



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

مدل سازی تولید زیست توده میکروبی توسط لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۱۷-۴ جدا شده از ترخینه در بستر لجن لبنی به وسیله روش سطح پاسخ (RSM)

علیرضا حیدریان^۱، فریده طباطبایی یزدی^{۲*}، سید علی مرتضوی^۳، فرشته فلاح^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه آموزشی علوم و مهندسی صنایع غذایی گرایش زیست فناوری، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۲ استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۳ دکترای تخصصی، گروه آموزشی علوم و مهندسی صنایع غذایی گرایش زیست فناوری، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

لجن لبنی یکی از ضایعات اصلی و ارزان قیمت صنایع لبنی است که حاوی مواد مغذی لازم برای رشد باکتری های اسیدلاکتیک (LAB) به منظور تولید متابولیت های میکروبی است که برای استفاده کارآمد از آن، بهینه سازی شرایط تخمیر حیاتی است. به منظور بهینه سازی تولید زیست توده خشک، سه متغیر مستقل غلظت لجن لبنی (۵، ۱۲، ۵ و ۲۰ درصد)، pH (۶، ۷ و ۸) و نرخ تلقیح باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم سویه ۴-۱۷ (۱، ۳ و ۵ درصد) استفاده شد. قبل از عمل تخمیر، رشد سلولی و مورفولوژی این باکتری به منظور تعیین عملکرد میزان رشد و تأیید حضور باکتری در این بستر مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهای مستقل با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) با طرح مرکب مرکزی (CCD) به منظور به حداکثر رساندن تولید زیست توده خشک توسط این باکتری بهینه شدند. نتایج بهینه سازی نشان داد که حداکثر میزان تولید زیست توده خشک مربوط به تیمار بهینه شامل ۲۰ درصد غلظت لجن لبنی، نرخ تلقیح ۱ درصد و pH ۸ بود. همچنین باتوجه به نتایج، بستر لجن لبنی برای تخمیر این باکتری مناسب است. در نتیجه، اثر غلظت بستر لجن لبنی و pH بر میزان تولید زیست توده خشک توسط این باکتری بسیار معنی دار بود.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۵

کلمات کلیدی:

پساب لبنی،

روش سطح پاسخ،

لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۱۷-۴،

مدل سازی.

DOI: 10.22034/FSCT.20.137.191

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.137.13.3

* مسئول مکاتبات:

tabatabai@um.ac.ir

۱- مقدمه

پساب لبنی^۱ به عنوان فاضلاب قوی با غلظت های بالای اکسیژن مورد نیاز بیولوژیکی^۲ (BOD) و اکسیژن مورد نیاز شیمیایی^۳ (COD) طبقه بندی می شود [۱]. با توجه به اینکه این پساب ها حاوی اکثر مواد جامد موجود در شیر می باشند اگر کنترل نشوند باعث از دست رفتن یک محصول باارزش از صنایع لبنی می شوند و علاوه بر آن باعث ایجاد مشکلات زیست محیطی می کنند [۲]. از سوی دیگر این پساب ها به علت دارا بودن غلظت های بالای مواد آلی سبب ایجاد مشکل حاد در سیستم فاضلاب شهری می شوند [۳، ۴]. لجن لبنی تولید شده از محصولات شیر (شیر، کره، ماست و پنیر) به میزان زیادی تحت تاثیر نوع سیستم و روش های عملیات مورد استفاده قرار می گیرد اما ترکیبات عمده آن شامل کربوهیدرات، پروتئین و چربی می باشد که منشأ اصلی آنها از شیر است. ترکیب عمده موجود در لجن لبنی قند لاکتوز می باشد که سهم ۱۶-۱۴٪ از این پساب را به خود اختصاص داده است. نیتروژن یکی از دیگر ترکیبات موجود در این پساب است که از پروتئین های موجود در شیر نشأت گرفته و به دو صورت آلی (پروتئین، اوره و اسیدهای نوکلئیک) و یونهای نظیر NH_4^+ ، NO_2^- و NO_3^- می باشد و ۸-۶٪ از این پساب را شامل می شود. چربی و مواد غیرشیری دیگر ترکیبات موجود در لجن لبنی می باشند که به ترتیب ۷،۴٪ و ۳-۱،۵٪ از لجن لبنی را شامل می شوند [۵]. لجن لبنی به طور کلی حجمی بین ۱-۰،۰۵٪ از حجم شیر را داراست و ۱۶-۱۴٪ از آن مواد خشک هستند و از سوی دیگر این پساب نسبت به ملاس و لجن فاضلاب

سهم کمتری از فلزات و ترکیبات مضر را به خود اختصاص می دهد [۶].

از دیدگاه تاریخی محصولات تخمیری در جهت افزایش ماندگاری تولید می شوند. کشورهای خاورمیانه بخصوص ایران در تولید محصولات تخمیری قدمت طولانی دارند. ترخینه^۴ یکی از غذاهای تخمیری است که پایه لبنی و غله ای دارد و منبع غنی از ویتامین ها از جمله تیامین، ریبوفلاوین و B12 است و اکثراً در نواحی غربی ایران تولید می شود. این محصول تخمیری معمولاً از سوسپانسیون گندم، دوغ و شلغم تولید می شود و به علت دارا بودن رطوبت کم (۳-۹٪) و pH پایین (۴،۵-۴،۰) از رشد میکروارگانیسم های بیماری زا و مولد فساد جلوگیری می کند و در نتیجه ماندگاری محصول را افزایش می دهد [۷]. در این غذای تخمیری توانایی ارتقا سلامتی به علت حضور و فعالیت باکتری های اسید لاکتیک وجود دارد به گونه ای که در سال های قدیم این غذا را در جهت بهبود بیماری های من جمله سرماخوردگی استفاده می کردند [۸].

باکتری های اسید لاکتیک به علت تولید متابولیت های ثانویه مفید مانند پپتیدهای زیست فعال^۵، باکتریوسین ها^۶ و اگزوپلی ساکاریدها^۷ در صنایع مختلف نظیر میکروبیولوژی صنعتی، غذایی و پزشکی مفید واقع می شوند و از سوی دیگر به علت افزایش ماندگاری مواد غذایی و بهبود سیستم ایمنی نگهدارنده های زیستی تلقی می شوند [۹، ۱۰]. لاکتوباسیلوس ها^۸ عضو بسیار مهم خانواده LAB^۹ می باشند

4 - Tarkhineh

5 - Bioactive peptide

6 - Bacteriocin

7- Exopolysaccharide

8 - *Lactobacillus*

9 - Lactic acid bacteria

1 - Dairy sludge

2- Biological oxygen demand

3 - Chemical oxygen demand

از عوامل تأثیرگذار در تولید زیست‌توده^۵ توسط باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۱۷-۴ شرایط و عوامل مختلفی نظیر درصد لجن لبنی، pH و نرخ تلقیح باکتری می‌باشد. هنگامی که عوامل زیادی در تولید یک محصول دخیل باشند، روش سطح پاسخ^۶ (RSM) یک ابزار کارآمد برای بهینه‌کردن شرایط به حساب می‌آید. این طرح می‌تواند با حداقل زمان و آزمایش‌های کمتر مناسب‌ترین اطلاعات را ارائه دهد. این روش در بسیاری از فرآورده‌های زیستی مبتنی بر فناوری زیستی نظیر زیست‌توده، آنزیم‌ها، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و... استفاده شده است [۲۱]. هدف از این مطالعه بهینه‌سازی محیط کشت لجن لبنی به‌عنوان بستر ارزان‌قیمت و حاوی مواد مغذی جهت رشد لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۱۷-۴ استحصال شده از ترخینه و تولید زیست‌توده خشک به روش سطح پاسخ می‌باشد. در این مطالعه علاوه بر بهینه‌سازی تولید زیست‌توده خشک، رشد سلولی این باکتری در بستر لجن لبنی و مورفولوژی این باکتری مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲- مواد و روش

۲-۱- فعال‌سازی باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۱۷-۴

باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۱۷-۴ از مجموعه میکروبی گروه صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد و بر روی محیط MRS آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. کشت بر روی محیط جامد به‌منظور تعیین آلودگی صورت گرفت و پس از اطمینان عدم آلودگی، کلنی منفرد به‌دست‌آمده از محیط MRS آگار به محیط MRS براث منتقل شد و در شرایط ذکر شده انکوبه شد [۲۲].

