Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 4 (September - October)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Bioaccumulation of Vitamin D3 by *Lactobacillus plantarum* and Optimization with Response Surface Methodology

Morteza Mohajeri Amiri[1], Mohammad Reza Fazeli[2], Nasrin Samadi[2], Mohsen Amini[3], Nasim Hayati Roodbari[1]

1. Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Quality Assurance Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Drug Design, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2017/05/14
Accepted: 2017/06/18
Available online: 2017/09/12

Article Subject:
Food Microbiology

IJMM 2017; 11(4): 35-44

Corresponding author:

Dr. Nasrin Samadi

Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Quality Assurance Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: 0982164121307

Email:
samadin@tums.ac.ir

Abstract

Background and Aims: Vitamin D3 deficiency can causes many diseases such as rickets, osteopenia and osteoporosis and increases the risk of some types of cancer. Probiotic strain of *Lactobacillus plantarum*, which can store fat-soluble vitamin D3 in its bulk, can reduce the effects of vitamin D3 deficiency in addition to being able to produce products with probiotic benefits.

Materials and Methods: This research was carried out in 2016. By designing the one-factor-at-a- time tests, the range of possible effective variables on vitamin D3 absorption in bacterial mass and effective factors were selected. Optimization of vitamin D3 entrapment in biomass of bacteria was performed using response surface methodology via Box-Behnken design. The high-performance liquid chromatography was employed for determination of vitamin D3 quantities.

Results: Among the parameters affecting vitamin D3 entrapment, three factors including incubation temperature, initial vitamin D3 and sucrose concentrations were most effective. The optimal points were obtained at vitamin D3 concentration of 351723.537 IU/mL, sucrose concentration of 2.89 (g/L) and incubation temperature of 33.8 °C. The maximum value of vitamin D3 in dry cell weight of *L. plantarum* was 1028.5 IU/g which was consistent with the proposed statistical model.

Conclusions: In this study *L. plantarum* enriched with vitamin D3 was produced and optimized for the first time. Experimental and statistical studies confirm the accuracy and reliability of this optimization.

KeyWords: *Lactobacillus plantarum*, Vitamin D3, Box-Behnken design, Response surface methodology

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Downloaded from ijmm.ir at 14:35 +0330 on Sunday February 17th 2019

Eim. of

How to cite this article:

Mohajeri Amiri M, Fazeli MR, Samadi N, Amini M, Hayati Roodbari N. Bioaccumulation of Vitamin D3 by *Lactobacillus plantarum* and Optimization with Response Surface Methodology. 2017; 11 (4): 35-44

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۴ – مهر و آبان ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

تجمع زیستی ویتامین D3 توسط باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و بهینه‌سازی آن با روش رویه پاسخ

مرتضی مهاجری امیری[۱]، محمدرضا فاضلی[۲]، نسرین صمدی[۲]، محسن امینی[۳]، نسیم حیاتی رودباری[۱]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات تضمین کیفیت دارو، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۲۴
پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۲۸
انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱
موضوع:
میکروبیولوژی مواد غذایی

IJMM 1396; 11(4): 35-44

نویسنده مسئول:
دکتر نسرین صمدی

گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات تضمین کیفیت دارو، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۲۱۶۴۱۲۱۳۰۷

پست الکترونیک:
samadin@tums.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: اثر کمبود ویتامین D3 درخطر ابتلای به بیماری‌هایی مانند نرمی استخوان، استئوپنی، پوکی استخوان و انواع سرطان، به‌خوبی شناخته‌شده است. سویه پروبیوتیک باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که بتواند ویتامین محلول در چربی D3 را در توده زیستی خود ذخیره کند، علاوه بر اینکه می‌تواند زمینه‌ساز تولید محصولاتی با مزایای پروبیوتیک شود، احتمالاً اثرات نقص ویتامین D3 را کاهش خواهد داد.

مواد و روش کار: در این مطالعه که در سال ۱۳۹۵ انجام شد، با طراحی آزمایش‌های یک فاکتور در زمان، گستره متغیرهای مؤثر احتمالی بر جذب ویتامین D3 در توده زیستی باکتری مشخص و فاکتورهای مؤثر انتخاب گردیدند. سپس با طرح رویه پاسخ، با انجام آزمایش‌های باکس- بنکن این متغیرها بهینه‌سازی شدند. روش تعیین کمی ویتامین در توده زیستی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) می‌باشد.

یافته‌ها: از میان فاکتورهای بررسی‌شده، سه فاکتور دما، غلظت اولیه ویتامین D3 و غلظت ساکارز از بقیه اهمیت بیشتری داشت. در غلظت اولیه ویتامین D3 IU/mL ۳۵۱۷۲۳/۵۳۷، غلظت ساکارز افزوده‌شده به محیط کشت (g/L) ۲/۸۹ و دمای ۳۳/۸ درجه سلسیوس، بیشترین میزان انباشته شدن ویتامین در وزن خشک سلولی (IU/g ۱۰۲۸/۵) به دست آمد که با مدل آماری پیشنهادی مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری: این مطالعه، اولین گزارش در زمینه غنی‌سازی توده زیستی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با ویتامین D3 و بهینه‌سازی آن می‌باشد. مطالعات آزمایشگاهی و آماری انجام‌شده نشان‌دهنده صحت و اعتبار این بهینه‌سازی می‌باشد.

کلمات کلیدی: *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، ویتامین D3، آزمایش‌های باکس- بنکن، طرح رویه پاسخ

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

امروزه به علت شیوع سوءتغذیه و بیماری‌های ناشی از آن در جهان بحث غنی‌سازی مواد غذایی انسان و دام با ویتامین‌ها و املاح موردنیاز بسیار حائز اهمیت است (۱). ساده‌ترین شکل‌های غنی‌سازی عبارت است از اضافه کردن ریزمغذی‌هایی مثل سلنیوم، روی، مس، آهن، منگنز و ویتامین‌هایی مثل ویتامین‌های گروه A، B، D، E و ... به مواد غذایی که ممکن است با مشکلاتی مثل تخریب و ناپایداری این ترکیبات در مواد غذایی، عدم جذب مناسب آن‌ها توسط انسان یا دام و یا ایجاد سمیت آن‌ها در مقادیر بالا مواجه باشد (۲). یکی از راه‌هایی که اخیراً برای غنی‌سازی مواد غذایی با مواد ضروری یادشده، به‌کاربرده می‌شود اضافه کردن یا ترکیب آن‌ها با مواد آلی است. میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک مانند *لاکتوباسیل* ها، که همواره از آن‌ها به‌عنوان غذا یا افزودنی‌های مفید یاد می‌شود، حامل مناسبی برای این منظور به شمار می‌روند. مطالعات مختلف نشان داده است که اگر پروبیوتیک ها به میزان کافی در رژیم غذایی انسان و دام وجود داشته باشند علاوه بر اینکه فضاهای اکولوژیک لوله گوارش را از

