

بررسی تولید اسید لاکتیک از ملاس چغندر توسط باکتری باسیلوس سوبتیلیس

فهیمة نوریان^۱، مسعود هنرور^{۲*}

^۱ کارشناس ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران.

^{۲*} دانشیار، مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران.

تاریخ ارسال: ۱۴۰۲/۰۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۱

چکیده

اسید لاکتیک یک آلفاهیدروکسی اسید با فرمول شیمیایی $C_3H_6O_3$ که با نام‌های ۱- هیدروکسی پروپیونیک اسید و ۲- هیدروکسی پروپانویک اسید نیز معرفی می‌گردد. یکی از روش‌های صنعتی تولید اسید لاکتیک، استفاده از ملاس چغندر قند در فرایند تخمیری است. ملاس چغندر قند به عنوان منبع کربن و نیتروژن به کار می‌رود و سویه‌های مختلف باکتریایی و قارچی در فرایندهای مداوم و غیرمداوم مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این تحقیق تولید اسید لاکتیک از ملاس چغندر توسط باکتری باسیلوس سوبتیلیس مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه به منظور استخراج باکتری از خاک ۶ منطقه جغرافیایی واقع در منطقه ۵ تهران و استان گیلان نمونه برداری شد. برای بررسی رشد، باکتری باسیلوس کشت و در چندین مرحله پاستاز داده شد. یافته‌ها مبنی بر آن بود که از ۶ نمونه خاک بیشترین رشد و جداسازی باسیلوس از خاک‌های کنار شالیزار روستای لیفکو خندان شهرستان شفت گیلان بود. با رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده باسیلوس با انجام تست‌های شیمیایی و مولکولی PCR، باکتری باسیلوس استخراج شده و مورد بررسی قرار گرفت. پس از محرز شدن گونه سوبتیلیس جهت بررسی تولید اسید لاکتیک به محیط کشت حاوی ملاس چغندر غنی شده تلقیح گردید. نتایج حاصل از این تحقیق پس از تلقیح در زمان‌های شروع تلقیح و ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تلقیح بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان غلظت تولید در زمان پس از تلقیح (۲۶۸۷.۴۳) میکروگرم بر گرم و کمترین میزان تولید مربوط به ۴۸ ساعت پس از تلقیح (۷۵۰.۳۹) میکروگرم بر گرم بود.

واژه‌های کلیدی: اسید لاکتیک، ملاس، تخمیر، باسیلوس سوبتیلیس.

مقدمه

افزودنی‌های طبیعی با استفاده از علم بیوتکنولوژی می‌باشد، که روش تأمین سلامتی و سالم و بدون خطر بودن آن به اثبات رسیده است (Eiteman & Ramalingam, 2015). همچنین محدودیت کاربردهای افزودنی‌های شیمیایی به دلیل اثرات جانبی متعدد باعث شده است که کشورهای پیشرفته به سمت تولید افزودنی‌های طبیعی از طریق بیوتکنولوژی روی آورند. از جمله این افزودنی‌ها که سالیان

توسعه صنایع غذایی لزوم استفاده از پاره‌ای مواد شیمیایی را ایجاد می‌کند که دسته‌ای از آن‌ها را افزودنی‌ها تشکیل می‌دهند. نقش اصلی افزودنی‌ها، به منظور افزایش ارزش غذایی، خواص حسی، حفاظت و نگهداری مواد غذایی است. پیشرفت‌های اخیر در افزودنی‌های مواد غذایی، تولید

درازی است در کشورها استفاده می‌گردد، اسید لاکتیک، نمک‌های لاکتیک، و فرآورده‌های حاصل از تخمیر باکتری‌های لاکتیکی نظیر نیسین است (Mozzi et al., 2015). اسید لاکتیک نخستین بار در سال ۱۷۸۰ از شیر ترش شده و توسط شیمی‌دان سوئدی گزارش شد و در سال ۱۸۵۶ نقش لاکتوباسیلوس در سنتز این ماده توسط لوئیس پاستور کشف شد. این ترکیب به روش فوق در سال ۱۸۹۵ به صورت تجاری تولید و در سال ۲۰۰۶ تولید جهانی آن با متوسط رشد سالانه ۱۰ درصد به ۲۷۵۰۰۰ تن رسید (Mozzi et al., 2015).

اسید لاکتیک که با نام‌های ۲-هیدروکسی پروپینیک اسید و ۲-هیدروکسی پروپانوئیک اسید نیز معرفی می‌شود، با فرمول شیمیایی $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ است. این اسید با دارا بودن دو ایزومر نوری کاربردهای زیادی در صنایع پزشکی، دارویی، غذایی و شیمیایی دارد. بدلیل مصرف فراوان اسید لاکتیک و مشتقات آن در صنایع غذایی، نساجی، دارویی، آرایشی، شیمیایی و خصوصاً پلیمری، در سال‌های اخیر مطالعات زیادی به منظور تولید این اسید آلی صورت گرفته است. علاوه بر این، اسید لاکتیک می‌تواند از طریق واکنش‌های شیمیایی به مواد مفیدی، مانند پروپیلن اکسید، پروپیلن گلیکول و استر لاکتات تبدیل شود. ساخت پلی‌لاکتیک و اکریلیک اسیدهای زیست تخریب‌پذیر نیز بازار مهمی برای اسید لاکتیک خالص ایجاد کرده است (Thakur et al., 2019). اسید لاکتیک که به دو شکل فعال نوری (-D) و (+L) وجود دارد، که با واکنش شیمیایی، توسط آبکافت لاکتونیتریل و فرآیندهای تخمیر میکروبی تولید می‌شود. نوع (+L) از آنجایی که در سوخت و ساز طبیعی انسان نیز وارد می‌شود، ترجیح داده می‌شود. اما فرآیند شیمیایی آن، فقط مخلوط راسمیک (DL) را تولید می‌کند. باکتری باسیلوس سوبتیلیس که یک باکتری گرم مثبت بی‌هوازی اختیاری است، فقط نوع (+L) را تولید می‌کند. این اسید به دو روش تخمیری و شیمیایی تولید می‌شود. بیشترین حجم

