشار معینی از غشایی عبور می کند که مولکول های کوچک را از خود عبور می دهد و مانع از عبور مولکول های بزرگتر میگردد. آب و لاکتوز و املاح که از مولکول های کوچک تشکیل شده اند از صافی عبور کرده و چربی و پروتئین که عموما از مولکول های بزرگتر تشکیل یافته اند نمی توانند از آن عبور نمایند. شیر بعد عبور از فرآیند اولترافیلتراسیون[1] به دو بخش نفوذ پذیر(آب، لاکتوز، املاح) و نفوذناپذیر(آب، چربی، پروتئین، لاکتوز و املاح) تقسیم می گردد. با به کارگیری این سیستم در تولید پنیر، پروتئین و چربی شیر در پنیر باقی می ماند و ارزش غذایی پنیر را بالا می برد. از اینرو، انجام فرآیند اولترافیلتراسیون، درفرآیند تولید پنیر، بسیار متداول است [۱۶] . در این فرآیند ذرات با سایز کمتر از مقدار میانگین ۰/۰۵ میکرون، از صافی عبور و باقی ذرات روی غشا باقی می مانند. مقدار وزن مولکولی[2] ذراتی که از غشا عبور می کنند و اصطلاحا مقدار Cut off در این فرآیند برابر ۲۰۰۰۰۰ دالتون یا ۲۰۰ کیلو دالتون بوده است. بخش نفوذ پذیر از غشا، که همان فراپالایش[3] است، بخشی از مواد آلی و معدنی و تمامی پروتئین خود را از دست داده است و تا حدودی بار آلودگی آن کاهش می یابد اما به علت حضورمقدار زیادی لاکتوز و نمک های معدنی، COD آن هم چنان بالا میماند و در نتیجه آلاینده محسوب می شود. امروزه آب پنیر را بعد از عبور از فرآیند اولترافیلتراسیون به خشک کن ها می برند وآن را به صورت پودر در می آورند و از پودر آن در تولید نان و بیسکوییت و در غذای دامی حیوانات استفاده می کنند [۱۲]. منبع قندی آب پنیر، لاکتوز می باشد که انجام واکنش هایی به گالاکتوز و گلوکز هیدرولیز می شود که راحت تر توسط لاکتوباسیلوس ها به مصرف می رسند و تبدیل به اسیدلاکتیک می گردند. نوع و ترکیب اجزای آب پنیر در کارخانجات تولید پنیر، بستگی به تکنیک مورد استفاده برای جداسازی کازئین (ماده پروتئینی شیر) از شیر دارد. آب پنیردو نوع است : آب پنیرشیرین (pH<۶) و آب پنیر اسیدی (pH<۵) . آب پنیر شیرین در نتیجه انعقاد آنزیمی پروتئین های شیر و آب پنیراسیدی در نتیجه تولید پنیر به وسیله اسیدی کردن شیر حاصل می شود. تفاوت اصلی در آب پنیراسیدی و آب پنیر شیرین، میزان اسیدی بودن و مقدار مواد معدنی آن ها است. در ایران فقط آب پنیر شیرین تولید می شود که ترکیب آن در جدول (۱-۲) نشان داده شده است [۱].

---

[1]-Ultra filtration
[2]-MW(molecular weight)
[3]-Permeate

جدول (۱-۲). ترکیب اجزای آب پنیر شیرین[۵].

اجزای تشکیل دهنده	آب پنیر شیرین ($g.l^{-1}$)
موا د جامد کل	۶۳-۷۰
لاکتوز	۴۶-۵۲
پروتئین	۶-۱۰
کلسیم	۰/۴-۰/۶
فسفات	۱-۳
لاکتیت	۲
کلراید	۱/۱

همانطور که در جدول نشان داده شده است، بعد از آب، ترکیب اصلی در آب پنیر، لاکتوز است. از کل جامدات محلول در آب پنیر (حدودا ۹٪) ۷۲-۷۰٪ لاکتوز، ۱۰-۸٪ پروتئین و ۱۵-۱۲٪ مواد معدنی می باشد که با روش تجربی به دست آمده است[۵].

