تولید دی استیل درفرایند تخمیرغیرمداوم با استفاده ازکشت های آغازگر لاکتیکی

هما الوندی[1]، مهین آذر[2]، سید عباس شجاع الساداتی*[3]

۱- دانش آموخته دوره کارشناسی ارشد علوم وصنایع غذایی ، انستیتو تحقیقات تغذیه ای وصنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای وصنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی- مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

دراین تحقیق تولید دی استیل به عنوان عامل ایجاد عطر و طعم کره ای در صنایع غذایی با استفاده از باکتری های لاکتیکی جنس های *لاکتوکوکوس*(*Lactococcus*) و *لوکونوستوک* (*Leuconostoc*) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور فرایند تخمیر هوازی غیرمداوم برروی محیط کشت MRS ، محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر ومحیط کشت بر پایه پودر شیر بدون چربی درشرایط مختلف دما، دورهمزن، میزان گلوکز به عنوان منبع کربن ، میزان تری سدیم سیترات به عنوان پیش ساز تولید دی استیل، درصد مایه تلقیح، میزان آنزیم کاتالاز، میزان خون گاوی به عنوان منبع پروتئین هم ومیزان نمک کلرید مس دو ظرفیتی انجام و شرایط بهینه برای به دست آوردن بالاترین راندمان تولید مشخص شد. نتایج نشان داد که بهترین شرایط تخمیر برای تولید دی استیل با استفاده ازآغازگرلاکتیکی مخلوط ودرمحیط کشت بر پایه پودر آب پنیرشامل دمای۳۲ درجه سانتی گراد، دورهمزن ۱۸۰ دور در دقیقه ، گلوکز٦ گرم برلیتر، تری سدیم سیترات ۵ گرم برلیتر ، میزان مایه تلقیح ۵ درصد، میزان آنزیم کاتالاز٦ میلی لیتر برلیتر، میزان خون گاوی٤ گرم بر لیتر و میزان نمک کلرید مس دو ظرفیتی ۱۵میلی گرم برلیتر می باشد. در نهایت از یک فرمنتور۱۰ لیتری باحجم کاری ٦/۵ لیتر، برای تولید دی استیل در شرایط بهینه استفاده شد که مقدار۹٤۵ میلی گرم بر لیتردی استیل در کشت بهینه به دست آمد.

کلید واژگان : دی استیل ،*لاکتوکوکوس لاکتیس* ، *لوکونوستوک مزانتروئیدس* ، تخمیرغیرمداوم، بهینه سازی تولید

۱- مقدمه

دی استیل (۲ و ۳ بوتاندیون) از جمله ترکیبات طعم دهنده است که به شکل مایعی به رنگ زرد- سبز با بوی تند کره ای، کاربردهای وسیعی در ایجاد عطر وطعم کره در صنایع غذایی دارد. دی استیل عمدتا"به روش شیمیایی از متیل اتیل کتون[1] (MEK) ساخته می شود. این روش ابتدا MEK به یک ترکیب ایزونیتروزو[2] تبدیل و سپس تحت تاثیر اسید کلریدریک آبکافت شده و به دی استیل تبدیل می شود. دی استیل تولید شده تحت عنوان طعم دهنده کره در فراوری انواع مارگارین، تافی، آبنبات، شکلات، سس، فراورده های لبنی، غلات حجیم شده و دیگر محصولات غذایی استفاده می شود. میزان مصرف دی استیل در فرمول بندی فراورده های غذایی

* مسئول مکاتبات: shoja_sa@modares.ac.ir

1. Methyl Ethyl Keton
2. Isonitroso compound

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

مختلف بر اساس دستور العمل ای فرایند خوب ساخت[1] تنظیم می شود. به طورکلی، طعم دهنده دی استیل در فهرست GARS[2] قرار دارد و مصرف آن در فرمول بندی انواع فرآورده های غذایی محدویت ندارد. عموما" محدوده مصرف آن در صورتی که به عنوان طعم دهنده مورد استفاده قرار گیرد، از ppm ۰/۷۶ تا ۶۲/۱۸(چربیها و روغن ها) متغیر است [۱و۲] .

امروزه اکثر ترکیبات طعم دهنده از طریق واکنش های پیچیده شیمیایی ساخته، خالص سازی و استخراج شده و درصنایع غذایی به منظور ایجاد عطرو طعم مناسب و مورد پسند مصرف کنندگان استفاده می شوند. احتمال وجود ناخالصی در این ترکیبات و به دنبال آن خطرات احتمالی این مواد برسلامتی انسان و افزایش تقاضای مصرف فراورده های غذایی با منشا زیستی سبب شده که توجهات خاص به دانش زیست فناوری جهت تولید این فراورده ها مبذول شود [۱و۳] . به‌طور کلی ۱/٤ سهم بازار فروش جهانی مواد افزودنی غذایی را مواد طعم دهنده تشکیل می دهند. روند رو به رشد معادل ۳-۲ میلیارد دلار در سال برای فروش مواد طعم دهنده طبیعی به جای مواد طعم دهنده شیمیایی وجود دارد [٤]. برای اولین بار دی استیل طبیعی از طریق روش تخمیر در اوائل سال ۱۹۹۰ در شرکت فراورده های لبنی می جی[3] ژاپن تولید شد. اساساً تولید ترکیبات طعم دهنده در فرایند تخمیرغیر مداوم، پدیده ای پیچیده است که تحت تاثیر عواملی مانند pH ، غلظت سیترات ، شرایط فیزیولوژیک سلول ها و فرایند تثبیت سلول ها[4] قرارمی گیرد[۵ و٦]. سیترات ابتدا به استات و اگزالواستات تبدیل شده و در اثردکربوکسیلاسیون، پیروات را به وجودمی آورد و پیروات به دی استیل تبدیل می شود. از جمله پژوهش های انجام شده در زمینه تولید دی استیل ایجاد شرایط بهینه برای افزایش تولید متابولیت ها در محیط های کشت تخمیری است[۷] .

هدف از این پژوهش، تولید دی استیل از طریق فرایند تخمیر هوازی، با استفاده از باکتری های جنس *لاکتوکوکوس* و *لوکونوستوک* بر روی محیط کشت مرجع MRS[5]، محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر و محیط کشت بر پایه پودرشیر پس چرخ انجام می با شد. در همین ارتباط اثر متغیرهای دما، دورهمزن، میزان گلوکز به عنوان منبع کربن، میزان تری سدیم سیترات به عنوان پیش ساز تولید دی استیل، درصد مایه تلقیح، میزان آنزیم کاتالاز، میزان خون گاوی به عنوان منبع پروتئین هم و میزان نمک کلرید مس دو ظرفیتی بر تولید دی استیل توسط آغازگرهای[6] لاکتیکی ساده و مخلوط با نام های تجاری DY 11 و PROBAT 505 مورد بررسی قرار گرفت و شرایط مناسب تولید تعیین شد.

