بهینه سازی اجزای محیط کشت برای تولید زیست‌توده سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* با استفاده از طراحی آزمایش

مرتضی مهاجری امیری[*1]، سیده معصومه میرنورالهی[2]

۱. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۲۸

چکیده

لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه *بولگاریکوس* یکی از مشهورترین باکتری‌های اسید لاکتیک پروبیوتیک است که به طور سنتی در فرآورده‌های تخمیری خصوصاً لبنیات استفاده می‌شود. مطالعات اندکی بر بهینه‌سازی تولید زیست‌توده *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* متمرکز شده‌اند، بنابراین استفاده از طراحی آزمایش در بهینه‌سازی این سویه ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه از سویه *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* جدا شده از فرآورده‌های تخمیری استان تهران استفاده شد. با روش یک متغیر در زمان، منابع کربن و نیتروژن مورد ارزیابی قرار گرفت. سه پارامتر غلظت گلوکز، عصاره مخمر و پپتون جهت بهینه‌سازی تأیید شد. سپس از سطح رویه پاسخ و مدل باکس- بنکن برای بهینه‌سازی استفاده شد. ارزیابی نتایج، مدل کوادراتیک را برای بهینه سازی، معنادار تشخیص داد. این مدل، پیشنهاد می‌دهد در غلظت گلوکز ۲۰ gr/L ، عصاره مخمر ۲۵ gr/L و پپتون ۳۰gr/L، وزن خشک ۲.۱۳۲ gr/L بدست می‌آید که با آزمون نهائی تأیید شد. این مطالعه در بهینه‌سازی منابع کربن و نیتروژن بر تولید زیست توده *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* موفق بوده است. متغیرها و مقادیر آنها توسط مطالعات دیگر تأیید شد؛ ولی در نهایت، به علت مطالعات محدودی که در ارتباط با بهینه‌سازی شرایط کشت این سویه انجام شده است، پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های بیشتری در این زمینه انجام شود.

واژگان کلیدی: *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*، روش یک متغیر در زمان، مدل باکس- بنکن، زیست توده، سطح رویه پاسخ

* mo.mohajeri@iau.ac.ir

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

مقدمه

امروزه پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل‌های غذایی و دارویی مورد توجه بسیاری قرار گرفته اند(۱). به علت اثبات مزایای آن‌ها در سلامت انسان مانند: ایجاد تعادل در میکروبیوتای روده، بهبود عملکرد سیستم ایمنی، محافظت در برابر عوامل پاتوژن و کنترل بیماری‌های روده‌ای، محبوبیت پروبیوتیک‌ها در سال‌های اخیر به طرز چشمگیری افزایش یافته است(۲). اهمیت پروبیوتیک‌ها در مطالعات متعددی تأکید شده است، بنا بر این پژوهش‌های مربوط به تولید آزمایشگاهی و نهایتاً صنعتی آن‌ها برای تأمین تقاضای فزاینده ایجاد شده در صنعت مکمل‌های دارویی ضروری به نظر می‌رسد(۳).

از میان میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌های اسید لاکتیک شامل: جنس‌های *لاکتوباسیلوس*، *بیفیدوباکتریوم*، *لاکتوکوکوس* و *استرپتوکوکوس*، در منابع مختلف در گروه میکروارگانیسم‌های با پتانسیل پروبیوتیک قرار می‌گیرند(۴). پروبیوتیک‌های تخمیرکننده اسید لاکتیک می‌توانند در روده انسان زنده بمانند و نقش حیاتی خود را در بهبود عملکرد میکروبیوم روده و همچنین به علت اثبات ارتباط روده و مغز، در سیستم عصبی نیز ایفا کنند. این میکروارگانیسم‌ها با تولید مولکول‌های فعال زیستی مانند اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، اگزوپلی‌ساکاریدها، استیل کولین، اسید γ-آمینو بوتیریک، سروتونین و ویتامین‌ها، اثرات درمانی مشخصی علیه بیماری‌های مختلف نشان می‌دهند(۵). علاوه بر این، پروبیوتیک‌ها دارای خواص ضد حساسیت، کاهش کلسترول، تقویت کننده سیستم ایمنی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند(۶, ۷).

در میان میکروارگانیسم‌های تخمیر کننده لاکتیکی، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* یکی از مشهورترین پروبیوتیک‌های تخمیرکننده اسید لاکتیک است که به طور سنتی در تخمیر مواد غذایی و خصوصاً لبنیات استفاده می‌شود. این سویه در کنار *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* به عنوان استارتر ماست مورد استفاده قرار می‌گیرد و می‌تواند به همراه پروبیوتیک‌های دیگر مثل *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* در کاهش کلسترول و تجزیه نمک‌های صفراوی مؤثر باشد(۸-۱۰). این میکروارگانیسم علاوه بر داشتن اثرات آنتی اکسیدانی، در کنار سویه‌هایی دیگر از *لاکتوباسیل‌ها*، *بیفیدوباکتریوم‌ها* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* باعث افزایش حرکات دودی روده و انجام بهتر دفع خصوصاً در کودکان ۵ تا ۱۵ ساله می‌شود(۱۱).

