إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش باستخدام مزرعة مختلطة من بكتريا *Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus* المقيدة

سحر عدنان شيت[1] ووليد احمد محمود*[1]

(1). قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، العراق.
(*للمراسلة: د. وليد أحمد محمود. البريد الإلكتروني:waleedahmed53@yahoo.com).

تاريخ الاستلام: 2020/01/12 تاريخ القبول: 2020/04/12

الملخص

تم تنفيذ البحث في كلية الزراعة والغابات بجامعة الموصل خلال العامين 2018 و2019. تم إنتاج حمض اللاكتيك من شرش جبن الحليب الجاموسي باستخدام مزرعة مختلطة من بكتريا *Streptococcus thermophilus* و*Lactobacillus bulgaricus* المقيدة (Immobilized) في هلام ألجينات الكالسيوم. تمت دراسة بعض العوامل المؤثرة في كل من كفاءة التقييد وفي إنتاجية الحمض بطريقة تخمر الوجبات (Batch fermentation). أظهرت النتائج أن التركيز 2% من ألجينات الصوديوم في معلق الخلايا قد أعطى أعلى كفاءة تقييد وأفضل إنتاج من حمض اللاكتيك وبفروق معنوية عن التركيزين الآخرين (1 و3%). كما تم الحصول على أعلى كفاءة تقييد وأفضل إنتاجية للحمض باستعمال كلوريد الكالسيوم بالتركيزين 5 و4%، على التوالي. بلغت أعلى كفاءة تقييد وإنتاجية للحمض باستعمال حبيبات هلام ذات أقطار 3 ملم. أظهرت النتائج أن مدة تصلب الحبيبات 45–60 دقيقة كانت مناسبة للحصول على كفاءة تقييد وإنتاجية جيدة من الحمض. بينت النتائج أن التركيز المنخفض من اللقاح البكتيري (5×10^7 خلية/مل) كان مفضلاً للحصول على كفاءة تقييد عالية والتي انخفضت معنوياً بزيادة تركيز اللقاح. أما بالنسبة لحمض اللاكتيك فقد تم الحصول على أعلى إنتاجية باستعمال تركيز لقاح 20×10^7 خلية/مل وبفروقات غير معنوية ضمن التركيز $10–25\times10^7$ خلية/مل. تم تكرار استعمال الخلايا المقيدة في إنتاج الحمض أربع مرات متتالية ولوحظ حصول انخفاض معنوي في إنتاجية الحمض في دورات الإنتاج المتعاقبة.

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

المقدمة:

حمض اللاكتيك ($CH_3CHOHCOOH$) هو أحد الأحماض العضوية الواسعة الانتشار وله استعمالات عديدة، فهو يدخل في تحضير بعض الأغذية مثل السلطات والمخبوزات والخضراوات المخللة والمشروبات والحلويات لتحسين النكهة، كما يستعمل في صناعة

اللحوم والدواجن المعلبة لتوفير منتجات ذات صلاحية طويلة الأجل نسبياً، وقد تم إدراج هذا الحمض كماده مأمونة الاستعمال من الناحية الصحية (Generally Recognized As Safe, GRAS) من قبل منظمة الغذاء والدواء (Food and Drug Administration, FDA) (Litchfield, 2009). وهو يدخل أيضاً في صناعة الأعلاف والأنسجة والمواد الصيدلانية ومستحضرات التجميل (Tan *et al*., 2018). نال هذا الحمض في العقود الأخيرة أهمية كبيرة بسبب استعماله في تحضير حمض اللاكتيك المتعدد (Polylactic acid, PLA) والذي يمتلك صفات بلاستيكية شبيهة بالبولي ستايرين. وتتميز متعددات حمض اللاكتيك بكونها شفافة (Transparent) وبقابليتها للتحلل البيولوجي في الجسم، ويمكن التحكم بدرجة تحللها وصفاتها الأخرى من خلال التلاعب بطريقة تحضيرها ووزنها الجزيئي (Joshi and Amrutsagar, 2017). كما تعتمد خواصها الفيزيائية على نوع ونقاوة نظائر حمض اللاكتيك (+ L و - D) المستعملة في إنتاجها (Tan *et al*., 2018). يستعمل حوالي 35% من حمض اللاكتيك المنتج عالمياً في مجال التصنيع الغذائي بينما تشكل صناعة حمض اللاكتيك المتعدد (PLA) 39% من مجموع الطلب على هذا الحمض (Komesu *et al*., 2017).

يعد استعمال مخلفات معامل الأغذية كمواد أولية في التقنية الحيوية ذو أهمية كبيرة. فبالإضافة إلى إنتاج مواد مفيدة وذات أهمية اقتصادية فإن هذه العملية تساهم في علاج مشكلة التلوث البيئي بهذه المخلفات. ومن أهم هذه المخلفات الشرش المتخلف من صناعة الجبن والذي يعد غنياً بالمواد العضوية والتي تجعله من أهم الملوثات البيئية، إذ تبلغ متطلبات الأوكسجين الحيوي (BOD) له حوالي $3-5\times10^4$ جزء من المليون ومتطلبات الأوكسجين الكيميائي (COD) حوالي $6-8\times10^4$ جزء من المليون. ومن جهة أخرى فإن احتواءه على الكثير من المواد الغذائية، مثل اللاكتوز والبروتين والدهون والفيتامينات والأملاح المعدنية، يجعله وسطاً جيداً لتنمية الأحياء المجهرية وإنتاج الكثير من المواد المفيدة مثل الأحماض العضوية والأنزيمات والأحماض الأمينية والفيتامينات وبروتين وحيد الخلية وغيرها (Vidra and Nemeth, 2017).

نالت تقنية تقييد (Immobilization) الخلايا والأنزيمات اهتماماً كبيراً في العقود الأخيرة وذلك لفوائدها التكنولوجية والبيئية والاقتصادية، فهي تعمل على زيادة سرعة التفاعلات بسبب الكثافة العالية للعامل الحيوي المقيد وتساعد في استعمال معدلات جريان عالية في عمليات التخمر المستمرة (Continuous fermentations) بدون حصول غسل (Washout) أو إزالة للخلايا من وسط التخمر، كما تقلل من احتمال التلوث الميكروبي بالإضافة إلى تحسين قدرة الخلايا على التكيف لتغير الظروف البيئية. إن هذه العوامل وغيرها تساعد في خفض تكاليف تصميم المخمر والسيطرة عليه مقارنة بتقنيات التخمر التقليدية باستعمال الخلايا الحرة (El-Gendy *et al*., 2015)، وتعد طريقة التقييد في هلام ألجينات الكالسيوم من الطرق المفضلة في التقييد بسبب بساطتها وعدم سميتها (Ghorbani *et al*., 2011).

تهدف الدراسة الحالية إلى إنتاج حمض اللاكتيك من شرش الجبن المصنع من حليب الجاموس بواسطة مزرعة مختلطة لبكتريا *Streptococcus thermophilus* و*Lactobacillus bulgaricus* المقيدة في هلام ألجينات الكالسيوم وتأثير بعض العوامل في كفاءة التقييد وفي إنتاج الحمض.

مواد البحث وطرائقه:

تم الحصول على مزرعة مختلطة لبكتريا *Streptococcus thermophilus* و*Lactobacillus bulgaricus* من شركة ألبان محلية. نشطت المزرعة في وسط حليب الفرز المعقم بدرجة حرارة 40°م لمدة 24 ساعة وتم التأكد من نقاوتها بالفحص المجهري ثم حفظت في الثلاجة (4°م) لحين الاستعمال. تم حساب تركيز الخلايا باستعمال طريقة الأطباق المصبوبة.

الشرش: استخدم الشرش الناتج من تصنيع الجبن الأبيض من الحليب الجاموسي باستعمال المنفحة الميكروبية. سخّن الشرش بدرجة حرارة 90°م لمدة 20 دقيقة لترسيب البروتينات والتي تم فصلها بالطرد المركزي بسرعة 4000 ×g لمدة 15 دقيقة وذلك حسب الطريقة الموصوفة من قبل Mawgoud *et al*., (2016).

