تولید باکتریوسین در فرآیند غیر مداوم تخمیر ضایعات لبنی توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 و *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه **لاکتیس** BB12

صابر امیری[۱]، رضا رضائی مکرم[۲*]، محمود صوتی خیابانی[۳]، محمود رضازاد باری[۴]، محمد علیزاده خالد آباد[۵]

۱- دکترای تخصصی میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
٤- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۵- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۵/۱٤)

چکیده

هدف پژوهش حاضر بررسی عوامل موثر بر فرآیند تخمیر در تولید باکتریوسین توسط دو باکتری پروبیوتیک تجاری با استفاده از ضایعات کارخانجات لبنی به عنوان محیط کشت می‌باشد. از این رو اثر متغیرهای مستقل شامل: دمای گرمخانه گذاری (۳۰، ۳٤ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد)، pH اولیه (۵، ٦ و ۷)، مدت زمان گرمخانه گذاری (۱۲، ۳۰ و ٤۸ ساعت)، غلظت عصاره مخمر (صفر، ۲ و ٤ درصد)، نوع باکتری پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 و *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB12) و نوع محیط کشت (آب پنیر و پرمیات شیر) استفاده از طرح پایه کاملاً تصادفی به صورت آرایش فاکتوریل دو سطحی، بررسی شد. نتایج نشان داد که دمای و زمان گرمخانه گذازی و همچنین نوع محیط کشت بر میزان باکتریوسین تولید اثر معنی دار داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین دما، غلظت عصاره مخمر، نوع محیط کشت و نوع کشت باکتری‌ها اثر معنی داری بر میزان زیست توده داشت ($p<۰/۰۵$). pH اولیه و نوع محیط کشت بر مقدار پروتئین کل اثر معنی دار داشت ($p<۰/۰۵$). بر اساس نتایج دمای گرمخانه گذاری، مدت زمان گرمخانه گذاری، غلظت عصاره مخمر، نوع محیط کشت و نوع باکتری پروبیوتیک بر اسیدیته قابل تیتراسیون تأثیر معنی دار داشتند ($p<۰/۰۵$). مقادیر فعالیت باکتریوسین، زیست توده، پروتئین کل و اسیدیته قابل تیتراسیون به ترتیب در محدوده ۱۰۰۰ AU/mL تا۵۰۰۰، ۰/۸۰ g/L تا ۸/٦۷ mg/L ۱۰۷/۷۵ تا ۳۵۱/۹۲ و ۰/۲۵ g/L تا ۱/٤۱ متغیر بود. به طور کلی نتایج نشان داد که آب پنیر و باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 به ترتیب محیط کشت و باکتری مناسب جهت تولید باکتریوسین بودند.

کلید واژگان: باکتریوسین، ضایعات لبنی، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5، *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB12، تخمیر غیرمداوم

*مسئول مکاتبات: rmokarram@tabrizu.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-27]

۱- مقدمه

باکتریوسین‌ها گروهی از پپتیدهای زیست فعال خارج سلولی مترشحه توسط باکتری‌ها هستند که در ریبوزوم سنتز شده و فعالیت ضد میکروبی علیه دیگر باکتری‌ها دارند. این پپتیدهای کوچک مقاوم به حرارت ویژگی‌های بیوشیمیایی متغیری از نظر وزن مولکولی، مکانیسم عمل و طیف فعالیت داشته و بسیاری از آن‌ها در محدوده نانومولار فعال می‌باشند [۱، ۲ و ۳]. تولید *ex situ*، که شامل افزودن باکتریوسین‌های خالص و نیمه خالص به عنوان نگهدارنده غذایی و یا استفاده از یک محصول قبلاً تخمیر شده توسط یک یا چند گونه LAB تولید کننده باکتریوسین، به عنوان افزودنی در مواد غذایی یکی از راه‌های تولید این مواد ضد میکروبی است. در این روش، باکتریوسین‌ها پس از کشت گونه تولید کننده در سوبسترای با درجه خوراکی می‌تواند به عنوان ماده تغلیظ شده، تا حدی خالص یا خالص، که به عنوان مواد نگهدارنده از نقطه نظر قوانین و مقررات به تأیید برسد، به صورت افزودنی به مواد غذایی اضافه شود [۲، ٤ و ٥]. عامل محدود کننده عمده در استفاده از باکتریوسین‌ها به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی بازده پایین تولید آن‌ها در طی فرآوری غذا است. بنابراین، مواد غذایی حاوی باکتریوسین‌ها، به عنوان ترکیبات ضد میکروبی نگهدارنده، گران قیمت هستند [٦]. رشد آغازگرهای تولید کننده باکتریوسین در محیطی مانند شیر، شیر پس چرخ، دکستروز و ...، رویکردی برای استفاده از این ترکیبات است [۲ و ۷].

آب پنیر محصول جانبی عمده صنعت تولید پنیر (۸۵-۹۵ درصد از حجم شیر) است، که شامل مایع شفاف مایل به سبز به دست آمده از شیر پس از رسوب کازئین است. مواد مغذی مهم در آب پنیر لاکتوز (۵-٤/۵ درصد W/V)، پروتئین‌های محلول (۰/٦- ۰/۸ درصد W/V) و ویتامین‌های گروه B است [۷ و ۸]. سالانه مقادیر زیادی آب پنیر تولید می‌گردد زیرا حدوداً به ازای یک کیلوگرم پنیر تولیدی، ۹ کیلوگرم آب پنیر به دست می‌آید. پرمیات محصول جانبی مهم حاصل از فرآیند اولترافیلتیراسیون شیر در صنعت پنیرسازی است که حاوی لاکتوز به عنوان اجزای عمده، علاوه بر آب، ویتامین‌های محلول و املاح شیر است. این محصول جانبی در حدود ۸۰ درصد لاکتوز اولیه از شیر فیلتر شده را حفظ کرده است [۹]. اگر چه پرمیات و آب پنیر زیست تخریب پذیر هستند، ولی انتشار آن در محیط زیست به دلیل بالا بودن نیاز بیوشیمیایی (بیولوژیکی) به اکسیژن آن (٤۰،۰۰۰-٤۸،۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) و همچنین اکسیژن مورد نیاز شیمیایی آن (۸۰،۰۰۰-۹٥،۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) به طور قابل توجهی به آلودگی محیط زیست منجر می‌شود [۸ ، ۱۰، ۱۱ و ۱۲]. اغلب دفع مؤثر نیاز به پیش تیمار گسترده و در نتیجه منجر به افزایش هزینه‌های عملیاتی در کارخانه لبنی می‌گردد. یکی راه نویدبخش برای استفاده مستقیم از لاکتوز مبتنی بر آب پنیر و پرمیات در تولید فرآورده‌های زیستی و یا به عبارت بهتر در فرآیندهای بیوتکنولوژیکی است [۸، ۱۳ و ١٤].

کلادرا اولیویرا و همکاران در سال ۲۰۰٤، برای بهینه سازی تولید باکتریوسین‌های *باسیلوس فرمیس* P40 از طرح آماری فاکتوریل همراه با بهینه سازی عددی استفاده کردند. تولید باکتریوسین ابتدا در ضایعات مختلف مانند پودر پَر، باگاس انگور، فیبر باقیمانده سویا و آب پنیر به عنوان محیط کشت مورد آزمایش قرار گرفت. در ادامه آب پنیر به عنوان محیط کشت انتخاب شد و اثر سه متغیر (دما، pH اولیه و غلظت آب پنیر) مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری نتایج نشان داد که در محدوده مورد مطالعه، سه متغیر دارای اثر قابل توجهی در تولید باکتریوسین بودند. حداکثر تولید باکتریوسین در pH اولیه بین ٦/۵ و ۷/۵ و درجه حرارت بین ۲٦ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت آب پنیر ۷۰ گرم در لیتر بود [۱۵].

