عنوان

بهینه سازی عملیات فرمانتاسیون در تولید سویه های پروبیوتیک وتولید زیست توده مقایسه ای بین تخمیر Batchو FED-Batch با استفاده ازتکنولوژی آنالیز تحلیلی فرایند (PAT) در صنعت

Optimization of fermentation operations in the production of probiotic strains and biomass production. Comparison between batch and FED-Batch fermentation using process analytical analysis (PAT) technology in industry

دکترمریم آرمند
دکترای تخصصی میکروبیولوژی(PhD)
سرپرست تحقیقات و کنترل کیفیت میکروبی شرکت دارویی بنیان سلامت کسری

- **فهرست:**
- تعریف وتاریخچه پروبیوتیک
- نمودار رشد باکتری ها
- محیط کشت تخمیر
- فرمانتور واجزا فرمانتور نحوه کار آن
- تکنولوژی آنالیز تحلیلی فرایند (PAT)

تعریف وتاریخچه پروبیوتیک

- عبارت پروبیوتیک (برای زندگیPro=for, Bio=life) اولین بار توسط Kollath در سال 1953 بیان شد. بطور کلی عبارت پروبیوتیک به میکروارگانیسم های زنده ای تعلق می گیرد که می توانند ضمن عبور از دستگاه گوارش زنده بمانند و اثرات مفید و سودمندی برروی میزبان برجای گذارند .

- تا نیمه قرن نوزدهم، مطالعات و تحقیقات علمی بر روی میکروارگانیسم ها و واکنش آنها با میزبان انسانی برروی جنبه های منفی آن متمرکز بود در همان زمان این عقیده که سلامتی از روده آغاز می شود بیان شد. از آنجا که مواد اضافی مسموم از روده به دستگاه گردش خون وارد می شوند. کاهش عفونت در روده به عنوان هدف برای برخی از درمان ها قرار گرفت.

- Doderline در 1882 احتمالا اولین دانشمندی بوده است که همکاری سودمند باکتریهای واژینال را مطرح کرده است به این صورت که آنها با تولید اسیدلاکتیک از قندها سبب مهار رشد باکتری های بیماری زا می شوند .

اثرات سودمند پروبیوتیک ها بر سلامتی:

- به طوری کلی، پروبیوتیک ها را عامل برطرف کننده ناراحتی های روده ای و متعادل کننده میکروفلور روده می دانند که اختلالات روده ای را بهبود می بخشند و یا مانع ایجاد آنها می شوند. اگرچه برخی از این اثرات سودمند، برای مثال تحریک سیستم ایمنی، می تواند حتی با باکتریهای مرده هم ایجاد شود.

1- برطرف کننده مشکلات گوارشی (اسهال، یبوست)