۲ – مواد و روش ها

۲-۱ میکرو ارگانیسم ها

از دو نوع آغازگرلاکتیکی ساده و مخلوط جهت تولید دی استیل استفاده شد که عبارت بودند از:

الف – آغازگر لاکتیکی ساده DY11 شامل باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیر گونه *دی استی لاکتیس* .

ب– آغازگر لاکتیکی مخلوط PROBAT 505 شامل باکتری های :

- *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیر گونه *دی استی لاکتیس*
- *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیر گونه *لاکتیس*
- *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیر گونه *کرموریس*
- *لوکونوستوک مزانتروئیدس* زیر گونه *کرموریس*

۲-۲ محیط کشت

از۳ نوع محیط کشت جهت کشت باکتری های لاکتیکی استفاده شد .

الف – محیط کشت ام آر اس[7]

ترکیبات محیط کشت ام آر اس به عنوان محیط کشت مرجع که به صورت آماده در دسترس قرار گرفت شامل :

مخلوط پپتون g/l ۱۰/۵ ، عصاره مخمرg/l ۵ ، عصاره گوشت g/l ۱۰، گلوکزg/l ۲۰، فسفات پتاسیمg/l ۲ ، استات سدیم g/l ۵ ، سیترات آمونیوم g/l ۲, سولفات منیزیمg/l ۰/۲ ، سولفات منگنز g/l ۰/۰۵ و ماده Tween 8 0 به میزان g/ l ۱/۰۸[۸] .

1. Good Manufacturing Practice
2. Generally Recognize As Safe
3. eiji
4. Immobilization
5. De Man,Rogosa and Sharpe medium
6. Starters
7. MRS medium

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

ب- محیط کشت برپایه پودر شیر بدون چربی

از پودر شیر پس چرخ بازسازی شده[1] به عنوان ماده اصلی جهت تهیه محیط کشت همراه با ۰/۱ درصد عصاره مخمری و یک میلی مولار سولفات منگنز و ۲۰ میلی مولار تری سدیم سیترات استفاده شد وبه منظور پاستوریزاسیون ، در دمای ۳ ℃ ±۹۵ به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد . با توجه به اینکه ۲ نوع آغازگر انبوه[2] ساده و مخلوط تهیه گردید، از هر یک از آغازگرهای انبوه به میزان ۵ درصد در محیط کشت پودر شیر پس چرخ تلقیح شد[۹] .

ج - محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر

از پودر آب پنیر[3] به عنوان ماده پایه جهت رشد باکتری های لاکتیکی استفاده شد. ترکیبات محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر در لیتر عبارتند از: پودر آب پنیر ۲۰ گرم، مخلوط پپتون ها (از پپتون کازئین، پپتون گوشت و پپتون سویا به میزان مساوی استفاده شد) ۵ گرم، عصاره مخمر ۳/۵ گرم، نمک تری سدیم سیترات ۲/۲ گرم. پس از تهیه محیط کشت به منظور پاستوریزاسیون در دمای ۳ °C ± ۹۵ به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد و سپس از هر یک از آغازگرهای انبوه به میزان ۵ درصد در محیط کشت محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر تلقیح گردید[۱۰و۱۱] .

۲-۳ آغازگر انبوه

جهت تهیه ۱ لیتر آغازگر انبوه، از پودر شیر پس چرخ استفاده شد. پودر شیر پس چرخ به نسبت ۱۰ به ۹۰ در آب مقطر حل شده ودر دمای ۳ ℃ ±۹۵ به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم حرارت داده شد. جهت تلقیح پودر آغاز گرهای کره ساده و مخلوط، یک قاشقک از هر یک از آغازگر ها در شرایط کاملاً سترون و در زیر هود لامینار[4] به محیط کشت شیر بدون چربی اضافه شد. پس از تلقیح، ارلن ها در گرمخانه با تکان دهنده در دمای ۳۲-۳۰ ℃ به مدت ۲۴ ساعت با دور همزن ۱۸۰ rpm قرار گرفتند. پس از رسیدن به شدت رشد ویژه بیشینه[5] (μ_{max})، باکتری های لاکتیکی در هر دو نوع آغازگر بدست آمد و برای نگهداری به یخچال ۴ ℃ منتقل شد.

۲-۴ تلقیح آغازگر انبوه به محیط های کشت

بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، از هر دو نوع آغاز گر به نسبت ۵ درصدحجمی به محیط های کشت آبگوشت ام آر اس ، محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر و محیط کشت پودر شیر بدون چربی تلقیح گردید. کلیه ارلن ها در دمای ۳۲ °C به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه با تکان دهنده با دور همزن ۱۸۰ rpm قرار گرفتند.

۲- ۵ کشت باکتری های لاکتیکی روی محیط کشت ام آر اس جامد

از هر یک از ارلن ها در شرایط کاملاً سترون ۱ میلی لیتر در محیط کشت ام آر اس آگاردار به روش آمیختنی[6] تلقیح شد و در دمای ۳۲°C به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شد. بشقابک های تهیه شده و در یخچال ۴°C نگهداری شدند.

۲- ۶ منحنی رشد و تولید محصول

ارلن های حاوی محیط کشت شیر پس چرخ بازسازی شده تهیه شده و از هر دو نوع آغازگر انبوه 505 , DY11 PROBAT به میزان ۵ درصد حجمی تلقیح شد. کلیه ارلن ها در گرمخانه با تکان دهنده با دمای ۳۲°C ودور همزن ۱۰۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. در زمانهای ۰ ، ۲ ، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۴، ۱۸ ، ۲۰، ۲۴ ساعت، دو ارلن به طورهم زمان برداشته شدند و میزان دانسیته نوری[7] (OD) در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. پس از قرائت OD، ارلن های مربوط به هر زمان در سردخانه ۴°C قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت اندازه گیری دی استیل به طور همزمان انجام شد.

1. Reconstitute skim milk powder
2. Bulk starter
3. Whey powder
4. Laminar hood
5. Specific growth rate
6. Pour plate
7. Optical density(OD)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

۲-۷ تولید دی استیل

انواع محیط کشت تولید، شامل محیط کشت آبگوشت ام آر اس ، محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر (با افزودن یا بدون افزودن نمک تری سدیم سیترات) و محیط کشت پودر شیر پس چرخ بازسازی شده تهیه و در ارلن های ۵۰۰ میلی لیتری در شرایط سترون قرار گرفت. مقدار سوبسترا ۵ ٪ حجمی از مایه تلقیح تهیه شده درشرایط سترون بود که به انواع محیط های کشت اضافه شد. پس از انجام تلقیح، کلیه ارلن ها در گرمخانه با تکان دهنده دردما و دور همزن مورد آزمایش قرار گرفتند.

۲-۸ جداسازی دی استیل حاصل از فرایند تخمیر لاکتیکی

پس از برداشت کشت های تولید، توده زیستی[1] ابتدا توسط سانتریفوژ با دور ۶۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شد سپس استخراج دی استیل توسط روش تقطیربا بخار[2] درحلال دی اتیل اترانجام شد[۱۲].

