

تأثير بعض العوامل في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش باستعمال مزرعة مختلطة لبكتريا *Lactobacillus bulgaricus* و *Streptococcus thermophilus*

سحر عدنان شيت⁽¹⁾ ووليد احمد محمود*⁽¹⁾

(1). قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، العراق.

(*المراسلة: د. وليد أحمد محمود. البريد الإلكتروني: waleedahmed53@yahoo.com).

تاريخ القبول: 2020/02/09

تاريخ الاستلام: 2020/01/04

الملخص

نفذ البحث في كلية الزراعة والغابات بجامعة الموصل خلال العامين 2018 و 2019. تم إنتاج حمض اللاكتيك من شرش جبن الحليب الجاموسي بواسطة مزرعة مختلطة لبكتريا *Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus* ودرست بعض العوامل المؤثرة في إنتاجية الحمض والتي شملت نوع وتركيز المصدرين الكربوني والنيتروجيني، وتركيز كبريتات المغنسيوم وكبريتات المنغنيز، وتركيز اللقاح، ودرجة الـ pH، ومدة التخمر. بينت نتائج التجارب التي أجريت بطريقة الوجبات وباستعمال الخلايا الحرة، حصول زيادة معنوية في إنتاجية الحمض باستعمال المزرعة المختلطة للنوعين، مقارنة بالمزرعة النقية لكل منهما. وجد أن كل من مستخلص الخميرة (12 غ/لتر)، واللاكتوز (15 غ/لتر)، هما أفضل المصادر النيتروجينية والكربونية المضافة لغرض زيادة إنتاج الحمض على التوالي. أدت إضافة كبريتات المغنسيوم بتركيز 0.35 غ/لتر وكبريتات المنغنيز بتركيز 0.05 غ/لتر إلى زيادة معنوية في إنتاج الحمض. تم الحصول على أعلى إنتاج لحمض اللاكتيك بإضافة لقاح مزيج البكتريا بتركيز 10×10^7 خلية/مل. وبلغ أقصى إنتاج للحمض عند ضبط درجة الـ pH الابتدائية لوسط الإنتاج عند 5.5 ويفروق غير معنوية في المدى 5-6.5. كما وجد أن مدة التخمر 48 ساعة كانت المفضلة لإنتاج الحمض، وكانت الزيادة في الإنتاجية غير معنوية عند تجاوز هذه المدة.

الكلمات المفتاحية: حمض اللاكتيك، الشرش، *Streptococcus thermophilus*، *Lactobacillus bulgaricus*.

المقدمة:

يعد حمض اللاكتيك (2-Hydroxypropionic acid) أكثر الأحماض العضوية انتشاراً في الطبيعة، وله تاريخ طويل من الاستعمالات والتطبيقات في مجالات الصناعات الغذائية، والصيدلانية، والكيميائية (Ouyang et al., 2013). وفي العقود الأخيرة ازداد الطلب كثيراً على هذا الحمض لاستعماله لتحضير حمض اللاكتيك المتعدد (Polylactic acid, PLA)، وهو عبارة عن بوليمر قابل للتحلل الحيوي (Biodegradable polymer) وله استعمالات هامة مثل: صناعة مواد التغليف، وصناعات الألياف ومواد الرغوة، وبعض

المواد الطبية (Rodrigues et al., 2012). بلغ الإنتاج العالمي من حمض اللاكتيك عام 2017 حوالي 370 ألف طنناً (Rodrigues et al., 2017)، ومن المتوقع أن يزداد الطلب بنسبة 16.2% سنوياً في الفترة 2019-2025 (Abdel-Rahman et al., 2019). ذكر تقرير صادر عن منظمة Grand View Research (2019) أنه من المتوقع أن تصل قيمة الطلب العالمي على حمض اللاكتيك إلى 8.77 مليار دولاراً في عام 2025.

يمكن إنتاج حمض اللاكتيك بطريقتين، الأولى هي طريقة التخليق الكيميائي، والتي يعاب عليها إنتاجها لكلي النظيرين الضوئيين للحمض، D(-) و L(+)، بشكل مزيج راسيمي. أما الطريقة الثانية فهي طريقة تخمر السكريات بواسطة الأحياء المجهرية والتي يمكنها إنتاج أحد النظيرين بشكل نقي، وبالتالي يمكن استعماله في الصناعات التي تتطلب توفر صورة نقية لأحد النظيرين بالإضافة إلى الكلفة المنخفضة لهذه الطريقة. وفي الوقت الحاضر ينتج حوالي 90% من هذا الحمض بطريقة التخمرات (Tan et al., 2018).

يعد الشرش، وهو الناتج الثانوي من صناعة الجبن، أحد أهم المشاكل التي يعاني منها أصحاب مصانع الألبان وذلك بسبب الكميات الكبيرة المنتجة منه، إذ بلغ الإنتاج العالمي منه في عام 2016 أكثر من 100 مليون طنناً، ويؤدي طرحه في مياه الأنهار والبحيرات إلى تأثيرات سلبية خطيرة للحياة المائية بسبب ارتفاع متطلباته من الأوكسجين الحيوي (BOD). يشكل الشرش 85-95% من حجم الحليب المستعمل في صناعة الجبن، وهو يحتوي على حوالي 55% من المواد الغذائية الموجودة في الحليب مثل اللاكتوز، وبروتينات الشرش، والليبيدات، والأملاح المعدنية، بالإضافة إلى بعض الفيتامينات، مما يجعله الوسط المناسب لإنتاج الكثير من المواد بطريقة التخمر (Mawgoud et al., 2016). وقد أجريت دراسات كثيرة لإنتاج حمض اللاكتيك من الشرش وبطريقتي تخمرات الوجبات والتخمرات المستمرة (Fakhravar et al., 2012; Nemeth, 2017; Thankur et al., 2018a). وفي العراق يتشكل من الشرش الناتج من الحليب الجاموسي نسبة كبيرة من المخلفات التي تطرح عادة في مياه الأنهار والمسطحات المائية، وهناك القليل جداً من الدراسات التي تناولت استغلال هذا الشرش في إنتاج مواد مفيدة. هدفت الدراسة الحالية إلى إنتاج حمض اللاكتيك من شرش الجبن المصنّع من حليب الجاموس بواسطة مزيج بكتريا *Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus* الحرة وبطريقة الوجبات ودراسة تأثير بعض العوامل في إنتاج الحمض.

مواد البحث وطرائقه:

تم الحصول على مزرعتي البكتريا *Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus* من شركة ألبان محلية. تم تنشيط المزرعتين في وسط حليب الفرز المعقم بدرجة حرارة 42°م لمدة 24 ساعة، وتم التأكد من نقاوتها بالفحص المجهرى. ثم حفظت في الثلاجة (4°م) لحين الاستعمال. تم حساب تركيز الخلايا باستعمال طريقة الأطباق المصبوبة.

الشرش: تم الحصول عليه كناتج ثانوي لتصنيع الجبن الأبيض من الحليب الجاموسي باستعمال المنفعة الميكروبية. وزع الشرش في أكياس من النايلون وحفظ بالتجميد لحين الاستعمال. عند الاستعمال تمت إذابة الشرش المجمد ثم سخن بدرجة حرارة 90°م لمدة 20 دقيقة لترسيب البروتينات والتي أزيلت بالطرد المركزي بسرعة 4000 g× لمدة 15 دقيقة وحسب الطريقة الموصوفة من قبل Mawgoud et al., (2016).

تقدير تركيز اللاكتوز في الشرش: اتبعت الطريقة التي ذكرها (Ghasemi et al., 2009) والتي تعتمد في قياس تركيز السكر المختزل (اللاكتوز) بتفاعله مع مركب 3,5-dinitrosalicylic acid في وسط قاعدي ليتحول المركب الأخير إلى 5-amino-3-

nitrosalicylic acid ذي اللون البرتقالي والذي تم قياس الامتصاص الضوئي له عند طول موجي مقداره 540 نانومتر. وتعتمد شدة اللون الناتج على تركيز السكر المختزل.

عملية التخمير وإنتاج حمض اللاكتيك بواسطة الخلايا الحرة: وزّع الشرش في دوارق مخروطية سعة 100 مل بواقع 25 مل لكل دورق وعقم بدرجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة ثم برد ولقح بمعلق البكتريا بتركيز 10×10^7 خلية/مل. تم تحضين الدوارق لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 42°م. بعد انتهاء التخمير أجريت عملية طرد مركزي بسرعة 5000 g. وقدّر تركيز حمض اللاكتيك في راسح المزرعة. وتم حساب كفاءة إنتاج الحمض باستعمال المعادلة الآتية (Ghaly *et al.*, 2003):

الحاصل الحقيقي للمنتج (غ/ليتر)

$$\text{كفاءة الإنتاج (\%)} = \frac{\text{الحاصل النظري للمنتج (غ/ليتر)}}{100} \times 100$$

الحاصل النظري للمنتج (غ/ليتر)

حيث أن: الحاصل النظري لحمض اللاكتيك من التخمير المتجانس = $0.95 \times$ نسبة اللاكتوز (غ/ليتر)

تقدير حمض اللاكتيك: تم اتباع الطريقة التي ذكرها Borshchevskaya *et al.*, (2016) حيث تعتمد الطريقة على قياس الامتصاص الضوئي لمركب لاكتات الحديدك ذي اللون الأصفر المخضر، والناتج من تفاعل اللاكتات مع كلوريد الحديدك (FeCl_3) عند طول موجي 405 نانوميتر.