2- تحریک سیستم ایمنی

3- کنترل عدم تحمل لاکتوز lactose intolerance

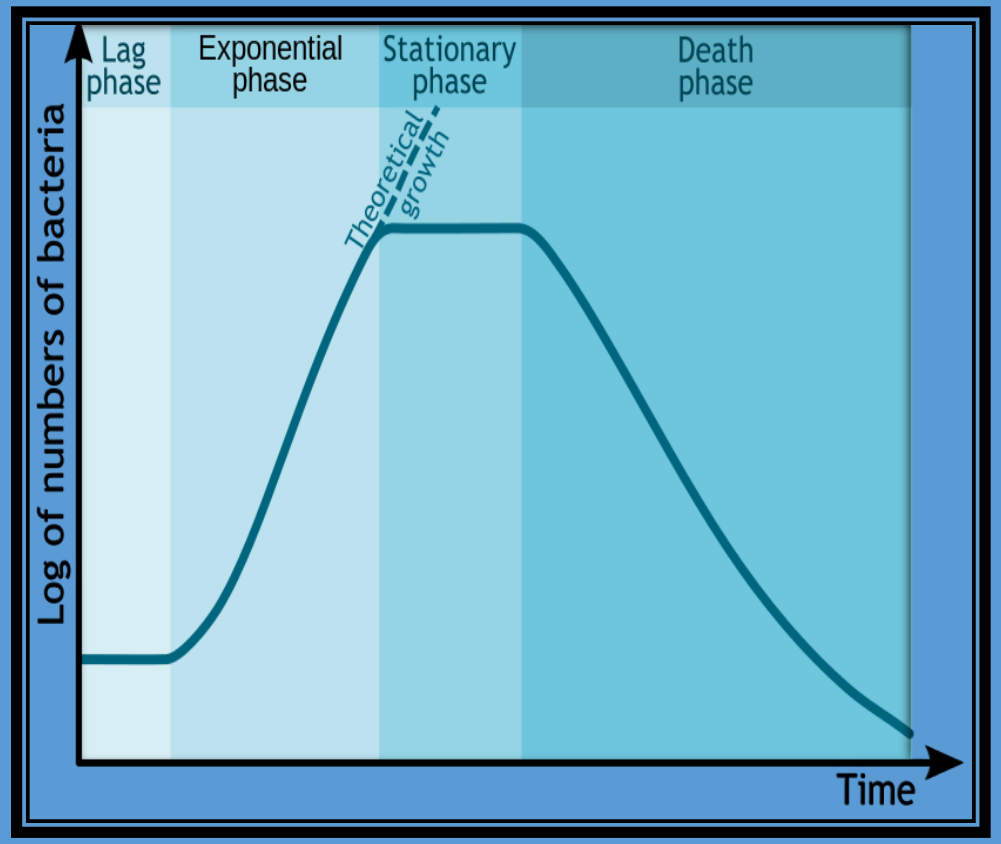
4- مقابله با سرطان

5-جلوگیری ازعفونت های دستگاه تنفسی

6-کنترل عفونت های دستگاه ادراری- تناسلی

7-کاهش سموم بدن

نمودار رشد باکتری ها



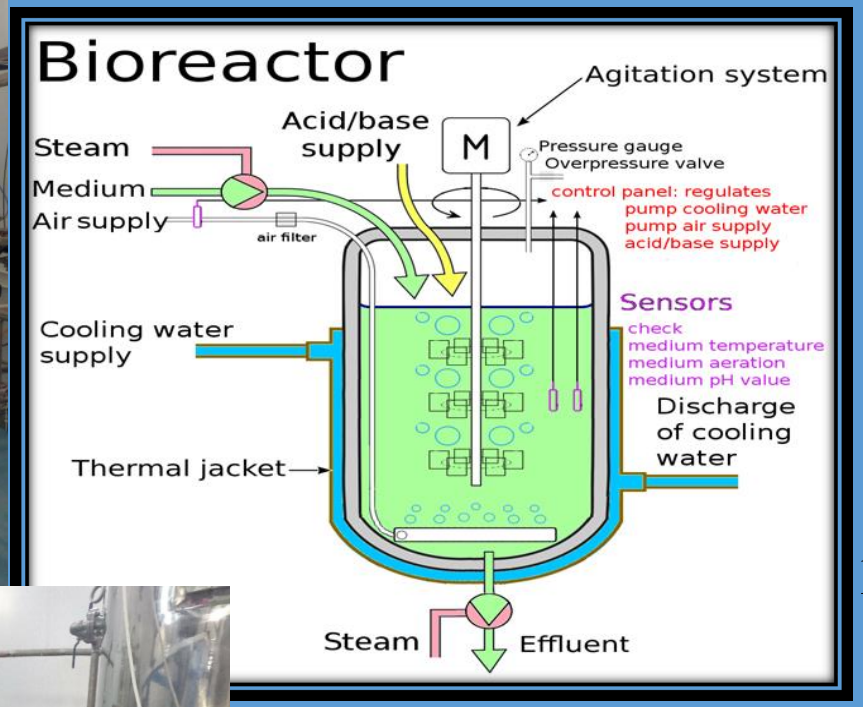
- فاز تاخیری
- فاز رشد لگاریتمی
- مرحله سکون
- مرحله مرگ

فاکتورهای اصلی که بر انتخاب نهایی مواد خام محیط کشت موثر هستند به صورت زیر می باشد:

- 1.هزینه و قابلیت دسترسی : مواد باید ارزان و از کیفیت نسبتا ثابتی برخوردار بوده و در تمام طول سال در دسترس باشند.
- 2.سهولت کار با آن به شکل جامد یا مایع ،و پایین بودن هزینه های ذخیره و انتقال آن مثل کنترل درجه حرارت در زمان حمل و نقل
- 3.امکان استریلیزاسیون و هر گونه مشکلات بالقوه دناتوراسیون .
- 4.فرمولاسیون ،مخلوط کردن ،ترکیب کردن و خصوصیات ویسکوزیته که همزدن ، هوادهی و تشکیل کف در طی تخمیر و مراحل فرآیند بعد از تخمیر را می تواند تحت تاثیر قرار دهد.
- 5.دستیابی به غلظت فرآورده مورد نظر ،سرعت تشکیل آن و عملکرد به ازای هرگرم از بستره مصرفی .
- 6.سطح و دامنه ناخالصیها قابل قبول و توانایی بالقوه در تولید محصولات نامطلوب بعدی در طی فرآیند .
- 7.اثرات کلی بر سلامت و ایمنی آنها.

