

بهبود تولید گابا و زنده مانی لاکتوپاسیلوس برویس G42 در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش با استفاده از ریزپوشانی با ایزوله پروتئین سویا و آلتینات سدیم

مژده کریمی¹، فریده طباطبایی یزدی^{*1}، سید علی مرتضوی¹، ایمان شهابی قهرخی²،

جمشید خان چمنی³

- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

- گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: 13/06/98 تاریخ پذیرش: 19/08/98)

چکیده

گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA) یک اسید آمینه غیر پروتئینی است که از باکتری‌ها، گیاهان و مهره داران بدست می‌آید. گابا یک ترکیب شناخته شده است زیرا نقش فیزیولوژیکی مهمی در انتقال پیام‌های عصبی، کاهش فشار خون، تکرر ادرار و ایجاد آرامش دارد. گابا به صورت بیولوژیکی به وسیله‌ی اسید لاکتیک باکریاها تولید می‌شود که به صورت گسترده در تخمیر غذاها استفاده می‌شوند. در این مطالعه باکتری‌های تولید کننده گابا برای ریز پوشانی به وسیله‌ی ایزوله پروتئین سویا و آلتینات انتخاب شده و به روش امولسیون‌سازی ریزپوشانی شدند. راندمان ریزپوشانی و میزان به دام افتادن باکتری‌های تولید کننده گابا در کبسول‌های ایزوله پروتئین سویا و آلتینات به کمک میکروسکوپ الکترونی روگش تایید شد. توانایی تولید گابا و زنده مانی باکتری‌های ریز پوشانی شده در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش انسان بررسی شد. برای شناسایی باکتری‌های تولید کننده گابا، باکتری‌های ایزوله شده از ترخینه و هویج تخمیر شده روی محیط کشت MRS حاوی 1 درصد مونوسدیم گلوتامات کشت شد. راندمان تولید گابا به کمک کروماتوگرافی لایه نازک (HPLC) و کروماتوگرافی مایع (HPLC) بررسی شد. بر اساس نتایج ثبت شده، لاکتوپاسیلوس برویس PML1 ایزوله شده از ترخینه و لاکتوپاسیلوس (TLC) G42 ایزوله شده از هویج تخمیر شده میزان تولید گابا را 304 میلیگرم بر لیتر و 2511 میلی گرم بر لیتر بعد از 30 ساعت در 30 درجه سانتیگراد نشان دادند. نتایج نشان داد زنده مانی و میزان تولید گابا به کمک ریزپوشانی با ایزوله پروتئین سویا و آلتینات و به دلیل تولید مناسب سلول بهبود یافته است. این مطالعه پتانسیل ریز پوشانی باکتری‌ها افزایش راندمان تولید گابا با هدف ایجاد یک غذای فراسودمند را نشان می‌دهد.

کلید واژگان: غذای فراسودمند، ریز پوشانی، گاما آمینو بوتیریک اسید، لاکتوپاسیلوس برویس، ایزوله پروتئین سویا

* مسئول مکاتبات: tabatabaei@um.ac.ir

1- مقدمه

نوشیدنی‌های جلیک قرمز [39]، خمیر ترش گندم [39]، پائوکای [23] ماهی تخمیری (غذای سنتی ژاپنی) [27] جداسازی شده اند که ویژگی مشترک آنها pH اسیدی است. علاوه بر این تمامی منابع جداسازی حاوی مقادیر بالایی گلوتامات بوده اند. بنابراین مواد غذایی سنتی تخمیری و غنی از گلوتامات مهم‌ترین منابع برای غربالگری باکتری‌های اسید لاكتیک تولیدکننده گابا می‌باشند [40]. با توجه به تأثیرات مفید گابا، در سال‌های اخیر تلاش‌های بسیاری برای غنی‌سازی غذاهای تخمیر شده با پروپیوتیک‌ها بعنوان تولید کننده‌های اصلی گابا صورت گرفته است (31). جهت افزایش محتوای گابا در محصول غذایی باید سویه‌های با فعالیت بالای آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز انتخاب شود. همچنین غلاظت مونوسدیم گلوتامات در ماده غذایی باید به اندازه کافی بالا باشد. ولی در غیر این صورت می‌توان با گلوتامیک اسید خارجی، افزودن پروتئاز جهت هیدرولیز پروتئین و تولید گلوتامیک اسید و یا استفاده همزمان از سویه هیدرولیز کننده پروتئین در ماده غذایی کمبود گلوتامیک اسید در ماده غذایی را جرمان کرد [40].

فناوری ریزپوشانی یا کپسوله‌سازی پروپیوتیک‌ها یک زمینه در حال ظهور به منظور ثبت طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها در مواد زیست سازگار با هدف رهایش کنترل شده سلول‌ها است [41]. کپسوله کردن باعث آزاد شدن کنترل شده ی پروپیوتیک‌ها می‌شود و زمانی که آنها در سیستم رها می‌شوند از زنده ماندن آنها در برابر نیروهای مکانیکی هنگام فرایند کردن مواد غذایی و زنده ماندن سلول در مواجهه با اسید معدله در هنگام هضم اطمینان می‌دهد [42]. آژینات به دلیل سهولت در استفاده، مقرنون به صرفه بودن، عدم سمیت، و زیست سازگاری یکی از متداول‌ترین مواد زیست توده برای کپسوله کردن سلول‌های پروپیوتیکی است.

یکی از موادی که جهت ریزپوشانی پروپیوتیک‌ها استفاده می‌شود آژینات‌ها هستند. آژینات‌ها پلی ساکاریدهای غیر قابل هضم در بدن انسان هستند و به عنوان یک فیر رژیمی اثرات فیزیولوژیکی مفیدی در دستگاه گوارش و سلامت روده بزرگ دارند. آژینات‌ها اشتها و مصرف انرژی در انسان را تعدیل می‌کنند و با کاهش جذب مواد در روده بر کنترل دیابت نوع II و چاقی موثر است [43].

گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا) یک اسید آمینه چهارکربنه و مهم‌ترین پیام رسان عصبی در مغز است [1]. گابا در عملکردهای فیزیولوژیکی بدن از جمله ترشح هورمون رشد، ستر پروتئین [2]، تنظیم فشار خون [3]، فعالیت کلیه و کبد [5, 4, 7]، تنظیم ترشح هورمون‌های تیروئید [8] و تنفس [10, 9] نقش دارد. این ماده باعث بهبود خواب و سلامت روان [11]، بهبود عملکرد بینایی [12]، تقویت حافظه [13] و همچنین مهار دیابت [14]، مهار تومور [15] و مهار چاقی [8] می‌شود. گابا در درمان اختلالات عصبی، بیماری‌های هاتینگتون، پارکینسون، تشنج، آزارایم و اسکیزوفرنی [16] نقش موثری دارد. گابا از طریق دکربوکسیلازیون آمینواسید ال- گلوتامیک اسید به وسیله آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز¹ به صورت برگشت‌نایزی تولید می‌شود [3]. مطالعات زیادی وجود این آنزیم را در باکتری‌های اسید لاكتیک گزارش می‌دهند [17]. باکتری‌های اسید لاكتیک گروه مهمی از باکتری‌های گرم مثبت هستند که به طور طبیعی در دستگاه گوارش حیوانات، انسان و در سبزیجات توزیع شده‌اند [20-18]. سیستم گلوتامیک اسید کربوکسیلاز در باکتری‌های اسید لاكتیک همانند لاكتوباسیلوس برویس² به عنوان یک سیستم تعیین‌کننده برای مقاومت اسیدی عمل می‌کند. گابا محصول نهایی دکربوکسیلازیون اسید آمینه گلوتامیک اسید در باکتری‌های اسید لاكتیک است [17]. لاكتوباسیلوس برویس [24-21]، لاكتوكوس لاكتیس³ [25], لاكتوباسیلوس پاراکائزی⁴ [27]، لاكتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس [26]، لاكتوباسیلوس بورچنری⁵ [28] و لاكتوباسیلوس پلاتارتاروم⁶ [32-29] و لاكتوباسیلوس رامنوس⁷ [33] از جمله گونه‌های باکتری‌های اسید لاكتیک تولیدکننده گابا هستند و در بین آنها لاكتوباسیلوس برویس بیشترین تولید گابا را نشان می‌دهد [34]. تقریباً اکثر گونه‌های باکتری‌های تولیدکننده گابا از غذاهای سنتی تخمیری همانند کیمچی [35-37]، پنیرهای سنتی [38]

1. Glutamate decarboxylase

2. *Lactobacillus brevis*

3. *Lactococcus lactis*

4. *Lactobacillus paracasei*

5. *Lactobacillus buchneri*

6. *Lactobacillus plantarum*

7. *Lactobacillus rhamnosus*

گیری شد که کپسوله سازی با استفاده از کامپوزیت ایزوله پروتئین سویا-آلثینات محافظت مطلوبی را از باکتری‌ها ارائه می‌دهد.

