



تولید L-گلوتامات در محیط کشت تخمیر حاوی ضایعات غذایی با استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک

بومی و مقایسه آن با سویه صنعتی

نگین غظنفری^۱، فرشته فلاح^۱، علیرضا وسیعی^۲، فریده طباطبایی یزدی^{۳*}

۱-دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲-دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳-استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>تاریخ های مقاله :</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۰۶</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۲۱</p>	<p>L-گلوتامات از فراوانترین اسیدهای آمینه بدن است که نقش مهمی در فرآیندهای مختلف سلولی دارد و همچنین به عنوان پیش‌ساز مولکول‌های زیست فعال عمل می‌کند، که با توجه به کاربردهای دارویی و غذایی امروزه، بسیار مورد توجه قرار گرفته است و به عنوان یک اسید آمینه مهم صنعتی به صورت تجاری تولید می‌شود. در این پژوهش، تولید L-گلوتامات توسط سه باکتری اسید لاکتیک بومی (لاکتوباسیلوس برویس PML1، لاکتوباسیلوس پلاتناروم 1058 و لاکتوباسیلوس فرمتوم 4-17) در سه سطح درصد لجن لبنی (0، 10، 20%)، سه سطح درصد کنجاله سویا (0، 2.5، 5%) و سه سطح مدت زمان تخمیر (48، 84، 120 hr) با استفاده از روش آماری سطح پاسخ، بهینه شد. حداکثر تولید L-گلوتامات در محیط کشت حاوی 20% لجن لبنی، 5% کنجاله سویا و 48 hr زمان تخمیر، 500 mg/ml بدست آمد. از کروماتوگرافی لایه نازک برای ارزیابی کیفی و از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای تخمین کمی تولید L-گلوتامات استفاده و سپس خصوصیات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره تخمیر مورد ارزیابی قرار گرفت و با نمونه شاهد مقایسه شد. بر اساس نتایج آزمون‌های میکروبی، استافیلوکوکوس اورئوس حساسیت بیشتری به عصاره تخمیر شده در مقایسه با نمونه شاهد از خود نشان داد (MIC: 25 mg/ml, MBC: 50 mg/ml, WD: 14 mm).</p>
<p>کلمات کلیدی:</p> <p>L-گلوتامات، باکتری اسید لاکتیک بومی، RSM، لجن لبنی، کنجاله سویا.</p> <p>DOI: 10.22034/FSCT.19.131.91 DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.8.9</p> <p>* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir</p>	

۱- مقدمه

L-گلوتامات یک اسید آمینه غیرضروری، اسیدی و به صورت خطی، با بار منفی خالص و از فراوانترین اسیدهای آمینه در بدن انسان است که، توسط دانشمند آلمانی Karl Heinrich Ritthausenas در سال 1866 کشف شد [۱]. L-گلوتامات پیش‌ساز خاص برای اسیدهای آمینه مانند آرژینین و پرولین، همچنین مولکول‌های فعال زیستی مانند $GABA^1$ و بیولوژیکی مانند، گلووتاتینون، آدرنالین و استیل کولین است [۲]. L-گلوتامات در گروه اصلی انتقال دهنده عصبی تحریکی اصلی مغز قرار می‌گیرد. عملکرد مغز و فعالیت ذهنی را افزایش می‌دهد. یک اسید آمینه چند منظوره است که در درک طعم و برخی فرآیندهای سلولی مانند سیگنال‌دهی درون سلولی، تولید انرژی و سنتز دیواره سلولی نقش دارد [۳ و ۴]. گلوتامین مشتقی از L-گلوتامات است که در بدن از L-گلوتامات و آمونیاک توسط گلوتامین سنتتاز کاتالیز می‌شود و دارای فعالیت ضد سرطانی است به همین دلیل L-گلوتامات به عنوان یک عامل ضد سرطان شناخته می‌شود [۳]. L-گلوتامات به دلیل کاربردهای دارویی و غذایی امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است و به عنوان یک اسید آمینه مهم صنعتی به صورت تجاری تولید می‌شود. روش‌های متنوعی برای تولید L-گلوتامات وجود دارد ولی عمدتاً از طریق تخمیر میکروبی تولید می‌شود، زیرا روش شیمیایی یک مخلوط راسمیک گلوتامات (d- و L-گلوتامات) تولید می‌کند، همچنین تخمیر، اقتصادی‌ترین روش است. امروزه از سویه کورینه باکتریوم گلوتامیکوم به عنوان سویه صنعتی تولید کننده L-گلوتامات استفاده می‌شود. این باکتری در سال 1957 به عنوان یک باکتری تولید کننده L-گلوتامات به نام میکروکوکوس گلوتامیکوس کشف شد که امروزه به نام کورینه باکتریوم گلوتامیکوم شناخته می‌شود [۵-۷]. ضایعات غذایی به مواد غذایی اطلاق می‌شود که کیفیت خوبی دارند و برای مصرف انسان مناسب هستند اما، مصرف نمی‌شوند زیرا، دور ریخته می‌شوند که نتیجه سهل انگاری یا تصمیم آگاهانه برای دور ریختن غذا است. ضایعات غذایی اثرات منفی محیط زیستی زیادی دارند. از نظر محیط زیستی از دست دادن و ضایعات مواد