محیط کشت تجاری مورد استفاده برای باکتری‌های تخمیر لاکتیکی مانند *لاکتوباسیلوس* ها؛ MRS broth، است که از مواد مغذی ضروری (استات، منیزیم، منگنز و توئین ۸۰) و مواد بازدارنده رشد برای جلوگیری از رشد نامطلوب باکتری‌های ناخواسته تشکیل شده است. با این حال، محیط MRS brothبرای رشد حداکثری برخی از سویه‌های *لاکتوباسیلوس* کافی نیست(۱۲). *لاکتوباسیل* ها باکتری‌هایی سخت‌رشد هستند که به محیط‌های غنی نیاز دارند؛ زیرا ظرفیت آنها برای متابولیسم مواد مغذی مانند قندها، اسیدهای آمینه، پپتیدها و ویتامین‌ها بسته به سویه متفاوت است(۱۳). بنابراین، تولید سلول‌های زنده، زیست‌توده و متابولیت‌های *لاکتوباسیلوس*ها به طور قابل توجهی تحت تأثیر اجزای محیط و شرایط کشت قرار می‌گیرد. اگر بتوان یک محیط جدید برای هر گونه از این میکروارگانیسم‌ها به عنوان جایگزینی برای محیط‌های معمول ابداع کرد، منجر به افزایش تولید زیست‌توده و مزایای اقتصادی از جمله کاهش هزینه و زمان تخمیر خواهد شد(۱۴, ۱۵).

برای یافتن راه‌های مؤثر برای افزایش بازدهی محصولات مورد نظر، با استفاده از استراتژی‌های مختلف، می‌توان محیط کشت این باکتری‌ها را بهینه کرد. یکی از روش‌های

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

کلاسیک بهینه‌سازی؛ روش یک عامل در یک زمان است که در آن تنها یک عامل تغییر می‌کند؛ در حالی که عوامل دیگر ثابت هستند. این روش اگرچه ساده به نظر می‌رسد، شامل تعداد زیادی آزمایش با تعداد فزاینده‌ای از پارامترها است. علاوه بر این، روش فوق برهم‌کنش بین عوامل را نادیده می‌گیرد(۱۶). بنابراین، روش‌های آماری طراحی فاکتوریل و روش سطح رویه پاسخ(RSM[1]) به دلیل کارایی بالا ترجیح داده می‌شوند. علاوه بر این، روش‌های آماری تکمیلی شامل تحلیل رگرسیون چندگانه، اثرات عوامل مختلف، روابط بین متغیرها و شرایط بهینه را با دقت بالا در نظر می‌گیرد(۱۷).

بسیاری از مطالعات بهینه‌سازی در ارتباط با پروبیوتیک‌ها بر روی افزایش تولید متابولیت‌هایی مانند باکتریوسین، اسید لاکتیک و اگزوپلی‌ساکاریدها متمرکز شده‌اند(۱۸, ۱۹) و مطالعات اندکی بر روی تولید زیست توده *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* انجام گرفته است. بنابراین، در این مطالعه از روش RSM برای بهینه‌سازی محیط و شرایط تخمیر استفاده شد، تا تولید ارتقا یافته زیست توده توسط این سویه مهم بتواند در صنعت پروبیوتیک و تولید استارتر محصولات لبنی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش ها

سویه باکتری و محیط کشت

باکتری *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* جدا شده از لبنیات سنتی استان تهران در این مطالعه استفاده شد. این سویه در مطالعه‌ای پایه‌ای با فن‌آوری 16srRNA تأیید شده بود. کشت های استوک در دمای ^{o}C ۸۰- در MRS broth (شرکت مرک، آلمان) با گلیسرول ۲۰ درصد (v/v) استریل نگهداری شدند. سویه در دمای ^{o}C ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت h ۲۴ ساعت در محیط MRS broth گرماگذاری شد و حداقل دو بار قبل از استفاده پاساژ داده شد.

محیط پایه از محیط MRS broth براث مشتق شده و شامل gr/L ۵ استات سدیم (شرکت مرک، آلمان)،gr/L ۲ K2HPO4(دکتر مجللی، ایران)،gr/L ۱ Tween 80 (شرکت نوترون، ایران) بود.gr/L ۰.۱ MgSO4·7H2O (شرکت سیگما، ایالات متحده آمریکا) ، وgr/L ۰.۰۵ MnSO4·H2O(سیگما، ایالات متحده آمریکا) بود. محیط پایه به تمام محیط‌های مورد استفاده در این مطالعه اضافه شد. pH اولیه همه محیط‌ها با هیدروکسید سدیم ۱M و اسید هیدروکلریک ۱ M قبل از سترون کردن روی ۰.۰۵ ± ۶.۵ تنظیم شد. از محیط MRS broth به عنوان کنترل(محیط پایه) برای مقایسه با محیط بهینه استفاده شد.