در بهینه سازی تولید گابا توسط میکروارگانیسم‌ها، اسید گلوتامیک و یا نمک‌های آن، pH و منع کربن و نیتروژن در محیط کشت و عواملی که به خواص بیوشیمیابی آنزیم تولیدکننده گابا مرتبط هستند از عوامل اصلی و تعیین کننده تولید گابا محسوب می‌شوند. [52, 40]. هم چنین در دهه گذشته، بهینه سازی و بهبود تولید گابا از طریق تکنیک‌های مختلف جدید از جمله کاربرد روش‌های مهندسی ژنتیک و بیان ژن [53]، و یا به کارگیری همزمان کشت‌های تولید کننده، [55]. فناوری تثبیت سلولی یا فناوری کپسوله سازی گزارش شده است [57, 56]. در این مطالعه، لاکتوپاسیلوس‌های تولیدکننده گابا جدا شده از برخی انواع غذاهای تخمیر شده ایرانی شناسایی شد و سپس، اثر میکروکپسولاسیون سویا-آلثینات بر بقای آنها در شرایط شبیه سازی شده معده و روده و تولید گابا به شکل میکرو کپسوله شده بررسی شد.

2- مواد و روش

2-1- میکروارگانیسم‌ها

در این مطالعه از لاکتوپاسیلوس‌های جدا شده از ترخیمه (کدهای 1-16) و هویج تخمیری (G39, G42, G160) و سویه‌های استاندارد لاکتوپاسیلوس پلاتارتوم ATCC 8014 لاکتوپاسیلوس پلاتارتوم 14917 ATCC لاکتوپاسیلوس ATCC 14931 La5 و لاکتوپاسیلوس فرمتووم اسیدوفیلوس به عنوان سویه‌های استاندارد و تجاری برای بررسی پتانسیل تولید گابا استفاده شد. به منظور فعل سازی، ابتدا هر یک از سویه‌ها در میکرو میکروب‌آثروفیل گرم خانه گذاری شدند. پیلیت‌ها به مدت 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد تا ظهور کلونی در شرایط میکروب‌آثروفیل گرم خانه گذاری شدند.

2-2- محیط و شرایط کشت

در ابتدا برای بررسی تولید گابا توسط سویه‌ها، مطابق با روش لی و همکاران (2010)، محیط MRS مایع حاوی 1 درصد (وزنی/حجمی) از نمک مونوسدیم گلوتامات تهیه شد. پس از

دانه‌های آلثینات بسیار متخلخل و نفوذ پذیر هستند، از این رو می‌توانند از سلول‌های زنده در برابر محیط‌های خشن محافظت کنند ولی همین ویژگی ممکن است باعث انتشار همزمان مواد از این دانه‌ها شود [44]. این مسئله با اصلاح ساختار آلثینات با استفاده از سایر بیopolymerها یا پوشش دهنده‌ی دانه‌های آلثینات با بیopolymerهای کم تخلخل قابل پیشگیری است [45].

ایزوله پروتئین سویا (SPI) دارای ویژگی‌های فرایند پذیری و ارزش غذایی مطلوب است. پروتئین سویا حاوی تمام آمینواسید‌های ضروری مورد نیاز برای تحقق نیازهای غذایی انسان در رشد، تعادل و مقابله با فشارهای روانی است. مطالعات بالینی نشان داده اند که پروتئین سویا از نظر هضم با دیگر منابع پروتئینی مانند گوشت، شیر، ماهی و تخم مرغ قابل مقایسه هستند. کاهش کلسیرون و جلوگیری از سرطان، دیابت و چاقی و همچنین محافظت در برابر بیماری‌های روده و کلیه از اثرات تغذیه‌ای پروتئین سویا است [46]. SPI به عنوان یک ماده فراوان و ارزان، به طور گسترده‌ای در مواد بسته بندی، صنایع غذایی و مواد پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین نشان داده شده است که یک نانو حامل نویدبخش در ترکیبات زیست فعال و ترکیبات دارویی فعال (API) است [48, 47].

يو و همکاران (2011) سیستم حامل پروپیوتیک ساخته شده توسط پروتئین سویا کراسلینک شده با ترانس گلوتامیناز میکروبی (MTG) متصل به پسماندهای زراعی مانند پوست موز، پالپ موز و پوست پوملو را گزارش کرد [49]. حامل‌های مبتنی بر SPI توسعه یافته ساختار خود را در مایع شبیه سازی شده معده حفظ کرده و تخریبی را نشان ندادند، در حالی که یک فروپاشی عمده ساختاری در مایع شبیه سازی شده روده نشان داده شد که رهایش کنترل شده در روده را تایید می‌کند. نتایج همچنین نشان داد که حامل‌های SPI حاوی پسماندهای زراعی می‌توانند برای انتقال سلول‌های زنده پروپیوتیک در طول معده و قبل از رهایش در روده مفید باشند. پوسته‌های بیوکامپوزیت ستر شده توسط آلثینات و SPI برای محصور کردن انتروکرکوس فکالیس و لاکتوپاسیلوس برویس [50] و [51] مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده از توانایی بقا در مایع شبیه سازی شده معده و محلول نمک صفرایی، و همچنین رفتار آزاد شدن سلول‌های محصور شده در مایع شبیه سازی شده روده نتیجه

گلوتامات (1، 3، 5 و 7 %) با pH 5/4 به مدت 30 ساعت در دمای 30 درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند.

5-2- ارزیابی کمی تولید گابا به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

میزان گابا در محیط کشت به وسیله دستگاه HPLC بر اساس روش چو و همکاران (2007) اندازه گیری شد. در مرحله اول پس از سانتریفیوژ کردن محیط کشت، فاز رویی با استفاده از معرف فنیل ایزو تیوسیانات (PITC) با روش تان و همکاران (2006) مشق سازی شد. سپس 20 میکرولیتر از مشق حاصل فیلتر شده به میکروتیوب های 1/5 میلی لیتری منتقل و تحت خلا با استفاده از سانتریفیوژ تحت خلا خشک شد. سپس به باقیمانده خشک داخل میکروتیوب 10 میکرولیتر از محلول متابول - سدیم استات 1 مولار - تری اتیل آمین 2:2:1 (حجمی / حجمی) اضافه شد. پس از حل شدن باقیمانده خشک و مجدد حلال اضافه شده تحت خلا خشک شد. 50 میکرولیتر از معرف فنیل ایزو تیوسیانات - متانول - متانول - تری اتیل آمین - آب 1:6:1:1:1 (حجمی / حجمی / حجمی / حجمی) به تیوب افزوده و به مدت 20 دقیقه به جهت تشکیل فنیل ایزو تیوسیانات - گابا در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت باقی معرف به وسیله خلا جدا شد [59].

هم چنین استانداردهای گابا در غلظت های 125، 500 و 1000 میلی گرم بر لیتر آماده شد و با معرف PITC مشق سازی شد. مشق حاصل از نمونه ها و نمونه های استاندارد در 300 میکرولیتر استونیتریل 60 درصد حل و برای تزریق به دستگاه آماده شد. در هر بار $20 \mu\text{l}$ نمونه به دستگاه تزریق شد. آنالیز با استفاده از HPLC مجهز به ستون (سدیم 4.6 C18) انجام شد. فاز متحرک شامل دو فاز A (سدیم استات 0/1 میلی مولار، 6% استونیتریل و 0/1% تری اتیل آمین) و فاز B (استونیتریل 60%) که با گرادیانت خطی از 1 تا 100 درصد با هم محلوت شده اند. فاز متحرک با سرعت جريانی 1 ml/min به ستون تزریق شد. برای شناسایی مواد خروجی از ستون از آشکارساز UV در طول موج 254 نانومتر استفاده شد. [35]

تنظیم pH در 5/4 به مدت 20 دقیقه در 121 درجه سانتی گراد استریل شد. یک کلونی از هر سویه به صورت جداگانه در فالکون های حاوی 5 میلی لیتر محیط کشت مذکور تلقیح و به مدت 30 ساعت در دمای 30 درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد.

3-2- ارزیابی کیفی تولید گابا به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

برای تهیه نمونه برای نشان گذاری بر روی TLC پس از گذشت 30 ساعت از تخمیر، مایع کشت با دوری معادل 10000 (دور در دقیقه) در دمای 4 درجه سانتی گراد و به مدت زمان 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. آنگاه برای حذف میکرووار گانیسم های احتمالی، فاز رویی به وسیله فیلتر 0/2 میکرومتر فیلتر شد [58]. برای ارزیابی تولید گابا از پلیت سیلیکاژل (60 F254) فعال با ابعاد 20×20 استفاده شد.