۲-۹ اندازه گیری دی استیل

برای اندازه گیری دی استیل از دو روش رنگ سنجی[3] و کروماتوگرافی گازی استفاده شد.

۲-۹-۱ روش رنگ سنجی

اساس این روش چنین است که دی استیل در حضورمعرف هیدروکسیل آمین[4] بافری به دی متیل گلایوکسیم[5] تبدیل می شود که ماده مذکور با سولفات آهن دو ظرفیتی در محلول قلیایی واکنش داده و کمپلکس صورتی رنگ آمونوفروس دی متیل گلایوکسیم[6] را ایجاد می کند. پس از تیمار کلیه نمونه ها با این روش، میزان دانسیته نوری در دستگاه اسپکتروفوتومتردر طول موج۵۳۰ نانومتر قرائت شد وبا رسم منحنی کالیبراسیون نمونه های استاندارد، غلظت دی استیل در نمونه های مجهول به دست آمد[۱۳] .

1. Biomass
2. Steam distillation
3. Colorimetric method
4. Hydroxylamine
5 . Dimethylglyoxim
6. Ammomo-ferrous dimethyl-glyoximate

۲-۹-۲ اندازه گیری دی استیل با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی

پس از استخراج کلیه نمونه ها در حلال دی اتیل اتر، از فاز بالایی اتری با استفاده از سرنگ همیلتون به ترتیب به دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل فیلیپس پ یو۴۴۱۰[7] تزریق شد . ابتدا غلظت های استاندارد تزریق شده و پس از به دست آوردن منحنی کالیبراسیون و محاسبه معادله خط رگرسیون، پیک های نمونه های مجهول آزمون شد[۱۴]. مشخصات دستگاه گاز کروماتوگرافی استفاده شده عبارتند از: نوع ستون بپلو موئین[8]، طول ستون ۲۵ متر، قطر ستون ۰/۲۲ میلی متر و ضخامت فیلم آن ۰/۲۵ میکرومتر ، دمای اولیه ستون ۵۰ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۳ دقیقه ، دمای تزریق ۲۵۰ درجه سانتی گراد، دمای آشکار ساز ۲۸۰ درجه سانتی گراد و نوع آن FID [9] ، دمای نهایی ستون ۲۴۰ درجه سانتی گراد، شیب دمایی ۳۰ درجه سانتی گراد در دقیقه و گازحامل هلیوم بود .

۲-۱۱ طراحی آزمایش ها

برای طراحی آزمایش ها از روش تاگوچی[10] به منظور جلوگیری از تداخل متغیر ها در دو مرحله استفاده شد. ابتدا عوامل و سطوح آنها انتخاب شدند. دراین تحقیق، در مرحله اول۴ عامل دما، دور همزن، تری سدیم سیترات به عنوان پیش ساز تولید دی استیل و میزان گلوکز به عنوان منبع کربن در۳ سطح مختلف (دما در سطوح ۳۰، ۳۲، ۳۷ درجه سانتی گراد ، دور همزن rpm ۷۵، ۱۲۵، ۱۸۰ ، تری سدیم سیترات ۲، ۵ ، ۱۰ گرم در لیتر و گلوکز ۶، ۱۲، ۲۰ گرم در لیتر) ۹ آزمایش با سه تکرار انجام و درمرحله دوم با استفاده از نتایج مرحله اول تاثیر۴ عامل دیگریعنی میزان مایه تلقیح، کلرید مس دو ظرفیتی ، خون گاوی و آنزیم کاتالاز در سه سطح مختلف (میزان مایه تلقیح ۵،۳،۱ درصد، کلرید مس دو ظرفیتی ۱۵، ۴۰،۲۵ میلی گرم برلیتر، میزان خون گاوی ۴ ، ۸ ، ۱۲ گرم برلیتر و میزان آنزیم کاتالاز ۶،۴،۱ میلی لیتربرلیتر) نیز ۹ آزمایش با سه تکرار برمیزان تولید دی استیل

7. PHILIPS-PU- 4410
8. Capillary Bplo
9. Flame Ionization Detector(FID)
10. Taguchi

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

ارزیابی شد و آزمایش ها مطابق آرایه متعامد L۹ انجام و پس از انجام آزمایش ها از روش تحلیل واریانس استفاده شد [۱۵] .

۲-۱۲ اندازه گیری pH و اسیدیته محیط های کشت قبل و بعد از فرایند تخمیر

مطابق استاندارد ملی ایران (روش تعیین اسیدیته کل و pH با تراکم یونهای H^+ در شیر و فرآورده های آن) انجام شد[۱۶] .

۲-۱۳ اندازه گیری خواص فیزیکی دی استیل استخراج شده

خواص فیزیکی شامل: وزن مخصوص، ضریب شکست، حلالیت در الکل، نقطه انجماد و مواد باقیمانده حاصل از تبخیر طبق استاندارد ملی ایران (روش اندازه گیری خواص فیزیکی اسانس های طبیعی) انجام شد [۱۷] .

۲-۱۴ شناسایی دی استیل به روش اسپکتروسکوپی مادون قرمز (IR)

جهت شناسایی دی استیل و نوع گروه ها و اتصالات موجود در مولکول های نمونه استخراج شده ، طیف IR آن گرفته شده وبا طیف IR استاندارد دی استیل مقایسه شد. برای شناسایی گروه ها از طیف با مراجعه به جداول همبستگی[1]، طول موج یا عدد موجی گروه ها ، وجود عامل کربونیل را ثابت کرد[۱۸] .

۲-۱۵ تولید دی استیل دربیوراکتور

ازفرمنتور بیوترون[2] ساخت کشورکره جنوبی با ظرفیت۱۰ لیتر با حجم کاری ۶/۵ لیتردر آزمایشگاه بیو تکنولوژی دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه تربیت مدرس پس ازسترون سازی استفاده شد و با استفاده از داده های مربوط به شرایط بهینه تولید که قبلا به دست آمده بود بیوراکتور طی مراحل زیرراه اندازی شد.

۱- مقدار ۶ لیتر محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر تهیه و سترون شد.

۲- ۵٪ حجمی از مایه تلقیح آغازگر لاکتیکی مخلوط به محیط کشت در شرایط کاملا سترون تلقیح شد.

۳- الکترود pH متر بیوراکتور با بافرهای ۷،۴ و۱۰ تنظیم و به بیوراکتور متصل شد.

۴- حسگر اکسیژن محلول از نظر وجود محلول الکترولیت کنترل و به بیوراکتور متصل شد.

۵- حسگر ضد کف جهت تزریق ماده ضد کف سیلیکونی به محیط کشت، کنترل و به بیوراکتور متصل شد.

۶- مسیر تزریق سود و اسید و خوراک مسدود شد.

۷- فیلتر هوا در مسیر ورودی هوا و نمونه گیر قرار گرفت.

۸- ترموستات از نظر میزان آب و دما تنظیم شد.

۹- همزن در جایگاه مخصوص متصل شد .

۱۰- کندانسورتعبیه شده در بالای بیوراکتور متصل شد.

۱۱- میزان هوادهی محیط کشت از طریق پمپ هوا ۲ لیتر در دقیقه تنظیم شد.