تأثير نوع المصدر النتروجيني في إنتاج حمض اللاكتيك: أضيفت بعض المصادر النتروجينية بتركيز 10 غ/ليتر إلى وسط الشرش المستعمل في إنتاج الحمض. تضمنت المصادر المضافة كل من مستخلص الخميرة واليوربا والنبتون، ومستخلص اللحم ونواتر الصوديوم ونواتر وكلوريد وكبريتات الأمونيوم. أجريت عملية التخمير وإنتاج الحمض بواسطة المزرعة البكتيرية المختلطة. بعد انتهاء التخمير قدّر تركيز حمض اللاكتيك في راسح المزرعة.

تأثير تركيز مستخلص الخميرة في إنتاج حمض اللاكتيك: أضيف مستخلص الخميرة إلى وسط الشرش المستعمل في إنتاج الحمض وبتراكيز 2-20 غ/ليتر، وأجريت عملية التخمير، وبعد ذلك قدّر تركيز حمض اللاكتيك في راسح المزرعة.

تأثير نوع المصدر الكربوني في إنتاج حمض اللاكتيك: تم تدعيم وسط الشرش الحاوي على التركيز الأمثل من مستخلص الخميرة ببعض السكريات كمصادر كربونية وبتركيز 10 غ/ليتر. أجريت عملية التخمير وإنتاج الحمض بواسطة مزرعة البكتريا المختلطة، وبعد انتهاء التخمير قدّر تركيز حمض اللاكتيك.

تأثير تركيز اللاكتوز المضاف في إنتاج حمض اللاكتيك: تم تدعيم وسط الشرش بسكر اللاكتوز وبتراكيز تراوحت بين 5-50 غ/ليتر، وأجريت عملية التخمير ثم قدّر تركيز حمض اللاكتيك المنتج.

تأثير تركيز كبريتات المغنسيوم في إنتاج حمض اللاكتيك: أضيفت كبريتات المغنسيوم، وبتراكيز تراوحت بين 0.05-0.5 غ/ليتر إلى وسط الشرش المدعم بالتراكيز المثلى من مستخلص الخميرة واللاكتوز. أجريت عملية التخمير بواسطة مزيج البكتريا ثم قدّر تركيز حمض اللاكتيك في راسح المزرعة.

تأثير تركيز كبريتات المنغنيز في إنتاج حمض اللاكتيك: أضيفت كبريتات المنغنيز، وبتراكيز تراوحت بين 0.01-0.1 غ/ليتر، إلى وسط الشرش المدعم بالتراكيز المثلى من مستخلص الخميرة واللاكتوز. أجريت عملية التخمير بواسطة مزيج البكتريا ثم قَدِّر تركيز حمض اللاكتيك في راشح المزرعة.

تأثير تركيز اللقاح في إنتاج حمض اللاكتيك: أضيف لقاح مزيج البكتريا، وبتراكيز تراوحت بين 5-20 × 10⁷ خلية/مل، إلى وسط الشرش المدعم بالتراكيز المثلى من مستخلص الخميرة واللاكتوز وكبريتات المغنسيوم وكبريتات المنغنيز. أجريت عملية التخمير ثم قَدِّر تركيز حمض اللاكتيك في راشح المزرعة.

تأثير درجة الـ pH في إنتاج حمض اللاكتيك: بعد تحضير وسط الشرش المدعم بالمواد المذكورة آنفاً تم تعديل درجة الـ pH إلى قيم تراوحت بين 4-8 بواسطة حمض الهيدروكلويك أو هيدروكسيد الصوديوم (1 مولاري) وأجريت عملية التخمير، ثم تم تقدير تركيز حمض اللاكتيك المنتج.

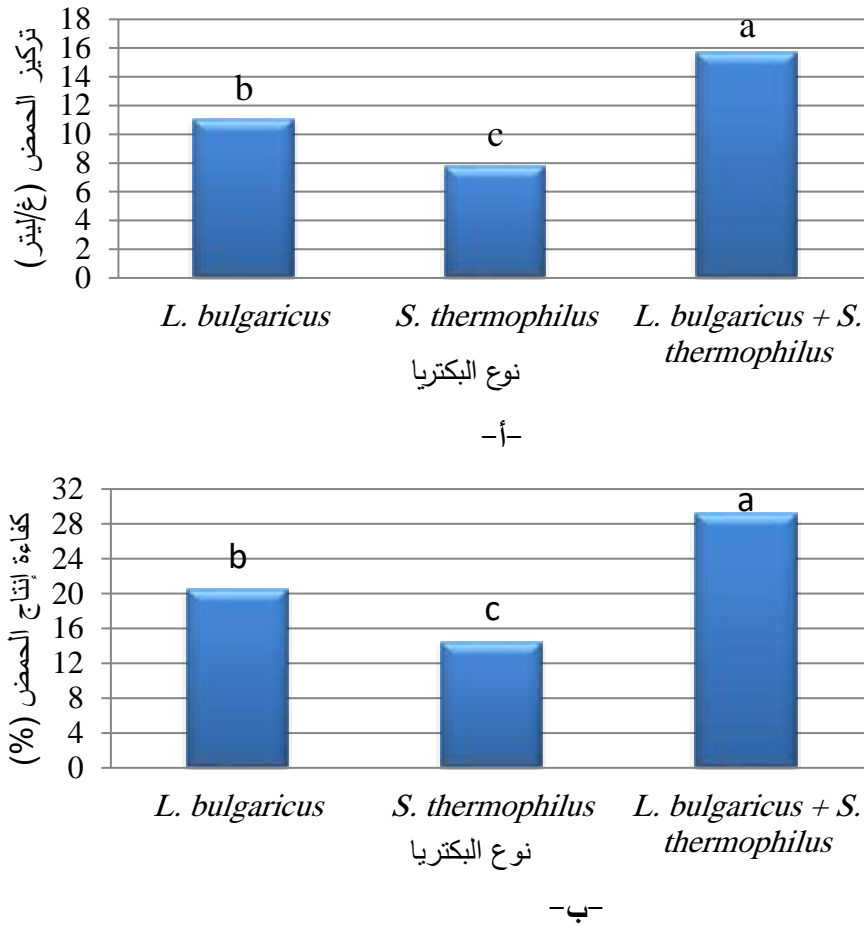
تأثير مدة التحضين في إنتاج حمض اللاكتيك: أجريت عملية تحضين وسط الشرش المملح بمزيج البكتريا لفترات تراوحت بين 6-90 ساعة. قَدِّر كمية حمض اللاكتيك المنتجة كل 6 ساعات من التحضين.

التحليل الإحصائي: تم تحليل البيانات وفق نظام التجارب البسيطة بالتصميم العشوائي الكامل (Complete Randomized Design, CRD) للتعرف على طبيعة الاختلافات بين مستويات المعاملات، كما استخدم اختبار دنكن متعدد المدى لتحديد معنوية الفروقات بين المتوسطات عند مستوى احتمالية 0.01، وتمت الاستعانة بالبرنامج الإحصائي الجاهز (SAS).

النتائج والمناقشة:

المقارنة بين نوعي البكتريا ومزيجهما في إنتاج حمض اللاكتيك:

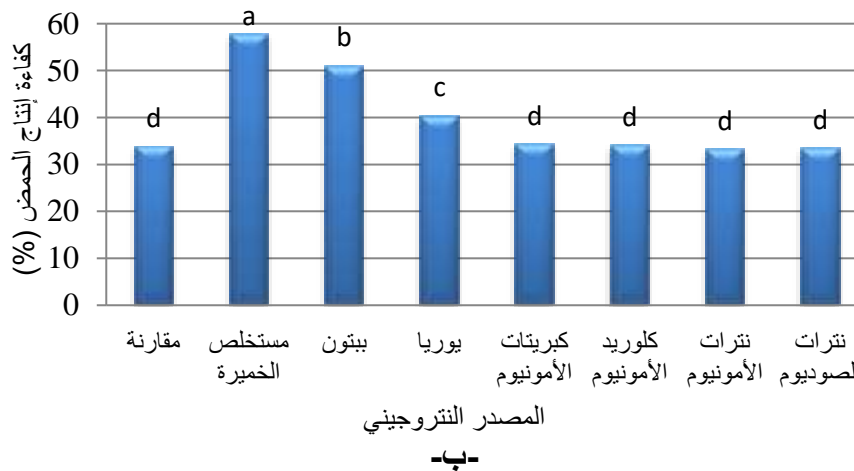
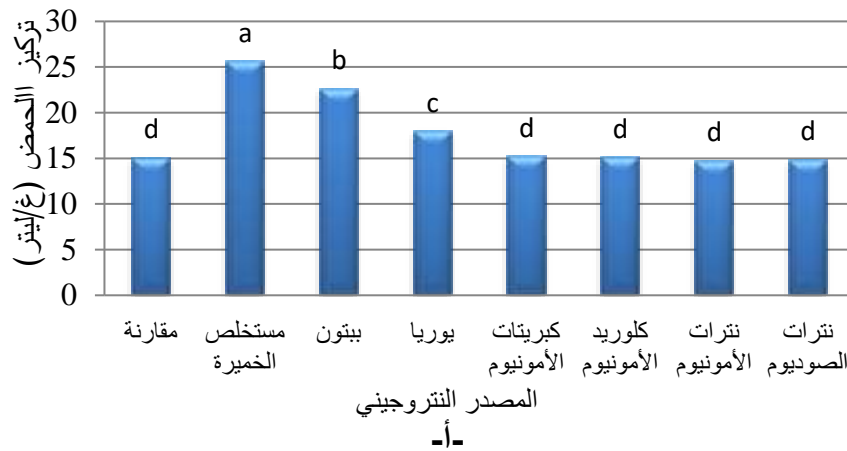
تمت مقارنة نوعي بكتريا بادئ اللبن في إنتاجيتهما لحمض اللاكتيك من الشرش. بينت النتائج تفوق مزيج النوعين (*S. thermophilus* و *L. bulgaricus*) في إنتاج الحمض (15.74 غ/ليتر)، تلتها *L. bulgaricus* (11.02 غ/ليتر) وأخيراً *S. thermophilus* (7.78 غ/ليتر) ويفروق معنوية بينها في كل من كمية الإنتاج وكفاءته (الشكل 1 أ، وب). إن الإنتاجية العالية للحمض باستعمال مزيج نوعي البكتريا مع بعضهما مقارنة بإنتاجية كل منهما وبفارقٍ معنوي واضح، وبالرغم من إضافة نفس كمية اللقاح، يدل على وجود علاقة وتأثير إيجابي مباشر بينهما مما يزيد من فعاليتيهما الاستقلالية. وقد درست هذه العلاقة بين النوعين منذ مدة طويلة وتبين أنهما ينموان بعلاقة تآزرية (Proto-cooperative) أو تكافلية (Synergistic) تؤدي إلى الإسراع في إنتاج حمض اللاكتيك، إذ تعمل بكتريا *S. thermophilus* على تحفيز نمو الثانية بإزالتها للأوكسجين من الوسط وخفضها لدرجة pH بالإضافة إلى إنتاجها لأحماض الفورميك والبايروفيك والفوليك والأحماض الدهنية طويلة السلسلة، بالإضافة إلى مركب الأورنثين (Ornithine) وغاز ثنائي أوكسيد الكربون، بينما تعمل بكتريا *L. bulgaricus* على تحلل البروتين وتحرير الأحماض الأمينية الحرة والبيبتيدات بسبب امتلاكها فعالية عالية لتحلل البروتين وبذلك تحفز نمو بكتريا *S. thermophilus* ذات القابلية الضعيفة على تحلل البروتين (Mchiouer et al., 2017). وقد تم اختيار مزيج النوعين المذكورين من البكتريا لإجراء التجارب اللاحقة من الدراسة.



الشكل 1: مقارنة بين نوعي البكتريا *L. bulgaricus* و *S. thermophilus* ومزيجهما في إنتاج حمض اللاكتيك.
 أ- كمية الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج.
 (الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

تأثير نوع المصدر النتروجيني في إنتاج حمض اللاكتيك:

تمت دراسة تأثير عدد من المصادر النتروجينية المضافة إلى الشرش، بتركيز 10 غ/لتر، في إنتاج حمض اللاكتيك بواسطة مزيج بكتريا *L. bulgaricus* و *S. thermophilus* الحرة وبطريقة الوجبات. بينت النتائج أن أفضل هذه المصادر كان مستخلص الخميرة إذ بلغت كمية الحمض المنتجة 25.6 غ/لتر تلاها الببتون (22.6 غ/لتر)، ثم اليوريا (17.9 غ/لتر). وقد تفوق مستخلص الخميرة معنوياً على بقية المصادر المستخدمة. أما المصادر غير العضوية للنتروجين فلم يكن لها أي تأثير معنوي إيجابي في كمية الحمض المنتجة (الشكل 2 أ).



الشكل 2. تأثير نوع المصدر النتروجيني في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بواسطة مزرعة مختلطة لبكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus*.

أ- كمية الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج.

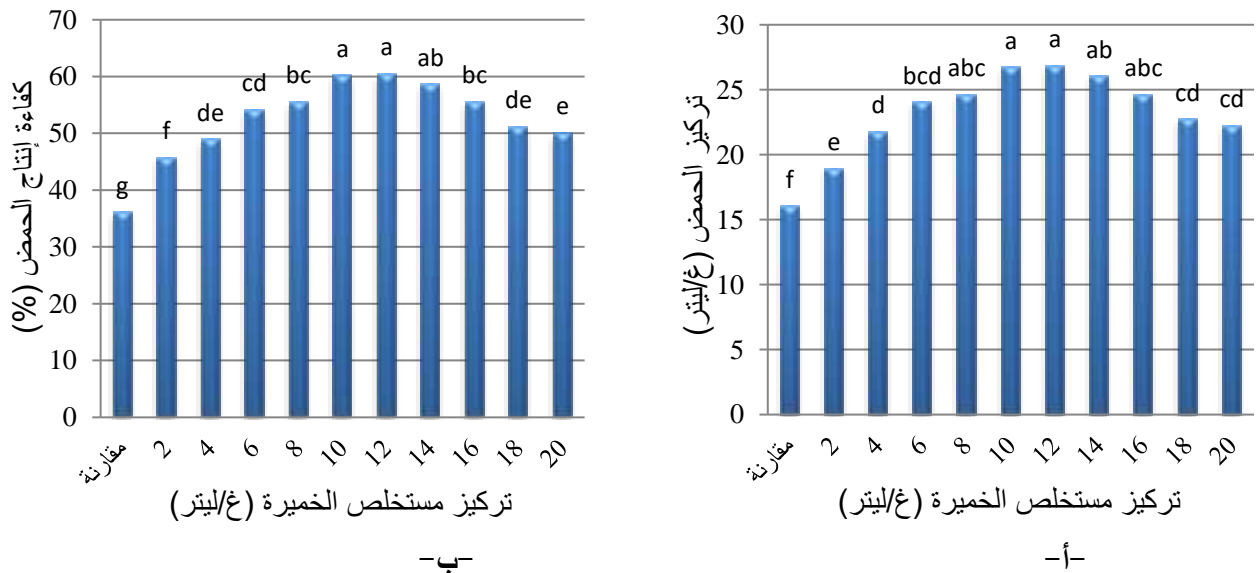
(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

ويعود السبب في ذلك إلى كون بكتريا حمض اللاكتيك غير قادرة على استهلاك مصادر النتروجين اللاعضوية (Abdel-Rahman *et al.*, 2019). وقد تشابهت نتيجة كفاءة الإنتاج (57.67%) باستعمال مستخلص الخميرة مع نتيجة تأثير المصدر النتروجيني في كمية الإنتاج وبفروق معنوية عن باقي المصادر النتروجينية (الشكل 2 ب). توصل Taleghani *et al.*, (2016) إلى نتيجة مشابهة إذ لاحظوا تفوق مستخلص الخميرة على كل من مستخلص اللحم والببتون في زيادة إنتاج الحمض من بكتريا *L. bulgaricus* المنماة في الشرش، وذكروا أن ذلك قد يعود إلى المحتوى الغذائي الجيد لمستخلص الخميرة مثل الأحماض الأمينية، والببتيدات، والفيتامينات، والعناصر المعدنية، وبعض الأحماض العضوية التي تحتاجها البكتريا مثل: البايروفيك والكليسيريك.

تأثير تركيز المصدر النتروجيني (مستخلص الخميرة) في إنتاج حمض اللاكتيك:

تمت إضافة مستخلص الخميرة إلى وسط الشرش وبتركيز تراوحت بين 2-20 غ/لتر لغرض التعرف على تأثيرها في إنتاجية حمض اللاكتيك بواسطة مزرعة مختلطة من بكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* الحرة وبطريقة الوجبات. بينت النتائج حصول زيادة معنوية في كمية الحمض المنتج عند إضافة المصدر النتروجيني مقارنة بمزرعة المقارنة الخالية من المصدر النتروجيني المضاف. كما يلاحظ أن هذه الزيادة في الإنتاج كانت أكثر وضوحاً في المجال 2-10 غ/لتر من تركيز المصدر النتروجيني المضاف إذ كانت معظم