شرایط تخمیر

یک کلنی از باکتری که در محیط جامد MRS agar برای بدست آوردن کلنی خالص کشت داده شده بود، در MRS broth تلقیح شد و با جذب نوری (OD) ۰.۵ ۰.۰۵± درnm ۶۰۰ طبق استاندارد مک فارلند تنظیم شد.mL ۱۰۰ از محیط با ۱ درصد (v/v) کشت اولیه در ارلن مایرmL ۲۵۰ تلقیح شد و در دمای ^{o}C ۳۷ به مدت ۲۴h ساعت بدون شیکر گرماگذاری شد.

اندازه گیری وزن خشک زیست‌توده

محیط کشت مایع کشت داده شده(۵۰mL) جمع آوری و با سانتریفیوژ در g× ۴۰۰۰ به مدت min ۱۵ در دمای ^{o}C ۴ جدا شد. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب های حاوی سلول‌های باکتری دو بار با آب مقطر استریل شسته شدند. زیست‌توده خشک در آون با دمای ^{o}C ۸۰ تا رسیدن به وزن ثابت به دست آمد.

تعیین ترکیبات محیط کشت با استفاده از روش یک عامل در زمان

[1] Response Surface Methodology

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

برای بررسی اثرات منابع کربن و نیتروژن بر توده سلولی باکتری از روش یک عامل در زمان استفاده شد. این روش می‌تواند اثرات هر متغیر را تخمین بزند، اما تعامل بین متغیرها را در نظر نمی‌گیرد. قبل از ادامه روش یک عامل در زمان، کیت API 50 CHL (شرکت های‌مدیا، هند) برای ارزیابی در دسترس بودن کربوهیدرات‌های متابولیزه کننده استفاده شد. گلوکز، ساکارز، مالتوز، فروکتوز، لاکتوز و گالاکتوز انتخاب شدند و شش منبع کربن به صورت جداگانه به ۱۰۰mL محیط پایه حاوی gr/L ۱۰ عصاره مخمر با غلظت gr/L ۲۰ اضافه شدند. به همین ترتیب، پنج منبع نیتروژن (پپتون، تریپتون، عصاره مخمر، عصاره گوشت گاو و عصاره مالت) به ۱۰۰mL محیط پایه حاوی gr/L ۲۰ گلوکز با غلظت هر یک به میزان gr/L ۱۰ اضافه شد. در پایان سه متغیر مؤثرتر از این روش انتخاب شده و از روش باکس-بنکن بهینه‌سازی شدند.

روش طراحی باکس-بنکن و روش سطح پاسخ

RSM با روش باکس - بنکن برای بهینه‌سازی غلظت اجزای محیط و برآورد اثرات هر متغیر و برهم‌کنش بین متغیرها مورد استفاده قرار گرفت. گلوکز، عصاره مخمر و پپتون به عنوان متغیرهای مستقل استفاده شد. متغیرها در سه سطح مختلف (۱-، ۰، ۱) تنظیم شدند. محدوده مقادیر واقعی متغیرها در جدول ۱ ارائه شده است(جدول۱).

جدول۱: محدوده بالا و پایین سه متغیر انتخابی در بهینه سازی

متغیرها	سطح پایین (۱-) (g/L)	سطح میانه(۰) (g/L)	سطح بالا(۱+) (g/L)
گلوکز(A)	۱۵	۲۰	۲۵
عصاره مخمر(B)	۱۵	۲۵	۳۵
پپتون(C)	۲۰	۳۰	۴۰

طراحی آزمایش باکس - بنکن از یک طرح فاکتوریل کامل ساخته شده است که بر اساس فرمول‌های آماری و بر مبنای تعداد متغیرهای انتخاب شده، نقاط مختلفی را برای آزمون پیشنهاد می‌دهد. محیط‌ها بر اساس ترکیبی از متغیرها در آزمایش‌های تصادفی تهیه شدند و همه آزمایش‌ها در شرایط استاتیک انجام شدند. برای ایجاد مدل رگرسیونی؛ از میزان زیست توده به‌دست‌آمده به عنوان پاسخ آزمون، استفاده شد. معادله چند جمله‌ای درجه دوم برای متغیرها به شرح زیر است:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2$$

که در آن Y مقدار پاسخ متغیر وابسته است (زیست توده *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*). β_0، β_i، β_{ij} و β_{ii} به ترتیب ضرایب قطع، خطی، برهمکنش و مجذور مدل هستند. X_i و X_j متغیرهای مستقل هستند.

محاسبه نقطه بهینه سازی شده

تخمیر *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* در محیط کشت و شرایط بهینه پیشنهاد داده شده توسط طراحی باکس-بنکن انجام شد. محیط کشت با ۱درصد (v/v) از پیش‌کشت رشد یافته در محیط MRS broth به مدت h ۲۴ تلقیح شد. دما در ^{o}C ۳۰ کنترل شد و pH در ۶.۵ با NaOH با غلظت M ۳ وهیدروکلریک اسید با غلظت M ۳ حفظ شد. محیط MRS brothبه عنوان شاهد استفاده شد و تخمیر در شاهد در همان شرایط نمونه آزمون انجام شد. میزان زیست‌توده و زنده ماندن سلول به مدت h ۲۴ اندازه‌گیری شد. ۵۰mL آبگوشت کشت داده شده برای اندازه‌گیری زیست‌توده جمع‌آوری شد و زنده ماندن سلول‌ها پس از یک دوره گرماگذاری در دمای ^{o}C ۳۷ به مدت ۲۴h ساعت بر روی پلیت‌های MRS agar اندازه گیری شد.

تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شده و پاسخ‌ها میانگین گرفته شد. داده‌ها به عنوان میانگین ± انحراف معیار ارائه شده

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

است. برای تعیین میزان اختلاف معنی‌دار از تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. مقادیر در$p<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد و تمام تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از نرم افزار معتبر Design-Expert® (شرکت Stat-Ease؛ ایالات متحده آمریکا) ارزیابی گردید.

نتایج

نتایج آزمون یک متغیر در زمان

همانطور که ذکر شد شش منبع کربن استفاده شده شامل گلوکز، ساکارز، مالتوز، فروکتوز، لاکتوز و گالاکتوز انتخاب شدند و به همین ترتیب، پنج منبع نیتروژن(پپتون، تریپتون، عصاره مخمر، عصاره گوشت گاو و عصاره مالت) بررسی اولیه شدند که در این میان گلوکز به عنوان بهترین منبع کربن و عصاره مخمر و پپتون به عنوان بهترین منابع نیتروژن انتخاب شدند؛ چرا که بیشترین افزایش در تولید زیست توده را از خود نشان دادند. این سه منبع گلوکز، عصاره مخمر و پپتون هر یک به ترتیب gr/L ۰.۴۳ gr/L، ۰.۳۵ و gr/L ۰.۳۹ به زیست‌توده باکتری در مقایسه با محیط پایه افزودند. منابع کربن و نیتروژن دیگر مورد مطالعه در مقایسه با محیط پایه، یا مقادیر کمتری زیست‌توده ایجاد کردند یا تفاوت معناداری نداشتند.

نتایج آزمون باکس- بنکن و آنالیز آماری محیط

در آزمون باکس - بنکن سه منبع انتخاب شده شامل گلوکز، عصاره مخمر و پپتون برای بهینه‌سازی انتخاب شدند. آزمون باکس - بنکن در ۱۷ مرحله انجام گردید؛ که نتایج آن در جدول ۲ ارائه گردیده است(جدول۲).

جدول ۲: طراحی باکس- بنکن برای بهینه سازی اجزای محیط *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*

استاندارد	ترتیب	متغیر اول	متغیر دوم	متغیر سوم	نتیجه آزمون
Std	Run	غلظت گلوکز(g/L)	غلظت عصاره مخمر(g/L)	غلظت پپتون(g/L)	میزان زیست‌توده باکتری(g/L)
۳	۱	۱۵	۳۵	۳۰	۱.۵۳
۷	۲	۱۵	۲۵	۴۰	۱.۷۲
۱۰	۳	۲۰	۳۵	۲۰	۱.۴۷
۱۴	۴	۲۰	۲۵	۳۰	۲.۱۳
۹	۵	۲۰	۱۵	۲۰	۱.۷۳
۵	۶	۱۵	۲۵	۲۰	۱.۴۴
۱۵	۷	۲۰	۲۵	۳۰	۲.۱۶
۱۶	۸	۲۰	۲۵	۳۰	۲.۲۱
۱۳	۹	۲۰	۲۵	۳۰	۲.۱۴
۶	۱۰	۲۵	۲۵	۲۰	۱.۸۳
۱	۱۱	۱۵	۱۵	۳۰	۱.۶۴
۱۷	۱۲	۲۰	۲۵	۳۰	۲.۰۲
۱۲	۱۳	۲۰	۳۵	۴۰	۲.۰۱
۲	۱۴	۲۵	۱۵	۳۰	۱.۶۸
۸	۱۵	۲۵	۲۵	۴۰	۲.۱۲
۱۱	۱۶	۲۰	۱۵	۴۰	۱.۷۹
۴	۱۷	۲۵	۳۵	۳۰	۲.۰۰

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

نتایج بررسی شده با نرم افزار نشان می‌دهد که مدل linear مناسب نیست، مدل‌های فاکتوریل و مدل های Cubic درجه سوم و بالاتر نیز مناسب نیست. مناسب ترین مدل حالت Quadratic می باشد. در این صورت عدد R^2 و adjusted R^2 در این حالت بیشترین نزدیکی به عدد ۱ خواهند داشت. Lack of fit F value معنادار نیست (بهترین حالت برای این مقیاس معنادار نبودن است؛ چرا که معنادار نبودن نقص برازش نشان دهنده معنادار بودن و برازش مدل است). P value در مقایسه با بررسی بقیه مدل‌ها در کمترین حد قرار دارد (جدول ۳).