تقدير تركيز اللاكتوز في الشرش: اتبعت الطريقة التي ذكرها Ghasemi *et al*., (2009) والتي تعتمد على قياس تركيز السكر المختزل (اللاكتوز) بتفاعله مع مركب 3,5-dinitrosalicylic acid في وسط قاعدي ليتحول المركب الأخير إلى 3-amino-5-nitrosalicylic acid ذي اللون البرتقالي والذي تم قياس الامتصاص الضوئي له عند طول موجي مقداره 540 نانومتر. تعتمد شدة اللون الناتج على تركيز السكر المختزل.

تقدير حمض اللاكتيك: اتبعت الطريقة التي ذكرها Borshchevskaya *et al*., (2016) والتي تعتمد على قياس الامتصاص الضوئي لمركب لاكتات الحديديك ذي اللون الأصفر المخضر والناتج من تفاعل اللاكتات مع كلوريد الحديديك ($FeCl_3$) عند طول موجي 405 نانومتر.

تقييد مزيج خلايا بكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* في هلام ألجينات الكالسيوم: اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل El-Gendy *et al*., (2015). أجريت العملية بمزج محلول ألجينات الصوديوم المعقم (2%) مع حجم مماثل من معلق مزيج نوعي الخلايا للحصول على معلق يحوي ألجينات الصوديوم بتركيز 1%. نقل المزيج إلى محقنة طبية (Syringe) وتم إنزال قطرات المعلق من المحقن بهدوء إلى سطح محلول كلوريد الكالسيوم (2%) لتتحول القطرات عند ملامستها لسطح المحلول إلى حبيبات هلامية كروية الشكل من ألجينات الكالسيوم. تركت حبيبات الهلام في المحلول لمدة 30 دقيقة لإكمال عملية التصلب. جمعت الحبيبات وعلقت في ماء الببتون (Peptone water) وخزنت في الثلاجة لحين الاستعمال.

تقدير كفاءة تقييد الخلايا: اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Chavarri *et al*., (2010). بعد الانتهاء من تقييد الخلايا وتصلبها فصلت حبيبات الهلام وتمت إسالتها بوضعها في 50 مل من محلول سترات الصوديوم المعقم (تركيزه 1% وبدالة حمضية مقدارها 6) لمدة 30 دقيقة وبدرجة حرارة الغرفة. غسلت الخلايا المتحررة بماء الببتون وأجريت عملية طرد مركزي وتم التخلص من الراشح وعلقت الخلايا في 50 مل من ماء الببتون وحسب عددها بطريقة الأطباق المصبوبة (Pouring plate count). ومن ثم حسبت كفاءة التقييد باستعمال المعادلة الآتية:

$$\text{كفاءة التقييد} = \frac{\text{عدد الخلايا المقيدة}}{\text{عدد الخلايا الحرة قبل التقييد}} \times 100$$

عملية التخمر وإنتاج حمض اللاكتيك بواسطة الخلايا المقيدة بطريقة الوجبات: وزع الشرش المدعم بمستخلص الخميرة، كمصدر نتروجيني، في دوارق مخروطية سعة 100 مل بواقع 25 مل لكل دورق وعقم بدرجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة. بردت الدوارق إلى حرارة الغرفة ولقحت بكمية من حبيبات هلام ألجينات الكالسيوم المحتوية على مزيج نوعي البكتريا المقيدة بحيث كان تركيز الخلايا المقيدة المضافة إلى الشرش يعادل 10 × 10^7 خلية/مل. حضنت الدوارق بدرجة حرارة 40°م في محضن هزاز بسرعة بطيئة وفي ظروف لاهوائية لمدة 48 ساعة. بعد انتهاء التخمر اجريت عملية طرد مركزي بسرعة 4000 ×g لمدة 10 دقائق ثم تم تقدير حمض اللاكتيك في راشح المزرعة. وحسبت كفاءة الإنتاج باستعمال المعادلة الآتية (Ghaly *et al*., 2003):

$$\text{كفاءة إنتاج الحمض (\%)} = \frac{\text{الحاصل الحقيقي للمنتوج}}{\text{الحاصل النظري للمنتوج}}$$

إذ أن: الحاصل النظري لحمض اللاكتيك من التخمر المتجانس= 0,95 × تركيز اللاكتوز في الشرش (48 غ/لتر)

تأثير بعض العوامل في كفاءة التقييد وإنتاج الحمض من الشرش بطريقة الوجبات: درس تأثير بعض العوامل في كفاءة التقييد وإنتاجية حمض اللاكتيك بطريقة الوجبات باستعمال الخلايا المقيدة لمزيج البكتريا. شملت هذه العوامل كلاً من تركيز ألجينات الصوديوم (1–4%) وتركيز كلوريد الكالسيوم (1–8%) وأقطار حبيبات الهلام (1.6–3 ملم) ومدة تصلبها (15–120 دقيقة) بالاضافة إلى تأثير تركيز اللقاح (5–25 خلية/مل × 10^7). كما درس تأثير تكرار استعمال الخلايا المقيدة في إنتاج الحمض.

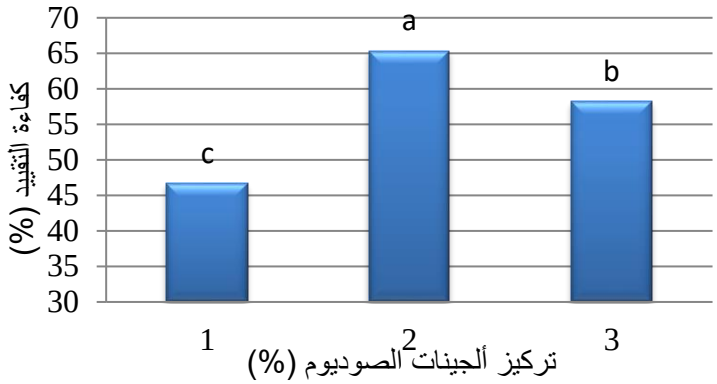
التحليل الإحصائي: تم تحليل البيانات وفق نظام التجارب البسيطة بالتصميم العشوائي الكامل (Complete Randomized Design, CRD) للتعرف على طبيعة الاختلافات بين مستويات المعاملات كما استخدم اختبار دنكن متعدد المدى لتحديد معنوية الفروقات بين المتوسطات عند مستوى احتمالية 0.01. وتمت الاستعانة بالبرنامج الإحصائي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

النتائج والمناقشة:

تم تقييد مزيج خلايا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* في حبيبات هلام ألجينات الكالسيوم وتمت دراسة تأثير بعض العوامل في كفاءة التقييد وفي إنتاجية حمض اللاكتيك من الشرش بواسطة الخلايا المقيدة بطريقة تخمر الوجبات.

