Journal of Microbial World
Volume 13, No. 3, September 2020

Original Article

Optimization of biomass production by probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnonsus* at pilot-plant scale

Maryam Armand[1], Mohammad Faezi Ghasemi[2], Mohammad Reza Fazeli[3], Mirsasan Mirpour[4]

[1]PhD Student, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran. [2]Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran. [3]Professor, Department of Drug and Food Control, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [4]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

Abstract

Background & Objectives: Probiotics play a very important role in improving the normal intestinal flora and inhibit the growth of harmful bacteria in the gastrointestinal tract and are also important for therapeutic purposes. This study aimed to optimize biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 (GG) using the experimental design process.

Materials and Methods: In this study, the probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* was used. Plackett-Burman design method was used for the optimization. Fermentations in basal and optimized cultures were performed in 1300 liter Parspad Company's fermenters.

Results: The results showed that beet molasses, glucose, and casein have the greatest effect on biomass production by *Lactobacillus rhamnosus*. Glucose with casein and beet molasses have a synergistic effect and increasing the concentration of glucose with increasing the concentration of two other factors increases the production of the biomass. Based on the results obtained, after optimization, the optimal culture medium for biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* has the following compounds g/L^{-1}: glucose 112.50, beet molasses 56.25, casein 18.75, yeast extract 18.75, K_2HPO_4 13.13, Tween 80 1.88, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3750, $MnSO_4.4H_2O$ 0.0750, $CaCl_2.2H_2O$ 0.1875 and Simethicone1.25. The biomass production in optimized conditions was increased more than 2-folds higher than the basal medium.

Conclusion: Biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* on a semi-industrial scale was carried out in 1300 liters fermentors. Therefore, the results of this study can be used in the industrial production of *Lactobacillus rhamnosus* biomass. Also, commercial production under fed-batch and continuous culture conditions is recommended.

Keywords: Experimental design, *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC53103, Plackett-Burman Design, Optimization, Probiotics.

Correspondence to: Mohammad Faezi Ghasemi

Tel: +98 1342239042

E-mail: faezi@liau.ac.ir

Journal of Microbial World 2020, 13(3): 202-214.

DOI:

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزهم شماره سوم (پیاپی ۴۴) پاییز ۱۳۹۹
صفحات ۲۱۴-۲۰۲

Original Article

بهینه‌سازی تولید زیست‌توده باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در سطح نیمه‌صنعتی

مریم آرمند[۱]، محمد فایزی قاسمی[*۲]، محمدرضا فاضلی[۳]، میرساسان میرپور[۴]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران. [۲]دانشیار، دانشکده علوم، پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران. [۳]استاد، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۴]استادیار، دانشکده علوم، پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: باکتری‌های پروبیوتیک نقش بسیار مهمی در بهبود فلور طبیعی روده داشته و مانع رشد باکتری‌های مضر در دستگاه گوارش شده و از نظر اهداف دارویی و درمانی دارای اهمیت می‌باشند. هدف از این مطالعه بهینه‌سازی تولید زیست‌توده باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (*Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC53103) با استفاده از روش طراحی آزمون است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* استفاده شد. به‌منظور بهینه‌سازی از روش طراحی پلاکت-برمن استفاده گردید. تمام کشت های محیط پایه و بهینه‌شده در فرمانتور ۱۳۰۰ لیتری شرکت پارس پاد انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که منابع ملاس چغندرقند، گلوکز و کازئین بیشترین اثر را در تولید زیست‌توده *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* دارند. گلوکز با کازئین و ملاس چغندرقند اثر هم‌افزایی داشته و موجب افزایش تولید زیست‌توده می‌شوند. پس از بهینه‌سازی، محیط کشت دارای مقادیر ترکیبات زیر به ازای گرم در لیتر: گلوکز ۱۱۲/۵۰، ملاس چغندرقند ۵۶/۲۵، کازئین ۱۸/۷۵، عصاره مخمر ۱۸/۷۵، K_2HPO_4 ۱۳/۱۳، توین ۸۰ ۱/۸۸، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۳۷۵۰، $MnSO_4.4H_2O$ ۰/۰۷۵۰، $CaCl_2.2H_2O$ ۰/۱۸۷۵ و سایمتیکن ۱/۲۵ به‌منظور تولید بهترین زیست‌توده توسط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* مشخص گردید. میزان زیست‌توده بیشتر از دو برابر نسبت به شرایط محیط کشت پایه افزایش پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: با توجه به تولید زیست‌توده باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در سطح نیمه‌صنعتی درفرمانتور ۱۳۰۰ لیتری، امکان تولید صنعتی زیست‌توده *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* وجود خواهد داشت. همچنین کشت این باکتری به‌صورت صنعتی در شرایط کشت ناپیوسته تغذیه شونده و متداوم به‌عنوان یک پروبیوتیک تجاری پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: طراحی آزمون، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، طراحی پلاکت- برمن، بهینه‌سازی، پروبیوتیک.

دریافت مقاله: خردادماه ۱۳۹۹ پذیرش برای چاپ: شهریورماه ۱۳۹۹

مقدمه

استفاده از پروبیوتیک ها برای افزایش سلامتی و بهبود عملکرد دستگاه گوارش سابقه طولانی دارد (۱). همچنین افزودن پروبیوتیک ها به مواد غذایی تأثیرات مفیدی بر سلامت انسان از جمله کاهش کلسترول خون، بهبود عملکرد دستگاه گوارش، تقویت سیستم ایمنی بدن و کاهش خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ دارد. سه مکانیسم اصلی برای اثرات سودمند باکتری‌های پروبیوتیک در نظر گرفته‌شده است (۲). اولین مکانیسم این است که بعضی از پروبیوتیک ها می‌توانند پاتوژن های مقیم را

*) آدرس برای مکاتبه: لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ۰۱۳۴۲۲۳۹۰۴۲ پست الکترونیک: faezi@liau.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