بر طبق روش لی و همکاران (2010) ابتدا پلیت از یک جهت و به فاصله 2 سانتی متر از پایین به طور افقی با مداد خط کشی و با فواصل به طول یک سانتی متر نقطه گذاری شد. سپس به وسیله لوله موئینه مقداری از هر نمونه سانتریفیوژ و فیلتر شده بر روی پلیت لکه گذاری گردید. در این آزمون از محلول های 1% گابا، مونو سدیم گلوتامات و محیط کشت مایع MRS به طور مجزا به عنوان استاندارد استفاده شد. آنگاه از محلولی مشکل از بوتانول، استیک اسید و آب مقطر به نسبت (5:2:2) به عنوان فاز متحرک در TLC استفاده شد. سپس به فاز متحرک اجازه داده شد تا ارتفاع 13 سانتی متری صفحه TLC حرکت کند. آنگاه صفحه از تانک خارج و زیر هود خشک شد. سطح صفحه با محلول 2% ناین هیدرین اسپری و به مدت 10 دقیقه در آون 80 درجه سانتی گراد قرار داده شد [29].

4-2- ارزیابی کیفی تولید گابا در غلظت های مختلف مونو سدیم گلوتامات

پس از شناسایی سویه ها تولید کننده گابا، برای بررسی اثر میزان مونو سدیم گلوتامات بر تولید گابا، سویه های منتخب در محیط های MRS مایع حاوی مقدار مختلط مونو سدیم

pH آن به وسیله هیدروکلریدریک اسید، در حدود 6 تنظیم شده است، پراکنده شده و به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق توسط هم زن مغناطیسی عمل همزدن ادامه پیدا می‌کند. در طی این فرایند دیواره دانک‌های آژینات تخریب شده و سلول‌های باکتریایی به بیرون رها می‌شوند. پس از این مرحله عمل رقت‌سازی و کشت میکروبی به صورت سطحی با استفاده از محیط آگار MRS در شرایط هوایی و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت انجام و تعداد باکتری‌ها شمارش شدن. این آزمایش در سه تکرار صورت پذیرفت [61].

بازده ریزپوشانی با روش زیر محاسبه می‌شود:

$$EE = \left(\frac{X_t}{X_i} \right) \times 100$$

Xt: سلول‌های پروپیوپ مخصوص سده در میکروپسون و Xi: مقدار اولیه سلول‌های پروپیوتیک در فرایند کپسول سازی

8-2- بررسی مورفولوژی و اندازه دانک‌های تشکیل شده

میکروکپسول‌ها با میکروسکوپ نوری (Olympus BX41) مورد بررسی قرار گرفتند. نرم افزار ImageJ (Microscope موسسات ملی سلامت، ایالات متحده آمریکا) به منظور اندازه گیری با استفاده از تصاویر به کار رفت. میانگین قطر میکروکپسول‌ها به صورت میانگین از 100 عدد (Zaeim, Tromp & Kadhodaei, Ghorani, Sarabi-Jamab 2017) گزارش شد. شکل و ساختار میکروسکوبی میکروکپسول‌ها با میکروسکوپ الکترونی اسکن (نئو VP1450) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها با طلا در آبگرمکن اسبری (SC7620) به مدت 180 ثانیه در 5 میلی آمپر تحت اتمسفر آرگون پوشش داده شده است.

9-2- بررسی مقاومت باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی شده به محیط شبیه سازی شده معده و روده

محیط شبیه سازی شده معده و روده بر اساس روش برینکو و همکاران در سال 2011 تهیه شد [62]. محلول شبیه سازی شده

6-2- ریزپوشانی باکتری تولید کننده گابا

سویه تولید کننده گابا در محیط MRS مایع کشت می‌شود پس از گرم خانه گذاری به مدت 24 ساعت و در دمای 37 درجه سانتی گراد مایع کشت با دور 7000 g به مدت 3 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و سلول‌ها جدا و شسته می‌شود و سپس در محلول آب نمک استریل (0/9%) به حالت سوسپانسیون در آمد. تعداد سلول‌ها 109-1010 CFU/ml با اندازه کیری غلظت در OD625 تنظیم شد.

ریزپوشانی با روش زنجانی و همکاران با کمی تغییرات انجام گرفت [60]. برای تهیه ریزکپسول‌های آژینات / سویا به طور خلاصه 2 گرم از پروتئین سویا در 40 میلی لیتر آب مقطр استریل اضافه و به منظور پاستوریزه شدن به مدت 30 دقیقه در دمای 85 درجه سانتی گراد حرارت داده شد. سپس محلول سدیم آژینات (1/0%) تهیه و در دمای 121 درجه سانتی گراد در اتوکلاو استریل شد. با یکدیگر مخلوط شده و محلول اینولین (1%) اضافه و خوبی همزده شد. به ازای هر 10 میلی لیتر، 1 میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی به محلول تشکیل دهنده دیواره شامل ایزوله پروتئین سویا (مشخصات) و سدیم آژینات اضافه و مخلوط نهایی قطره قطره به 500 میلی لیتر روغن گیاهی (آفتابگردان، ورامین) حاوی 0/2% توئین 80 که با استفاده از همزن مغناطیسی با سرعت 350 rpm در حال مخلوط شدن است اضافه گردید. کپسول‌ها با افزودن 200 میلی لیتر کلسیم کلرید 0/1 مولار به مخلوط شکل گرفت و سپس جداسازی فازها از امولسیون آب / روغن به مدت در بشر اتفاق می‌افتد. پس از 30 دقیقه محلول به قیف دکانتور متقل و 30 دقیقه به حال خود گذاشته شده تا در نهایت یک سیستم دوفازی بدست آمد. فاز زیرین از روغن جدا شده و پس از شست و شوی دانک‌ها با محلول PS، آن‌ها را تا زمان مصرف در دمای یخچال نگهداری شد.

7-2- شمارش باکتری‌های ریزپوشانی شده و تعیین بازده ریزپوشانی

جهت تعیین کارایی فرایند ریزپوشانی باکتری براساس مطالعه رضایی مکرم و همکاران (2009)، 1 گرم از ریزپوشینه‌ها داخل 9 میلی لیتر محلول 1 درصد وزنی / حجمی سیترات سدیم استریل

در بررسی بین بیش از 20 سویه لاکتوپاسیلوس جدا شده از محصولات تخمیری، دو سویه با قابلیت تولید گابا را داشتند. پتانسیل تولید گابا متعلق به سویه PML1 جدا شده از ترخینه و G42 جدا شده از هویج تخمیری بود. شماره دسترسی برای این دو باکتری به ترتیب KF307784.1 و JX966418.1 در بانک ژنومی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ثبت شده است و هر دو سویه متعلق به گونه لاکتوپاسیلوس برویس می‌باشند. روش‌های متعددی برای تشخیص اولیه تولید گابا در عصاره‌های بیولوژیک وجود دارد. از جمله این روش‌ها آنالیز اسید آمینه‌ها، کروماتوگرافی گازی، الکتروفورز، کروماتوگرافی مایع با کارابی بالا، روش‌های طیف سنجی و اسپکتروفتومتری می‌باشد. با این حال روش‌های ذکر شده نیاز به مراحل آماده سازی متعدد نمونه دارد و پر هزینه و زمانبر هستند. از این رو روش‌های غربال‌گری مطلوبی محسوب نمی‌شوند. کروماتوگرافی کاغذی، یا کروماتوگرافی لایه نازک نیاز به تجهیزات گران‌قیمت ندارد و مناسب برای تجزیه و تحلیل همزمان تعداد زیادی از نمونه‌ها است و در نتیجه برای غربال‌گری سریع و راحت تعداد زیادی از سویه‌های مولد گابا پیشنهاد می‌شود. با کمک کروماتوگرافی لایه نازک ضمن اینکه آنالیز در زمان کوتاهی انجام پذیرفت، گاما آمینو بوتیریک اسید با وضوح خوب و حساسیت بالا جدا می‌شود. بسیاری از محققان روش کروماتوگرافی لایه نازک را برای غربال‌سازی اولیه مورد استفاده قرار داده‌اند. چو و همکاران (2007)، با روش کروماتوگرافی لایه نازک موفق به جداسازی لاکتوپاسیلوس بروچنری MS از کیمچی شدند [35]. لی و همکاران (2008)، 23 جدایه از بین 1000 جدایه از پائوکای را از نظر تولید گابا براساس این روش غربال کردند و در نهایت لاکتوپاسیلوس برویس NCL912 به عنوان تولید کننده گابا معرفی شد [23]. لی و همکاران (2010) با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک تولید گابا را توسط لاکتوپاسیلوس برویس BJ20 را از بین 22 سویه جداسازی شده از کیمچی گزارش دادند [58]. راتاناپور و همکاران (2013)، با استفاده از این روش 4 باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده گابا را از بین 149 جدایه از مواد غذایی تخمیری سنتی تایلند شناسایی کردند [63]. داس و همکاران (2015) با روش کروماتوگرافی لایه نازک توانایی تولید گابا توسط لاکتوپاسیلوس پلاتارتوم DM5 جدا

معده با حل کردن پیسین در محلول سدیم کلرید استریل (0/5 درصد وزنی / حجمی) و رسیدن به غلظت 3 گرم بر لیتر تهیه شد. pH 1/5 به وسیله هیدروکلریدیریک اسید تنظیم شد. شربت روده شبیه سازی شده با حل کردن پانکراتین و نمک صفرایی در محلول سدیم کلرید 0/5 درصد و رسیدن به غلظت 1 گرم بر لیتر و 4/5 درصد تهیه شد. pH محلول به وسیله سدیم هیدروکسید 8 تنظیم شد. یک گرم از نمونه باکتری‌های کپسوله شده و یا یک میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی (سلول‌های آزاد) به 10 میلی لیتر از هر محیط مایع افزوده و در 120 دقیقه گرم خانه گذاری شدند. باکتری‌ها بر سطح محیط MRS اگر جامد شمارش شدند.