تأثير تركيز ألجينات الصوديوم في كفاءة تقييد الخلايا: استعملت أربعة تراكيز من ألجينات الصوديوم في معلق الخلايا (1–4%) وتم قياس كفاءة التقييد في حبيبات الهلام الناتجة. لم تنجح محاولة التقييد باستعمال التركيز 4% لأن محلول الألجينات الأولي المستعمل (تركيز 4%) كان شديد اللزوجة ولم يكن بالإمكان الحصول على مزيج متجانس مع عالق خلايا البكتريا، ولهذا فقد تم استبعاد هذا التركيز من التجارب. بلغت كفاءات التقييد للتراكيز 1 و 2 و 3% من الألجينات 46.73 و65.36 و58.17%، على التوالي. بينت النتائج أن أعلى كفاءة للتقييد قد تم الحصول عليها باستعمال التركيز 2% من الألجينات، وأن زيادة أو تقليل التركيز قد أدى إلى انخفاض كفاءة التقييد وبفروق معنوية (الشكل 1). تم الحصول على أدنى كفاءة تقييد عند استعمال التركيز المنخفض من الألجينات (1%)، وقد يعود السبب إلى ضعف شبكة هلام ألجينات الكالسيوم المتكونة وزيادة نفاذيتها مما أدى إلى تسرب وخروج الخلايا المقيدة من الحبيبات. أما بالنسبة للتركيز العالي من الألجينات (3%) فقد كان أفضل من التركيز المنخفض في درجة احتفاظ حبيبات الهلام بالخلايا المقيدة بالرغم من أنه كان أقل كفاءة من التركيز 2%، وقد يعود السبب إلى أن التركيز العالي يؤدي إلى تكوين شبكة هلامية

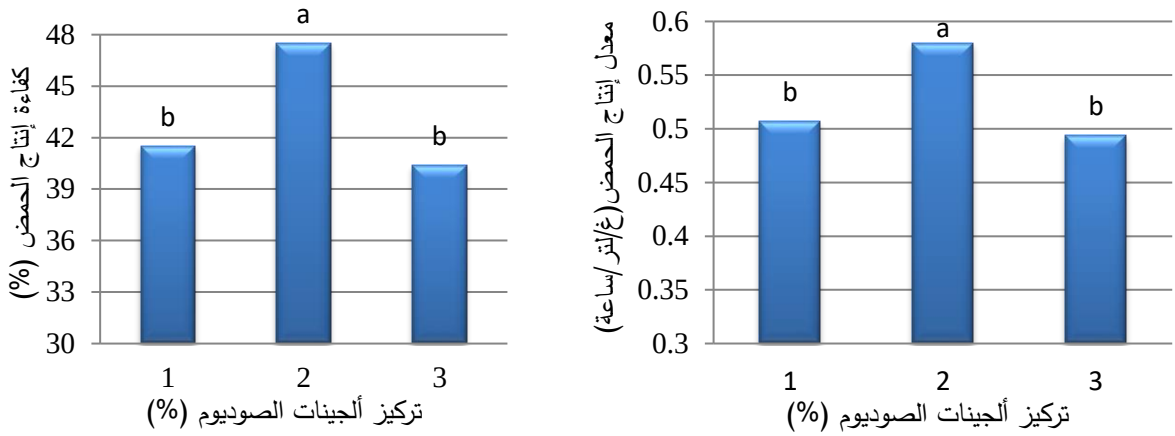
كثيفة جدا ومنكمشة وذات فجوات صغيرة لا تسمح باحتواء أعداد كبيرة من الخلايا فيها مما يؤدي إلى انخفاض كفاءة التقييد. من ناحية أخرى، فإن استعمال تراكيز منخفضة من ألجينات الصوديوم يؤدي إلى قلة اعداد الروابط التقاطعية وبالتالي زيادة مسامية الشبكة الهلامية مسبباً تسرب الخلايا المقيدة من حبيبات الهلام وبالتالي انخفاض كفاءة التقييد (Talekar and Chavare, 2012). كانت النتيجة مشابهة لتلك التي حصل عليها Mrudula and Shyam, (2012) و Mawgoud *et al.*, (2016) في تقييد خلايا بكتريا *Bacillus megaterium* و *L. bulgaricus* والذين وجدوا أن 2% من ألجينات الصوديوم كان أفضل تركيز لتقييد الخلايا المذكورة، كما كان هذا التركيز هو الأفضل للحصول على أعلى كفاءة لتقييد خلايا الخميرة التابعة لأجناس *Candida* و *Saccharomyces* و *Scheffersomyces* (Carvalho *et al.*, 2002; Najafpou *et al.*, 2044; Milessi *et al.*, 2013). قد يعود سبب تباين تأثير تركيز الألجينات في كفاءة التقييد إلى ظروف التقييد المتبعة ومدى نقاوة المواد المستعملة ومصدرها مثل الألجينات وكلوريد الكالسيوم، فقد أشار Ramos *et al.*, (2018) إلى تأثر قوام ومسامية هلام ألجينات الكالسيوم بصورة كبيرة بكل من الوزن الجزيئي لألجينات الصوديوم ونسبة حمض المانيورونيك (Mannuronic acid) إلى حمض الكيولورونيك (Guluronic acid) الداخلين في تركيبها.



الشكل 1. تأثير تركيز ألجينات الصوديوم في كفاءة تقييد مزيج بكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* في هلام ألجينات الكالسيوم.

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

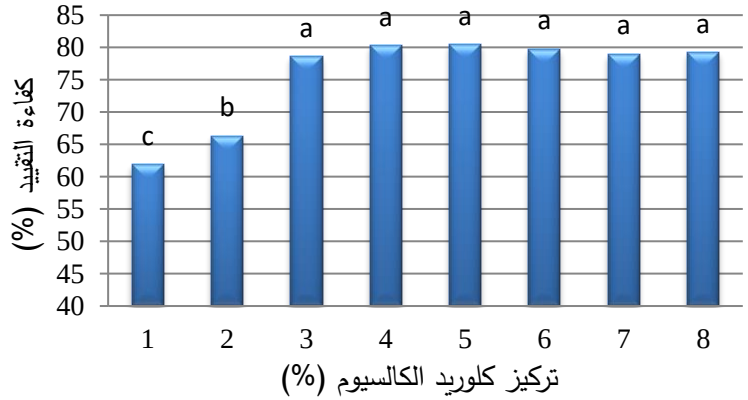
تأثير تركيز ألجينات الصوديوم في إنتاج حمض اللاكتيك بواسطة الخلايا المقيدة: بينت النتائج أن أفضل تركيز من الألجينات للحصول على أعلى إنتاجية من الحمض كان 2% إذ تم الحصول على أعلى معدل وكفاءة إنتاج للحمض (0.58 غ/لتر/ساعة و47.51%، على التوالي) باستعمال التركيز المذكور وبفروق كبيرة ومعنوية عن التركيزين الآخرين. كانت إنتاجية الحمض متقاربة وبفروق غير معنوية باستعمال التركيزين 1 و3% (الشكل 2، أ وب). يلاحظ أن إنتاجية الحمض كانت متناسبة مع كفاءة التقييد والتي تتأثر ببعض العوامل وأهمها مسامية (Porosity) هلام ألجينات الكالسيوم. يؤثر تركيز ألجينات الصوديوم المستعملة في كثافة الروابط التقاطعية التي تتكون بين المجاميع الفعالة في الشبكة الهلامية وبالتالي في مسامية الهلام والتي تؤثر بدورها في قدرة جزيئات مادة الركيزة ونواتج التفاعل على المرور خلالها. تسبب التراكيز العالية من ألجينات الصوديوم انخفاض مسامية الهلام بسبب زيادة كثافة الشبكة مما يؤدي إلى انخفاض قابلية جزيئات مواد التفاعل ونواتجه على النفاذ خلال المسامات وبالتالي انخفاض الإنتاجية (Talekar and Chavare, 2012).



الشكل 2. تأثير تركيز ألجينات الصوديوم في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بطريقة الوجبات بواسطة مزيج بكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* المقيدة. أ- معدل الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج.
(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

كانت النتائج متوافقة مع توصل إليه Goksungur and Guvenc (1999) عند إنتاج حمض اللاكتيك باستعمال خلايا *L. delbrueckii* المقيدة في ألجينات الكالسيوم، إذ وجدا أن أقصى إنتاج من الحمض قد تم الحصول عليه باستعمال ألجينات الصوديوم بتركيز 2% في عملية التقييد وأن استعمال التركيزين 1 و1.5% من الألجينات أدى إلى تحطم الحبيبات الهلامية بسبب ضعف تركيبها. كذلك توافقت النتائج مع ما توصل إليه Idris and Wahidin, (2006) عند إنتاج الحمض من المخلفات السائلة لثمار الأناناس بواسطة بكتريا *L. delbrueckii* المقيدة في هلام ألجينات الكالسيوم إذ كان التركيز الأمثل لألجينات الصوديوم 2%. أما Abdel-Naby *et al.*, (1992) فقد وجدوا أن أفضل تركيز من ألجينات الصوديوم لتقييد بكتريا *Lactobacillus lactis* من أجل الحصول على أعلى إنتاج من حمض اللاكتيك هو 1.5% بينما انخفض الإنتاج عند ارتفاع التركيز إلى 2.7%.