تولید جهانی آن به دلیل نیاز به نوع ایزومر L+ به صورت تخمیر است. در تخمیر از دو روش غیرمداوم و مداوم استفاده می‌شود، در روش مداوم به دلیل طولانی بودن فاز تاخیر مخمر بیشتری مورد نیاز است و افزایش هزینه را در بر دارد و جهت خنثی‌سازی اسید لاکتیک نیاز به آمونیوم و کلسیم مصرفی نیز بیشتر است. در سیستم مداوم به دلیل افزایش مقدار محلول بايومس حجم تولیدی تقریباً دو برابر است. در روش شیمیایی ابتدا استالدئید با سیانید هیدروژن واکنش داده می‌شود و پس از آن هیدرولیز لاکتونیتریل به شکل صنعتی، موجب سنتز اسید لاکتیک راسمیک می‌گردد (Mozzi et al., 2015).

باسیلوس سوبتیلیس باکتری میله‌ای شکل گرم مثبت و هوازی اختیاری می‌باشد. این باکتری به صورت ساپروفیت و زیستگاه آن در خاک، آب و هوا است، وقتی در زیر میکروسکوپ مشاهده می‌شود یک اسپور کروی در مرکز سلول باکتری دیده می‌شود که شکل باکتری را تغییر نمی‌دهد (Arnaouteli et al., 2021). این باکتری در صنعت غذا جهت فرایندهای تخمیری، در صنعت دارو با اثر آنتی بیوتیکی و گروهی از آنها به عنوان افزودنی در مواد شوینده با تولید آنزیم پروتئاز و غیره کاربرد دارد.

ملاس آخرین پساب حاصل از پخت یا کریستالیزاسیون تولید شکر از چغندر قند یا نیشکر است. از قرن ۱۴ با توسعه صنعت قندسازی به کالای تجاری تبدیل شد. ملاس به دلیل وجود ترکیباتی چون کلسیم، پتاسیم، مس، آهن، منیزیم، منگنز، سلنیوم و ویتامین B₆، دارای ارزش غذایی بالایی است. از ملاس برای تولید خمیر مایه در صنعت نان، تولید اسید سیتریک توسط تخمیر ملاس با گونه‌هایی از قارچ‌ها، تهیه دکستران و تولید اسید لاکتیک جهت بهبود طعم و آرومای مواد غذایی و نیز خواص نگهدارنده آن استفاده می‌شود.

استفاده از ملاس جهت تولید اسیدلاکتیک نیز توسط محققین دیگر نیز توصیه شده است. میردامادی و همکاران

تولید اسید لاکتیک توسط باکتریهای اسید لاکتیکی می باشد. عمر فاروق (Umar Farooq *et al.*, 2012) نیز از ملاس نیشکر برای رشد باکتری اسید لاکتیکی لاکتوباسیلوس دلبروکی استفاده کرده و میزان تولید اسید لاکتیک را مورد بررسی قرار دادند و پس از ۷ روز تخمیر بیشترین میزان اسید لاکتیک را به دست آوردند. همچنین مالدوونیک (Mladenović *et al.*, 2018) نیز استفاده از ملاس برای تولید اسید لاکتیک توسط باکتریهای اسید لاکتیکی را بررسی کردند و حداکثر میزان تولید اسید لاکتیک را ۴۶/۴ گرم بر لیتر گزارش دادند. سان (Sun *et al.*, 2019) نیز از باکتری‌هایی غیر از باکتری‌های اسید لاکتیکی در محیط حاوی ملاس چغندر قند استفاده کردند و میزان تولید اسید لاکتیک را بررسی نمودند. طبق نتایج آنها ۱۸/۵ گرم در لیتر از ملاس، اسید لاکتیک تولید شد. عبدالرحمن (Abdel-Rahman *et al.*, 2021) نیز از باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی در محیط کشت حاوی ملاس چغندر قند برای تولید اسید لاکتیک استفاده کردند و حداکثر ۸۰/۱۰ گرم بر لیتر اسید لاکتیک تولید کردند.