به‌طور مستقیم یا از طریق تأثیر روی میکروبیوم بی‌آزار روده حذف کنند (۲ و ۳). دومین مکانیسم این است که برخی سویه‌های پروبیوتیک موجب افزایش مقاومت سطوح موکوسی با تغییر راه‌های پیام‌رسان مانند فاکتور مرکزی kB Nuclear (factor= kB) و یا از طریق مسیر وابسته به فعالیت میتوژنی پروتئین کیناز (Mitogen-activated protein kinase= MAPK) عمل می‌کنند (۴) که این فرایند موجب افزایش ترشح موکوس یا افزایش اتصال محکم سلول‌ها می‌شود (۵ و ۶). سوم اینکه بیشتر سویه‌های پروبیوتیک موجب تغییر پاسخ‌های ایمنی و اثرات موضعی و سیستماتیک می‌شوند. بسیاری از واکنش‌ها بین باکتری‌های پروبیوتیک و سلول‌های اپتلیال روده با ساختارهای ملکولی که تحت عنوان الگوهای ملکولی همراه شونده با میکروب‌ها (Microbe-associated molecular patterns= MAMPs) انجام می‌شود. این ملکول ها توسط گیرنده‌های اختصاصی مانند گیرنده شبیه تول (Toll-like receptors) شناسایی می‌شوند (۷ و ۸). *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* یکی از وسیع‌ترین سویه‌های پروبیوتیک مورداستفاده است. به علت داشتن خصوصیاتی مانند مقاومت به اسید و صفرا، ویژگی رشد خوب و ظرفیت مناسب اتصال به لایه اپیتلیال روده‌ای به‌عنوان یک باکتری مناسب با پتانسیل پروبیوتیکی است (۹ و ۱۰). این لاکتوباسیلوس توانایی بسیار بالایی در اتصال به سطوح مخاطی نسبت به سویه‌های محصولات لبنی مانند لاکتوباسیلوس رامنوسوس LC70 و سایر سویه‌های پروبیوتیک مانند *لاکتوباسیلوس جانسونی* (*Lactobacillus Johnsoni*) LJ1 و *لاکتوباسیلوس کازئی* (*Lactobacillus casei*) دارد. در مطالعات انسانی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG برای مدت‌زمان بیشتری نسبت به سویه‌های وابسته مانند *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LC 705 باقی می‌ماند (۱۰-۱۲). فناوری تحلیل فرآیند (Process Analytical Technology= PAT)، توسط سازمان غذا و داروی ایالات‌متحده (Food and drug administration= FDA) به‌عنوان مکانیسم طراحی، تجزیه‌وتحلیل کنترل فرایندهای تولید دارو با اندازه‌گیری پارامترهای بحرانی فرآیند (Critical Process Parameters= CPP) که از ویژگی‌های اصلی کیفیت هستند، توسعه‌یافته است. با تعریف و شناسایی پارامترهای بحرانی فرآیند و کنترل آن‌ها در محدوده تعریف‌شده، می‌توان محصولی یکنواخت و باکیفیت تولید و موجب کاهش هزینه‌ها و ضایعات شد. این فناوری در سه مرحله انجام می‌شود. مرحله اول طراحی است، در این مرحله واحد عملکردی طراحی و سپس بهینه‌سازی شده و تشخیص داده می‌شود. در این مرحله (Critical Quality Attributes= CQA) که در مرحله فرایند نقش دارند با پارامترهای نقاط بحرانی که روی CQA اثر می‌گذارند تشخیص داده می‌شوند. در مرحله دوم یعنی آنالیز، یک تجزیه‌وتحلیل مناسب برای تعیین CQA و CPP انجام و در انتها فاز کنترل طراحی شمای آن بر پایه فهم فرآیند است (۱۳ و ۱۴). طراحی پلاکت-برمن به‌عنوان یک روش مؤثر طراحی فاکتوریل به‌منظور غربالگری از میان فاکتورهای مهم زیادی با استفاده از حداقل آزمایش‌ها استفاده می‌گردد. این روش اجازه می‌دهد اهمیت پارامترها و تخمین خطاهای تصادفی تعیین گردد. این روش برای پروسه‌های بیولوژیک شامل مدل‌سازی فرایندهای تخمیری به‌طور گسترده استفاده‌شده است (۱۵-۱۷). در این تحقیق بهینه‌سازی فرآیند تخمیر با روش طراحی پلاکت-برمن با توجه به مراحل اول و دوم فناوری تحلیل فرآیند به منظور افزایش زیست‌توده سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ATCC53103 GG انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم و محیط کشت:

ویال لیوفیلیزه آغازگرکشت (Starter culture) *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG با کد SP1 و Lot Number: C161485A از شرکت زیست‌فناوری SACCO S.r.L (کادوراگو، ایتالیا) تهیه شد. ویال لیوفیلیزه باکتری در محیط کشت مایع MRS (De Man, Rogosa and Sharpe=MRS) در دمای ۳۷ درجه

سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. برای تهیه پیش کشت های اولیه قبل از تلقیح به فرمانتور ۱۰ میلی‌لیتر از کشت اولیه باکتری به دو بطری حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MRS تلقیح شد. بطری‌ها به مدت ۱۵ ساعت در درجه حرارت ۳۹ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور با ۱۱۰ دور در دقیقه گرما گذاری شد تا واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی (cfu/ml) به میزان 10^8 تا 10^9 برسد. در مرحله بعد ۴۰۰ میلی‌لیتر از پیش کشت به دست آمده به ۳۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه مایع MRS تلقیح شد. شرایط کشت مطابق مرحله قبل انجام شد. ۳۶۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت پیش کشت با واحد تشکیل‌دهنده کلنی به میزان (cfu/ml) 10^8 تا 10^9 به ۴۰ لیتر محیط کشت اولیه (پیش کشت) تولید توده زنده حاوی ترکیبات زیر به ازای گرم در لیتر: گلوکز ۲۰، عصاره مخمر ۲۰، پپتون حاصل از کازئین ۲۰، K_2HPO_4 ۲/۵، KH_2PO_4 ۰/۶ تلقیح شد. گرماگذاری در ۳۷ درجه سلسیوس در فرمانتور ۵۰۰ لیتری مدل FR500 شرکت پارس پاد با همزن ۱۰۰ دوردردقیقه ، میزان هوادهی ۳۰۰ V $V^{-1}min^{-1}$ و pH ۷ انجام‌شده و برای تلقیح در فرمانتور ۱۳۰۰ لیتری آماده شد.

تخمیر در فرمانتور تولید:

به‌منظور تولید در فرمانتور ۱۳۰۰ لیتری، ۴۰ لیتر از محیط پیش کشت آماده‌شده مرحله قبل به ۶۰۰ لیتر محیط کشت تولید در فرمانتور تلقیح شد. این محیط کشت حاوی ترکیبات زیر به ازای گرم در لیتر بود. گلوکز ۹۰، ملاس چغندرقند ۴۵، کازئین پپتون ۱۵، عصاره مخمر ۱۵، K_2HPO_4 ۱۰/۵، توین ۸۰ ۱/۵، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۳، $MnSO_4.4H_2O$ ۰/۰۶، $CaCl_2.2H_2O$ ۱۵/۰ و سایمتیکن(Simethicone) ۱. گرماگذاری در ۳۷ درجه سلسیوس در فرمانتور ۱۳۰۰ لیتری مدل FR ۱۳۰۰ شرکت پارس پاد با همزن ۱۰۰ دوردردقیقه میزان هوادهی ۳۰۰ V $V^{-1}min^{-1}$ و pH ۷ به مدت ۴۸ ساعت انجام پذیرفت.