گوئرا و همکاران در سال ۲۰۰۱، توانایی *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیر گونه لاکتیس CECT 539 و *پدیوکوکوس اسیدی-لاکتیسی* NRRL B-5627 را در تولید باکتریوسین در آب پنیر رقیق و غلیظ به صورت تخمیر ناپیوسته مورد بررسی قرار دادند. اگر چه آب پنیر باعث رشد و تولید باکتریوسین توسط دو سویه شد، ولی هم زیست توده و هم تولید باکتریوسین کمتر از میزان به دست آمده در MRS براث بود [١٦]. کومار و همکاران در سال ۲۰۱۲، توانایی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* LA-1 را برای تولید باکتریوسین با استفاده از محصولات جانبی صنعتی، مانند آب پنیر، به عنوان مکمل در محیط رشد، مطالعه کردند. آب پنیر به عنوان تنها منبع کربن به همراه دیگر اجزای به جای مواد مغذی گران قیمت مانند

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-27]

MRS برای تولید اقتصادی باکتریوسین مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق نشان داد که استفاده از آب پنیر به عنوان جایگزینی مناسب برای محیط کشت گران قیمت مانند MRS است و برای کاهش هزینه در صنعت برای تولید محصولات متابولیت بیولوژیکی نوین امیدوار کننده می‌باشد [۹]. ابوعامر در سال ۲۰۱۱، تحقیقی را با هدف بررسی اثر شرایط رشد بر حداکثر فعالیت تولید باکتریوسین‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* AA11 انجام داد. عملکرد باکتریوسین در محیط M17 براث غنی شده با لاکتوز در مقایسه با سایر منابع کربن حداقل ٤ برابر بیشتر گردید. منبع نیتروژن آلی بهینه برای تولید باکتریوسین عصاره مخمر (٤ درصد) بود [۱۷]. آوونتس و همکاران در سال ۲۰۰٤، رشد، متابولیسم و تولید باکتریوسین-های هفت سویه لاکتوباسیلوس از جمله پنج سویه پروبیوتیک تجاری را در طول تخمیر در محیط کشت MRS و محیط کشت شیر در pH ثابت ٦/٥ بررسی کردند. سویه‌های مورد مطالعه عبارتند از، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ACC، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* IBB 801، *لاکتوباسیلوس کازئی* Imunitas، *لاکتوباسیلوس کازئی* YIT 9029، *لاکتوباسیلوس گاسری* K7، *لاکتوباسیلوس جانسونی* LA1 و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG، اگر چه گونه‌های مخلوط *لاکتوباسیلوس کازئی* نسبت به سویه‌های مخلوط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* سطوح بالاتر سلول را در محیط MRSتولید کردند، ولی میزان باکتریوسین قابل تیتر برای گونه‌های مخلوط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بالاتر بود [۱۸]. هالامی و چاندراشکار در سال ۲۰۰۵، قابلیت‌های ایزوله بومی، *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی* C20 را برای تولید مقادیر قابل سنجش پدیوسین C20 در پرمیات آب پنیر مورد مطالعه قرار دادند. بهینه سازی پرمیات آب پنیر همراه با عصاره مخمر ۲ درصد موجب رشد سلول ۳/٥ برابر در گردید و فعالیت پدیوسین C20 AU/mL ۱۵۰×۱۰^{۳} شد که معادل مقدار به دست آمده با رشد در محیط کشت MRS براث تجاری بود [۱۹].

هزینه منبع کربن برای رشد میکروب‌ها و تولید باکتریوسین و همچنین روش‌های خالص سازی باکتریوسین، عواملی هستند که به شدت بر قیمت تجاری باکتریوسین‌ها مؤثر بوده و تا حد زیادی کاربرد آن‌ها در مقیاس صنعتی در صنایع غذایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین استفاده از منابع کربن ارزان قیمت، به ویژه آن‌های که از فرآیندهای صنعتی یا کشاورزی تولید می-شود، می‌تواند راهی برای کاهش هزینه‌های تولید باکتریوسین و همچنین سایر متابولیت‌های میکروبی فراهم کند و زمینه کاربرد گسترده آن‌ها در صنایع غذایی را ایجاد می‌نماید [٦ و ۲۰]. از این رو هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر فاکتورهای محیطی مهم و مؤثر در تولید متابولیت زیست فعال یعنی باکتریوسین (که متابولیت متناسب با رشد است) توسط کشت‌های خالص دو جنس پروبیوتیک پُرکاربرد درصنایع غذایی یعنی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* در محیط‌های کشت آب پنیر و پرمیات شیر است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

کشت‌های باکتریایی: گونه‌های باکتریایی مورد استفاده در پژوهش حاضر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 و *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB12 محصول شرکت کریستن هانسن (Christian Hansen, DK-2970 Hørsholm, Denmark) از شرکت پیشگامان پخش صدیق، نمایندگی شرکت Chr. Hansen در ایران، خریداری شد. همچنین باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* ATCC 19113، به عنوان گونه نشانگر حساس به باکتریوسین، از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. آب پنیر و پرمیات شیر از کارخانجات لبنیات واقع در ارومیه تهیه شد. محیط‌های کشت میکروبی پودری به شرح ذیل که از نمایندگی شرکت‌های تولید کننده در ایران خریداری خواهد شد، RCA، MRS براث و آگار، Tryptic Soy Broth، BHI و پپتون واتر (شرکت Merck، آلمان). آب دیونیزه (شرکت زلال، کرج، ایران) و سایر مواد شیمیایی آزمایشگاهی (آهن (III) کلرید، کربنات سدیم، سولفات مس (پنج آبه)، پتاسیم تارتارات، هیدروکسید سدیم، اسید هیدروکلریک، اتانول، متانول، Merck، آلمان) مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- آماده سازی محیط کشت

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-27]

هر دو محیط کشت آب پنیر و پرمیات شیر به شرح زیر جهت کشت آماده سازی شد. پس از تنظیم pH ٤/٥ با اسید هیدروکلراید ٥ نرمال، در دمای ١٢١ درجه سانتی‌گراد به مدت ١٥ دقیقه حرارت داده شد تا پروتئین‌ها دناتوره گردند. سپس رسوب حاصله با استفاده از سانتریفیوژ (g ١٢٠٠٠ به مدت ١٥ دقیقه) جدا گردید. سوپرناتانت در pH مورد مطالعه تنظیم شده و در ١٢١ درجه سانتی گراد به مدت ١٥ دقیقه استریل گردیده و به عنوان محیط کشت استفاده شد [١٦].

٢-٢-٢- آماده سازی مایه تلقیح

برای این منظور پودر شیر بدون چربی تجاری در آب مقطر با غلظت ١٢ گرم در١٠٠ میلی لیتر آب مقطر حل و به مدت ١٥ دقیقه در دمای ١٢١ درجه سانتی‌گراد استریل شد. سپس ٢/٥ گرم از سلول‌های باکتریایی آماده استفاده تولید شده به روش خشک کردن انجمادی در ١٠٠ میلی لیتر محلول فوق حل گردید [٢١].

٢-٢-٣- تلقیح و کشت ناپیوسته

مایه تلقیح باکتری‌های مورد مطالعه مطابق طرح آماری به میزان ٣ ٪ محیط کشت اضافه گردید. کشت ناپیوسته در ارلن مایر ٥٠ میلی لیتر حاوی ٢٥ میلی لیتر از محیط کشت در دمای مورد مطالعه و در زمان مورد مطالعه بر حسب ساعت انجام شد [١٦].