Downloaded from ijmm.ir at 14:35 +0330 on Sunday February 17th 2019

Downloaded from ijmm.ir at 14:35 +0330 on Sunday February 17th 2019

دسترس میکروارگانیسم‌های پاتوژن حفظ می‌کنند، با ایجاد تعادل میان باکتری‌های مفید و مضر روده باعث یک تغییر مثبت در میکروفلور روده شده و عمل هضم مواد غذایی را بهبود می‌بخشند. همچنین، سویه‌های پروبیوتیک ایمنی موضعی لوله گوارشی را نیز تحریک می‌کنند (۳).

نقش ویتامین D3 (cholecalciferol) در تنظیم تعادل کلسیم در استخوان به‌خوبی توصیف‌شده است. در سال‌های اخیر نقش این ویتامین در تنظیم سیستم ایمنی شامل دفاع سلولی، رفع التهاب و ترمیم موردتوجه قرارگرفته است. کمبود ویتامین D3 هم در برخی کشورهای توسعه‌یافته و هم در اغلب کشورهای درحال‌توسعه شایع می‌باشد. در مطالعات اخیر ارتباط بیماری‌های تنفسی نیز با کمبود ویتامین D3 مشخص گردیده است. مطالعات همه‌گیرشناسی نشان می‌دهد که سطح پایین ویتامین D3 با اختلال عملکرد ریوی، افزایش بروز بیماری‌های نئوپلاستیک، عفونی و التهابی در ارتباط می‌باشد. مکانیسم‌های زمینه‌ای دخیل در این بیماری‌ها به‌طور کامل شناخته‌نشده است؛ بااین‌وجود، به نظر می‌رسد میزان ویتامین D3 بر روی عملکرد سلول‌های ایمنی مثل سلول‌های دندرتیک، لنفوسیت‌های B و T، منوسیت‌ها و سلول‌های اپیتلیال تأثیر می‌گذارد. مقادیر قابل‌توجهی از ویتامین D3 در پوست انسان تحت تابش نور خورشید تشکیل می‌شود؛ ولیکن در فصول پاییز و زمستان کمبود ویتامین D3 می‌تواند کودکان را به بیماری‌های عفونی ازجمله عفونت‌های باکتریایی و ویروسی مستعد سازد. ارتباط بین سطوح ویتامین D3 و عملکرد ایمنی خصوصاً در اطفال، استفاده از مکمل‌های ویتامین D3 را ضروری نشان می‌دهد (۴).

پروبیوتیک ها علاوه بر اینکه خود تولیدکننده یک سری ویتامین‌ها و حامل یک سری املاح هستند، اگر ریزمغذی‌ها (ویتامین‌ها و املاح ضروری) به نحوی در توده زیستی آن‌ها وارد گردد به‌این‌علت که در سیستم گوارش انسان و دام باقی می‌مانند، احتمالاً باعث آزاد شدن و جذب تدریجی این ریزمغذی‌ها در لوله گوارش میزبان خواهند شد. ازآنجایی‌که کمبود ویتامین‌های محلول در چربی امروزه فراگیر شده است اگر بتوان ویتامین‌ها را در توده زیستی باکتری‌های پروبیوتیک وارد کرد می‌توان محصولات پروبیوتیک کارآمدی تولید کرد که کیفیت و ماندگاری بالاتری داشته باشند و همچنین، محصولاتی غنی‌شده برای پیشگیری از بیماری‌های ناشی از کمبود ویتامین باشند. از مزایای دیگری که برای پروبیوتیک های غنی‌شده با ویتامین‌ها می‌توان ذکر کرد کاهش سمیت این عناصر در توده سلولی باکتری نسبت به زمانی است که به‌صورت آزاد در رژیم غذایی انسان و دام مورداستفاده قرار می‌گیرند (۵). یکی دیگر از مزایای احتمالی عمل غنی‌سازی، این است که یک محصول پروبیوتیک خود اثرات متعددی در زمینه جلوگیری از کلونیزه شدن پاتوژن ها در بدن، افزایش سطح ایمنی مخاطی، توانایی تثبیت فلور روده و غیره دارد که اگر بتوان آن را با یک یا چند ریزمغذی غنی نمود می‌توان محصولات جدید پروبیوتیک با کارایی و مزایای بیشتری تولید کرد (۶).

در این مطالعه از سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برای غنی‌سازی با ویتامین D3 استفاده شد. این میکروارگانیسم یک پروبیوتیک شناخته‌شده است و نقش آن در ایجاد تعادل میکروبی دستگاه گوارش، تثبیت آنزیم‌های گوارشی و نقش التیام‌بخش آن در سندروم روده تحریک‌پذیر (IBS) مشخص‌شده است (۶,۷). طراحی آزمایش و طرح رویه پاسخ، برای کاهش تعداد آزمایش‌های مبتنی بر سعی و خطا و کاهش هزینه‌های آزمایشگاهی در پژوهش‌های انجام‌شده در زمینه علوم پایه موردتوجه قرارگرفته است (۸). در این پژوهش به‌منظور بهینه‌سازی میزان جذب ویتامین D3 در توده سلولی باکتری از طرح رویه پاسخ و آزمایش‌های باکس- بنکن استفاده شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب سویه، شرایط کشت و غنی‌سازی

در این مطالعه از باکتری *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 که در فرآورده‌های پروبیوتیکی و محصولات تخمیری دارای اهمیت است استفاده شد. محیط کشت پایه برای کشت باکتری، MRS براث بوده است (این محیط از شرکت Merck آلمان تهیه و طبق روش ارائه‌شده، آماده‌سازی گردید).