و به صورت میله ای شکل، گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، غیرمتحرک، غیر اسپورزا، کاتالاز منفی و مقاوم به اسید هستند. دمای رشد لاکتوباسیلوس ها در بازه ۲ تا ۵۳ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد و دمای بهینه رشد آنها ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد است [۱۱، ۱۲]. این جنس از باکتری‌های اسیدلاکتیک بر مبنای ویژگی‌های تخمیری به هموفرمنتاتیو و هتروفرمنتاتیو طبقه بندی می‌شوند و باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۱۷-۴^۱ در گروه هتروفرمنتاتیو اجباری بوده و توانایی تولید CO₂ را از قند گلوکز دارد [۱۳، ۱۴]. پروبیوتیک‌ها دسته از میکروارگانیسم‌ها هستند که با انعطاف‌پذیری بالا و توانایی اصلاح میکروفلور سالم روده توانایی ایجاد اثرات مفید در بدن میزبان را دارند. اکثر باکتری‌های اسید لاکتیک در این گروه قرار می‌گیرد و جنس‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم^۲ از خانواده باکتری‌های اسید لاکتیک دارای بیشترین فعالیت پروبیوتیکی هستند [۱۵، ۱۶]. میکروارگانیسم‌هایی که دارای خواص پروبیوتیکی هستند باید مقاومت بالایی در برابر نمک‌های صفرای و اسید داشته باشند [۱۷]. باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۱۷-۴ باکتری مورد مطالعه این پژوهش می‌باشد و از غذای تخمیری ترخینه استحصال شده است و ویژگی‌های پروبیوتیکی آن قبلاً به اثبات رسیده است [۱۸]. این باکتری توانایی زنده ماندن در pH پائین و تحمل نمک صفرای را دارا است. درصد آبگریزی^۳ و میزان چسبندگی^۴ آن به سلول‌های سرطانی Caco-2 به ترتیب ۴۳ و ۸٫۵٪ می‌باشد. این باکتری مقاومت بالایی در برابر محیط گوارشی دارد و خواص ضدباکتریایی و چسبندگی و ضدعفونی بالایی را دارا است [۱۹، ۲۰].

1 - *Lactobacillus fermentum* 4-17

2 - *Bifidobacterium*

3 - Hydrophobicity

4 - Adhesion level

5 - Biomass

6- Response Surface Method

۲-۲- آماده سازی لجن لبنی به عنوان بستر اصلی رشد

باکتری

لجن لبنی، در مرحله جداسازی چربی شیر توسط سپراتور ایجاد می شود و دستگاه سپراتور بر اساس نیروی گریز از مرکز کار می کند. لجن لبنی در این مطالعه از کارخانه پگاه خراسان رضوی تهیه شد و در جهت کاهش بار میکروبی و رسوب پروتئین های نامحلول موجود در آن، pH اولیه آن در بازه ۶ توسط HCL تنظیم گردید و در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت دید. در مرحله بعد، به منظور تغییرات در مورفولوژی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی و یکنواخت کردن ترکیبات موجود در آن با خشک کن پاششی^۱ دونا زله (سروش صنعت - نیشابور) با دمای ورودی ۱۸۰ درجه سانتی گراد و جریان ورودی خوراک ۴۴٫۵ میلی لیتر بر دقیقه پودر گردید [۲۳]. تهیه پودر از این ضایعات علاوه بر ایجاد پایداری باعث افزایش سطح به حجم ذرات می شود و دسترسی بیشتر میکروارگانیسم ها را به مواد مغذی موجود در بستر فراهم می کند. برای تهیه غلظت های مورد استفاده در این پژوهش به مقدار تعیین شده پودر لجن لبنی توزین می گردد و توسط آب مقطر محلول تهیه می شود [۲۴].

۲-۳- اندازه گیری رشد سلولی

سویه لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۴-۱۷ در محیط کشت لجن لبنی که دارای کمترین درصد لجن لبنی (۵٪) می باشد جهت توانایی رشد مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله اولیه، ۱۰۰ ماکرولیت از سوسپانسیون حاوی باکتری فعال شده را به ۵ میلی لیتر از پودر لجن لبنی اتوکلاو شده در شرایط ۱۲۱ درجه سانتی گراد و ۱۵ دقیقه تلقیح کرده و هریک ساعت

یکبار تا ۸ بازه زمانی پیاپی به میزان ۱۰۰ ماکرولیت در پلیت حاوی محیط MRS آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد انکوبه گردید و در مرحله نهایی تعداد کلنی ها در هر پلیت در هر بازه زمانی شمارش به عمل آمد [۲۵].

۲-۴- بررسی خصوصیات مورفولوژیکی باکتری

لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۴-۱۷

در این آزمون جهت بررسی خصوصیات ظاهری هر کلنی پس از رنگ آمیزی گرم توسط میکروسکوپ نوری^۲ انجام گرفت. در مرحله بعد، از کلنی های مشابه لاکتوباسیلوس با ویژگی گرم مثبت، بدون اسپور و میله ای شکل نمونه برداری از آنها صورت گرفت و برای تأیید آن نیز آزمون کاتالاز انجام شد. در جهت رسیدن به رشد و خلوص بالاتر چند بار این سویه در محیط MRS پاساژ شد [۲۶].

۲-۵- تهیه غلظت نیم مک فارلند از باکتری

لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۴-۱۷

برای تعیین میزان نرخ تلقیح باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۴-۱۷ در محیط لجن لبنی جهت بهینه سازی تولید زیست توده خشک باید غلظت باکتری توسط استاندارد نیم مک فارلند تنظیم گردد. استاندارد نیم مک فارلند با اضافه کردن ۹۹٫۵ میلی لیتر اسیدسولفوریک ۱ درصد و ۰٫۵ میلی لیتر کلرور باریم ۱،۱۷۵ درصد تهیه می شود. چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از اندازه گیری جذب در اسپکتروفتومتر^۳ مشخص می شود. محلول نیم مک فارلند کدورتی معادل با یک سوسپانسیون باکتریایی حاوی 1×10^8 CFU/ml در طول موج ۵۳۰ ایجاد می کند [۲۷].

2 - Optical microscope
3 - Spectrophotometer

1 - Spray dryer

۶-۲- بهینه‌سازی رشد باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم

۱۷-۴ به روش سطح پاسخ

روش سطح پاسخ یکی از متداول‌ترین روش‌ها برای بررسی اثر ترکیبی چندین متغیر به منظور یافتن شرایط بهینه برای یک شرایط چندمتغیره است. در این مطالعه، برای بررسی اثر سه متغیر مستقل^۱ درصد لجن لینی، نرخ تلقیح^۲ باکتری و pH بر متغیر وابسته^۳ (میزان تولید زیست‌توده خشک) از طرح مرکب مرکزی^۴ به روش سطح پاسخ استفاده شد و در این طرح هر یک از متغیرهای مستقل در سه سطح (۱-، ۰ و ۱+) به کار گرفته شدند که امکان برآزش چندنامی مرتبه دوم^۵ را فراهم می‌کند (جدول ۱) [۲۸، ۲۹]. یک طرح مکعب مرکزی با ۲۰ اجرا^۶ برای ارزیابی متغیرها صورت گرفت و در جدول ۲ ارائه شد. اهمیت اثر خطی، درجه دوم و بر همکنش سه متغیر مستقل مورد بررسی بر متغیر وابسته (پاسخ) با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) ارزیابی شد. برای تعیین همبستگی پاسخ به دست‌آمده از آزمایش‌های تجربی به متغیرهای مستقل توسط معادله مدل درجه دوم برآزش صورت گرفت.