اندازه‌گیری رشد و تخمین زیست‌توده و محاسبه گلوکز مصرفی:

به‌منظور اندازه‌گیری توده زنده در طول رشد از روش آلوارز (Alvarez) و همکاران (۲۰۱۰) استفاده گردید. میزان رشد با اندازه‌گیری دانسیته نوری در طول‌موج ۵۶۰ nm به کمک اسپکتروفوتومتر مدل UV/vis۲۱۰۰ شرکت یونکیو-آمریکا انجام شد. مقادیر جذب نوری به‌منظور تعیین وزن خشک متناسب با ۳۰ میلی‌لیتر نمونه‌های که در هر مرحله جمع‌آوری و در شرایط فریز شده و درخلا خشک شد، در نظر گرفته شد. به‌منظور تفسیر تولید توده زنده تولیدشده از یک مدل ریاضی به شرح ذیل استفاده شد. به‌منظور تأیید مدل آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام پذیرفت. در معادله شدت توده زنده تولیدشده لاکتوباسیلوس رامنوسوس براساس معادله درجه اول است:

$$rx = d[X]/dt = \mu [X]$$

که در آن r_x شدت تولید توده زنده است [X] غلظت توده زنده، t زمان و μ شدت رشد اختصاصی است (۱۸). میزان غلظت گلوکز با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatography= HPLC) با دستگاه کروماتوگرافی مایع مدل ۱۲۶۰ اجیلنت (Agilent 1260, USA) دارای محفظه تزریق شش راهه همراه با لوپ ۲۰ میکرولیتری مدل G1328C و آشکارساز مدل (Agilent G7162A, USA) انجام پذیرفت. ستون از نوع آمینکس (Aminex HPX-87) از شرکت بایو-راد (Bio-Rad) با ابعاد ۸/۷×۳۰۰ میلی‌متر استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از نمونه به دستگاه در هر مرحله تزریق شد. آب مقطر اسیدی شده (محلول اسیدسولفوریک ۳ میلی مولار) با شدت‌جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد. دمای ستون نیز در ۸۰ درجه سلسیوس جهت جداسازی تنظیم شد.

طراحی پلاکت- برمن به‌منظور بهینه‌سازی تولید:

در مراحل اولیه تولید زیست‌توده باکتری‌های پروبیوتیک تعیین فاکتورهای مهم در تولید و اثرات هرکدام از این فاکتورها دارای اهمیت است و استفاده از طراحی پلاکت-برمن در این زمینه بسیار کمک‌کننده است. مهم‌ترین ویژگی این روش این است که طراحی به شکل آرایه‌های متعامد انجام شد و اثر هر فاکتور به شکل دقیق بر میزان تولید، بدون در نظر گرفتن تداخل بین فاکتورها به دست می‌آید (۱۹). ترکیبات محیط کشت شامل گلوکز، ملاس چغندرقند، کازئین پپتون، عصاره مخمر، K_2HPO_4، توین ۸۰، $MgSO_4.7H_2O$، $MnSO_4.4H_2O$،

$CaCl_2.2H_2O$ وسایمتیکن در ۳ سطح و ۱۶ آزمون مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). به‌منظور بررسی اثر فاکتورهای محیط کشت و بهینه‌سازی سطوح آن‌ها در طراحی آزمون، ده فاکتور محیط کشت در سه سطح براساس طراحی پلاکت-برمن انتخاب شد. پس از بهینه‌سازی یک مرحله تخمیر در شرایط پیشنهادی توسط نرم‌افزار انجام پذیرفت.

تجزیه و تحلیل نتایج:

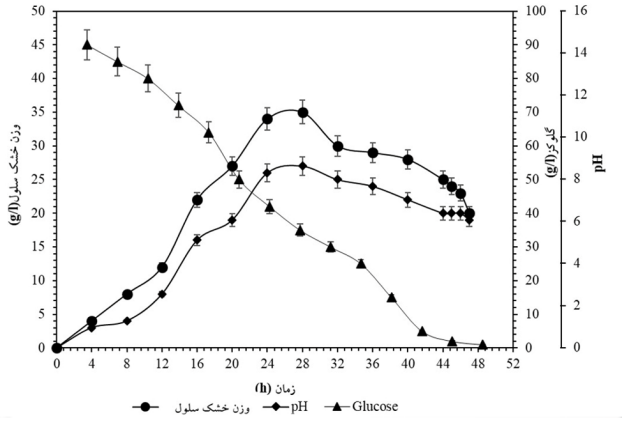
جهت بهینه‌سازی و طراحی آزمون با روش پلاکت-برمن از نرم افزار Design-Expert 12.0.3.3 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA) استفاده شد. تجزیه‌وتحلیل نتایج نیز با همین نرم‌افزار انجام پذیرفت. نتایج میانگین با انحراف معیار دو تکرار است.

یافته‌ها

کشت ناپیوسته در فرمانتور ۱۳۰۰ لیتری انجام پذیرفت و شکل ۱ منحنی تولید زیست‌توده، مصرف گلوکز و تغییرات pH برحسب زمان در شرایط کشت ناپیوسته توسط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* را در محیط کشت پایه را نشان می‌دهد. آنچنان که در شکل مشاهده می‌شود میزان زیست‌توده تولیدشده در محیط کشت پایه قبل از فرآیند بهینه سازی در ساعت ۳۰ فرآیند تخمیر به میزان ۳۵ گرم وزن خشک به ازای لیتر در pH ۷ رسید. نتایج آرایه استفاده‌شده در طراحی پلاکت-برمن با ۱۶ آزمایش به همراه کنترل که مقادیر فاکتورهای محیط کشت در سطح میانه بود در (جدول ۲) مشاهده می‌شود. شرایط تخمیر در دو فرمانتور ۱۳۰۰ لیتری مطابق شرایط ذکرشده برای هر آزمایش به‌طور یکسان انجام شد. همان‌طوری که در جدول مشاهده می‌شود، بیشینه تولید زیست‌توده در آزمایش دهم به میزان ۷۲/۳ گرم وزن خشک به ازای لیتر است. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها و اثرات فاکتورهای مؤثر محیط کشت در تولید زیست‌توده باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به کمک نرم‌افزار Design-Expert انجام و نتایج در شکل ۲ (الف) و (ب) به‌صورت شمای پارتو و طرح نیمه‌نرمال (Half-Normal Plot) نشان داده شده همانطورکه مشاهده می‌شود ملاس چغندرقند، گلوکز و کازئین بیشترین اثر را در تولید زیست‌توده باکتری پروبیوتیک دارند (p <0/05). نتایج آنالیز واریانس و درصد مشارکت همه فاکتورهای مؤثر در تولید زیست‌توده و سایر پارامترها در (جدول ۳) آمده است. همان‌طوری که در جدول

جدول ۱: سطوح فاکتورهای محیط کشت تولید زیست‌توده توسط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (برحسب گرم در لیتر).

فاکتورها	سطوح فاکتورها		
	سطح بالا (+۱)	سطح میانه (۰)	سطح پایین (-۱)
گلوکز	۱۸۰	۹۰	۴۵
ملاس چغندرقند	۹۰	۴۵	۲۲/۵
کازئین پپتون	۳۰	۱۵	۷/۵
عصاره مخمر	۳۰	۱۵	۷/۵
K_2HPO_4	۲۱	۱۰/۵	۵/۲۵
توین ۸۰	۳	۱/۵	۰/۷۵
$MgSO_4$	۰/۶	۰/۳	۰/۱۵
$MnSO_4$	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۰۳
$CaCl_2$	۰/۳	۰/۱۵	۰/۰۷۵
سایمتیکن	۲	۱	۰/۵



شکل ۱: منحنی تولید زیست‌توده، مصرف گلوکز و تغییرات pH برحسب زمان توسط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در محیط کشت پایه.