1. Gamma-aminobutyric acid (GABA)

غذایی تأثیرات زیادی از جمله انتشار گازهای گلخانه‌ای و استفاده ناکارآمد آب و زمین دارد که منجر به کاهش اکوسیستم‌های طبیعی می‌شود [۸]. با افزایش جمعیت نیاز برای تأمین منابع انرژی و غذایی نیز افزایش یافت. یکی از راهکارها استفاده از ضایعات غذایی برای تولید محصولات مفید و قابل استفاده است چرا که بسیاری از این منابع حاوی ترکیبات مختلفی از جمله پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و ویتامین‌ها هستند، از طرفی استفاده از ضایعات غذایی در تولید محصولات قابل استفاده، از ضررهای اقتصادی و زیست محیطی آنها جلوگیری می‌کند [۹]. پسماندهای لبنی به عنوان یک فاضلاب قوی حاوی درصد بالای اکسیژن و مقدار زیادی مواد آلی است که در سیستم تصفیه فاضلاب شهری مشکلات عمده‌ای را ایجاد می‌کنند که با بازیافت این نوع پساب‌ها این مشکلات تا حدی جبران می‌شود. پساب صنایع لبنی که به لجن لبنی معروف هستند و حاوی مقدار زیادی کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها است که می‌تواند به عنوان منابع کربن و نیتروژن برای میکروارگانیسم‌ها استفاده شود [۱۰]. کنجاله سویا از بقایای دانه، پس از استخراج روغن تولید می‌شود. منبع اصلی پروتئین در جیره غذایی غیر نشخوارکنندگان است. محتوای نسبتاً بالای پروتئین خام، مشخصات اسید آمینه عالی که مکمل غلات است و قابلیت هضم بالای اسید آمینه‌ی آن در مقایسه با سایر دانه‌های روغنی، آن را به دانه روغنی محبوب‌تری تبدیل کرده است. کنجاله سویا به دلیل داشتن مهارکننده‌ی تریپسین، در طول تولید تحت عملیات حرارتی قرار می‌گیرد تا مهارکننده‌ی تریپسین دناتوره شود و با هضم پروتئین تداخل ایجاد نکند [۱۱ و ۱۲]. باکتری‌های اسید لاکتیک، ارگانیسم‌های گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، متحرک، غیر بیماری‌زا و غیر اسپورزایی هستند که توانایی استفاده از کربوهیدرات‌ها را دارند و از نظر متابولیکی اسید لاکتیک را به عنوان محصول اصلی در تخمیر تولید می‌کنند و در بسیاری از غذاهای تخمیری استفاده می‌شوند. از طریق تولید عوامل ضد میکروبی مانند اسید لاکتیک، دی استیل، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین نقش مهمی در ایجاد یک میکروفلور روده سالم با مبارزه و از بین بردن عوامل بیماری‌زا دارند [۱۳]. هدف از انجام این پژوهش، استفاده از لجن لبنی و کنجاله سویا به عنوان به ترتیب منابع کربن و ازت برای بهینه‌سازی تولید L-گلوتامات و بررسی پتانسیل تولید این اسید آمینه توسط

به مدت 15 min سانتریفیوژ و از سوپرناتانت برای تخمین L-گلوتامات استفاده شد [۱].