در این تحقیق به مطالعه و بهینه‌سازی اثر باکتری باسیلوس سوبتیلیس در محیط کشت حاوی ملاس چغندر قند غنی شده بر تولید اسید لاکتیک بوده و انتظار می‌رود نتایج حاصل از آن در پژوهش‌های مرتبط با پروتکل‌های درمانی، بهداشتی و صنعتی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

به منظور جداسازی باکتری باسیلوس سوبتیلیس از ۶ منطقه واقع در استان تهران و استان گیلان، نمونه برداری از خاک انجام شد. ۳ نمونه از باغچه و پارک در منطقه ۵ استان تهران (شهر تهران) و ۳ نمونه از خاک جنگل، باغ ویلا و زمین‌های کنار شالیزار واقع در روستای لیفکوخندان شهرستان شفت استان گیلان جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از هر منطقه با رعایت اصول بهداشتی و از عمق ۳۰-۱۵

در سال ۱۳۸۴ نیز به این نتیجه رسیدند که ملاس چغندر قند یک سوسترای مناسب برای تهیه اسید لاکتیک طی تخمیر توسط میکروارگانیسم‌ها می‌باشد زیرا این ماده که محصول جانبی کارخانجات تولید قند و شکر است هم ارزان قیمت بوده و هم دارای منابع مورد نیاز جهت رشد میکروارگانیسم‌ها است. این ماده منبع خوبی از کربن و نیتروژن طی رشد، فعالیت و تولید متابولیت توسط میکروارگانیسم‌ها است. همچنین در ملاس ویتامین‌هایی نظیر تیامین، پنتوتینیک اسید، نیاسین، پیریدوکسین، ریبوفلاوین و اسیدهای آمینه نظیر اسپارتیک اسید و املاحی مثل پتاسیم، سدیم و منیزیم وجود دارد (Mirdamadi *et al.*, 2004).

بسته به گونه باسیلوس سوبتیلیس و شرایط رشد و محیط کشت، میزان تولید اسید لاکتیک توسط این باکتری می‌تواند بی ۱/۵۰-۵ گرم بر لیتر متفاوت باشد (Romero-Garcia *et al.*, 2009). گاو و همکاران (Gao *et al.*, 2012)، تولید اسید لاکتیک توسط باسیلوس سوبتیلیس را گزارش دادند و حداکثر میزان تولید آن توسط این میکروارگانیسم را ۷۷/۱ گرم بر لیتر بیان کردند. علاوه بر آن این محققین بیان کردند که تولید اسید لاکتیک و غلظت آن به مواردی نظیر دما، سرعت هم زدن و غلظت‌های مختلف گلوکز در محیط کشت بستگی دارد (Gao *et al.*, 2012). طبق مطالعات کستل و همکاران در سال ۲۰۲۲، بیشترین میزان تولید اسید لاکتیک توسط باسیلوس سوبتیلیس تقریباً ۰/۲۵ گرم به ازای هر گرم گلوکز بود، این محققان بیان کردند که برای آنکه باسیلوس سوبتیلیس بتواند LA تولید کند، افزودن پیرووات به محیط پیشنهاد می‌شود (Castells *et al.*, 2022).

محققان دیگری نیز توانستند از ملاس چغندر قند جهت تولید اسید لاکتیک استفاده کنند به عنوان مثال جوانمردی (Javanmardi *et al.*, 2015) از باکتری‌های اسید لاکتیکی جهت تولید نوشیدنی تخمیری از ملاس چغندر قند پرداخته و میزان تولید اسید لاکتیک را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که ملاس محیط کشت مناسبی برای

سانتی‌متری جمع‌آوری و در پاکت‌های استریل و محیط خنک نگهداری و به آزمایشگاه منتقل شد و از شماره ۱ تا ۶ شماره گذاری و تفکیک گردید (Samad et al., 2020).

ملاس چغندر با مشخصات بریکس ۸۰ درصد، ساکارز ۴۸ درصد، درجه خلوص ۶۰ درصد و pH معادل ۸ از کارخانه قند هگمتانه همدان تهیه گردید.

به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌های جمع‌آوری شده خاک، در ۶ ارلن جداگانه، هر کدام به مقدار ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس، داخل اتوکلاو قرار گرفت. از هر نمونه خاک شماره‌گذاری شده، مقدار ۱۰ گرم توزین و در داخل ارلن‌ها ریخته شد. قبل از برداشت نمونه و کشت روی محیط کشت‌های آماده، جهت شوک حرارتی، ارلن‌های حاوی نمونه خاک به مدت ۱ ساعت با دمای ۶۰ درجه سلسیوس بن‌ماری شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه، برای خنک شدن در محیط آزمایشگاه قرار گرفت (Asgher et al., 2020).

کشت نمونه‌ها بر روی محیط کشت جهت تهیه محیط کشت، مقدار ۴ گرم از محیط کشت نوترینت آگار در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و اتوکلاو شد. سپس از نمونه مورد نظر روی محیط کشت داده و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، داخل انکوباتور

قرار گرفتند و پس از مدت زمان انکوباسیون، رشد وسیعی از باکتری‌ها روی سطح پلیت، مشاهده گردید بنابراین با هدف جداسازی مجدد، با همان شرایط، محیط کشت تهیه و تحت شرایط استریل، به صورت کشت ۴ منطقه‌ای، کشت انجام و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید، پاساژ دادن در چند مرحله با رعایت کامل شرایط استریل انجام شد تا نهایتاً کلونی‌های Typic جداسازی گردید (Asgher et al., 2020).

جهت بررسی کلونی‌ها از روش رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد و باسیلوس‌های گرم مثبت توسط میکروسکوپ Olympus مشاهده گردید. این روش نیز به جهت اطمینان بارها تکرار گردید.