در غنی‌سازی سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با ویتامین D3، محیط کشت MRS براث به‌طور جداگانه با غلظت‌های مختلف ویتامین D3 بین ۵۰۰۰۰ IU/mL تا ۵۰۰۰۰۰ در ارلن مایرهای تیره‌رنگ آماده شد. ویتامین D3 برای انحلال و هموژنیزه شدن در محیط کشت به توین ۸۰ به میزان ۰/۱٪ نیاز داشت. از کشت ۲۴ ساعته *لاکتوباسیل* مورد آزمون به میزان ۵٪ به محیط‌های با غلظت متفاوت ویتامین تلقیح شد و برای کشت اولیه، در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سلسیوس و pH حدود ۵/۷ گرمخانه گذاری گردیدند. سپس با طراحی آزمایش‌های یک متغیر در زمان،

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 14:35 +0330 on Sunday February 17th 2019

گستره و اثربخشی متغیرهای مؤثر احتمالی برافزایش جذب ویتامین D3 در توده سلولی باکتری، شامل: غلظت اولیه ویتامین در محیط کشت، میزان تلقیح اولیه باکتری به محیط کشت، میزان افزودن ساکارز، دمای گرمخانه گذاری، pH و زمان نمونه‌برداری موردبررسی قرار گرفت. نمونه‌ها پس از استخراج چربی ازنظر میزان ویتامین D3 موردسنجش قرار گرفتند.

استخراج ویتامین D3 از باکتری

ابتدا حجم معینی از محیط‌های کشت در ۳۰۰۰×g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی جدا گردید. رسوب حاصله سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو و در ۳۰۰۰×g سانتریفوژ شد. برای شکستن سلول باکتری ابتدا توده سلولی سه بار شسته شده باکتری در بافر فسفات سالین حاوی ۱٪ گلیسرول سوسپانسیون و ورتکس گردید. سپس لیزوزیم اضافه شد و سوسپانسیون حاصل مخلوط و هموژن گردید. محلول نهایی با فرکانس خفیف ۵ کیلوهرتز و مدت ۲۰ ثانیه سونیکه شد تا توده سلولی یکدست گردد. در مرحله بعد، لوله‌های فالکون حاوی نمونه در حمام یخ قرار گرفت. برای شکستن دیواره سلولی، سوسپانسیون‌های حاصل به مدت ۶۰ تا ۹۰ ثانیه در ۴۰ کیلوهرتز با پالس‌های ۱۰ ثانیه‌ای و وقفه ۶۰ ثانیه برای جلوگیری از داغ شدن نمونه و تخریب ویتامین‌ها سونیکه شدند. لایزیت های حاصل در ۴ درجه سلسیوس و دور ۱۰۰۰۰×g سانتریفوژ گردیدند. مایع رویی جدا گردید و از فیلتر ۰/۲۲ µm عبور داده شد.

برای استخراج ویتامین D3 از توده سلولی باکتری، ۵۰۰ میکرولیتر از مخلوط لیز شده سلولی (لایزیت) داخل میکروتیوب با گنجایش ۲ میلی‌لیتر اضافه گردید. به نمونه موردمطالعه، ۱۰۰۰ میکرولیتر ان- هگزان اضافه گردید و ۱۰ دقیقه ورتکس شد. نمونه با دور ۱۲۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. ۸۰۰ میکرولیتر از فاز آلی به لوله‌آزمایش منتقل گردید. با استفاده از دستگاه Block Heater (مدل SBH200D/3، شرکت Stuart، انگلستان) در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تحت گاز ازت حلال به‌سرعت تبخیر شد و باقی‌مانده در اتانول حل و برای آنالیز با HPLC استفاده گردید (۹).

شرایط کروماتوگرافی

کروماتوگرافی HPLC از نوع فازمعکوس و با روش ایزوکراتیک انجام شد. شرایط کروماتوگرافی عبارت بود از: فاز متحرک شامل متانول ۶۰٪، ایزوپروپانول ۲۸٪ و آب دیونیزه ۱۲٪، سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر در دقیقه، دگاز حلال‌های فاز متحرک قبل شروع کروماتوگرافی و در طول کار با گاز هلیوم، میزان دمیدن اولیه ۱۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و در طول کار با سرعت جریان ۱۰ میلی‌لیتر هلیوم در دقیقه. فاز ثابت شامل ستون C18 بود و ردیابی توسط دتکتور UV با طول‌موج ۲۶۵ نانومتر انجام شد. حجم لوپ تزریق ۵۰ میکرولیتر و حجم تزریقی توسط سرنگ همیلتون به داخل لوپ ۸۰ میکرولیتر بود. ثبت و پردازش داده‌ها و رسم منحنی‌ها توسط کامپیوتر و با استفاده از نرم‌افزار Millennium® (شرکت Waters، میلفورد، آمریکا) انجام شد. مدت ثبت داده‌ها برای هر تزریق (run time) ۲۲ دقیقه و زمان بازدارندگی (retention time) برابر ۱۴ دقیقه برای ویتامین D3 اندازه‌گیری شد.

بعد از آماده کردن سیستم HPLC و به تعادل و ثبات رسیدن فاز متحرک در مسیر ستون و فراهم آمدن شرایط لازم جهت تزریق نمونه ابتدا از محلول‌های کاری استاندارد به میزان ۸۰ میکرولیتر توسط سرنگ همیلتون در لوپ تزریق شد و پس از اطمینان از تعادل سیستم نمونه‌های باکتری آماده‌سازی و تزریق گردید. برای آماده‌سازی نمونه‌ها جهت تزریق به HPLC ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فاز متحرک در هر لوله حاوی عصاره نمونه افزوده و ۳۰ ثانیه ورتکس شد. سپس ۸۰ میکرولیتر از محلول حاصله توسط سرنگ همیلتون بعد از خارج کردن هوا و با دقت داخل لوپ تزریق شد.