Table1 The levels of the independent variables in the CCD

Variables	Unit	Symbol	High level (+1)	Inter mediate level (0)	Low level (-1)
Dairy wastewater	%	A	20	12.5	5
Inoculation	%	B	5	3	1
pH		C	8	7	6

1 - Independent variable

2 - Inoculation rate

3 - Dependent variable

4 - Central composite design

5 - Fit second- order poly- nomials

6 - Run

Table 2 Experimental design to optimize the fermentation environment of *Lactobacillus fermentum* 4-17 for biomass production

Run	Dairy wastewater (%)	Inoculation (%)	pH	Biomass (g/L)
1	20	5	8	20.73
2	12.5	3	7	15.04
3	5	3	7	11.95
4	12.5	3	7	14.68
5	12.5	3	7	16
6	12.5	3	8	22.71
7	12.5	3	6	15.97
8	20	5	6	19.71
9	12.5	3	7	16.87
10	12.5	3	7	14.08
11	12.5	3	7	14.2
12	20	1	8	26.53
13	20	1	6	18.75
14	20	3	7	18.04
15	5	1	8	20.14
16	12.5	1	7	14.93
17	5	5	8	16.07
18	5	1	6	12.36
19	5	5	6	15.41
20	12.5	5	7	13.38

۳-۱- بررسی میزان رشد باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم**۱۷-۴ در بستر لجن لبنی**

در شکل ۱ منحنی استاندارد رشد باکتری در بستر لجن لبنی بر اساس تعداد سلول بر حسب زمان رسم شده است و به دلیل ایجاد کدورت بالا در اثر رشد این سویه امکان بررسی رشد بر اساس جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر وجود نداشت و از روش کشت سطحی میزان رشد سلول مورد بررسی قرار گرفت. میزان رشد این سویه در بستر لجن لبنی در بازه زمانی اولیه (تا ۴ ساعت) افزایش یافت چراکه لجن لبنی همانطور که اشاره شد عمده ترکیبات آن قند لاکتوز است که یکی از بهترین سوبستراهای مغذی برای رشد این سویه باکتری است. اگرچه در بازه زمانی ۴ ساعت به بعد میزان رشد این سویه کاهش یافت که به دلیل کاهش

۲-۷- اندازه گیری میزان زیست توده (بیومس) خشک

برای تعیین میزان زیست توده خشک ابتدا باید محیط تخمیر شده در فالكونها با سرعت $4000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردد. مایع رویی^۱ از فالكونها خارج گشته و رسوب سلولی باقیمانده در ته فالكون توسط آب مقطر ۲ مرتبه شستشو داده شود و درون آون در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردد. وزن زیست توده خشک به صورت گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر بیان شد [۳۰].

۳- نتایج و بحث

1 - Supernatant

در شکل ۲ نمایی از باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۴-۱۷ جدا شده از ترخینه نشان داده شده است. همان طور که مشاهده شد کلنی های این باکتری میله ای شکل و غیر اسپوزا بودند و باتوجه به رنگ آمیزی گرم در گروه باکتری های گرم مثبت قرار گرفتند و در انتها برای تأیید نهایی بر روی آنها آزمون کاتالاز صورت گرفت که آزمون کاتالاز آنها منفی بود. فلاح و همکاران (۱۳۹۸) نیز از تصاویر میکروسکوپ نوری و آزمون تکمیلی بیوشیمیایی کاتالاز برای تأیید حضور باکتری لاکتوباسیلوس برویس PML1 استفاده کردند [۶].



Fig 2 Image taken by light microscope of *Lactobacillus fermentum* 4-17

۳-۳- مطالعه بهینه سازی تولید زیست توده خشک توسط

باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۴-۱۷

روش سطح پاسخ برای یافتن شرایط عملیاتی بهینه برای تولید زیست توده خشک از باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۴-۱۷ انجام شد. باتوجه به مدل مکعب مرکزی، ۲۰ اجرا برای بهینه سازی سه متغیر مستقل برای تولید زیست توده خشک انجام شد و ماتریس طراحی متغیرها با نتایج تجربی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج تجربی به دست آمده با استفاده از نرم افزار Design expert نسخه ۱۳ برازش داده

مواد مغذی (منابع کربنی و نیتروژنی) برای رشد این سویه باکتری بود و در فاز سکون قرار گرفت [۳۱]. فلاح و همکاران (۱۳۹۸) از بستر لجن لبنی برای رشد باکتری لاکتوباسیلوس برویس PML1^۱ استفاده کردند و میزان تولید گاما آمینو بوتیریک اسید^۲ را در این محیط کشت بررسی کردند. میزان حداکثر رشد این سویه در بازه زمانی اولیه بود و بعد از آن این سویه به علت محدودیت منابع کربنی و نیتروژنی وارد فاز سکون شد [۶]. در مطالعه دیگر، اسکندری و همکاران (۱۳۹۵) از بستر لجن لبنی برای رشد ریزوبیوم رادیوباکتر^۳ و تولید اگزوپلی ساکارید استفاده کردند که میزان حداکثر رشد این سویه در فاز لگاریتمی (ساعات اولیه) مشاهده شد و به دلیل کمبود منابع کربنی، نیتروژنی و فسفات بعد گذشت ساعات اولیه این سویه وارد فاز سکون گردید [۳۲].

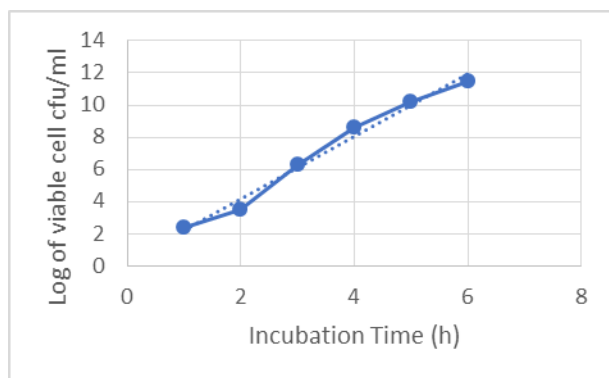


Fig 1 The logarithmic curve of the number of cells in terms of incubation time

۲-۳- بررسی خصوصیات موفولوژیکی باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۴-۱۷

1 - *Lactobacillus brevis* PML1

2 - γ -aminobutyric acid

3 - *Rhizobium radiobacter*

می دهد و بر اساس آن می توان پیش بینی کرد که در اثر تغییرات هر کدام از فاکتورها چه میزان تولید زیست توده خشک را می توان انتظار داشت.

Eq. 1: $Biomass(Y) = 15.07 + 2.78A - 0.7410B + 2.40C - 0.4775AB + 0.0450AC - 1.74BC + 0.0364A^2 - 0.8036B^2 + 4.38C^2$

داده های به دست آمده برای زیست توده خشک تولید شده توسط باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۱۷-۴ با استفاده از این نرم افزار تحت آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) قرار گرفتند. نتایج ANOVA برای برازش مدل های سطح پاسخ در جدول ۳ ارائه شده است.

شدند. معادله مدل به دست آمده از این نرم افزار به منظور تعیین میزان همبستگی متغیر وابسته (پاسخ) به متغیرهای مستقل استفاده شد. هم چنین معادله کلی برای پیش بینی نقطه بهینه به شرح زیر توضیح داده شد که در این معادله Y، A، B و C به ترتیب معادل میزان زیست توده خشک تولید شده توسط باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۱۷-۴ (g/L)، غلظت لجن لینی (٪)، نرخ تلقیح این سویه (٪) و pH هستند. اثر سطوح مختلف متغیرها بر میزان تولید زیست توده خشک را می توان از طریق حل معادله ۱ به دست آورد. هم چنین معادله حاضر میزان تأثیرگذاری هر کدام از فاکتورها، اثرات مربع و اثرات متقابل آنها را نشان

Table 3 Analysis of Variance (ANOVA) of factors affecting dry biomass production

Source	Sum of Square	df	Mean Square	F-value	P-value	
Model	245.24	9	27.25	31.58	< 0.0001	significant
A-Dairy sludge	77.45	1	77.45	89.76	< 0.0001	
B-Inoculation	5.49	1	5.49	6.36	0.0303	
C-pH	57.50	1	57.50	66.64	< 0.0001	
AB	1.82	1	1.82	2.11	0.1766	
AC	0.0162	1	0.0162	0.0188	0.8937	
BC	24.08	1	24.08	27.91	0.0004	
A ²	0.0036	1	0.0036	0.0042	0.9495	
B ²	1.78	1	1.78	2.06	0.1819	
C ²	52.79	1	52.79	61.18	< 0.0001	
Residual	8.63	10	0.8628			
Lack of Fit	2.67	5	0.5335	0.4474	0.8010	not significant
Pure Error	5.96	5	1.19			
Cor Total	253.87	19				
R²	Adjusted R²		C.V%	Adeq Prechsn		
0.9660	0.9354		5.50	22.5128		

مربوط به تغییر متغیرهای مستقل است و تنها ۳,۴۰ درصد از تغییرات پاسخ توسط مدل توجیه نمی شود. همچنین برای آنکه یک مدل توانایی خوبی برای برازش اطلاعات داشته باشد لازم است علاوه بر ضریب تبیین (R²) بالا، آزمون عدم برازش^۱ آن مدل نیز معنادار (p-value= 0.8010)

مقدار p محاسبه شده برای مدل Quadratic کمتر از ۰/۰۰۰۱ بود که نشان دهنده اهمیت این مدل است. در این مدل، ضریب تبیین (R² 0.9660) و ضریب تبیین اصلاح شده (R²adj 0.9363) تأیید می کند که مدل ارائه شده بسیار معنادار است. به عبارت دیگر ۹۶,۶۰ درصد از تغییرات پاسخ

1 - Lack of Fit

توزیع شوند. برای بررسی نرمال بودن داده‌ها می‌توان از نمودار احتمال نرمال باقیمانده^۲ استفاده کرد. اگر داده‌ها از خط رسم شده در شکل ۳، دور نباشند توزیع داده‌ها نرمال بوده و داده‌ها با کمترین میزان خطا وارد شده‌اند. هم چنین در این نمودار هر چه داده‌ها از طیف رنگی آبی به قرمز نزدیک‌تر شود میزان زیست‌توده خشک تولیدی توسط این باکتری افزایش می‌یابد.