2-10-2- ارزیابی تولید گابا به وسیله سلول‌های ریزپوشانی شده

یک گرم از کپسول‌های باکتری و یا 1 میلی لیتر سوسپانسیون سلولی (سلول‌های آزاد) به 10 میلی لیتر محیط مایع حاوی و فاقد MSG و پیتون واتر اضافه شد و در 37 درجه سانتی گراد انکوباتور شدند. قابلیت تولید گابا به وسیله کپسول‌ها پس از 24، 48، 72، 96 و 120 ساعت در مقایسه با سلول‌های آزاد مورد بررسی قرار گرفت. تولید گابا به وسیله TLC براساس روش HPLC شرح داده شده، بررسی شد و مقدار گابا با استفاده از مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

2-11-2- تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم افزار Minitab 15 در سطح 5٪ معنی داری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و رسم نمودارها با کمک Microsoft Office Excel 2007 انجام شد.

3- نتایج و بحث

3-1- غربال سازی اولیه با کروماتوگرافی لایه نازک

در این مطالعه از روش کروماتوگرافی لایه نازک برای غربال سازی اولیه سویه‌های تولید کننده گابا استفاده شد. همان طور که در صفحات کروماتوگرافی لایه نازک (شکل 1) نشان داده شده

پلانتاروم ATCC 14917، لاكتوباسیلوس اسیدوفیلوس La5 و لاكتوباسیلوس فرمتونوم ATCC 14931 قادر به تولید گابا نیستند. بنابراین سویه‌ها مذکور قادر آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز هستند یا ژن مسئول تولید این آنزیم در آن‌ها بیان نشده است [29].

2-3- ارزیابی کیفی تولید گابا در غلظت‌های مختلف مونوسدیم گلوتامات

ساخت گابا در باکتری‌های اسید لاكتیک به وسیله آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز کاتالیز می‌شود و تولید گابا به ویژگی‌های بیوشیمیایی این آنزیم وابسته است. تولید آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز در پاسخ به شرایط اسیدی در باکتری‌های اسید لاكتیک القا می‌شود و تنها بر روی گلوتامات به عنوان سوبسترا واکنش انجام می‌دهد و در طی این فرآیند آن را به گابا و دی اکسید کربن تبدیل می‌کند [25]. گلوتامات به عنوان سوبسترات آنزیم، پارامتر اصلی موثر بر تولید گابا در طول تخمیر است. بنابراین افزودن گلوتامات به محیط تخمیر تولید گابا را در باکتری‌های مولد گابا افزایش می‌دهد [66].

در مقایسه توانایی تولید گابا توسط دو سویه G42 و PML1 در حضور غلظت‌های مختلف مونوسدیم گلوتامات، همان طور که در شکل 2 نشان داده شده است. در هر دو سویه با افزایش غلظت مونوسدیم گلوتامات در محیط تخمیر شدت لکه مربوط به گابا افزایش یافته است. این نتایج موئید فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز در هر دو سویه جداسازی شده از ترخینه و هویج تخمیری است. وو و همکاران (2015)، اثر غلظت‌های 1، 3، 5 و 7 درصد از مونوسدیم گلوتامات بر تولید گابا توسط سویه‌های لاكتوباسیلوس برویس جدا شده ازکیمچی را بررسی کردند و مشاهده کردند که هر چند نرخ تبدیل مونوسدیم گلوتامات به گابا با افزایش غلظت کاهش یافت اما همچنان تولید نهایی با افزایش غلظت افزایش می‌یابد [67]. این نتایج در مطالعه ژانگ و همکاران (2012) همچنان مشاهد شد [68]. افزایش تولید گابا در اثر افزایش غلظت سدیم گلوتامات در لاكتوباسیلوس پاراکاژئی [27] و لاكتوباسیلوس برویس NCL912 نیز مشاهده شده است.

شده از نوشیدنی‌های تخمیری سنتی را گزارش دادند [29]. همچنین 12 سویه لاكتوباسیلوس از 130 سویه جداسده از محصولات تخمیری دریابی با غربال گری اولیه با روش کروماتوگرافی لایه نازک شناسایی و در نهایت با آنالیز آمینواسیدها 4 سویه تائید شد [64]. کیم و همکاران (2007) به وسیله این روش لاكتوباسیلوس برویس BH2 جدا شده از کیمچی را به عنوان تولید کننده معرفی کردند [65].

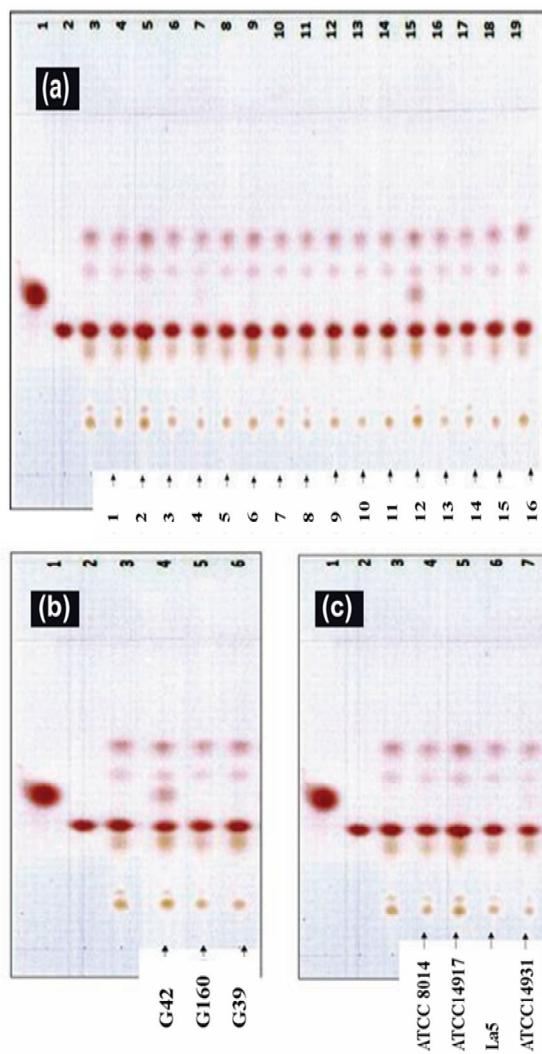
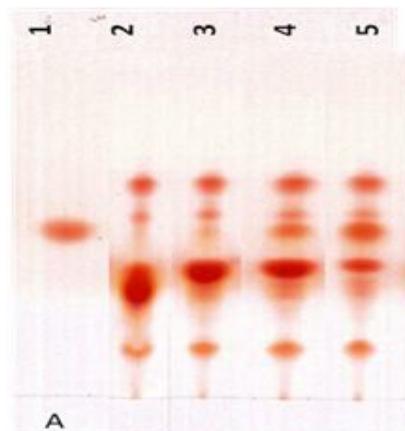


Fig 1 TLCs used in the qualitative assessment of GABA production by (a) lactobacillus isolated from Tarkhineh, (b) Lactobacillus isolated from fermented carrot (c) standard lactobacilli. Lane 1) GABA Standard, Lane 2) Monosodium Glutamate, Lane 3) MRS broth media.

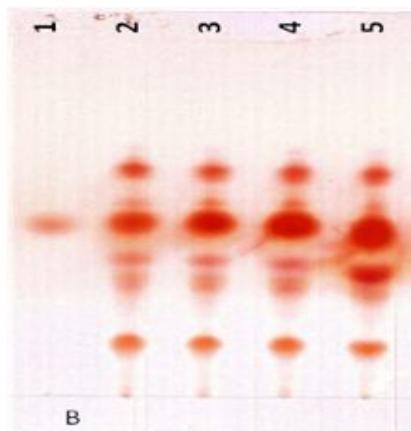
همان طور که در شکل 1 مشخص است. سویه‌های استاندارد لاكتوباسیلوس پلانتاروم ATCC 8014، لاكتوباسیلوس

واکنش کربوکسیلاسیون برای گلوتامات دکربوکسیلاز در باکتری‌های اسید لاكتیک مشابه است اما ساختار اولیه در نواحی N-ترمینال و مناطق C-ترمینال آنزیم در سویه‌های مختلف به میزان قابل توجهی متفاوت است. اختلاف در این ساختار اولیه آنزیم می‌تواند در توانایی آنزیم و باکتری در تولید گابا تاثیر بگذارد [70].