جدول۳: آنالیز واریانس مدل درجه دوم استفاده شده در بهینه سازی طراحی باکس-بنکن

معناداری	P	F	میانگین مربعات	درجه آزادی	مجموع مربعات	منبع
معناداری	۰.۰۰۰۳	۲۱.۳۷	۰.۱۱۳۶	۹	۱.۰۲	**مدل**
	۰.۰۰۰۴	۳۹.۷۵	۰.۲۱۱۳	۱	۰.۲۱۱۳	**A-گلوکز**
	۰.۰۰۶۹	۰.۶۷۹۷	۰.۰۰۳۶	۱	۰.۰۰۳۶	**B-عصاره مخمر**
	۰.۰۰۰۸	۳۲.۱۹	۰.۱۷۱۱	۱	۰.۱۷۱۱	**C-پپتون**
	۰.۰۲۱۴	۸.۷۰	۰.۰۴۶۲	۱	۰.۰۴۶۲	**AB**
	۰.۹۴۷۲	۰.۰۰۴۷	۰.۰۰۰۰	۱	۰.۰۰۰۰	**AC**
	۰.۰۱۳۳	۱۰.۸۴	۰.۰۵۷۶	۱	۰.۰۵۷۶	**BC**
	۰.۰۰۰۹	۳۰.۴۳	۰.۱۶۱۸	۱	۰.۱۶۱۸	**A^2**
	۰.۰۰۰۴	۳۹.۵۷	۰.۲۱۰۳	۱	۰.۲۱۰۳	**B^2**
	۰.۰۰۲۹	۱۹.۹۰	۰.۱۰۵۸	۱	۰.۱۰۵۸	**C^2**
			۰.۰۰۵۳	۷	۰.۰۳۷۲	**باقی مانده**
*غیر معناداری	۰.۴۱۲۹	۱.۲۱	۰.۰۰۵۹	۳	۰.۰۱۷۷	**نقص برازش**
			۰.۰۰۴۹	۴	۰.۰۱۹۵	**خطای خالص**
				۱۶	۱.۰۶	**میزان مجموع**

*نقص برازش در صورت غیرمعنادار بودن نشانه برازش و مناسب بودن مدل است.

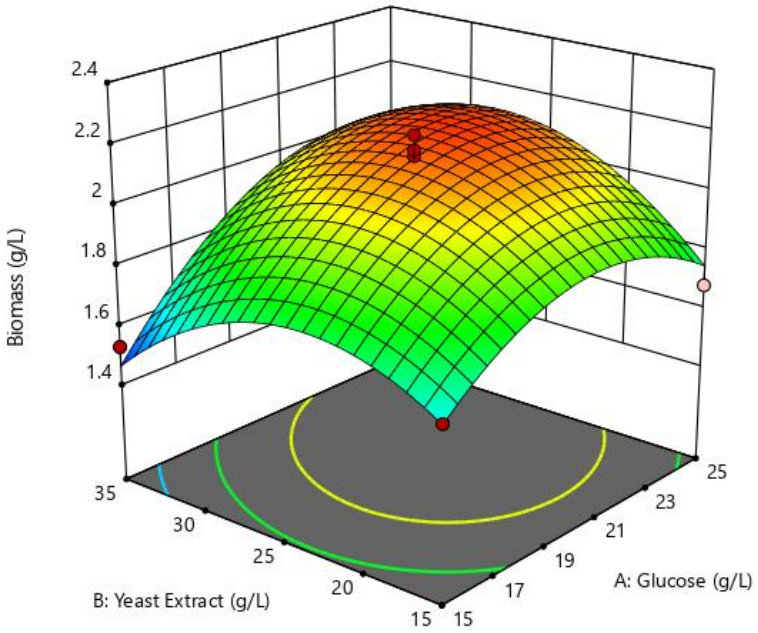
پیشگویی مقدار بهینه

مدل بر حسب مقادیر پاسخ، پیشنهاد می‌دهد که در غلظت گلوکز ۲۰ gr/L و غلظت عصاره مخمر ۲۵ gr/L و پپتون ۳۰ gr/L ، وزن خشک میکروارگانیسم ۲.۱۳۲ gr/L پیشگویی می‌شود. این میزان با آزمایش نهایی نقطه بهینه به میزان ۲.۱۵۵ gr/L به دست آمد. این عدد در مقایسه با میزان پیشگویی شده با تقریب ۹۸.۹ درصد به دست آمد و نشان دهنده دقت بالای مدل است.