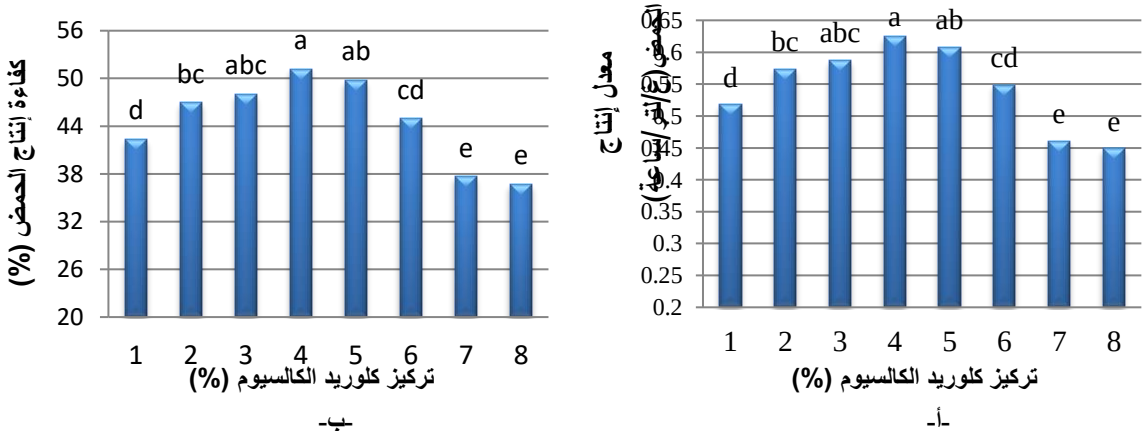
تأثير تركيز كلوريد الكالسيوم في كفاءة تقييد الخلايا: لتركيز كلوريد الكالسيوم تأثير كبير في عملية التهلم التي تحصل في شبكة الألجينات وفي كثافة الروابط التقاطعية التي تقوم بحجز الخلايا المقيدة داخلها. ويعد اختيار التركيز المناسب من هذه المادة عاملاً مهماً في تحديد خواص حبيبات الألجينات وكفاءتها في تقييد العوامل الحيوية. استعملت تراكيز تراوحت بين 1–8% من كلوريد الكالسيوم في تقييد مزيج خلايا البكتريا. بينت النتائج أن كفاءة التقييد بلغت 61.85% عند استعمال التركيز 1% وارتفعت بصورة معنوية لتصل 66.33% عند مضاعفة تركيز الكلوريد إلى 2% واستمرت بالارتفاع المعنوي والكبير إلى 78.6% عند زيادة تركيز كلوريد الكالسيوم إلى 3%. يلاحظ حصول ارتفاع بسيط وغير معنوي في كفاءة التقييد بزيادة التركيز المستعمل إلى 4 و5% ثم بدأت الكفاءة في الانخفاض بزيادة التركيز بنسبة > 5% (الشكل 3).



الشكل 3. تأثير تركيز كلوريد الكالسيوم في كفاءة تقييد مزيج *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* في ألجينات الكالسيوم.
(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

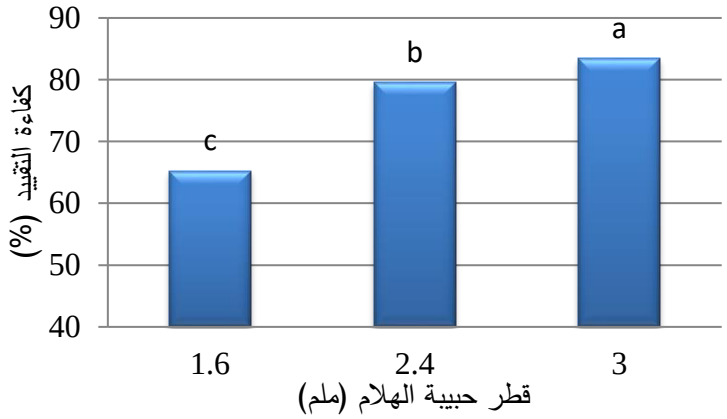
تباينت نتائج الدراسات السابقة حول هذا الموضوع. فقد وجد كل من Carvalho *et al.*, (2002) و Milessi *et al.*, (2013) أن التركيز 1% من كلوريد الكالسيوم كان الأفضل لتقييد خلايا الخميرة التابعة للجنسين *Candida* و*Scheffersomyces*، بينما كان التركيز الأمثل للكلوريد للحصول على أعلى كفاءة تقييد لخلايا بكتريا *Bacillus sp.* هو 1.5% (Seifan *et al.*, 2017). أما Anwar *et al.*, (2009) فقد توصلوا إلى أعلى كفاءة تقييد باستعمال التركيز 2% من كلوريد الكالسيوم. قد يعود هذا التباين إلى عوامل عديدة مثل تركيز ونقاوة الألجينات ومدة التصلب وتركيز الخلايا المقيدة ونوعها.

تأثير تركيز كلوريد الكالسيوم في إنتاج حمض اللاكتيك بواسطة الخلايا المقيدة: يستعمل كلوريد الكالسيوم في عملية التقييد لتوفير أيونات الكالسيوم التي تحل محل أيونات الصوديوم وتكوين هلام ألجينات الكالسيوم الحاوي على روابط تقاطعية بكثافة معينة تكفي للحصول على شبكة ذات مسامات تسمح لجزيئات مواد التفاعل ونواتجه بالمرور خلالها ولا تتمكن الخلايا أو الأنزيمات المحجوزة داخلها من الخروج إلى وسط التخمر وبالتالي يمكن الحصول على إنتاجية عالية من نواتج التخمر (Hitha *et al.*, 2014). بلغ المعدل الأعظمي والكفاءة الإنتاجية لحمض اللاكتيك من الشرش 0.625 غ/لتر/ساعة و51.18%، على التوالي بواسطة الخلايا المقيدة لمزيج البكتريا عند استعمال كلوريد الكالسيوم بتركيز 4%، وكانت الفروق غير معنوية في المدى 3–5% من التركيز. بينما كان الانخفاض في الإنتاجية معنوياً خارج النطاق المذكور من التركيز (الشكل 4).



الشكل 4. تأثير تركيز كلوريد الكالسيوم في معدل إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بطريقة الوجبات بواسطة مزيج بكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* المقيدة. أ- معدل الإنتاج ب- كفاءة الإنتاج.
(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

تأثير حجم حبيبات هلام ألجينات الكالسيوم في كفاءة تقييد الخلايا: تم إنتاج ثلاثة أحجام من حبيبات الألجينات الحاوية على خلايا البكتريا المقيدة وذلك لغرض التعرف على تأثير هذا العامل في قابلية الحبيبات على الاحتفاظ بالخلايا المقيدة داخلها وعدم تسربها إلى خارج الشبكة الهلامية. يبين الشكل (5) أن كفاءة التقييد كانت أعلى في حالة الحبيبات الكبيرة (بقطر 3 ملم) والتي بلغت 83.48% وبفروق معنوية مقارنة بالحجمين الآخَرَين (بأقطار 1.6 و2.4 ملم) والذين وصلت كفاءة التقييد فيهما إلى 65.24 و79.5%، على التوالي. وهذا قد يعود إلى انخفاض المساحة السطحية الكلية للحبيبات الكبيرة وبالتالي انخفاض اعداد الخلايا التي تتسرب إلى الخارج مقارنة بالحبيبات الصغيرة ذات المساحة السطحية الكبيرة الموجودة في كمية محددة من الحبيبات.