٢-٢-٤- اندازه‌گیری زیست توده

برآورد زیست توده باکتری‌ها (g/L) با اندازه گیری OD_{600} (چگالی نوری در ٦٠٠ نانومتر) با استفاده از اسپکتروفتومتر تک پرتو اندازه‌گیری شد. اسپکتروفوتومتر با محلول نرمال سالین ٠/٨٥٪ به عنوان نمونه مرجع تنظیم می شود. OD_{600} نمونه ها، اندازه گیری شده و منحنی کالیبراسیون OD_{600} در مقابل زیست توده (g/L) به شرح ذیل رسم گردید. سلول های باکتری‌های پروبیوتیک از محیط کشت تخمیری با استفاده از سانتریفوژ جدا شده و دو بار با استفاده محلول نرمال سالین ٠/٨٥ ٪ شستشو داده شد. سپس پلت به دست آمده با استفاده از آون خشک شده و وزن گردید. در انتها یک رابطه خطی بین OD_{600}و زیست توده (g/L) به دست آمد و برای تخمین زیست توده مورد استفاده قرار گرفت [٢٢].

٢-٢-٥- سنجش فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین

تیتر باکتریوسین‌های به روش رقت معیار تعیین شد. برای این منظور مایع رویی با روش رقیق سازی متوالی دو مرتبه‌ای رقیق شده و فعالیت هر رقت با روش انتشار در آگار، مشخص شد. مطابق روشAgar well diffusion method با استفاده از باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* ATCC 19113 به عنوان باکتری نشانگر انجام گردید. ابتدا سلول‌ها توسط سانتریفوژ در ١٢،٠٠٠ g مدت ٣٠ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد جدا و مایع رویی بدون سلول با هیدروکسید سدیم ٥ مولار (pH ٦/٥) خنثی شده و با استفاده از فیلتر با اندازه منافذ ٠/٢٢ میکرومتر استریل گردید. سپس ١٥ میلی لیتر از محیط کشت BHI آگارحاوی 10^{7} CFU/ml از باکتری پاتوژن نشانگر در یک پلیت استریل ریخته و پس از جامد شدن، چاهک‌هایی به قطر ٦ میلی متر در شرایط استریل ایجاد شد. در ادامه، ٥٠ میکرولیتر از رقت های مایع رویی در هر چاهک ریخته شد. پلیت‌ها قبل از انکوبه شدن، در ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢ ساعت نگهداری گردیدند تا نفوذ کلی مایع رویی صورت گیرد، و سپس در انکوباتور در ٣٧ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری شد. فعالیت ضد باکتریایی با اندازه گیری قطر مناطق مهار (میلی متر) در اطراف چاهک‌ها مورد بررسی قرار گرفت. تیتر باکتریوسین به صورت واحدهای مطلق (AU) در هر میلی لیتر به عنوان بالاترین رقت متقابل مهار رشد سویه شاخص بیان گردید [٢٣، ٢٤ و ٢٥].

٢-٢-٦- اندازه‌گیری محتوای پروتئین کل

غلظت کل پروتئین با استفاده از روش لوری تعیین گردید، در ١ میلی لیتر از نمونه، ١ میلی لیتر از معرف A، مخلوط مساوی از: محلول در حدود ٢٠٪ کربنات سدیم به آرامی در حال که تکان دادن به محلول تارتارات سولفات مس اضافه شد تا غلظت نهایی مشخص ٠/١ درصد سولفات مس (پنج آبه)، ٠/٢١ درصد پتاسیم تارتارات، ١٠٪ کربنات سدیم، سود (٠/٨٠ نرمال)، SDS (١٠ درصد) و آب مقطر، اضافه و اجازه داده - شد تا به مدت ١٠ دقیقه در دمای اتاق (٢٠ درجه سانتی گراد) به صورت ایستا قرار گیرد. سپس، ٠/٥ میلی لیتر از معرف B (یک قسمت معرف Folin-Ciocalteu فنل با ٥ قسمت آب مقطر مخلوط) اضافه و بلافاصله مخلوط گردید. پس از ٣٠ دقیقه، جذب با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-vis در طول موج ٧٥٠ نانومتر خوانده شد [٢٣ و ٩].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-27]

۲-۲-۷ اندازه گیری اسیدیته قابل تیتراسیون

برای این منظور تیتراسیون با استفاده از محلول ۰/۱ مولار NaOHانجام شد و به صورت درصد از اسید لاکتیک بیان گردید [۲۶].

۲-۳- طرح و تحلیل آماری

مطالعه از نوع تحلیلی بود و با استفاده از طرح پایه کاملاً تصادفی به صورت آرایش فاکتوریل دو سطحی، اثر pH اولیه (۵، ۶ و ۷)، دمای تخمیر (۳۰، ۳۴ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد)، زمان گرمخانه گذاری (۱۲ تا ۴۸ ساعت)، غلظت عصاره مخمر (صفر، ۲ و ٤ درصد)، نوع باکتری پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 و *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB12) و نوع محیط کشت (آب پنیر و پرمیات شیر) بررسی شد. بررسی اثر معنی‌داری فاکتورها و بر هم‌کنش‌های آن‌ها با استفاده از توزیع فیشر به روش تجزیه واریانس در سطح ۰/۰۵ $\alpha \leq$ مورد ارزیابی قرار گرفت. طرح و تحلیل آماری و همچنین رسم نمودارها با نرم افزار Design Expert v10.0.4.0 (Stat-Ease Int. Co., Minneapolis, MN, USA) انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اثر متغیرهای مستقل بر تولید زیست توده

شکل ۱ اثرات پارامترهای مورد بررسی بر روی زیست توده *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 و *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* زیرگونه *لاکتیس* BB12 را در طول تخمیر نشان می‌دهد. با توجه به نتایج، دما، غلظت عصاره مخمر، نوع محیط کشت و نوع کشت باکتری ها اثر معنی داری بر میزان زیست توده داشت ($p<۰/۰۵$). شایان ذکر است که اثر متقابل pH اولیه با دما و نوع باکتری پروبیوتیک بر میزان زیست توده تولید موثر بود ($p<۰/۰۵$). زیست توده هر دو باکتری پروبیوتیک با افزایش غلظت عصاره مخمر افزایش یافت (شکل ۱- a). گوئرا و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که رشد *لاکتوکوکوس لاکتیس* به طور عمده توسط منبع ازت مورد استفاده تحت تأثیر قرار گرفت [۱۶]. افزایش درجه حرارت از ۳۰ درجه سانتی-گراد تا ۳۸ درجه سانتی‌گراد موجب افزایش زیست توده BB12 و LA5 شد (شکل ۱- b). همانطور که در شکل نشان داده شده است (شکل ۱- c)، در pH بالاتر از ۵، زیست توده با افزایش دمای افزایش می‌یابد. با این وجود، در pH ۵، افزایش دما تاثیری بر زیست توده ندارد. اگر چه با افزایش pH از ۵ تا ۷، زیست توده در آب پنیر ثابت بود، در پرمیات شیر افزایش یافت. علاوه بر این، شکل نشان می‌دهد که در pH بین ۵ تا ۵/۵۷، زیست توده در آب پنیر بالاتر از پرمیات شیر بود. با این حال، در محدوده pH ۵/۷۵ تا ۷، زیست توده در پرمیات شیر بالاتر از آب پنیر بود. اگر چه زیست توده BB12 در آب پنیر بالاتر از آن در پرمیات شیر بود، میزان زیست توده LA5 هیچ تغییری در آب پنیر و پرمیات شیر نداشت (شکل ۱ - d). یکی از عوامل مهم که بر بقای سویه های باکتری پروبیوتیک در مواد غذایی تأثیر می گذارد، pH است، بطوری که بقاء در pH های پایین، محدود است [۲۷]. کاهش در زنده مانی *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* در پرمیات به دلیل محتوای لاکتوز بالاتر پرمیات نسبت به آب پنیر است که در اثر فرآیند تخمیر باعث افزایش اسیدیته و کاهش بیشتر pH نسبت به آب پنیر می گردد. مرحمتی زاده و همکاران در سال ۲۰۱۲، در مطالعه خود در مورد تاثیر پرمیات بر رشد و زنده ماندن *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در تولید نوشیدنی های غذایی پروبیوتیک، به نتایج مشابه دست یافتند. آنها گزارش کردند اثر ضد باکتری و مهار کننده pH پایین برای *B بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* قوی تر از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* است و به نظر می رسد که در طول زمان ذخیره سازی و فرآیند افزایش تخمیر، کاهش pH موجب کاهش رشد *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* می شود [۲۸]. در تحقیقی که جایالایتا و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام دادند، نتایج مشابه بود و مقاومت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در محیط معده بیشتر از سایر گونه ها از جمله *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* گزارش شد [۲۹]. پروبیوتیک ها اغلب زنده مانی ضعیفی محصولات لبنی تخمیری نشان می‌دهد، کاهش زنده مانی باکتری های پروبیوتیک و بقای ضعیف آن در طی زمان نگهداری و نیز کاهش در اثر آسیب‌های ناشی از افزایش اسیدی توسط محققان گزارش شده است [۳۰، ۳۱ و ۳۲ و ۳۳].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-27]