تست‌های شیمیایی و مولکولی جهت شناسایی کلنی‌های حاصل جهت شناسایی، از نظر تست شیمیایی و ملکولی مورد مطالعه قرار گرفتند. تست‌های شیمیایی مورد بررسی شامل تست کاتالاز، اکسیداز، سیترات، ایندول، تخمیرقندها و تست تحرک بود (Bernfield, 1955; Ezeji & Bahl, 2006). نتایج به دست آمده از آزمون‌های شیمیایی، جهت شناسایی باکتری جداسازی شده از خاک در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- نتایج آزمون‌های شیمیایی جهت شناسایی باکتری جداسازی شده از خاک

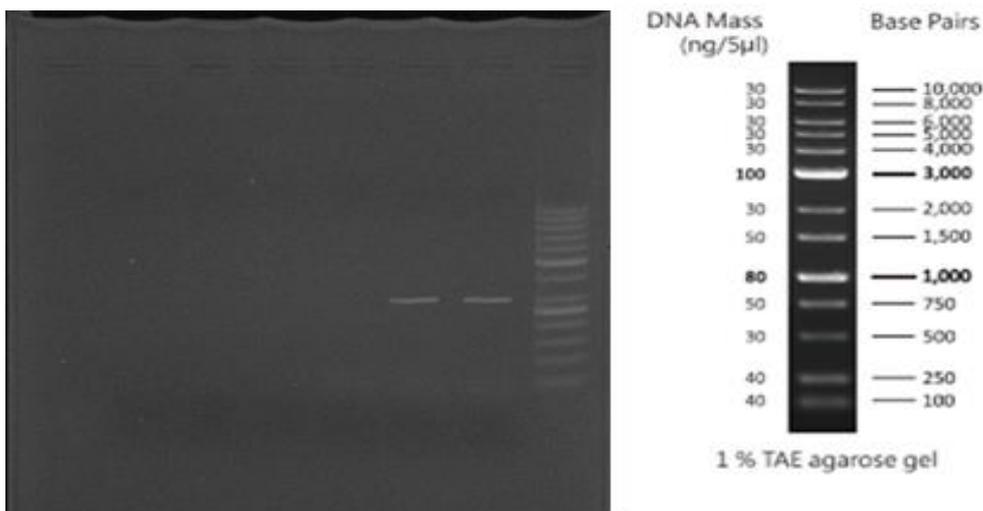
Table 1- Results of chemical tests to identify bacteria isolated from soil

نتیجه تست	نوع تست
+	کاتالاز
-	اکسیداز
+	سیترات
+	تخمیرقندها
-	تست MR
+	تست VP
+	تست حرکت باکتری

این آزمایش تحت شرایط دمایی، ۶ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت زمان ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و درنهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت (Sambrook, 2001).

برای اطمینان از انجام واکنش زنجیر پلی مرز، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد در شرایط ۱۰۰ ولت در بافر TBE 1X انجام و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، DNA در زیر نور UV در دستگاه Gel doc مشاهده و عکسبرداری شد (Javanmardi *et al.*, 2015). شکل ۱ تصویر باند DNA16 sr با طول bp1500 جهت شناسایی سویه باسیلوس سوبتیلیس بر روی ژل آگار بعد از الکتروفورز می باشد. باتوجه به توالی به دست آمده و مقایسه قطعه تکثیر یافته با توالی موجود در بانک های اطلاعاتی نشان داد سویه مورد بررسی باسیلوس سوبتیلیس می باشد (شکل ۱).

جهت توالی یابی رشته DNA باکتری از تست مولکولی PCR^۱ استفاده شد. جهت انجام تست ابتدا مقدار ۰٫۶ گرم محیط کشت TSB در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو گردید و از کلونی توسط لوپ استریل در زیر هود لامینار، به محیط کشت تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، انکوباسیون انجام شد. برای انجام تست از پرایمر جنرال (Forward/Reverse) استفاده شد. به منظور شناسایی ملکولی سویه های جدا شده از خاک (سویه های حاصل از پلیتهایی که دارای بیشترین قطر کلنی بودند) ابتدا DNA ژنومی سویه ها با استفاده از کیت های Cinnapure-DNA استخراج گردید. از پرایمرهای یونیورسال مورگان جهت تکثیر ژن 16s rRNA با توالی های معلوم و شامل Primer Forward (5'GAGTTTGATCATGGCTCAG3') و Primer Reverse (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') در سویه های باسیلوس استفاده شد که طول قطعه پس از تکثیر ۱۵۰۰ bp بود.



شکل ۱ - تصویر باند DNA16 sr با طول bp1500 و تشخیص سویه باکتری باسیلوس سوبتیلیس

^۱ Polymerase chain reaction

تهیه محیط کشت ملاس چغندر

ملاس چغندر با مشخصات بریکس ۸۰ درصد، ساکارز ۴۸ درصد، درجه خلوص ۶۰ درصد و pH معادل ۸ از کارخانه قند هگمتانه همدان تهیه گردید. پس از آماده سازی، به جهت غنی سازی ملاس بر حسب گرم بر لیتر از ترکیبات عصاره مخمر ۱۰ گرم، استات سدیم ۵ گرم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۲ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۵ گرم، سولفات آهن ۰/۰۳ گرم، پیتون ۱۰ گرم، توئین ۸۰ به میزان ۱ گرم اضافه و پس از مخلوط شدن ترکیبات pH به ۶/۵ رسید (Lazaridis et al., 2018).