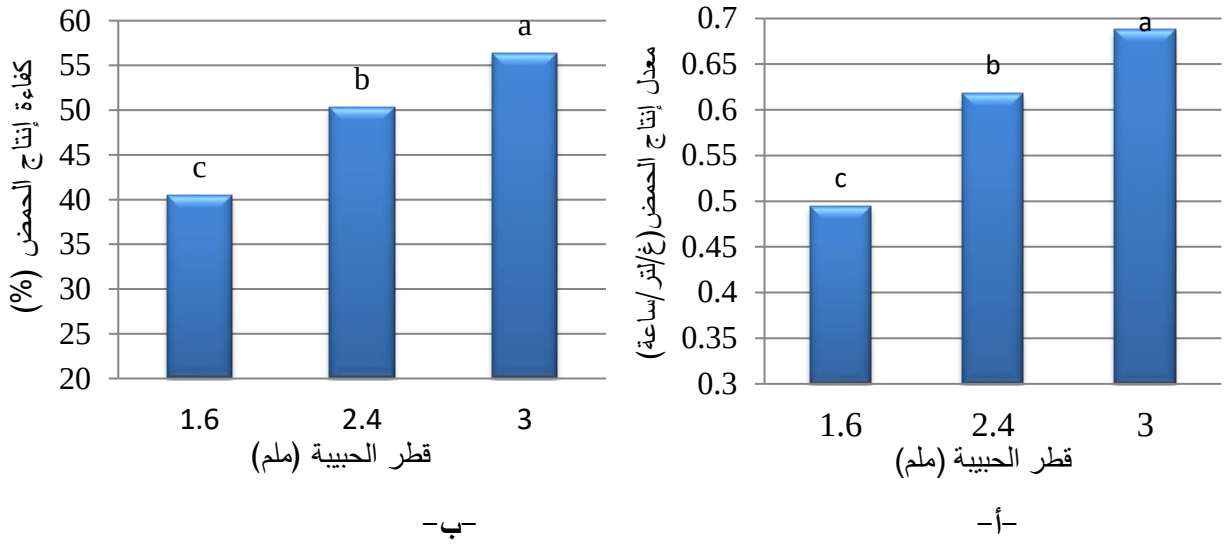


الشكل 5. تأثير حجم الحبيبات في كفاءة تقييد مزيج بكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* في ألجينات الكالسيوم.
(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

توصل Viet *et al.*, (2013) إلى نتيجة مشابهة إذ وجدوا أن أقطار الحبيبات المثالية لهلام الألجينات كان 3 ملم، كما توصل Mrudula and Shyam, (2012) إلى نفس النتيجة في تقييد خلايا بكتريا *B. megaterium* في حبيبات هلام الألجينات، بينما أعطت أقطار حبيبات الألجينات ذات الأقطار 1.3–1.7 ملم أعلى كفاءة تقييد لخلايا بكتريا *L. casei* (Goksungur et al., 2005).

تأثير حجم حبيبات هلام ألجينات الكالسيوم في إنتاج حمض اللاكتيك بواسطة الخلايا المقيدة: تظهر النتائج المبينة في الشكل (6) أن المعدل الأعظمي والكفاءة الإنتاجية لحمض اللاكتيك (0.688 غ/لتر/ساعة و56.31%، وعلى التوالي) قد تم الحصول عليها عند تقييد الخلايا في حبيبات بأقطار 3 ملم وبفروقات معنوية واضحة عن الإنتاجية باستعمال الحجوم الصغيرة للحبيبات، قد يعود السبب في هذه النتيجة إلى زيادة كفاءة التقييد باستعمال الحبيبات الكبيرة مما يعني زيادة اعداد الخلايا المقيدة فيها والتي تعمل على إنتاج الحمض مقارنة بالحبيبات الصغيرة والتي تحتوي على اعداد منخفضة نسبياً من الخلايا. بالإضافة إلى ذلك فإن مدة التحضين (48 ساعة) كانت كافية لدخول وانتشار جزيئات مادة الركيزة (اللاكتوز) والمغذيات في الحبيبات ووصولها إلى الخلايا البكتيرية وكذلك لخروج النواتج الاستقلابية إلى الخارج مما ساهم بدرجة كبيرة في الحد من تأثير تثبيط الفعاليات الاستقلابية بواسطة نواتج التفاعل (Feed-back inhibition)وكذلك التأثير المعاكس الناتج عن زيادة المسافة التي يجب أن تقطعها جزيئات المواد المتفاعلة والنواتج الاستقلابية في المرور خلال الشبكة الهلامية للحبيبات الكبيرة ذات الحجوم الكبيرة. ذكر Mawgoud *et al.*, (2016) أن أقطار حبيبات هلام الألجينات المناسبة لتقييد خلايا بكتريا *L. bulgaricus* هي 2 ملم، بينما وجد Thakur *et al.*, (2018) أن حبيبات الهلام بأقطار 2.5 ملم قد أعطت إنتاجاً جيداً من الحمض من الشرش بواسطة بكتريا *L. casei*. بينما كانت حبيبات الهلام بأقطار 3

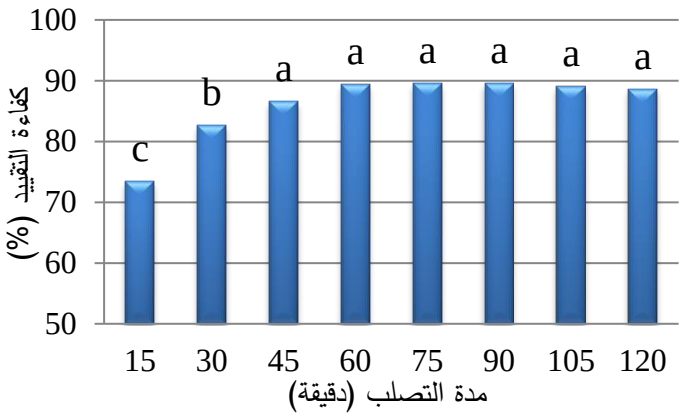
ملم مناسبة لتقييد بكتريا *L. longum* و *L. helveticus* المستعملة في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش (Shahbazi *et al.*, 2005).



-أ- -ب-

الشكل 6. تأثير حجم حبيبات ألجينات الكالسيوم في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بطريقة الوجبات بواسطة مزيج بكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* المقيدة. أ- معدل الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج.
(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

تأثير مدة تصلب حبيبات هلام ألجينات الكالسيوم في كفاءة تقييد الخلايا: عند إجراء عملية التقييد وتكوين حبيبات هلام الألجينات في محلول كلوريد الكالسيوم فإن هذه الحبيبات تكون هشة ولينة في البداية وتحتاج إلى بقائها مغمورة في محلول الكلوريد لمدة معينة يطلق عليها مدة التصلب والتي تعد ضرورية لإكمال عملية استبدال أيونات الصوديوم بأيونات الكالسيوم في داخل الشبكة الهلامية للحبيبة وهذا يعطي صلابة للحبيبات تجعلها مقاومة للتهشم او الانضغاط خلال عمليات التداول المختلفة التي تتعرض لها خلال التخمر مثل المزج والتحريك والترشيح وغيرها. استعملت فترات تصلب للحبيبات تراوحت بين 15–120 دقيقة. وقد بينت النتائج أن كفاءة التقييد بلغت 73.36% باستعمال مدة 15 دقيقة في التصلب وعند زيادة مدة التصلب إلى 45 دقيقة لوحظ حصول ارتفاع معنوي في كفاءة التقييد حيث وصلت النسبة إلى 86.6%. أما عند زيادة المدة أكثر من ذلك فيلاحظ أن الارتفاع في كفاءة التقييد أصبح قليلاً وغير معنوياً. ويمكن القول أن المدة المناسبة للتصلب تتراوح بين 45–60 دقيقة إذ أنه عند هذه المدة انخفضت كمية الخلايا المتسربة من حبيبات الهلام وهذا يعني أن نفاذية الهلام أصبحت مناسبة لمنع الخلايا من التسرب في المراحل اللاحقة والتي تستعمل فيها الحبيبات في عملية التخمر وإنتاج حمض اللاكتيك (الشكل 7).

