

غربالگری تولید اسیدهای چرب به وسیله بیفیدوباکتر لاکتیس در بستر کنجاله سویا

سمین رفیع آذری^۱، محمد حجت الاسلامی^۲، زینب السادات ابراهیم زاده موسوی^۳، حسین کیانی^۴، سید محمد علی جلالی^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه کشاورزی و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- دانشیار گروه کشاورزی و صنایع غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳- نویسنده مسئول: استادیار، آزمایشگاه زیست فراوری و زیست سنجش، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
پست الکترونیکی: Zeinab.mosavi@ut.ac.ir

۴- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۵- استادیار مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک (RCNOP)، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: تولید زیستی اسیدهای آلی به روش تخمیر میکروبی با استفاده از بستر جامد روشی ایمن، ارزان و آسان در جهت تولید اسیدهای چرب می‌باشد. هدف این مطالعه، استفاده از خمیر کنجاله سویا به عنوان بستر جامد جهت کشت پروبیوتیک و تجزیه و تحلیل رفتار بیفیدوباکتر لاکتیس در بستر جامد جهت تولید اسیدهای چرب بود.

مواد و روش‌ها: خمیر همگن شده کنجاله سویا با میزان رطوبت (۶۵٪) برای تخمیر در بستر جامد آماده گردید. سپس، در سطح (۰.۴٪) به محیط کشت تلقیح شد. در نهایت، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای استفاده در این نوع تخمیر گرمخانه‌گذاری شد.

یافته‌ها: جمعیت باکتری پس از رشد طی ۲۴ ساعت باعث افزایش جمعیت میکروبی، به میزان $9/98 \log CFU/g$ و افت PH تا سطح ۵/۱ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شد. بعلاوه، با تغییرات پروفایل اسیدهای چرب منجر به افزایش درصد اسیدهای چرب اشباع نسبت به اسیدهای چرب غیراشباع و کاهش بیشتر چربی‌های امگا ۳ نسبت به امگا ۶ شد.

نتیجه‌گیری: خمیر سویای انتخاب شده می‌تواند به عنوان حامل پروبیوتیک برای تولید اسیدهای چرب مورد استفاده قرار گیرد. زیرا میکروارگانیسیم قادر است، بستر را برای افزایش ویژگی‌های تغذیه‌ای و عملکردی خود تغییر دهد که این امر باعث می‌شود کنجاله سویا به محصولی جذاب‌تر جهت عرضه محصولات جدید به بازار برای مصرف‌کنندگان تبدیل شود.

واژگان کلیدی: بیفیدوباکتر لاکتیس، پروبیوتیک، اسیدهای چرب، کنجاله سویا، تخمیر حالت جامد

• مقدمه

عملکرد آنها به شمار می‌رود. همچنین، آنها با تخریب کربوهیدرات‌های غیر قابل هضم، هضم را بهبود می‌بخشند و با کاهش اسهال، بهبود عدم تحمل لاکتوز، کاهش سطح کلسترول سرم، پیشگیری از سرطان، محافظت در برابر عوامل بیماری‌زا، تولید ویتامین B، تولید اسیدهای لینولئیک مزدوج، جلوگیری از رشد تومور، آنتی‌اکسیدان‌ها، تحریک و توسعه سیستم ایمنی، سلامتی را ارتقا می‌بخشند (۴-۸). بیفیدوباکتری‌ها متعلق به شاخه اکتینوباکتریا (Actinobacteria) بوده، باکتری‌هایی میله ای شکل، گرم مثبت، بی‌هوازی اجباری تا حدی اختیاری،

بیفیدوباکتری‌ها یکی از مفیدترین، میکروارگانیسیم‌های زنده‌ای هستند که به طور طبیعی میکرو فلور غالب روده را تشکیل داده و با عملکردهای متعدد خود، بر ارتقاء سلامتی میزبان خود مؤثرند (۱-۳). آنها با ایجاد میکروبیوتای (Microbiota) سالم و کنترل pH روده، رشد باکتری‌های فرصت طلب دستگاه گوارش انسان را تعدیل، مهار و با دفع باکتری‌های مضر به بدن کمک می‌کنند تا عملکردهای اساسی را انجام دهد. تولید متابولیت‌هایی مانند اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، ویتامین‌ها و پیشگیری از اختلالات روده از دیگر

حالت جامد در سال‌های گذشته با استفاده از بیفیدوباکتری‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) به دلیل داشتن نقش اساسی در تخمیر با استفاده از تخمیر غوطه وری انجام شده است. در سال‌های اخیر استفاده از ضایعات کشاورزی و صنعتی از طریق تخمیر حالت جامد در سطح جهانی به عنوان یک راه نجات اصلی در اقتصاد کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه مورد استقبال قرار گرفته و مطالعات متعددی با استفاده از SSF برای تولید اسید لاکتیک از ضایعات کشاورزی و صنعتی نیز انجام شده است (۱۷).