ویتامین های موجود در آب پنیر، تیامین، ریبوفلاوین، پیرودوکسین، کوبالامین، نیاسین، فولاسین، اسید پنتوتنیک و بیوتین می باشد.

هم چنین ترکیبات پروتین آب پنیر در جدول ۱-۳ نشان داده شده است.

جدول (۱-۳). پروتئین های موجود در آب پنیر و ترکیب آن ها

ترکیب پروتئین	وزن ملکولی (کیلودالتون)	٪ پروتین آب پنیر
بتا لاکتو گلوبولین	۱۸/۳	۵۰
آلفا لاکتالبومین	۱۴	۱۲
ایمونوگلوبولین	۱۵-۱۰۰	۱۰
سرم آلبومین	۶۹	۵
پروتئوزپپتون	۴۰/۸-۴۱	۲۳

۱-۳-۱. مشخصات فیزیکی آب پنیر

- ✓ آب پنیر مایعی سبز مایل به زرد است و بسته به مقدار لاکتوز و املاح معدنی موجود در آن ، میزان ترشی یا شیرینی متفاوت دارد.
- ✓ دانسیته برای انواع آب پنیرها متفاوت است و در محدوده ($Kg.m^{-3}$) ۱/۲۲ – ۱/۱ متغیر می باشد.
- ✓ ویسکوزیته آب پنیرعاری از چربی و کازئین شیر، با تغییر دما تغییر میکند. آب پنیر جز سیالات نیوتنی محسوب می شود.
- ✓ کشش سطحی در آب پنیر با کاهش دما و افزایش مقدار جامدات، زیاد می شود و در محدوده N/m^2 ۳۰۰۰۰-۸۴۰۰۰ می باشد [۱].

- ✓ COD = ۴۰۰۰۰-۶۰۰۰۰ ($mg\ O_2/\ L$) [۱۶]
- ✓ BOD = ۴۰۰۰۰ ($mg\ O_2/\ L$) [۱]

۱-۳-۲. مصارف آب پنیر

- استفاده در جیره غذایی دامها
- در تهیه نوشیدنیهای ورزشی، نوشیدنیهای انرژی زا، آب میوه های تقویتی، نوشیدنیهای لبنی
- جایگزیی برای پروتئین تخم مرغ در محصولات شیرینی پزی و نانوایی
- جایگزینی در محصولات لبنی مثل بستنی
- شیرینی و بیسکویت سازی
- مصرف در امولسیون کننده های ترکیباتی چون سوسیس، سوپها، کیکها، سالادها و نوشیدنی ها
- تهیه ماست و دوغ
- تولید اتانول
- تولید اسیدلاکتیک و اسیدسیتریک
- تولید پروتئین های حیاتی و پروتئین تک سلولی
- تولید لاکتوز و گلوکز
- استفاده در داروها و تهیه پنی سیلین
- تهیه خوراک کودک

۱-۴. تولید اسیدلاکتیک از آب پنیر

همان طور که ذکر شد از تخمیر منبع قندی موجود در محیط کشت توسط باکتری ها، و در نتیجه آن رشد و تکثیر سلولی، اسیدلاکتیک تولید می شود. تولید اسیدلاکتیک از آب پنیر با قند لاکتوز طی چرخه

EMP (خلاصه ای از این واکنش های بیوشیمیایی در رابطه ۱-۱ ذکر شده است) که در شکل (۱-۲) نشان داده شده است.

(رابطه ۱-۱)