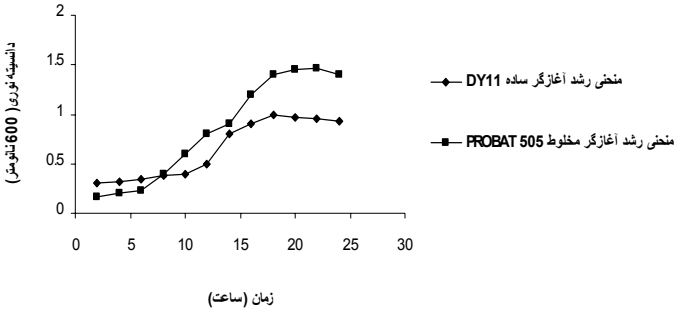
۱۲- راه اندازی بیوراکتور انجام شد

pH اولیه محیط کشت برابر با ۶/۶ ، دمای اولیه ۲۷ °C بوده و دمای فرایند تخمیردر ۳۲ °C و دور همزن ۱۸۰ rpm تنظیم شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱ منحنی رشد

شکل۱ نشان می دهدکه شدت رشد ویژه بیشینه[3] (μ_{max}) آغاز گر ساده لاکتیکی(h^{-1}) ۰/۱۹۷ و آغازگر مخلوط لاکتیکی (h^{-1}) ۰/۳۰۵ است. به طوری که مشخص است آغازگر ساده لاکتیکی نسبت به آغازگر مخلوط لاکتیکی ، فاز تاخیر رشد[4] طولانی تری داشته و فاز لگاریتمی رشد کوتاه تر و شدت رشد ویژه بیشینه (μ_{max}) کمتری دارد و در مقابل، آغازگر مخلوط لاکتیکی فاز تاخیر رشد کوتاه تری داشته و فاز لگاریتمی رشد را در زمان طولانی تری طی کرده و از شدت رشد ویژه بیشینه بیشتری برخوردار می باشد.



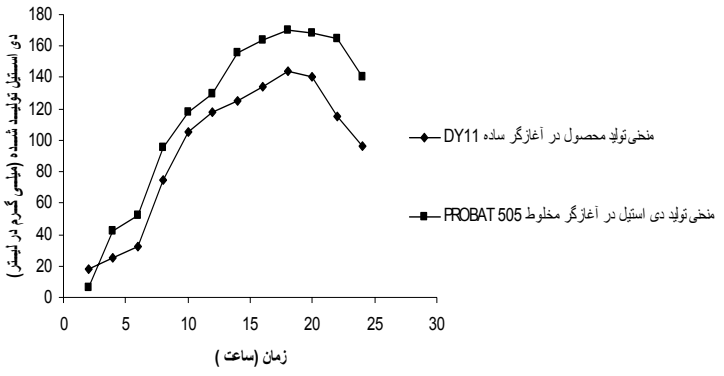
شکل ۱ منحنی رشد آغازگر لاکتیکی ساده و مخلوط در محیط کشت MRS

1. Correlation charts
2. Biotron
3. Specific Growth Rate
4. Lag phase

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

۳-۲ تولید دی استیل

شکل۲ نشان می دهد که هر دو نوع آغازگر از ویژگی تولید دی استیل برخوردارند با اندازه گیری دی استیل با روش گاز کروماتوگرافی با سه تکرار معلوم شد که درتیمارهای کشت داده شده با آغازگر مخلوط لاکتیکی، میزان تولید دی استیل بیشتر از آغازگر ساده لاکتیکی است. طبق جدول ۱ در تیمارهای کشت داده شده با آغازگر ساده لاکتیکی، میانگین دی استیل تولید شده در محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر بدون افزودن سیترات ٤٨٦ میلی گرم بر لیتر و با افزودن سیترات ۷۱۹ میلی گرم بر لیتر، محیط کشت پودر شیر پس چرخ بازسازی شده ۲٤۸ میلی گرم بر لیتر و در محیط کشت مرجع ام آر اس به طور میانگین ۵۱ میلی گرم در لیتر بوده است. در تیمارهای کشت داده شده با آغازگر مخلوط لاکتیکی، میانگین دی استیل تولید شده در محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر بدون افزودن سیترات ٦٦۳ میلی گرم بر لیتر و با افزودن سیترات ۹۲۳ میلی گرم بر لیتر، محیط کشت بر پایه پودر شیر پس چرخ بازسازی شده ۵۵۳ میلی گرم بر لیتر و در محیط کشت مرجع ام آراس به طور میانگین ۸۱/۸۸ میلی گرم بر لیتر بود. گزارش ها نشان می دهد که میزان تولید دی استیل در محیط کشت مرجع ام آر اس بدون افزودن سیترات، ppm ۱۷ دی استیل بوده است[۵]. شایان یاد آوری است که میزان دی استیل تولید شده در محیط کشت حاوی ضایعات پکتینی و با کشت باکتری های *لوکونوستوک کرموریس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *دی استی لاکتیس* ppm ۱۷۰۰ گزارش شده است [۱۹] .



شکل۲ منحنی تولید دی استیل در آغازگر های لاکتیکی ساده و مخلوط در محیط کشت MRS

۳-۳ تولید توده سلولی

تحقیق انجام شده نشان داد که آغازگر مخلوط نسبت به آغازگر ساده در زمان مساوی توده سلولی بیشتری تولید کرده و پس از ۲٤ ساعت، میزان وزن خشک سلولی توده زیستی آغازگر ساده و آغازگر مخلوط به ترتیب ۲٤/۸۸ و ۳۸ گرم برلیتر به دست آمد در حالی که محققین میزان تولید توده سلولی را در محیط کشت مرجع ام آر اس و با کشت باکتری *لوکونوستوک مزانتروئیدس* زیرگونه *مزانتروئیدس* بدون افزودن سیترات، ۰/٤ و با افزودن سیترات ۰/٦٤ میلی گرم بر لیتر گزارش کردند. غلظت توده سلولی از طریق منحنی استاندارد جذب نوری در طول موج nm ٦۰۰ در وزن خشک سلولی به دست آمد[۲۰].

۳-٤ تولید دی استیل در تیمارهای غنی شده با سیترات

طبق جدول۱ ، نتایج اندازه گیری میزان دی استیل تولید شده در تیمارها با روش کروماتوگرافی گازی نشان داد که در محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر که به آن نمک تری سدیم سیترات اضافه شد، میزان تولید دی استیل بیشتر از سایر محیط های کشت بود و علاوه بر این آغازگر مخلوط لاکتیکی در محیط کشت مذکور، از توانایی بیشتری جهت تولید دی استیل برخوردار است. گزارش ها نشان می دهد که سیترات سبب ترغیب باکتری های لاکتیکی به تولید دی استیل شده و به عنوان پیش ساز تولید دی استیل در فراورده های لبنی تخمیری عمل می کند. با وجود شرایط هوادهی و با حضور اکسیژن کافی، افزودن نمک سیترات به محیط کشت تولید دی استیل و استوین افزایش می یابد ولی باید توجه داشت که افزودن سیترات بیشتربه زمان تخمیر طولانی تری نیازمند و بازده تبدیل زیستی سیترات به دی استیل و استوین کاهش می یابد. دلیل کاهش تولید دی استیل، افزایش اثربافری در غلظت های بالای سیترات است. با افزایش غلظت اولیه سیترات، pH افزایش می یابد و افزایش pH ، سبب کند شدن فعالیت آنزیم α- استولاکتات می شود. با افزایش pH ، غلظت پیروات خارج سلولی کاهش می یابد که این روند، فعالیت آنزیم α- استولاکتات سنتتاز را کاهش می دهد [۱۰] .