الفروق معنوية بين كمية الإنتاج في هذا المدى، ووصل الإنتاج إلى أقصاه (26.8 غ/ليتر) عند إضافة مستخلص الخميرة بتركيز 12 غ/ليتر ولكن بفرق ظاهري عن التركيز 10 غ/ليتر من المصدر النتروجيني المضاف (26.7 غ/ليتر). ذكر (Hiitha *et al.*, 2014) أن عدم كفاءة تخمر اللاكتوز قد يعود إلى محدودية المحتوى النتروجيني الضروري لتغذية ونمو البكتريا. يلاحظ أن إنتاج الحمض قد بدأ بالانخفاض بعد تجاوز التركيز 12 غ/ليتر مما يدل على حصول تثبيط للإنتاج بزيادة تركيز المصدر النتروجيني وكان التثبيط أكثر وضوحاً في التراكيز العالية (الشكل 3 أ)، وقد يعود السبب إلى حصول تثبيط للاستقلاب الخلوي ولفعالية بعض الأنزيمات بفعل التراكيز العالية لبعض مكونات مستخلص الخميرة، وقد توافقت هذه النتيجة مع ما ذكره (Ghaly *et al.*, 2003) حيث وجدوا أن زيادة تركيز مستخلص الخميرة المضاف إلى وسط الشرش من 5 إلى 10 غ/ليتر قد أدى إلى زيادة إنتاج حمض اللاكتيك بواسطة بكتريا *L. helveticus* من 22.1 إلى 34.8 غ/ليتر، ثم انخفض إلى 26.8 غ/ليتر عند زيادة تركيز المستخلص إلى 15 غ/ليتر مقارنة بـ 15.2 غ/ليتر للوسط الخالي من المصدر النتروجيني المضاف. أما بالنسبة لكفاءة إنتاج الحمض فقد وصلت إلى القيمة القصوى (60.37%) عند إضافة التركيز المذكور (12 غ/ليتر) من مستخلص الخميرة وبفرق غير معنوي أيضاً عن التركيز 10 غ/ليتر، ثم انخفضت الكفاءة وبصورة معنوية بعد زيادة تركيز المستخلص المضاف عن 14 غ/ليتر (الشكل 3 ب). ولذلك فقد تم اعتبار التركيز 10 غ/ليتر هو الأنسب للاستعمال كمصدر نتروجيني مع الأخذ بعين الاعتبار الكلفة العالية لهذه المادة عند إضافتها بكميات كبيرة وخاصة على المستوى الصناعي.



الشكل 3. تأثير تركيز مستخلص الخميرة في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بواسطة مزرعة مختلطة لبكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus*

أ- كمية الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج.

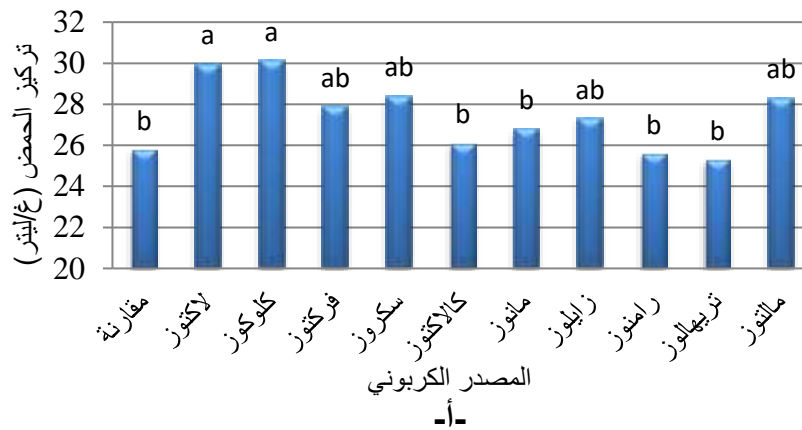
(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

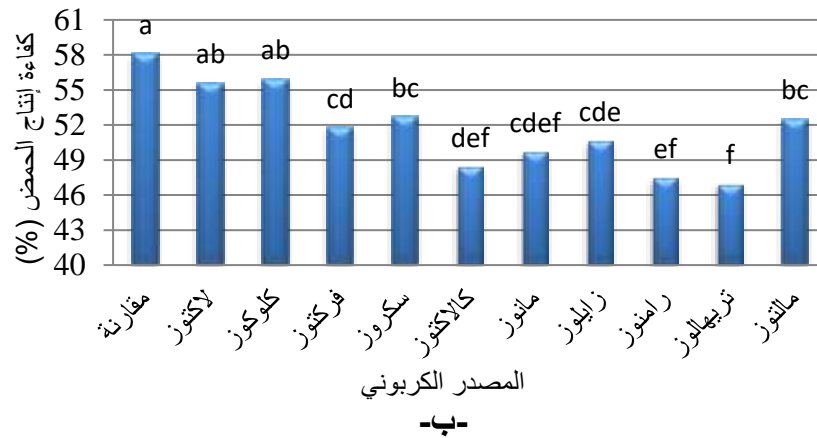
كانت النتيجة مقارنة بشكل كبير لما توصل إليه (Taleghani *et al.*, 2016) والذين وجدوا أن مستخلص الخميرة، وبتركيز 10 غ/ليتر، كان أفضل المصادر النتروجينية لإنتاج حمض اللاكتيك والكتلة الحيوية من الشرش بواسطة بكتريا *L. bulgaricus* تلاه مزيج المستخلص مع الببتون. بينما توصل (Goksungur *et al.*, 2005) إلى نتيجة مختلفة إذ وصل أقصى إنتاج للحمض من الشرش المدعم بمستخلص الخميرة بتركيز 28.8 غ/ليتر وبواسطة بكتريا *L. casei* NRRL B-441 المقيدة في حبيبات هلام الجينات

الكالسيوم. قد تعود هذه التباينات في النتائج إلى اختلاف الأنواع والسلالات المستعملة واختلاف ظروف التخمر. أشار Hayek and Ibrahim, (2013) إلى أن زيادة تركيز مستخلص الخميرة عن 12 غ/ليتر قد تعمل على تثبيط بعض الفعاليات الاستقلابية في بكتريا حمض اللاكتيك في الأوساط التي لا يتم فيها السيطرة على ثبات الدالة الحمضية خلال التخمر. إن اختلاف التركيز الأمثل من مستخلص الخميرة كمصدر نتروجيني قد يعكس تباين فعاليات الأنزيمات المحللة للبروتينات (Proteolytic enzymes) في أنواع البكتريا المختلفة مما يؤثر في درجة تحلل هذه البروتينات والبيبتيدات الموجودة في المستخلص وبالتالي اختلاف كميات الأحماض الأمينية الحرة التي تكون متوفرة للخلايا (Zhang *et al.*, 2013).

تأثير نوع المصدر الكربوني في إنتاج حمض اللاكتيك:

تم تدعيم الشرش ببعض السكريات، وبتكرير 10 غ/ليتر، لبيان تأثيرها في كمية حمض اللاكتيك المنتجة بواسطة مزرعة مختلطة لبكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus*. بينت النتائج أن الجلوكوز المضاف كان له التأثير الأكبر في زيادة إنتاج الحمض (30.13 غ/ليتر) تلاه اللاكتوز (29.97 غ/ليتر) وبفرق بسيط جداً وغير معنوي. وقد سببت إضافة كل من السكروز والمالتوز والفركتوز والزايلوز زيادات لا بأس بها (28.4 و 28.3 و 27.9 و 27.3 غ/ليتر على التوالي). لم يكن لباقي السكريات المضافة تأثير يذكر في إنتاج الحمض مقارنة بعينة الشاهد الخالية من السكر المضاف (الشكل 4 أ). أما بالنسبة لكفاءة إنتاج الحمض، والذي يعبر عن كمية الحمض المنتجة منسوبة إلى الحاصل النظري أو المحسوب للإنتاج، فيلاحظ أن عينة الشاهد الخالية من السكر المضاف قد حصلت على أعلى كفاءة إنتاج (الشكل 4 ب) بالرغم من انخفاض تركيز الحمض المنتج فيها. ويعود ذلك إلى انخفاض نسبة السكر الأصلي الموجود فيها مقارنة بالعينات التي تم تدعيمها بالسكر. ويمكن القول بأنه يفضل عدم الاعتماد على معيار كفاءة الإنتاج عند عدم تساوي نسب السكر في العينات المختلفة بل يتم الاعتماد على كمية الإنتاج والذي يعطي مؤشراً حقيقياً لجدوى عملية التدعيم. أما بالنسبة للعينات والتي يتم تدعيمها بكميات متساوية من السكريات فيمكن استعمال معيار كفاءة الإنتاج لتقييم جدوى المعاملة.





الشكل 4. تأثير نوع المصدر الكربوني في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بواسطة مزرعة مختلطة من بكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus*

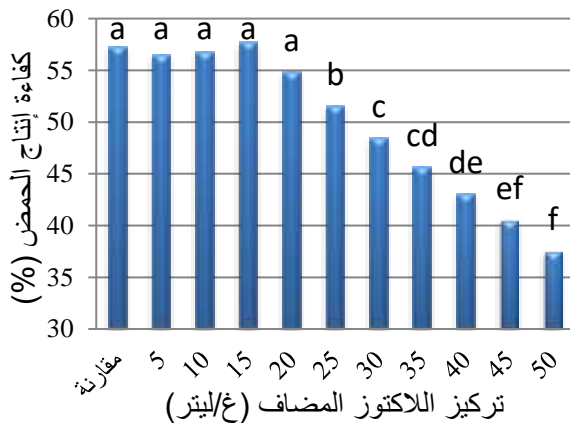
أ- كمية الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج.