امروزه غذاهای تخمیر شده با استفاده از محصولات جامد کشاورزی به دلیل ارزش‌های فرهنگی، آشپزی، اقتصادی و تغذیه‌ای، ارزشمند و مورد توجه هستند. زیرا تخمیر میکروبی کلید کاهش عوامل ضد تغذیه‌ای بالقوه در پسماندهای کشاورزی و صنعتی نیز بوده، در نتیجه با بهبود دسترسی زیستی، تولید یا افزایش برخی از ترکیبات زیست فعال، پروتئین‌های محلول و پپتیدهای کوچک را افزایش می‌دهد. باعث قابلیت هضم و جذب پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها شده، کیفیت غذایی مواد تخمیر شده را افزایش، عوامل ضد تغذیه‌ای را غیرفعال می‌نماید (۲۰). همچنین با استفاده از این روش تخمیر، مواد لازم جهت مصرف انسانی و دامی و نیز مواد خام جهت تولید صنایع تبدیلی مواد غذایی تولید می‌شود (۱۳). در طی تخمیر باکتری‌های پروبیوتیک تکثیر از طریق تجزیه زیستی و کاهش الیگوساکاریدها با آزاد کردن پپتیدهای فعال زیستی صورت می‌گیرد. برخی از ترکیبات زیست فعال تولید یا افزایش یافته، در نتیجه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی پس از تخمیر به طور قابل توجهی بهبود خواهد یافت، که باعث خواص عملکردی در سیستم ایمنی بدن می‌شود (۲۲، ۲۱). کنجاله سویا، رایج‌ترین منبع پروتئین گیاهی، به عنوان محصول جانبی تولید روغن رژیمی با کیفیت پروتئین بالا (۴۴ درصد) می‌باشد. طبق نظر FAO در سال ۲۰۱۷، ترکیب اسید آمینه نسبتاً متعادل (۲۵-۲۳، ۱۶، ۱۵) و وجود ویتامین‌های A, E، مواد معدنی مانند کلسیم، منیزیم و آهن یک جایگزین کم هزینه در این کنجاله، به مراتب جذاب‌تر از دانه سویا جهت بستر میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک (به دلیل ایمن و غیر بیماریزا بودن) از جمله بیفیدوباکتریوم‌ها برای به دست آوردن غذاهای جدید در SSF می‌باشد. زیرا تخمیر بستر جامد بی‌هوازی کیفیت تغذیه‌ای کنجاله را بهبود می‌بخشد (۱۵). هدف از این مطالعه، بررسی خمیرکنجاله سویا به عنوان محیطی غنی، طبیعی و مناسب جهت رشد بیفیدوباکتر، ابتدا بدون افزودن هیچ گونه مکمل، سپس با اضافه نمودن ۳٪ ساکارز به بستر آزمایش جهت تجزیه و تحلیل رفتار بیفیدوباکتر لاکتیس در بستر جامد بود. جهت

ساکارولیتیک، کاتالاز منفی، غیر متحرک، تخمیری، غیر اسپورزا، تولید کننده اسید لاکتیک و اغلب منشعب (Pleomorphic) هستند (۹). در صفحات آگار، کلنی‌های بیفیدوباکتری‌ها شباهت زیادی به باکتری‌های اسیدلاکتیک (به ویژه لاکتوباسیل‌ها) دارند. درحالی‌که بیفیدوباکتری‌ها ارتباط نزدیکی با هیچ یک از باکتری‌های اسید لاکتیک که در تولید غذاهای تخمیر شده استفاده می‌شوند نداشته، علیرغم این‌که نقش اصلی را در تولید غذاهای کاربردی جدید ایفا و رفتار آنها در این سیستم‌ها عملاً ناشناخته است. درانبوهی از آزمایشات بالینی موفق با پروبیوتیک‌ها که بر روی طیف وسیعی از افراد از جمله نوزادان، کودکان، بزرگسالان و سالمندان مورد استفاده قرار گرفته، ثابت شده شناخته‌ترین گونه پروبیوتیک در بین تمام اعضا، جنس، بیفیدوباکتریوم لاکتیس است. زیرا دارای همه ویژگی‌های ارزشمند از جمله تحمل اسید معده و صفا به دلیل داشتن هیدرولازهای نمک صفاوی و خواص چسبندگی موکوس قوی بوده، همچنین نسبت به سایر گونه‌های بیفیدوباکتری انسانی به شرایط اسیدی و دماهای بالا مقاوم‌ترند (۱۰). ولی به اندازه لاکتو باسیلوس‌ها مقاوم نبوده و رشد آنها را نمی‌توان "بی‌هوازی اختیاری" کامل نامید. توانایی بقا و زنده ماندن آنها در دستگاه گوارش تا حد زیادی به قابلیت‌های متابولیک کربوهیدرات‌ها و رفتار ساکارولیتیک آنها بستگی داشته (۱۱)، علیرغم اینکه در تخمیر گلوکز، برخی از سویه‌های تخمیر نشده نیز گزارش شده و حتی برخی از گونه‌های بیفیدوباکتریوم قادر به تخمیر لاکتوز نیز هستند. بنابراین می‌توان گفت توانایی تخمیر سویسترهای مختلف، از جمله ساکاریدها، مشتقات آنها و الکل‌ها، به سویه خاص بستگی دارد. تخمیر حالت جامد (Solis State Fermentation) SSF کارآمدترین فرآیند زیستی برای به دست آوردن غذاهای تخمیر شده با منشاء مختلف است. که این شیوه تخمیر مجدداً در سال‌های اخیر از نظر جنبه‌های زیستی، پردازشی، زیست محیطی و اقتصادی به دلیل مزایایی از جمله کارایی بالاتر تخمیر، غلظت بیشتر و پایداری بالاتر محصول نهایی، مصرف کمتر آب و سرکوب کاتابولیکی کمتر، به عبارتی تولید آسان در مقیاس بزرگ با حداقل جریان‌های باقیمانده که نسبت به تخمیر غوطه‌وری دارد، از سوی محققان مورد توجه فزاینده در سراسر جهان قرار گرفته و ارزش گذاری شده است (۸-۱۲).

SSF فرایندی است که از طریق آن میکروارگانیسم‌های منتخب (باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها) بر روی یک ماده آلی مرطوب، جامد و غیر محلول به عنوان یک منبع حمایتی و غذایی برای رشد در نبود یا تقریباً عدم وجود آب آزاد کشت داده می‌شود (۱۹-۱۳). بیشتر مطالعات تخمیری در تخمیر

غربالگری، نتایج میزان تغییرات PH / CFU بستر و کروماتوگرافی اسیدهای چرب مد نظر گرفته شد.

• مواد و روش‌ها

بیفیدوباکترلاکتیس سویه (*BBO4*) کشت نوع ایرانی (*BBO4, Persian Type Culture Collection*) از مجموعه میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه تهران تهیه شد. کنجاله سویا از شرکت دامپروری زارع در ایران خریداری گردید. ساکارز، محیط های کشت و سایر مواد شیمیایی از شرکت شیمیایی رازی نمایندگی شرکت مرک آلمان در اصفهان خریداری شد. برای ارزیابی رفتار سویه از کنجاله ۶۵ درصد رطوبت، سطح تلقیح ۴ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ساکارز ۳ درصد استفاده شد.