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

جدول۱ میانگین میزان دی استیل تولید شده در نمونه های حاصل از کشت آغازگر ساده DY11

ردیف	نوع محیط کشت	آغازگر ساده میانگین ± خطای استاندارد(mg/l)	آغازگر مخلوط میانگین ± خطای استاندارد(mg/l)
۱	بر پایه *RSMP*	۲٤۸/۰۹±۲/۳۳	٥٥۳/۹۳±۱/۳٦
۲	بر پایه پودر آب پنیر (بدون افزودن سیترات)	٤۸٦/٦٤±٤/۲٥	٦٦۳/۲۰±۲/۲٥
۳	بر پایه پودر آب پنیر(با افزودن سیترات)	۷۱۹/۱۳±۱/۸۷	۹۲۳/٤٤±۱/۰۰
٤	مرجع MRS	٥۱/۲٥±۱/٤٤	۸۱/۸۸±۰/۹۳
٥	آغاز گر انبوه	۱۰۲۱/۳٦±٤/٤۲	۲۸٦۳/۲٤±۰/۹۸

۳-۵ نتایج حاصله از آزمایش بهینه سازی طبق الگوی تاگوچی

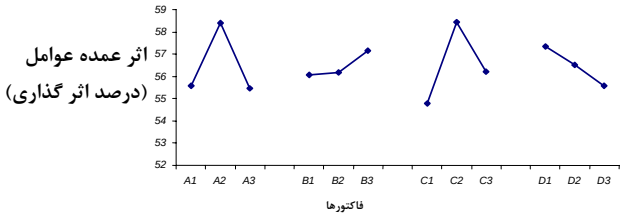
گزارش ها نشان می دهد که میزان تولید دی استیل و استوین با کشت باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس*۳۰۲۲[1] در محیط کشت مرجع ام آر اس، فاقد هر گونه افزودنی به ترتیب ۱۷ و کمتر از ppm ۲۰۰ بوده است[۵] . با توجه به اینکه تحقیق حاضر برای اولین بار انجام می شود طبق جدول۲ و شکل های ۳ و٤ ، با طراحی آزمایش ها طبق الگوی تاگوچی ، بهترین شرایط تخمیربرای تولیددی استیل با استفاده از آغازگر مخلوط لاکتیکی و در محیط کشت بر پایه پودر آب پنیردر مرحله اول شامل : دما درسطح۲ (۳۲ درجه سانتی گراد)، دور همزن در سطح۳ (rpm۱۸۰)، تری سدیم سیترات درسطح۲ (۵ گرم بر لیتر) و میزان گلوکز در سطح۱ (٦ گرم برلیتر) و از نظر تاثیر نسبی عوامل، تری سدیم سیترات دارای بیشترین تاثیر و دما، میزان گلوکز و دورهمزن به ترتیب دارای تاثیر کمتری هستند. طبق جدول۳ و شکل های ۵ و٦ ، در مرحله دوم بهترین شرایط تخمیر برای تولید دی استیل، میزان مایه تلقیح درسطح۳ (۵ درصد)، کلرید مس دو ظرفیتی درسطح۱ (۱۵میلی گرم برلیتر)، خون گاوی درسطح۱ (٤ گرم بر لیتر) و آنزیم کاتالاز درسطح۳ (٦ میلی لیتر برلیتر) قرار داشت و از نظر تاثیر نسبی عوامل، کلرید مس دو ظرفیتی دارای بیشترین تاثیر و آنزیم کاتالاز، میزان مایه تلقیح و خون گاوی به ترتیب دارای تاثیر کمتری هستند. میزان مایه تلقیح ۵ درصد، میزان آنزیم کاتالاز ٦ میلی لیتر برلیتر ، میزان خون گاوی ٤ گرم بر لیتر و میزان نمک کلرید مس دو ظرفیتی ۱۵ میلی گرم بر لیترمی باشد.

جدول۲ نتایج حاصل از آزمایش های بهینه سازی طبق الگوی تاگوچی در مرحله اول

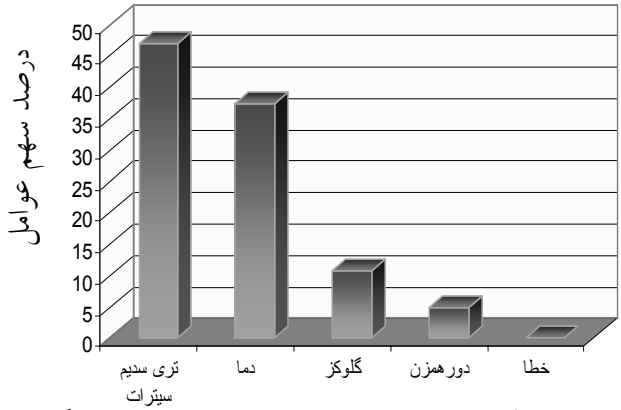
شماره آزمایش / عوامل	دما °C	دور همزن rpm	تری سدیم سیترات g/l	گلوکز g/l	میانگین میزان دی استیل تولید شده ± خطای استاندارد mg/l
۱	۳۰	۷۵	۲	٦	٥۲۱/٦٦±۲/۳۳
۲	۳۰	۱۲٥	٥	۱۲	۷۳۲/٦٦±۷/۸۹
۳	۳۰	۱۸۰	۱۰	۲۰	٥٦۸±٤/٦٥
٤	۳۲	۷٥	٥	۲۰	۸۹٦/۳۳±٥/٤٤
٥	۳۲	۱۲٥	۱۰	٦	۸٦۰/۳۳±٤/۳٥
٦	۳۲	۱۸۰	۲	۱۲	۷۷۷/٦٦±۷/۲۸
۷	۳۷	۷٥	۱۰	۱۲	٥٥۲/۳۳±٦/٤٥
۸	۳۷	۱۲٥	۲	۲۰	٤۲٦/۳۳±٥/٦٥
۹	۳۷	۱۸۰	٥	٦	۸۹۳±٥/۳۳

1. Lactococcus lactis subsp lactis 3022

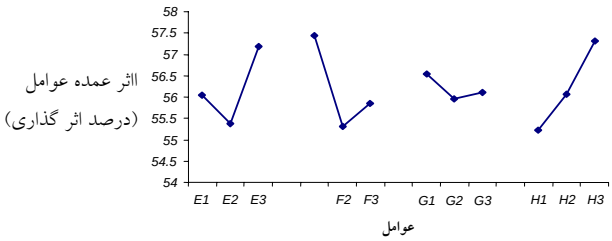
[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]