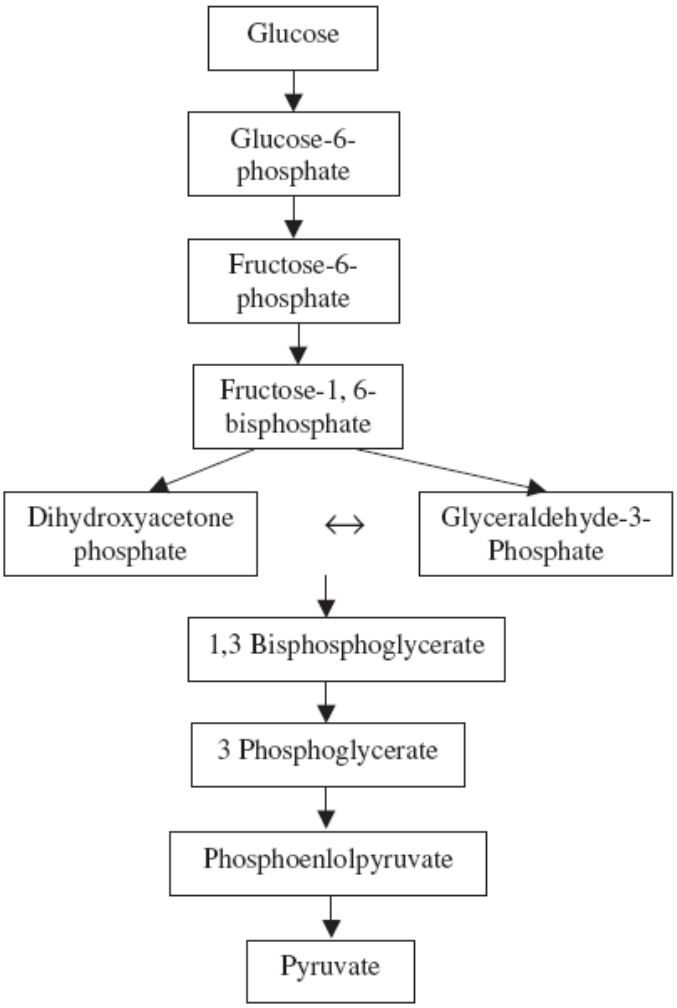
EMP

$$Lactose \rightarrow Galactose + Glucose$$

$$Glucose + 2\ Pi^{1} + 2\ ADP^{2} \rightarrow 2\ Lactate + 2\ ATP^{3} + 2H_2O$$

$$Glucose \rightarrow 2\ Lactic\ Acid$$

[۱]



شکل ۱-۲. چرخه EMP [۳]

[1] -Inorganic Phosphate
[2] -Adenosin Diphosphate
[3] -Adenosin triphosphate

در شکل ۱-۲ دیده می شود که از گلوکز پیرووات تولید شده است. این ماده در شرایط بی هوازی تبدیل به اسیدلاکتیک می شود. تولید اسیدلاکتیک یک فرآیند محدود شونده توسط محصول[1] است