فعالسازی سویه میکروبی، تهیه مایه تلقیح

جهت آماده سازی سویه، باکتری دو نوبت ۲۴ ساعته به محیط مایع MRS Broth منتقل شد. در شرایط میکروآئروفیلیک (*Microaerophilic*) بدون تحرک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور (مدل Memmert ساخت کشور آلمان) گرمخانه گذاری شد. به منظور به دست آوردن مایه تلقیح برای تخمیر بسترجامد، سلول های باکتری در انتهای مرحله نمایی رشد در محیط آبگوشت براث (MRS Broth) با روش سانتریفیوژ جمع آوری، دو بار با محلول سرم فیزیولوژی استریل شسته شد. سپس با استفاده از محلول سرم فیزیولوژی استریل، غلظت نیم مک فارلند تهیه شد و جمعیت میکروبی با این محلول تطبیق داده شد. جهت اطمینان از غلظت مایع تلقیح از روش اسپکتروفتومتری نیز استفاده شد.

آماده سازی بستر کشت

برای تهیه بستر در تخمیر جامد، میزان مناسب از کنجاله سویا برداشته تمیز گردید. ابتدا زیر آب لوله کشی و سپس با آب مقطر شست و شو داده شد. کنجاله به مدت ۶۰ دقیقه در آب مقطر در دمای اتاق غوطه ور شد. سپس آب اضافی دور ریخته با آب مقطر آبکشی گردید. سرانجام به کنجاله سویا مقدار مناسب آب مقطر اضافه شد و در مخلوط کن برای به دست آوردن بافت هموزن ریخته شد. مقدار تقریبی ۲۰۰ گرم خمیر سویا همگن شده با رطوبت ۶۵ درصد با ترازوی دیجیتالی با دقت بالا معادل ۰/۰۰۱ گرم وزن، به یک فلاسک منتقل گردید. سپس، محیط با اتوکلاو در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. جهت کنترل میزان رطوبت کنجاله پس از اتوکلاو از روش آون گذاری در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. محلول ساکارز ۳٪ نیز تهیه گردید.

تلقیح باکتری

بعد از استریلیزاسیون، هنگامی که دمای کنجاله همگن شده به دمای اتاق رسید، محیط شاهد (خمیر فاقد میکروب تلقیح شده) تهیه شد. سپس مخلوط همگن طبق تحقیق de Olmos و همکاران در ۲۰۲۲ (۲۳) با میزان رطوبت ۶۵ درصد با ۰/۴٪ حجمی/وزنی در شرایط کاملاً استریل تلقیح، مخلوط و به صورت یکنواخت در پتری دیش‌ها توزیع، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور گرمخانه گذاری شد. مقدار سلول‌ها در زمان تلقیح حدود 6×10^7 CFU/g بود. ۴۸ ساعت بعد از کشت باکتری، ابتدا جهت اطمینان از خالص بودن باکتری تلقیحی پس از کشت، از کنجاله تلقیحی بر روی محیط MRS agar به صورت خطی کشت داده و گرمخانه گذاری گردید. سپس از پلیت لام تهیه، به روش گرم رنگ آمیزی، با میکروسکوپ نوری المپوس (Olympus) مشاهده، خالص بودن بیفیدوباکتر تأیید گردید. همچنین به منظور ارزیابی تأثیر ساکارز اضافی در تحریک فعالیت پروتئولیتیکی بیشتر بیفیدوباکترلاکتیس در بستر فرایند، میزان سه درصد ساکارز در شرایط استریل به خمیر سویا اضافه شد. آزمایش تکرار و بعد از مدت گرمخانه‌گذاری تغییرات pH و پروفایل اسیدهای چرب مورد سنجش قرار گرفت. جهت بررسی عملکرد محیط های کشت، ظرفیت مغذی بودن و ظرفیت مهار کنندگی با مقایسه شاهد انجام گردید.

برای اندازه‌گیری ظرفیت مغذی بودن محیط، سوسپانسیون اولیه میکروبی را به نسبت ۱ به ۱۰۰ با سرم نمکی استریل رقیق و مقدار ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون رقیق شده به محیط MRS agar برده و کشت داده شد. جهت اندازه‌گیری ظرفیت مهار کنندگی، سوسپانسیون اولیه به نسبت ۱ به ۱۰ در نرمال سالین استریل رقیق و مقدار ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون رقیق شده به محیط MRS agar انتقال کشت داده شد. سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. ۲۴ ساعت بعد از کشت میزان کلنی مغذی بودن 10^3 CFU/Plate و مهار کنندگی 10^4 CFU/Plate بود. میزان تغییرات pH نمونه‌ها در زمان‌های مختلف (۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت) با pH متر، مدل متروهم ساخت کشور آلمان انجام گردید (۱۷).

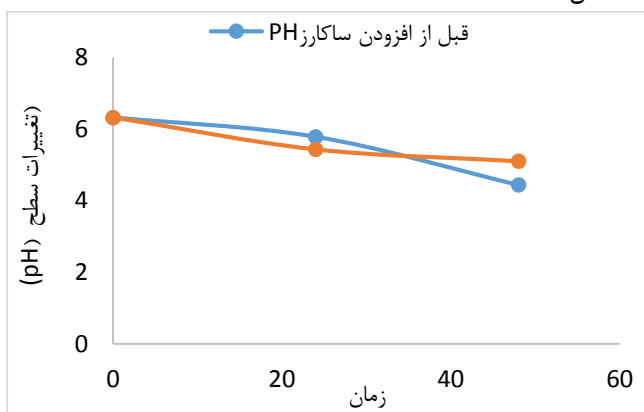
شمارش میکروبی

جمعیت کل باکتری های زنده در زمان های ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشت تعیین شد. از سوپای تخمیر شده (۱۰ گرم) با ۹۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل همگن، رقت‌های سریالی تهیه شد. حدود ۱۵ میلی لیتر محیط آگار قبل از آن در پلیت هاریخته شد. سپس ۱ میلی لیتر از هر رقت در پتری