A

همان طور که در شکل 2 مشخص است تولید گابا توسط سویه لاكتوباسیلوس برویس G42 از لاكتوباسیلوس برویس PML1 در شرایط یکسان کشت بیشتر است. گلوتامات دکربوکسیلاز از 62 زیر واحدهای یکسان با جرم مولکولی در محدوده از 54 تا 62 کیلو دالتون تولید می‌شود که رشته‌های اسیدآمینه کاتالیزوری آن شامل یک ریشه لیزین و بسیار حفاظت شده است. با اینکه



B

Fig 2 The TLC plates used in GABA quality evaluation by (a) *Lactobacillus brevis* PML1 and (b) *Lactobacillus brevis* G42 at 1% concentrations (Lane 2), 3% (Lane 3), 5% (Lane 4) and 7% (Lane 5) of monosodium glutamate in a liquid MRS medium, GABA standard (Lane 1)

همان طور که در شکل 3 نشان داده شده است؛ با توجه به تزریق استاندارد داخلی گابا متوسط زمان بازداری برای گابا 30/02 ± 0/02 دقیقه بود.

-3-3- ارزیابی کمی تولید گابا به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

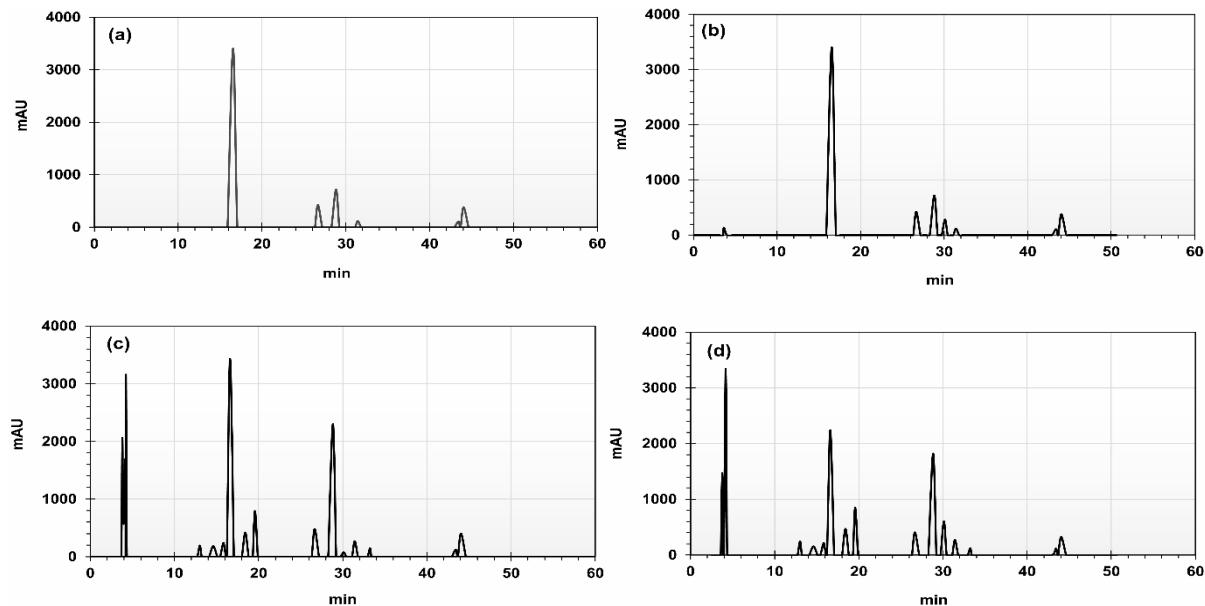


Fig 3 Monitoring the GABA production by HPLC Chromatograms. (a) The blank sample, (b) GABA standard solution (1000 mg/l), (c) fermented culture broth in the presence the strain PML1, (d) fermented culture broth in the presence the strain G42.

زده شد. این نتایج مؤید ارزیابی های کیفی تولید گابا هستند (شکل 3).

جدول 1 نمونه هایی از مقادیر تولید شده گابا از سویه های مختلف را نشان می دهد. همان طور که نشاده داده می شود مقدار گابا تولیدی به شدت تحت تأثیر محیط جداسازی و محیط کشت قرار دارد. به طوری که در جداسازی باکتری های تولید کننده گابا گزارش هایی در خصوص توانایی بیشتر تولید گابا توسط سویه های جداسازی شده از پنیر حاصل از شیر گوسفند و بز نسبت به شیر گاو وجود دارد [71]. در این مورد توانایی تولید گابا ممکن است به محیط سنتی تولید، نوع فلور میکروبی حیوان و منابع مختلف دریافت آن از جمله پستان، هوا، آب شستشو، کارکنان و تجهیزات شیردوشی مرتبط باشد ولی در هر حال باکتری های جدا شده از سبزیجات تخمیری گابای بیشتری تولید بالایی می کنند.

Table 1 Production of GABA by different strains of *Lactobacillus brevis* isolated from different sources

Microorganism	Isolation source	Culture medium	GABA Production (mg/l)	References
<i>Lactobacillus brevis</i> PM17	Cheeses	Sodium acetate buffer	15	[26]
<i>Lactobacillus brevis</i> 12005		20% wheat flour dissolution	85.6	[71]
<i>Lactobacillus brevis</i> CECT 8183	Cheeses	20% wheat flour dissolution	100	[71]
<i>Lactobacillus brevis</i> CECT 8181	Cheeses	20% wheat flour dissolution	97	[71]
<i>Lactobacillus brevis</i> CECT8182	Cheeses	20% wheat flour dissolution	102	[71]
<i>Lactobacillus brevis</i> TCCC13007		MRS broth containing 7% of MSG	38000	[68]
<i>Lactobacillus brevis</i> K203	Kimchi	6 % L-glutamic acid, 4 % maltose, 2 % yeast extract, 1 % NaCl, 1 % CaCl ₂ , 2 g Tween 80/l, and 0.02 mM pyridoxal 50-phosphate	44400	[21]
<i>Lactobacillus brevis</i> BH2	Kimchi	MRS broth containing 5% of MSG	20005	[65]
<i>Lactobacillus brevis</i> NCL912	Paocai	Nutrient medium	35662	[69]
<i>Lactobacillus brevis</i> NCL912	Paocai	Nutrient medium	103719.1	[34]

ایزوله پروتئین سویا کراسلینک شده با ترانس گلوتامیناز برای باکتری لاكتوباسیلوس رامنوس 67/4 درصد است [72].

شکل 4 میکرو گراف SEM و تصاویر OM از میکرو کپسول ها را نشان می دهد.

میکرو گراف ها ذرات کروی یکنواخت را نشان می دهند که به طور مؤثر باکتری ها را محاصره کرده اند. اندازه میکرو کپسول ها عامل مهمی برای کاربرد آنهاست و تحت تأثیر فرایندهای ریزپوشانی قرار می گیرد. در روش کواسرواسیون و جداسازی فازی، اندازه تقریبی ذرات 5-5000 میکرومتر است. مطابق شکل، میانگین قطر میکرو کپسول ها 78/06 میکرومتر برآورد شده است.

در کروماتوگرام ها تعدادی بیک نامشخص وجود دارد که به سایر ترکیبات مورد استفاده در مرحله مشتق سازی نمونه مربوط می باشند. پس از تعیین پیک مربوط به گابا و با استفاده از غاظت های مختلف گابا منحنی استاندارد و به تبع از آن معادله رگرسیون خطی $y = 30.146 - 2.6278x$ با ضریب تشخیص $R^2 = 0.9997$ تعیین شد.

همان گونه که در شکل 3 مشخص است مقدار تولید گابا توسط باکتری لاكتوباسیلوس برویس G42 به طور چشمگیری بیشتر از لاكتوباسیلوس برویس PML1 بوده است. به این ترتیب مقدار گابا تولید شده به وسیله لاكتوباسیلوس برویس G42 و لاكتوباسیلوس برویس PML1 در محیط MRS حاوی 1 درصد مونوسدیم گلوتامات پس از 30 ساعت تخمیر در دمای 30 درجه سانتی گراد به ترتیب 2511 و 304 میلی گرم بر لیتر تخمین

-4-3 بازده ریزپوشانی و مورفولوژی میکرو کپسول ها

میانگین عملکرد کپسوله سازی 91/15 درصد محاسبه شده است که نشان دهنده موفقیت روش استفاده شده برای میکرو کپسولا سیون سویه لاكتوباسیلوس برویس G42 است. هادزیوا و همکاران (2017) میکرو کپسول های ایزوله پروتئین سویا و آژینات را با روش خشک کردن پاششی با حداکثر عملکرد کپسوله سازی 64٪ تولید کردند [51]. همچنین، لی و همکاران (2016) نشان دادند که عملکرد میکرو کپسولا سیون برای

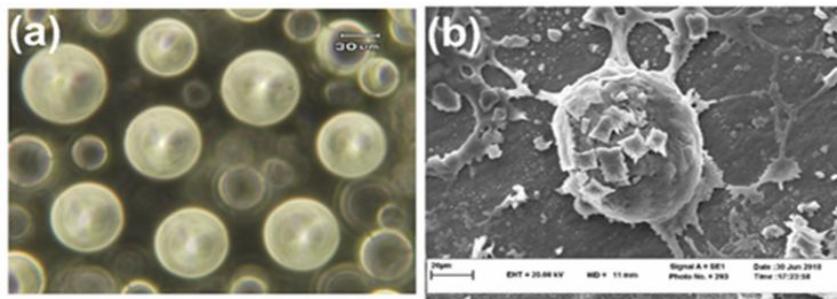


Fig 4 (a) OM ($\times 40$) and (b) SEM micrographs of the capsules surrounding the strain *L. brevis* G42.