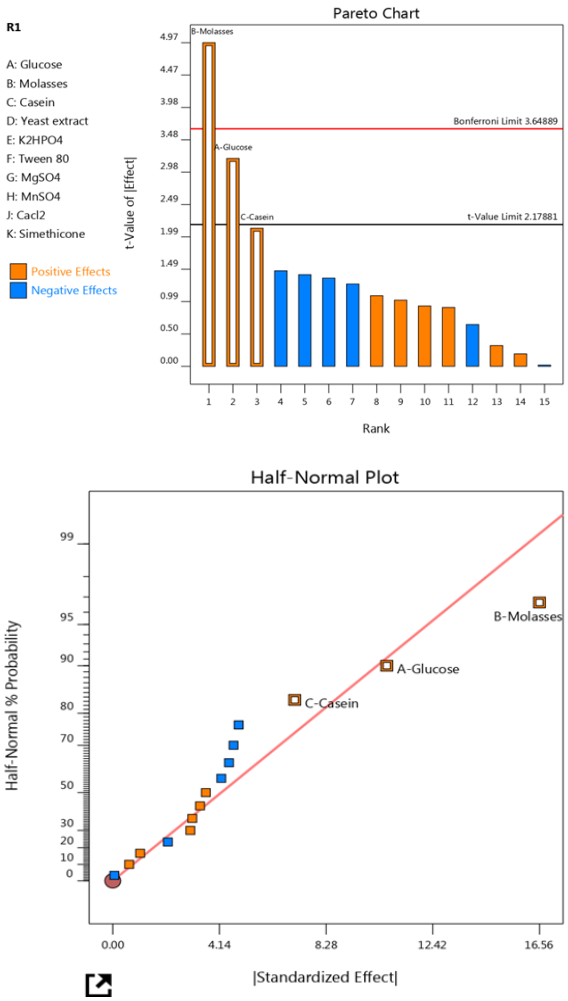
جدول ۴: سطوح پیشنهادی فاکتورهای محیط کشت توسط نرم‌افزار Design-Expert

متغیر	ترکیب	سطح پیشنهادی
A	گلوکز	۱۱۲/۵۰
B	ملاس چغندرقند	۵۶/۲۵
C	کازئین	۱۸/۷۵
D	عصاره مخمر	۱۸/۷۵
E	K_2HPO_4	۱۳/۱۳
F	توین ۸۰	۱/۸۸
G	$MgSO_4$	۰/۳۷۵۰
H	$MnSO_4$	۰/۰۷۵۰
J	$CaCl_2$	۰/۱۸۷۵
K	سایمتیکن	۱/۲۵

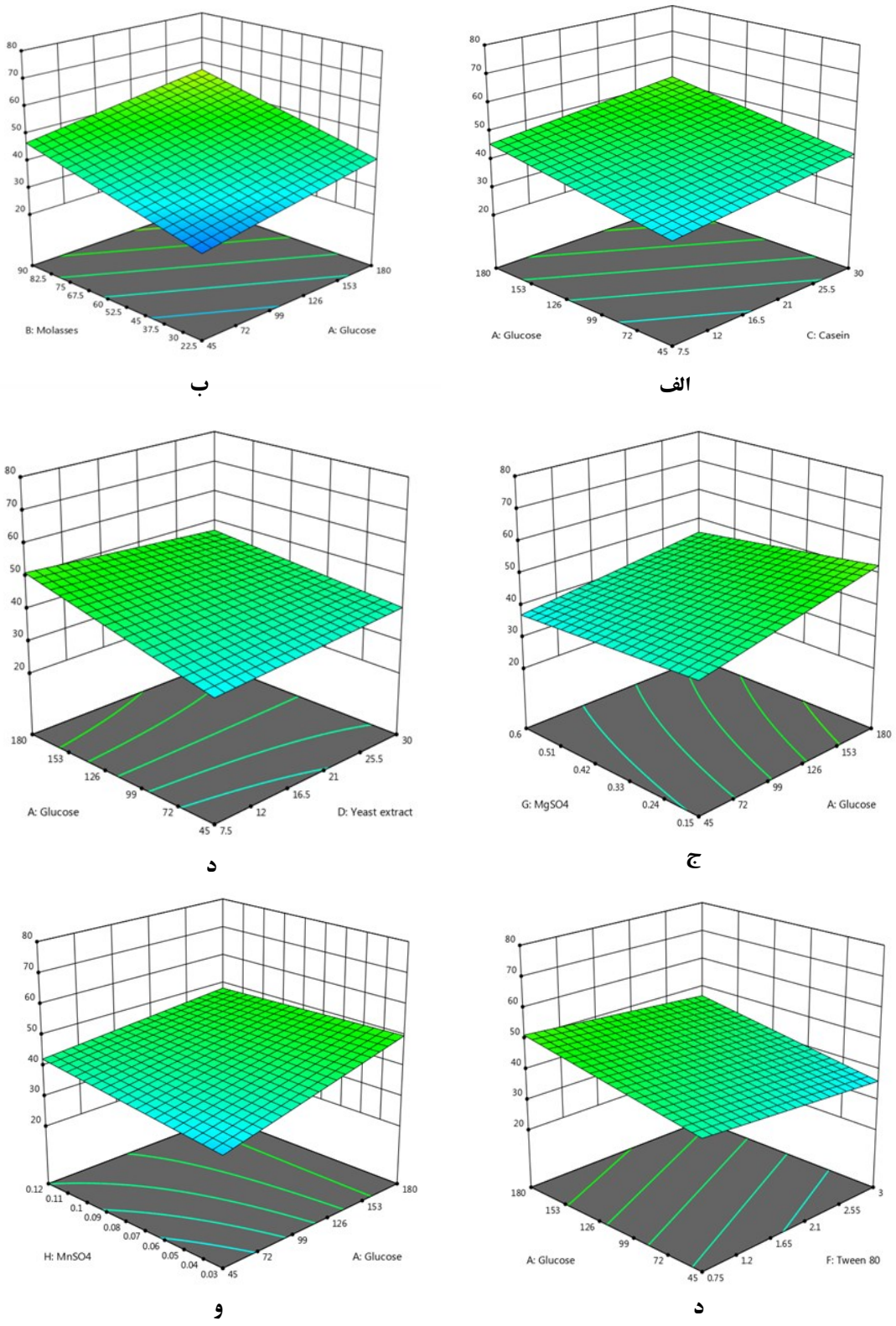
جدول ۲: طراحی آزمون‌ها به روش پلاکت-برمن به‌منظور افزایش زیست‌توده باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (مقادیر ستون پاسخ برحسب گرم در لیتر).