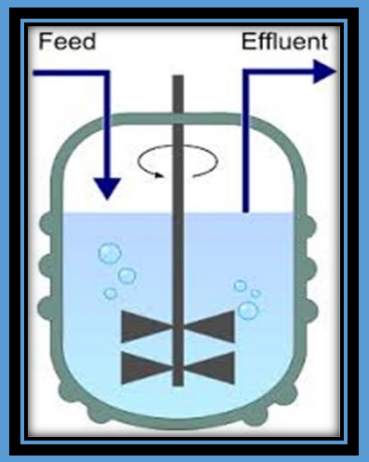
اجزا بیورآکتور

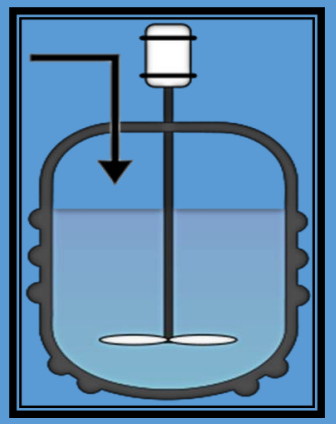






- محفظه استوانه ای
- همزن
- سیستم هوا دهی
- سیستم کنترل کف
- پروب های دما، pH
- اتصالات هاروست
- اتصالات تلقیح باکتری و محیط
- کنترلر





تخمیرهای صنعتی به صورت:

بسته

نیمه بسته

پیوسته

اکثر تخمیرها به صورت ناپیوسته بوده و سیستم های بسته ای هستند که پس از تلقیح بجز اضافه کردن اسید یا قلیا برای کنترل pH و هوا در فرآیندهای تخمیر هوازی نیاز به اضافه کردن ماده دیگر نیست.

روش نیمه پیوسته برای تولید مخمر نانوایی و پنی سیلین بکار می رود .که در این روش مقداری ماده غذایی معمولا در انتهای فاز رشد سریع به محیط اضافه می شود تا فاز تشکیل فرآوره را طولانی تر کند .

مشکلات مربوط به فرآیند های کشت پیوسته به غیر از مشکلات مربوط به تصفیه پساب آنها این است که در طی مدت کارکرد که ۲۵-۲۰ روز و یا بیشتر است، حالت استریل باید حفظ شده و محیط کشت به طور مداوم و با ترکیبی ثابت به محیط اضافه گردد.

Process Analytical Technology (PAT) تکنولوژی آنالیز فرایند

- تکنولوژی آنالیز فرایند Process Analytical Technology (PAT)، توسط سازمان دارو و غذای آمریکا Food and Drug Administration (FDA) به عنوان مکانیسمی برای طراحی، آنالیز و کنترل فرایندهای تولید دارویی از طریق اندازه گیری پارامترهای کلیدی Critical Process Parameters (CPP)که ویژگیهای کلیدی کیفیت Critical Quality Attributes (CQA)را تحت تاثیر قرار می دهند، تعریف شده است. تکنولوژی آنالیز فرایند یک اصطلاحی است که برای توصیف یک تغییر گسترده در تولید دارویی از تولید بچ استاتیک به تولید دینامیک به کار می رود. با تعریف و شناختCPP و کنترل آنها در محدوده تعریف شده می توان محصولی با کیفیت یکنواخت تولید کرد و همچنین کمک به کاهش هزینه ها و مواد زائد می شود. تولید مواد با کیفیت یکنواخت و کاهش مواد زائد یک گزینه خوبی را برای پیوسته کردن فرایند تولید ایجاد می کند. کنترل یک فرایند پایا وقتی که جریان های بالادستی و پایین دستی به خوبی شناخته شده باشند یک کار آسان بوده و به راحتی می توان پارامتری را که باعث تغییر می شود شناخت و آن را کنترل کرد.