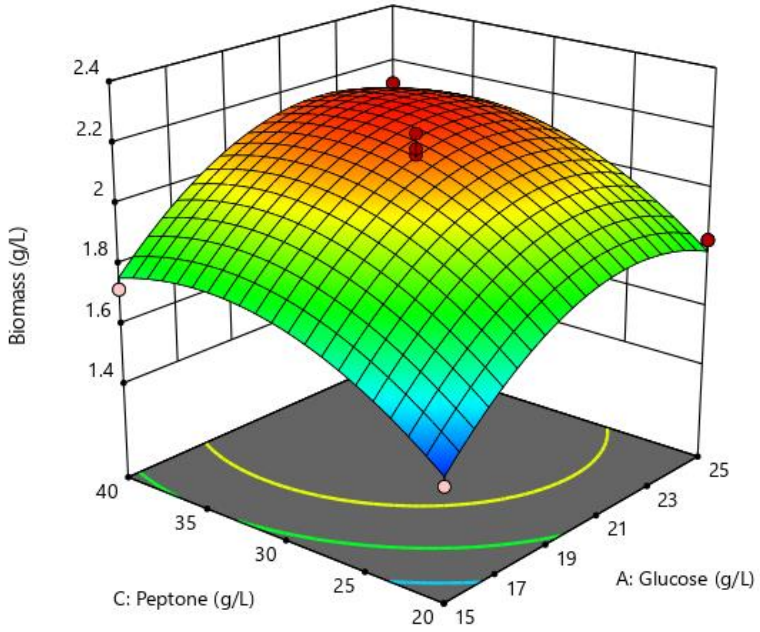
طرح اثر متغیرها بر پاسخ

در نمودار ۱ و۲ اثر هر یک از متغیرها بر روی نتیجه نهایی به طور سه بعدی نمایش داده شده است. قله‌های نشان داده شده در هر یک از نمودارها نشان دهنده نقطه بهینه با در نظر گرفتن فاکتورهای مورد مطالعه است(نمودار ۱ و۲).

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]



نمودار۱: نمایش سه بعدی اثر غلظت گلوکز و عصاره مخمر در محیط کشت؛ زمانی که غلظت پپتون در حالت بهینه قرار دارد.



نمودار۲: نمایش سه بعدی اثر غلظت پپتون و گلوکز در محیط کشت؛ زمانی که غلظت عصاره مخمر در حالت بهینه قرار دارد.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

بحث

هدف از این مطالعه بررسی اثر منابع کربن و نیتروژن بر تولید زیست توده سویه پروبیوتیک *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* بوده است؛ که در بهینه‌سازی این منابع برای رشد میکروارگانیسم موفق بوده است.

تحقیقات گسترده‌ای در مورد گونه‌های مختلف باکتری جنس *لاکتوباسیلوس* در زمینه رشد بهینه و تولید محصولات جانبی مثل اگزوپلی‌ساکاریدها، اسیدلاکتیک و باکتریوسین انجام شده است که در بسیاری از آن‌ها برای انتخاب و بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر، از سطح رویه پاسخ استفاده شده است. در مطالعات انجام شده جهت بررسی شرایط و اجزای محیط‌های کشت پروبیوتیک‌ها متغیرهای متعددی مانند دور همزن، اسیدیته، دما، منبع ازت و کربن، میزان تلقیح اولیه میکروارگانیسم در محیط کشت و عوامل دیگر مورد بررسی قرار گرفته‌اند(۲۰, ۲۱).

مطالعاتی که در ارتباط با *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* انجام شده است؛ اغلب در مورد زنده ماندن این میکروارگانیسم پس از خشک کردن انجمادی و استفاده از این میکروارگانیسم به عنوان استارتر لبنیات بوده است. Shu و همکاران (۲۰۲۱) اثر املاح مختلف در زنده ماندن باکتری *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* حین خشک‌کردن انجمادی را بررسی کرده‌اند. در این مطالعه که از سطح رویه پاسخ استفاده شده است؛ اهمیت منابع کربن و نیتروژن نیز مورد تأیید قرار گرفته است(۲۲).

در ارتباط با بهینه‌سازی شرایط رشد *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* در ایران مطالعات اندکی انجام شده است. در مطالعه‌ای توسط آقابابائی و همکاران(۲۰۱۴) پارامترهای رشد *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* مورد بررسی قرار گرفتند و توسط طرح رویه پاسخ، پارامترهایی مثل اثر دما و pH را مؤثرتر تشخیص داده و بهینه سازی کردند؛ ولی فاکتورهای مشترکی با مطالعه حاضر دیده نمی‌شود(۲۳).

مطالعه حاضر در میان منابع کربن، اثر گلوکز را مؤثرتر از منابع دیگر نشان داد و میزان گلوکز ۲۰ گرم در لیتر در مدل باکس- بنکن برای رشد باکتری بهینه تشخیص داده شد. نتایج بدست آمده با نتایج Zhang و همکاران (۲۰۱۷) منطبق است. مطالعه اخیر منابع مؤثر بر رشد *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* با روش رویه پاسخ و مشخصاً مدل باکس – بنکن را مورد بررسی قرار داده است. در این مطالعه نیز اهمیت گلوکز به عنوان منبع کربن اثبات می‌شود؛ با این تفاوت که مقدار بهینه گلوکز در این مطالعه کمتر از مطالعه حاضر است(۲۴). در مطالعات مختلف از منابع کربن دیگر مثل مالتوز و ترهالوز نیز استفاده شده است(۲۵)، که در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفت، با این وجود؛ مطالعات گسترده‌ای تأثیر استفاده از گلوکز در بهینه‌سازی محیط کشت انواع *لاکتوباسیل*‌ها را تأیید می‌کنند(۲۶-۲۸).

