

## Production of Lactic acid from local isolate of the fungus *Rhizopus oryzae*

### إنتاج حامض اللاكتيك بواسطة عزلة محلية من الفطر *Rhizopus oryzae*

منال عبد الواحد صليوخ  
كلية الزراعة - جامعة كربلاء

#### المستخلص

اجريت هذه الدراسة للكشف عن قابلية الفطر *Rhizopus oryzae* في إنتاج حامض اللاكتيك و أظهرت النتائج قدرت سلالة الفطر (*Rhizopus oryzae*(c-80) عن إنتاج حامض اللاكتيك في وسط غذائي تخمري محضر بطريقة التخمير السطحي . واستعملت تراكيز مختلفة من سكر الكلوكوز هي (5، 10، 15، 20) % لمعرفة أي تركيز من السكر يعطي إنتاجية عالية من الحامض ، وقد أعطى تركيز 20% كلوكوز أعلى نسبة من الحامض بلغت 39.6 غم/لتر ولوحظ ارتفاع نسبة إنتاج الحامض بارتفاع تركيز الكلوكوز في وسط الإنتاج .

#### Abstract

This study was carried out to detect the ability the fungus *Rhizopus oryzae* and The results showed the ability of fungus strain *Rhizopus oryzae* ( c-80) to produce lactic acid in fermented medium prepared at the surface fermented way . and uses for different concentration from glucose sugar it ( 5 , 10 .15 , 20 ) % to know , which concentrate from sugar gives higher production from acid . The concentration ( 20% ) glucose gave high production rate of acid reached to (39.6) gm per liter results of the present study revealed that the production of lactic acid was propotional to the to the increase of glucose concentration in product medium.

#### المقدمة

يعد حامض اللاكتيك من أكثر الحوامض العضوية استخداما في الصناعات الغذائية حيث يستعمل كمادة محمضة (acidulant) ومادة حافظة (preservative) وله استعمالات صناعية كازالة الكالسيوم في الصناعات الجلدية والنسجية ويستعمل في الصناعات الطبية والصيدلانية ويستعمل أيضا في صناعة مواد التلميع واللدانة والبوليمرات (1،2) ينتج حامض اللاكتيك بواسطة الفطر *oryzae* *Rhizopus* باستعمال طريقة المزرعة المغمورة (Submerged culture) باستعمال الخلايا الحرة وبطريقة الوجبات ( Batch culture) اذ تتم عملية التخمير بطروف هوائية وباستعمال دوارق ذات حجوم مناسبة (3) . ينتج حامض اللاكتيك بصورة رئيسية في أوساط تخمير سائلة وبطرائق عدة منها طريقة تخمرات الوجبة (Bacth culture) والتخمرات المستمرة (Continuous culture) والطريقة الشبه المستمرة (4،12) .

#### المواد وطرائق البحث

سلالة الفطر المنخبة : استخدمت السلالة (*Rhizopus oryzae* (c-80) المستحصل عليها من قسم وقاية النبات كلية الزراعة - جامعة كربلاء وهي سلالة مشخصة حسب المفاتيح التصنيفية .

تنشيط وإدامة الفطر *Rhizopus oryzae* : تم تجديد اطباق (PDA) potato dextrose Agar المنمى عليها الفطر *R oryzae* كل 21 يوما حيث حضر وسط جديد يضاف له 2مل من المضاد الحيوي الامبيسيلين (250 ملغم / 25 مل ماء ) ولقح بالسبورات الماخوذة من المزرعة الاصلية (stock culture) .

الحصول على الابواغ الفطرية (اللقاح) : وزع وسط (PDA) بعد تحضيره في دوارق سعة 250 مل وبواقع 25 مل لكل دورق وبرد بعد تعقيمه في المؤسدة بدرجة حرارة 121 م لمدة 15 دقيقة بوضع مائل بغية الحصول على مساحة ملائمة لنشر العفن وتنميته ثم حضنت الدوارق بعد تلقحها من المزرعة الاصلية لمدة 7 ايام في درجة حرارة 30 م حيث تم الحصول على الابواغ بازالتها وذلك بإضافة كمية مناسبة من الماء المقطر المعقم لكل دورق مع التحريك بعناية لإطلاق الابواغ الفطرية ثم الترشيح من خلال القطن الموضوع في قمع ( تم تعقيم الاثنين معا بوساطة الاوتوكليف بدرجة حرارة 121 م لمدة 15 دقيقة ) . تم بعدها حساب عدد الابواغ باستعمال الHemocytometer وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال .