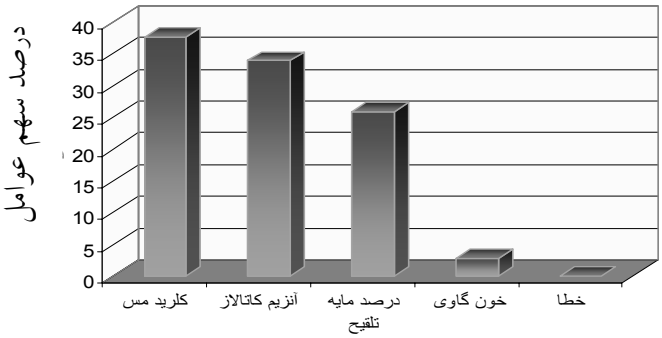
شکل۳ اثرات عمده عوامل (***A*** : دما، ***B***: دور همزن، ***C***: تری سدیم سیترات، ***D*** : گلوکز) در سه سطح



شکل٤ تاثیر نسبی٤ عامل (میزان تری سدیم سیترات، دما، گلوکزو دور همزن) برمیزان تولید دی استیل



شکل۵ اثر عمده عوامل (E : مایه تلقیح ، F : کلرید مس دوظرفیتی، G :خون گاوی ، H : آنزیم کاتالاز) در سه سطح



شکل٦ تاثیر نسبی٤ عامل (میزان کلرید مس، آنزیم کاتالاز، درصد مایه تلقیح و خون گاوی) بر میزان تولید دی استیل

جدول۳ نتایج حاصل از آزمایش های بهینه سازی طبق الگوی تاگوچی در مرحله دوم

عوامل / شماره آزمایش	میزان مایه تلقیح (درصد)	کلرید مس mg/l	خون گاوی g/l	آنزیم کاتالاز ml	میانگین میزان دی استیل تولیدشده ± خطای استاندارد mg/l
۱	۱	۱۵	٤	۱	٦٨٠/٦٦±٥/٦٦
۲	۱	۲٥	۸	٤	٥٤٩/٦٦±٧/٨٩
۳	۱	٤٠	۱۲	٦	٦٨٤/۳۳±٦/٧٨
٤	۳	۱٥	۸	٦	٧٤٩/٦٦±٨/٥٦
٥	۳	۲٥	۱۲	۱	٤٧٦/٦٦±٧/٥٨
٦	۳	٤٠	٤	٤	٥٧٨/۳۳±۳/٤٥
۷	٥	۱٥	۱۲	٤	٨١٤/۳۳±٤/٥٦
۸	٥	۲٥	٤	٦	٧٧۳/٦٦±٧/٨٧
۹	٥	٤٠	۸	۱	٦٠٨/٦٦ ±٦/٥٨

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

۳- ٦ تاثیر نمک مس و آهن پور فیرین

یون Cu^{2+} در شرایط هوادهی شده اثر مثبت بر تولید آنزیم دی استیل سنتتاز دارد و علاوه بر آن تشکیل استیل کوآنزیم A را از پیروات ترغیب می کند .Cu^{2+} رشد باکتری های لاکتیکی را ترغیب کرده و باعث افزایش مصرف گلوکز شده و تولید دی استیل و استوین را افزایش می دهد. بعلاوه تولید دی استیل و استوین در محیط کشت حاوی پروتئین هم ۱۰ برابر بیشتر از محیط کشت فاقد پروتئین هم می باشد[۵ و٦]. در پژوهش حاضرافزودن نمک کلرید مس دو ظرفیتی به میزان ۱۵ میلی گرم بر لیترو خون گاوی به میزان ۸ گرم در لیتر نقش موثری در تولید بهینه دی استیل دارد.

۳-۷ تاثیر آنزیم کاتالاز

توانایی مصرف O_2 به عنوان یک پذیرنده الکترون و تولید H_2O_2 از جمله ویژگیهای باکتری های لاکتیکی است و اثر مهار کنندگی H_2O_2 با کاهش نرخ رشد و تولید اسید تحت شرایط هوادهی شده همراه است. H_2O_2 برای باکتری ها، ماده سمی و کشنده است و تولید دی استیل در طول فرایند کشت غیر مداوم توسط H_2O_2 مهار می شود لذا در طول فرایند تولید دی استیل باید کاهش یابد. آنزیم کاتالاز، مکمل محیط کشت است و بهترین غلظت آنزیم کاتالاز برای تولید دی استیل ٤۰۰۰ واحد کاتالاز بر میلی لیتر محیط کشت است. به دلیل اینکه افزودن آنزیم کاتالاز به محیط کشت سبب افزایش هزینه های تولید دی استیل می شود، می توان ازجگر گاوی یکنواخت شده[1] (HBL) به جای آنزیم کاتالاز استفاده کرد[۲۱]. در تحقیق حاضر افزودن آنزیم کاتالازبه میزان ٦ میلی لیتر بر لیتر، با تجزیه H_2O_2 حاصل از فرایند تخمیر سبب تولید بهینه دی استیل شد.

۳-۸ نتایج حاصل از اندازه گیری pH

سرعت اسیدی شدن در محیط کشتی که به آن سیترات افزوده شده نسبت به محیط کشتی که فاقد سیترات است کمتر بوده که احتمالا" به دلیل اثر بافری سیترات است [۱۰] . طبق جدول ٤ میانگین pH و اسیدیته محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر با کشت آغازگر های لاکتیکی ساده و مخلوط (با و بدون افزودن سیترات) نشان دهنده این است که هر دو نوع آغازگر از ویژگی تولید اسید لاکتیک برخوردارند و آغازگر ساده، محیط کشت را بیشتر اسیدی می کند به علاوه سرعت اسیدی شدن در محیط کشتی که به آن سیترات اضافه شده نسبت به محیط کشتی که سیترات ندارد کمتر است.