- Design by Quality(DbQ) به طور کلی می گوید که کیفیت نباید اندازه گیری شود بلکه کیفیت باید طراحی و ایجاد شود ویک استراتژی کنترل قوی برای مانیتورینگ پروسه می باشد.
- در روند تحلیل PAT تمرکز این تحقیق بر روی فرمانتور upstream fermentation و بهینه سازی شرایط ان با انجام انالیزهای مختلف برای تولید نیمه پیوسته باکتری های پروبیوتیک با بیشترین بیومس با کنترل شرایط pH و تعیین نوع غذای باکتری و زمان تلقیح مناسب می باشد.
- انتخاب مرحله upstream fermentation به این دلیل است که این مرحله یکی از حساس ترین بخشهای تولید است که اثر مستقیم روی کیفیت محصول یکنواخت دارد.در این مرحله زمان بیشتری برای انالیز نمونه و تصمیم گیری داریم و در مواردی که پروسه تولید مراحل متعاقب ندارد،تنها مرحله کنترل سطح ناخالصی upstream fermentation است که با کنترل پارامترهای مختلف نهایتا به محصولی با کیفیت بالاتر و بیومس بیشتر می رسیم.

پلاکت برمن:

طراحی پلاکت- برمن به‌عنوان یک روش مؤثر طراحی فاکتوریل به‌منظور غربالگری از میان فاکتورهای مهم زیادی با استفاده از حداقل آزمایش‌ها استفاده می‌گردد. این روش اجازه می‌دهد اهمیت پارامترها و تخمین خطاهای تصادفی تعیین گردد.

این روش برای پروسه‌های بیولوژیک شامل مدل‌سازی فرایندهای تخمیری به‌طور گسترده استفاده‌شده است. مهم‌ترین ویژگی این روش این است که طراحی به شکل آرایه‌های متعامد انجام شد و اثر هر فاکتور به شکل دقیق بر میزان تولید، بدون در نظر گرفتن تداخل بین فاکتورها به دست می‌آید.

در مراحل اولیه تولید زیست توده باکتری های پروبیوتیک تعیین فاکتورهای مهم در تولید و اثرات هر کدام از این فاکتورها دارای اهمیت است و استفاده از طراحی پلاکت - برمن در این زمینه بسیار کمک کننده است.

با استفاده از طراحی پلاکت برمن در فضای نرم افزاری Design Expert 12 بررسی 16مدل،نتایج زیر حاصل شد.نتایج بدست آمده نشان داد که ملاس چغندر قند، گلوکز و کازئین بیشترین اثر را در تولید زیست توده لاکتوباسیلوس رامنوسوس GGدارند .گلوکز با کازئین و ملاس چغندر قند اثر هم افزایی داشته و افزایش غلظت قند گلوکز با افزایش غلظت دو فاکتور دیگر موجب افزایش تولید زیست توده شده ،اما همین گلوکز در غلظت های بالاتر و سولفات منیزیم، عصاره مخمر، توییین 80 و سولفات منگنز با غلظت کمتر در افزایش زیست توده دارای نقش می باشند.

پس از بهینه‌سازی، محیط کشت دارای مقادیر ترکیبات زیر به ازای گرم در لیتر :گلوکز 112/50، ملاس چغندرقند 56/25، کازئین 18/75، عصاره مخمر 18/75، 13/13K2HPO4، توییین 80 1/88 ، 0/37MgSO4 .7H2O ، 0/07MnSO4. 4H2O ،و 0/18CaCl2. 2H2O
سایمتیکن 1/25به‌منظور تولید بهترین زیست‌توده توسط لاکتوباسیلوس رامنوسوس مشخص گردید. میزان زیست‌توده بیشتر از دو برابر نسبت به شرایط محیط کشت پایه افزایش پیدا کرد.