الوسط الغذائي (الزرعي) : استعمل الوسط الغذائي الذي ذكره (5) والمكون مما يلي :

المادة	الوزن (غم)
Glucose	15
Mgso4.7H2o	0.025
NH4NO3	0.05
KH2PO4	0.03
Znso4.5H2O	0.004
Caco3	5
Dis water PH=7	1000مل

حيث وزع الوسط الغذائي في دوارق سعة 300 مل وبواقع 100 مل/ دورق ثم عقم في حرارة 121 م لمدة 15 دقيقة .

ظروف التخمر : اتبعت طريقة التخمر المستقرة (Static culture) وكانت درجة الحرارة 30 م والأس الهيدروجيني (7) وحجم لقاح ( $1 \times 10^6$ ) بوغ/ مل ومدة التخمر 7 ايام كما ورد في (6) .

#### التقدير الأولي للحامض المنتج :

ا - فصل الكتلة الحيوية : تم فصل الكتلة الحيوية النامية بطريقة الترشيح باستعمال ورق ترشيح Whattman No1 وباستعمال التفريغ ثم اخذ (50) مل من الراشح الناتج وقدرت الحموضة الكلية بطريقة التسحيح حسب الطريقة التي ذكرها (8،7) . واحتسابها كحامض لاكتيك حيث اخذ (10 مل ) من الراشح في دورق صغير سعة (50) مل وأضيف له قطرات من دليل الفينوفثالين (1%) وسحح ضد القاعدة NaoH ( 0.1 ع ) حتى تغير اللون وسجلت القراءات حسب القانون التالي :

نسبة الحامض المنتج % = حجم القاعدة NaoH (ملتر) \* عياريتها \* الوزن الملي مكافئ للحامض / حجم العينة \* 100

ب- تم قياس الاس الهيدروجيني للوسط باستعمال جهاز ال PH-meter .

التقدير الكمي للحامض : تم التقدير الكمي للحامض المنتج بوساطة سلالة الفطر بوساطة تقنية ال(HPLC) (High performance liquid chromatography) طبقاً لما ورد في (9) . حيث استعمل العمود نوع (c-811)shodex Ionpak ( الطور المتحرك حامض الفسفوريك 0.1 %) واستعمل المحلول القياسي لحامض اللاكتيك (90%) وطول موجي (220 نانوميتر) .

تحديد افضل تركيز للمصدر الكربوني : أجريت عدة معاملات حيث تم تغيير تركيز الكلوكوز في الوسط الزرعي ، واستعملت التراكيز الآتية (5، 10، 15، 20) % لأجل معرفة افضل تركيز لمصدر الكربون الذي يعطي أفضل إنتاجية من الحامض .

## النتائج والمناقشة

أظهرت العزلة *Rhizopus oryzae* (c-80) كفاءة في قابليتها على إنتاج حامض اللاكتيك في وسط التخمر حيث كانت الحموضة الكلية المقطرة بالتسحيح والأس الهيدروجيني وكمية حامض اللاكتيك (غم / لتر) مقدره باستخدام تقنية الـ HPLC البالغة (2.55% ، 3.1 ، 39.6 غم / لتر) على التوالي وهي نتائج مقارنة لدراسة اعطت نتائج مقارنة باستعمال سلالة الفطر *Rhizopus oryzae* وباستعمال الكلوكوز كمصدر كاربوني في وسط التخمر. (10).