• یافته‌ها

بررسی رشد و تخمیر بیفیدوباکتریوم لاکتیس در محیط بستر جامد خمیرهای سویا

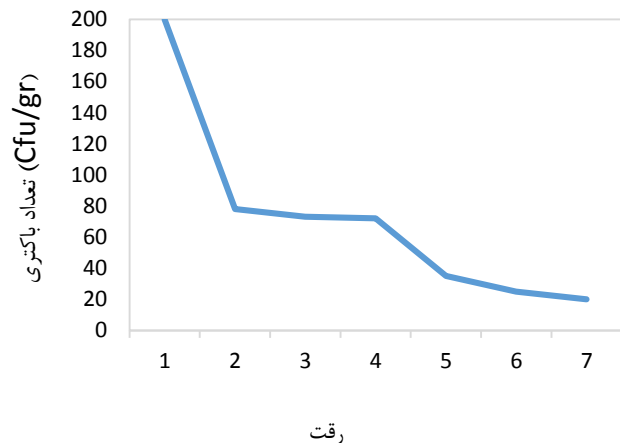
جهت تجزیه و تحلیل رفتار میکروارگانیسم انتخابی در بستر کنجاله سویا، بررسی میزان رشد (CFU) و فعالیت پروتئولیتیک (pH) و کروماتوگرافی اسیدهای چرب مد نظر قرار گرفت. بیفیدوباکتر لاکتیس سویه BBO4، کشت لاکتیکی مورد استفاده در این مطالعه قادر به رشد در بستر کنجاله سویا، بدون افزودن مکمل‌های کربوهیدرات یا پروتئین بود. ۱۸ ساعت بعد از تلقیح، میکروارگانیسم با سازگاری با محیط رشد، وارد فاز رشد گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تخمیر و رشد، جمعیت میکروبی، به میزان $9/98 \log CFU/g$ رسید. سویه سازگاری خوبی در بستر کنجاله سویا حاوی رطوبت ۶۵ درصد نشان داد. سویه با مصرف ترکیبات مختلف بستر، مواد معدنی، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب و قندها در مسیر متابولیک از طریق مسیر تخمیر منحصر به فرد فروکتوز ۶ - فسفات، (۲۳) و تولید اسید لاکتیک، اسید استیک و سایر اسیدهای آلی، باعث افت pH و تغییر در پروفایل اسیدهای چرب بستر گردید. در حالی که سطح pH از ۶/۳۲ به ۵/۷۸ بعد از ۲۴ ساعت و با گذشت ۴۸ ساعت به میزان ۵/۱ در سطح تلقیح ۴ درصد کنجاله فاقد ساکارز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. شروع افت شدید pH مشاهده شده بین ۸ تا ۱۲ ساعت بعد از تخمیر در بستر بود (شکل ۲).



شکل ۲. میزان تغییرات سطوح pH قبل و بعد از اضافه کردن ساکارز

در حالی که این تغییرات در بستر حاوی ساکارز اضافه شده بیشتر و شدیدتر بود. به طوری که pH از سطح ۶/۳۲ به ۵/۴۵ بعد از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت به سطح ۴/۴۴ کاهش یافت (شکل ۲). به طور کلی ۴۸ ساعت تخمیر برای افزایش تعداد باکتری‌ها، تغییر سطح اسید لاکتیک و تخریب پروتئین در کنجاله سویای تخمیر شده کافی بود. بیشترین رشد باکتری بعد از طی شدن ۴۸-۱۸ ساعت بعد از تلقیح روی داد. بعد از تخمیر کامل بستر

دیش استریل برای اندازه‌گیری تعداد کل سلول‌های زنده، با استفاده از روش کشت اختلاطی منتقل شد. با حرکت چرخشی به طور یکنواخت در تمام سطح آگار پخش شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. نتایج به صورت واحد تشکیل کلنی در گرم (lg CFU/g) بیان شد (شکل ۱).



شکل ۱. شمارش میکروبی

اندازه‌گیری میزان اسیدهای چرب به روش اسپکتروفتومتری

جهت بررسی توانایی باکتری جهت تولید اسیدهای چرب طی ۴۸ ساعت بعد از کشت، از روش اسپکتروفتومتری سریع بر اساس جذب UV با استفاده از دستگاه نانودراپ Model Biochrome WPA ساخت کشور انگلستان استفاده شد. نمونه کشت تخمیر شده با سانتریفیوژ یخچال‌دار (Germany) Model 3-30K, Sigma Co. با ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده، سپس ۱ میلی‌لیتر مایع رویی با ۲ میلی‌لیتر ایزوپروپانول مخلوط شد. پس از افزودن ۱/۵ میلی‌لیتر هگزان، مخلوط ورتکس گردید و پنج دقیقه در دمای اتاق در حالت ایستا قرار گرفت. سپس لایه هگزان جمع‌آوری شد و میزان جذب در طول موج ۲۳۳ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۶).

استخراج اسیدهای چرب

جهت استخراج اسیدهای چرب از روش فولچ (1957- Fulch) استفاده گردید (۲۶). بعد از مرحله روتاری (Rotary) نمونه‌ها طبق روش استاندارد ملی ۲ - ۱۳۱۲۶ جهت آنالیز توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متیله با تری فلوراید بور (BF₃) آماده و به دستگاه کروماتوگرافی گازی (Nexis2030 Shimadzu model, in Japan) تزریق گردید (۲۶). شناسایی اسیدهای چرب با زمان بازدارندگی اسیدچرب تعیین شد. نتایج به صورت درصد از کل اسید چرب اعلام شد.