۲-۴- کروماتوگرافی لایه نازک (TLC³)

برای ارزیابی تولید L-گلوتامات از صفحه سیلیکاژل صعودی TLC به ابعاد 20×20 cm استفاده شد. صفحه به صورت افقی در فاصله 2 cm از پایین صفحه با مداد در جهت افقی خط کشی و نقاطی به فاصله 1 cm از هم، علامت گذاری شد. فاز متحرک شامل n-بوتانول: استیک اسید: آب مقطر (1: 2: 4 v/v) آماده شد. از اسید گلوتامیک خالص به عنوان کنترل استفاده و با کمک یک لوله موئینه 2 μl صفحه، لکه گذاری شد. سپس لکه‌ها با کمک محلول 5% نین هیدرین و قرار گرفتن در آون 90 °C به مدت 10 min ظاهر شدند. نقاط حاوی L-گلوتامات در صفحات را برش داده و در محلول اتانول 75% و سولفات مس 0.6% حل شد. مخلوط به مدت 45 min در انکوباتور rpm 50 در دمای 40 °C قرار داده شد. سپس میزان جذب هر نمونه در طول موج 512 nm خوانده شد [۱۵].

۲-۵- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC⁴)

پس از یافتن تیمار بهینه با روش TLC، میزان L-گلوتامات توسط HPLC مجهز به ستون C₁₈ (250 × 4.6 mm) بدست آمد. استانداردهای L-گلوتامات در غلظت‌های 100 mg/L و 500 تهیه شد. فاز متحرک شامل محلول A (محلول آبی استات سدیم، تری اتیل آمین و اسید استیک pH= 5.8)، محلول B (acetonitrile) و محلول C شامل آب دیونیزه بود. فاز متحرک با سرعت جریان 0.5 ml/min به ستون تزریق و از آشکارساز UV در طول موج 254 nm در دمای 40 °C برای شناسایی مواد خروجی ستون استفاده شد [۱۶].

۲-۶- خصوصیات ضد میکروبی

۲-۶-۱- حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC⁵)

24 ساعت قبل از انجام تست، باکتری‌های بیماری‌زا سودوموناس آئروژینوزا PTCC 1707 و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC

باکتری‌های اسید لاکتیک بومی (لاکتوباسیلوس برویس PML1، لاکتوباسیلوس پلانناروم 1058 و لاکتوباسیلوس فرمنتوم 4-17) می‌باشد. در نهایت خصوصیات میکروبی و آنتی اکسیدانی عصاره تخمیر شده ارزیابی و با نمونه شاهد (کورینه باکتریوم گلوتامیکوم) مقایسه شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- فعال‌سازی میکروارگانسیم‌ها

باکتری‌های اسید لاکتیک بومی، از بانک میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی و سویه استاندارد از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. برای فعال شدن باکتری‌های اسید لاکتیک بومی لیوفیلیزه، در محیط کشت MRS² broth، در دمای 18 °C به مدت 18 hr گرمخانه گذاری شدند، سپس باکتری‌های فعال به محیط کشت MRS agar منتقل و در دمای 24 °C به مدت 24 hr در انکوباتور قرار گرفتند. باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکوم PTCC 1532 (نمونه شاهد) نیز در محیط کشت LB broth به همین ترتیب فعال شد [۱۴].

۲-۲- آماده‌سازی محیط کشت تخمیر

در این پژوهش لجن لبنی از کارخانه لبنیات پگاه خراسان رضوی، مشهد و کنجاله سویا از گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند. برای تهیه محیط کشت جهت تولید L-گلوتامات از لجن لبنی به عنوان منبع کربن و کنجاله سویا، به عنوان منبع ازت استفاده شد. ابتدا سه سطح پودر لجن لبنی (0، 10، 20%)، سه سطح پودر کنجاله سویا (0، 2.5، 5%) و سه سطح مدت زمان فرآیند تخمیر (48، 84، 120 hr) انتخاب و بر اساس طرح آماری در حجم مشخص تهیه شد. تخمیر در حجم نهایی 10 ml که حاوی، 7 ml محیط کشت + 3 ml از مخلوط سوسپانسیون (1.5 × 10⁸ CFU/ml) سه باکتری اسید لاکتیک (هر باکتری 1 ml) انجام شد.