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. آزمایش اندازه‌گیری اسیدلاکتیک با دستگاه HPLC با سه بار تکرار در مدت زمان پس از تلقیح و ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تلقیح باکتری مورد نظر در محیط کشت حاوی ملاس، انجام گردید. میانگن داده‌ها با استفاده از آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن انجام و با یکدیگر مقایسه شد و در نهایت تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SPSS، انجام گرفت.

نتایج و بحث

محیط کشت غنی شده ملاس، در دو فلاسک با شرایط کاملاً سترون و زیر هود به حجم ۱۰۰ رسانده و از باکتری استخراج شده میزان ۵/۰ مک فارلند (mc) در هر کدام از فلاسک‌ها تلقیح نموده و به شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و با ۱۷۰ دور در دقیقه منتقل گردید. از زمان t_0 که شروع زمان پس از تلقیح باکتری بود توسط سمپلر هر ۲۴ ساعت به صورت t_1 و t_2 نمونه گیری انجام گرفت. جهت اندازه گیری غلظت اسیدلاکتیک به روش HPLC به آزمایشگاه منتقل گردید.

اندازه‌گیری غلظت اسیدلاکتیک:

جهت اندازه‌گیری غلظت اسید لاکتیک موجود در نمونه از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. تکنیک HPLC ایزوکراتیک ساده برای تجزیه و تحلیل کمی اسیدهای آلی ایجاد شد. یک ستون Aminex HPX-87 در دمای ۶۵ درجه سلسیوس و تشخیص UV در ۲۲۰ و ۲۷۵ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور از دستگاه HPLC با ستون AminexHEX-87H با استفاده از ۵ میلی‌مولار اسید سولفوریک به عنوان فاز متحرک و با سرعت جریان ۰/۶ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد (Abedi & Hashemi, 2020).

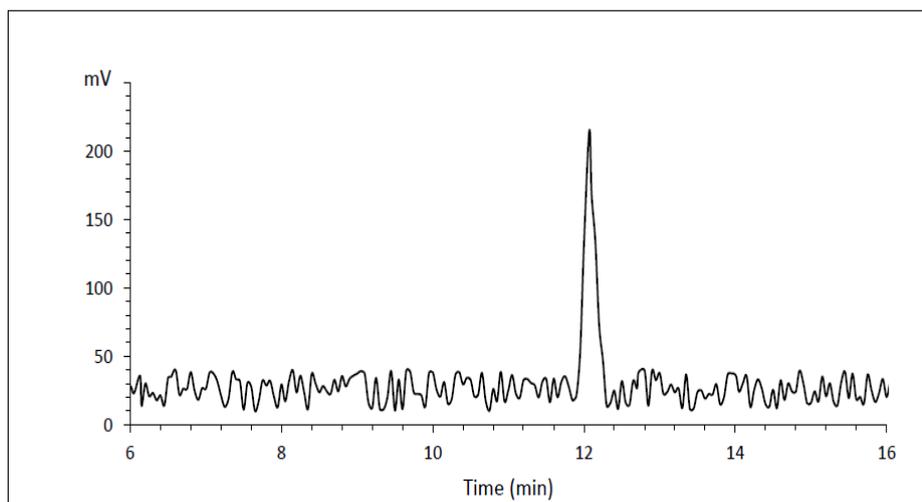
نتایج پس از کشت‌های مکرر میکروبی نشان داد که بهترین خاک برای استخراج از بین ۶ منطقه انتخابی، منطقه جغرافیایی روستای لیفکوخندان شهرستان شفت استان گیلان بود که بهترین رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس را نشان داد. جمیل (Jamil et al., 2007) نیز توانستند برخی گونه‌های باسیلوس سوبتیلیس را از خاک جداسازی کنند. علاوه بر آن سینز (Singh & Singh, 2020) گونه‌های مختلفی از باسیلوس را از خاک استخراج نمودند. (Mohammadi et al., 2015) نیز توانستند سویه باسیلوس سوبتیلیس را از خاک پارک جنگلی ۷ نقطه از شهر تهران (چیتگر، طالقانی، شیان، سرخه حصار، پردیسان، بوستان نهج البلاغه و بوستان گفتگو) را جداسازی کنند. هانن (Rebib et al., 2012) نیز توانستند سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس را از خاک‌های شور در شمال تونس جداسازی کنند.

با توجه به توالی به دست آمده از نتایج این تحقیق می‌توان اثبات نمود که باکتری به دست آمده از خاک، باکتری باسیلوس سوبتیلیس می‌باشد. باکتری‌های جنس باسیلوس به ویژه سویه سوبتیلیس به دلیل توانایی در تولید ترکیباتی با خواص ضد میکروبی مانند لیپوپپتیدهای ضد چرچی، علیه عوام بیماری‌زای گیاهی مؤثر هستند. باسیلوس