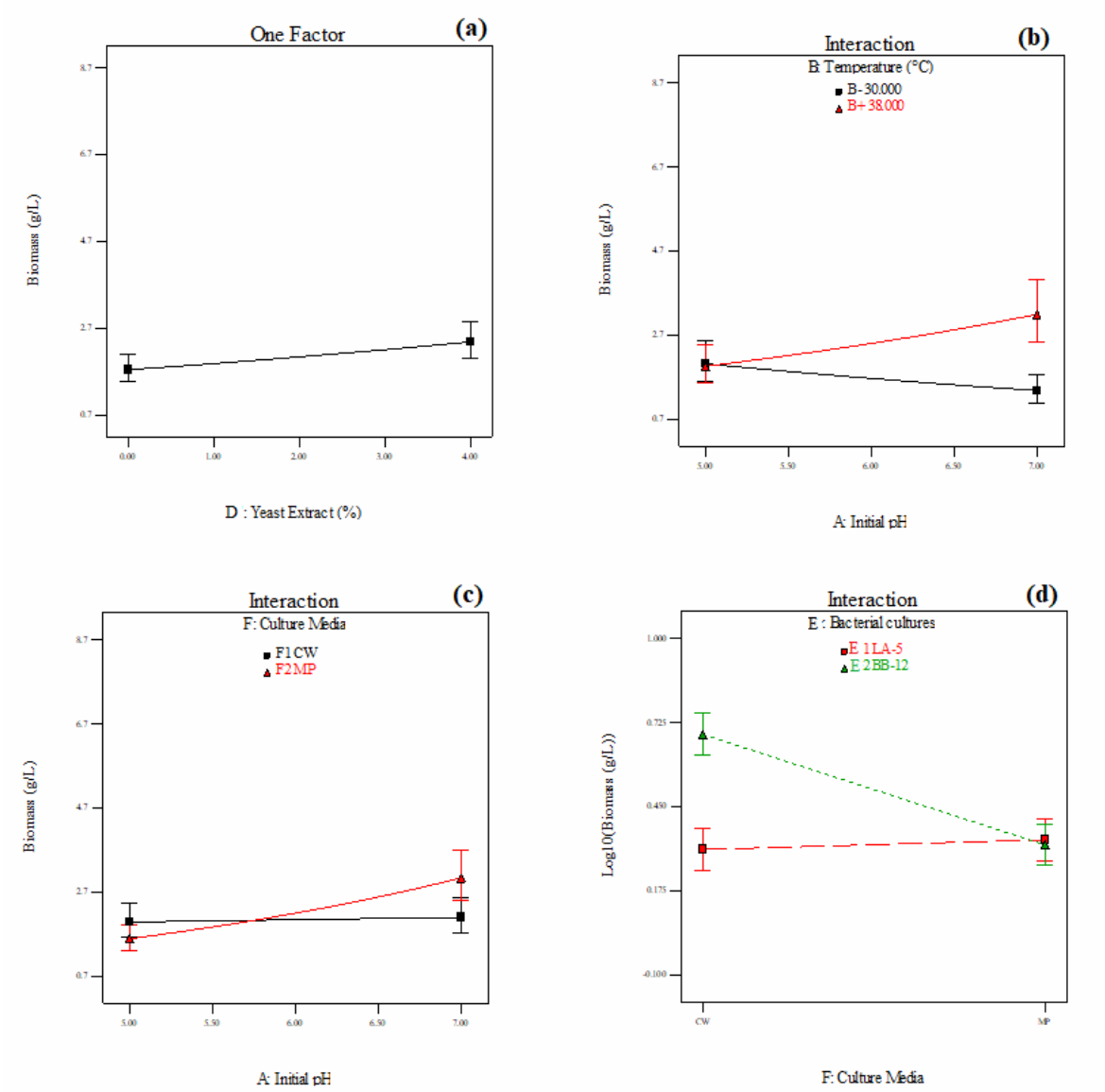

Fig 1 Effect of the studied factors on the biomass producion by LA5 and BB12

۳-۲- اثر متغیرهای مستقل بر تولید باکتریوسین

بر اساس نتایج، دمای و زمان گرمخانه گذاری و همچنین نوع محیط کشت بر میزان باکتریوسین تولید اثر معنی دار داشت ($p<۰/۰۵$). همانطور که در شکل ۲- a مشاهده می‌شود رابطه مستقیم بین دمای گرمخانه گذاری و میزان باکتریوسین تولید وجود دراد و با افزایش دمای گرمخانه گذاری میزان باکتریوسن تولیدی نیز افزایش می یابد. ولی میزان باکتریوسن تولیدی با مدت زمان گرمخانه گذاری رابطه عکس دارد، به طوری که میزان تولید باکتریوسین پس از ۱۲ ساعت گرمخانه گذاری، بیشتر از میزان آن پس از ٤٨ ساعت گرمخانه گذاری بود. میزان تولید باکتریوسین با افزایش غلظت عصاره مخمر از صفر درصد به ٤ درصد افزایش یافت (شکل ۲- b). مطابق با شکل ۲- c، میزان باکتریوسین تولیدی با افزایش دما در محیط کشت پرمیات شیر ثابت بود ولی در محیط کشت آب پنیر افزایش یافت. همچنین همانطور که در شکل ۲- d نشان داده شده است، مقدار باکتریوسین تولیدی توسط BB12 با افزایش غلظت عصاره مخمر ثابت بود ولی میزان تولید آن توسط LA5 با افزایش غلظت عصاره مخمر افزایش یافت. باکتریوسین بوسیله عوامل فیزیکی و شیمیایی مانند درجه حرارت رشد، زمان گرمخانه گذاری، pH و ترکیب شیمیایی محیط کشت تحت تأثیر قرار می‌گیرد. درجه حرارت و زمان گرمخانه گذاری مطلوب از مؤثرترین عوامل در تولید باکتریوسین برای هر گونه تعیین شده است. انواع و مقادیر مختلف منابع کربن، نیتروژن آلی و نمک‌های معدنی نقش مهمی در ترشح باکتریوسین ایفا می‌کنند. تأثیر شرایط فرآیند بر روی تولید و فعالیت باکتریوسین مهم بوده و نیاز به بهینه شدن

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-27]