۲-۳- استخراج L-گلوتامات

استخراج L-گلوتامات به روش Fahimitabar و همکاران صورت گرفت. به این ترتیب که عصاره تخمیر شده در 8000

3. Thin Layer Chromatography (TLC)

4. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

5. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

2. De Man, Rogosa and Sharpe (MRS)

به مدت 20 min در حمام آب در دمای 50 °C، 2.5 ml تری کلرو استیک اسید 10% به آن اضافه و مجدداً همزده و در rpm 750 به مدت 5 min سانتریفیوژ شد. در ادامه 2 ml سوپرناتانت با 2 ml آب مقطر و 1 ml کلرید آهن 0.1% مخلوط و بعد از نگهداری به مدت 10 min در دمای محیط، جذب محلول در طول موج 700 nm خوانده شد [۲۰].

۲-۷-۲- فعالیت رادیکال گیری (DPPH¹²)

از DPPH assay برای ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد عصاره تخمیر شده استفاده شد. برای این منظور، 2 ml از نمونه با 1 ml محلول اتانولی DPPH 0.2Mm مخلوط و نمونه به مدت 30 min در دمای اتاق و در مکان تاریک نگهداری و در نهایت جذب در طول موج 517 nm خوانده شد. محلول اتانولی BHA¹³ با غلظت 20 mg/ml به عنوان کنترل استفاده شد [۲۱].

$$\text{Radical inhibitory activity (\%)} = [(1 - A_1)/A_2] \times 100$$

A₁: جذب نمونه و A₂: جذب کنترل.

۲-۸- طرح آماری

برای بهینه‌سازی متغیرهای مؤثر بر تولید L-گلوتامات از روش سطح پاسخ (RSM¹⁴) طرح مرکب مرکزی (CCD¹⁵) استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار Design Expert صورت گرفت. سه متغیر درصد لجن لینی (X₁, 0, 10, 20%)، درصد کنجاله سویا (X₂, 0, 2.5, 5%) و مدت زمان تخمیر (X₃, 48, 84, 120 hr) تقسیم‌بندی شدند. طرح مرکب مرکزی شامل 20 مرحله آزمایشی (8 نقطه فاکتوریل، 6 نقطه محوری و 6 نقطه مرکزی) بود.

۳- نتایج

۳-۱- تجزیه و تحلیل آماری

بررسی اثر سه متغیر بر تولید L-گلوتامات، با کمک طرح CCD تجزیه و تحلیل شد. از TLC (Fig 1) برای بررسی کیفی تولید L-گلوتامات و از نین هیدرین برای شناسایی L-گلوتامات،

25923 در محیط کشت MHB⁶ (37 °C، 24 hr) فعال شدند. عصاره تخمیر شده در رقت‌های 1.6-200 mg/ml در میکروپلیت 96 خانه‌ای تهیه شد. سپس 20 µl سوسپانسیون میکروبی (1.5 × 10⁸ CFU⁷/ml) به هر چاهک اضافه و در دمای 37 °C به مدت 24 hr گرمخانه گذاری شد. بعد از اتمام گرمخانه گذاری، 10 µl محلول 5% تترازولیوم کلراید به هر چاهک اضافه و به مدت 30 min دیگر در همان دما قرار گرفت. پس از گذشت 30 min، اولین چاهکی که رنگ قرمز تشکیل نداده و در نتیجه رشد میکروبی در آن مشاهده نشده بود، به عنوان MIC گزارش شد [۱۷].

۲-۶-۲- حداقل غلظت کشندگی (MBC⁸)

از تمام چاهک‌هایی که در تست MIC فاقد رنگ بودند، 20 µl روی محیط کشت MHA⁹ کشت سطحی داده و در دمای 37 °C به مدت 24 hr گرمخانه گذاری شد. سپس رقتی به عنوان MBC انتخاب شد که هیچگونه رشدی در آن مشاهده نشده بود [۱۸].

۲-۶-۳- انتشار در چاهک (WD¹⁰)

ابتدا 15 ml محیط کشت MHA را به پلیت اضافه و در دمای محیط، جامد شد. 10 µl از سوسپانسیون میکروبی (1.5 × 10⁸ CFU/ml) به صورت سطحی کشت داده و با انتهای نوک سمپلر استریل چاهک‌هایی به قطر 9 mm ایجاد شدند. 150 µl از رقت‌های آماده شده عصاره تخمیر شده (1200, mg/ml) 600, 300, 150 در چاهک‌ها ریخته و در دمای 37 °C به مدت 24 hr گرمخانه گذاری شدند. در نهایت، اندازه هاله‌های بازدارندگی تشکیل شده بر مبنای mm گزارش شد [۱۹].