جدول سطوح فاکتورهای محیط کشت تولید زیست توده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*

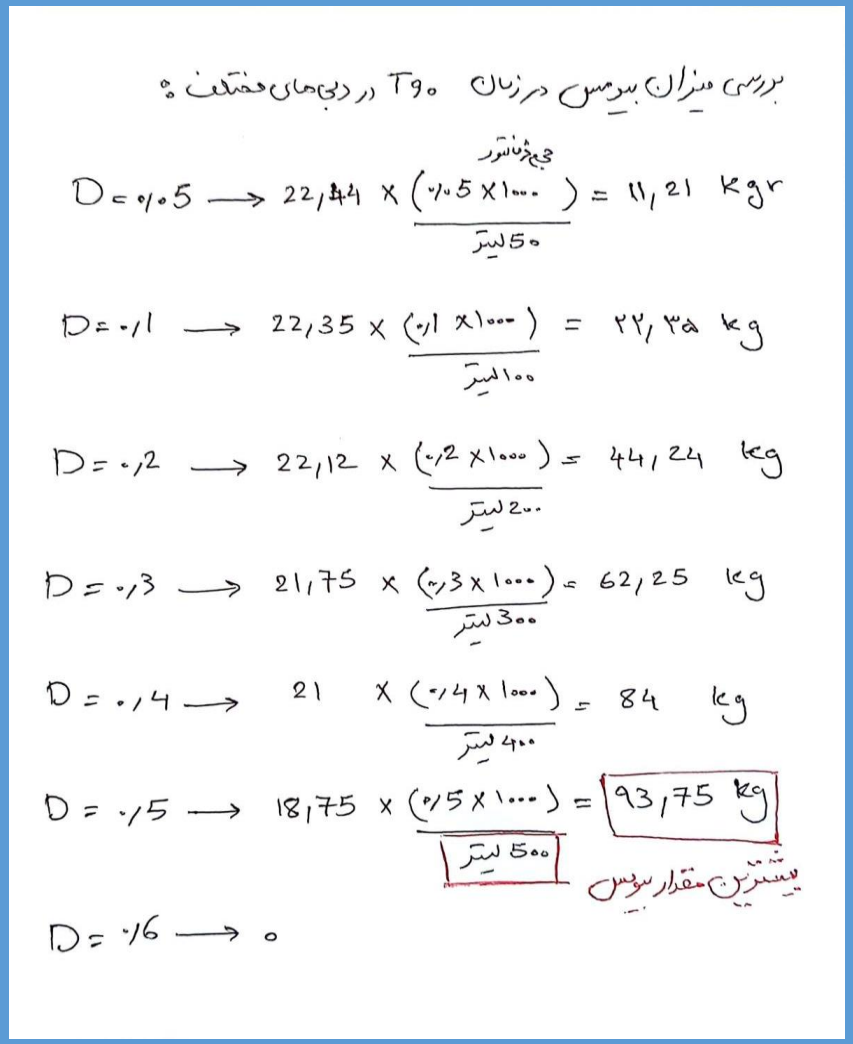
Table 3 Assignment of experimental medium factors and their results of the L_{16} optimization of biomass production by *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 according to Plackett–Burman (PB) method. Values are mean ±S. D of triple replicates ($p<0.05$).

Trials	Glucose (g/L)	Molasses (g/L)	Casein (g/L)	Yeast extract (g/L)	K_2HPO_4 (g/L)	Tween 80(g/L)	$MgSO_4$ (g/L)	$MnSO_4$ (g/L)	$CaCl_2$ (g/L)	Simethicone (g/L)	Biomass production (g/L)
1	180	90	7.5	30	5.25	0.75	0.15	0.12	0.075	2	54.5±0.13
2	45	22.5	7.5	30	5.25	3	0.6	0.12	0.075	2	28.5±0.35
3	45	22.5	7.5	7.5	5.35	0.75	0.15	0.03	0.3	2	27.3±0.41
4	45	90	7.5	7.5	21	3	0.15	0.12	0.075	0.5	42.5±0.18
5	180	22.5	30	30	5.25	0.75	0.6	0.03	0.075	0.5	37.1±0.22
6	45	22.5	30	7.5	21	3	0.6	0.03	0.075	2	25.1±0.71
7	180	90	30	30	21	3	0.6	0.12	0.3	2	58.2±0.47
8	45	90	30	7.5	5.25	0.75	0.6	0.12	0.3	0.5	51.2±0.56
9	45	90	7.5	30	21	0.75	0.6	0.03	0.3	0.5	44.1±0.62
10	180	90	30	7.5	21	0.75	0.15	0.03	0.075	2	72.3±0.48
11	180	90	7.5	7.5	5.25	3	0.6	0.03	0.3	2	52.3±0.39
12	180	22.5	7.5	30	21	3	0.15	0.03	0.3	0.5	38.6±0.39
13	45	22.5	30	30	21	0.75	0.15	0.12	0.3	2	47.6±0.21
14	180	22.5	7.5	7.5	21	0.75	0.6	0.21	0.075	0.5	35.3±0.51
15	180	22.5	30	7.5	5.25	3	0.15	0.12	0.3	0.5	45.6±0.75
16	45	90	30	30	5.25	3	0.15	0.03	0.075	0.5	42.5±0.19
Control	90	45	15	15	10.5	1.5	0.3	0.06	0.15	1	37.0±0.31