طراحی آزمایش و طرح رویه پاسخ

از بین فاکتورهای موردبررسی از طریق روش یک متغیر در زمان، سه فاکتور غلظت اولیه ویتامین، دمای گرمخانه گذاری و میزان ساکارز افزوده‌شده، در غنی‌سازی *باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با ویتامین D3 مؤثر شناخته شدند. سپس با استفاده از طرح رویه پاسخ و مدل باکس- بنکن، ۱۷ آزمایش طراحی‌شده با نرم‌افزار آماری Design Expert® (نسخه ۱۰,۱,۱، شرکت Stat-Ease، مینیاپولیس، آمریکا) برای بررسی شرایط بهینه‌سازی سه فاکتور یادشده انجام گرفت. این آزمایش‌ها، هر متغیر را در سه سطح حداقل، حداکثر و بهینه بررسی می‌کند. تعداد ۵ آزمایش از سری آزمایش‌های باکس – بنکن، تکراری و برای بررسی دقت آزمون طراحی‌شده است. پاسخ آزمایش‌های باکس- بنکن با استفاده از نرم‌افزار آماری مذکور موردبررسی قرار گرفت و بهترین مدل ریاضی پیشنهادی مورداستفاده قرار گرفت. با تحلیل آماری

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 14:35 +0330 on Sunday February 17th 2019

پاسخ آزمایش‌های باکس- بنکن و بررسی آن‌ها توسط رسم نمودارهای آماری، نقطه بهینه توسط نرم‌افزار پیشنهاد شد. با انجام آزمایش پیشنهادی بالاترین میزان جذب ویتامین D3 توسط توده زیستی باکتری به دست آمد. برای بررسی نقاط بهینه و اثر هریک از سه متغیر موردبررسی بر آن، از نمودارهای سه‌بعدی استفاده گردید. آنالیز واریانس (ANOVA) و اندازه‌گیری آزمون F و P برای بررسی معنی‌داری بودن و صحت مدل موردبررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج آزمایش‌های یک متغیر در زمان برای شناسایی متغیرهای مؤثر

توسط انجام آزمایش‌های یک متغیر در زمان، گستره فاکتورهای احتمالی مؤثر، ازجمله: فاکتور دمای گرمخانه گذاری، میزان تلقیح باکتری به کشت اولیه، میزان غلظت اولیه ویتامین، زمان نمونه‌برداری، غلظت ساکارز اضافه‌شده به محیط کشت، زمان نمونه‌برداری و pH مشخص گردید. طبق این آزمایش‌ها، دمای بین ۳۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس، میزان تلقیح اولیه ویتامین بین $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{۷}$(cfu/mL)، میزان غلظت اولیه ویتامین D3 بین ۲۰۰۰۰۰ تا ۴۰۰۰۰۰ (IU/mL)، زمان نمونه‌برداری بین ساعت ۱۸ تا ۲۴، غلظت اولیه ساکارز اضافه‌شده به محیط کشت بین ۱ تا ۴ گرم در لیتر و pH ۶/۵ تا ۷/۵ بهترین گستره برای دستیابی به بیشترین میزان جذب ویتامین D3 در توده سلولی باکتری می‌باشند. نتایج مربوط به هر متغیر و تأثیر آن برجذب ویتامین D3 در وزن خشک باکتری، نشان داد که در میان این فاکتورهای بررسی‌شده، سه فاکتور دمای گرمخانه گذاری، غلظت اولیه ویتامین D3 و غلظت ساکارز افزوده به محیط کشت، تأثیر بیشتری بر پاسخ داشتند.

نتایج آزمایش‌های باکس- بنکن و انتخاب بهترین مدل پیشنهادی

همان‌طور که ذکر شد، با استفاده از نرم‌افزار آماری Design Expert® (نسخه ۱۰,۱,۱، شرکت Stat-Ease، مینیاپولیس، آمریکا)، طراحی آزمایش‌های باکس- بنکن برای سه متغیر دمای گرمخانه گذاری، غلظت اولیه ویتامین D3 و غلظت ساکارز افزوده به محیط کشت در سه سطح بالا، پایین و بهینه استفاده گردید. آزمایش‌های ۱۷ گانه باکس- بنکن انجام‌شده، شرایط آزمایش و پاسخ‌های به‌دست‌آمده، در جدول ۱ موجود است. در این آزمایش‌ها سه فاکتور مؤثر برای تعیین نقطه بهینه با مقادیر متفاوت طراحی شدند و همان‌طور که مشاهده می‌شود، مقادیر پاسخ در ۵ آزمایش انتهایی که برای تعیین خطای انسانی و ابزاری مورد ارزیابی قرار گرفت تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

جدول ۱: طراحی آزمایش‌های باکس – بنکن و پاسخ آن در غنی‌سازی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با ویتامین D3

پاسخ: میزان جذب ویتامین D3 در وزن خشک باکتری (IU/g)	فاکتور ۳ غلظت ویتامین D3 (IU/mL)	فاکتور ۲ دما (ºC)	فاکتور ۱ غلظت ساکارز (g/L)	ترتیب	استاندارد
۶۴۲/۹۰۶۱	۳۰۰۰۰۰/۰۰	۳۰/۰۰	۱/۰۰	۴	۱
۷۷۵/۲۹۹۱	۳۰۰۰۰۰/۰۰	۳۰/۰۰	۴/۰۰	۱۶	۲
۳۴۷/۴۰۷۶	۳۰۰۰۰۰/۰۰	۴۰/۰۰	۱/۰۰	۶	۳
۴۹۸/۶۴۷۳	۳۰۰۰۰۰/۰۰	۴۰/۰۰	۴/۰۰	۹	۴
۵۵۷/۹۱۴۴	۲۰۰۰۰۰/۰۰	۳۵/۰۰	۱/۰۰	۱۳	۵
۷۷۲/۸۶۲۱	۲۰۰۰۰۰/۰۰	۳۵/۰۰	۴/۰۰	۱۰	۶
۸۰۲/۷۴۹۹	۴۰۰۰۰۰/۰۰	۳۵/۰۰	۱/۰۰	۱۷	۷
۹۲۱/۱۸۳۸	۴۰۰۰۰۰/۰۰	۳۵/۰۰	۴/۰۰	۱۱	۸
۶۷۵/۵۸۲۸	۲۰۰۰۰۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲/۵۰	۵	۹
۳۶۵/۸۰۱۹	۲۰۰۰۰۰/۰۰	۴۰/۰۰	۲/۵۰	۱۴	۱۰
۸۱۵/۴۹۳۸	۴۰۰۰۰۰/۰۰	۳۰/۰۰	۲/۵۰	۸	۱۱
۵۸۲/۳۲۲۲	۴۰۰۰۰۰/۰۰	۴۰/۰۰	۲/۵۰	۱	۱۲
۹۵۸/۵۰۱۱	۳۰۰۰۰۰/۰۰	۳۵/۰۰	۲/۵۰	۲	۱۳
۹۷۲/۶۰۶۶	۳۰۰۰۰۰/۰۰	۳۵/۰۰	۲/۵۰	۷	۱۴
۹۶۲/۴۵۳۷	۳۰۰۰۰۰/۰۰	۳۵/۰۰	۲/۵۰	۳	۱۵
۹۸۷/۷۱۵۸	۳۰۰۰۰۰/۰۰	۳۵/۰۰	۲/۵۰	۱۵	۱۶
۹۵۸/۷۳۳۴	۳۰۰۰۰۰/۰۰	۳۵/۰۰	۲/۵۰	۱۲	۱۷