(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

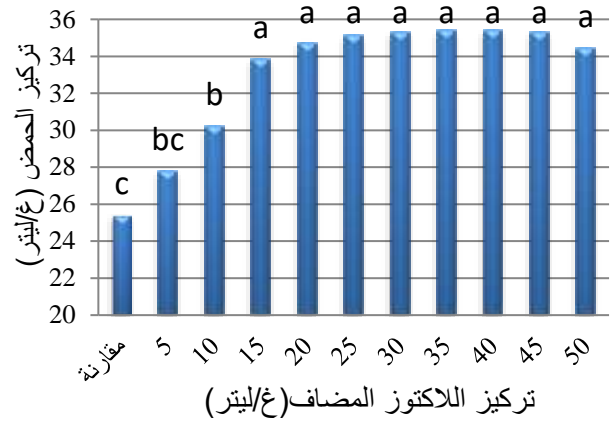
يلاحظ من الشكل (4-ب) زيادة كفاءة الإنتاج بصورة معنوية عند إضافة كل من الجلوكوز واللاكتوز إلى وسط الإنتاج (55.91 و 55.61% على التوالي) مقارنةً ببقية السكريات المضافة، كما كانت الكفاءة جيدة عند إضافة السكروز والمالتوز والفركتوز والزليلوز. ذكر (Sobowale *et al.*, 2011) أن بكتريا بادئ اللبن يمكنها إنتاج حمض اللاكتيك من سكريات اللاكتوز والجلوكوز والفركتوز والسكروز والمالتوز مع إنتاج ضعيف من الجالاكتوز.

تأثير تركيز اللاكتوز المضاف في إنتاج حمض اللاكتيك:

لكون الجلوكوز واللاكتوز قد أعطيا نتائج مقاربة جداً في إنتاجية حمض اللاكتيك ولكون اللاكتوز هو السكر الموجود في الشرش، ويمكن الحصول عليه من الشرش، لذا تم اختياره في التجارب اللاحقة. استعمل وسط الشرش المدعم بتركيز مختلفة من اللاكتوز (5-50 غ/لتر) لدراسة إنتاجية هذا الوسط لحمض اللاكتيك بواسطة مزيج بكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus*. أظهرت النتائج زيادة في كمية الحمض المنتج بزيادة تركيز اللاكتوز المضاف إلى الوسط وبفروق معنوية استمرت حتى تركيز 15 غ/لتر إذ بلغت كمية الحمض المنتج عند هذا التركيز 33.84 غ/لتر مقارنةً بـ 25.42 غ/لتر للوسط الخالي من اللاكتوز المضاف. وبعد هذا التركيز تباطأت الزيادة في إنتاج الحمض وأصبحت الفروق بينها غير معنوية لغاية التركيز 40 غ/لتر (الشكل 5-أ). قد يعود السبب في توقف الزيادة في الإنتاج إلى حدوث تثبيط للخلايا بواسطة التركيز العالي من اللاكتوز أو إلى التثبيط بالنواتج النهائي للتخمير (حمض اللاكتيك). تباينت نتائج الدراسات السابقة حول التركيز المناسب من السكر للوصول إلى الإنتاج الأمثل من حمض اللاكتيك. وقد وجد Goksungur *et al.*, (2005) أن أقصى إنتاج للحمض (136.3 غ/لتر) من الشرش قد تم الحصول عليه من الشرش الحاوي على تركيز أولي من اللاكتوز قدره 147.35 غ/لتر بواسطة *L. casei* NRRL B-441 المقيدة في حبيبات هلام الجينات الكالسيوم، بينما توصل Taleghani *et al.*, (2016) إلى أقصى إنتاج لحمض اللاكتيك من الشرش بواسطة بكتريا *L. bulgaricus* باستعمال تركيز ابتدائي قدره 90 غ/لتر من اللاكتوز. وعند زيادة تركيز اللاكتوز إلى 120 غ/لتر حصل انخفاض كبير في تركيز الحمض المنتج مما يشير إلى تثبيط إنتاج الحمض بوجود تراكيز عالية من المصدر الكربوني.



-ب-



-ف-

الشكل 5. تأثير تركيز اللاكتوز المضاف في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بواسطة مزرعة مختلطة لبكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus*

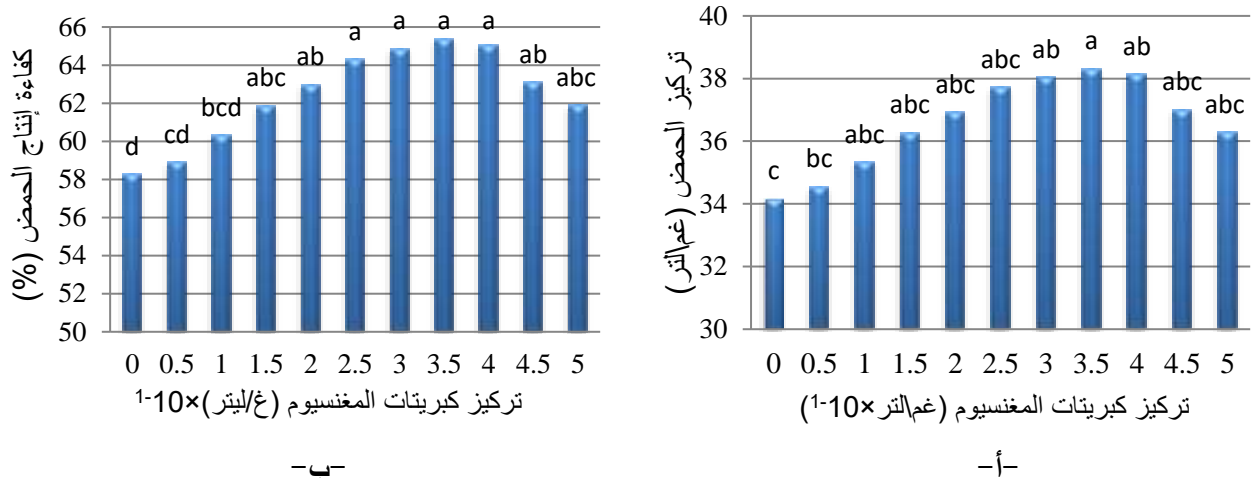
أ- كمية الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج.

(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

أما بالنسبة لكفاءة الإنتاج فيلاحظ انخفاضها المستمر بزيادة تركيز اللاكتوز المضاف ولكن بشكل غير معنوي ولغاية التركيز 20 غ/ليتر حيث وصلت كفاءة الإنتاج عنده 54.79%. استمر الانخفاض في الكفاءة بعد هذا التركيز ولكن بشكل معنوي لتصل إلى 37.47% عند التركيز 50 غ/ليتر من اللاكتوز المضاف (الشكل 5 ب). وكما ذكر سابقاً فإن كفاءة الإنتاج لا تعبر عن الإنتاجية الحقيقية للحمض وذلك بسبب التغير المستمر في تركيز السكر الأصلي، وبالتالي تغير قيمة الحاصل النظري أو المحسوب للحمض والذي يدخل في حساب قيمة كفاءة الإنتاج. ومن المعلوم أن كفاءة الإنتاج تعبر عن كمية الحمض المتكونة منسوبة إلى كمية الحمض التي يفترض إنتاجها نظرياً من وزن معين من السكر. تم اختيار التركيز 15 غ/ليتر من اللاكتوز المضاف للتجارب اللاحقة على أنه التركيز الأفضل من اللاكتوز المضاف ولكون الزيادة الحاصلة في الإنتاج بعد هذا التركيز كانت قليلة وغير معنوية.

تأثير التدهيم بكبريتات المغنسيوم في إنتاج حمض اللاكتيك:

تبين النتائج حصول زيادة قليلة نسبياً في كمية الحمض المنتجة بزيادة تركيز الكبريتات المضافة. وقد وصل أعلى إنتاج للحمض (38.31 غ/ليتر) عند التركيز 3.5×10^{-1} غ/ليتر من الملح المضاف مقارنة بـ 34.17 غ/ليتر في وسط المقارنة الخالي من المادة المذكورة وبفرق معنوي بينهما، وعند زيادة الكمية المضافة عن هذا التركيز يلاحظ حصول انخفاض تدريجي وغير معنوي في كمية الحمض المنتج مما يدل على حدوث تأثير تثبيطي لعملية الإنتاج بسبب التراكيز العالية من هذا الملح. كما تبين من النتائج أن الفروق بين تراكيز الحمض المنتج في التراكيز $1-5 \times 10^{-1}$ من كبريتات المغنسيوم المضافة كانت غير معنوية (الشكل 6 أ). كان تأثير تركيز كبريتات المغنسيوم في كفاءة إنتاج الحمض مشابهة لتأثيره في كمية الحمض المنتج، إذ تم الحصول على أعلى كفاءة (65.33%) عند إضافة الملح المذكور بتركيز 0.35 غ/ليتر مقارنة بعينة المقارنة الخالية من الملح المضاف (58.27%) وبفرق معنوي عنها (الشكل 6 ب). توصل (Bouhadi et al., 2017) إلى نتيجة مقارنة عند تنمية بكتريا *S. thermophilus* في وسط المولاس إذ أدت إضافة كبريتات المغنسيوم إلى وسط الشرش بتركيز 0.5 غ/ليتر إلى الحصول على 46.26 غ/ليتر من حمض اللاكتيك.