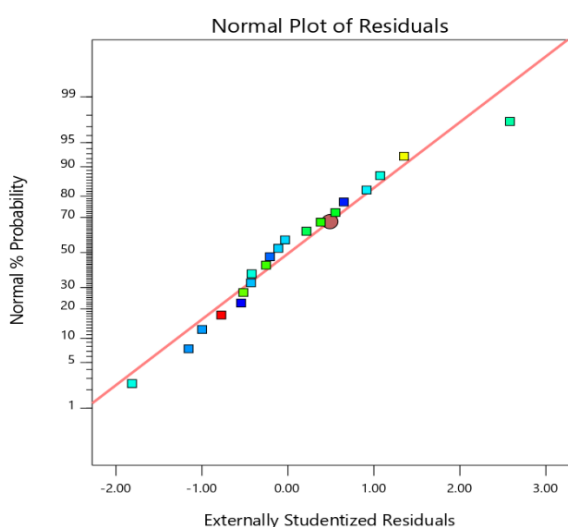


Fig 3 Normal residual probability diagram for dry biomass production

از سوی دیگر یکی دیگر از پارامترهای مورد بررسی که کفایت مدل پیشنهادی را تأیید کرد شکل نمودار^۴ بود که بر اساس عدد اجرا آزمایش در مقدار باقیمانده خارجی^۳ ترسیم شد. این نمودار نمایانگر انحراف معیار مقادیر واقعی از مقادیر پیش‌بینی شده^۴ است که نسبت به نمودارهای دیگر به دلیل بررسی تمامی نقاط جهت برآورد واریانس برتری دارد. باتوجه به این نمودار، مدل پیشنهادی کفایت کافی را برای

نباشد؛ چراکه معنادار نبودن آزمون عدم برازش یک مدل بیانگر برازش خوب داده‌های مورداستفاده است[۳۳]. در این مدل، مقدار نسبت سیگنال به نویز^۱ ۲۲,۵۱۲ است که مقدار بسیار خوبی برای نسبت سیگنال به نویز است. اگر مقادیر p برای هر متغیر بیشتر از ۰/۰۵ (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) باشد، نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن متغیر در مدل است و اگر کوچک‌تر از این مقدار باشد، نشان‌دهنده معنادار بودن متغیر است. مطابق جدول ۳، آنالیز واریانس نشان داد که متغیرهای غلظت لجن لبنی (A)، نرخ تلقیح باکتری (B) و pH (C) در شرایط خطی معنادار بود و اثرات متقابل AB و AC اثر معناداری نداشته اما اثر متقابل BC معنادار بوده. همچنین جدول آنالیز واریانس نشان داد که اثرات درجه دوم متغیرهای A^2 و B^2 معنی‌دار نبوده در حالیکه اثر درجه دوم متغیر C^2 معنادار بوده. یکی دیگر از فاکتورهای مورد بررسی در این جدول پارامتر F-value است که نشان‌دهنده اعتبار مدل و ارزش فاکتورهای مورد استفاده جهت بهینه سازی می‌باشد این پارامتر برای مدل بر خلاف پارامتر p -value مقدار آن هر چه بیشتر باشد نمایانگر ارزش بیشتر مدل است و از طرف دیگر هر چه مقدار F-value فاکتورهای مورد استفاده جهت بهینه سازی بالاتر باشد نشان دهنده تاثیر گذاری بیشتر آن فاکتور بر میزان متغیر وابسته (پاسخ) می‌باشد[۳۴].

باتوجه به میزان F-value فاکتورها اثرگذاری آنها بر میزان متغیر وابسته به صورت زیر می‌باشد:

نرخ تلقیح باکتری > pH > غلظت لجن لبنی

یکی دیگر از پارامترهای مورد بررسی برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های آزمایش این است که داده‌ها به صورت نرمال

2 - Normal plot of residuals

3 - Externally studentized residuals

4 - Predicted values

1 - Adeq Precision

فاکتور pH بر میزان زیست توده خشک تولیدی توسط باکتری، مربوط به بیشینه pH است چرا که شیب خط، در بیشینه pH حداکثر است.

این آزمایش دارد و از طرف دیگر تمامی اجراها در آزمایش بین خطوط قرمز قرار دارد.

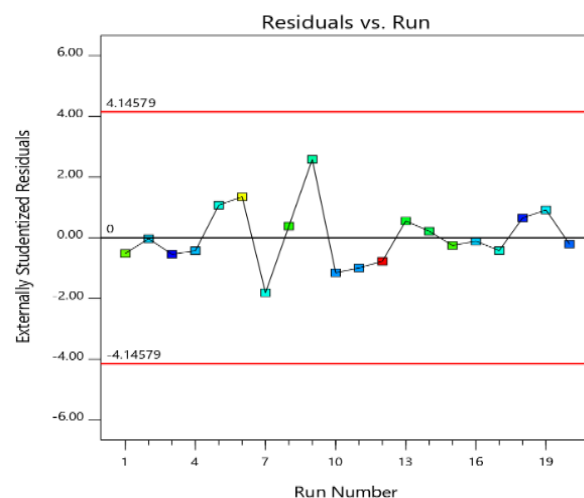


Fig 4 The graph of runs in external residual values

از طرف دیگر، قراردادن بیشینه^۱ میزان تولیدی زیست توده خشک به عنوان بهینه ترین پاسخ، نرم افزار اجرا شماره ۱۲ را به عنوان بهترین پاسخ انتخاب کرد که در این اجرا غلظت لجن لبنی، نرخ تلقیح باکتری و pH به ترتیب برابر ۲۰، ۱ و ۸ بود.

باتوجه به نمودار a شکل ۵ بیشترین اثرگذاری فاکتور غلظت لجن لبنی بر میزان زیست توده خشک تولیدی توسط باکتری، مربوط به بیشینه غلظت لجن لبنی است چرا که شیب خط، در بیشینه غلظت لجن لبنی حداکثر است. هم چنین باتوجه به نمودار b شکل ۵ بیشترین اثرگذاری فاکتور نرخ تلقیح بر میزان زیست توده خشک تولیدی توسط باکتری، مربوط به کمینه^۲ نرخ تلقیح این باکتری است چرا که شیب خط، در کمینه نرخ تلقیح حداکثر است. از طرف دیگر، باتوجه به نمودار c شکل ۵ بیشترین اثرگذاری