آزمایش	گلوکز	ملاس	کازئین	عصاره مخمر	K2HPO4	توین ۸۰	MgSO4	MnSO4	CaCl2	سایمتیکن	پاسخ
۱	۱۸۰	۹۰	۷/۵	۳۰	۵/۲۵	۰/۷۵	۰/۱۵	۰/۱۲	۰/۰۷۵	۲	۵۴/۵ ± ۰/۱۳
۲	۴۵	۲۲/۵	۷/۵	۳۰	۵/۲۵	۳	۰/۶	۰/۱۲	۰/۰۷۵	۲	۲۸/۵ ± ۰/۳۵
۳	۴۵	۲۲/۵	۷/۵	۷/۵	۵/۲۵	۰/۷۵	۰/۱۵	۰/۰۳	۰/۳	۲	۲۷/۳ ± ۰/۴۱
۴	۴۵	۹۰	۷/۵	۷/۵	۲۱	۳	۰/۱۵	۰/۱۲	۰/۰۷۵	۰/۵	۴۲/۵ ± ۰/۱۸
۵	۱۸۰	۲۲/۵	۳۰	۳۰	۵/۲۵	۰/۷۵	۰/۶	۰/۰۳	۰/۰۷۵	۰/۵	۳۷/۱ ± ۰/۲۲
۶	۴۵	۲۲/۵	۳۰	۷/۵	۲۱	۳	۰/۶	۰/۰۳	۰/۰۷۵	۲	۲۵/۱ ± ۰/۷۱
۷	۱۸۰	۹۰	۳۰	۳۰	۲۱	۳	۰/۶	۰/۱۲	۰/۳	۲	۵۸/۲ ± ۰/۴۷
۸	۴۵	۹۰	۳۰	۷/۵	۵/۲۵	۰/۷۵	۰/۶	۰/۱۲	۰/۳	۰/۵	۵۱/۲ ± ۰/۵۶
۹	۴۵	۹۰	۷/۵	۳۰	۲۱	۰/۷۵	۰/۶	۰/۰۳	۰/۳	۰/۵	۴۴/۱ ± ۰/۶۲
۱۰	۱۸۰	۹۰	۳۰	۷/۵	۲۱	۰/۷۵	۰/۱۵	۰/۰۳	۰/۰۷۵	۲	۷۲/۳ ± ۰/۴۸
۱۱	۱۸۰	۹۰	۷/۵	۷/۵	۵/۲۵	۳	۰/۶	۰/۰۳	۰/۳	۲	۵۲/۳ ± ۰/۳۹
۱۲	۱۸۰	۲۲/۵	۷/۵	۳۰	۲۱	۳	۰/۱۵	۰/۰۳	۰/۳	۰/۵	۳۸/۶ ± ۰/۳۹
۱۳	۴۵	۲۲/۵	۳۰	۳۰	۲۱	۰/۷۵	۰/۱۵	۰/۱۲	۰/۳	۲	۴۷/۶ ± ۰/۲۶
۱۴	۱۸۰	۲۲/۵	۷/۵	۷/۵	۲۱	۰/۷۵	۰/۶	۰/۱۲	۰/۰۷۵	۰/۵	۳۵/۳ ± ۰/۵۱
۱۵	۱۸۰	۲۲/۵	۳۰	۷/۵	۵/۲۵	۳	۰/۱۵	۰/۱۲	۰/۳	۰/۵	۴۵/۶ ± ۰/۵۷
۱۶	۴۵	۹۰	۳۰	۳۰	۵/۲۵	۳	۰/۱۵	۰/۰۳	۰/۰۷۵	۰/۵	۴۲/۵ ± ۰/۱۹
کنترل	۹۰	۴۵	۱۵	۱۵	۱۰/۵	۱/۵	۰/۳	۰/۰۶	۰/۱۵	۱	۳۷/۳ ± ۰/۳۱

مشاهده می‌شود، ملاس چغندرقند، گلوکز و کازئین به ترتیب بیشترین اثر را در تولید زیست توده *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به میزان ۴۸/۰۷، ۱۹/۸۳ و ۸/۷۴ درصد داشتند. از میان فاکتورها عصاره مخمر کمترین میزان تأثیر در تولید را داشت و می‌توان از سطح پایین آن به‌عنوان یکی از فاکتورهای محیط کشت استفاده کرد که ازنظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است. سایر فاکتورها مانند ترکیبات پایین آورنده کشش سطحی توین ۸۰ (۳/۵۶ درصد) و سایمتیکن (۲/۲۸ درصد) که در اصل ترکیب ضد اسید و نفخ بوده و همچنین دارای اثر کاربردی به‌عنوان ضد کف (Antifoam) در تولید و جداسازی ترکیبات دارویی در تخمیرهای میکروبی است، اثر مثبت در تولید زیست‌توده داشتند. از میان نمک‌های معدنی سولفات منیزیم (۴/۱۸ درصد) نیز بهترین اثر را در تولید زیست‌توده توسط این باکتری داشت.، میزان ارزش F به دست آمده ۷/۶۳ در این مدل نشان می‌دهد که مدل مورد تأیید است و (p <0/05) برای سه فاکتور، گلوکز، ملاس چغندرقند و کازئین ازنظر آماری معنی‌دار است. گلوکز به عنوان یکی از مهم‌ترین فاکتورها در تولید زیست‌توده سویه‌های پروبیوتیک است، به همین دلیل سطوح این قند با مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر در تولید زیست‌توده در نظر گرفته شد. همانطوریکه در شکل (۳ الف، ب) نشان داده‌شده است، گلوکز با کازئین و ملاس چغندرقند اثر هم‌افزایی داشته، افزایش غلظت قند گلوکز با افزایش غلظت



شکل ۲: شمای طرح پارتو (الف) و (ب) طرح نیمه نرمال Half-Normal plot اثر ترکیبات محیط کشت بر تولید زیست‌توده توسط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (p<0/05).

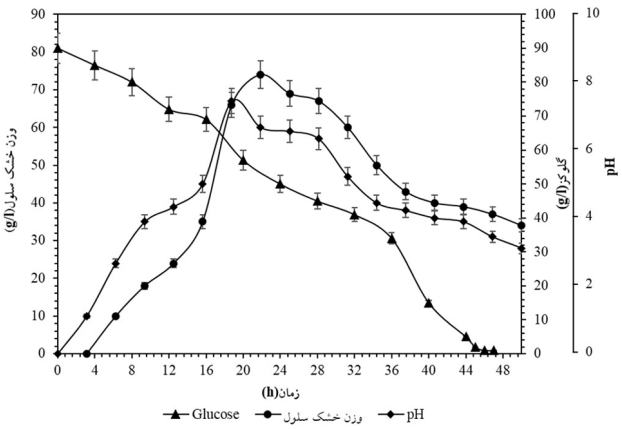


شکل ۳: پاسخ سطح سه‌بعدی قند گلوکز با مؤثرترین فاکتورها در تولید زیست‌توده *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*. الف: گلوکز با کازئین، ب) گلوکز با ملاس چغندرقند، ج) گلوکز با سولفات منیزیم، د) گلوکز با عصاره مخمر، ه) گلوکز با توین ۸۰ و) گلوکز با سولفات منگنز.

جدول ۳: آنالیز واریانس طراحی آزمایش‌ها تولید زیست‌توده توسط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (p <0/05).