چرب تولید می‌شود به میزان $26/90$ درصد و اسید استئاریک (C 18:0) دیگر اسید چرب اشباع زنجیره بلند با میزان $18/981$ + درصد بیشتر مشهود بود (جدول ۱). در حالی که نتایج بررسی بعد از افزودن ساکارز بر میزان اسیدهای چرب نشان داد، دو اسید چرب اشباع معروف پالمیتیک (C 16: 0) با میزان $32/16$ + درصد و اسید استئاریک (C18:0) دیگر اسید چرب اشباع زنجیره بلند با میزان $22/33$ + درصد دارای افزایش بیشتری نسبت به بستر اول (فاقد ساکارزافزوده شده) بود. بعلاوه در تغییرات میزان اسیدهای چرب غیراشباع بستر، اسید اولئیک (C18:1c) چربی امگا ۹ با میزان $20/69$ - درصد و اسید لینولئیک (C18:2c) با عدد $14/80$ - درصد نسبت به بستر اول نرخ کاهشی بیشتری نشان داد که این کاهش در اسید لینولئیک بیشتر بود (جدول ۲). بطور کلی مقایسه اسیدهای چرب شاخص در دوبستر فاقد ساکارز و حاوی ساکارز نشان داد، افزایش اسید چرب پالمیتیک، اسید استئاریک و میزان کاهش اسید لینولئیک، اسید اولئیک در محیط حاوی ساکارز مشهودتر بود (جدول ۱ و ۲).

میزان رشد باکتری در محیط کشت کنجاله سویا روند نزولی داشت. تقریباً بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت هیچ رشدی صورت نگرفت و حتی برخی از باکتری‌ها هم از بین رفت (خشک شدن بستر کاملاً مشهود بود). میکروارگانیسم انتخاب شده توانست بر تجمع متابولیت‌ها تأثیر بگذارد. زیرا نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی نشان داد، سویه توانایی زیادی در تغییر، افزایش و کاهش درصد اسیدهای چرب اشباع (Saturated) و غیر اشباع (Unsaturated) بستر در مقایسه با بستر شاهد داشت. بعلاوه میزان افزایش درصد اسیدهای چرب اشباع بیشتر از اسیدهای چرب غیراشباع و کاهش اسیدهای چرب امگا ۳ بیشتر از امگا ۶ بود. قابل ملاحظه‌ترین افزایش‌ها در اسید چرب پالمیتیک (Palmitic)، اسید استئاریک (Stearic) و بالاترین میزان افزایش در کاهش، در اسید لینولئیک (Linoleic acid) و اسید اولئیک بود، که این کاهش در اسید لینولئیک بیشتر از اسید لینولینیک (Linolenic acid) نیز بود (جدول ۱). میزان افزایش در دو اسید چرب اشباع معروف، اسید پالمیتیک (C 16 : 0) اولین اسید چرب اشباع شده‌ای که در طول سنتز اسیدهای

جدول ۱. نتایج ترکیب اسیدهای چرب (درصد اسیدهای چرب کل) بستربدون ساکارز (B) در مقایسه با بستر شاهد (A)

اسیدهای چرب	(دما / تلقیح / طوبت) (C 37-4-65%)		درصد میزان تغییرات (B-A)
	A / شاهد	B / بعد از تخمیر	
C12:0	۱.۵۵	۱.۳۹۹	+۰.۱۵۱
C14:0	۱.۲۶	۱.۵۰۷	+۰.۲۴۷
C15:0	۰.۲۶	۰.۶۴۴	+۰.۳۸۴
C16:0	۱۸.۵۷	۲۶.۹۰	+۸.۳۳
C16:۱	۰.۲۱	۰.۲۵۸	+۰.۰۴۸
C17:0	۰.۲۲	۰.۲۹۷	+۰.۰۷۷
C17:۱	ND	۰.۰۷۳	+۰.۰۷۳
C18:0	۱۳.۳۵	۱۸.۹۸۱	+۵.۶۳۱
C18:1t	۰.۳۴	۰.۴۶۹	+۰.۱۲۹
C18:1c	۲۷.۴۵	۲۲.۹۶۵	-۴.۴۸۵
C18:2t	۰.۲۹	۰.۲۷۸	-۰.۰۱۲
C18:2c	۳۰.۴۱	۲۰.۲۶۸	-۱۰.۱۴۲
C20:0	۰.۶۸	۰.۴۵۲	-۰.۲۲۸
C20:۱	۰.۱۳	۰.۰۲۳	-۰.۱۰۷
C21:0	ND	۰.۲۴۹	+۰.۲۴۹
C22:0	۰.۵۱	۰.۲۶۱	-۰.۲۴۹
C24:0	۰.۵۶	۰.۶۴۲	+۰.۰۸۲
C24:۱	۰.۰۷	۰.۱۴۹	+۰.۰۷۹

جدول ۲. نتایج ترکیب اسیدهای چرب (درصد اسیدهای چرب کل) بستر حاوی ۳٪ ساکارز (B) در مقایسه با بستر شاهد (A)

(دما/تلقیح/طوبت) (37 °C - 4% - 65%)			
اسیدهای چرب	A/شاهد	B/بستر حاوی ۳٪ ساکارز/افزافه	میزان تغییرات (B-A)
C12:0	۱.۵۵	۰.۶۲	-۰.۹۳
C14:0	۱.۲۶	۰.۷۵	-۰.۵۱
C14:1	۰.۴۱	ND	-۰.۴۱
C15:0	۰.۲۶	ND	-۰.۲۶
C15:1	۰.۲۹	ND	-۰.۲۹
C16:0	۱۸.۵۷	۳۲.۱۶	+۱۳.۵۹
C16:1	۰.۲۱	۰.۷۳	+۰.۵۲
C17:0	۰.۲۲	۰.۶۴	+۰.۴۲
C17:1	ND	۰.۱۱	+۰.۱۱
C18:0	۱۳.۳۵	۲۲.۳۳	+۸.۹۸
C18:1t	۰.۳۴	۰.۳۵	+۰.۰۱
C18:1c	۲۷.۴۵	۲۰.۶۹	-۶.۷۶
C18:2t	۰.۲۹	ND	-۰.۲۹
C18:2c	۳۰.۴۱	۱۴.۸۰	-۱۵.۶
C18:3t	ND	ND	ND
C18:3c	۱.۹۲	۰.۹۸	-۰.۹۴
C20:0	۰.۶۸	۰.۵۴	-۰.۱۲
C20:1	۰.۱۳	۰.۰۴	-۰.۰۹
C20:2	ND	ND	ND
C22:0	۰.۵۱	۰.۳۷	-۰.۱۴