۲-۷-۲- خصوصیات آنتی اکسیدانی

۲-۷-۱- سنجش قدرت آنتی اکسیدانی احیاء آهن (FRAP¹¹)

ابتدا 1 ml از عصاره تخمیر شده با 1 ml آب مقطر و 1 ml فری سیانید پتاسیم 1% مخلوط شد. بعد از حرارت دهی محلول

6. Muller Hinton Broth (MHB)

7. Colony Forming Unit

8. Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

9. Muller Hinton Agar (MHA)

10. Well Diffusion assay (WD)

11. Ferric Reducing Antioxidant Power assay (FRAP)

12. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

13. Beta Hydroxy Acid (BHA)

14. Response Surface Methodology (RSM)

15. Central Composite Design (CCD)

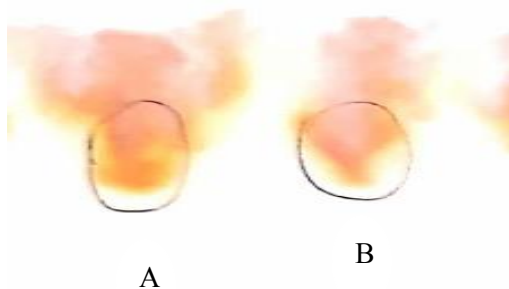


Fig 1 Thin-layer chromatography: (A) Standard concentrations 300 ppm, (B) optimum sample

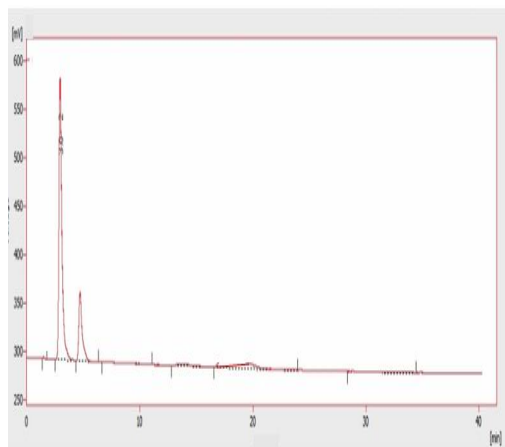


Fig 2 Optimal treatment HPLC

۲-۳- نتایج خصوصیات ضد میکروبی

با توجه به نتایج بدست آمده از تست MIC و MBC (جدول 1) *استافیلوکوکوس اورئوس* حساسیت بیشتری به عصاره تخمیر شده در مقایسه با نمونه شاهد از خود نشان داد و باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* با رقت بالاتری از هر دو نمونه مهار شد که نشان دهنده مقاومت بالاتر این باکتری گرم منفی به هر دو نمونه است. در تست انتشار در چاهک (جدول 2) هر دو باکتری با بالاترین رقت آماده شده از عصاره تخمیر شده و نمونه شاهد، (1200 mg/ml) هاله بازدارندگی تشکیل دادند. بزرگترین هاله تشکیل شده 14 mm برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و

همچنین برای اندازه‌گیری کمی L-گلوتامات از HPLC (Fig 2) استفاده شد. P-value به عنوان یک شاخص مهم در بررسی نتایج عمل می‌کند و هر چقدر کمتر باشد، مدل معتبرتر است. طبق نتایج بدست آمده اثر لجن لبنی بیشتر از کنجاله سویا و مدت زمان تخمیر مشاهده شد. اثر هر سه متغیر بر تولید L-گلوتامات معنی‌دار بود ($p < 0.05$). مقدار F-value نشان دهنده تأثیر متغیرهای مختلف بر فرآیند تخمیر L-گلوتامات به این صورت بود:

$$X_1 > X_2 > X_3$$

آزمایش‌های اولیه بر روی تولید L-گلوتامات توسط باکتری‌های اسید لاکتیک بومی نشان داد، مهم‌ترین پارامتر، درصد لجن لبنی بود. مدل پیش‌بینی از نظر آماری معنی‌دار بود ($R^2 = 0.9967$, $p < 0.05$, F-value = 470.06) که کیفیت برازش مدل را تأیید می‌کند. یکی از ترکیباتی که می‌توان در طراحی محیط کشت به عنوان محیط مناسبی (منبع کربن) برای رشد بسیاری از باکتری‌ها استفاده کرد، لجن لبنی است [۱۶]. کنجاله سویا نیز به عنوان منبع ازت، به دلیل داشتن زنجیره کوتاه و پپتیدهای زیست فعال، می‌تواند در کشت‌های تخمیر برای تولید اسیدهای آمینه مختلف مورد استفاده قرار گیرد [۲۲]. سنتز L-گلوتامات توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها گزارش شده است ولی بسیاری از آنها میکروارگانیسم‌های با گرید غذایی نیستند. باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری‌هایی هستند که متابولیت‌های مختلفی تولید می‌کنند و به طور گسترده در صنایع غذایی استفاده می‌شوند [۲۳]. استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک بومی با پتانسیل تولید L-گلوتامات، می‌تواند تولید غذاهای کاربردی حاوی مولکول‌های زیست فعال مانند GABA را تسهیل کند. از دیگر مزیت‌های استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توان به، خاصیت پروبیوتیک آن‌ها، تولید اسیدهای آمینه فعال، تولید ایمن و سازگار با محیط زیست اشاره کرد [۴]. بیش‌ترین میزان تولید L-گلوتامات توسط باکتری‌های اسید لاکتیک بومی در محیط حاوی 20% لجن لبنی، 5% کنجاله سویا و مدت زمان تخمیر 48 hr که 500 mg/ml (دمای 37 °C) بدست آمد.

نمونه عصاره تخمیر شده در مقایسه با نمونه شاهد نتایج بهتری در تست‌های ضد میکروبی از خود نشان داد.

نمونه عصاره تخمیر شده بود که نشان دهنده حساسیت بالاتر این باکتری گرم مثبت در مقایسه با *سودوموناس آئروژینوزا* است.

Table 1 Antimicrobial properties (MIC, MBC)

Bacteria	Fermentation broth		Control sample	
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC	MBC
<i>P. aeruginosa</i>	50	100	100	200
<i>S. aureus</i>	25	50	50	100

Table 2 Antimicrobial properties (WD)

Bacteria	Fermentation broth	Control sample
	Well diffusion (mm)	
<i>P. aeruginosa</i>	12	7
<i>S. aureus</i>	14	8

نشان داد که می‌تواند به تعداد زیاد هیدروژن تولید شده در فرآیند تخمیر نسبت داده شود. اساس آزمون DPPH بر مبنای احیاء رادیکال آزاد DPPH و تغییر رنگ از بنفش به زرد استوار است [۲۵]. نمونه تخمیر شده در مقایسه با BHA قدرت رادیکال‌گیری نسبتاً خوبی از خود نشان داد. به طور کلی با توجه به نتایج بدست آمده، نمونه تخمیر شده در مقایسه با نمونه شاهد قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نشان داد.

۳-۳- خصوصیات آنتی‌اکسیدانی

نتایج خصوصیات آنتی‌اکسیدانی در جدول شماره ۳ ارائه شده است. FRAP یک روش مناسب برای بررسی توانایی یک آنتی‌اکسیدان در اهداء الکترون است که اساس آن احیاء کمپلکس فروسیانید کلرید آهن به شکل آهن-آهن می‌باشد [۲۴]. نتایج نشان داد عصاره تخمیر شده قدرت احیاء قابل قبولی داشت، هر چند فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری در مقایسه با BHA از خود

Table 3 Antioxidant properties (DPPH, FRAP)

Method	Fermentation broth	Control sample	BHA
DPPH (%)	44.40 ± 0.61	24.95 ± 0.87	72.15 ± 2.13
FRAP (μmol/l)	0.130 ± 0.002	0.06 ± 0.0005	1.51 ± 0.83

استفاده از ضایعات غذایی و تولید محصولات مفید مشاهده شد. همچنین باکتری‌های اسید لاکتیک بومی نشان دادند علاوه بر داشتن پتانسیل تولید L-گلوتامات، به دلیل داشتن فرآیند تولید ایمن و سازگار با محیط زیست، گزینه مناسبی برای تولید L-گلوتامات هستند.