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش-F F-value	ارزش -p p-value	درصد مشارکت هر فاکتور ٪
مدل	۲۰۹۸/۹۴	۹	۲۲/۲۳۳	۶۳/۷	۰/۰۱۱۲	
گلوکز	۴۵۲/۶۳	۱	۴۵۲/۶۳	۸۲/۱۴	۰/۰۰۸۵	۱۹/۸۳
ملاس	۱۰۹۷/۲۷	۱	۱۰۹۷/۲۷	۹۲/۳۵	۰/۰۰۱۰	۴۸/۰۷
کازئین	۱۹۹/۵۲	۱	۱۹۹/۵۲	۵۳/۶	۰/۰۴۳۲	۸/۷۴
K2HPO4-E	۳۸/۱۳	۱	۳۸/۱۳	۲۵/۱	۰/۳۰۶۶	۱/۶۷
F – تعیین ۸۰	۸۱/۴۵	۱	۸۱/۴۵	۶۷/۲	۰/۱۵۳۶	۳/۵۶
MgSO4 -G	۹۵/۵۵	۱	۹۵/۵۵	۱۳/۳	۰/۱۲۷۴	۴/۱۸
MnSO4-H	۳۶/۳۰	۱	۳۶/۳۰	۱۹/۱	۰/۳۱۷۵	۱/۵۹
Cacl2 -J	۴۵/۹۰	۱	۴۵/۹۰	۵۰/۱	۰/۲۶۶۲	۲/۰۱
Simethicone -K	۵۲/۲۰	۱	۵۲/۲۰	۷۱/۱	۰/۲۳۹۰	۲/۲۸

دو فاکتور دیگر موجب افزایش تولید زیست‌توده شده و این هم‌افزایی ازنظر آماری نیز معنی‌داراست. تولید زیست‌توده در حضور قند گلوکز با غلظت‌های بالاتر و سولفات منیزیم، عصاره مخمر، توین ۸۰ و سولفات منگنز با غلظت کمتر بیشتر می‌شود شکل (۳ ج تا و). این نتایج نیز ازنظر آماری معنی‌دار است. مطابق (جدول ۴) فرایند تخمیر در سطوح پیشنهادی فاکتورهای محیط کشت توسط نرم‌افزار در آزمایش تأییدی انجام شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده بیشینه تولید زیست‌توده به‌دست‌آمده در شرایط بهینه‌شده به میزان ۷۴/۳ گرم وزن خشک به ازای لیتر در ساعت ۲۲ فرایند تخمیر در pH ۷ رسید که بیشتر از دو برابر نسبت به شرایط محیط کشت پایه افزایش پیدا کرد (شکل ۴). نتیجه به‌دست‌آمده تجربی(experimental) با مقدار مورد انتظار (expected) در سطح ۹۵ درصد معنی‌دار



شکل ۴: منحنی تولید زیست‌توده، مصرف گلوکز و تغییرات pH برحسب زمان توسط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در محیط کشت بهینه.

بود که این نشان‌دهنده تایید نهایی شرایط بهینه سازی است. بر این اساس پس از بهینه‌سازی، محیط کشت به‌منظور تولید بهترین زیست‌توده به ترتیب دارای مقادیر ترکیبات زیر به ازای گرم در لیتر است: گلوکز ۱۱۲/۵۰، ملاس چغندرقند ۵۶/۲۶، کازئین ۱۸/۷۵، عصاره مخمر ۱۸/۷۵، K_2HPO_4 ۱۳/۱۳، توین ۸۰ ۱/۸۸، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۳۷۵۰، $MnSO_4.4H_2O$ ۰/۰۷۵۰، $CaCl_2.2H_2O$ ۰/۱۸۷۵ و سایمتیکن ۱/۲۵. از این سطوح ترکیبات می‌توان به جهت تولید در سطح صنعتی استفاده نمود.

بحث

امروزه استفاده از پروبیوتیک ها در مواد غذایی و نوشیدنی‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. محصولات تخمیری محیط مناسبی برای پروبیوتیک ها محسوب می‌شوند. میزان باکتری‌های پروبیوتیک در محصولات باید در حدی باشد که بقا و پایداری این باکتری‌ها در طول نگهداری محصول حفظ شود، تا اثرات مفیدی بر روی میزبان داشته باشد. در این تحقیق بهینه‌سازی فرایند تخمیر و تولید زیست‌توده سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG ATCC53103 با روش طراحی پلاکت-برمن انجام پذیرفت. استفاده از این روش به‌عنوان قسمتی از فناوری تحلیل فرآیند در نظر گرفته می‌شود. پس از تهیه پیش کشت ها، تخمیر در محیط کشت پایه و محیط‌های بهینه‌سازی در دو فرمانتور ۱۳۰۰ لیتری مدل پارس‌پاد شرکت زیست تخمیر انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان

تولید زیست‌توده باکتری پروبیوتیک را به میزان مؤثری افزایش داد. محققان مختلف درزمینهٔ افزایش تولید زیست‌توده باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط آزمایشگاهی کار کرده‌اند. پدرام و عطایی (Pedram & Ataei) (۲۰۱۴) بهینه‌سازی محیط تغییر شکل یافته GS را به‌منظور تولید سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (*Lactobacillus acidophilus*) انجام دادند. روش پاسخ تغییر سطح بر پایه مدل باکس–ویلسون به منظوربدست آوردن محیط کشت بهینه انجام پذیرفت. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که گلوکز، عصاره مخمر، KH_2PO_4 و K_2HPO_4 به ترتیب ۸/۷۵– ۵، ۳۹– ۳۶/۷۵، ۰/۲۱۲۵ – ۰/۱ و ۰/۷۰۷۵ –۰/۳۹۲۵ گرم به ازای لیتر ($p<0/05$) به‌عنوان بهترین ترکیبات محیط کشت جهت تولید زیست‌توده است. آزمایش‌های تأییدی نشان داد که محیط بهینه‌شده قابل‌مقایسه با محیط MRS در تولید زیست‌توده هست و ازنظر اقتصادی مقرون به‌صرفه‌تر است (۲۰). در این تحقیق نیز مشابه با نتایج به‌دست‌آمده پدرام و عطایی گلوکز به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین منابع در تولید زیست‌توده باکتری پروبیوتیک شناخته شد. اما وجود ملاس چغندرقند و کازئین پپتون نیاز باکتری را نسبت به عصاره مخمر بسیار کاهش داده است. به همین دلیل می‌توان از سطوح پایین غلظت عصاره مخمر به جهت کاهش قیمت محیط کشت به‌خصوص در سطوح صنعتی استفاده کرد. هاوانگ (Hwang) و همکاران (۲۰۱۲) بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت به‌منظور افزایش تولید زیست‌توده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) Pi650 را به کمک طراحی تاگوچی و باکس– بنکن انجام دادند. نتایج این تحقیق نشان داد وزن زیست‌توده در محیط ابتدایی تولید به میزان ۴/۳۱ گرم وزن خشک به ازای لیتر بود که به ترتیب با طراحی تاگوچی و روش باکس–بنکن به میزان ۷/۱۶ و ۸/۹۴ گرم وزن خشک به ازای لیتر رسید است. این محققین توانستند با استفاده از سه متغیر گلوکز، عصاره مخمر و کورن استیپ لیکور وزن توده زنده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را بیش از دو برابر افزایش دهند (۲۱). نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نیز ازنظر میزان افزایش تولید مشابه با تحقیق هاوانگ (Hwang) و همکاران (۲۰۱۲) بود.