• بحث

تنوع متابولیک (Metabolic) در میان گونه‌ها و سویه‌ها سازگاری، ادغام و تعامل متفاوت با میکروب های ساکن را توضیح می دهد. در حالی که ظرفیت بعضی از سویه‌های بیفیدوباکتریوم به عنوان تخریب‌کننده‌های اولیه کربوهیدرات‌های پیچیده گیاهی رژیم‌های اثبات می کند، تغذیه متقاطع متابولیک با تحریک رشد سبب تسهیل کردن تجزیه‌کننده‌های ثانویه می باشد. می تواند منجر به تولید بیشتر متابولیت های مرتبط با سلامتی مانند اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه شده، مزایای تولید بیفیدوباکتری‌ها را ارائه می دهد (۳)، زیرا کربوهیدرات‌ها عامل مهم کلونیزاسیون (Colonization) برای بیفیدوباکتریوم ها هستند. بطور کلی یک فرآیند تخمیر مؤثر، به انتخاب مناسب میکروارگانیسم، رفتار و رشد میکروارگانیسم در بستر، توانایی تجزیه ی بستر، بازده تولید محصول خاص، مقاومت به حرارت، pH و ایمنی محصول تخمیر شده برای انسان بستگی دارد (۱۳). بعلاوه زمان تخمیر، درصد رطوبت، میزان تلقیح و دما از شرایط مؤثر در SSF می باشد (۲۸-۲۴). تغییرات ایجاد شده بعد از تخمیر، pH کاهش یافته در این مطالعه می تواند مربوط به اسید استیک تولید شده در

طی پروسه تخمیر باشد (۱۵). بعلاوه سنتز اسیدهای آمینه در نتیجه تخمیر اسید لاکتیک (۲۴) و ترکیبات آزاد شده از هیدرولیز پروتئین‌ها نیز به بافری کردن محیط و افت شدید pH کمک کرده، PH اسیدی تر باعث تسریع رشد گونه ی بیفیدوباکتریوم می‌شود (۱۹، ۲۱). زیرا در نتیجه تخمیر، هیدرولیز پروتئین‌ها افزایش یافته، پپتیدها و اسید آمینه‌های کوچک تجزیه می شود. بنابراین دسترسی زیستی آنها افزایش می یابد (۱۹). همچنین انواع زیادی از پپتیدها را نیز تولید می‌کند که برخی از آنها دارای فعالیت‌های بیولوژیکی هستند. که این "پپتیدهای زیست فعال" (Bioactive peptides) از دیدگاه تغذیه و مراقبت‌های بهداشتی با ارزش می‌باشند (۲۹). زمان نیز از عوامل مهم در تخمیر می‌باشد. زمان پایدار، طول تخمیر را کوتاه کرده و کیفیت محصولات حاصل از تخمیر را بهبود می‌بخشد. اگر زمان تخمیر کمتر از میزان مناسب باشد، غلظت محصول نهایی کم و اگر طولانی باشد مقدار بیشتری مواد مغذی مصرف، در نتیجه تعداد باکتری کم و اتو فازی رخ می‌دهد (۲۸). نتایج کاهش سطح pH همسو با مطالعه de Olmos و همکاران در ۲۰۱۷ بود (۱۷). همچنین Li و همکاران در ۲۰۱۸ بیان کردند pH محصول تخمیر شده کاهش تدریجی را در مرحله اولیه تخمیر نشان می‌دهد و سپس ثابت می‌ماند

جامد تولید می‌شود، مضر است. بطور کلی مقایسه اسیدهای چرب شاخص دو بستر نشان داد، افزایش اسیدچرب پالمیتیک، اسید استئاریک و میزان افزایش در کاهش اسید لینولئیک، اسیداولئیک هنگامی که ساکارز به محیط اضافه شد بیشتر بود. که این افزایش بیشتر با میزان کاهش بیشتر pH همراه بود. عامل این افزایش تغییرات می‌تواند، بدلیل غلظت بالاتر اسید لاکتیک تولیدشده از ساکارز باقیمانده در محیط هنگام تخمیر باشد که در نتیجه، غلظت اسید لاکتیک باعث اسیدی شدن بیشتر محیط، افت بیشتر pH و ایجاد تغییرات متفاوت در تولید و تغییر میزان اسیدهای چرب گردید. با توجه به اینکه تخمیر حالت جامد با استفاده از دانه‌های سویا یک رویکرد جدید است. این مطالعه نشان داد، کنجاله سویا نیز می‌تواند یک حامل غذایی بالقوه برای بیفیدوباکتر لاکتیس سویه BBO4 در تخمیر حالت جامد و یک جایگزین اقتصادی ارزشمند بهتر برای استفاده در تولید اسیدهای چرب نیز باشد. علاوه بر این، یک فناوری سبز با خواص تغذیه‌ای بهبود یافته در جهت تولید غذاهای مشتق شده از سویا نیز می‌باشد (۱۷).

نتیجه گیری

باکتری انتخابی جهت تخمیر کنجاله سویا همچنین انتخاب میزان رطوبت بستر و سایر شرایط مانند دما و زمان مورد استفاده مناسب و مؤثر بود (۲۸). با توجه به نتایج، از فناوری‌های پایدار مانند SSF می‌توان برای طراحی غذاهای جامد مبتنی بر کنجاله سویا با خواص غذایی و عملکردی جذاب استفاده کرد. زیرا با توجه به نتایج، کنجاله سویا می‌تواند یک کاندید گیاهی عالی، یک جایگزین جذاب و اقتصادی برای تولید اسیدهای چرب و غذاهای کاربردی (۷) جهت عرضه محصولات جدید به بازار باشد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که این تحقیق در غیاب هر گونه روابط تجاری یا مالی که می‌تواند به عنوان تضاد منافع بالقوه تعبیر شود، انجام شده است.