دارد محققان قبلی اختلاف بین دمای مطلوب انکوباسیون برای رشد و تولید باکتریوسین را نشان دادند [۱۷ و ۲۰]. کومار و همکاران، ۲۰۱۲ گزارش دادند که دمای ۳۵ درجه سانتی گراد برای تولید باکتریوسین توسط *لاکتوباسیلوس کازئی* LA-1 و *زیرگونه های میکروکوکوس* GO5 مطلوب بود. اما تفاوت در دمای مطلوب برای ارگانیسم های تولید نیسین گزارش شده است [۹]. به عنوان متابولیت های اولیه، باکتریوسین ها، تولید شده در فاز لگاریتمی، در پایان این فاز یا در آغاز فاز ثابت، حداکثر می شوند. بنابراین، حداکثر فعالیت باکتریوسین ها معمولا در فاصله زمانی ۱۰ تا ۱۲ ساعت تخمیر مشاهده می شود و پس از آن کاهش می یابد [۱۴]. بر اساس مطالعه قبلی که آب پنیر را بعنوان یک محیط کشت جایگزین برای تولید باکتریوسین ها استفاده کردند، غنی سازی آن با عصاره مخمر ضروری است [۲۰]. از آنجا که عصاره مخمر میزان زیادی از آمینو اسیدهای آزاد و پپتیدهای کوتاه را فراهم می کند و رشد باکتری را افزایش می دهد [۱۷]. تیرومورگان و همکاران. (۲۰۱۵) توصیف کرد که غلظت عصاره مخمر یکی از عوامل مهم تولید باکتریوسین است و غلظت بالای عصاره مخمر برای تولید باکتریوسین مناسب است [۳۴].

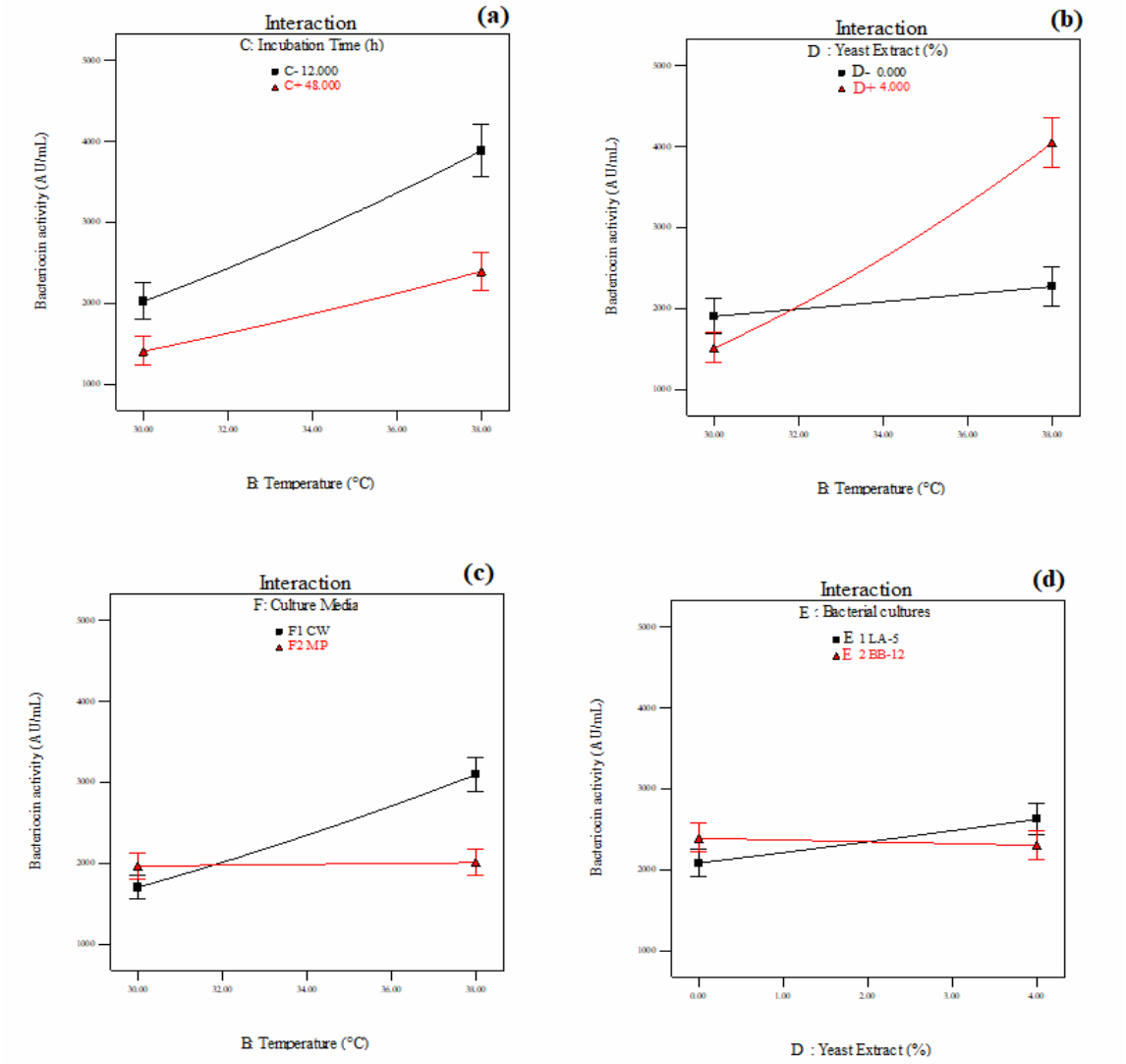

Fig 2 Effect of the studied factors on the bacteriosins production by LA5 and BB12

۳-۳- اثر متغیرهای مستقل بر محتوای پروتئین کل

بر اساس نتایج به دست آمده و مطابق شکل (۳)، pH اولیه و نوع محیط کشت بر مقدار پروتئین کل اثر معنی دار داشت ($p<۰/۰۵$)، بطوری که با افزایش pH از ۵ به ۷، مقدار پروتئین کل افزایش می یابد (شکل ۳- a و b). همچنین بر اساس نتایج اثر متقابل pH اولیه و دمای گرمخانه گذاری، pH اولیه و زمان گرمخانه گذاری، pH اولیه و نوع محیط کشت بر میزان پروتئین کل معنی دار بود ($p<۰/۰۵$)، که در شکل ۳- a، b و

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-27]

c مشخص است. با افزایش pH اولیه و افزایش دما مقدار تولید پروتئین افزایش می یابد که این افزایش در دمای ۳۸ درجه سانتی گراد بیشتر از ۳۰ درجه سانتی گراد بود (شکل ۳- a). با افزایش مدت زمان تخمیر مقدار پروتئین کل افزایش می یابد ولی میزان آن پس از ۱۲ ساعت بیشتر از ٤٨ ساعت بود (شکل ۳- b). با فزایش pH اولیه مقدار پروتئین کل در آب پنیر افزایش می یابد ولی در پرمیات شیر مقدار آن ثابت باقی ماند. در pH اولیه ۵ تا ٦ مقدار پروتئین میزان پروتئین کل در پرمیات شیر بیشتر از آب پنیر بود. با افزایش pH، میزان پروتئین کل در محیط کشت آب پنیر بیشتر از محیط کشت پرمیات بود که با نتایج سایر محققان مطابقت دارد. شایان ذکر است اثر متقابل غلظت عصاره مخمر با نوع محیط کشت بر میزان پروتئین کل معنی دار بود ($p<۰/۰۵$) (شکل ۳- d). بر اساس نتیجه مطالعه مک سو و شتی در سال ۲۰۰۵ بالاترین محتوای پروتئین پس از ١٦ ساعت از زمان کشت و کمترین محتوای پروتئین پس از ٤٨ ساعت از زمان کشت مشاهده شد. این محققین اظهار کردند مقدار پروتئین افزایش یافته پس از ١٦ ساعت با افزایش فعالیت آنزیمی همراه بود که در نتیجه افزایش سنتز آنزیم توضیح داده می شود. افزایش رشد پروبیوتیک‌های مورد استفاده در اثر افزایش میزان منبع نیتروژن، ناشی از عصاره مخمر و پروتئین‌های موجود در آب پنیر (پروتئین های عمده در آب پنیر، بتا لاکتوگلوبولین و α-لاکتوآلبومین به همراه باقیمانده β-کازئین است) منجر به فعالیت بالای پروتئینازهای غیر اختصاصی و در نتیجه افزایش پروتئین محلول می شود [۳۵]. مادوریرا و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند، نوع مایه تلقیح باکتریایی بر محتوای پروتئین تأثیر معنی دار گذاشت. علاوه بر این، نتایج آنها اثر تفاوت معنی دار در طول زمان ذخیره سازی را نیز نشان داد [۳٦]. مطابق یافته های ویرتانن و همکاران در سال ۲۰۰٦، در طول فرآیند تخمیر، پروتئین های شیر توسط پروتئاز های خارج سلولی باکتری های اسید لاکتیک هیدرولیز شده و در نتیجه محتوای پروتئین کل افزایش می یابد. نتایج آنها نشان داد که مقدار اسیدهای آمینه آزاد، آزاد شده در طول تخمیر بستگی به نوع باکتری دارد [۳۷].