1 - Maximum

2 - Minimum

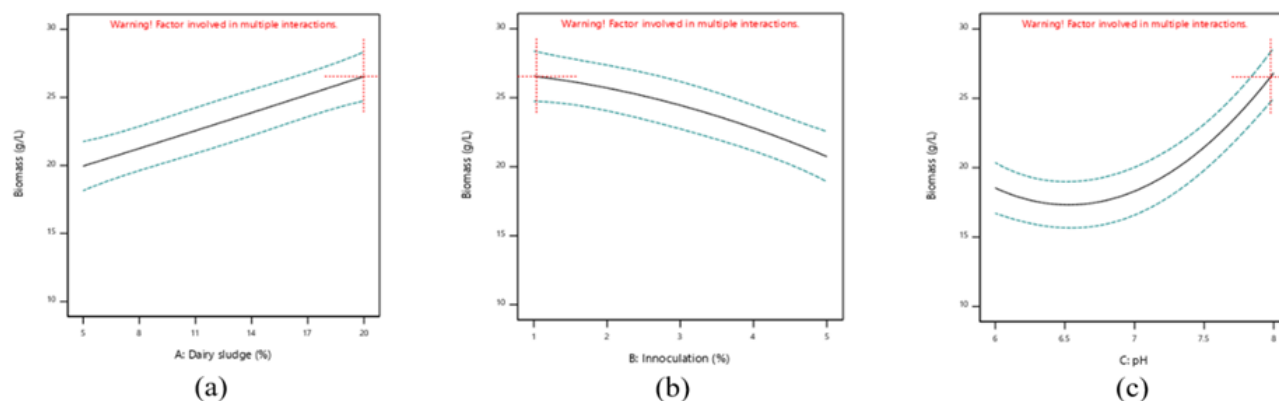


Fig 5 Influence diagram of independent factors on the dependent variable

بر میزان تولید زیست توده خشک را نشان می دهد. همچنین، اگر به طور همزمان غلظت لجن لبنی به ۲۰ درصد افزایش یابد و نرخ تلقیح به ۱ درصد کاهش یابد، میزان تولید زیست توده خشک به میزان بیشتری نسبت به زمانی که هر دو فاکتور به تنهایی اعمال شوند، افزایش می یابد. با توجه به اینکه لجن لبنی انرژی و جزء اصلی برای تولید زیست توده خشک را فراهم می نماید. به نظر می رسد تولید بالاتر زیست توده خشک با افزایش درصد لجن لبنی به مصرف لجن لبنی در بخش بعدی از کشت (فاز سکون) مرتبط باشد [۳۵]. همانطور که اشاره شد لاکتوز کربوهیدرات اصلی موجود در لجن لبنی است که اصلی ترین منبع کربن برای تولید زیست توده محسوب می شود علت اثر منبع کربن بر تولید زیست توده نیازمندی زیاد این سویه به منبع کربن می باشد [۳۶].

غضنفری و همکاران (۲۰۲۳)، اثر فاکتورهای مستقل غلظت لجن لبنی، غلظت کنجاله و زمان را در جهت بهینه سازی تولید ال-گلوتامات (پاسخ) توسط مجموعه ای از باکتری های لاکتوباسیلوس شامل لاکتوباسیلوس برویس

در اشکال (۶، ۷ و ۸) اثر مختلف فاکتورها بر میزان تولیدی زیست توده خشک توسط باکتری به دو صورت نمودارهای کانتور^۱ و سطح پاسخ^۲ بررسی گردید. در نمودارهای کانتور (a)، پاسخ برای دو فاکتور مستقل به تصویر کشیده می شود. این در حالی است که فاکتورهای دیگر ثابت هستند. همچنین نمودارهای سطح پاسخ (b)، اثر متقابل فاکتورهای مستقل را بر میزان تولیدی زیست توده خشک مورد بررسی قرار می دهند.

در شکل ۶، نمودار (a) نشان می دهد زمانی که نرخ تلقیح در محیط تخمیر ثابت در نظر گرفته شود، میزان تولید زیست توده خشک متناسب با افزایش غلظت لجن لبنی به تدریج افزایش یافته است. در مقابل، هنگامی غلظت لجن لبنی در نمودار ثابت در نظر گرفته شود، میزان تولید زیست توده خشک با افزایش نرخ تلقیح کاهش می یابد. از طرف دیگر نمودار (b) اثر متقابل غلظت لجن لبنی و نرخ تلقیح

1 - Contour charts

2 - Response surface graph

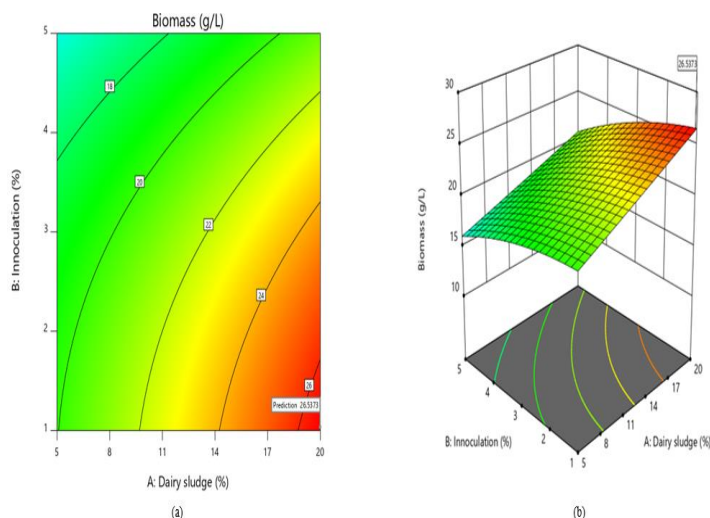


Fig 6 Investigating the effect of dairy sludge concentration and inoculation rate on dry biomass production

در شکل ۷، نمودار (a) نشان می‌دهد زمانی که pH در محیط تخمیر ثابت در نظر گرفته شود، میزان تولید زیست توده خشک متناسب با افزایش غلظت لجن لبنی به تدریج افزایش یافته است. در مقابل، هنگامی غلظت لجن لبنی در نمودار ثابت در نظر گرفته شود، میزان تولید زیست توده خشک با افزایش pH افزایش می‌یابد. از طرف دیگر نمودار (b) اثر متقابل غلظت لجن لبنی و pH بر میزان تولید زیست توده خشک را نشان می‌دهد. تأثیر افزایش غلظت لجن لبنی بر میزان تولید زیست توده خشک بیشتر از افزایش pH بود می‌توان نتیجه گرفت که تأثیر غلظت لجن لبنی بیشتر از pH است. همچنین، اگر غلظت لجن لبنی و pH به طور هم‌زمان به ۲۰ درصد و ۸ افزایش یابد، میزان تولید زیست توده خشک به میزان بیشتری نسبت به زمانی که غلظت هر متغیر به تنهایی افزایش یافته، افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد کاهش pH باعث افزایش غلظت هیدرونیوم در خارج از سلول می‌شود و بنابراین pH خارجی کاهش می‌یابد. علاوه بر این، اگر pH از ظرفیت بافر محیط کشت

سویه PML1، لاکتوباسیلوس پلانتاروم سویه ۱۰۵۸ و لاکتوباسیلوس فرمنتوم سویه ۱۷-۴ مورد بررسی قرار دادند. نتایج این گزارش نشان داد که با افزایش غلظت لجن لبنی (۲۰ درصد) میزان تولید ال-گلو تامات افزایش می‌یابد چرا که لجن لبنی به عنوان منبع کربن و کنجاله سویا به عنوان منبع نیتروژن می‌تواند محیط کشت مناسبی برای تولید ارزان قیمت ال-گلو تامات باشند و افزایش غلظت لجن لبنی افزایش منبع کربن مورد نیاز برای رشد باکتری های ذکر شده را به دنبال دارد [۲۸]. مرادی و همکاران (۲۰۲۲)، اثر فاکتورهای مستقل غلظت لجن لبنی، غلظت گلوکز و زمان را در جهت بهینه سازی تولید اسید لاکتیک (پاسخ) توسط باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه لاکتیس سویه PTCC1743 مورد بررسی قرار دادند. نتایج این گزارش نشان داد که با افزایش غلظت لجن لبنی (۱۸،۱۶ گرم در لیتر) میزان تولید اسید لاکتیک افزایش می‌یابد چرا که افزایش غلظت لجن لبنی تأثیر معناداری بر رشد سلولی این سویه از باکتری را به دنبال دارد [۳۷]. فلاح و همکاران (۲۰۲۲)، اثر فاکتورهای مستقل غلظت لجن لبنی، غلظت ملاس و زمان تخمیر را در جهت بهینه سازی تولید گاما آمینوبوتیریک اسید (پاسخ) توسط مجموعه ای از باکتری های لاکتوباسیلوس (لاکتوباسیلوس برویس PML1، لاکتوباسیلوس فرمنتوم ۱۷-۴ و لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۱۰۵۸) مورد بررسی قرار دادند. نتایج این گزارش نشان داد که با افزایش غلظت لجن لبنی (۲۹،۲۷ درصد) میزان تولید گاما آمینوبوتیریک اسید افزایش می‌یابد چرا که افزایش غلظت لجن لبنی به دلیل منبع ترکیبات کربنی تأثیر معناداری بر رشد سلولی این باکتری ها را به دنبال دارد [۳۸].