این محققین در سطح آزمایشگاهی کار خود را انجام دادند و در این تحقیق شرایط تخمیر در فرمانتور نیمه‌صنعتی انجام پذیرفت و به همین دلیل میزان وزن خشک زیست‌توده به‌دست‌آمده به‌مراتب بیشتر بود. چانگ و لیئو (۲۰۱۳) (Chang & Liew) بهینه‌سازی محیط کشت را برای تولید زیست‌توده باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ATCC7469 انجام دادند. در تحقیقشان از روش تغییر پاسخ در سطح استفاده کردند و نتایج تحقیق نشان داد که شرایط رشد بهینه در محیط کشت برای رشد باکتری پروبیوتیک دارای گلوکز، عصاره مخمر و تریپتون ترتیب به میزان ۴/۴، ۶/۰ و ۶/۰ درصد وزنی به حجمی و تویین ۸۰ به ازای ۱/۱ میلی‌لیتر به ازای لیتر انجام می‌شود (۲۲). مشابه با نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نیز گلوکز به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین منابع جهت تولید زیست‌توده باکتری پروبیوتیک استفاده شد. برناردز (Bernárdez) و همکاران (۲۰۰۸) تولید تغلیظ شده کشت لاکتوباسیلوس کازئی CECT 4043 را در محیط بر پایه آب‌پنیر انجام دادند. درکشت ناپیوسته بیشینه غلظت زیست‌توده به میزان ۰/۳۳ گرم به ازای لیتر رسید. در شرایط کشت تغذیه شونده با ۱۰ در صد وزنی به حجمی گلوکز حاصل از ضایعات صدف انجام پذیرفت، میزان زیست‌توده به میزان ۱/۷ گرم به ازای لیتر رسید (۲۳). ازکاریاتسا (Ezkauriatza) و همکاران (۲۰۱۰) مقایسه تولید زیست‌توده باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس کازئی را در شرایط ناپیوسته، ناپیوسته تغذیه شونده و متداوم با استفاده از سوبسترای کشک شیر بز موردبررسی قرار دادند. در این تحقیق تولید زیست‌توده در شرایط کشت ناپیوسته تغذیه شونده و پیوسته به ترتیب با محصول رشد بیشتر به میزان ۰/۴۵ و ۰/۱۱ گرم به ازای لیتر بر ساعت بود (۲۴). در این تحقیق از ملاس چغندرقند به‌عنوان منبع ارزان قیمت استفاده شد که مشابه با تحقیقات انجام شده فوق استفاده موجب افزایش تولید زیست‌توده باکتری پروبیوتیک شد. مینگ (Ming) و همکاران (۲۰۱۶) کشت ناپیوسته تغذیه شونده به منظور افزایش زیست‌توده *لاکتوباسیلوس سالواریوس* (*Lactobacillus salvarius*) انجام دادند. تعداد سلول زنده در

شرایط ثابت با شدت تغذیه ۰/۰۵ لیتر بر ساعت ۸ برابر بیشتر از شرایط ثبت‌شده درکشت ناپیوسته بود (۲۵). کرزیوونوس و ابرهارد (Krzywonos & Eberhard) (2011) تولید زیست‌توده *لاکتو باسیلوس پلانتاروم* با استفاده از سوبستراهای ارزان‌قیمت شامل پوسته گندم غنی‌شده با گلوکز ۲۰ درصد و ملاس چغندرقند ۱۰ درصد در محیط کشت را انجام دادند و توانستند به دانسیته بالای سلولی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۱/۶×۱۰^{۶} cfu/ml برسند (۲۶). مشابه با این تحقیق، می‌توان نتیجه گرفت گلوکز و ملاس چغندرقند اثر خوبی در بالا بردن میزان تولید زیست‌توده باکتری‌های پروبیوتیک دارند .همچنین مشخص گردید که گلوکز با کازئین و ملاس چغندرقند اثر هم‌افزایی در تولید زیست توده دارند. خوشایند (Khoshayand) و همکاران (۲۰۱۱) بهینه‌سازی شرایط تخمیر شیر سویا را با استفاده از *لاکتوباسیوس کازئی* و روش پاسخ سطح انجام دادند. فاکتورهای که در این تحقیق بررسی گردید شامل دما، قند گلوکز، نیاسین، ریبوفلاوین، پریدوکسین، فولیک اسید و پانتوتنیک اسید بود. بررسی اولیه با طراحی پلاکت–برمن نشان داد در میان این فاکتورها دما، گلوکز و نیاسین اثر مهمی روی رشد *لاکتوباسیوس کازئی* دارند. در ادامه بهینه‌سازی با روش طراحی باکس–بنکن و پاسخ سطح انجام پذیرفت و بهترین سطوح فاکتورهای دما، قند گلوکز و نیاسین به ترتیب ۱۵/۷۷درجه سلسیوس، ۵/۲۳ و ۰/۶۳ گرم به ازای لیتر در محیط کشت بود. در تحقیق خوشایند و همکاران نیز گلوکز به‌عنوان بهترین منبع جهت تولید زیست‌توده *لاکتوباسیوس کازئی* معرفی شد (۱۹). ژانگ (Zhang) و همکاران (۲۰۱۷) بهینه‌سازی زیست‌توده *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* (*Lactobacillus bulgaricus*) به روش طراحی باکس–بنکن را انجام دادند. با بهینه سازی محیط کشت توانستند در محیط کشت حاوی گلوکز ، کازئین هیدرولیز شده و گلوتامیک اسید به ترتیب به مقادیر ۹/۵، ۱۵/۵ و ۰/۷ گرم به ازای لیتر تعداد سلول باکتری‌ها را به‌اندازه ۲/۹۵×۱۰^{۹} به ازای میلی‌لیتر رسید که نزدیک به مدل پیش‌بینی‌شده ۳/۰۰×۱۰^{۹} عدد به ازای میلی‌لیتر بود. این نشان‌دهنده این است که مدل بهینه سازی به‌خوبی عمل کرده است (۲۷). کوالهو (Coelho) و همکاران (۲۰۱۱) تولید اسیدلاکتیک را به کمک یک سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم که در محیط کشت حاوی ملاس چغندر به‌عنوان پایه انجام دادند. هفت ترکیب کورن استیپ لیکور، سیترات سدیم، سولفات منیزیم و سولفات منگنز، سیترات آمونیوم، فسفات پتاسیم و توین ۸۰ به محیط پایه حاوی ملاس چغندر اضافه کردند. نتایج نشان داد که کورن استیپ لیکور، فسفات پتاسیم و توین ۸۰ موجب افزایش تولید اسیدلاکتیک شدند (۲۸). غلظت این سه ترکیب به همراه ملاس چغندرقند با روش پاسخ سطح بهینه شد. پس از بهینه‌سازی بالاترین میزان اسیدلاکتیک به میزان ۹۴/۸ گرم به ازای لیتر هنگامی به دست آمد که غلظت‌های ملاس، کورن استیپ لیکور، فسفات پتاسیم و توین ۸۰ به ترتیب ۱۹۳/۵، ۳۷/۵۰، ۲/۶۵ و ۰/۸۳ گرم به ازای لیتر بود. امروزه استفاده از ضایعات کشاورزی مانند ملاس چغندرقند به منظور تولیدات از لاکتوباسیلوس ها استفاده می‌شود. بیتل و همکاران (۲۰۲۰) از این منابع ارزان قیمت به منظور بالا بردن تولید اسیدلاکتیک از *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (*Lactobacillus delbrueckii*) استفاده کردند. در این تحقیق به کمک کشت ناپیوسته تغذیه شونده توانستند مقادیر بالای اسیدلاکتیک از نوع D(-) به میزان ۱۶۲ گرم به ازای لیتر پس از ۴۸ ساعت تخمیر به دست آورند. همچنین نتیجه گرفتند که تولید بالای اسیدلاکتیک به کمک منابع ارزان‌قیمتی مانند ملاس و کورن استیپ لیکور ازنظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه بوده و در سطح صنعتی نیز قابل‌استفاده است (۲۹). نتایج حاصل این تحقیق نیز نشان داد که ملاس چغندرقند همراه با گلوکز، کازئین، توین ۸۰ و سایمتیکن نقش مؤثری در افزایش تولید زیست‌توده باکتری پروبیوتیک داشته و جهت تولید در سطح صنعتی نیز می‌توان از آن استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق افزایش تقریباً بیش از دو برابر زیست‌توده باکتری پروبیوتیک در شرایط محیط کشت بهینه‌شده نسبت به شرایط محیط کشت پایه به دست آمد. علاوه بر آن مهم‌ترین فاکتورهای تأثیرگذار در افزایش تولید نیز مشخص گردید.با استفاده از این نتایج می‌توان فرآیند تخمیر تولید سویه‌های پروبیوتیک