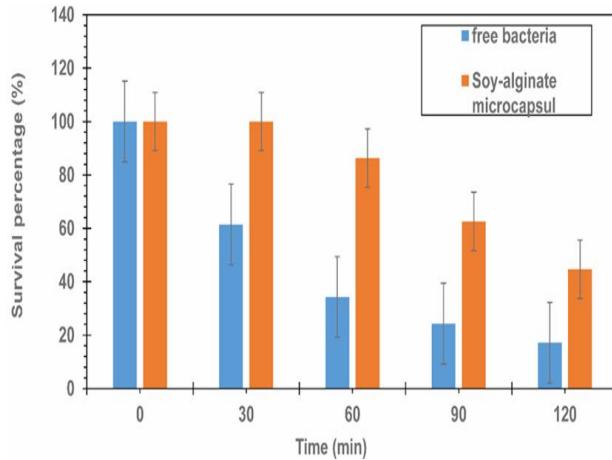


Fig 5 Survival of the free and microencapsulated *Lactobacillus brevis* G42 in the simulated gastric juice

همانطور که مشاهده می شود، با افزایش زمان تماس تعداد سلول‌های آزاد و محصور کاهش می‌یابد. همانند شیره معده، سلول‌محصور شده در مقایسه با سلول‌های آزاد زنده ماندن بسیار بالاتری را نشان دادند. تعداد سلول‌های لاکتوباسیلوس برویس G42 آزاد پس از 120 دقیقه 1×10^6 بакتری در هر میلی لیتر و درصد زنده مانی 26 درصد بود، در حالی که برای سلول‌های میکرو‌پسوله شده، درصد زنده ماندن 41 درصد محاسبه شد. این نشان دهنده اثربخشی ایزوله پروتئین سویا-آلرینات در محافظت از سلول‌های بacteriابی در شیره شبیه سازی شده روده است. این نتایج مطابق با نتایج گزارش شده توسط ژانگ و همکاران است که نشان دهنده افزایش بقای بacterیهای پریبیوتیک محاصره شدن با آلرینات سویا در محیط معده و روده است [50].

5-3- بقای بacterیهای آزاد و میکرو‌پسوله

شده در شیره شبیه سازی شده معده و روده

شکل 5 زنده مانی لاکتوباسیلوس برویس G42 آزاد و محصور شده در طول 120 دقیقه تماس در شیره شبیه سازی شده معده را نشان می‌دهد. بacterیهای آزاد میزان بقای کمتری در شیره معده نشان می‌دهند و با افزایش زمان تماس کاهش بیشتری را نشان دادند. بقای سلول‌های آزاد لاکتوباسیلوس برویس G42 در زمان تماس 120 دقیقه $10^6 \times 1/2$ بакتری در هر میلی لیتر اندازه گیری شد، که درصد زنده ماندن آن 17 درصد است. با این حال، سلول‌های G42 میکرو‌پسوله شده پس از 120 دقیقه $6/2 \times 10^6$ بакتری در هر میلی لیتر محاسبه شد که 45٪ درصد زنده ماندنی را نشان می‌دهد.

بدیهی است که میکرو‌پسوله سازی بطور قابل توجهی (P_{0.05}) بقای سلول‌ها در شیره شبیه سازی شده معده را افزایش می‌دهد. نتایج مطابق با مطالعات قبلی است که بهبود بقای انتروکوکریس فکالیس P2 [50] و لاکتوباسیلوس کائزی [51] در شیره شبیه سازی شده معده پس از کپسوله شدن توسط ایزوله پروتئین سویا را نشان دادند. در اینجا، افزایش تعداد بacterیهای زنده می‌تواند به دلیل افزودن اینولین، به عنوان یک پریبیوتیک باشد. آلرینات و پری بیوتیک‌ها یا الیگوساکاریدها به صورت هم افزایی کار می‌کنند تا شبکه‌های ژل تشکیل دهند که باعث بهبود و نگهداری سلول‌های بacterیابی شود [75-73]. تأثیر شیره شبیه سازی شده روده بر روی زنده‌مانی سلول‌های میکرو‌پسوله شده و آزاد در شکل 6 ارائه شده است.

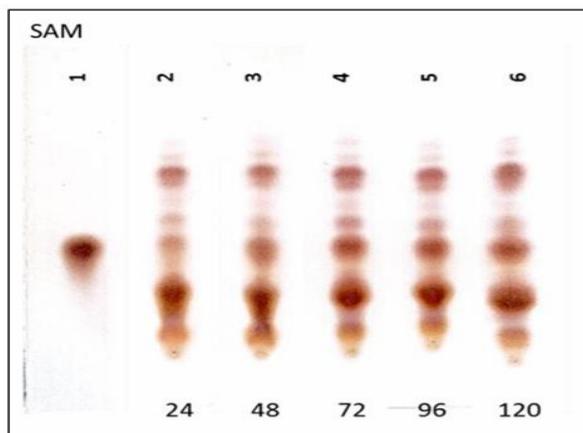


Fig 8 TLC chromatogram showing GABA producing ability of microencapsulated *L. brevis* G42 at different times (h) in MRS broth.

لакتوباسیلوس برویس G42 میکروکوپسوله شده در مدت زمان 120 ساعت 32416,9 میلی گرم در لیتر گابا تولید کرد، در حالی که در محیط MRS در مدت زمان مشابه، گابای تولید شده توسط سلولهای آزاد 2411/8 میلی گرم در لیتر اندازه گیری شد. هوانگ و همکاران گزارش دادند که سلولهای ثبت شده لакتوباسیلوس برویس در دانه‌های ژل کلسیم آژینات برای بیوستر گابا پایدار و کارآمد بودند [57]. همچنین، یک سیستم نیمه پیوسته ثبت سلول ساخته شده از آژینات حاوی لакتوباسیلوس برویس 057 توسط چوی و همکاران تولید شد که تا 223 میلی مول گابا در حضور 534 میلی مول MSG پس از 48 ساعت تولید می‌کند. افزایش تولید گابا می‌تواند به دلیل اضافه شدن پریبووتیک‌های اینولین به آژینات باشد که منجر به افزایش پایداری لакتوباسیلوس برویس ثبت شده و افزایش بهره وری گابا شود [56].

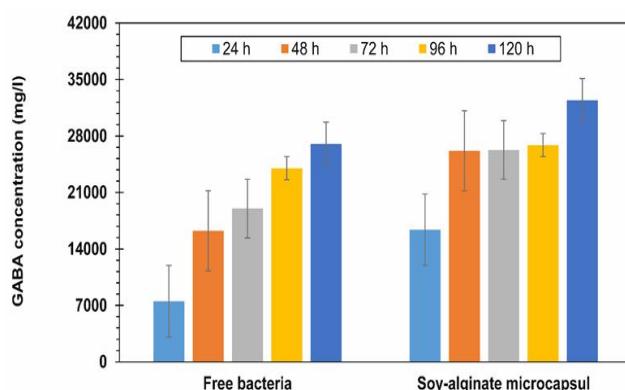


Fig 9 Production of GABA by encapsulated *Lactobacillus brevis* G42 in different forms growth in MRS broth

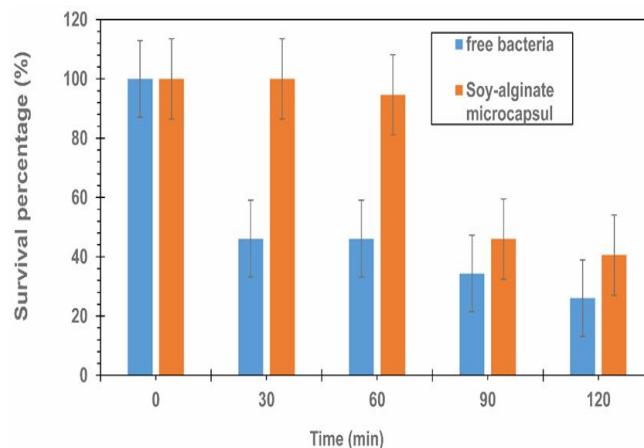


Fig 6 Survival of the free and microencapsulated *Lactobacillus brevis* G42 in the simulated intestinal juice

6-3- تولید گابا پس از ریزپوشانی

شکل‌های 9-7 کروماتوگرام فرآیند تولید گابا توسط لакتوباسیلوس برویس G42 را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، تولید گابا به دلیل ریزپوشانی شدن لакتوباسیلوس برویس G42 به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. علاوه بر این، تولید گابا روند افزایشی را نشان می‌دهد که به طور قابل توجهی با افزایش زمان اوج می‌گیرد.