جدول٤ میانگین pH محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر قبل و بعد از کشت

ردیف	شرح	میانگین ± خطای استاندارد
۱	قبل از کشت	٦/۵۲±۱/۵۲
۲	پس از تلقیح آغازگر مخلوط PROBAT505 پس از ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری(با افزودن سیترات)	۳/۹۲±۱/۷۸
۳	پس از تلقیح آغازگر مخلوطPROBAT505 پس از ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری (بدون افزودن سیترات)	۳/۸۰±۰/۲۳
٤	پس از تلقیح آغازگر ساده DY_{11} پس از ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری (با افزودن سیترات)	۳/۷۳±۱/۱۳
۵	بعد از تلقیح آغازگر ساده DY_{11} پس از ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری (بدون افزودن سیترات)	۳/٦٤±۰/٤۷

۳-۹ نتایج حاصل از اندازه گیری خواص فیزیکی

در جدول ۵ نتایج اندازه گیری خواص فیزیکی دی استیل تولید شده در شرایط بهینه دیده می شود. میانگین وزن مخصوص ماده حاصل از استخراج ۰/۹۰، شاخص ضریب شکست ۱/۳۸۹، مواد باقیمانده حاصل از تبخیر ۷٤/۳٪ ، نقطه انجماد ۳/۸- و از نظر حلالیت در الکل ، محلول کاملاً شفاف تشکیل داد. با توجه به استاندارد ویژگی های فیزیکی طعم دهنده دی استیل که توسط متخصصین کمیته مشترک FAO/WHO در مورد مواد افزودنی[2] تعیین شده است، دی استیل خالص دارای وزن مخصوص ۰/۹٦*g/ml*، شاخص ضریب شکست ۱/۳۹۷- ۱/۳۹۳، نقطه انجماد۲- تا ٤- و از نظرحلالیت در الکل، محلول کاملاً شفاف تشکیل می دهد[۲۲] . در استاندارد کدکس ، ویژگی ها ی دی

1. Homogenized bovin liver

2. Joint FAO/WHO Expert Committee On Food Additives

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

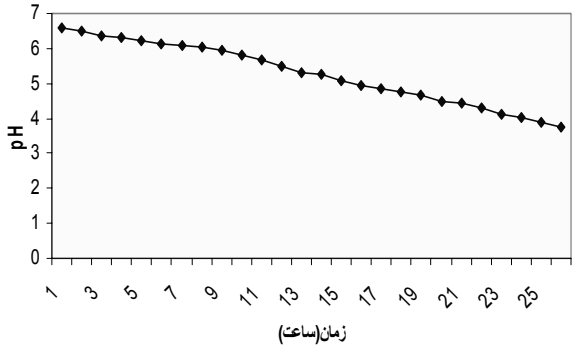
استیل توسط متخصصین کمیته مشترک FAO/WHO مواد افزودنی تعیین شده و طیف IR آن رسم شده است [۲۳]. با توجه به اینکه طیف IR به صورت درصد عبور[1] در منحنی عرض ها و بر حسب عدد موج[2] در محور طول ها رسم می شود، با مقایسه طیف جذبی نمونه های مورد آزمون با پیک استاندارد معلوم شد که در مادهٔ حاصل از استخراج محیطهای کشت MRS ، محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر و محیط کشت پودر شیر پس چرخ که با آغازگر ساده و آغازگر مخلوط کشت داده شده اند، گروه های کربونیل وجود دارند. عامل های کربونیل دارای ارتعاش یا پیک جذبی قوی در ناحیه $1750-1650\ cm^{-1}$ بوده و طیف IR ماده حاصل از استخراج کلیه محیط های کشت وجود عامل کربونیل را اثبات می کند. از آنجا که آزمون مذکور به صورت کیفی انجام گرفته است ، شدت علائم ثبت شده در محدوده $1750-1650\ cm^{-1}$ عدد موجی نیز موید میزان عامل های کربونیلی است که در محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر شدت علامت مذکور از همه موارد بیشتر بوده است.

جدول۵ مقدار کمی ویژگی های فیزیکی دی استیل تولید شده در شرایط بهینه

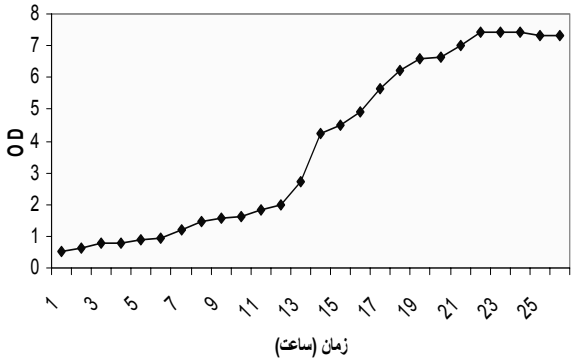
ردیف	خواص فیزیکی	میانگین ± خطای استاندارد
۱	وزن مخصوص	۰/۹۰±۰/٤٤
۲	اندیس رفراکسیون	۱/۳۸۱±۰/۱۱
۳	حلالیت در الکل	کاملاً محلول در الکل
٤	مواد باقیمانده حاصل از تبخیر(آزمون پایداری)	٪۷٤/۳±۱/۳۸
۵	نقطه انجماد	-۳/۸±۰/۱۸

۳-۱۱ نتایج حاصل از تخمیر در بیوراکتور

در تحقیق حاضر، طبق شکل شماره ۷ تغییراتpH در طول فرایند تخمیردر بیوراکتور تلقیح شده با آغازگر لاکتیکی مخلوط (PROBAT 505) ملاحظه می شود که در محیط کشت بر پایه پودر آب پنیر در مدت ۲٤ ساعت pH از ٦/٦ به۳/۷٤ می رسد و طبق شکل شماره ۸ منحنی رشد باکتری های لاکتیکی در طول فرایند تخمیر در بیوراکتور۱۰ لیتری نشان داد که در مدت زمان حدود۲ ساعت فاز تاخیر طی شده و پس از آن باکتری ها وارد فاز لگاریتمی رشد می شوند و فاز لگاریتمی رشد در مدت ۸ ساعت طی شده و نهایتاً باکتری ها پس از ۲۰ساعت وارد فاز سکون می شوند. تغییراتpH در طول فرایند تخمیر دربیوراکتور تلقیح شده با آغازگرلاکتیکی و منحنی رشد باکتری های لاکتیکی (ROBAT 505) در طول فرایند تخمیردر نمودار های ۹ و۱۰ نشان داده شده است.نمونه آنالیز کروماتوگرافی گازی نمونه وجود ۹٤۵ میلی گرم بر لیتردی استیل در محیط کشت را نشان داد.



شکل۷ تغییراتpH در طول فرایند تخمیر در بیوراکتور تلقیح شده با آغازگر لاکتیکی مخلوط



شکل ۸ منحنی رشد باکتری های آغازگرلاکتیکی مخلوط در طول فرایند تخمیر در بیوراکتور

٤- نتیجه گیری

بهترین شرایط تخمیر برای تولید دی استیل ، دمای۳۲ درجه سانتی گراد، دورهمزنrpm ۱۸۰، میزان گلوکز ٦ گرم برلیتر،