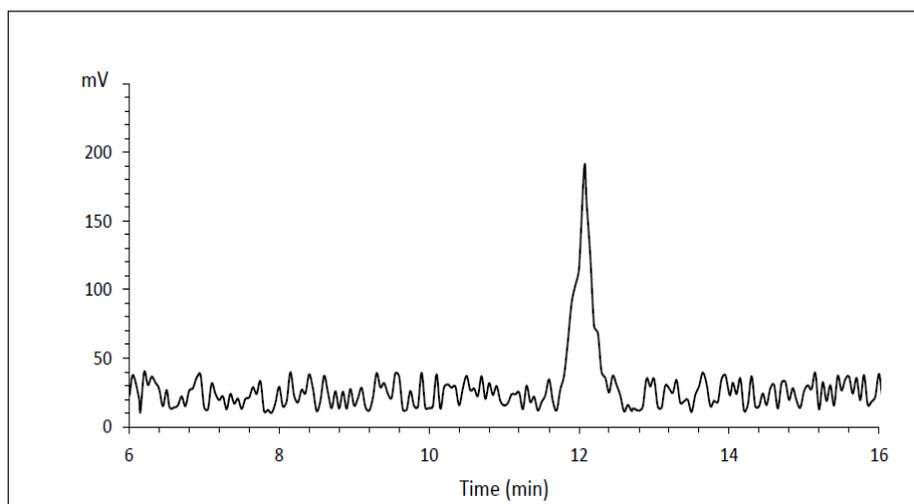
بررسی تولید اسید لاکتیک از ملاس چغندر توسط باکتری باسیلوس سوبتیلیس

سوبتیلیس یک میکروارگانیسم غالب خاک است که قادر به تولید تعداد زیادی ترکیبات ضد میکروبی مانند پپتیدها، لیپوپپتیدها، فسفولیپیدها و پلی‌ان‌ها² می‌باشد. همچنین این باکتری به عنوان عوام کنترل بیولوژیک علیه برخی از باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی نیز کاربرد دارد. توانایی تشکیل اسپور مقاوم به وسیله این باکتری نیز آن را به عنوان یکی از بهترین کاندیداها در فرآیند کنترل بیولوژیک معرفی نموده است (Asgher et al., 2020).

پس از تلقیح باکتری شناسایی شده در محیط کشت غنی شده ملاس، از زمان t_0 که شروع زمان پس از تلقیح باکتری بود، نمونه تهیه و در مدت زمان هر ۲۴ ساعت به صورت t_1 و t_2 نمونه‌گیری انجام گرفت و پس از آماده‌سازی نمونه‌های به دست آمده در زمان پس از تلقیح، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تلقیح، به دستگاه HPLC تزریق و کروماتوگرام‌های به دست آمده به ترتیب در شکل‌های ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است.

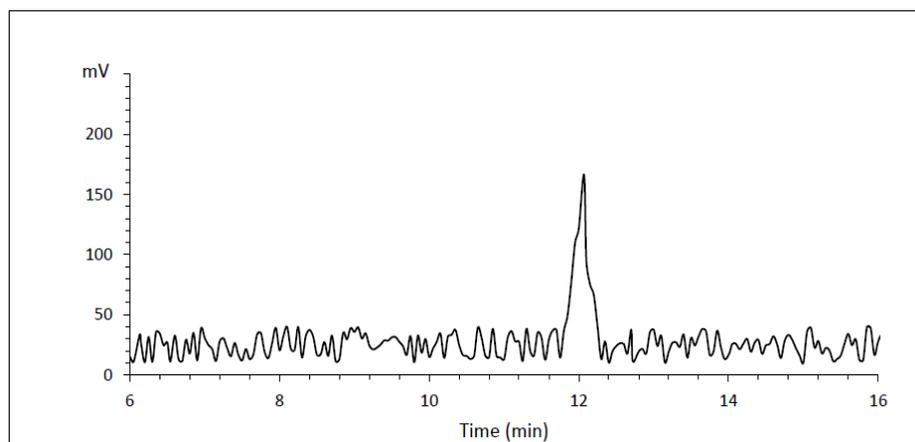


شکل ۲- کروماتوگرام حاصل از اندازه‌گیری میزان اسید لاکتیک در زمان T_0 (پس از تلقیح)



شکل ۳- کروماتوگرام حاصل از اندازه‌گیری میزان اسید لاکتیک در زمان T_1 (۲۴ ساعت پس از تلقیح)

² Polyene

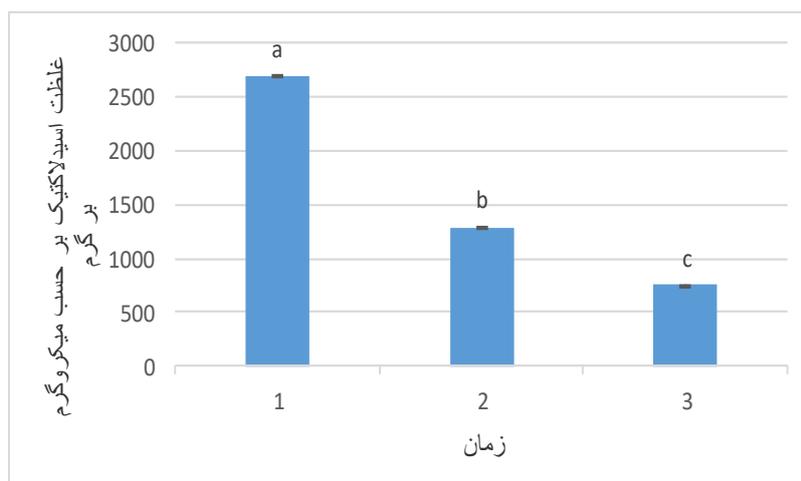


شکل ۴- کروماتوگرام حاصل از اندازه‌گیری میزان اسیدلاکتیک در زمان T₂ (۴۸ ساعت پس از تلقیح)

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین دامنه‌ای دانکن برای غلظت اسیدلاکتیک تولیدی توسط *باسیلوس سوبتیلیس* در مدت زمان‌های پس از تلقیح، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تلقیح