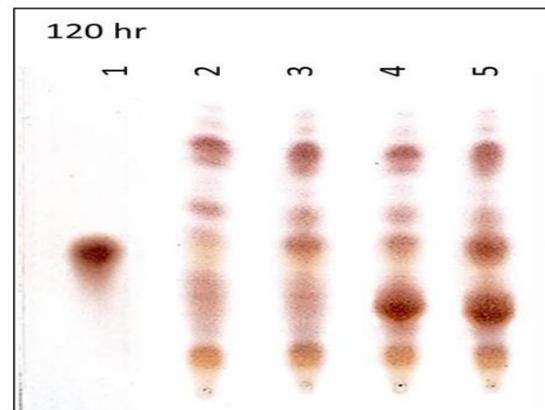


Fig 7 TLC chromatogram showing GABA producing ability of *L. brevis* G42 in MRS medium. Lane 1: GABA standard (1 mg/ml), Lane 2 and Lane 3: Filter sterilized cell-free supernatant of *L. brevis* G42 and soy-alginate microencapsulated *L. brevis* G42 in MRS broth. Lane 4 and Lane 5: Filter sterilized cell-free supernatant of *L. brevis* G42 and microencapsulated *L. brevis* G42 respectively in MRS broth containing of 1% MSG.

- [4] Sasaki, S., et al., Protective role of γ -aminobutyric acid against chronic renal failure in rats. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 2006. 58(11): p. 1515-1525.
- [5] Sun, B., Research of Some Physiological Active Substance by Fermentation of *Monascus* spp. 2004, Dissertation for Master Degree.] Zhejiang Industry University, China: 40-55.
- [6] Abdou, A.M., et al., Relaxation and immunity enhancement effects of γ -aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *Biofactors*, 2006. 26(3): p. 201-208.
- [7] Oh, S.-H., J.-R. Soh, and Y.-S. Cha, Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. *Journal of medicinal food*, 2003. 6(2): p. 115-121.
- [8] Wiens, S.C. and V.L. Trudeau, Thyroid hormone and γ -aminobutyric acid (GABA) interactions in neuroendocrine systems. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2006. 144(3): p. 332-344.
- [9] Xu, C. and Y. Xia, Clinical observations on the control acute attack of deficiency-syndrome asthma with γ -aminobutyric acid. *Chinese Journal of Binzhou Medical College*, 1999. 22: p. 181.
- [10] Kazemi, H. and B. Hoop, Glutamic acid and gamma-aminobutyric acid neurotransmitters in central control of breathing. *Journal of Applied Physiology*, 1991. 70(1): p. 1-7.
- [11] Okada, T., et al .,Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi= Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 2000. 47(8): p. 596-603.
- [12] Leventhal, A.G., et al., GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science*, 2003. 300(5620): p. 812-815.
- [13] Kayahara, H. and T. Sugiura, Research on physiological function of GABA in recent years-improvement function of brain function and anti-hypertension. *Japanese Journal of Food development*, 2001. 36(6): p. 4-6.
- [14] Adeghate, E. and A. Ponery, GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and

4- نتیجه گیری

در این پژوهش توانایی تولید گابا از لاكتوباسیلوس های جدا شده از غذاهای تخمیر شده توسط کروماتوگرافی HPLC و TLC مورد بررسی قرار گرفت. لاكتوباسیلوس برویس PML1 جدا شده از ترخینه و لاكتوباسیلوس برویس G42 جدا شده از هویج تخمیر شده در شرایط تخمیر غیر بهینه، باعث تولید غلظت بالای گابا به ترتیب 304 میلی گرم در لیتر و 2511 میلی گرم در لیتر شد. علاوه بر این، ایزوله پروتئین سویا-آلرینات برای کپسوله کردن لاكتوباسیلوس برویس G42 مورد استفاده قرار گرفت و میکروکپسول ها از نظر توانایی تولید گابا مورد بررسی قرار گرفت. به نظر می رسد که ریزپاشانی در محافظت از لاكتوباسیلوس برویس G42 در برابر شرایط شبیه سازی شده معده و روده بسیار مؤثر است به طوری که بقای سلول به طور قابل توجهی بالا رفت و متعاقباً تولید گابا از سلول ها بطور قابل توجهی بهبود یافت. نتایج ما نشان می دهد که ریزپاشانی ایزوله پروتئین سویا-آلرینات حامل مفیدی برای انتقال مولکول های فعال زیستی تولید شده توسط پروبیوتیک ها و خود پروبیوتیک ها از طریق دستگاه گوارش و تحويل آنها به روده کوچک هستند.

5- تشکر و قدردانی

بر خود لازم می دانیم از حمایت های مالی "دانشگاه فردوسی مشهد" و کمک های فنی "شرکت داروسازی ثامن" برای انجام این تحقیق تشکر نمائیم.

6- منابع

- [1] DeFeudis, F.V., Muscimol binding and GABA receptors. *Drug Development Research*, 1981. 1(2): p. 93-105.
- [2] Tujioka, K., et al., Dietary γ -aminobutyric acid affects the brain protein synthesis rate in ovariectomized female rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 2009. 55(1): p. 75-80.
- [3] Diana, M., J. Quílez, and M. Rafecas, Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *Journal of functional foods*, 2014. 10: p. 407-420.

- Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1997. 61(7): p. 1168-1171.
- [25] Nomura, M., et al., Lactococcus lactis contains only one glutamate decarboxylase gene. *Microbiology*, 1999. 145(6): p. 1375-1380.
- [26] Siragusa, S., et al., Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and environmental microbiology*, 2007. 73(22): p. 7283-7290.
- [27] Komatsuzaki, N., et al., Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food microbiology*, 2005. 22(6): p. 497-504.
- [28] Park, K.-B. and S.-H. Oh, Isolation and characterization of *Lactobacillus buchneri* strains with high γ -aminobutyric acid producing capacity from naturally aged cheese. *Food Science and Biotechnology*, 2006.
- [29] Das, D. and A. Goyal, Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim. *LWT-Food Science and Technology*, 2015. 61(1): p. 263-268.
- [30] Di Cagno, R., et al., Synthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 2010. 86(2): p. 731-741.
- [31] Kim, J.E., et al., Novel bioconversion of sodium glutamate to γ -poly-glutamic acid and γ -amino butyric acid in a mixed fermentation using *Bacillus subtilis* HA and *Lactobacillus plantarum* K154. *Food Science and Biotechnology*, 2014. 23(5): p. 1551-1559.
- [32] Shan, Y., et al., Evaluation of improved γ -aminobutyric acid production in yogurt using *Lactobacillus plantarum* NDC75017. *Journal of dairy science*, 2015. 98(4): p. 2138-2149.
- [33] Lin, Q., Submerged fermentation of *Lactobacillus rhamnosus* YS9 for γ -aminobutyric acid (GABA) production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013. 44(1): p. 183-187.
- [34] Li, H., et al., Medium optimization for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912. *Amino acids*, 2010. 38(5): p. 1439-1445.
- function in normal and diabetic rats. *Tissue and Cell*, 2002. 34 :(')p. 1-6.
- [15] Kleinrok, Z., et al., GABA content and GAD activity in colon tumors taken from patients with colon cancer or from xenografted human colon cancer cells growing as sc tumors in athymic nu/nu mice. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 1998. 49(2): p. 303-310.
- [16] Wong, T., et al., Gaba, γ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Annals of neurology*, 2003. 54(S6).()
- [17] Feehily, C. and K. Karatzas, Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *Journal of applied microbiology*, 2013. 114(1): p. 11-24.
- [18] Omar, N.B., et al., Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia). *Systematic and Applied Microbiology*, (2).2300 :p. 285-291.
- [19] Gardner, N.J., et al., Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *International journal of food microbiology*, 2001. 64(3): p. 261.۲۷۵-
- [20] Satokari, R.M., et al., Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Systematic and applied microbiology*, 2003. 26(4): p. 572-584.
- [21] Binh, T.T.T., et al., Optimization of γ -amino butyric acid production in a newly isolated *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology letters*, 2014. 36(1): p. 93-98.
- [22] Huang, J., et al., Purification and Characterization of Glutamate Decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 Isolated from Fresh Milk** Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30570411) and the Research Plan of Zhejiang Province, China. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2007. 15(2): p. 157-161.
- [23] Li, H., et al., A high γ -aminobutyric acid-producing *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese traditionalpaocai. *Annals of Microbiology*, 2008. 58(4): p. 649-653.
- [24] Ueno, Y., et al., Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005.