در این پژوهش، از میان منابع ازت مورد بررسی؛ عصاره مخمر را با میزان ۲۵ g/L بر رشد باکتری *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* مؤثرتر از منابع دیگر تشخیص داد. مطالعات بسیاری اثر بخشی عصاره مخمر را بر رشد باکتری *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* تایید می‌کنند؛ از جمله Zhang و همکاران (۲۰۲۰) هنگامی که یک محیط MRS broth اصلاح شده با عصاره مخمر را بر میزان رشد باکتری *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* و تولید باکتریوسین توسط این باکتری مورد مطالعه قرار دادند، اثر عصاره مخمر را نسبت به منابع دیگر مورد مطالعه، مؤثرتر تشخیص دادند(۲۹). همچنین تأثیر عصاره مخمر به عنوان فاکتور مؤثر بر رشد بهتر این باکتری با مطالعات Ayivi و همکاران (۲۰۲۲)، Somani و همکاران(۲۰۲۰)، Xiao و همکاران(۲۰۲۰) و Choi و همکاران(۲۰۲۱) مطابقت دارد. تفاوت میزان بهینه‌سازی شده عصاره مخمر در مطالعات ذکرشده با مطالعه حاضر احتمالاً به تفاوت در نوع جدایه‌ها و روش‌های بهینه سازی وابسته است(۳, ۱۰, ۳۰, ۳۱).

استفاده از پپتون در بهینه سازی *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* کمتر مورد توجه قرار گرفته است؛ با این حال نتیجه به دست آمده در این بررسی با Zhang و همکاران

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

(۲۰۱۷) مطابقت دارد؛ با این تفاوت که در این مطالعه از پپتون کازئین استفاده شده است(۲۴).

نتیجه‌گیری

مطالعات انجام شده در زمینه بهینه‌سازی شرایط رشد *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* نتایج مطالعه حاضر را در اهمیت منابع نیتروژن و کربن خصوصاً گلوکز و عصاره مخمر، تأیید می‌کنند. در نهایت، به علت مطالعات محدودی که بر بهینه‌سازی شرایط کشت این سویه پروبیوتیک انجام شده است، پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری با درنظر گرفتن پارامترهای متعدد دیگر در این زمینه طراحی گردد؛ چرا که باکتری پروبیوتیک *ل. دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* به طور گسترده‌ای در جهان به همراه گونه‌های دیگر باکتری‌های لاکتیک مثل *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* به عنوان استارتر محصولات لبنی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

منابع

1. 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. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2017;11(4):35-44.

2. Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. Journal of functional foods. 2014;9:225-41.

3. Choi G-H, Lee N-K, Paik H-D. Optimization of medium composition for biomass production of Lactobacillus plantarum 2006 ۵۵using response surface methodology. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2021;31(5):717.

4. Evivie SE, Huo G-C, Igene JO, Bian X. Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. Food & nutrition research. 2017;61(1):1318034.

5. Nataraj BH, Shivanna SK, Rao P, Nagpal R, Behare PV. Evolutionary concepts in the functional biotics arena: a mini-review. Food Science and Biotechnology. 2021;30(4):487-96.

6. Das TK, Pradhan S, Chakrabarti S, Mondal KC, Ghosh K. Current status of probiotic and related health benefits. Applied Food Research. 2022;2(2):100185.

7. Puttarat N, Kasorn A, Vitheejongjaroen P, Chantarangkul C, Tangwattanachuleeporn M, Taweechotipatr M. Beneficial effects of indigenous probiotics in high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemic rats. Nutrients. 2023;15(12):2710.

8. Lye H-S, Rahmat-Ali GR, Liong M-T. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. International Dairy Journal. 2010;20(3):169-75.

9. Leaf-nosed bat. Encyclopædia Britannica: Encyclopædia Britannica Online; 2009.

10. Ayivi RD, Ibrahim SA, Krastanov A, Somani A, Siddiqui SA. The impact of alternative nitrogen sources on the growth and viability of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus. Journal of Dairy Science. 2022;105(10):7986-97.

11. Sadeghzadeh M, Rabieefar A, Khoshnevisasl P, Mousavinasab N, Eftekhari K. The effect of probiotics on childhood constipation: a randomized controlled double blind clinical trial. International journal of pediatrics. 2014;2014.

12. Yeo S, Shin HS, Lee HW, Hong D, Park H, Holzapfel W, et al. Determination of optimized growth medium and cryoprotective additives to enhance the growth and survival of Lactobacillus salivarius. 2018.

13. Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J, et al. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2021;9:612285.

14. Kumar V, Naik B ,Kumar A, Khanduri N, Rustagi S, Kumar S. Probiotics media: Significance, challenges, and future perspective-a mini review. Food Production, Processing and Nutrition. 2022;4(1):17.

15. Śliżewska K, Chlebicz-Wójcik A. Growth kinetics of probiotic Lactobacillus strains in the alternative, cost-efficient semi-solid fermentation medium. Biology. 2020;9(12):423.