میزان اسیدلاکتیک (µg/gr)	مدت زمان تلقیح
2687.43±7.00a	0
1290.43±3.77b	۲۴ ساعت
750.39±4.84c	۴۸ ساعت

حروف کوچک نشان دهنده وجود اختلاف معنادار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد



شکل ۵- نمودار نتایج مقایسه میانگین دامنه‌ای دانکن برای غلظت اسیدلاکتیک تولیدی توسط *باسیلوس سوبتیلیس* در مدت زمان‌های پس از تلقیح، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تلقیح، زمان ۱: پس از تلقیح، زمان ۲: ۲۴ ساعت پس از تلقیح و زمان ۳: ۴۸ ساعت پس از تلقیح. حروف کوچک نشان دهنده وجود اختلاف معنادار در سطح اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر، بیشترین میزان غلظت اسیدلاکتیک، از محیط کشت حاوی ملاس توسط باکتری باسیوس سوبتیلیس پس از تلقیح و کمترین غلظت مربوط به ۴۸ ساعت پس از تلقیح می‌باشد. به طور کلی با افزایش میزان تلقیح، غلظت اسیدلاکتیک کاهش یافت. کستل و همکاران (Castells *et al.*, 2022) بیان کردند که با گذشت زمان تخمیر، تا ۳۰ ساعت میزان غلظت اسیدلاکتیک کاهش می‌یابد. احتمالاً کاهش غلظت اسیدلاکتیک با افزایش زمان تلقیح به دلیل آن است که میکروارگانسیم با گذشت زمان وارد فاز دیگری از رشد می‌شود و احتمال ورود به فاز مرگ نیز وجود دارد.

احتمال می‌رود تولید اسیدلاکتیک و کاهش pH، فعالیت آنزیمهای تولیدی توسط باسیلوس سوبتیلیس و قابلیت استفاده از منابع کربنی در محیط کشت را دستخوش تغییر قرار می‌دهد. بنابراین با گذشت زمان، میزان تولید اسیدلاکتیک کاهش می‌یابد.

با توجه به کروماتوگرامهای به دست آمده توسط دستگاه HPLC، زمان بازداری (RT)^۳ برای اسیدلاکتیک ۱۲٫۰۷ دقیقه می‌باشد.

نتایج مقایسه میانگین دامنه‌ای دانکن برای غلظت اسیدلاکتیک تولیدی توسط باسیلوس سوبتیلیس در مدت زمان‌های پس از تلقیح، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تلقیح در جدول ۲ و نمودار موجود در شکل ۵ نشان داده شده است.

با توجه به جدول ۲ و نمودار شکل ۵، میزان اسید لاکتیک بین ۷۵۰٫۳۹ تا ۲۶۸۷٫۴۳ میکروگرم بر گرم می‌باشد. بیشترین میزان غلظت اسیدلاکتیک، از محیط کشت حاوی ملاس توسط باکتری باسیوس سوبتیلیس پس از تلقیح و کمترین غلظت مربوط به ۴۸ ساعت پس از تلقیح می‌باشد. به طور کلی با افزایش میزان تلقیح، غلظت اسیدلاکتیک کاهش یافت.

منابع

- Abdel-Rahman, M. A., Hassan, S. E.-D., Alrefaey, H. M., El-Belely, E. F., Elsakhawy, T., Fouda, A., Desouky, S. G., & Khatatb, S. M. (2021). Subsequent improvement of lactic acid production from beet molasses by *Enterococcus hirae* ds10 using different fermentation strategies. *Bioresource Technology Reports*, 13, 100617.
- Abedi, E., & Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production—producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6(10).
- Arnaouteli, S., Bamford, N. C., Stanley-Wall, N. R., & Kovács, Á. T. (2021). *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 19(9), 600-614.
- Asgher, M., Afzal, M., Qamar, S. A., & Khalid, N. (2020). Optimization of biosurfactant production from chemically mutated strain of *Bacillus subtilis* using waste automobile oil as low-cost substrate. *Environmental Sustainability*, 3, 405-413.
- Bernfield, P. (1955). Amylase, alpha and beta. *Methods Enzymol*, 1, 149-158.
- Castells, A., Leon, A., Sosa, D., Cadena, I., Ramirez, D., Serrano, L., Larrea, F., Streitweiser, D. A., & Alvarez-Barreto, J. (2022). Evaluation of Lactic Acid Production by different *Bacillus Subtilis* Strains Isolated from *Theobroma Cacao* Crops in Ecuador. *Chemical Engineering Transactions*, 93, 55-60.
- Eiteman, M. A., & Ramalingam, S. (2015). Microbial production of lactic acid. *Biotechnology letters*, 37, 955-972.