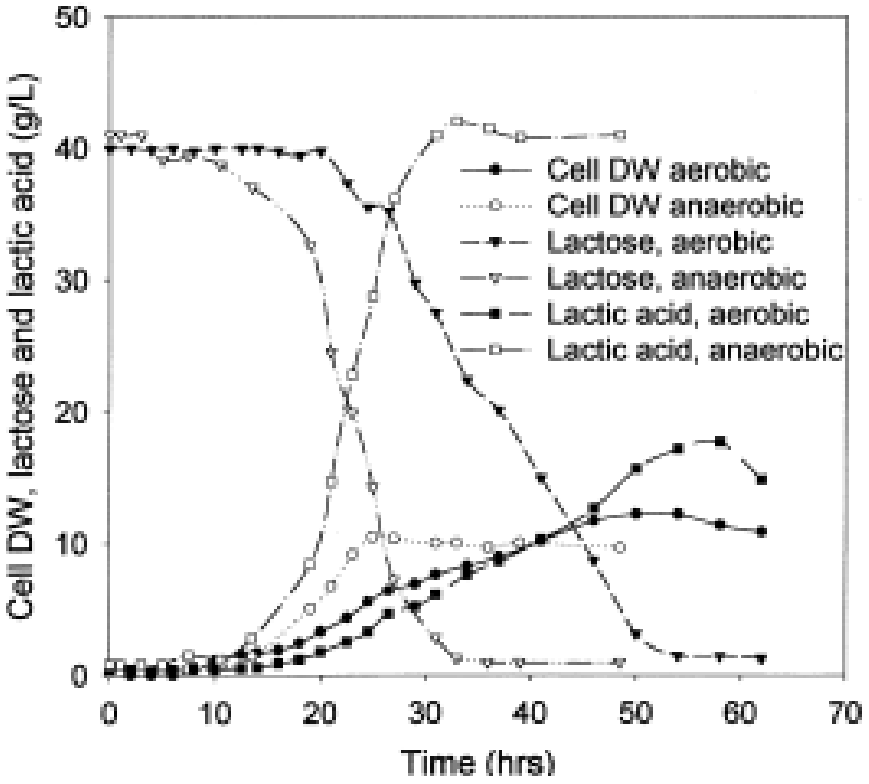
۱-۵. عوامل موثر بر فرآیند تولید

- محیط رشد باکتری (حضور و عدم حضور اکسیژن) و نوع باکتری که اسید لاکتیک تولید می کند
- مقدار مواد جامد موجود در آب پنیر
- افزودن مواد مغذی به مقدار مناسب جهت رشد باکتری
- نوع فرآیند تخمیر (پیوسته یا ناپیوسته)
- pH
- دما [۱۷،۷].

۱-۵-۱. محیط رشد باکتری

لاکتوباسیلوس ها باکتریهای بی هوازی اختیاری هستند و به صورت اختیاری عمل می کنند و بنابراین نیازی نیست که بیورکتور ها در شرایط خروج کامل اکسیژن کار کنند. با وجود این اگر مقدار کمی اکسیژن موجود باشد، مقداری پراکسید هیدروژن تولید می شود[۱۸] . فو[2] در سال ۱۹۹۸ آزمایشی ترتیب داد که در آن تولید اسیدلاکتیک در محیط هوازی و بی هوازی مقایسه شد. میکروارگانیسم فعال در این آزمایش باکتری لاکتوباسیلوس پلنتارم[3] بوده است که در شرایط هوازی و بی هوازی رشد می کند. برای این میکروارگانیسم با سوبسترای لاکتوز نشان داده شده که رشد و فعالیت سلول ها در شرایط بی هوازی سریع تر از شرایط هوازی است. شکل۱-۳ روند تغییرات لاکتوز، جرم خشک سلولی و اسیدلاکتیک را نشان می دهد و دیده می شود که در شرایط بی هوازی سرعت تولید اسیدلاکتیک و افزایش جرم خشک سلولی و هم چنین کاهش غلظت لاکتوز، کمتر از تخمیر هوازی است. در این آزمایش $g.l^{-1}$ ۱۸ در شرایط هوازی و $g.l^{-1}$ ۴۲ اسیدلاکتیک در شرایط بی هوازی تولید شد که بیانگر آن است که بازده تولید اسیدلاکتیک در تخمیر بی هوازی که ۲/۳ برابر بیشتر از تخمیر هوازی است[۱۵].

[1]-End-Product Inhibition
[2]-Fu
[3]-Lactobacillus Plantarum



شکل ۱-۳. مقایسه تخمیر در حالت هوازی و بی هوازی [۱۵].

۱-۵-۲. تاثیر انواع باکتری لاکتوباسیلوس بر تولید اسیدلاکتیک

تحقیقات قاسمی[1] در سال ۱۳۸۷ نتایج تحقیقات هوجانن[2] و همکارانش در سال ۱۹۹۶،را مورد بررسی قرار داد که در آن مطالعه ای در تاثیر دو نوع باکتری *L. rhamnosus* و *L. casei*، برمیزان تولید اسیدلاکتیک، با منبع کربن گلوکز خالص و در دمای ۴۱ ℃ انجام شد. نتایج تحقیقات در جدول ۱-۶ نشان می دهد، که انواع مختلف باسیلوس ها، میزان اسیدلاکتیک متفاوتی تولید می کنند. در میان دو باکتری بررسی شده در جدول ۱-۴ که منبع قندی هردوی آن ها گلوکز می باشد، لاکتوباسیلوس کازئی اسیدلاکتیک بیشتری تولید می کند[۱].