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 14:35 +0330 on Sunday February 17th 2019

پاسخ‌های به‌دست‌آمده از آزمایش‌های باکس- بنکن، برای مدل‌سازی مورداستفاده قرار گرفت. نتایج بررسی‌شده با نرم‌افزار نشان داد که مدل خطی برای این مطالعه مناسب نیست. مدل‌های فاکتوریل و مدل‌های مکعبی (درجه سوم) و بالاتر نیز مناسب نبوده و مناسب‌ترین مدل حالت درجه دوم (Quadratic) شناخته شد. در این مدل درجه دوم، پارامترهای آماری R^2 و R^2 میانگین (adjusted R^2) بیشترین نزدیکی به عدد ۱ را داشتند. نقص برازش (Lack of fit) در این مدل معنی‌داری نیست (بهترین حالت برای این مقیاس معنی‌داری نبودن است) و مقدار P در کمترین حد خود قرار دارد (P <۰/۰۰۱) (جدول ۲).

جدول ۲: مقادیر آماری مقایسه‌ای برای انتخاب بهترین مدل طراحی باکس – بنکن در غنی‌سازی باکتری *L.plantarum* با ویتامین D3

مدل‌های ارائه‌شده	مقدار P ترتیبی	نقص در مقدار P	R میانگین ^{2}	R میانگین پیش‌بینی‌شده ^{2}	
درجه اول	۰/۰۹۷۰	۰/۰۰۰۱<	۰/۲۳۰۴	۰/۰۳۲۳	
مدل فاکتوریل	۰/۹۹۳۰	۰/۰۰۰۱<	۰/۰۰۸۰	۰/۷۶۶۶-	
درجه دوم	۰/۰۰۰۱<	۰/۳۹۹۲	۰/۹۹۶۲	۰/۹۸۵۹	مدل پیشنهادی
درجه سوم	۰/۳۹۹۲	----------	۰/۹۹۶۶	----------	

آنالیز واریانس و نتایج آزمون‌های آماری

در این مدل آزمون F (F Value) برابر ۵۶۴/۳۰ است که نشان می‌دهد تنها احتمال ۰/۰۱٪ خطا (noise) در مدل وجود دارد. این آزمون، اعتبار مدل را نشان می‌دهد. مقدار P در مدل کمتر از ۰/۰۰۱ است. اگر مقدار آن در مدل کمتر از ۰/۰۵ باشد نشان می‌دهد مدل فوق معنی‌داری است. ضرایب A معرف غلظت ساکارز، B معرف دما، C معرف غلظت اولیه ویتامین D3 و همچنین ضرایب A^2،B^2،C^2، AC و BC که تأثیر هر متغیر و تداخلات بین متغیرها را نشان می‌دهند، نیز دارای مقدار P کمتر از ۰/۰۵ هستند که نشان می‌دهد این ضرایب نیز معنی‌داری هستند. هرچه تعداد بیشتری از ضرایب معادله مدل معنی‌داری باشند مدل معتبرتر است. نقص برازش آزمون Lack of Fit F- F (value) نسبت به خطای خالص (pure error) در این مدل ۱/۰۹ است که معنی‌داری نیست. در مدل‌های آماری نقص برازش نسبت به خطای خالص نباید معنی‌داری باشد. بدین مفهوم که باید از ۰/۰۵ بیشتر باشد تا کفایت مدل تأیید گردد. در این مدل معنی‌داری، مقادیر R^2 پیش‌بینی‌شده و R^2 میانگین به هم بسیار نزدیک هستند که نشانگر صحت مدل در پیشگویی است. فاکتور کفایت دقت(Adeq Precision) باید بیش از ۴ باشد. در این مدل این میزان ۶۶/۹۳۳ است که دقت مدل را نشان می‌دهد. ضریب تغییرات ۱/۷۱٪ نشان‌دهنده میزان تغییرات کم مدل انتخابی، حول انحراف استاندارد است که قابل‌اطمینان بودن مدل را اثبات می‌کند (جدول ۳).

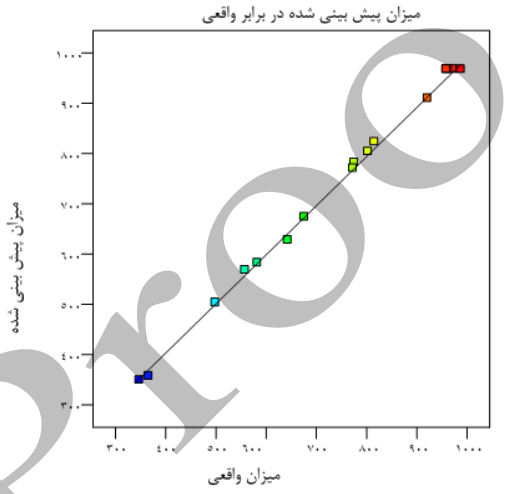
جدول ۳: آنالیز واریانس ANOVA مدل درجه دوم تغییریافته در غنی‌سازی باکتری *L. plantarum* با ویتامین D3