1 - *Lactobacillus plantarum* 1058

2 - *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* PTCC 1743

معناداری بر مهار باکتری های *اشرشیاکلی*^۴، *باسیلوس سوبتیلیس*^۵، *استافیلوکوکوس اورئوس*^۶، *سودوموناس آئروجینوزا*^۷ دارد [۴۱]. وانگ^۸ و همکاران (۲۰۱۷)، اثر فاکتورهای مستقل پپتون سویا، دمای تخمیر و pH اولیه را در جهت بهینه سازی تولید آگزوپلی ساکارید جدید (پاسخ) توسط باکتری *لاکتوباسیلوس پلاتناروم* سویه KX041^۹ مورد بررسی قرار دادند. نتایج این گزارش نشان داد که با افزایش pH تا بازه (۶,۳۸) میزان تولید EPS افزایش می یابد چرا که pH اولیه خنثی برای تولید EPS مناسب است و شرایط قلیایی به طور چشمگیری بازده EPS را کاهش می دهد [۴۲]. همچنین جواد و همکاران (۲۰۱۳)، گزارش کردند که اگر pH تخمیر در تولید زیست توده توسط *لاکتوباسیلوس* کمتر از ۴,۶ باشد، متابولیسم میکروارگانیسم ها باعث توقف مصرف سوپسترا و تولید زیست توده می شود [۴۳].

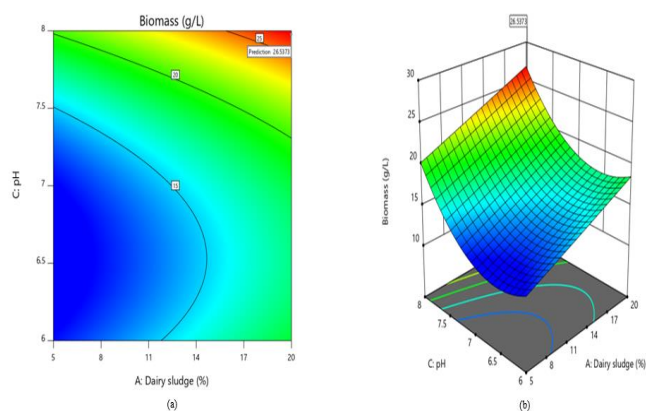


Fig 7 Investigating the effect of dairy sludge concentration and pH on dry biomass production

- 4 - *E. coli*
 5 - *Bacillus subtilis*
 6 - *Staphylococcus aureus*
 7- *Pseudomonas aeruginosa*
 8- Wang
 9 - *Lactobacillus plantarum* KX041

بالتر رود، زیست توده دوباره به داخل سلول منتشر می شود و به دلیل pH داخل سلولی بالاتر تجزیه می شود. اگر غلظت یون های هیدرونیوم در سلول های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* از ظرفیت بافر سیتوپلاسم بالاتر رود، این یون ها از طریق پمپ پروتون به خارج از سلول منتقل می شوند و انرژی سلولی ذخیره شده (ATP) را کاهش می دهند. هنگامی که ذخیره انرژی کاهش می یابد، پمپ پروتون کاهش pH داخلی را متوقف می کند و در نتیجه رشد متوقف می شود و بنابراین، تولید زیست توده به طبع آن نیز کاهش می یابد [۳۹].

چاسوی^۱ و همکاران (۲۰۲۰)، اثر فاکتورهای مستقل نسبت کربن به نیتروژن، pH اولیه محیط کشت را در جهت بهینه سازی تولید L-لاکتیک اسید و زیست توده (پاسخ) توسط باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* زیرگونه کازئی سویه -NRRL-441^۲ مورد بررسی قرار دادند. نتایج این گزارش نشان داد که با افزایش pH تا بازه (۷,۵) میزان تولید L-لاکتیک اسید و زیست توده افزایش می یابد چرا که pH اولیه کمتر از ۷,۵ تولید LA و زیست توده را محدود می کند و می توان اینگونه توجیه کرد که هر چه pH اولیه به pH مهار شناسایی شده (۳,۸۵) نزدیکتر باشد تولید زیست توده و L-لاکتیک اسید سریع تر متوقف می شود [۴۰]. تالوری^۳ و همکاران (۲۰۱۷)، اثر فاکتورهای مستقل منابع کربن و نیتروژن، دما، pH، سرعت همزدن و زمان انکوباسیون را در جهت بهینه سازی تولید ترکیبات ضد باکتریایی (پاسخ) توسط باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* MTCC No.1745^۲ مورد بررسی قرار دادند. نتایج این گزارش نشان داد که با افزایش pH تا بازه (۷) میزان تولید مواد ضد باکتریایی افزایش می یابد چرا که افزایش pH تا بازه ۷ تاثیر

- 1 - Chasoy
 2 - *Lactobacillus casei* subsp *casei* NRRL-441
 3 - Talluri

لاکتوباسیلوس پلانٹاروم ۱:۲:۱ بود و تخمیر به مدت ۸ روز انجام شد، خواص فیزیکی و مکانیکی بهبود یافته تخته خرده چوب بدون چسب بامبو به دست آمد [۴۴].

دیشبهای^۵ و همکاران (۲۰۲۲)، اثر فاکتورهای مستقل نرخ تلقیح و زمان انکوباسیون را در جهت بهینه سازی تولید پپتید زیست فعال (پاسخ) توسط کشت همراه^۶ لاکتوباسیلوس فرمنتوم سویه KGL4^۷ و مخمر ساکارومایسس سرویزیه سویه WBS2A^۸ در بستر کنسانتره پروتئین آب پنیر^۹ (WPC-80) مورد بررسی قرار دادند. نتایج این گزارش نشان داد که با افزایش نرخ تلقیح کشت همراه (۲,۵٪) میزان تولید پپتید افزایش می یابد چرا که با افزایش نرخ تلقیح کشت همراه میزان فعالیت پروتئولیتیک این سویه ها افزایش می یابد [۴۵]. تار^{۱۰} و همکاران (۲۰۰۸)، اثر فاکتورهای مستقل نرخ تلقیح باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس^{۱۱} و استرپتوکوکوس ترموفیلوس^{۱۲} به صورت کشت تک و کشت همراه را در جهت بهینه سازی تولید زیست توده، اسیدلاکتیک و آنزیم β-گالاکتوزیداز (پاسخ) در محیط حاوی آب پنیر مورد بررسی قرار دادند. نتایج این گزارش نشان داد که شرایط بهینه برای تولید زیست توده، اسید لاکتیک و آنزیم β-گالاکتوزیداز، کشت همراه دو باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس به نسبت ۱,۶۶:۱,۶۲ می باشد. چرا که لاکتوباسیلوس ها می توانند از طریق پپتیدهای تولیدی مکانیسم استرپتوکوک ها را تحریک کنند و فعالیت آنزیم ها پروتئولیتیک لاکتوباسیلوس

در شکل ۸، نمودار (a) نشان می دهد زمانی که pH در محیط تخمیر ثابت در نظر گرفته شود، میزان تولید زیست توده خشک متناسب با کاهش نرخ تلقیح، به تدریج افزایش یافته است. در مقابل، هنگامی نرخ تلقیح در نمودار ثابت در نظر گرفته شود، میزان تولید زیست توده خشک با افزایش pH، افزایش می یابد. از طرف دیگر نمودار (b) اثر متقابل نرخ تلقیح و pH بر میزان تولید زیست توده خشک را نشان می دهد. همچنین، اگر به طور همزمان نرخ تلقیح به ۱ درصد کاهش یابد و pH به ۸ افزایش یابد، میزان تولید زیست توده خشک به میزان بیشتری نسبت به زمانی که هر دو فاکتور به تنهایی اعمال شوند، افزایش می یابد. به نظر می رسد که هرچه میزان نرخ تلقیح باکتری در بستر کشت لجن لینی بیشتر شود به دلیل ایجاد رقابت و محدودیت سوبسترا مورد نیاز برای رشد باکتری، باکتری نمی تواند فاز اولیه رشد را طی کند و تولید زیست توده کاهش می یابد.