[1]-Ghasemi
[2] -Hujanen

جدول (۱-۴). تاثیر نوع باکتری بر تولید اسیدلاکتیک در فرآیند ناپیوسته[۱]

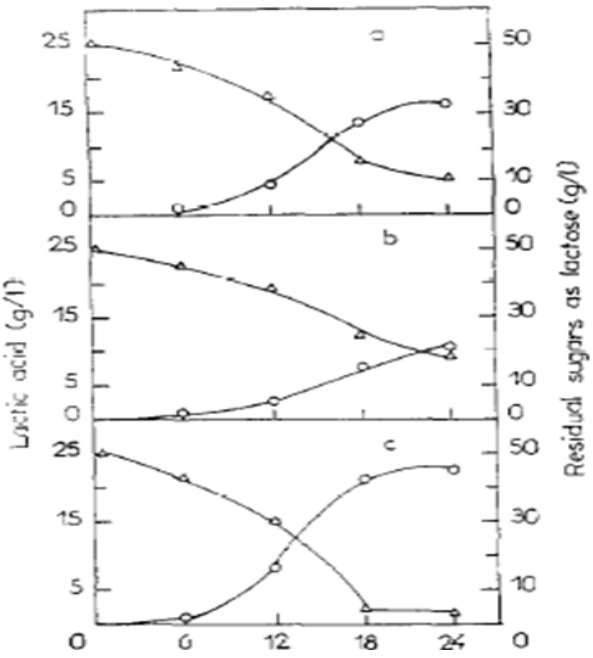
ارگانیسم	سوبسترا	غلظت اسیدلاکتیک (gl^{-1})
L. rhamnosus	گلوکز	۶۸
L .casei	گلوکز	۸۲

در جدول ۱-۵ غلظت اسیدلاکتیک تولید شده در زمان معین (۲۴ ساعت)، و غلظت قند باقی مانده نشان داده شده است. در محیط اول ارگانیسم تولید کننده اسیدلاکتیک، *L. casei*، محیط دوم *L. lactic* و محیط سوم حاوی مخلوطی از لاکتوباسیلوس ها می باشد.

جدول (۱-۵) .تاثیر نوع باکتری بر تولید اسیدلاکتیک از آب پنیر دپروتئینه در فرآیند ناپیوسته [۱۷]

ارگانیسم	سوبسترا ($۲۵\ gl^{-1}$)	لاکتوز باقیمانده (gl^{-1})	غلظت اسیدلاکتیک (gl^{-1})
L. casei	لاکتوز	۹/۸	۱۵/۶
L. lactic	لاکتوز	۱۲/۷	۱۰/۸
Mix culture	لاکتوز	۴/۵	۲۳/۲

نتایج نشان می دهد که هر یک از محیط های مذکور، کارایی متفاوتی در مصرف لاکتوز و تولید اسیدلاکتیک داشته اند. در هر سه محیط کشت، با گذشت زمان، قند باقی مانده در محیط کمتر میشود. یعنی، قند بیشتری توسط باکتری ها مصرف شده ودر نتیجه آن،اسیدلاکتیک بیشتری تولید شده است. با مقایسه در این سه محیط می توان دریافت که لاکتوباسیلوس کازئی بیشتر از لاکتوباسیلوس لاکتیک، اسیدلاکتیک تولید می کند و این مقدار در محیط کشت ترکیبی از چندین نوع باکتری، افزایش قابل توجهی داشته است. شکل ۱-۴ توضیحات مذکور را تایید می کند.



شکل ۱-۴ . تاثیر انواع متفاوت باکتری بر تولید اسیدلاکتیک [۱۷]

تولید اسیدلاکتیک از آب پنیر دپروتئینه توسط باکتری (a) *L. casei* و (b) *L. lactic* و (c) محیط mix از باکتری ها در فرآیند ناپیوسته (Δ) قند(لاکتوز) و (○) اسیدلاکتیک

نتایج حاکی از آن است که استفاده از محیط کشتی حاوی مخلوطی از لاکتوباسیلوس ها[1] به جای یک نوع باکتری، کارایی بالاتری خواهد داشت [۱۷].