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P	
مدل	۱۰^5×۷/۲۸۰	۸	۹۱۰۰۷/۶۱	۵۶۴/۳۰	۰/۰۰۰۱<	معنی‌داری
A-غلظت ساکارز	۴۷۵۸۸/۳۶	۱	۴۷۵۸۸/۳۶	۲۹۵/۰۹	۰/۰۰۰۱<	
B-دما	۱۰^5 ×۱/۵۵۴	۱	۱۰^5 ×۱/۵۵۴	۹۶۳/۸۲	۰/۰۰۰۱<	
C-غلظت اولیه ویتامین	۷۰۲۳۵/۴۲	۱	۷۰۲۳۵/۴۲	۴۳۵/۵۳	۰/۰۰۰۱<	
AC	۲۳۲۸/۷۲	۱	۲۳۲۸/۷۲	۱۴/۴۴	۰/۰۰۵۲	
BC	۱۴۶۷/۲۳	۱	۱۴۶۷/۲۳	۹/۱۰	۰/۰۱۶۷	
^{2}A	۶۴۷۷۲/۲۵	۱	۶۴۷۷۲/۲۵	۴۰۱/۶۵	۰/۰۰۰۱<	
^{2}B	۱۰^5×۳/۲۵۲	۱	۱۰^5×۳/۲۵۲	۲۰۱۶/۴۸	۰/۰۰۰۱<	
^{2}C	۲۷۱۴۶/۲۳	۱	۲۷۱۴۶/۲۳	۱۶۸/۳۳	۰/۰۰۰۱<	
باقی‌مانده	۱۲۹۰/۱۳	۸	۱۶۱/۲۷			
نقص برازش	۶۷۳/۳۳	۴	۱۶۸/۳۳	۱/۰۹	۰/۴۶۷۲	غیر معنی‌داری
خطای خالص	۶۱۶/۷۹	۴	۱۵۴/۲۰			
میزان مجموع	۱۰^5×۷/۲۹۳	۱۶				
^{2}R	۰/۹۹۸۲					
R میانگین ^{2}	۰/۹۹۶۵					
R میانگین پیش‌بینی‌شده ^{2}	۰/۹۸۸۸					
کفایت دقت	۶۶/۹۳۳					
درصد ضریب تغییرات	۱/۷۱					

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 14:35 +0330 on Sunday February 17th 2019

برای ارزیابی مدل انتخاب‌شده در طرح باکس- بنکن از نمودارهای آماری استفاده شد. نمودار داده‌های حقیقی نسبت به مقادیر پیشگویی شده برای تعیین خطای ثابت کاربرد دارد. مقادیر مشخص‌شده در این نمودار باید از الگوی خطی تبعیت کنند تا مدل انتخابی، قابل‌قبول باشد. در این مطالعه پراکندگی داده‌های حول خط ۴۵ درجه نشان‌دهنده پیش‌بینی خوب مدل ارائه‌شده است (نمودار ۱).



نمودار ۱: توزیع نرمال موارد حقیقی نسبت به مقادیر پیشگویی شده در مدل باکس- بنکن برای غنی‌سازی باکتری *L. plantarum* با ویتامین D3

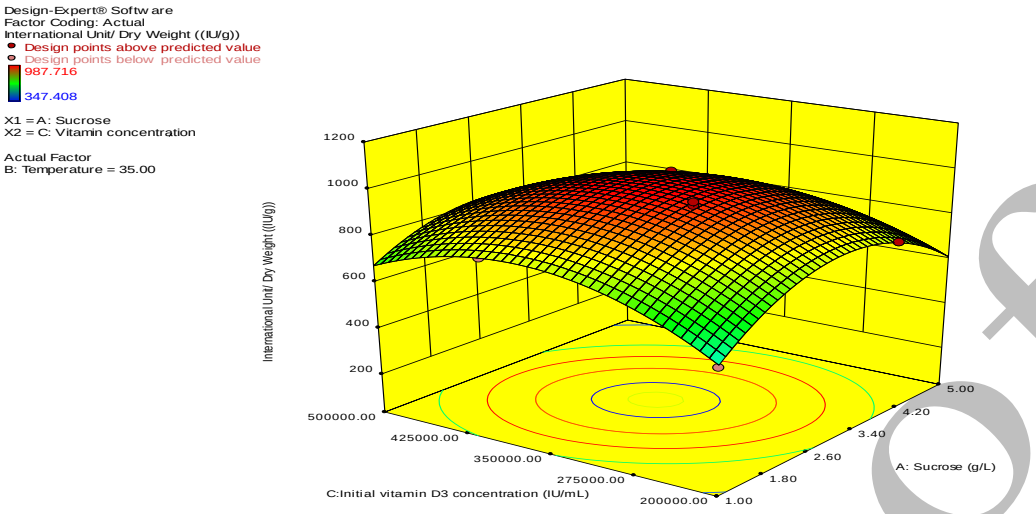
مقدار بهینه جذب ویتامین D3 در توده زیستی باکتری و اعتبارسنجی آن

مدل انتخاب‌شده برحسب مقادیر پاسخ، پیشنهاد می‌دهد که در غلظت اولیه ویتامین D3 IU/mL ۳۵۱۷۲۳/۵۳۷، غلظت ساکارز افزوده‌شده به محیط کشت (g/L) ۲/۸۹ و دمای ۳۳/۸ درجه سلسیوس میزان ویتامین در وزن خشک توده سلولی باکتری، IU/g ۱۰۱۸/۴۹۱ خواهد بود.

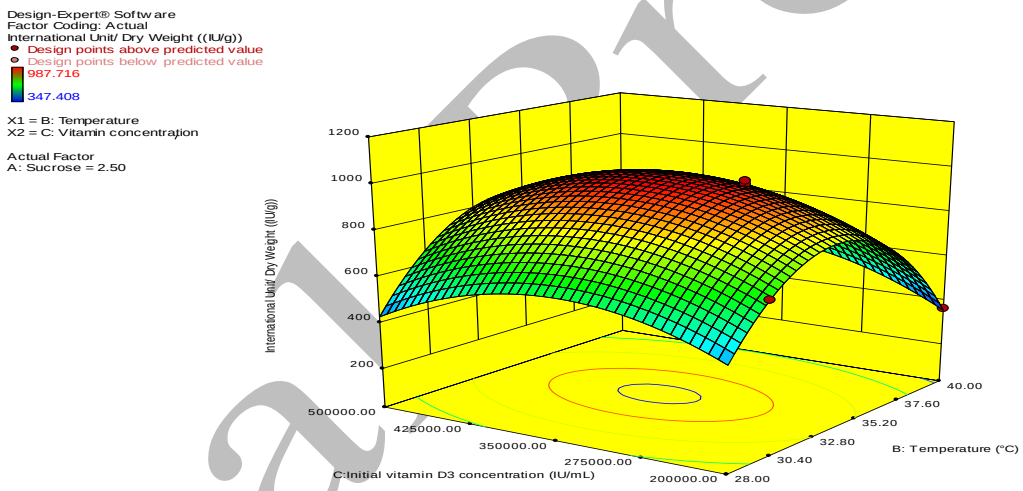
برای سنجش اعتبار مدل، نقطه بهینه که مدل در اختیار گذاشته است سه بار آزمایش شد و میانگین عددی IU/g ۱۰۲۸/۵ به دست آمد. این عدد با عدد پیش‌بینی‌شده نمودار ۹۹/۰۲٪ همخوانی دارد و در بازه تحمل ۹۵٪ بالا و پایین ارائه‌شده توسط نرم‌افزار که به ترتیب ۱۰۸۴/۹۳ و ۹۵۲/۰۵ هستند قرار دارد، که نشان‌دهنده معتبر بودن مدل می‌باشد.