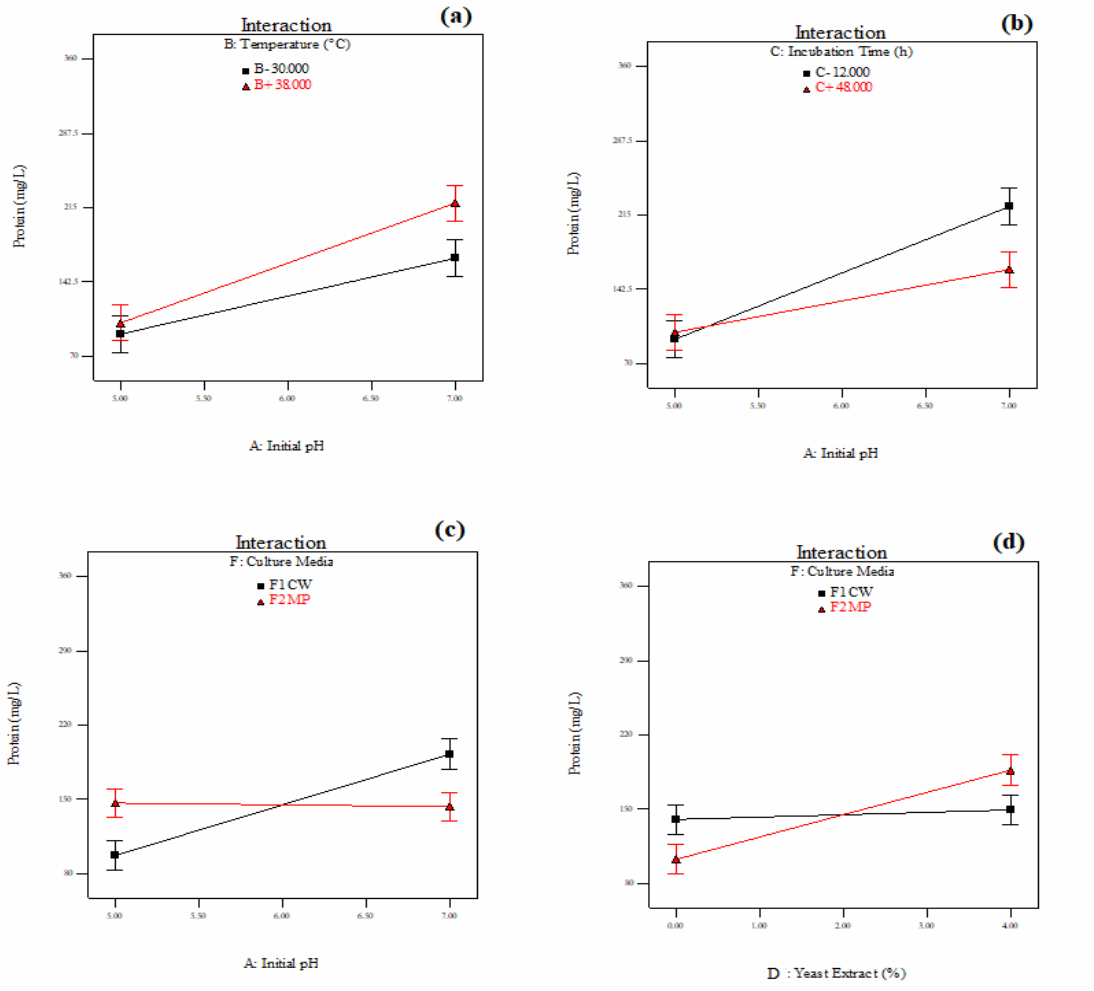

Fig 3 Effect of the studied factors on the total protein content of cultivation media

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-27]

۳-٤- اثر متغیرهای مستقل بر اسیدیته قابل تیتراسیون

بر اساس نتایج دمای گرمخانه گذاری، مدت زمان گرمخانه گذاری، غلظت عصاره مخمر، نوع محیط کشت و نوع باکتری پروبیوتیک بر اسیدیته قابل تیتراسیون تأثیر معنی دار داشتند ($p<۰/۰۵$). شایان ذکر است بر اساس نتایج، اثر متقابل دما و زمان گرمخانه گذاری، دمای گرمخانه گذاری و نوع محیط کشت و نیز دمای گرمخانه گذاری و نوع باکتری پروبیوتیک از نظر آماری معنی دار بود ($p<۰/۰۵$). افزایش اسیدیته پارامتری است که نشان دهنده عملکرد تخمیر یک کشت میکروبی است [۱۵]. مطابق شکل ٤- الف و ب با افزایش دما و زمان گرمخانه گذاری و نیز غلظت عصاره مخمر، اسیدیته قابل تیتراسیون افزایش می‌یابد. میزان افزایش اسیدیته قابل تیتراسیون در محیط کشت آب پنیر بیشتر از پرمیات بود. به دلیل وجود منابع نیتروژنی زیاد در آب پنیر، میزان رشد و فعالیت باکتری‌ها بیشتر بوده و در نتیجه موجب افزایش اسیدیته قابل تیتراسیون شدند. نتایج مشابهی توسط پیریرا و همکاران در سال ۲۰۱۵ که بر روی تولید نوشیدنی تخمیری با تلقیح دانه های کفیر و پروبیوتیک های تجاری کنسانتره پروتئین آب پنیر مایع و پرمیات های مطالعه کرده بودند، گزارش شده است. ایشان بیان کردند در نوشیدنی های تخمیری با پرمیات اولترافیلتراسیون تغلیظ شده، دارای اسیدیته بسیار کمتری نسبت به کنسانتره پروتئین مایع آب پنیر هستند. اسیدیته قابل تیتراسیون *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در مقایسه با *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بیشتر بود. زیرا *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* اسید استیک و اسید لاکتیک را در نسبت مولی ۳: ۲ تولید می‌نماید ولی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* هموفرمنتاتیو بوده و فقط اسید لاکتیک تولید می‌کند [۳۳].