جدول (1) يبين تأثير استخدام تراكيز مختلفة من الكلوكوز (مصدر الكاربون) لإنتاج حامض اللاكتيك بواسطة العزلة (c-80) *Rhizopus oryzae*

ت	مصدر الكاربون (كلوكوز) %	الحموضة الكلية %	الاس الهيدروجيني	حامض اللاكتيك غم/ لتر
1	5	0.81	5.1	15.4
2	10	1.06	4.2	30.1
3	15	1.90	3.9	32.9
4	20	2.55	3.1	39.6

ويلاحظ من النتائج المدرجة في الجدول أعلاه تأثير استخدام تركيز عالي من مصدر الكاربون (الكلوكوز) في وسط الإنتاج قد أعطى إنتاجية عالية من الحامض كذلك الزيادة في الحموضة الكلية % وهذا يتفق مع ما جاء في (11) وان سلالات اخرى قد اعطت إنتاجية عالية من الحامض تفوق حتى إنتاجية بكتريا حامض اللاكتيك وهذا ما ورد في (13)

## المصادر

- 1-Vaccari, G., Gonzalez-Vara, Y.R.A., Campi,A.L., Dosi,E.,Brigidi,P. and Matteuzzi, D.(1993) Fermentative production of L- lactic acid by *Lactobacillus Casei* DSM20011 and product recover using ion exchange resins . *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40 : 23-27.
- 2- Yin hua, L., Jianping, L., Shaozhang, L., Xuemer, L., Yao , S., Peilin, C. (1997). Extractive L- lactic acid fermentation with immobilized *Rhizopus oryzae* in a three- phase fluidized bed . *Chinese J. Biotech.* 13 (3): 169-176.
- 3- Obayashi, A., H. Yorifuji, T. Yamagata, T. Ijichi, and M. Kanie.(1966).Respiration in organic acid forming molds . part I.Purification of cytochrome c, coenzyme Q and L- lactic dehydrogenase from lactate forming *Rhizopus oryzae* . *Agric. Biol . Chem.* 30: 717- 724.
- 4-Wang,C.W.,Z.Lu,and G. T.Tasao . (1995).Lactic acid production by pellet - from *Rhizopus oryzae* in a submerged system.*Appl.Biochem.Biotechnol.*51 /52: 1391-1399.
- 5- Prescott, S.C. and Dunn, C.G.(1959) . *Industrial Microbiology* .3 ed. McGraw-Hill Book company .New York.pp:631-635.
- 6- Yu , R.C. and Hang , D. (1989). Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L(+)- lactic acid by *Rhizopus oryzae* . *Biotechnol.Lett.* 11: 597-600.
- 7- Rychtera,M.,Melzoch, K., Habova, V., Vedlichova, Z., Patakova, P., Hammaci.,H. and Machek.,F.(1996). Optimization of microbial lactic acid production in integrated process. *J. Biotechnik.* Ankara, Turkey FM, CZ- 155-161.
- 8- Speck , M.C. (1976) . *Compendium of method for Microbiological examination of food* . Washington .American Public Health Association , pp : 222-229.

- 9- Hamakawa,H.;Shimzaki,K.;Sukegawa,K and Kato,I.(1983) Analysis of organic acid component in fermented whey and in commercial dairy by high performance liquid chromatography . Japanese .J.of Dairy and Food Sci.,32(4):A139-144.
- 10- Ruengruglikit, C. and Hang , Y.D. (2002). Production of L(+) lactic acid from corn cobs . (Abst) .Session 76A , Biotechnology – Cornell University . Geneva
- 11- Margulies, M., and W. Vishniac. (1961). Dissimilation of glucose by the MX strain of Rhizopus . J. Bacteriol. 81: 1-9.(Abst).
- 12- Suntornsuk, W . and Hang,Y.D. (1994) . Strain improvement of Rhizopus oryzae for production of L (+) lactic acid and glucoamylase . Lett. Appl. Microbiol. 19: 249-252.
- 13- Senthuran, A., Senthuran, V., Mattiasson, B. and Kaul, R. (1997). Lactic acid fermentation in a recycle batch reactor using immobilized Lactobacillus casei . Biotechnol. Bioeng. 55(6) : 841- 853.