- reviews in food science and food safety, 2008. 7(1): p. 14-28.
- [47] Maltais, A., G.E. Remondetto, and M. Subirade, Soy protein cold-set hydrogels as controlled delivery devices for nutraceutical compounds. *Food Hydrocolloids*, 2009. 23(7): p. 1647-1653
- [48] Maltais, A., G.E. Remondetto, and M. Subirade, Tabletted soy protein cold-set hydrogels as carriers of nutraceutical substances. *Food Hydrocolloids*, 2010. 24(5): p. 518-524.
- [49] Yew, S.E., et al., Development of a probiotic delivery system from agrowastes, soy protein isolate, and microbial transglutaminase. *Journal of food science*, 2011. 76(3): p. H108-H115.
- [50] Zhang, Y., et al., Soy Protein Isolate-Alginate Microspheres for Encapsulation of *Enterococcus faecalis* HZNU P2. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2015. 58(5): p. 805-811.
- [51] Hadzieva, J., et al., Lactobacillus casei encapsulated in soy protein isolate and alginate microparticles prepared by spray drying. *Food technology and biotechnology*, 2017. 55(2): p. 173-186.
- [52] YANG, S.Y., et al., A simple method for rapid screening of bacteria with glutamate decarboxylase activities. *Journal of rapid methods & automation in microbiology*, 2006. 14(3): p. 291-298.
- [53] Park, K.-B. and S.-H. Oh, Enhancement of γ -aminobutyric acid production in Chungkukjang by applying a *Bacillus subtilis* strain expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology letters*, 2006. 28(18): p. 1459-1463.
- [54] Kook, M.-C., et al., Enhancement of γ -amminobutyric acid production by *Lactobacillus sakei* B2-16 expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2010. 53(6): p. 816-820.
- [55] Watanabe, Y., K. Hayakawa, and H. Ueno, Effects of co-culturing LAB on GABA production. *J. Biol. Macromol*, 2011. 11: p. 3-13.
- [56] Choi, S.-I., et al., Improvement of γ -Aminobutyric Acid (GABA) Production Using Cell Entrapment of [35] Cho, Y.R., J.Y. Chang, and H.C .Chang, Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007. 17(1): p. 104-109.
- [36] Lu, X., et al., Isolation of γ -aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. *Biochemical Engineering Journal*, 2008. 41(1): p. 48-52.
- [37] Seok, J.-H., et al., Production and characterization of kimchi with enhanced levels of γ -aminobutyric acid. *Food Science and Biotechnology*, 2008. 17(5): p. 940-946.
- [38] Nomura, M., et al., Production of γ -aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 1998. 81(6): p. 1486-1491.
- [39] Ratanaburee, A., et al., Enhancement of γ -aminobutyric acid in a fermented red seaweed beverage by starter culture *Lactobacillus plantarum* DW12. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2011. 14(3): p. 1-1.
- [40] Li, H. and Y. Cao, Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino acids* ,(5).39.2010 :p. 1107-1116.
- [41] Gbassi, G.K. and T. Vandamme, Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, 2012. 4(1): p. 149-163.
- [42] Jantarathin, S., C. Borompichaichartkul, and R. Sanguandeekul, Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its effect on viability under heat process in shrimp feeding. *Materials Today: Proceedings*, 2017. 4(5): p. 6166-6172.
- [43] Dettmar, P.W., V. Strugala, and J.C. Richardson, The key role alginates play in health. *Food Hydrocolloids*, 2011. 25(2): p. 263-266.
- [44] Dong, Q.Y., et al., Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 2013. 48(7): p. 133-1351-9.
- [45] Krasaekoopt, W., B. Bhandari, and H. Deeth, Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International dairy journal*, 2003. 13(1): p. 3-13.
- [46] Singh, P., et al., Functional and edible uses of soy protein products. *Comprehensive*

- and Bioprocess Engineering, 2007. 12(6): p. 707-712.
- [66] Dhakal, R., V.K. Bajpai, and K.-H. Baek, Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. Brazilian Journal of Microbiology, 2012. 43(4): p. 1230-1241.
- [67] Wu, Q. and N.P. Shah, Gas release-based prescreening combined with reversed-phase HPLC quantitation for efficient selection of high- γ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria. Journal of dairy science, 2015. 98(2): p. 790-797.
- [68] Zhang, Y., et al., The two-step biotransformation of monosodium glutamate to GABA by Lactobacillus brevis growing and resting cells. Applied microbiology and biotechnology, 2012. 94(6): p. 1619-1627.
- [69] Li, H., et al., Production of gamma-aminobutyric acid by Lactobacillus brevis NCL912 using fed-batch fermentation. Microbial Cell Factories, 2010. 9(1): p. 85.
- [70] Komatsuzaki, N., et al., Characterization of glutamate decarboxylase from a high γ -aminobutyric acid (GABA)-producer, Lactobacillus paracasei. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2008. 72(2): p. 278-285.
- [71] Diana, M., et al., Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production. LWT-Food Science and Technology, 2014. 56(2): p. 351-355.
- [72] Li, R., et al., Preserving viability of Lactobacillus rhamnosus GG in vitro and in vivo by a new encapsulation system. Journal of controlled release, 2016. 230: p. 79-87.
- [73] Capela, P., T. Hay, and N. Shah, Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Research International, 2006. 39(2): p. 203-211.
- [74] Nazzaro, F., et al., Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated Lactobacillus acidophilus and survival under simulated gastrointestinal conditions. Journal of Functional Foods, 2009. 1(3): p. 319-323.
- [75] Chen, K.N., et al., Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. Journal of food science, 2005. 70(5): p. M260-M266.
- Lactobacillus brevis GABA 057. Journal of microbiology and biotechnology, 2006. 16(4): p. 568-562.
- [57] Huang, J., et al., Biosynthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of Lactobacillus brevis. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007. 23(6): p. 865-871.
- [58] Lee, B.-J., et al., Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by Lactobacillus brevis BJ20 isolated from traditional fermented foods. Food Chemistry, 2010. 122(1): p. 271-276.
- [59] Tan, L., et al., Simultaneous Determination of γ -Aminobutyric Acid and Glutamate in Human Gastric Mucosa by HPLC, as their Phenylisothiocyanate Derivatives. Journal of liquid chromatography & related technologies, 2006. 29(1): p. 45-53.
- [60] Zanjani, M.A.K., et al., Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR, 2014. 13(3): p. 843.
- [61] Mokarram, R., et al., The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. Food Research International, 2009. 42(8): p. 1040-1045.
- [62] Brinques, G.B. and M.A.Z. Ayub, Effect of microencapsulation on survival of Lactobacillus plantarum in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. Journal of food engineering, 2011. 103(2): p. 123-128.
- [63] Ratanaburee, A., et al., Selection of γ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and their potential as probiotics for use as starter cultures in T hai fermented sausages (N ham). International Journal of Food Science & Technology, 2013. 48(7): p. 1371-1382.
- [64] Thwe, S.M., et al., Isolation, characterization, and utilization of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria from Myanmar fishery products fermented with boiled rice. Fisheries Science, 2011. 77(2): p. 279-288.
- [65] Kim, S.-H., et al., Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from Lactobacillus brevis BH2. Biotechnology

Improvement of GABA production and survival of *Lactobacillus brevis* G42 in simulated gastrointestinal conditions by soy-alginate microencapsulation

Karimi, M.¹, Tabatabaei Yazdi, F. ^{1*}, Mortazavi, S. A. ¹, Shahabi-Ghahfarrokhi, I. ², Chamani, J. ³

1. Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran

3. Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Sciences, Mashhad Branch Islamic Azad University, Mashhad, Iran

(Received: 2019/09/04 Accepted: 2019/11/10)

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a non-protein amino acid existing in bacteria, plants, and vertebrates. GABA is especially well-known because of its physiological role in the neurotransmission, induction of hypotension, diuresis, and tranquility. GABA is biologically synthesized by GABA-producing lactic acid bacteria (GLAB) which are widely used as starters in the fermented foods. In this study, GABA-producing strain were chosen to be microencapsulated by soy protein isolate (SPI)-alginate using emulsion method. Encapsulation efficiency and entrapment of GLAB into soy protein-alginate microcapsules (SAE) was confirmed by scanning electron microscope. The GABA-producing ability and survivability of the microencapsulated GLABs were investigated in the human gastro-intestinal simulant. For screening of GLAB strains, the isolates from Tarkhineh and fermented carrot were separately cultivated in MRS broth supplemented with 1% (w/v) monosodium glutamate (MSG). The GABA production efficiency was studied by thin layer chromatography (TLC) and High performance liquid chromatography (HPLC). According to the recorded chromatograms, *Lactobacillus brevis* PML1 isolated from Tarkhineh and *Lactobacillus brevis* G42 from fermented carrot showed GABA producing ability of 304 mg/L and 2511 mg/L, after 30 h at 30 °C, respectively. The results indicated that survival and GABA production improved upon microencapsulating the bacteria due to the good cell protection provided by soy protein isolate-alginate coating. In long with previous reports, this study proves the potential of microencapsulation toward increased efficiency of GABA production in functional foods.

Keywords: Functional food, Microencapsulation, γ -Aminobutyric Acid (GABA), *Lactobacillus brevis*, Soy protein isolate

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