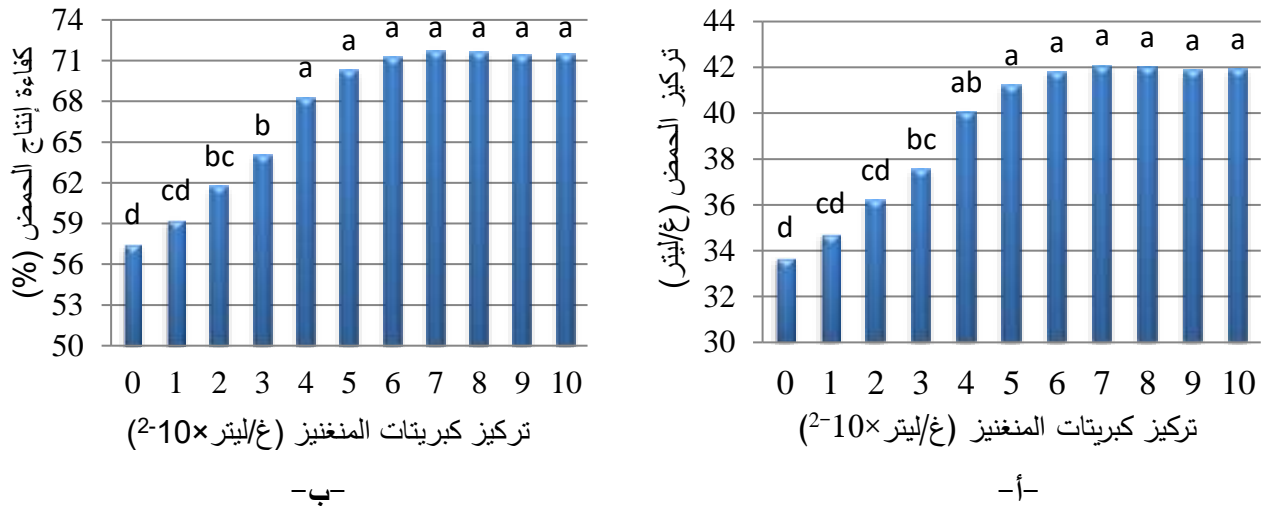
الشكل 6. تأثير تركيز كبريتات المغنسيوم في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بواسطة مزرعة مختلطة لبكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus*

أ- كمية الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج.

(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

تأثير التديم بكبريتات المنغنيز في إنتاج حمض اللاكتيك:

تبين النتائج وجود علاقة طردية بين تركيز الملح المضاف وبين إنتاجية الحمض ولغاية التركيز 7×10^{-2} غ/ليتر والذي وصل عنده كل من كمية وكفاءة الإنتاج 42.06 غ/ليتر و 71.73% على التوالي مقارنة ب 33.68 غ/ليتر و 57.44% في وسط الشرش الخالي من الملح المضاف، وعلى التوالي. بدأ الانخفاض في الإنتاجية بعد تجاوز التركيز المذكور من الملح المضاف وبصورة غير معنوية ولغاية 10×10^{-2} غ/ليتر (الشكل 7 أ، ب). يمكن القول عموماً أن التركيز 5×10^{-2} غ/ليتر يعد الأفضل عملياً ولأسباب اقتصادية لكون الزيادة في كمية وكفاءة إنتاج الحمض بعد هذا التركيز كانت قليلة وغير معنوية. وقد كانت كمية الحمض التي تم الحصول عليها مقارنة لتلك التي تمكن (Tripathi et al., 2015) من إنتاجها (39.2 غ/ليتر) من الشرش بواسطة بكتريا *L. delbrueckii* بالرغم من أن التركيز المضاف من كبريتات المنغنيز (5 غ/ليتر) كان كبيراً مقارنة بالتركيز المستعمل في الدراسة الحالية، كما أدت إضافة كبريتات المنغنيز (0.05 غ/ليتر) مع كبريتات المغنسيوم (0.2 غ/ليتر) إلى وسط الشرش الحاوي على بكتريا *L. bulgaricus* إلى زيادة إنتاج حمض اللاكتيك بنسبة 23.3% مقارنة بالوسط الخالي منها (Mawgoud et al., 2016). وجد (Bouhadi et al., 2017) أن إضافة كبريتات المنغنيز بتركيز 0.02 غ/ليتر إلى وسط المولاس المخفف المستعمل في تنمية بكتريا *S. thermophilus* قد أدت إلى زيادة إنتاج الحمض والحصول على إنتاج مقداره 46.26 غ/ليتر، كما توصل (Buyukkileci, 2000) في دراسته إلى أن أيونات المنغنيز تعمل كعامل مرافق (Cofactor) ضروري لفعالية أنزيم اللاكتيت ديهيدروجينيز في بكتريا *L. casei*.

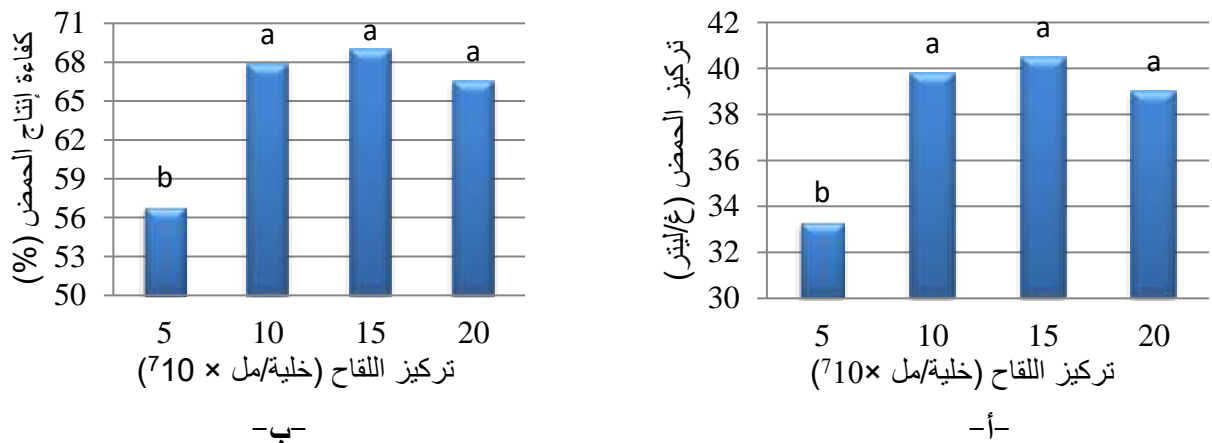


الشكل 7. تأثير تركيز كبريتات المنغيز في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بواسطة مزرعة مختلطة لبكتريا *S. thermophilus* و *L. Bulgaricus*

أ- كمية الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج.
(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

تأثير تركيز اللقاح في إنتاج حمض اللاكتيك:

تمت إضافة اللقاح إلى وسط الشرش بأربعة تراكيز تراوحت بين 5 و 20×10^7 خلية/مل، وقد بينت النتائج أن كل من كمية وكفاءة إنتاج الحمض باستعمال التركيز الأول (5×10^7 خلية/مل) تعادل 33.3 غ/ليتر و 56.79%، على التوالي، ولوحظ ارتفاع الإنتاجية بشكل معنوي وكبير بزيادة تركيز اللقاح إلى 10×10^7 خلية/مل لتصل كمية وكفاءة الإنتاج إلى 39.79 غ/مل و 67.85%، على التوالي مما يدل بشكل واضح أن التركيز القليل من اللقاح كان غير كافي للوصول إلى الإنتاج المطلوب من الحمض. أما عند زيادة تركيز اللقاح إلى 15×10^7 خلية/مل فيلاحظ أن الارتفاع في إنتاجية الحمض كان قليلاً جداً وغير معنوية. وعند استعمال التركيز 20×10^7 خلية/مل يلاحظ انخفاض كمية وكفاءة الإنتاج وبصورة غير معنوية (الشكل 8 أ و ب). يمكن القول أن التركيز 10×10^7 خلية/مل كان الأمثل لهذا الغرض مع أخذ الناحية الاقتصادية بنظر الاعتبار. استعمل التركيز 9.4×10^9 خلية/مل من لقاح بكتريا *L. plantarum* في إنتاج حمض اللاكتيك من مستخلص مخلفات حبوب الذرة (Minh, 2014). أما (Nagarjun, 2015) فقد وجد أن نسبة اللقاح المثلى لإنتاج الحمض بواسطة بكتريا *L. amylophorus* NRRL B-4542 كانت 5%.