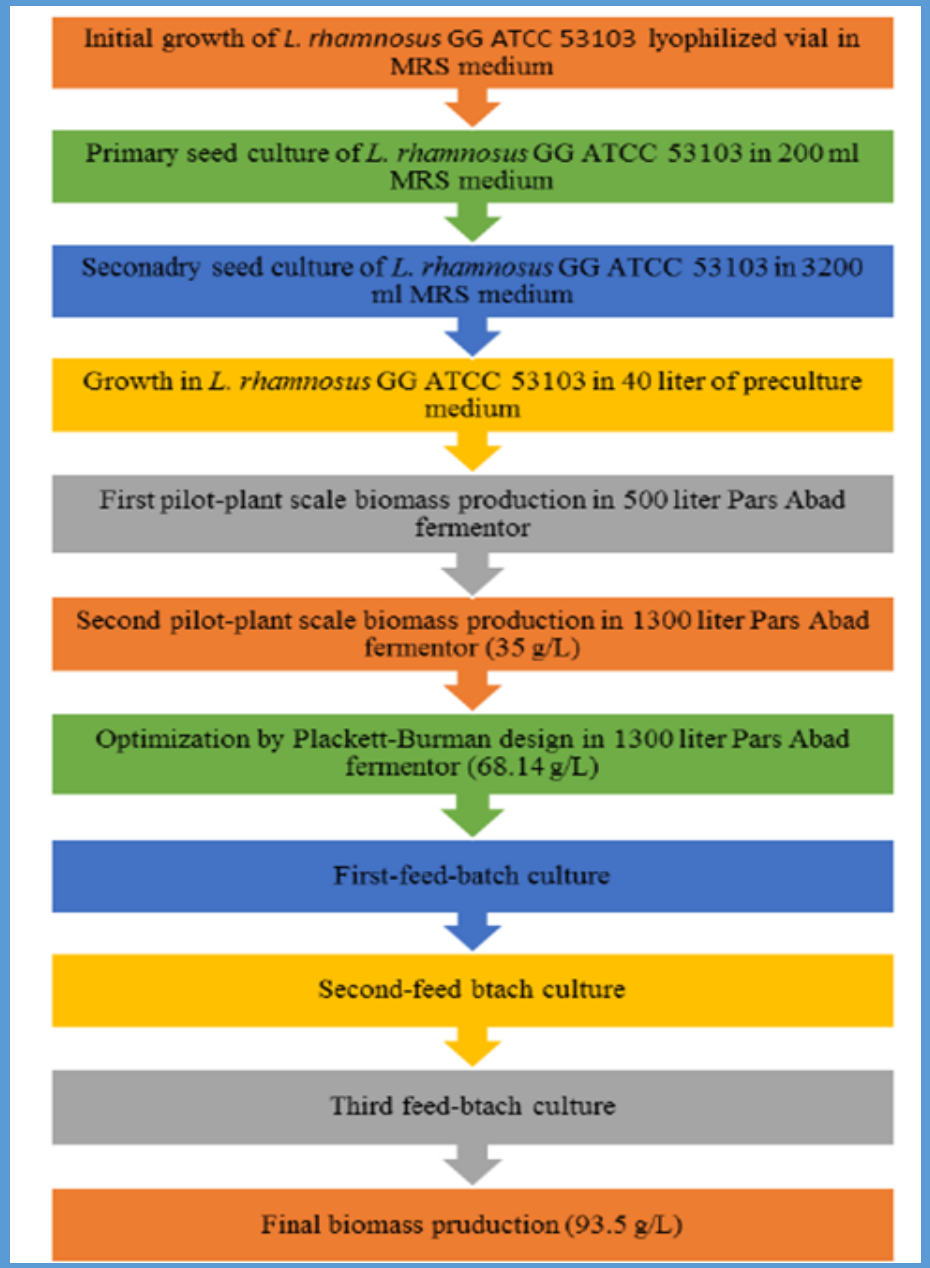
فاکتورها	سطوح فاکتورها		
	سطح بالا (+۱)	سطح میانه (۰)	سطح پایین (-۱)
گلوکز	۱۸۰	۹۰	٤٥
ملاس چغندرقند	۹۰	٤٥	۲۲/٥
کازئین پپتون	۳۰	۱٥	۷/٥
عصاره مخمر	۳۰	۱٥	۷/٥
K_2HPO_4	۲۱	۱۰/٥	٥/۲٥
توین 80	۳	۱/٥	۰/۷٥
$MgSO_4$	۰/٦	۰/۳	۰/۱٥
$MnSO_4$	۰/۱۲	۰/۰٦	۰/۰۳
$CaCl_2$	۰/۳	۰/۱٥	۰/۰۷٥
سایمتیکن	۲	۱	۰/٥