نمودارهای سه‌بعدی اثر برهم‌کنش دو فاکتور را زمانی که فاکتور سوم ثابت و در نقطه بهینه است، بر پاسخ اصلی نشان می‌دهند. نمودار ۲ برهم‌کنش دو متغیر غلظت اولیه ویتامین D3 و غلظت ساکارز بر تجمع زیستی ویتامین D3 در توده زیستی باکتری را نشان می‌دهد. در این نمودار، دما در نقطه بهینه (۳۵ درجه سلسیوس) ثابت فرض شده است. نمودار ۳ نمایش‌دهنده برهم‌کنش متغیرهای غلظت اولیه ویتامین D3 و دما بر تجمع زیستی ویتامین D3 در توده زیستی باکتری است. در این نمودار فرض بر آن است که غلظت ساکارز در میزان بهینه (۲/۵ g/L) قرار دارد. شکل نمودارها دارای قله می‌باشند. این اشکال تأیید می‌کنند که بهینه‌سازی فاکتورها به‌درستی انجام‌گرفته است و قله نمودارها نشان‌دهنده نقاط بهینه است.

Final Proof



نمودار ۲: نمایش سه‌بعدی اثر غلظت اولیه ویتامین D3 و غلظت ساکارز در غنی‌سازی توده زیستی باکتری *L. plantarum* با ویتامین D3 زمانی که دما در حالت بهینه قرار دارد



نمودار ۳: نمایش سه‌بعدی اثر غلظت اولیه ویتامین و دما در غنی‌سازی باکتری *L. plantarum* با ویتامین D3 زمانی که غلظت ساکارز در حالت بهینه قرار دارد.

بحث

هدف از این مطالعه غنی‌سازی توده زیستی سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با ویتامین محلول در چربی D3 به‌منظور تولید یک محصول پروبیوتیک غنی‌شده با ویتامین، برای اولین بار بود. بر اساس مطالعه انجام‌شده باکتری فوق توانست ویتامین D3 را در توده سلولی خود جذب کند.

در خصوص غنی‌سازی باکتری‌های پروبیوتیک که طی آن، بتوان با روش‌هایی ریزمغذی‌ها و مواد ضروری مثل ویتامین‌ها را وارد توده سلولی پروبیوتیک ها نمود، مطالعات کمی انجام‌گرفته است. از این میان، مطالعات انجام‌گرفته به غنی‌سازی توده سلولی برخی میکروارگانیسم‌ها با فلزات ضروری معطوف شده است (۱۰). در ارتباط با جذب چربی‌ها در باکتری‌ها نیز مطالعات بسیار کمی انجام‌شده است. در سال ۱۹۷۳، Olsen و Thomas نشان دادند که باکتریوفاژ حامل چربی PRDI توسط ناقل‌هایی می‌تواند جذب توده زیستی باکتری *E.coli* شود، که علاوه بر باکتریوفاژ، چربی نیز جذب باکتری می‌شد (۱۱). پژوهشی دیگر نیز در مورد

Downloaded from ijmm.ir at 14:35 +0330 on Sunday February 17th 2019

Final Proof

باکتریوفاژهای حامل چربی و باکتری‌های دیگری ازجمله سالمونلا انجام‌شده است (۱۲). در مطالعه دیگری از *لاکتوباسیل* ها به‌عنوان مصرف‌کننده کلسترول و کاهنده آن در بدن انسان یادشده است (۱۳).

در ارتباط با گونه‌های باکتری *لاکتوباسیل* در زمینه رشد بهینه، تولید محصولاتی مثل اسیدلاکتیک، باکتریوسین و اگزوپلی ساکارید ها و جذب فلزات سنگین مطالعات متعددی انجام‌گرفته است و از طراحی آزمایش برای انتخاب و بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر استفاده گردیده است. در مطالعاتی که در زمینه بهینه‌سازی رشد انجام‌گرفته است، فاکتورهایی مثل دما، منبع کربن، دور همزن، منبع ازت، میزان تلقیح اولیه باکتری و pH اولیه مؤثر بوده‌اند (۱۴،۱۵).

در سال ۲۰۰۲ مطالعه‌ای بر روی تولید باکتریوسین توسط *لاکتوباسیل* ها و همچنین اثر تلفیقی منبع ازت و منبع کربن بر روی تولید آن صورت گرفته است (۱۵). در مطالعه دیگری اثر دما بر رشد باکتری و تولید محصول باکتریوسین از *لاکتوباسیل* ها مشخص گردید (۱۶). در مطالعه‌ای که برای تولید اگزوپلی ساکارید ها از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* طراحی‌شده بود، اثر تلقیح اولیه باکتری به محیط کشت، میزان نمک و منبع کربن خصوصاً گلوکز و ساکارز تأیید شد (۱۷).

در ایران مطالعات اندکی در زمینه طراحی آزمایش برای بهینه‌سازی رشد و تولید محصولات مختلف از *لاکتوباسیل* ها انجام‌شده است. از این میان، Pedram و Ataei در سال ۲۰۱۴ اثر املاح پتاسیم و عصاره مخمر را بر رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بررسی کردند و توسط طرح رویه پاسخ، این پارامترها را مؤثر تشخیص داده و بهینه‌سازی کردند. در این مطالعه، میزان گلوکز ۵ تا ۸ گرم در لیتر و عصاره مخمر ۳۷ گرم در لیتر به‌عنوان میزان بهینه، معرفی گردیدند (۱۸). مطالعه‌ای دیگر برای تولید توده زیستی بیشتر از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، فاکتورهای دما و غلظت لاکتوز را با روش‌های طراحی آزمایش بهینه‌سازی کرد، که در این میان دمای ۳۱ درجه سلسیوس و غلظت لاکتوز ۰/۱ گرم در لیتر مقادیر بهینه تعیین گردیدند (۱۹). مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۴ بر روی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با طرح رویه پاسخ انجام‌گرفته است که در این مطالعه بهترین شرایط رشد این باکتری در pH ۴/۸ و میزان غلظت منبع نیتروژن ۲۶/۸۸ گرم در لیتر عنوان گردید (۲۰). در سال ۲۰۱۵ مطالعه‌ای جدیدتر، اثر منبع ازت و املاح معدنی را در رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با روش باکس بنکن بهینه‌سازی کردند (۲۱).