³ Retention Time

- Ezeji, T. C., & Bahl, H. (2006). Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant α -amylase and α -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. *Journal of Biotechnology*, 125(1), 27-38.
- Gao, T., Wong, Y., Ng, C., & Ho, K. (2012). L-lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1. *Bioresource Technology*, 121, 105-110.
- Jamil, B., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2007). Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 from soil and its potential of polypeptidic antibiotic production. *Pak. J. Pharm. Sci*, 20(1), 26-31.
- Javanmardi, A., Labafi, M., Khodaian, F., & Salehi, A. (2015). Feasibility of production of fermented beverage from red beetroot extract by lactic acid bacteria. *Iran's food sciences and industries*, 13(56), 1-9. [In Persian]
- Lazaridis, S., Patikas, D. A., Bassa, E., Tsatalas, T., Hatzikotoulas, K., Ftikas, C., & Kotzamanidis, C. (2018). The acute effects of an intense stretch-shortening cycle fatigue protocol on the neuromechanical parameters of lower limbs in men and prepubescent boys. *Journal of sports sciences*, 36(2), 131-139.
- Mirdamadi, S., Beg Mohammadi, L., Rajabi, A., & Aziz Mohseni, F. (2004). *The use of molasses in the economic production of lactic acid by discontinuous fermentation method* The 4th Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran, Kerman.
- Mladenović, D., Pejin, J., Kocić-Tanackov, S., Radovanović, Ž., Djukić-Vuković, A., & Mojović, L. (2018). Lactic acid production on molasses enriched potato stillage by *Lactobacillus paracasei* immobilized onto agro-industrial waste supports. *Industrial crops and products*, 124, 142-148.
- Mohammadi, R., Dadger, T., Pardali, H., Yazdan Stad, S., Najafpour, R., & Faraj Tabrizi, A. (2015). Isolation and molecular identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* bacteria a producers of pectinase enzyme from different regions of Golestan province. *Journal of Molecular Cell Studies*, 29(3), 348-340.
- Mozzi, F., Raya, R., Vignolo, G., & Love, J. C. (2015). *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*. 2. Wiley Online Library.
- Rebib, H., Hedi, A., Rousset, M., Boudabous, A., Limam, F., & Sadfi-Zouaoui, N. (2012). Biological control of *Fusarium* foot rot of wheat using fengycin-producing *Bacillus subtilis* isolated from salty soil. *African Journal of Biotechnology*, 11(34), 8464-8475.
- Romero-Garcia, S., Hernández-Bustos, C., Merino, E., Gosset, G., & Martinez, A. (2009). Homolactic fermentation from glucose and cellobiose using *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 8, 1-8.
- Samad, K. A., Zainol, N., Yussof, H. W., Khushairi, Z. A., Mohd Sharif, N. S. A., & Mohd Syukri, N. S. (2020). Isolation, identification and characterization of soil bacteria for the production of ferulic acid through co-culture fermentation using banana stem waste. *SN Applied Sciences*, 2(3), 339.
- Sambrook, S. (2001). HRD as an emergent and negotiated evolution: An ethnographic case study in the British National Health Service. *Human Resource Development Quarterly*, 12(2), 169-193.
- Singh, J., & Singh, S. P. (2020). Isolation and identification of bacillus species from soil for phosphate, potassium solubilisation and amylase production. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(5), 415-426.
- Sun, Y., Xu, Z., Zheng, Y., Zhou, J., & Xiu, Z. (2019). Efficient production of lactic acid from sugarcane molasses by a newly microbial consortium CEE-DL15. *Process Biochemistry*, 81, 132-138.

- Thakur, A., Panesar, P. S., & Saini, M. S. (2019). Optimization of process parameters and estimation of kinetic parameters for lactic acid production by *Lactobacillus casei* MTCC 1423. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 9, 253-266.
- Umar Farooq, U. F., Anjum, F., Tahir Zahoor, T. Z., Sajjad-ur-Rahman, S.-u.-R., Randhawa, M., Anwaar Ahmed, A. A., & Kashif Akram, K. A. (2012). Optimization of lactic acid production from cheap raw material: sugarcane molasses.

Original Research

Investigating the production of lactic acid from beet molasses by *Bacillus subtilis*

F. Nooryan, *M. Honarvar

*Corresponding Author: Associate Professor, Food Industry Engineering, Faculty of Science and Agriculture and Food Industry, Tehran Science and Research Unit. Iran. (Corresponding Author)

Email: m-honarvar@hotmail.com

Received: 28 April 2023 Accepted: 12 September 2023

[http://doi: 10.22092/FOODER.2024.362125.1365](http://doi.org/10.22092/FOODER.2024.362125.1365)

Abstract

Lactic acid is an alpha hydroxy acid with the chemical formula $C_3H_6O_3$, which is also known as 2-hydroxypropionic acid and 2-hydroxypropanoic acid. One of the industrial methods of lactic acid production is the use of sugar beet molasses in the fermentation process. Sugar beet molasses is used as a source of carbon and nitrogen, and various bacterial and fungal strains are used in continuous and non-continuous processes. In this research, the production of lactic acid from beet molasses by *Bacillus subtilis* bacteria was studied. In order to extract bacteria from the soil of 6 geographical regions located in the 5th region of Tehran and Gilan province, samples were collected to investigate the growth of bacillus and were cultured and passaged in several stages. The findings were that out of the 6 soil samples, the most bacillus growth and isolation was from the soil next to the paddy field of Lifko Khandan village, Shaft city, Gilan. The extracted bacillus was examined by gram staining and observation of bacillus by conducting chemical and molecular PCR tests. After the *subtilis* strain was identified, it was inoculated into culture medium containing enriched beet molasses to check lactic acid production. The results of this research after inoculation at the start of inoculation and 24 and 48 hours after inoculation, checking and reporting that the highest production concentration at the time after inoculation (2687.43) micrograms per gram and the lowest production amount corresponding to 48 hours After inoculation (750.39) microgram/gram was expressed.

Keywords: lactic acid, Molasses, *Bacillus subtilis* fermentation