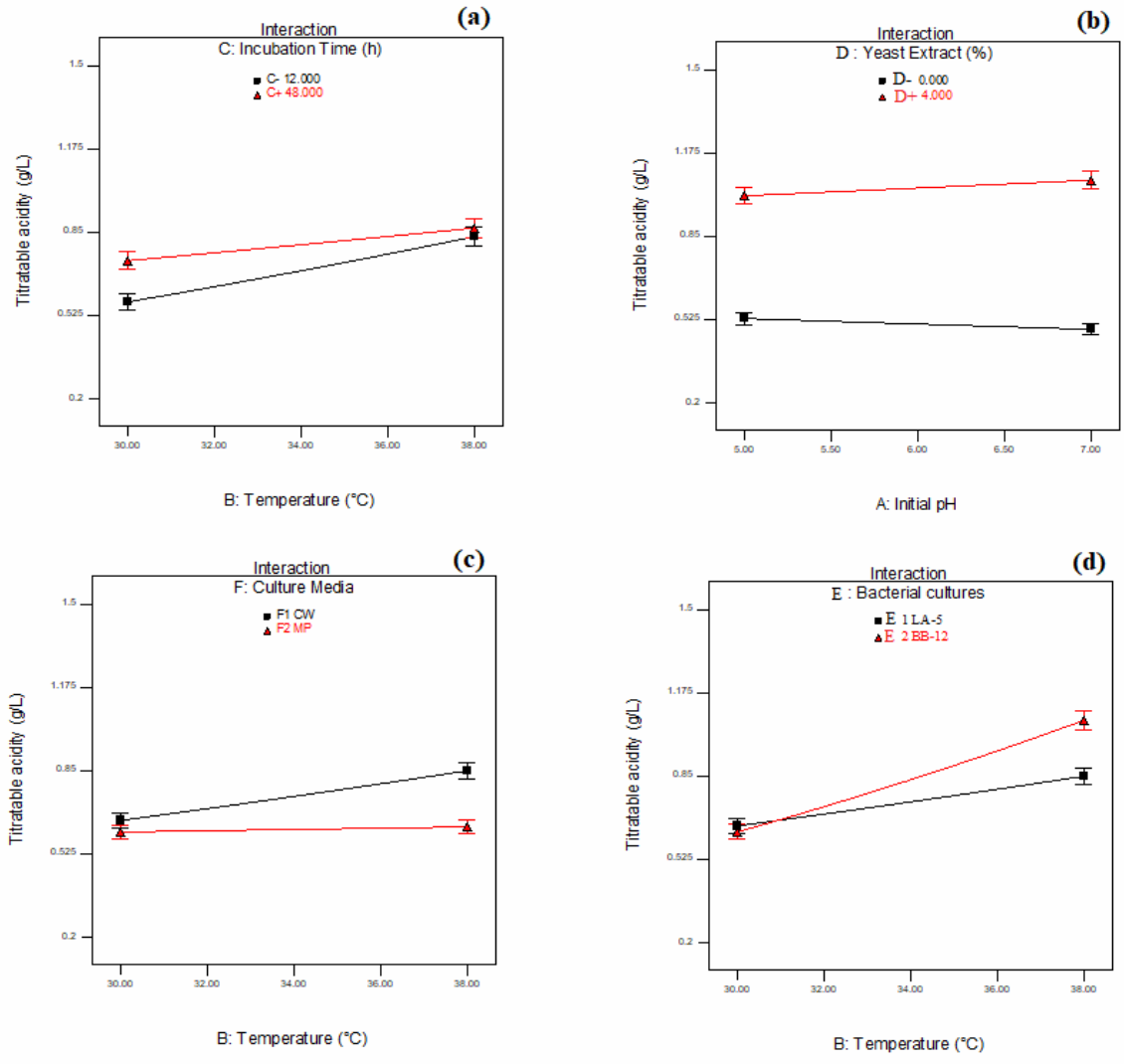

Fig 4 Effects of the studied factors on titratable acidity of cultivation media

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-27]

۳-۵- بهینه سازی عددی

جهت پیدا کردن شرایط بهینه تولید باکتریوسین از روش بهینه سازی عددی و به دست آوردن تابع مطلوبیت استفاده گردید. برای این منظور بیشینه مقدار باکتریوسین و پروتئین کل و همچنین کمینه مقدار اسیدیته قابل تیتراسیون در نظر گرفته شد. شرایط بهینه به دست آمده جهت تولید باکتریوسین عبارت از pH اولیه حدود ۷، دمای گرمخانه گذاری ۳۸ درجه سانتی گراد، زمان گرمخانه گذاری ۱۲ ساعت، غلظت عصاره مخمر ٤ درصد، محیط کشت آب پنیر و باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* شد، که دارای مطلوبیت ۰/۸٦ بود.

٤- نتیجه گیری

باکتریوسین ها، پپتیدهای کوچک تولیدی توسط باکتری ها هستند که امروزه به عنوان نگهدارنده طبیعی به طور گسترده در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می گیرند. با توجه به اهمیت تولید باکتریوسین ها و کاهش هزینه های تولید آن ها استفاده از ضایعات کارخانجات لبنی به عنوان محیط کشت پایه و بررسی اثر فاکتورهای موثر بر فرآیند تخمیر ضروری به نظر می رسد. در این راستا اثر دمای گرمخانه گذاری (۳۰، ۳٤ و ۳۸ درجه سانتی گراد)، pH اولیه (۵، ٦ و ۷)، مدت زمان گرمخانه گذاری (۱۲ تا ٤۸ ساعت)، غلظت عصاره مخمر (صفر، ۲ و ٤ درصد)، نوع باکتری پروبیوتیک و نوع محیط کشت (آب پنیر و پرمیات شیر) در تولید باکتریوسین بررسی شد. نتایج نشان داد که دمای و زمان گرمخانه گذازی و همچنین نوع محیط کشت مهمترین فاکتورهای موثر بر میزان باکتریوسین تولیدی بود. مقادیر فعالیت باکتریوسین، زیست توده، پروتئین کل و اسیدیته قابل تیتراسیون به ترتیب در محدوده ۱۰۰۰ AU/mL تا۵۰۰۰، ۰/۸۰ g/L تا ۸/٦۷ mg/L، ۱۰۷/۷۵ تا ۳۵۱/۹۲ و ۰/۲۵ g/L تا ۱/٤۱ متغیر بود. در این مطالعه رابطه بین رشد و بیوسنتز باکتریوسین نشان داده شد. سینتیک تولیدم تابولیت اولیه باکتریوسین در پایان مرحله رشد نمایی دارای بیشترین مقدار بود و سپس در طول فاز ثابت کاهش می‌یابد. هم رشد میکروبی و هم تولید باکتریوسین توسط اسید لاکتیک و افزایش اسیدیته مهار شد. به طور کلی نتایج نشان داد که آب پنیر و باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 به ترتیب محیط کشت و باکتری مناسب جهت تولید باکتریوسین بودند.

۵- قدردانی

نویسندگان لازم می دانند از دانشگاه تبریز به دلیل حمایت مالی در انجام این پروژه کمال قدردانی را داشته باشند (شماره ۳۹/۱۸۵۳/د، تاریخ ۱۳۹٦/۰۱/۱۰).

٦- منابع

[1] Caballero B, Finglas P and Toldrá F, 2015. Encyclopedia of Food and Health. Academic Press.
[2] McNeil B, Archer D, Giavasis I and Harvey L (Eds.). 2013. Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals. Elsevier. 14, 355-363.
[3] Fuquay JW, Fox PF and McSweeney PL, 2011. Encyclopedia of dairy sciences. Academic Press.
[4] Bhat R and Paliyath G, 2012. Progress in food preservation. John Wiley & Sons.
[5] Lacroix C, (Ed.). 2010. Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation. Elsevier. XXIII-XXIV.
[6] Bertrand N, Fliss I and Lacroix C, 2001. High nisin-Z production during repeated-cycle batch cultures in supplemented whey permeate using immobilized Lactococcus lactis UL719. International dairy journal 11(11), 953-960.
[7] Zeuthen P and Bøgh-Sørensen L, (Eds.). 2003. Food preservation techniques. Boca Raton Boston New York Washington, DC, 17-18.
[8] Amado IR, Vázquez JA, Pastrana L and Teixeira JA, 2016. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus. Food chemistry 198, 54-61.
[9] Kumar M, Jain AK, Ghosh M and Ganguli A, 2012. Industrial whey utilization as a medium supplement for biphasic growth and bacteriocin production by probiotic Lactobacillus casei LA-1. Probiotics and antimicrobial proteins 4(3), 198-207.
[10] Parashar A, Jin Y, Mason B, Chae M and Bressler DC, 2016. Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. Journal of dairy science 99(3), 1859-1867.
[11] Tabasco R, García-Cayuela T, Peláez C and Requena T, 2009. Lactobacillus