رائو^۱ و همکاران (۲۰۲۳)، اثر فاکتورهای مستقل نرخ تلقیح مجموعه ای از باکتری های اسید لاکتیک شامل لاکتوباسیلوس پاراکازی^۲، لاکتوباسیلوس بوکتری^۳ و لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و زمان تخمیر را در جهت بهینه سازی عملکرد ذرات بامبو برای تشکیل تخته خرده چوب بدون چسب^۴ مورد بررسی قرار دادند. نتایج این گزارش نشان داد که تخمیر توسط مجموعه باکتری های اسید لاکتیک مشخص دارای سرعت تجزیه بالاتری نسبت به تخمیر باکتریایی اسید لاکتیک است. هنگامی که نسبت اختلاط لاکتوباسیلوس پاراکازی، لاکتوباسیلوس بوکتری و

5 - Dineshbhai

6- co-culture

7 - *Lactobacillus fermentum* KGL48 - *Saccharomyces cerevisiae* WBS2A

9 - Whey protein concentrate-80

10 - Tar

11- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*12- *Streptococcus thermophilus*

1 - Rao

2- *Lactobacillus paracasei*3- *Lactobacillus buchneri*

4- Binderless particleboard

متابولیت‌ها با استفاده از روش‌های ارزان و مقرون به صرفه، بسیار مورد توجه محققان مختلف قرار گرفته است. لجن لبنی محصول فرعی کارخانه‌های لبنی است که علاوه بر ارزان بودن آن، حاوی انواع مواد مغذی مانند پروتئین، قند، چربی، ویتامین‌ها و مواد معدنی است. با استفاده از بهینه‌سازی شرایط تخمیر می‌توان از این باکتری استفاده کارآمد داشت، به همین منظور از روش سطح پاسخ با طرح مکعب مرکزی شامل متغیرهای مستقل غلظت لجن لبنی (۵، ۱۲، ۵ و ۲۰ درصد)، pH (۶، ۷ و ۸) و نرخ تلقیح این باکتری (۱، ۳ و ۵ درصد) در جهت بیشینه میزان تولید زیست‌توده خشک استفاده شد. نتایج بهینه‌سازی نشان داد که حداکثر میزان تولید زیست‌توده خشک مربوط به تیمار بهینه شامل ۲۰ درصد غلظت لجن لبنی، نرخ تلقیح ۱ درصد و pH ۸ می‌باشد. اثر غلظت بستر لجن لبنی و pH بر تولید زیست‌توده خشک توسط این باکتری بسیار معنی‌دار بود و با افزایش غلظت لجن لبنی و pH میزان تولید زیست‌توده خشک افزایش یافت و از سوی دیگر متغیر مستقل نرخ تلقیح اثر منفی بر میزان تولید زیست‌توده خشک داشت. باتوجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که محیط کشت لجن لبنی محیط مناسبی برای رشد سویه بوده و می‌توان از آن در مقیاس تجاری به عنوان بستر مناسب استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه مصوب با کد ۵۹۰۵۵ / ۳ در دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

بولگاریکوس نسبت به استرپتوکوکوس ترموفیلوس بیشتر است و استرپتوکوکوس ترموفیلوس می‌تواند از آن بهره‌مند شود و در عوض استرپتوکوکوس ترموفیلوس ترکیباتی تولید می‌کند که می‌تواند رشد لاکتوباسیلوس بولگاریکوس را تحت تاثیر خود قرار دهد [۴۶].

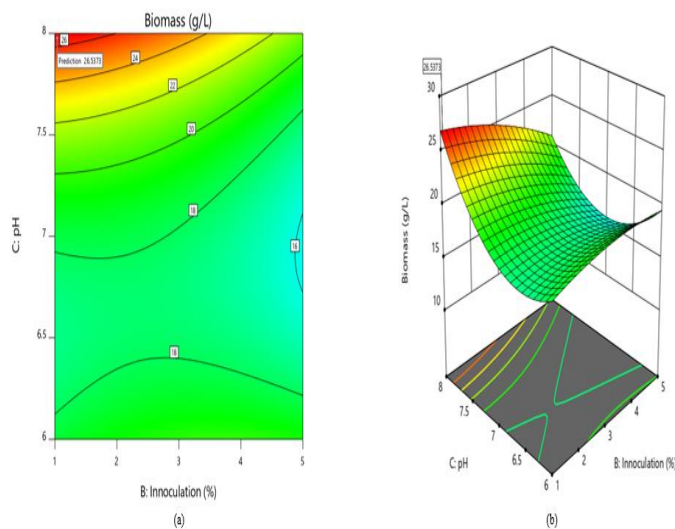


Fig 8 Investigating the effect of inoculation rate and pH on dry biomass production

۴- نتیجه‌گیری

زیست‌توده باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم سویه ۴-۱۷ دارای ترکیبات مفیدی نظیر پپتید زیست فعال، باکتریوسین، اسیدلاکتیک و L-گلوتامات می‌باشد، برای تولید این

۵- منابع

- [1]Wang, S .G., Gong, W .X., Liu, X .W., Tian, L., Yue, Q .Y., and Gao, B. Y. 2007. Production of a novel bioflocculant by culture of *Klebsiella mobilis* using dairy wastewater. *J. Biochem. Eng*, 36(2): 81-86.
- [2]Demirel, B., Yenigun, O., and Onay, T .T. 2005. Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. *J. Process Biochem*, 40(8): 2583-2595.
- [3]Porwal, H .J., Mane, A .V., and Velhal, S .G. 2015. Biodegradation of dairy effluent by using microbial isolates obtained from activated sludge. *J. Water Resour. Ind*, 9: 1-15.
- [4]Lins, M., Puppini Zandonadi, R., Raposo, A., and Ginani, V .C. 2021. Food waste on foodservice: An overview through the perspective of sustainable dimensions. *J. Foods*, 10(6): 1175.
- [5]Lappa, I .K., Papadaki, A., Kachrimanidou, V., Terpou, A., Koulougliotis, D., Eriotou, E., and Kopsahelis, N. 2019. Cheese whey processing: integrated biorefinery concepts and emerging food applications. *J. Foods*, 8(8): 347.
- [6]Falah, F., Vasiee, A., Tabatabaei-Yazdi, F., Moradi, S., and Sabahi, S. 2022. Optimization of γ -aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus* spp. from agro-food waste. *J. Biomass Convers*, 1-13.
- [7]Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S .A., and Noorbakhsh, H. 2018. Diversity and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from horreh, a traditional Iranian fermented food. *J. Probiotics Antimicrob*, 10: 258-268.
- [8]Sengun, I .Y., and Karapinar, M. 2012. Microbiological quality of T arhana, T urkish cereal based fermented food. *J. Qual. Assur. Saf*, 4(1): 17-25.
- [9]Tamime, A .Y., and Thomas, L .V. (Eds.) . 2018. Probiotic dairy products. John Wiley & Sons.
- [10]Bacha, K., Mehari, T., and Ashenafi, M. 2010. Antimicrobial susceptibility patterns of LAB isolated from wakalim, a traditional ethiopian fermented sausage. *J. Food Saf*, 30(1): 213-223.
- [11]Mathara, J .M., Schillinger, U., Kutima, P .M., Mbugua, S .K., and Holzapfel, W .H. 2004. Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *J. Int. Food Microbiol*, 94(3): 269-278.
- [12]Canon, F., Nidelet, T., Guédon, E., Thierry, A., and Gagnaire, V. 2020. Understanding the mechanisms of positive microbial interactions that benefit lactic acid bacteria co-cultures. *J. Front Microbiol*, 11: 2088.
- [13]Vasiee, A., Falah, F., Sankian, M., Tabatabaei-Yazdi, F., and Mortazavi, S .A. 2020. Oral immunotherapy using probiotic ice cream containing recombinant food-grade *Lactococcus lactis* which inhibited allergic responses in a BALB/c mouse model. *J. Immunol. Res*, 2020: 2635230.
- [14]García-Ruiz, A., de Llano, D .G., Esteban-Fernández, A., Requena, T., Bartolomé, B., and Moreno-Arribas, M .V. 2014. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *J. Food Microbiol*, 44: 220-225.
- [15]Ouweland, A .C., Salminen, S., and Isolauri, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the seventh Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications*. Egmond aan Zee, the Netherlands (pp. 279-289). Springer Netherlands.
- [16]Falah, F., Vasiee, A., Yazdi, F .T., and Behbahani, B .A. 2021. Preparation and functional properties of synbiotic yogurt fermented with *Lactobacillus brevis* pml1 derived from a fermented cereal-dairy product. *J. Biomed Res. Int*, 2021.
- [17]Mosallaie, F., Jooyandeh, H., Hojjati, M., and Fazlara, A. 2020. Biological reduction of aflatoxin B1 in yogurt by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Food Sci. Biotechnol*, 29(6): 793-803.
- [18]Falah, F., Vasiee, A., Behbahani, B .A., Yazdi, F .T., Moradi, S., Mortazavi, S .A., and Roshanak, S. 2019. Evaluation of adherence and anti-infective properties of probiotic *Lactobacillus fermentum*