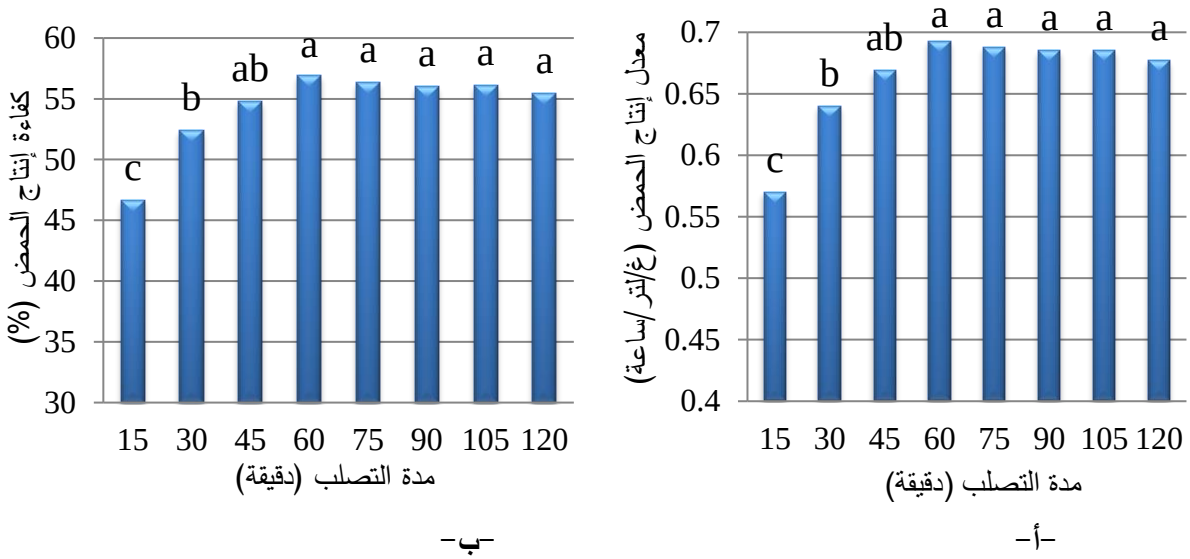


الشكل 7. تأثير مدة التصلب في كفاءة تقييد مزيج بكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* في هلام ألجينات الكالسيوم.
(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

يلاحظ وجود تباين كبير في نتائج الدراسات السابقة حول مدة التصلب المناسبة للوصول إلى كفاءة التقييد المناسبة، فقد توصل Viet *et al.*, (2013) و Mawgoud *et al.*, (2016) إلى أن أفضل مدة لتصلب حبيبات ألجينات الكالسيوم كانت 30 دقيقة، بينما حصل Mrudula and Shyam, (2012) على أفضل كفاءة لتقييد بكتريا *B. megaterium* في حبيبات هلام الألجينات بعد مدة تصلب في محلول كلوريد الكالسيوم مقدارها 12 ساعة. قد يعود سبب تباين النتائج إلى اختلاف ظروف التقييد المستعملة ومدى نقاوة المواد الداخلة في عملية التقييد وخاصة ألجينات الصوديوم.

تأثير مدة التصلب في إنتاج حمض اللاكتيك بواسطة الخلايا المقيدة: إن عملية التقييد الناجحة من الناحية العملية هي التي يتم فيها الحصول على حبيبات ذات مسامية مناسبة للحركة الحرة لمواد التفاعل ونواتجه خلال الشبكة الهلامية وفي نفس الوقت تعمل على منع الخلايا أو الأنزيمات المقيدة فيها من التسرب إلى الخارج لأن ذلك يؤدي إلى فشل عملية التقييد وانخفاض العمر الإنتاجي للخلايا المقيدة. وبعبارة أخرى فإن كفاءة التقييد العالية لا تعني دائما أن عملية التقييد تكون مثالية وناجحة ما لم يصاحب ذلك الحصول على إنتاجية عالية من عملية التخمر.

بينت النتائج حصول زيادة معنوية لكمية الحمض المنتج من الخلايا المقيدة عند زيادة مدة تصلب الحبيبات من 15 إلى 45 دقيقة، إذ بلغت الكمية المنتجة من الحمض 27.36 و32.11 غ/لتر عند استعمال مدتي التصلب المذكورتين، على التوالي. وقد يعود السبب إلى الارتفاع الحاصل في كفاءة التقييد والذي يعني احتفاظ الحبيبات بكمية أكبر من الخلايا والتي تقوم بعملية التخمر مع عدم التأثير في حرية حركة مواد التفاعل ونواتجه خلال الشبكة الهلامية نتيجة الانخفاض النسبي لمسامية الهلام بسبب زيادة مدة التصلب. أدى استعمال مدة تصلب طويلة إلى استقرار نسبي في إنتاج الحمض وبفروق غير معنوية في النطاق 30–120 دقيقة. ويمكن القول أن مدة التصلب 45–60 دقيقة هي الأنسب لإنتاج الحمض (الشكل 8 أ، ب). تحتاج الحبيبات إلى مدة زمنية محددة لإكمال عملية التصلب. يؤدي استعمال مدة قليلة في التصلب إلى إنتاج حبيبات لينة وهشة وتسمح للخلايا بالتسرب إلى الخارج كما أن زيادة المدة لا تؤدي إلى تحسين صفات الحبيبات التي وصلت إلى الحالة المثلى للصلابة (Pereira *et al.*, 2018). كانت النتيجة مشابهة لتلك التي حصل عليها Thakur *et al.*, (2018) عند إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بواسطة بكتريا *L. casei* المقيدة في هلام ألجينات الكالسيوم، كما كانت مشابهة لتلك المستعملة في تقييد بكتريا *L. longum* و*L. helveticus* المستعملة في إنتاج الحمض من الشرش (Shahbazi *et al.*, 2005).

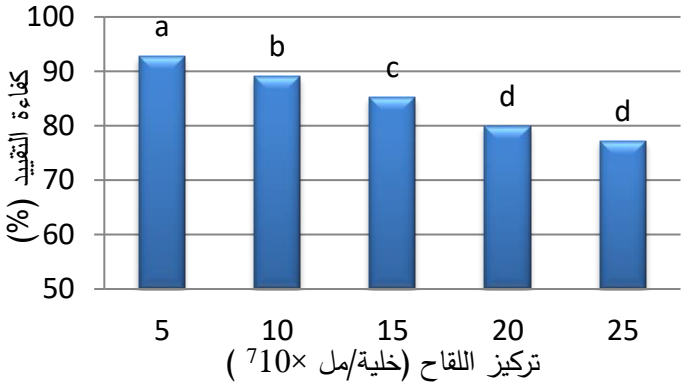


-أ- -ب-

الشكل 8. تأثير مدة تصلب حبيبات ألجينات الكالسيوم في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بطريقة الوجبات بواسطة مزيج بكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* المقيدة أ- معدل الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج.

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

تأثير تركيز اللقاح في كفاءة تقييد الخلايا: أجريت عملية تقييد مزيج البكتريا في هلام الألجينات بمزج اللقاح مع محلول ألجينات الصوديوم بحيث كان تركيزه في المزيج يتراوح بين 5-25 $\times 10^7$ خلية/مل ثم أكملت عملية التقييد. بينت النتائج وجود علاقة عكسية بين تركيز اللقاح وكفاءة التقييد (الشكل 9). بلغت الكفاءة 92.76% عند استعمال لقاح بتركيز 5$\times 10^7$ خلية/مل وانخفضت معنوياً لتصل إلى 89.02% عند زيادة تركيز اللقاح إلى 10$\times 10^7$ خلية/مل، واستمر الانخفاض المعنوي في كفاءة التقييد مع زيادة تركيز اللقاح المضاف لتصل 77.17%.