سپاس‌گزاری

این پژوهش با پشتیبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شماره گزنت: ۷۶۵۷۶ انجام شده است. نویسندگان این مقاله از آزمایشگاه دانشکده کشاورزی تهران به خاطر در اختیار گذاشتن باکتری و از شرکت دامپروری زارع برای در اختیار قرار دادن کنجاله سویا سپاس‌گزاری می‌نمایند.

(۲۱). de Olmos و همکاران در تحقیق دیگری در ۲۰۲۲ شرایط بهینه تخمیر در رطوبت بستر ۶۵ درصد، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تلقیح ۴ درصد را در تخمیر کنجاله سویا گزارش کردند (۲۷، ۲۳). شرایط و نتایج این مطالعه همسو با تحقیق کنونی بود. درباره دلایل خشک شدن بستر بعد از پروسه تخمیر می‌توان بیان نمود، میزان رطوبت بستر نیز عامل تأثیرگذار بر کیفیت محصول نهایی است. رطوبت نامناسب، رشد میکروارگانیسم و ثبات pH را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۸). زیرا میکروارگانیسم‌ها جهت رشد نیازمند بسترهای مغذی می‌باشند. بنابراین، خشکی بستر با ایجاد شرایط نامناسب تخمیر، نقش کلیدی در عدم توانایی رشد سلولی و مرگ باکتری‌ها، تجمع محصولات تولیدی در طی فرآیند تخمیر حالت جامد ایفا می‌کند. زیرا رطوبت بیش از حد باعث کاهش تخلخل ماتریکس، کاهش انتقال اکسیژن، گرما و افزایش خطر آلودگی به مایکوتوکسین (Mycotoxin) می‌گردد. در مقابل، رطوبت کم باعث کاهش و کند شدن انتشار مواد مغذی و متابولیت‌ها شده که می‌تواند دلیل محدودیت رشد میکروارگانیسم‌ها، از دست دادن قابلیت زنده ماندن و مانعی برای ادامه رشد باکتری باشد (۲۸). افزون بر این، محتوای اسید لاکتیک با رطوبت اولیه مناسب در طول SSF افزایش یافته، در مقابل مقدار pH کاهش می‌یابد. که این کاهش هنگام تخمیر عامل مهمی برای رشد سلولی است. از طرفی تلقیح مناسب نیز عامل کلیدی برای موفقیت در تخمیر است. اندازه اولیه ۴ درصد تلقیح، مناسب برای تخمیر باکتری و رشد آن بود. نتیجه همسو با مطالعه de Olmos و همکاران (۲۰۲۲) بود (۲۳).

همچنین علیرغم اینکه بیفیدو باکترها توان تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه را دارند، تغییرات میزان اسیدهای چرب غیراشباع بستر، اسید لینولئیک (C18:2c) با میزان ۲۰/۲۶۸- درصد، اسیداولئیک (C18:1c) چربی امگا ۹ با میزان ۲۲/۹۶۵- درصد در مقایسه با بستر شاهد نرخ کاهشی بیشتری نشان داد که این کاهش بسیار با ارزش می‌باشد. اسید لینولئیک یک نوع چربی یا اسید چرب است که در روغن‌های گیاهی، آجیل، دانه‌ها و محصولات حیوانی یافت می‌شود. این ماده یک اسید چرب امگا ۶ ضروری است ولی در مقادیر کم مورد نیاز بدن انسان می‌باشد. با این حال، مقادیر بیش از حد آن می‌تواند به سلامت انسان آسیب برساند. بعلاوه فرم ترانس اولئیک اسید که الایدیک اسید (Elaidic acid) نامیده می‌شود، در صنعت طی فرآیند هیدروژناسیون جهت تبدیل روغن‌های مایع به روغن‌های