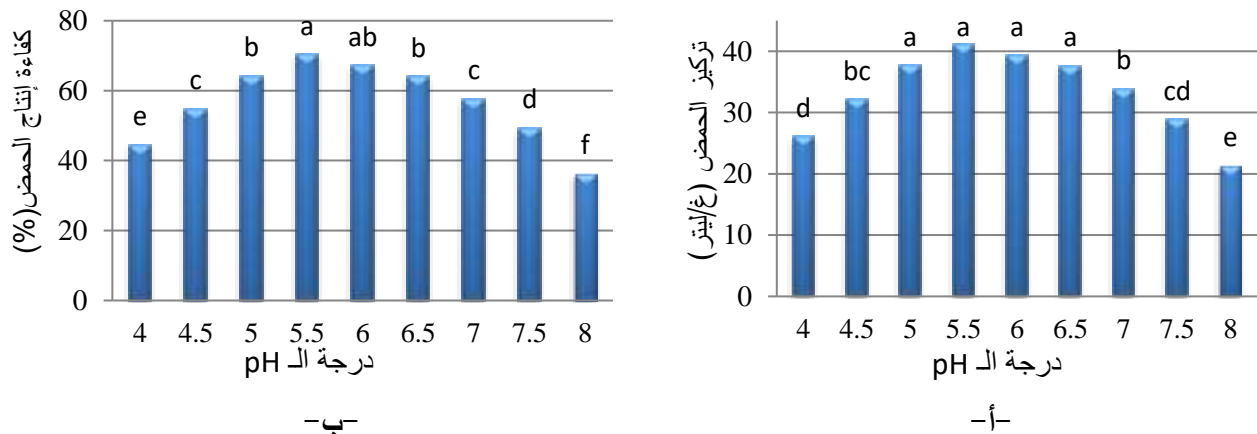


الشكل 8. تأثير تركيز اللقاح في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بواسطة مزيج بكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus*

أ- كمية الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج.
(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

تأثير درجة الـ pH في إنتاج حمض اللاكتيك:

من المعروف وجود تأثير كبير لدرجة الـ pH في فعالية الأنزيمات الخلوية المختلفة وفي نقل المغذيات خلال الجدار الخلوي وفي درجة ذوبانية وتأمين المركبات الخلوية وبالتالي في استقلاب الخلية ونموها وإنتاجها للمركبات المختلفة (Joshi and Amrusagar, 2017). تمت دراسة تأثير درجة الـ pH الابتدائية لوسط التخمر في إنتاج حمض اللاكتيك. بينت النتائج وصول كل من كمية وكفاءة إنتاج الحمض إلى قيمها القصوى عند القيمة 5.5 لدرجة الـ pH الابتدائية لوسط الشرش. كانت الفروق غير معنوية بين كميات إنتاج الحمض في المدى 5-6.5 وانخفض الإنتاج بشكل كبير ومعنوي خارج هذا المدى. أما بالنسبة لكفاءة الإنتاج فلم يكن الفرق معنوياً عند درجتى الـ pH 5.5 و6 وأصبحت معنوية عند الابتعاد عنهما (الشكل 9 أ، ب).



الشكل 9. تأثير درجة الـ pH في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بواسطة مزرعة مختلطة لبكتريا *L. bulgaricus* و *S. thermophilus*. أ- كمية الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج. (الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

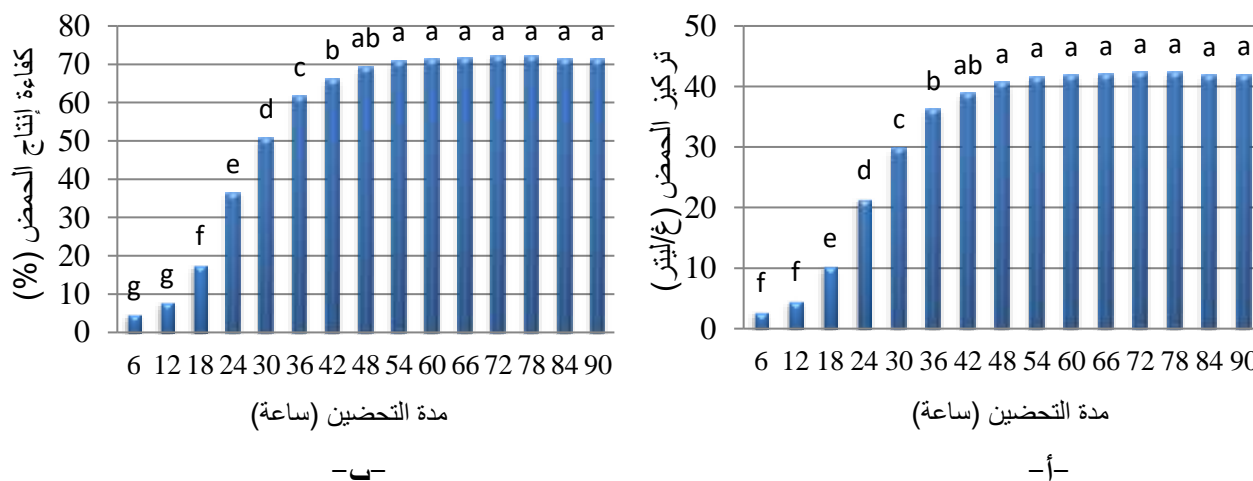
من الملاحظ تباين الأحياء المجهرية المختلفة في حساسيتها تجاه تغير درجة الـ pH. فقد وجد Busairi, (2002) أن بكتريا *L. delbrueckii* المنماة على مخلفات ثمار الأناناس كانت حساسة جدا لتغير درجة الـ pH للوسط إذ تمكن من الحصول على إنتاج عالي من حمض اللاكتيك وذلك بضبط درجة الـ pH عند 6 بينما انخفض الإنتاج بصورة كبيرة عند تغيير درجة الـ pH إلى 5.5 و6.5، مما يدل على أهمية السيطرة على هذا العامل خلال التخمر بواسطة بعض أنواع البكتريا.

ذكر (Bouhadi et al., 2017) أن حمض اللاكتيك الذي تنتجه الخلايا يعمل على خفض درجة الـ pH مما يثبط النمو، وفي نفس الوقت فإن الخلايا حاولت المحافظة على الظروف المتعادلة داخلها بالرغم من انخفاض درجة الـ pH في الوسط الخارجي لأن الغشاء الخلوي يمنع دخول جذر اللاكتات كما أن الخلايا تقوم بإفراز الحمض غير المتأين بسرعة إلى الخارج. إن التباين في الحموضة بين الساييتوبلازم والوسط الخارجي يسبب وجود تدرج في قيم درجة الـ pH مما يشجع إفراز البروتونات إلى خارج الخلية. ولكن في نهاية الطور اللوغاريتمي تصبح كمية الـ ATP غير كافية وتختفي حالة التدرج في درجة الـ pH وتزداد حموضة الساييتوبلازم مما يسبب انخفاض فعالية أنزيم الهيكسوكاينيز (Hexokinase) وبالتالي تثبيط نمو الخلايا.

تأثير مدة التحضين في إنتاج حمض اللاكتيك:

تم التحضين لفترات تراوحت بين 6-90 ساعة مع قياس كمية الحمض المنتجة كل ست ساعات من التحضين. بينت النتائج الموضحة في الشكل (10 أ، ب) أن كمية الحمض المنتجة خلال الـ 6 ساعات الأولى من التحضين كانت قليلة بسبب أن الخلايا كانت في بداية

تأقلمها في الوسط. وبعد هذه المدة بدأ الارتفاع السريع والمعنوي في الإنتاج ولغاية الوصول إلى كمية الإنتاج القصوى (42.32 غ/ليتر) بعد 72 ساعة من التحضين، ولكن بفروق غير معنوية في المدى 48-72 ساعة، كما بلغت كفاءة الإنتاج في هذه المدة 72.17%، ولم تحصل أية زيادة في الإنتاج عند تجاوز هذه المدة. ويمكن القول بأن مدة 48 ساعة تعد مناسبة للتخمير مع الأخذ بعين الاعتبار الناحية الاقتصادية. يمكن أن يكون السبب في ثبات الإنتاج هو تأثير التثبيط الرجعي (Feedback inhibition) لنواتج التخمر (حمض اللاكتيك) في أنزيم اللاكتيك ديهيدروجينيز (Lactate dehydrogenase) والأنزيمات الأخرى الموجودة في مسار الكلايوليسيس (Glycolysis) بالإضافة إلى النقص الحاصل في تركيز السكر نتيجة استهلاكه من قبل الخلايا البكتيرية وتحويله إلى حمض اللاكتيك بالإضافة لإنتاج الطاقة اللازمة للنمو. كانت النتيجة المستحصل عليها مشابهة لتلك التي وجدها (Luongo *et al.*, 2019) حيث حصلوا على أقصى إنتاج من الحمض بعد 48 ساعة من التحضين في وسط الشرش عند استعمال مزرعة مختلطة معزولة من الحمأة المتخلفة من عملية معالجة فضلات أحد مصانع الألبان. وفي دراسة أخرى لإنتاج حمض اللاكتيك من مستخلص لمخلفات حبوب الذرة المعاملة بحمض الكبريتيك المركز وباستعمال بكتريا *L. plantarum* بلغ أقصى إنتاج من الحمض بعد 84 ساعة ولكنه انخفض بعد 108 ساعة من بداية التخمر بسبب التثبيط الحاصل من تراكم الحمض (Minh, 2014).



الشكل 10. تأثير مدة التحضين في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بواسطة مزرعة مختلطة لبكتريا *L. Bulgaricus* و *S. thermophilus* أ- كمية الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج.

(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

تعتبر فترة التحضين 6-54 ساعة عن فترة الطور اللوغاريتمي لنمو الخلايا والتي حصل خلالها الإنتاج العالي للحمض والذي يعد من نواتج الاستقلاب الأولية (Primary metabolites) بسبب توفر الظروف المثالية للنمو مع توفر المغذيات وغياب مثبطات النمو. أظهرت النتائج أن إنتاج الحمض قد استمر بالارتفاع بعد تجاوز مدة الـ 54 ساعة. وهذه النتيجة يمكن تفسيرها بكون إنتاج الحمض كان تراكمياً في الوسط بسبب استعمال طريقة الوجبات والتي تتراكم فيها نواتج التخمر بغض النظر عن سرعة إنتاجها (Roberto *et al.*, 2007). في دراسة لإنتاج حمض اللاكتيك من المولاس بواسطة بكتريا *L. casei* المقيدة في هلام ألجينات الكالسيوم وجد أن الزيادة في إنتاج الحمض خلال الـ 54 ساعة الأولى من التحضين كانت معنوية ثم تناقص معدل الارتفاع في الإنتاج لتصبح الفروقات غير معنوية (Thakur *et al.*, 2018b). أما (Nagarjun, 2015) فقد حصل على أقصى إنتاج من حمض اللاكتيك بعد 30 ساعة من تحضين

بكتريا *L. amylophorus* NRRL B-4542 الحرة في مزرعة مغمورة وباستعمال النشا كمصدر كربوني وبقي الإنتاج ثابتا لغاية 48 ساعة من التحضين.