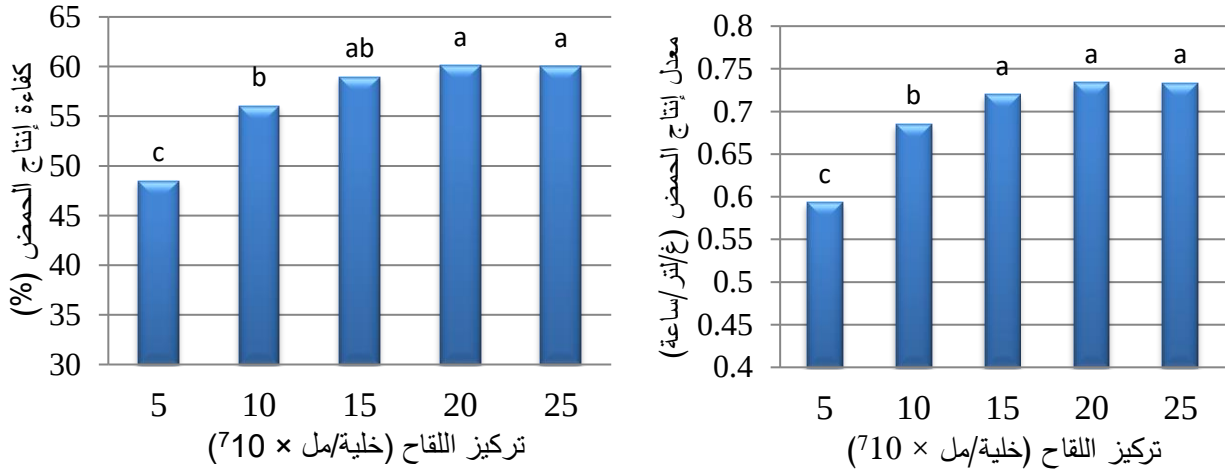
الشكل 9. تأثير تركيز اللقاح في كفاءة تقييد مزيج بكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* في ألجينات الكالسيوم.

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

قد يؤدي استعمال تركيز عالي من الخلايا إلى عدم قدرة حبيبات الهلام على استيعابها مما يدفعها للتسرب إلى وسط النمو وبالتالي انخفاض كفاءة التقييد. ويمكن القول بأن تركيز الخلايا الأمثل في محلول ألجينات الصوديوم هو 5$\times 10^7$ خلية/مل للحصول على أفضل كفاءة تقييد. وتعد هذه النتيجة بديهية ومتوقعة، إذ أن وجود الخلايا بكثافة منخفضة وغير متزاحمة في الحبيبات سوف يبقيها داخل الهلام ولن يؤدي إلى تسربها إلى الخارج وبالتالي تكون كفاءة التقييد مرتفعة وخاصة عندما تكون مسامية الهلام مناسبة والتي

تتأثر بكمية وكثافة الروابط التقاطعية المتكونة في شبكة الهلام والتي تؤثر بدورها في قدرة جزيئات مادة الركيزة ونواتج التفاعل في المرور خلالها (Seifan *et al.*, 2017).

تأثير تركيز اللقاح في إنتاج حمض اللاكتيك بواسطة الخلايا المقيدة: يوضح الشكل (10) تأثير تركيز لقاح مزيج البكتريا المقيدة في حبيبات ألجينات الكالسيوم في كل من معدل وكفاءة إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش. تبين النتائج وجود علاقة طردية بين تركيز اللقاح وبين إنتاجية الحمض إذ تم الحصول على أقصى معدل إنتاج للحمض (0.734 غ/لتر/ساعة) عند إضافة اللقاح بتركيز 20×10^7 خلية/مل مع وجود فروقات غير معنوية في النطاق 15–25×10^7 خلية/مل من تركيز اللقاح. أما التركيز المنخفض من اللقاح (5×10^7 خلية/مل) فقد أعطى إنتاج منخفض من الحمض (0.593 غ/لتر/ساعة) وبفرق معنوي عن التراكيز الاخرى من اللقاح بالرغم من كفاءة التقييد العالية. ويعود السبب إلى انخفاض كمية الخلايا المقيدة في الحبيبات مقارنة بالمعاملات التي استعملت فيها تراكيز عالية من اللقاح. وبصورة عامة فإن الإنتاج العالي من الحمض يكون مرتبطاً بالعدد الحقيقي للخلايا المقيدة في الهلام بغض النظر عن كفاءة التقييد لكون كفاءة التقييد تعبر عن النسبة المئوية للخلايا المقيدة ولا تعبر عن كميتها أو عددها الكلي الموجود في الحبيبات. لهذا السبب يلاحظ أن إنتاجية الحمض قد تناسبت طرديا مع كمية اللقاح المضاف بالرغم من حصول تسرب للخلايا من الحبيبات خلال عملية التقييد لأن كمية الخلايا الباقية في الهلام عند استخدام التركيز العالي من اللقاح لا زالت أكبر من مثيلتها في حالة استعمال تركيز منخفض من اللقاح.

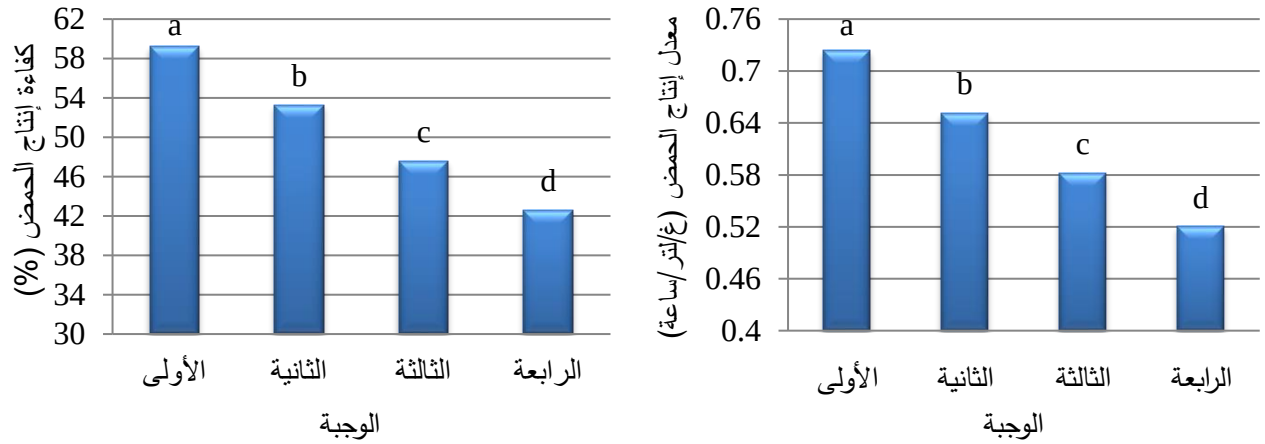


–أ– –ب–

الشكل 10. تأثير تركيز اللقاح في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بطريقة الوجبات بواسطة مزرعة مختلطة لبكتريا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* المقيدة. أ- معدل الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج.
(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

تأثير تكرار استعمال الخلايا المقيدة في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بطريقة الوجبات: من فوائد تقنية تقييد الخلايا هي امكانية فصل الخلايا المقيدة من وسط التخمر وإعادة استعمالها في وجبات تخمر لاحقة ولعدة مرات بعكس الخلايا الحرة. استعملت الخلايا المقيدة في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش وتم فصلها من وسط التخمر وأعيد استعمالها في الإنتاج لأربع مرات متتالية. بينت نتائج الدورة الأولى من الإنتاج أن كل من معدل وكفاءة إنتاج الحمض قد بلغت 0.724 غ/لتر/ساعة و59.23%، على التوالي، ثم

تناقصت الإنتاجية في الدورات اللاحقة وبصورة معنوية لتصل إلى 0.52 غ/لتر/ساعة و 42.58% لمعياري الإنتاج المذكورين آنفاً، على التوالي (الشكل 11).