۱-۵-۳. مقدارمواد جامد موجود در آب پنیر

وجود مواد آلی و معدنی در آب پنیر عامل محدود کننده برای رشد میکروارگانیسم هاست، بنابراین لازم است این ذرات با فرآیند فیلتراسیون از آب پنیر جدا شوند تا مانع از تغذیه و رشد میکروارگانیسم ها نگردند. بدیهی است که آب پنیر فیلتر شده اسیدلاکتیک بیشتری تولید می کند که جدول ۱-۶ بیانگراین مطلب است. تحقیقات قاسمی[2] در سال ۱۳۸۷، نتیجه تحقیقات روکاس[3] و کتزیکیدن[4] در سال ۱۹۹۸ را مورد بررسی قرار داد که در آن تخمیر در در دمای ۳۲ ℃ و باکتری لاکتوباسیلوس کازئی، انجام شد[۱].

[1] -Mixed culture
[2]-Ghasemi
[3]-Roukas
[4]- Kotzekidoun

جدول (۱-۶). تاثیر فرآیند فیلتراسیون بر رشد ارگانیسم و تولید اسیدلاکتیک [۱]

آب پنیر	ارگانیسم	اسیدلاکتیک (gl^{-1})
فیلتر شده	*L. casei*	۱۶
فیلتر نشده	*L. casei*	۱۱

نتایج در جدول۱-۶ حاکی از آن است که تولید اسیدلاکتیک از آب پنیر فیلتر شده، در شرایط مشابه از دما و نوع میکروارگانیسم، تاحدودی بالاتر از آب پنیر فیلتر نشده است. بنابر این بهتر است شیر را پس از افزودن آنزیم و در نتیجه آن منعقد شدن مولکول ها، از فرآیند اولترافیلتراسیون عبور دهند تا با حذف بخشی از مواد جامد و پروتئین های موجود در آن، تجمع مولکول های بزرگ در محیط و ممانعت های حاصل کاهش و مقدار اسیدلاکتیک تولید شده افزایش می یابد. زیرا با منعقد شدن مولکول ها امکان دسترسی سلول ها به مواد مغذی موجود در محیط کاهش و در نتیجه آن، میزان اسیدلاکتیک تولید شده کاهش یابد [۱].

۱-۵-۴. افزودن مواد مغذی به مقدار مناسب جهت رشد باکتری

باکتری ها برای رشد خود نیاز به مواد مغذی دارند. آب پنیر حاوی مقدار زیادی لاکتوز است، اما لاکتوز به تنهایی برای رشد بایومس، کافی نیست. از این رو افزودن منابع غذایی دیگر، لازم و ضروریست. اغلب باکتری های تولید کننده اسیدلاکتیک به منبع مغذی مکمل چون آمینواسیدها، اسیدهای چرب، ویتامین ها و ... برای رشد و تکثیر خود نیاز دارند.. منبع نیتروژن بخش مهمی از این افزودنی هاست. نمونه ای از این این افزودنی ها: عصاره مخمر[۱]، عصاره گوشت[۲]، پپتون[۳]، عناصر فلزات واسطه، فسفات پتاسیم[۴] و آمونیوم سولفات[۵] و اوره و ویتامین B ... می باشند [۱۹] . تحقیقات دانشمندان نشان داده است که در میان منابع نیتروژنی، عصاره مخمر بیشترین تاثیر را در تولید اسیدلاکتیک دارد و افزایش آن باعث ازدیاد تولید اسیدلاکتیک خواهد بود [۲]. نانسیب[۶] در سال ۲۰۰۳ تاثیرات غلظت عصاره مخمر را بر دانسیته سلولی و تولید اسیدلاکتیک را بررسی کرده است. جدول ۱-۷ نتایج این تحقیق را نشان می دهد.