۴- نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج بدست آمده برای بررسی اثر متغیرهای مؤثر بر تخمیر و بهینه‌سازی فرآیند تولید L-گلوتامات می‌توان از طرح مرکب مرکزی استفاده کرد. حداکثر تولید L-گلوتامات با استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک بومی (لاکتوباسیلوس برویس PML1، لاکتوباسیلوس پلاتناروم 1058 و لاکتوباسیلوس فرمنتوم 17-4) در محیط کشت حاوی 20% لجن لبنی، 5% کنجاله سویا و 48 h زمان تخمیر، 500 mg/ml بدست آمد. روش تخمیر روش مناسبی برای تولید اسید آمینه به دلیل کاهش هزینه‌های تولید، کاهش آلودگی محیط زیست، امکان

۵- تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله صمیمانه تشکر و قدردانی خود را از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) جهت تأمین مالی طرح تحقیقاتی با کد ۴۰۰۰۹۶۰ اعلام می‌دارند.

۶-منابع

- microbial isolates obtained from activated sludge. *Water Resources and Industry*, 9, 1–15.
- [11] Ravindran, V., Abdollahi, M. R. & Bootwalla, S. M. 2014. Nutrient analysis, metabolizable energy, and digestible amino acids of soybean meals of different origins for broilers. *Poultry Science*, 93, 2567–2577.
- [12] Stein, H. H., Berger, L. L., Drackley, J. K., Fahey, G. C., Hernot, D. C. & Parsons, C. M. 2008. Nutritional Properties and Feeding Values of Soybeans and Their. *Soybeans, Chemistry, Production, Processing, and Utilization*, pp, 613-660.
- [13] Kocabay, S. & Çetinkaya, S. 2020. Probiotic Properties of a *Lactobacillus fermentum* Isolated from New-born Faeces. *Journal of Oleo Science*, pp, 1-6.
- [14] Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S. A. & Noorbakhsh, H. 2018. Diversity and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Horreh, a traditional Iranian fermented food. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10, 258–268.
- [15] Kook, M. C. & Cho, S. C. 2013. Production of GABA (gamma amino butyric acid) by lactic acid bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 33, 377–389.
- [16] Liu, W., Chen, X. D., Cheng, Z. & Selomulya, C. 2016. On enhancing the solubility of curcumin by microencapsulation in whey protein isolate via spray drying. *Journal of Food Engineering*, 169, 189–195.
- [17] Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A. & McClements, D.J. 2016. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of thymus daenensis essential oil against *E. coli*. *Food Chemistry*, 194, 410–415.
- [18] Alizadeh Behbahania, B., Noshad, M. & Falah, F. 2019. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial Pathogenesis*, 136, 1-6.
- [19] Ghazanfari, N., Mortazavi, S. A., Tabatabaei Yazdi, F. & Mohammadi, M. 2020. Microwave-assisted hydrodistillation extraction of essential oil from coriander seeds and evaluation of their composition, antioxidant and antimicrobial activity. *Heliyon*, 6, 1-9.
- [1] Fahimitabar, A., Razavian, S. M. H. & Rezaei, S. A. 2021. Application of RSM for optimization of glutamic acid production by *Corynebacterium glutamicum* in bath culture. *Heliyon*, 7, 1-7.
- [2] Beyreuther, K., Biesalski, H., Fernstrom, J., Grimm, P., Hammes, W., Heinemann, U., Kempster, O., Stehle, P., Steinhart, H. & Walker, R. 2007. Consensus meeting: Monosodium glutamate—An update. *European journal of clinical nutrition*, 61, 304-313.
- [3] Dutta, S., Ray, S. & Nagarajan, K. 2013. Glutamic acid as anticancer agent: An overview. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 337-343.
- [4] Zareian, M., Ebrahimpour, A., Abu Bakar, F., Sabo Mohamed, A. K., Forghani, B., Ab-Kadir, M. S. & Saari, N. 2012. A Glutamic Acid-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Malaysian Fermented Foods. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 5482-5497.
- [5] Shen, X. H., Zhou, N. Y. & Liu, S. J. 2012. Degradation and assimilation of aromatic compounds by *Corynebacterium glutamicum*: another potential for applications for this bacterium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp, 1-14.
- [6] Nadeem, S., Niaz, B., Muzammil, H. M., Rana, S. M., Rajoka, M. I. & Shakoory, A. R. 2011. Optimising Carbon and Nitrogen Sources for L-Glutamic acid Production by *Brevibacterium* strain NIAB SS-67. *Pakistan Journal of Zoology*, 43, 285-290.
- [7] Sano, C. 2009. History of glutamate production. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 728S–732S.
- [8] Lipinski, B., hanson, C., Iomax, J., Kitinoja, L., Waite, R. & Searchinger, T. 2013. Reducing Food Loss and Waste. *World resource institute*, pp, 1-40.
- [9] Falah, F., Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F. & Mortazavi, S. A. 2021. Optimization of gamma-aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* PML1 in dairy sludge-based culture medium through response surface methodology. *Food Sciences & Nutrition*, 9, 3317–3326.
- [10] Porwal, H. J., Mane, A. V. & Velhal, S. G. 2015. Biodegradation of dairy effluent by using