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-27]

2012. Organic milk improves Bifidobacterium lactis counts and bioactive fatty acids contents in fermented milk. LWT-Food Science and Technology 49(1), 89-95.
[22] Loghavi L, Sastry SK and Yousef AE, 2007. Effect of moderate electric field on the metabolic activity and growth kinetics of Lactobacillus acidophilus. Biotechnology and bioengineering 98(4), 872-881.
[23] Motahari P, Mirdamadi S and Kiani Rad M, 2016. A Sequential Statistical Approach Towards an Optimized Production of Bacteriocin by Lactobacillus pentosus TSHS. Journal of Food Processing and Preservation 40 (6),1238–1246.
[24] Bendjeddou K, Fons M, Strocker P and Sadoun D, 2012. Characterization and purification of a bacteriocin from Lactobacillus paracasei subsp. paracasei BMK2005, an intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28(4), 1543-1552.
[25] Chen YS, Srionnual S, Onda T and Yanagida F, 2007. Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Letters in applied microbiology 45(2), 190-193.
[26] Pereira C, Henriques M, Gomes D, Gomez-Zavaglia A and de Antoni G, 2015. Novel Functional Whey-Based Drinks with Great Potential in the Dairy Industry. Food technology and biotechnology 53(3), 307.
[27] Hamdipour S, Rezazad M and Alizadeh M, 2014. Production of phenolic antioxidants from apple residue using Rhizopus oligosporus. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research 2(6), 1937-1942.
[28] Marhamatizadeh MH, Ehsandoost E, Gholami P, Moshiri H and Nazemi M, 2012. Effect of permeate on growth and survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum for production of probiotic nutritive beverages. World Applied Sciences Journal 18(1), 1389-1393
[29] Jayalalitha V, Balasundaram B and Palanidorai R, 2012, In Vitro assessment of microencapsulated probiotic beads, International Journal of Agriculture: Research and Review 2 (1): 1-6.
[30] Sarabi jamab M, Rahnama vosough P, kate shamdhiri M and Karazhyan R, 2017. Survivability of Probiotic Bacteria in acidophilus La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. International journal of food microbiology 132(2), 109-116.
[12] Mathys S, Meile L and Lacroix C, 2009. Co□cultivation of a bacteriocin□producing mixed culture of Bifidobacterium thermophilum RBL67 and Pediococcus acidilactici UVA1 isolated from baby faeces. Journal of Applied Microbiology 107(1), 36-46.
[13] Domínguez-Manzano J and Jiménez-Díaz R, 2013. Suppression of bacteriocin production in mixed-species cultures of lactic acid bacteria. Food control 30(2), 474-479.
[14] Zamfir M, Callewaert R, Cornea PC and De Vuyst L, 2000. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus IBB 801. FEMS microbiology letters 190(2), 305-308.
[15] Cladera-Olivera F, Caron GR and Brandelli A, 2004. Bacteriocin production by Bacillus licheniformis strain P40 in cheese whey using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal 21(1), 53-58.
[16] Guerra NP, Rua ML and Pastrana L, 2001. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. International Journal of Food Microbiology 70(3), 267-281.
[17] Abo-Amer AE, 2011. Optimization of bacteriocin production by Lactobacillus acidophilus AA11, a strain isolated from Egyptian cheese. Annals of microbiology 61(3), 445-452.
[18] Avonts L, Van Uytven E and De Vuyst L, 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic Lactobacillus strains in different media. International Dairy Journal 14(11), 947-955.
[19] Halami PM and Chandrashekar A, 2005. Enhanced production of pediocin C20 by a native strain of Pediococcus acidilactici C20 in an optimized food-grade medium. Process Biochemistry 40(5), 1835-1840.
[20] Schirru S, Favaro L, Mangia NP, Basaglia M, Casella S, Comunian R, ... and Todorov SD, 2014. Comparison of bacteriocins production from Enterococcus faecium strains in cheese whey and optimised commercial MRS medium. Annals of microbiology 64(1), 321-331.
[21] Florence ACR, Oliveira RP, Silva RC, Soares FA, Gioielli LA and Oliveira MN,

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-27]

Simulated Gastric and Intestinal model. JFST No. 68, Vol. 14.

[31] Hekmat S, Soltani H and Reid G, 2009. Growth and survival of Lactobacillus reuteri RC-14 and Lactobacillus rhamnosus GR-1 in yogurt for use as a functional food. Innovative food science & emerging technologies 10(2), 293-296.

[32] Lucas A, Sodini I, Monnet C, Jolivet P and Corrieu G, 2004. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. International Dairy Journal 14(1), 47-53.

[33] Gueimonde M, Delgado S, Mayo B, Ruas-Madiedo P, Margolles A and de los Reyes-Gavilán CG, 2004. Viability and diversity of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium populations included in commercial fermented milks. Food Research International 37(9), 839-850.

[34] Thirumurugan A, Ramachandran S and Gobikrishnan S, 2015. Optimization of medium components for maximizing the bacteriocin production by Lactobacillus plantarum ATM11 using statistical design.

[35] McCue PP and Shetty K, 2005. Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using Kefir cultures. Process Biochemistry 40(5), 1791-1797.

[36] Madureira AR, Soares JC, Amorim M, Tavares T, Gomes AM, Pintado MM and Malcata FX, 2013. Bioactivity of probiotic whey cheese: characterization of the content of peptides and organic acids. Journal of the Science of Food and Agriculture 93(6), 1458-1465.

[37] Virtanen T, Pihlanto A, Akkanen S and Korhonen H, 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. Journal of applied microbiology 102(1), 106-115.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-27]

Production of bacteriocin in batch fermentation of dairy effluents by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB12

Amiri, S. [1], Rezaei Mokarram, R. [2*], Sowti Khiabani, M. [3], Rezazadeh Bari, M. [4], Alizadeh Khaledabad, M. [5]

1. PhD, Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
4. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
5. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: 2019/06/15 Accepted:2019/08/05)

The purpose of this study was to investigate the factors affecting the fermentation process in the production of bacteriosin by two commercial probiotic bacteria in dairy factories effluents as a culture medium. Therefore, the effect of independent variables, including incubation temperature (30, 34 and 38 °C), initial pH (5, 6 and 7), duration of incubation (12, 30 and 48 hours), yeast extract concentration (0, 2 and 4 %), probiotic bacterial species (*L. acidophilus* LA5 and *B. animalis* subsp. lactis BB12) and culture medium (cheese whey and milk permeate) was studied using a completely randomized design with two-level factorial arrangement. The results showed that the temperature and time of incubation as well as the culture medium had a significant effect on bacteriosin production ($p<0.05$). Also, temperature, yeast extract concentration, culture medium type and culture of bacteria had a significant effect on biomass ($p<0.05$). Initial pH and culture medium had a significant effect on total protein content ($p<0.05$). Based on the results of incubation temperature, duration of incubation, yeast extract concentration, type of culture medium and type of probiotic bacteria had a significant effect on the titratable acidity ($p<0.05$). The levels of bacteriosin activity, biomass, total protein, and titratable acidity were in the range of 1000 to 5000 AU/mL, 0.80 to 8.67 g/L, 107.75 to 351.92 mg/L and 0.25 to 1.41 g/L, respectively. In general, the results showed that cheese whey and *L. acidophilus* LA5 is the suitable culture medium and bacterium for producing bacteriosin, respectively.

Key words: Bacteriocin, Dairy effluents, *Lactobacillus acidophilus* LA5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12, Batch fermentation

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-27]

* Corresponding Author E-Mail Address; rmokarram@tabrizu.ac.ir