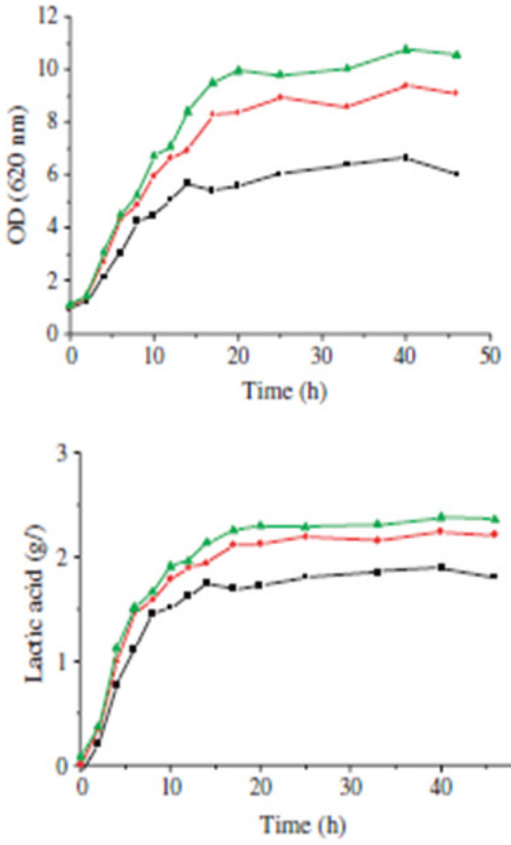
---

[1] -Yeast extract
[2] -Meat extract
[3] -Peptone
[4] -K_2HPO_4
[5] -$(NH4)_2SO_4$
[6] -Nancib

جدول (۱-۷). تاثیر غلظت عصاره مخمر بر رشد سلولی و تولید اسیدلاکتیک با (gl^{-1}) ۵۰ گلوکز اولیه توسط *L. casei* subsp. *rhamnosus* [۲۰]

غلظت عصاره مخمر (gl^{-1})	دانسیته سلولی (OD at 620 nm)	اسیدلاکتیک (gl^{-1})
۰	۶/۱۵	۱/۷
۱۰	۸/۵	۲/۴
۲۰	۱۰/۲	۲/۶

نتایج حاکی از آن است که اسیدلاکتیک تولید شده در محیط کشت غنی شده با عصاره مخمر بیشتر از محیط غنی نشده است و هر چقدرغلظت عصاره مخمر بیشتر شود، دانسیته سلولی و در نتیجه غلظت اسیدلاکتیک تولید شده افزایش می یابد. شکل ۱-۵ نتایج تحقیقات نانسیب و همکارانش در سال ۲۰۰۳ می باشد که در آن روند رشد میکروارگانیسم ها و تولید اسیدلاکتیک نسبت به زمان نشان داده شده است [۲۰].



شکل ۱-۵. تاثیرغلظت عصاره مخمربر رشد سلولی و تولید اسیدلاکتیک
(■) ۰ gl^{-1} و (▲) ۲۰ gl^{-1} و (●) ۱۰ gl^{-1} [۲۰]

نانسیب در این آزمایش نشان داد که با افزایش غلظت عصاره مخمر از (gl^{-1}) ۰ تا ۱۰ تولید اسیدلاکتیک افزایش قابل توجهی داشته است اما با ازدیاد غلظت عصاره مخمر از (gl^{-1}) ۱۰ تا ۲۰ غلظت اسیدلاکتیک تولید شده تنها ۸٪ افزایش یافت که با توجه به هزینه بالای عصاره مخمر و برای ممانعت از تجمع سلولی، ازاین مقدار افزایش در تولید صرف نظر و غلظت بهینه عصاره مخمر در این فرآیند (gl^{-1}) ۱۰ تعیین شد.

دانسیته سلولی[1] معیار رشد میکروارگانیسم هاست و با میزان قند باقی مانده نسبت عکس دارد. هر چه مقدار قند بیشتری مصرف شود رشد سلولی افزایش پیدا خواهد کرد. یعنی میکروارگانیسم ها، مدام قند را مصرف می کنند و تکثیر می شوند و در شرایط بهینه، اسیدلاکتیک تولید می کنند. میزان رشد میکروارگانیسم ها در این آزمایش، برای نمونه های بدون رقت گزارش شده است زیرا مقدار جذب نور در اسپکتوفتومتر، در محدوده ۰-۰/۹۹ می باشد و باید نمونه را رقیق نمود تا میزان جذب نور در بازه ذکر شده قرار بگیرد .