میزان توده زیستی در سرعت تزریق های مختلف نسبت به زمان

	D=0.05 (1/h)		D=0.1 (1/h)		D=0.2 (1/h)		D=0.3 (1/h)		D=0.4 (1/h)		D=0.5 (1/h)		D=0.55 (1/h)		D=0.6 (1/h)	
T(h)	Biomass (g/L)	glucose (g/L)	Biomass (g/L)	glucose (g/L)	Biomass (g/L)	glucose (g/L)	Biomass (g/L)	glucose (g/L)	Biomass (g/L)	glucose (g/L)	Biomass (g/L)	glucose (g/L)	Biomass (g/L)	glucose (g/L)	Biomass (g/L)	glucose (g/L)
T0	0.2	45	0.2	45	0.2	45	0.2	45	0.2	45	0.2	45	0.2	45	0.2	45
T5	0.4	33	0.4	33	0.4	33	0.4	33	0.4	33	0.4	33	0.4	33	0.4	33
T10	1.2	25	1.2	25	1.2	25	1.2	25	1.2	25	1.2	25	1.2	25	1.2	25
T15	25	14	25	14	25	14	25	14	25	14	25	14	25	14	25	14
T20	40	11	40	11	40	11	40	11	40	11	40	11	40	11	40	11
T30	11	2	11	2	11	2	11	2	11	2	11	2	11	2	11	2
T40	10	5	9	7	8	9	6.9	12	5.3	15.5	4.8	17.3	3.1	24.3	2.1	29.9
T50	21	3	18	5	17	7	15.2	10.2	13.9	12.6	11.4	15.1	8.8	21.7	4.5	38.1
T60	22	1.5	21	2.7	20	4.5	18.7	5.8	16.4	7.3	14.9	9.4	11.2	19.9	3.8	41.4
T70	22.3	0.8	21.9	1.1	21.2	2.2	20.4	3.1	18.1	4.8	16.8	8.2	13.7	17.6	3.1	42.5
T80	22.36	0.15	22.3	0.5	22.1	0.8	21.3	1.7	20.2	3.2	18.1	7.6	14.1	17.1	0.35	44.6
T90	22.43	0.13	22.35	0.3	22.12	0.75	21.75	1.5	21	3	18.75	7.5	14.25	16.5	0.2	45
T100	22.43	0.13	22.35	0.3	22.12	0.75	21.75	1.5	21	3	18.75	7.5	14.25	16.5	0	45



در کشت پیوسته تجزیه و تحلیل پارامترهای موثر در فرآیند تولید PAT، به صورت روی خط تولید اندازه گیری شد. پارامترهای بررسی شده شامل دانسیته نوری رشد سلولی ، میزان توده زنده تولید شده، pH، مصرف گلوکز و مصرف اکسیژن محلول بود. شدت های رقیق شدن در کشت پیوسته از D=0.05 شروع و به ترتیب به 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.55 وتا 0.6 ادامه پیدا کرد.



نتیجه کلی در این تحقیق با تغییر شرایط از حالت فرمنتسیون بسته یا بچ طی 24 ساعت به حالت نیمه پیوسته 100ساعته با استفاده از روش PATوکنترل pHدر محدوده 6.5و دما 38 درجه سانتی گرادوقند در بازه 300تا400 u/dlو میزان اکسیژن در حدود 0.2-0.5 L/min و میزان دقیق اجزای محیط کشت در فرمانتور به افزایش یک logدر کانت باکتری در واحد mlدست یافتیم و کانت به عدد 10^{10} × 3-1معادل 93/7گرم وزن خشک به ازای لیتر رسید. دراین تحقیق در شرایط کموستات ایجاد شده در حالت نیمه پیوسته برای لاکتو باسیلوس رامنوسوس مناسب ترین سرعت فلو برابر با 0.5 لیتر بر ساعت حاصل شد.