را در سطح صنعتی در فرمانتورهای با حجم‌های بالاتر انجام داد. به‌علاوه ادامه کار درزمینهٔ بالا بردن میزان تولید زیست توده در شرایط کشت های ناپیوسته تغذیه شونده و متداوم پیشنهاد می‌شود. ترکیب ملاس چغندرقند که به‌عنوان بهترین فاکتور تأثیرگذار در تولید زیست پروبیوتیک شناخته شد به‌عنوان یک منبع ارزان‌قیمت است و در تولیدات صنعتی پیشنهاد می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله پژوهشی تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از شرکت زیست تخمیر تهران واقع در پارک علم و فناوری پردیس تهران که امکانات لازم جهت اجرای این پژوهش را فراهم ساختند تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Emami Z, Khalilian E, Shahsanaei M. Isolation of *Lactobacillus plantarum* from different varieties of Iranian native olives and investigation of their antimicrobial activity against two pathogenic members of Entrobacteriaceae. Biological Journal of Microorganism. 2015;4(13).
2. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Genes and molecules of *lactobacilli* supporting probiotic action. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2008;72(4): 728-64.
3. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. Nature Reviews Microbiology. 2010;8(3):171-84.
4. Corr SC, Hill C, Gahan CG. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. Advances in food and nutrition research. 2009;56:1-15.
5. Krishna Rao R, Samak G. Protection and restitution of gut barrier by probiotics: nutritional and clinical implications. Current Nutrition & Food Science. 2013;9(2):99-107.
6. Mack D, Ahrné S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. Gut. 2003;52 (6):827-33.
7. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. Nature Reviews Immunology. 2010;10(2):131-44.
8. Wells JM, editor Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. Microbial cell factories; 2011: BioMed Central.
9. Doron S, Snydman DR, Gorbach SL. Lactobacillus GG: bacteriology and clinical applications. Gastroenterology Clinics. 2005;34(3):483-98.

10. Segers ME, Lebeer S, editors. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions. Microbial cell factories; 2014: BioMed Central.

11. Kankainen M, Paulin L, Tynkkynen S, von Ossowski I, Reunanen J, Partanen P, et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009;106 (40):17193-8.

12. Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 1999;26(2):137-42.

13. McGuire S. US department of agriculture and US department of health and human services, dietary guidelines for americans, 2010. Washington, DC: US government printing office, January 2011. Oxford University Press; 2011.

14. Rathore A, Bhambure R, Ghare V. Process analytical technology (PAT) for biopharmaceutical products. Analytical and bioanalytical chemistry. 2010;398(1):137-54.

15. He S, Wang H, Wu B, Zhou H, Zhu P, Yang R, et al. Response surface methodology optimization of fermentation conditions for rapid and efficient accumulation of macrolactin A by marine *Bacillus amyloliquefaciens* ESB-2. Molecules. 2013;18(1):408-17.

16. Lei H, Zhao H, Yu Z, Zhao M. Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles. Applied biochemistry and biotechnology. 2012;166(6):1562-74.

17. Salihu A, Bala M, Bala SM. Application of Plackett-Burman experimental design for lipase production by Aspergillus niger using shea butter cake. International Scholarly Research Notices. 2013.

18. Alvarez M, Aguirre-Ezkauriatza E, Ramírez-Medrano A, Rodríguez-Sánchez Á. Kinetic analysis and mathematical modeling of growth and lactic acid production of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* in milk whey. Journal of dairy science. 2010;93(12):5552-60.

19. Khoshayand F, Goodarzi S, Shahverdi AR, Khoshayand MR. Optimization of culture conditions for fermentation of soymilk using *Lactobacillus casei* by response surface methodology. Probiotics and antimicrobial proteins. 2011;3(3-4):159-67.

20. Pedram N, Ataei S. Optimization of a Modified GS Medium for a Probiotic Strain (*L. acidophilus* ATCC4356). 2014.

21. Hwang C-F, Chang J-H, Houng J-Y, Tsai C-C, Lin C-K, Tsen H-Y. Optimization of medium composition for improving biomass production of *Lactobacillus plantarum* Pi06 using the Taguchi array design and the Box-Behnken method. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2012;17(4):827-34.

22. Chang C, Liew S. Growth Medium Optimization for Biomass Production of a Probiotic Bacterium, *L. actobacillus rhamnosus* ATCC 746. Journal of Food Biochemistry. 2013;37 (5):536-

23. Bernárdez PF, Amado IR, Castro LP, Guerra NP. Production of a potentially probiotic culture of Lactobacillus casei subsp. casei CECT 4043 in whey. International Dairy Journal. 2008;18 (10-11):1057-65.

24. Aguirre-Ezkauriatza E, Aguilar-Yáñez J, Ramírez-Medrano A, Alvarez M. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. Bioresource Technology. 2010;101(8):2837-44.

25. Ming LC, Halim M, Abd Rahim R, Wan HY, Ariff AB. Strategies in fed-batch cultivation on the production performance of *Lactobacillus salivarius* I 24 viable cells. Food science and biotechnology. 2016;25(5):1393-8.

26. Krzywonos M, Eberhard T. High density process to cultivate *Lactobacillus plantarum* biomass using wheat stillage and sugar beet molasses. Electronic Journal of Biotechnology. 2011;14(2):6-.

27. Zhang B, Shu G, Bao C, Cao J, Tan Y. Optimization of Culture Medium for *Lactobacillus bulgaricus* using Box-Behnken Design. Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology. 2017;21(1):3-10.

28. Coelho L, De Lima C, Rodovalho C, Bernardo M, Contiero J. Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 2011;28(1):27-36.

29. Beitel SM, Coelho LF, Contiero J. Efficient Conversion of Agroindustrial Waste into D (-) Lactic Acid by *Lactobacillus delbrueckii* Using Fed-Batch Fermentation. BioMed Research International.;2020.