1. % Transmitance
2. Wave Number

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

میزان تری سدیم سیترات ۵ گرم درلیتر، میزان مایه تلقیح ۵ درصدحجمی، میزان آنزیم کاتالاز٦ میلی لیتر بر لیتر، میزان خون گاوی ٤ گرم برلیترو میزان نمک کلرید مس دو ظرفیتی ۱۵ میلی گرم بر لیتر به دست آمد. با مقایسه کشت باکتری های لاکتیکی در شرایط استاتیک (کشت ساکن) و غیر استاتیک (کشت همزن دار) مشخص شد که میزان تولید دی استیل در کشت همزن دار بیشتر از کشت ساکن است و هنگامیکه غلظت اکسیژن اولیه افزایش می یابد، تولید دی استیل و استوین در محیط کشت افزایش می یابد. احتمالاً با افزایش غلظت اکسیژن، فعالیت آنزیم α- استولاکتات سنتتاز و NADH اکسیداز افزایش می یابد و این مساله منجر به افزایش تولید استوین و دی استیل و ترکیبات معطره تحت شرایط هوادهی شده می شود. به علاوه آغازگر لاکتیکی مخلوط در مقایسه با آغازگر ساده از توانایی بیشتری در تولید اسید لاکتیک برخوردار بوده و pH محیط کشت را در مدت ٤٨ ساعت گرمخانه گذاری به مقدار بیشتری کاهش می دهد. نتایج اندازه گیری خواص فیزیکی دی استیل تولید شده در شرایط بهینه نشان داد که عوامل فیزیکی در صورتی قابل اندازه گیری هستند که دی استیل تولید شده خالص سازی شود با توجه به اینکه در این پژوهش عمل خالص سازی انجام نشده و تنها محلول حاصل از استخراج جهت آزمایش های بعدی مورد ارزیابی واقع شده است بررسی روش های خالص سازی دی استیل تولید شده در محیط کشت با روش های پیشرفته دستگاهی توصیه می گردد.

۵- سپاسگزاری

به این وسیله از زحمات خانم فاطمه تیموری، کارشناس محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه تربیت مدرس تهران برای همکاری در انجام پژوهش حاضر صمیمانه تشکر می شود.

٦-منابع

[1] Oscar A., Liliana B., Pierella R B. 2001. Kinetic studies in diacetyl synthesis over V-containing zeolites. J.Catalysis Letter. 75(1-2): 87-91.

[2] Ashurst PR. (Ed). 1999 . Food Flavoring. 3 rd ed. Maryland, Aspen. 253-270.

[3] Teixeira R M., Cavalheiro D., Ninow JL 2002. Optimization of acetion production by *Hanseniaspora guilliermondii* using experimental design. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 19(2):118-130.

[4] Mortazavi SA., Kuchaki A. 2004. Introduction to industrial microbiology.1th Pub. Ferdosi University. Mashhad. 359-361.

[5] Kaneko T., Takahashi M., Suzuki H.1991a . Method for the fermentative production of diacetyl and action using lactic acid bacteria. US Patent number 5, 075.226

[6] Kaneko T., Watanbe Y., Suzuki H. 1991b. Differences between *Lactobacillus casei subsp.casei 2206* in citrate positive *Lactococcus lactis subsp. lactis 3022* in the characteristics of diacetyl production. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 57:3040-3042.

[7] Verhue W M., Tjan F B. 1991. Study of the citrate metabolism of *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* by means of nuclear magnetic resonance. Applied and Environmental Microbiology. 57(11): 3371-3377.

[8] De Man J C., Rogosa M., Sharpe M E .1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology. 23: 130-135.

[9] Hugenholtz J., Starrenburg Marjo J.C.1992. Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis subsp.lactis var. diacetylactis* and *Leuconostoc ssp*. Applied Microbiology Biotechnology. 38: 17-22.

[10] Boumerdassi H., Monnet C., Desmazeaud M .1997. Effect of citrate in production of diacetyl and acetion by *Lactococcus lactis Subsp lactis CNRZ 483* cultivated in the presence of oxygen.Journal of Dairy Science. 80: 634-639.

[11] Christopherson A.T., Zottola E.A.1989. Whey permeate as a medium for mesophilic lactic acid streptococcus. Journal of Dairy Science. 72 :1701-1706.

[12] Walsh B., Cogan T M. 1974a. Seperation and estimation of diacetyl and acetion in milk. Journal of Dairy Research. 41:25-30.

[13] Walsh B., Cogan T M. 1974b. Further studies on the estimation of diacetyl by the methods of prill and hammer and owades and jakovac. Journal of Dairy Reseaech. 41:31-35.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

[14] Monnet C., Schmitt P., Divies C. 1994b. Method for assaying volatile compounds by headspace gas chromatography and application to growing starter cultures. Journal of Dairy Science. 77: 1806-1815.

[15] Shojaosadati SA., Asadollahi MA. 2008. Industrial biotechnology.2nd edution. Tarbiat Modaress University. Tehran. 299 – 338.

[16] Iran National Standard. Brochure No 2852. Method for detecting acidity and pH in milk & dairy products. 1987.

[17] Iran National Standard. Brochure No 2274 . Natural essence.1979

[18] Edris M., Nasernejad B. Analytical spectroscopy.1992. 1th Pub. Amirkabir University. Tehran. 90-115.

[19] Duboff S A., Kwon S S.,Vadehra DY. 1993. Diacetyl production. European patent application. Number 0564777 A_1.

[20]Schmitt P., Vasseur C., Phalip V. 1997, Diacetyl and acetoin production from the co-metabolism of citrate and xylose by *Leuconostoc mesentroides Subsp mesentroides*. Applied Microbiology Biotechnology. 47:715-718.

[21]Ochi H, Takahshi M, Kaneko T.1991. Diacetyl production by co-immobilized citrate-positive *Lactococcus lactis subsp. Lactis lactis 3022* and homogenized bovin liver in alginate fibers with double gel layers. 13(7): 505-510.

[22]JECFA Evaluation .1998. Diacetyl Flavoring. Joint FAO/WHO expert committee on food additives.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

Diacetyl Production in Batch Fermentation Process by Lactic Starter Cultures

Alvandi, H. [1], Azar, M. [2], Shojaosadati ,S. A.[3*]

1. M.Sc., Food Science and Technology, National Nutrition & Food Technology Research Institute Shahid Beheshti University of Medical Science
2. Professor, Department of Food Science and Technology, National Nutrition & Food Technology Research Institute Shahid Beheshti University of Medical Science
3. Professor, Biotechnology Group, Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering , Tarbiat Modares University

In this research diacetyl production as a buttery flavor in food industries by Lactic Acid Bacteria (LAB), Lactococcus and Leuconostoc genus was investigated. Batch fermentation process accomplished on MRS (De Man, Rogosa and Sharpe medium) broth medium, medium based on whey powder and based on skim milk powder at different conditions of temperature, agitation speed, glucose as carbon source, tri-sodium citrate as precursor of diacetyl production, inoculum, catalase enzyme, bovin blood as heme protein source and $CuCl_2$. Optimum conditions were determined for achivement of highest production yield. This research indicated that the optimum fermentation conditions for diacetyl production by LAB were:32º C, 180 rpm, glucose 6 g/l,tri-sodium citrate 5g/l, inoculun 5%, catalase enzyme 6 ml/l, bovin blood 4 g/l, $CuCl_2$ 15 mg/l. Finally, for production of diacetyl, a fermenter was used with 10 liter volume, inoculum size 5 % (v/v) with working volume of 6.5 liters. Agitation and temprature were maintained at 180 rpm and 32ºC, respectively. Diacetyl concentration under optimized condition in fermenter was obtained as 945 mg/l.

Key Words*:* Diacetyl, Batch Fermentation, Lactococcus lactis, Leuconostoc mesentroides. Optimized production

*Corresponding author E-mail addresss; shoja_sa@modares.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]