منابع:

- Goktepe I, Juneja VK, Ahmedna M. Probiotics in food safety and human health: CRC Press; 2005.
- Weese JS, editor A review of probiotics: Are they really “functional foods”. AAEP Proc; 2001.
- Parker R. Probiotics, the other half of the antibiotic story. Anim Nutr Health. 1974;29(29):4-8.
- Fuller R. A review. J appl Bacteriol. 1989;66:365-78.
- Shah N. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of dairy science. 2000;83(4):894-907.
- Yoon KY, Woodams EE, Hang YD .Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. Bioresource Technology. 2006;97(12):1427-30.
- Rathore A, Bhambure R, Ghare V. Process analytical technology (PAT) for biopharmaceutical products. Analytical and bioanalytical chemistry.

منابع:

. Schiraldi C, Adduci V, Valli V, Maresca C, Giuliano M, Lamberti M, et al. High cell density cultivation of probiotics and lactic acid production. Biotechnology and bioengineering. 2003;82(2):213-22.

. Zhang Y, Cong W, Shi S. Application of a pH feedback-controlled substrate feeding method in lactic acid production. Applied biochemistry and biotechnology. 2010;162(8):2149-56.

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

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

. Ding S, Tan T. L-lactic acid production by Lactobacillus casei fermentation using different fed-batch feeding strategies. Process Biochemistry. 2006;41(6):1451-4.

منابع:

- Alfano A, Donnarumma G, Cimini D, Fusco A, Marzaioli I, De Rosa M, et al. Lactobacillus plantarum: Microfiltration experiments for the production of probiotic biomass to be used in food and nutraceutical preparations. Biotechnology progress. 2015;31(2):325-33.
- Malek RA, bin Hamdan S, El Enshasy HA, Zalina N. High cell mass production and characterization of Lactobacillus salivarius, a new probiotic strain isolated from human breast milk.
- Jantzen M, Göpel A, Beermann C. Direct spray drying and microencapsulation of probiotic Lactobacillus reuteri from slurry fermentation with whey. Journal of applied microbiology. 2013;115(4):1029-36.
- M.Alvarez E. J. Aguirre-Ezkauriatza A. Ramírez-Medrano (Synergy, Reading, PA) Production of probiotic biomass (Lactobacillus casei) in goat milk whey: comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. 2010

منابع:

- Ahire, J. J., Jakkamsetty, C., Kashikar, M. S., Lakshmi, S. G., & Madempudi, R. S. (2021). In vitro evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* UBLP40 isolated from traditional indigenous fermented food. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *13*(5), 1413-1424. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66
- Widyastuti, Y., Febrisiantosa, A., & Tidona, F. (2021). Health-promoting properties of lactobacilli in fermented dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 1189. https://doi.org/10.3389/fmicb**.2021.673890**
- Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., ... & Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *18*(3), 196-208. https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5
- Capurso, L. (2019). Thirty Years of Lactobacillus rhamnosus GG. Journal of Clinical Gastroenterology, 53, S1–S41. Segers, M. E., & Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions. *Microbial cell factories*, *13*(1), 1-16. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7

منابع:

- Rathore, A. S., Bhambure, R., & Ghare, V. (2010). Process analytical technology (PAT) for biopharmaceutical products. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *398*(1), 137-154. https://doi.org/10.1007/s00216-010-3781-x
- Food and Drug Administration. (2004). Guidance for industry, PAT-A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance. *http://www. fda. gov/cder/guidance/published. Html.*
- Amanda, R. C. D. M., Cintia, R. R. C., Jessica, F., Irapuan, O. P., Amanda, M., Adelisa, A. F., & Eulalia, A. X. (2017). Activity of metabolites produced by new strains of *Lactobacillus* in modified de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium against multidrug-resistant bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, *11*(8), 345-355. https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8437
- Kim, M., Jang, J. K., & Park, Y. S. **(2021).** Production optimization, structural analysis, and prebiotic-and anti-inflammatory effects of gluco-oligosaccharides produced by *Leuconostoc lactis* SBC001. *Microorganisms*, *9*(1), 200.

با سپاس از توجه شما