الشكل 11. تأثير تكرار استعمال مزيج خلايا *S. thermophilus* و *L. bulgaricus* المقيدة في إنتاج حمض اللاكتيك من الشرش بطريقة الوجبات. أ- معدل الإنتاج، ب- كفاءة الإنتاج.
(الحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى 0.01)

قد يعود الانخفاض المستمر في إنتاج الحمض إلى بضعة اسباب منها التسرب المستمر للخلايا من الحبيبات إلى وسط التخمر بسبب تضرر وتهشم بعض الحبيبات والناتج عن التحريك المستمر في الحضان الهزاز (Shaker incubator) مما أدى إلى تناقص أعدادها في الدورات أو الوجبات اللاحقة من التخمر، وكذلك موت أو انخفاض فعالية بعض الخلايا بالإضافة إلى انخفاض فعالية وثبات إنزيماتها بزيادة مدة التخمر. يعد عدد الدورات الإنتاجية الناجحة للعوامل الحيوية المقيدة مؤشراً لنجاح عملية التقييد ولإمكانية استعمالها على نطاق إنتاجي صناعي. قام Goksungur *et al.*, (2005) بإعادة استعمال خلايا *L. casei* المقيدة في حبيبات هلام ألجينات الكالسيوم في إنتاج حمض اللاكتيك لعدة مرات، وقد أعطت نتيجة جيدة خلال دورات التكرار الخمس الأولى ثم بدأ الإنتاج بالانخفاض في الدورة السادسة من الإنتاج. ولاحظ أنه في الوجبتين الاخيرتين قد بدأ ظهور تحطم وتشقق وانكماش في الحبيبات. أما في الوجبة الحادية عشر فقد حصل تضرر وتحطم كامل لحبيبات الهلام.

الاستنتاجات:

بينت نتائج الدراسة أن استخدام هلام ألجينات الكالسيوم في تقييد خلايا البكتريا قد أعطى نتائج جيدة لإنتاج حمض اللاكتيك من شرش الجبن الناتج من الحليب الجاموسي وأن توفير ظروف التقييد المناسبة تعد ضرورية للوصول إلى كفاءة تقييد جيدة للخلايا وإنتاجية عالية من الحمض. كما أن استخدام الشرش لهذا الغرض يساهم بدرجة كبيرة في الحد من مشكلة التلوث البيئي التي تسببها مخلفات مصانع الالبان.

المراجع:

Abdel-Naby, M.; C. Mok; and C. Lee (1992). Production of organic acids from enzymatic hydrolyzate of starch by immobilized lactic acid bacteria. In: Proceedings of the UNIDO International Workshop on Lactic Acid Fermentation of Non-Dairy Food and Beverages, Songnam, Korea, 227-243.

Anwar, A.; S.A. Ul Qader; A.R. Iqbal; and A. Azhar (2009). Calcium Alginate: A support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. World Applied Sciences Journal. 7(10): 1281-1286.

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.

Carvalho, W.; S.S. Silva; A. Converti; M.V. Vitolo; M.G. Felipe; I.C. Roberto; M.B. Silva; and I.M. Mancilha (2002). Use of immobilized *Candida* yeast cells for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate: Cell immobilization conditions. Applied Biochemistry and Biotechnology. 98: 489-496.

Chavarri, M.; I. Maranon; R. Ares; F.C. Ibanez; F. Marzo and C.V. Mdel (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. International Journal of Food Microbiology. 142(1-2): 185-189.

El-Gendy, N.S.; Z.Z. Abidin; S.S. Abu Amr; and H.N. Nassar (2015). Statistical optimization of alginate immobilization process of *Candida stauntonica* strain MY1 for bioethanol production. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 4(3): 397-420.

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. Beigi; 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.

Ghorbani, F.; H. Younesi; A.E. Sari; and G. Najafpour (2011). Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. Renewable Energy. 36: 503-509.

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.

Goksungur, Y.; and U. Guvenc (1999). Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 74(2): 131-136.

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.

Idris, A.; and S. Wahidin (2006). Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. Process Biochemistry. 41(5): 1117-1123.

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.

Komesu, A.; J.A. Oliveira; L.H. Martins; M.R. Maciel and R.M. Filho (2017). Lactic acid production to purification: A review. Bioresources. 12(2): 4364-4383.

Litchfield, J.H. (2009). Lactic acid, microbially produced. Applied Microbiology. 9: 362-372.

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.

Milessi, T.S.; F.A. Antunes; A.K. Chandel; and S.S. da Silva (2013). Immobilization of *Scheffersomyces stipites* cells with calcium alginate beads: A sustainable method for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 4(3): 397-420.

Mrudula, S.; and N. Shyam (2012). Immobilization of *Bacillus megaterium* MTCC 2444 by Ca-alginate entrapment method for enhanced alkaline protease production. Brazilian Archives of Biology and Technology. 55(1): 135-144.

Najafpour, G.; H. Younesi; and K.S. Ismail (2004). Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae.* Bioresource Technology. 92: 251-260.

Pereira, A.S.; J.L. Fraga; M.M. Diniz; G.C. Sant'Ana; and P.F. Amaral (2018). High catalytic activity of lipase from *Yarrowia lipolytica* immobilized by microencapsulation. International Journal of Molecular Sciences. 19: 1-18.

Ramos, P.E.; P. Silva; M.M. Alario; L.M. Pastrana; J.A. Teixeira; M.A. Cerqueira; and A.A. Vicente (2018). Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics. Food Hydrocolloids. 77: 8-16.

Seifan, M.; A.K. Samani; S. Hewitt; and A. Berenjian (2017). The effect of cell immobilization by calcium alginate on bacterially induced calcium carbonate precipitation. Fermentation. 3(4): 57-67.

Shahbazi, A.; M.R. Mims; Y. Li; V. Shirley; S.A. Ibrahim; and A. Morris (2005). Lactic acid production from cheese whey by immobilized bacteria. Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology. 121-124: 529-540.

Talekar, S.; and S. Chavare (2012). Optimization of immobilization of α-amylase in alginate gel and its comparative biochemical studies with free α-amylase. Recent Research in Science and Technology. 4(2): 1-5.

Tan, J.; M.A. Abdel-Rahman; and K. Sonomoto (2018). Bio refinery-Based Lactic Acid Fermentation: Microbial Production of Pure Monomer Product. In: Cantow P. D.; 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 (2018). Parametric optimization of lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* using Box- Behnken design. Periodica Polytechnica Chemical Engineering. 62(3): 274-285.

Vidra, A.; and A. Nemeth (2017). Whey utilization in a two-stage fermentation process. Liquid Waste Recovery. 2: 17–20.

Viet, T.Q.; N.P. Minh; and D.T. Dao (2013). Immobilization of cellulase enzyme in calcium alginate gel and its immobilized stability. American Journal of Research Communication. 1(12): 254-267.

Production of Lactic Acid from Whey Using Immobilized 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: 12/01/2020 Accepted: 12/04/2020

Abstract

This study was carried out at Faculty of Agriculture and Forestry, University of Mosul during 2018 and 2019 seasons. Lactic acid was produced from cheese whey of buffalo's milk by a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* immobilized in calcium alginate gel by using batch fermentation. Some factors affecting immobilization efficiency and lactic acid productivity were studied. Results indicated that the concentration of 2% sodium alginate in the cell suspension resulted in maximum immobilization efficiency and acid production with significant differences from the other used concentrations (1 and 2%). Maximum acid productivity and immobilization efficiency were obtained upon using calcium chloride with concentrations of 4 and 5%, respectively. Beads diameter of 3 mm resulted in the highest immobilization efficiency and acid productivity. 45-60 minutes of beads solidification time were found suitable to obtain high immobilization efficiency and lactic acid productivity. Results showed that low inoculum concentration (5×10^7 cell/ml) was preferred for obtaining the highest immobilization efficiency, which was significantly dropped upon increasing of inoculum concentration. Maximum lactic acid production was obtained by using inoculum concentration of 20×10^7 cell/ml with non-significant differences over the range of $10\text{-}25\times10^7$ cell/ml. Immobilized cells were reused for four runs and a significant loss in activity was observed during the successive runs.

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