16. Mohajeri Amiri M, Fazeli MR, Babaee T, Amini M, Roodbari NH, Mousavi SB, et al. Production of Vitamin D3 Enriched Biomass of Saccharomyces Cerevisiae as A Potential Food Supplement: Evaluation and Optimization of Culture Conditions Using Plackett–Burman and Response Surface Methodological Approaches. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR. 2019;18(2):974.

17. Mohajeri Amiri M, Fazeli MR, Amini M, Roodbari NH, Samadi N. optimization of culture conditions for enrichment of saccharomyces cerevisiae with Dl-α-Tocopherol by response surface methodology. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR. 2017;16(4):1546.

18. Habib B, Vaid S, Bangotra R, Sharma S ,Bajaj BK. Bioprospecting of probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering and exopolysaccharide producing potential. Biologia. 2022;77(7):1931-51.

19. Mora-Villalobos JA, Montero-Zamora J, Barboza N, Rojas-Garbanzo C, Usaga J, Redondo-Solano M , et al. Multi-product lactic acid bacteria fermentations: a review. Fermentation. 2020;6(1):23.

20. Bibi A, Xiong Y, Rajoka MSR, Mehwish HM, Radicetti E, Umair M, et al. Recent advances in the production of exopolysaccharide (EPS) from

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

Lactobacillus spp .and its application in the food industry: A review. Sustainability. 2021;13(22):12429.

21. Abbasiliasi S, Tan JS, Ibrahim TAT, Bashokouh F, Ramakrishnan NR, Mustafa S, et al. Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. Rsc Advances. 2017;7(47):29395-420.

22. Shu G, Li B, Zhang M, Huang J, Chen L, Dong X. Optimization of compatible solutes for improving survival of freeze-dried Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus using Box-Behnken design. Acta Universitatis Cibiniensis Series E: FOOD TECHNOLOGY. 2021;25(2):301.

23. Aghababaie M, Beheshti M, Khanahmadi M. Effect of temperature and pH on formulating the kinetic growth parameters and lactic acid production of Lactobacillus bulgaricus. 2014.

24. Zhang B, Shu G, Bao C, Cao J, Tan Y. Optimization of Culture Medium for using Box-Behnken Design. Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology. 2017;21(1):3-10.

25. Ren H, Zentek J, Vahjen W. Optimization of production parameters for probiotic Lactobacillus strains as feed additive. Molecules. 2019;24(18):3286.

26. Yoo H, Rheem I, Rheem S, Oh S. Optimizing medium components for the maximum growth of Lactobacillus plantarum JNU 2116 using response surface methodology. Korean journal for food science of animal resources. 2018;38(2):240.

27. Kepli A, Dailin D, Malek R, Elsayed E, Leng O, El-Enshasy H. Medium optimization using response surface methodology for high cell mass production of Lactobacillus acidophilus. 2019.

28. Aristimuño Ficoseco C ,Mansilla FI, Vignolo GM, Nader-Macías MEF. Optimization of probiotic lactobacilli production for in-feed supplementation to feedlot cattle. Applied Microbiology. 2023;3(2):339-57.

29. Zhang J, Bu Y, Zhang C, Yi H, Liu D, Jiao J. Development of a low-cost and high-efficiency culture medium for bacteriocin lac-b23 production by Lactobacillus plantarum j23. Biology. 2020;9(7):171.

30. Somani S, Boran B, Bekers K. Impact of nucleotides on L. bulgaricus growth, viability and performance. Ohly vVhite Paper, Ohly GmbH. 2020.

31. Xiao S, Bekers M, van der Werf M. Using DoE to optimize yeast extract composition for lactic acid bacteria. Ohly White Paper, Ohly GmbH. 2020.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

Optimization of media components for biomass production of the probiotic strain *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* using experimental design

Morteza Mohajeri Amiri[*1], Seyyedeh Masumeh Mirnurollahi[2]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2-Department of Microbiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

The *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* is one of the most well-known probiotic lactic acid bacteria, which is traditionally used in fermented products, especially dairy products. Few studies have focused on the optimization of *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* biomass production. Therefore, it is necessary to use the design of the experiment and response surface methodology in the optimization of this important probiotic strain. The *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* strain isolated from fermented products of Tehran province was used in this study. By studying one-factor-at-a-time, carbon and nitrogen sources were evaluated. Three factors of glucose, yeast extract and peptone were confirmed to be evaluated in the optimization test. Then, using the experimental design and response surface methodology, the Box-Behnken model was used to optimize these three variables. The results obtained from Box-Behnken design with statistical software identified the full quadratic model for significant optimization. This model suggests that in the concentration of glucose 20 gr/L and the concentration of yeast extract 25 gr/L and peptone 30 gr/L, a dry weight of 2.132 gr/L is obtained, which was confirmed. This study has been successful in optimizing carbon and nitrogen sources on *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* biomass production. The variables and values obtained are confirmed by other studies, but finally, due to the restricted studies that have been done on the optimization of the cultivation conditions of this probiotic strain, more investigations are suggested to confirm the findings of this study.

Keywords: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, one-factor-at-a-time, Box-Behnken model, biomass, Response Surface Methodology.

* mo.mohajeri@iau.ac.ir

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]