● References

- O'Callaghan A, Van Sinderen D. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:925.
- Kim JY, Bang S-J, Kim J-Y, Choi EJ, Heo K, Shim J-J, et al. The Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* HY8002 Potentially Improves the Mucosal Integrity of an Altered Intestinal Microbial Environment. *Frontiers in microbiology*. 2022;1573.
- Derrien M, Turrone F, Ventura M, van Sinderen D. Insights into endogenous *Bifidobacterium* species in the human gut microbiota during adulthood. *Trends in Microbiology*. 2022; 30(10): 940-7
- Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. *Bifidobacteria* and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:979.
- Wong CB, Odamaki T, Xiao J-z. Insights into the reason of Human-Residential *Bifidobacteria* (HRB) being the natural inhabitants of the human gut and their potential health-promoting benefits. *FEMS microbiology reviews*. 2020;44(3):369-85.
- Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical journal*. 2017;474(11):1823-36.
- Zuo F, Chen S, Marcotte H. Engineer probiotic bifidobacteria for food and biomedical applications-Current status and future prospective. *Biotechnology Advances*. 2020;45:107654.
- Chen J, Chen X, Loong HC. Recent development of probiotic *Bifidobacteria* for treating human diseases. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2021:1371.
- Jungersen M, Wind A, Johansen E, Christensen JE, Stuer-Lauridsen B, Eskesen D. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®. *Microorganisms*. 2014;2(2):92-110.
- Mao K, Gao J, Wang X, Li X, Geng S, Zhang T, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 Has Effect Against Obesity by Regulating Gut Microbiota in Two Phases in Human Microbiota-Associated Rats. *Frontiers in Nutrition*. 2021;8.
- Garro MS, Rivas FP, Garro OA. Solid state fermentation in food processing: Advances in reactor design and novel applications. 2021.
- Chen Y, Wang Y, Chen J, Tang H, Wang C, Li Z, et al. Bioprocessing of soybeans (*Glycine max* L.) by solid-state fermentation with *Eurotium cristatum* YL-1 improves total phenolic content, isoflavone aglycones, and antioxidant activity. *RSC advances*. 2020;10(29):16928-41.
- Yafetto L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. *Heliyon*. 2022:e09173.
- Cerda A, Artola A, Barrena R, Font X, Gea T, Sánchez A. Innovative production of bioproducts from organic waste through solid-state fermentation. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2019;3:63.
- Yao Y, Li H, Li J, Zhu B, Gao T. Anaerobic solid-state fermentation of soybean meal with *Bacillus* sp. to improve nutritional quality. *Frontiers in Nutrition*. 2021:552.
- de Oliveira NS, Ha N, da Cunha L, Cipriani LA, Neto AT, Skoronski E, et al. Fermentation of Soybean Meal with *Lactobacillus acidophilus* Allows Greater Inclusion of Vegetable Protein in the Diet and Can Reduce *Vibrionacea* in the Intestine of the South American Catfish (*Rhamdia quelen*). *Animals*. 2022;12(6):690.
- de Olmos AR, Deza MAC, Garro MS. Selected lactobacilli and bifidobacteria development in solid state fermentation using soybean paste. *Revista Argentina de Microbiología*. 2017;49(1):62-9.
- Deza MAC, de Olmos AR, Garro MS. Solid state fermentation to obtain vegetable products bio-enriched with isoflavone aglycones using lactic cultures. *Revista Argentina de Microbiología*. 2019;51(3):201-7.
- Qin P, Wang T, Luo Y. A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. *Journal of Agriculture and Food Research*. 2022;7:100265.
- Abdul Manan M, Webb C. Modern microbial solid state fermentation technology for future biorefineries for the production of added-value products. *Biofuel Research Journal*. 2017;4(4):730-40.
- Su L-W, Cheng Y-H, Hsiao FS-H, Han J-C, Yu Y-H. Optimization of Mixed Solid-state Fermentation of Soybean Meal by Species and. *Polish Journal of Microbiology*. 2018;67(3):297-305.
- Soccol CR, da Costa ESF, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, de Souza Vandenberghe LP. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*. 2017;1(1):52-71.
- de Olmos AR, Garro OA, Garro MS. Behavior study of *Bifidobacterium longum* using solid state fermentation from commercial soybean meal. *LWT*. 2022;157:113101.
- Rui X, Wang M, Zhang Y, Chen X, Li L, Liu Y, et al. Optimization of soy solid-state fermentation with selected lactic acid bacteria and the effect on the anti-nutritional components. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2017;41(6):e13290.
- GAO Y-l, WANG C-s, ZHU Q-h, QIAN G-y. Optimization of solid-state fermentation with *Lactobacillus brevis* and *Aspergillus oryzae* for trypsin inhibitor degradation in soybean meal. *Journal of Integrative Agriculture*. 2013;12(5):869-76.
- Azari SR, Hojjatoleslami M, Mousavi ZE, Kiani H, Jalali SMA. Production and Optimization of Conjugated Linoleic and Eicosapentaenoic Acids by *Bifidobacterium lactis* in Cold-Pressed Soybean Cake. *Frontiers in Nutrition*. 2022;9.
- Akpabli-Tsigbe NDK, Ma Y, Ekumah J-N, Osabutey J, Hu J, Xu M, et al. Novel solid-state fermentation extraction of 5-O-caffeoylquinic acid from heilong48 soybean using *Lactobacillus helveticus*: Parametric screening and optimization. *LWT*. 2021;149:111809.
- Yang L, Zeng X, Qiao S. Advances in research on solid-state fermented feed and its utilization: The pioneer of private customization for intestinal microorganisms. *Animal Nutrition*. 2021;7(4):905-16.
- Raveschot C, Cudennec B, Coutte F, Flahaut C, Fremont M, Drider D, et al. Production of bioactive peptides by *Lactobacillus* species: from gene to application. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:2354.

Screening of Fatty Acid Production by *Bifidobacterium lactis* in Soybean Cakes

Rafi Azari S¹, Hojjatol Esalami M², Ebrahimzadeh Mousavi Z^{*3}, Kiani H⁴, Jalali M.A⁵

1- PhD Student, Department of Agriculture and Food Industry, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2- Associate Professor, Department of Agriculture and Food Industry, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

3- *Corresponding author: Assistant Professor, Biological Processes and Biodiagnosis Laboratory, Food Science and Engineering Department, Agriculture and Natural Resources Campus, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: Zeinab.mosavi@ut.ac.ir

4- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

5- Assistant Professor, Nutrition and Organic Products Research Center (RCNOP), Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Received 14 Apr, 2023

Accepted 25 Jun, 2023

Background and Objectives: Microbial fermentation using solid substrates offers a safe, cost-effective straightforward approach for generating valuable organic acids, constituting the third-tier product category in addition to enzymes and secondary metabolites. This study investigated potentials of soybean meal paste as a substrate without the need of additional supplements, with the specific aim of propagating probiotic cultures and assessing performance of *Bifidobacterium lactis* in fatty acid production.

Materials & Methods: A homogenized soybean meal paste was prepared with an initial moisture content of 65% to begin solid-bed fermentation. This paste was inoculated with 4% of microbial culture and then incubated at 37 °C.

Results: After 24 h of fermentation, strain showed significant acidification and increases in cell numbers. Moreover, the microorganism demonstrated significant capacity to modulate levels of saturated and unsaturated fatty acids within the media, in contrast to the control media. The fatty acid composition shifted to a higher proportion of saturated fatty acids as well as further decreases in omega-3 acid than omega-6 fatty acid. Inoculation of the bacteria at 4% with substrate fermentation led to significant increases in the microbial population to 9.98 log CFU/g and decreases in pH levels to 5.1 at the optimal temperature of 37 °C.

Conclusion: The soybean paste demonstrates potentials as a carrier for this probiotic microorganisms, facilitating fatty acid production. This microorganism enhanced nutritional and functional characteristics of the substrate, rendering soybean meal an appealing option for the production of innovative products for market consumers. The findings suggest promising solutions for the cost-effective and sustainable production of organic acids and fatty acids using solid substrates and probiotic microorganisms.

Keywords: *Bifidobacterium lactis*, probiotic, Fatty acids, Soybean meal, Solid state fermentation