- glutamate dehydrogenase in *Lactococcus lactis* is part of a remnant Tn3 transposon carried by a large plasmid. *Journal of Bacteriology*, 187, 5019–5022.
- [24] Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Falah, F. & Vasiee, A. 2020. Gamma-aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* A3: Optimization of production, antioxidant potential, cell toxicity, and antimicrobial activity. *Food Sciences & Nutrition*, 8, 5330–5339.
- [25] Kukic, J., Popovic, V., Petrovic, S., Mucaji, P., Ciric, A., Stojkovic, D. & Sokovic, M. 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chemistry*, 107, 861–868.
- [20] Li, X., Shi, X., Jin, Y., Ding, F. & Du, Y. 2013. Controllable antioxidative xylan–chitosan Maillard reaction products used for lipid food storage. *Carbohydrate Polymers*, 91, 428–433.
- [21] Bai, W., Wang, Q., Zeng, X., Fu, J., Liu, Y. & Dong, H. 2017. Antioxidant activities of chicken peptide-Maillard reaction products (CP-MRPS) derived from chicken peptides and D-glucose system. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41: e13041.
- [22] Chi, C. H. & Cho, S. J. 2016. Improvement of bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* versus *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT -Food Science and Technology*, 68, 619–625.
- [23] Tanous, C., Chambellon, E., Sepulchre, A. M. & Yvon, M. 2005. The gene encoding the



Production of L-glutamate in fermentation medium containing food waste using native lactic acid bacteria and its comparison with industrial strain

Ghazanfari, N. ¹, Falah, F. ¹, Vasiee, A. ², Tabatabaei Yazdi, F. ^{3*}

1. PhD student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. PhD, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 08/ 28
Accepted 2022/ 11/ 12

Keywords:

L-glutamate,
Native lactic acid bacteria,
RSM,
Dairy sludge,
Soybean meal.

DOI: 10.22034/FSCT.19.131.91
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.8.9

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

ABSTRACT

L-glutamate is one of the most abundant amino acids in the body, which plays an important role in various cellular processes and also acts as a precursor of bioactive molecules, which has received much attention due to its medicinal and food applications today, and as an important amino acid. Industrial is produced commercially. L-glutamate is one of the metabolites produced by these bacteria, which is also biologically active. In this research, the production of L-glutamate by three autochthonous lactic acid bacteria (*Lactobacillus brevis* PML1, *Lactobacillus plantarum* 1058 and *Lactobacillus fermentum* 4-17) at three percentage levels of dairy sludge (0, 10, 20%), three levels of soybean meal (0, 2.5, 5%) and three levels of fermentation time (48, 84, 120 hr) were optimized using RSM. The maximum production of L-glutamate in culture medium containing 20% dairy sludge, 5% soybean meal and 48 hr fermentation time, 500 mg/ml was obtained. TLC was used for qualitative evaluation and HPLC was used for quantitative estimation of L-glutamate production, and then the antimicrobial and antioxidant properties of the fermentation extract were evaluated and compared with the control sample. According to the results of microbial tests, *Staphylococcus aureus* showed more sensitivity to the fermented extract compared to the control sample (MIC: 25 mg/ml, MBC: 50 mg/ml, WD: 14 mm).