- strain 4-17 against *Escherichia coli* causing urinary tract infection in humans. *J. Microb. Pathog*, 131: 246-253.
- [19]de Souza, B .M .S., Borgonovi, T .F., Casarotti, S .N., Todorov, S .D., and Penna, A .L .B. 2019. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* strains isolated from mozzarella cheese: probiotic potential, safety, acidifying kinetic parameters and viability under gastrointestinal tract conditions. *J. Probiotics Antimicrob*, 11: 382-396.
- [20]Joyndeh, H., Alizadeh Behbahani, B., and Noshad, M., 2021. Investigating the effect of inulin on the viability of *Lactobacillus fermentum* strain 4-17 in practical ice cream and evaluating its microbial and physicochemical characteristics. *J. F.S.T*, 18(113): 91-100.
- [21]Chicatto, J .A., Costa, A., Nunes, H., Helm, C .V., & Tavares, L. 2014. Evaluation of hollocelulase production by *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler during the submerged fermentation growth using RSM. *J. Braz. Biol*, 74: 243-250.
- [22]Horackova, S., Vesela, K., Kloidova, I., Bercikova, M., and Plockova, M. 2020. Bile salt hydrolase activity, growth characteristics and surface properties in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Eur. Food Res. Technol*, 246: 1627-1636.
- [23]Liu, T., Li, Y., Chen, J., Sadiq, F .A., Zhang, G., Li, Y., and He, G. 2016. Prevalence and diversity of lactic acid bacteria in Chinese traditional sourdough revealed by culture dependent and pyrosequencing approaches. *J. LWT-FOOD SCI TECHNOL*, 68: 91-97.
- [24]Li, J., Zhang, W., Li, X., Ye, T., Gan, Y., Zhang, A., and Liu, Y. 2018. Production of lactic acid from thermal pretreated food waste through the fermentation of waste activated sludge: effects of substrate and thermal pretreatment temperature. *J. Bioresour. Technol*, 247: 890-896.
- [25]Singh, A .K., Singh, G., Gautam, D., and Bedi, M .K. 2013. Optimization of dairy sludge for growth of *Rhizobium* cells. *J. Biomed Res. Int*, 2013.
- [26]Harrigan, W .F., and McCance, M .E. 1976. *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic Press Inc.(London) Ltd.
- [27]Mahon, C .R., and Manuselis, G. (Eds.). 2000. *Textbook of diagnostic microbiology* (Vol. 355). WB Saunders company.
- [28]Ghazanfari, N., Falah, S., Vasiee, A., and Yazdi, F .T. 2023. Optimization of fermentation culture medium containing food waste for l-glutamate production using native lactic acid bacteria and comparison with industrial strain. *J. LWT*, 114871.
- [29]Oleksy-Sobczak, M., Klewicka, E., and Piekarska-Radzik, L. 2020. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains—Optimization of synthesis and extraction conditions. *J. LWT*, 122: 109055.
- [30]Choi, G .H., Lee, N .K., and Paik, H .D. 2021. Optimization of medium composition for biomass production of *Lactobacillus plantarum* 200655 using response surface methodology. *J. Microbiol. Biotechnol*. 31(5): 717-725
- [31]Sharmila, V .G., Angappane, S., Gunasekaran, M., Kumar, G., and Banu, J .R. 2020. Immobilized ZnO nano film impelled bacterial disintegration of dairy sludge to enrich anaerobic digestion for profitable bioenergy production: Energetic and economic analysis. *J. Bioresour. Technol*, 308: 123276.
- [32]Eskandari, E., Tabatabai Yazdi, F., Mortazavi S .A., and Kochaki. A., optimization of exopolysaccharide production by *Rhizubium radiobacter* PTCC 1654 bacteria in dairy sludge using statistical response surface method. *J. F.S.T*, 15(81): 201-215.
- [33]Gharibzahedi, S .M .T., Mousavi, S .M., Hamed, M., Rezaei, K., and Khodaiyan, F. 2013. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of Persian walnut oil obtained by several extraction methods. *J. Ind Crops Prod*, 45: 133-140.
- [34]Koocheki, A., Taherian, A .R., Razavi, S .M., and Bostan, A. 2009. Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds. *J. Food Hydrocoll*, 23(8): 2369-2379.
- [35]Silva, M .F., Fornari, R .C., Mazutti, M .A., de Oliveira, D., Padilha, F .F., Cichoski, A .J., and Treichel, H. 2009. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *J. Food Eng*, 90(1): 119-123.

- [36]Hasegawa, M., Yamane, D., Funato, K., Yoshida, A., and Sambongi, Y. 2018. Gamma-aminobutyric acid
- [37]Moradi, S., Zeraatpisheh, F., and Tabatabaee-Yazdi, F. 2022. Investigation of lactic acid production in optimized dairy wastewater culture medium. *J. Biomass Convers. Biorefin*, 1-12.
- [38]Falah, F., Vasiee, A., Tabatabaei-Yazdi, F., Moradi, S., and Sabahi, S. 2022. Optimization of γ -aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus* spp. from agro-food waste. *J. Biomass Convers. Biorefin*, 1-13.
- [39]Schepers, A .W., Thibault, J., and Lacroix, C. 2002. *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. Multiple factor kinetic analysis. *J. Enzyme Microb. Technol*, 30(2): 176-186.
- [40]Chasoy, G .R., Chairez, I., and Durán-Páramo, E. 2020. Carbon/nitrogen ratio and initial pH effects on the optimization of lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp *casei* NRRL-441. *J. Carbon*, 27(10).
- [41]Talluri, V .P., and Lanka, S .S. 2017. Optimization of cultural parameters for the production of antimicrobial compound from *Lactobacillus fermentum* (MTCC No. 1745). *J. Bacteriol. Mycol*, 4(5).
- [42]Wang, X., Shao, C., Liu, L., Guo, X., Xu, Y., and Lü, X. 2017. Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. *J. Int. Biol. Macromol*, 103: 1173-1184.
- [43]Jawad, A .H., Alkarkhi, A .F., Jason, O .C., Easa, A .M., and Norulaini, N .N. 2013. Production of the lactic acid from mango peel waste–Factorial experiment. *J. King Saud Univ. Sci*, 25(1): 39-45.
- [44]Fu, R., Guan, M., Wang, G., Pan, L., and Li, Y. 2023. Optimised fermentation of bamboo waste using three types lactic acid bacteria and forming mechanism of binderless particleboard. *J. Ind Crops Prod*, 196: 116522.
- [45]Dineshbhai, C .K., Basaiawmoit, B., Sakure, A .A., Maurya, R., Bishnoi, M., Kondepudi, K .K., and Hati, S. 2022. Exploring the potential of *Lactobacillus* and *Saccharomyces* for biofunctionalities and the release of bioactive peptides from whey protein fermentate. *J. Food Biosci*, 48: 101758.
- [46]Tari, C., Ustok, F .I., and Harsa, S. 2009. Optimization of the associative growth of novel yoghurt cultures in the production of biomass, β -galactosidase and lactic acid using response surface methodology. *J. Int. Dairy*, 19(4): 236-243.



Scientific Research

Modeling of microbial biomass production by *Lactobacillus fermentum* 4-17 isolated from Tarkhineh in dairy sludge optimized by response surface methodology (RSM)

Alireza Heydarian¹, Farideh Tabatabai Yazdi^{2*}, Seyed Ali Mortazavi², Fereshte Fallah³

1-Master's student, Educational Department of Food Science and Engineering, Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Professor, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Ph.D., Educational Department of Food Science and Engineering, Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

ABSTRACT

Dairy sludge is one of the main and inexpensive wastes of the dairy industry, which contains the nutrients necessary for the growth of lactic acid bacteria (LAB) to produce microbial metabolites, and for its efficient use, optimization of fermentation conditions is critical. In order to optimize the production of dry biomass, three independent variables of dairy sludge concentration (5, 12.5 and 20%), pH (6, 7 and 8) and the inoculation rate of *Lactobacillus fermentum* strain 4-17 (1, 3 and 5%) were used. Before fermentation, the cell growth and morphology of this bacterium were examined in order to determine the function of the growth rate and confirm the presence of bacteria in this medium. The independent variables were optimized using response surface method (RSM) with central composite design (CCD) in order to maximize dry biomass production by this bacterium. The optimization results showed that the maximum amount of dry biomass production related to the optimal treatment included 20% dairy sludge concentration, 1% inoculation rate and pH 8. Also, according to the results, the dairy sludge substrate is suitable for the fermentation of this bacterium. As a result, the effect of dairy sludge bed concentration and pH on dry biomass production by this bacteria was very significant.

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2023/5/22

Accepted: 2023/6/26

Keywords:

Dairy wastewater,
Response surface method,
Lactobacillus fermentum 4-17,
Modeling

DOI: 10.22034/FSCT.20.137.191

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.137.13.3

*Corresponding Author E-Mail:
tabatabai@um.ac.ir