تحقیقات ابوزید[2] در سال ۱۹۹۳ نیز، نتایج مذکور را تایید می کند و نشان می دهد که عصاره مخمر بیشترین تاثیر را بر رشد سلولی و در نتیجه آن، تولید اسیدلاکتیک داشته است. جدول ۱-۸ این نتایج را نشان می دهد.

جدول (۱-۸). تاثیر غلظت عصاره مخمر بر رشدسلولی و تولید اسیدلاکتیک با (gl^{-1}) ۶۰ گلوکزاولیه، توسط *L. casei* subsp. *rhamnosus* [۱۱]

عصاره مخمر (gl^{-1})	جرم خشک سلولی (gl^{-1})	غلظت اسیدلاکتیک (gl^{-1})	گلوکز باقی مانده (gl^{-1})
۰	۲/۲	۳۰	۱۳
۵	۳/۹	۳۵	۸
۱۰	۵/۲	۴	۷/۵
۲۰	۵/۸۱	۴۶	۶
۳۰	۵/۸	۴۶	۷

جدول ۱-۸ نشان می دهد، هر چه مقدار عصاره مخمر اضافه شده بیشتر شود، جرم سلولی بیشتر می شود که بیانگر مصرف بیشتر گلوکز و تولید مقدار بیشتری اسیدلاکتیک است. تحقیقات دانشمندان نشان داده

[1] -OD =Optical Density
[2] -Abou-zeid

که وجود مقداری زیادی از عصاره مخمر به تنهایی، بازدهی تولید بیشتری نسبت به ترکیب مقدار کمتری از عصاره مخمر با پپتون خواهد داشت [۱۱]. به علت گران بودن عصاره مخمر، سعی می شود تا از ترکیب آن با سایر منابع غذایی استفاده شود تا از لحاظ اقتصادی به صرفه باشد [۹]. مواد افزودنی باید در حد لازم باشد و مقدار بهینه آن باید در تکرارآزمایش و استفاده از تجارب، انتخاب شود چرا که نقش مهمی را در چگونگی فرآیند ایفا می کند. اگر مقدار این مواد زیاد باشد، انباشتگی سلولی مانع رشد باکتری ها می شوند و در واقع سوبسترای زیاد عامل محدود کننده فرآیند[1] خواهد بود. تحقیقات دانشمندان نشان داده است که حضور ویتامین B نقش موثری در تولید اسیدلاکتیک دارد [۱۳]. نانسیب[2] و همکارانش در سال ۱۹۹۹ تاثیر منابع نیتروژنی مختلف و حضور ترکیبات ویتامینی را بر تولید اسیدلاکتیک توسط میکروارگانیسم لاکتوباسیلوس کازئی بررسی کردند. در تمامی محیط کشت ها، قند اولیه گلوکز و به میزان (gl^{-1}) ۵۰ بوده است.

جدول (۱-۹). تاثیر افزودن منابع نیتروژنی و ویتامین B بر تولید اسیدلاکتیک در ۴۰ ساعت در فرآیند ناپیوسته (غلظت اولیه گلوکز (gl^{-1}) ۵۰) [۲۰] .

منبع نیتروژن (gl^{-1})	اسیدلاکتیک (gl^{-1})		مقدار افزایش تولید با حضور ویتامین B (٪)
	بدون حضور ویتامین	با حضور ویتامین	
عصاره مخمر ۱۰	۲۴/۸	۲۴/۳	—
سولفات آمونیوم ۵/۲	۱۹	۲۳/۷	۲۴/۴۶
اوره ۲/۴	۱۴/۱	۱۱/۶	—
پپتون ۶/۹	۱۶	۱۴/۸	—
سبوس ۱۲/۶	۱۸	۲۰	۱۲/۹۴
کازئین ۱۴/۶	۱۹/۱	۲۲/۵	۱۷/۹۵

نتایج این تحقیقات در جدول ۱-۹ نشان می دهد که افزودن ویتامین B در محیطی که حاوی سولفات آمونیوم بوده است، بیشترین تاثیر را داشته و تولید اسیدلاکتیک را ۲۴/۴۶٪ افزایش داده است. حضور

[1]- Substrate inhibition
[2] -Nancib