این مطالعه که به‌منظور بهینه‌سازی تجمع زیستی ویتامین D3 در توده سلولی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* انجام گرفت از اولین نتایج موفق در این زمینه محسوب می‌شود. همچنین این پژوهش، از اولین گزارش‌ها در زمینه معرفی فاکتورهای مؤثر بر جذب مواد محلول در چربی در *لاکتوباسیل* ها است. با روش یک متغیر در زمان، از میان چندین فاکتور استفاده‌شده در مطالعات قبل، سه فاکتور دما، غلظت اولیه ویتامین و ساکارز انتخاب گردیدند و با روش باکس- بنکن بهینه‌سازی انجام شد. با استفاده از نتایج این مطالعه احتمالاً می‌توان محصولات پروبیوتیک باقابلیت حمل ویتامین‌های محلول در چربی طراحی نمود. لیکن با توجه به اینکه گزارش مشابهی در این زمینه وجود ندارد، مطالعات بیشتری به‌منظور بررسی مکانیسم غنی‌سازی، رهایش برون تنی و درون تنی ویتامین از باکتری و همچنین معرفی این محصول به‌عنوان یک پروبیوتیک کاربردی، ضروری به نظر می‌رسد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران (گرانت شماره۳۲۹۷۳) و پرسنل آزمایشگاه تحقیقات پروبیوتیک دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران سپاسگزاری می‌نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

Downloaded from ijmm.ir at 14:35 +0330 on Sunday February 17th 2019

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 14:35 +0330 on Sunday February 17th 2019

References

1. Fitzpatrick TB, Basset GJC, Borel P, Carrari F, DellaPenna D, Fraser PD, et al. Vitamin Deficiencies in Humans: Can Plant Science Help? Plant Cell 2012; 24 (2):395–414.
2. Medardus JJ, Molla BZ, Nicol M, Morrow WM, Rajala-Schultz PJ, Kazwala R, et al. In-Feed Use of Heavy Metal Micronutrients in U.S. Swine Production Systems and Its Role in Persistence of Multidrug-Resistant Salmonellae. Appl Environ Microbiol 2014; 80 (7):2317–25.
3. Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. Therap Adv Gastroentrol 2013; 6 (1):39–51.
4. Chau YY, Kumar J. Vitamin D in Chronic Kidney Disease. Ind J Pediatr 2012; 79(8):1062–8.
5. Simm C, Lahner B, Salt D, LeFurgey A, Ingram P, Yandell B, et al. *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and Intracellular zinc distribution. Eukaryot Cell 2007; 6 (7):1166–77.
6. Farazandehnia N. The evaluation of antimicrobial effect of fermented probiotic milk produced *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium* and *Bifidobacterium angultum*. Iran J Med Microbiol 2016; 10 (3):31-8.
7. Ershadian M, Arbab Soleimani N, Ajodani Far H, Vaezi Khakhki M R. The Co-aggregation effects of probiotic lactobacillus against some pathogenic bacteria. Iran J Med Microbiol 2015; 9 (3):14-22.
8. Soltani M, Soltani J. Determination of optimal combination of applied water and nitrogen for potato yield using response surface methodology (RSM). J Biosci Biotechnol Res Comm 2016; 9 (1):46-54.
9. Popović S, Kostadinović LM, Brkljača JS, Krulj JA, Manojlović MS, Solarov MIB. The development and validation of HPLC method for quantification of DL-α-tocopherol in quinoa seeds (C*henopodium quinoa* Willd.). Food Feed Res 2014; 41 (2):147–52.
10. Stehlik-Tomas V, Gulan Zeti V, Stanzer D, Grba S, Vahcic N. Zinc, Copper and Manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae.* Food Technol Biotechnol 2004; 42 (2):115-20.
11. Olsen RH, Thomas D. Characteristics and purification of PRRI, an RNA phage specific for the broad host range *Pseudomonas* RI 822 drug resistance plasmid. J Virol 1973; 12 (6):1560-7.
12. Olsen RH, Shipley P. Host range and properties of the *Pseudomonas aeruginosa* R factor RI 822. J Bacteriol 1973; 113 (2):772-80.
13. Smet P, Boever D, Verstraete W. Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. Br J Nutr 1998; 79 (2):185–94.
14. Hwang CF, Chang JH, Houng JY, Tsi CC, Lin CK, Tsen HY. Optimization of Medium Composition for Improving Biomass Production of *Lactobacillus plantarum* Pi06 Using the Taguchi Array Design and the Box-Behnken Method. Biotechnol Bioprocess Engin 2012; 17 (4):827-34.
15. Leal-Sa´nchez MV, Jime´nez-Díaz R, Maldonado-Barraga´n A, Garrido-Ferna´ndez A, Ruiz-Barba JL. Optimization of Bacteriocin Production by Batch Fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. Appl Environ Microbiol 2002; 68 (9):4465–71.
16. Keren T, Yarmus M, Halevy G, Shapyra R. Immunodetection of the Bacteriocin Lacticin RM: Analysis of the Influence of Temperature and Tween 80 on Its Expression and Activity. Appl Environ Microbiol 2004; 70 (4):2098–104.
17. Sanchez JI, Martı´nez B, Guille´n R, Jime´nez-Dı´az R, Rodrı´guez A. Culture Conditions Determine the Balance between Two Different Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. Appl Environ Microbiol 2006; 72 (12):7495–502.
18. Pedram A, Ataei SA. Optimization of a Modified GS Medium for a Probiotic Strain (*L. acidophilus* ATCC4356). Appl Food Biotechnol 2014; 1 (1):25-9.
19. Brinques GB, Peralba MC, Ayub MAZ. Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. J Ind Microbiol Biotechnol 2010; 37(2): 205–12.
20. Brzozowski B, Lewandowska M. Prolyl endopeptidase —Optimization of medium and culture conditions for enhanced production by *Lactobacillus acidophilus*. Electron J Biotechnol 2014; 17 (5):204–10.
21. Thirumurugan A, Ramachandran S, Gobikrishnan S. Optimization of medium components for maximizing the bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ATM11 using statistical design. Int Food Res J 2015; 22 (3):1272-9.

Final Proof