الاستنتاجات:

يعد الشرش وسطاً جيداً لإنتاج حمض اللاكتيك لارتفاع محتواه من المكونات الغذائية ولتوفره كأحد مخلفات مصانع الأغذية. ولوحظ تفوق المزرعة المختلطة لنوعي البكتريا في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش مقارنةً باستعمال المزرعة النقية لأحد النوعين، بسبب وجود علاقة تكافلية بينهما. كما يلاحظ أنه من الضروري توفير الظروف المناسبة للبكتريا لأجل الوصول إلى إنتاجية جيدة من الحمض.

المراجع:

- Abdel-Rahman, M. A.; S. Hassan; M. S. Azab; A. Al- Mahin; and M.A. Gaber (2019). High improvement in lactic acid productivity by new alkaliphilic bacterium using repeated batch fermentation integrated with increased substrate concentration. *Bio. Med. Research International*. 6:1-13.
- Borshchevskaya, L.N.; T L. Gordeeva; A.N. Kalinina; and S.P. Sineokii (2016). Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry*. 71(8):755-758.
- Bouhadi D; B. Raho; A. Hariri; Z. Benattouche; F. Sahnouni; K. Ould Yerou and S.A. Bouallam (2017). Utilization of date juice for the production of lactic acid by *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*. 3(3):362–364.
- Busairi, A.M. (2002). Lactic acid fermentation of pineapple wastes fermentation using *Lactobacillus Delbrueckii*. PhD Thesis, University of Technology, Malaysia.
- Buyukkileci, A.O. (2000). L (+) Lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. M.Sc. Thesis, Izmir Institute of Technology, Izmir, Turkey.
- Fakhravar, S.; G. Najafpour; S.Z. Heris; M. Izadi; and A. Fakhravar (2012). Fermentative lactic acid from deproteinized whey using *Lactobacillus bulgaricus* in batch culture. *World Applied Sciences Journal*. 17(9):1083-1086.
- Ghaly, A.E.; M.S. Tango and M.A. Adams (2003). Enhanced lactic acid production from cheese whey with nutrient supplement addition. *Journal of Scientific Research and Development*. Manuscript FP 02 009.
- Ghasemi, M.; G. Najafpour; M. Rahimnejad; P.A. Beigi1; M. Sedighi; and B. Hashemiyeh (2009). Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus*. *African Journal of Biotechnology*. 8(1):081-084.
- Goksungur, Y.; M. Gunduz; and S. Harsa (2005). Optimization of lactic acid production from whey by *L. casei* NRRL B-441 immobilized in chitosan stabilized Ca-alginate beads. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80:1282–1290.
- Hayek, S.A.; S.A. Ibrahim (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: A review. *Food and Nutrition Sciences*. 4(11):73-87.
- Hitha, C.S.; C. S. Hima; B.J. Yogesh; S. Bharathi and K.V. Sekar (2014). Microbial utilization of dairy waste for lactic acid production by immobilized bacterial isolates on sodium alginate beads. *International Journal of Pure and Applied Biosciences*. 2:55-60.
- Joshi, S.S.; and M.V. Amrutsagar (2017). Lactic acid production and applications: A review. *International Journal of Recent Scientific Research*. 8(7):18518-18521.
- Lasprilla, A.J; G.A. Martinez; B.H. Lunelli; A.L. Jardini; and R.M. Filho (2012). Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices– A review. *Biotechnology Advances*. 30(1):321-328.
- Luongo, V.; G. Policastro; A. Ghimire; F. Pirozzi; and M. Fabbicino (2019). Repeated-batch fermentation of cheese whey for semi-Continuous lactic acid production using mixed cultures at uncontrolled pH. *Sustainability*. 11: 30-33.

- Mawgoud, Y.A.; G.A. Ibrahim; and M.F. El-ssayad (2016). Studying the influence of nitrogen source on lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus bulgaricus* Lb-12. Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 7(1):693-705.
- Mchiouer, K.; S. Bennani; and M. Meziane (2017). Microbial interactions between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in milk. Journal of Materials and Environmental Sciences. 8(4):1460-1468.
- Minh, N. P. (2014). Investigation of lactic acid fermentation from corn by-product using *L. casei* and *L. plantarum* strain. International Journal of Multidisciplinary Research and Development. 1(3):92-100.
- Nagarjun, P.A. (2015). Parametric optimization of lactic acid production and its scale up using free and immobilized cells of *Lactobacillus amylovorus* NRRL B- 4542. International Journal of Pure and Applied Biotechnology. 3(5):159-168.
- Ouyang, J.; R. Ma; Z. Zheng; C. Cai; M. Zhang; and T. Jiang (2013). Open fermentative production of L-lactic acid by *Bacillus* sp. strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. Bioresource Technology. 13:475-480.
- Roberto, I.; S. Mussatto; I. Mancilha; and M. Fernandes (2007). The effects of pH and nutrient supplementation of brewer's spent grain cellulosic hydrolysate for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. Journal of Biotechnology. 131(2):181-182.
- Rodrigues, C.; L.P. Vandenberghe; A.L. Woiciechowski; J. de Oliveira; L.A. Letti; and C.R. Soccol (2017). Production and application of lactic acid. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. 543-556.
- Sobowale, A.A.; M.O. Efuntoye; and O.O. Adesetan (2011). Energy sources of yoghurt bacteria and enhancement of their galactose uptake. African Journal of Biotechnology. 10(21): 4457-4463.
- Taleghani, H.G.; G.D. Najafpour; and A.A. Ghoreyshi (2016). A study on the effect of parameters on lactic acid production from whey. Polish Journal of Chemical Technology. 18(1): 58-63.
- Tan, J.; M.A. Abdel-Rahman; and K. Sonomoto (2018). Biorefinery-based lactic acid fermentation: Microbial production of pure monomer product. In: P.D. Cantow; P.D. Natta; and P. Ferry (Eds). Advances in Polymer Science. 279:27–66, Springer, New York.
- Thakur, A.; P.S. Panesar; and M.S. Saini (2018a). Continuous production of lactic acid in a two stage process using immobilized *Lactobacillus casei* MTCC 1423 cells. International Journal of Food Engineering. 4 (3):216-222.
- Thakur, A.; P.S. Panesar; and M.S. Saini (2018b). Parametric optimization of lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* using Box- Behnken design. Periodica Polytechnica Chemical Engineering. 62(3):274-285.
- Tripathi, A.D.; S.K. Srivastava; P. Singh; R.P. Singh; S.P. Singh; A. Jha; and P. Yadav (2015). Optimization of process variables for enhanced lactic acid production utilizing paneer whey as substrate in SMF. Applied Food Biotechnology. 2(2):46-55.
- Vidra, A.; and A. Nemeth (2017). Whey utilization in a two-stage fermentation process. Liquid Waste Recovery. 2:17–20.
- Zhang, W., Y. Lin; Q. Zhang; X. Wang; D. Wu; and H. Kong (2013). Optimization of simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw for ethanol production. Fuel. 112:331-337.

Some Factors Affecting Lactic Acid Production from Cheese Whey Using a Mixed Culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*

Sahar Adnan Sheet⁽¹⁾ and Waleed Ahmed Mahmood^{*(1)}

(1). Faculty of Agriculture and Forestry, University of Mosul. Iraq.

(*Corresponding author: Dr. Waleed Ahmed Mahmood. E-Mail: waleedahmed53@yahoo.com).

Received: 04/01/2020

Accepted: 09/02/2020

Abstract

The study was carried out at Faculty of Agriculture and Forestry, Univ. of Mosul in 2018 and 2019. Lactic acid was produced from cheese whey of buffalo's milk by free mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Some factors affecting acid productivity were studied which included type and concentration of carbon and nitrogen sources, concentration of magnesium sulphate and manganese sulphate, inoculum concentration, pH and fermentation time. Results showed a significant increase in acid production upon using the mixed culture as compared to pure culture of each species. Yeast extract (12 gm/l) and lactose (15 gm/l) were found the best addition as a source of nitrogen and carbon for improving acid production, respectively. Addition of magnesium sulphate (0.35 gm/l) and manganese sulphate (0.05 gm/l) had significantly increased lactic acid production. Maximum lactic acid production was obtained upon the addition of the inoculum with a concentration of 10×10^7 cell/ml. Optimum initial pH of whey for acid production was 5.5 with non-significant differences within the range of 5-6.5. Incubation time of 48 hours was found suitable for acid production since the increment beyond this time was non-significant.

Key words: Lactic acid, Cheese whey, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, .