علمی پژوهشی

تولید گاما آمینو بوتریک اسید توسط *Lactococcus lactis* NZ1330 در محیط کشت حاوی لجن لبنی و مونوسدیم گلوتامات

بهروز علیزاده بهبهانی[۱]، فرشته فلاح[۲]، علیرضا وسیعی[۳]، فریده طباطبایی یزدی[۴*]، سیدعلی مرتضوی[۴]، شهناز افشاریان[۵]

۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۲- دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳- دکتری گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
٤- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۵- کارشناس ارشد آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۰۵)

چکیده

گاما آمینوبوتریک اسید (گابا)، مولکول زیست فعال با نقش‌های فیزیولوژیکی مختلف در بدن است که با مهار تحریکات نورون و ممانعت از رسیدن پیام-های حاوی ترکیبات استرس‌زا، دارای خواص آرامش بخشی بوده و در درمان بیماری‌های مختلف نقش موثری دارد. در پژوهش حاضر، امکان تولید این اسید آمینه توسط باکتری *Lactococcus lactis* NZ1330 بررسی شد. به منظور بهینه‌سازی فرآیند تخمیر سه سطح از لجن لبنی (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد)، مونو سدیم گلوتامات (صفر، ۰/۵ و ۱ درصد) در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت انتخاب شد و پس از تخمیر، وجود گابا در محیط کشت به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک بررسی شد. برای کمی سازی باندهای موجود در کروماتوگرافی لایه نازک از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. نتایج بهینه‌سازی در سطح معنی داری ۹۵ درصد نشان داد تیمار بهینه شامل محیط کشت حاوی ۱۱/۲درصد لجن لبنی،۰/۷ درصد مونوسدیم گلوتامات و زمان ۷۰ ساعت تخمیر در دمای ۳۲ °C بوده و تحت این شرایط تولید گابا به میزان ٤۰۰ ppm می‌باشد. بنابراین از این ترکیب محیط کشت می‌توان به عنوان سوبسترای مناسب جهت تولید ترکیب دارویی و زیست فعال ارزشمند گابا استفاده کرد.

کلید واژگان: گابا، *لاکتوکوکوس لاکتیس*، لجن سپراتور، مونوسدیم گلوتامات.

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

۱- مقدمه

گاما آمینوبوتیریک اسید[1](GABA)، یکی از آمینواسیدهای غیرضروری تشکیل شده از گلوتامیک اسید و ویتامین ب ٦ می‌باشد. گاما آمینوبوتیریک اسید تقریبا در تمام بخش‌های مغز یافت می‌شود و از طریق فعالیت آنزیم گلوتامیک اسید دی کربوکسیلاز[2] (GAD) تشکیل می‌شود. GABA یکی از اصلی‌ترین انتقال دهنده‌های عصبی مهارکننده در دستگاه عصبی می‌باشد که از انتقال جریان از سلولی به سلول دیگر جلوگیری می‌کند. این ماده به دلیل مهار تحریکات نورون و ممانعت از رسیدن پیام های حاوی ترکیبات استرس‌زا، دارای خواص آرامش بخشی بوده و در درمان اختلالات عصبی، بیماری‌های پارکینسون[3]، تشنج، آلزایمر[4] و اسکیزوفرنی[5] و به خصوص مالتیپل اسکلروزوسیس[6] نقش موثری دارد. به همین دلیل برخی پژوهش‌ها پیشنهاد کرده‌اند که می‌توان از آن به عنوان یک درمان طبیعی استفاده کرد [۱]. در حالی که برخی پژوهشگران متوجه شده‌اند که این ماده می‌تواند در مکانیزم بهبود جراحات دخالت داشته باشد [۲]. برخی تحقیقات نشان داده‌اند که اسید گاما آمینو بوتیریک می‌تواند در کاهش التهاب موثر بوده و در درمان این بیماری‌ها مفید باشد. به عنوان مثال، مطالعات حیوانی UCLA[7] نشان داد که تغذیه موش‌ها با اسید گاما آمینو بوتیریک باعث کاهش خطر ابتلا به آرتریت روماتوئید و کاهش علائم آن می‌شود. بررسی دیگری در سال ۲۰۱۸ توسط کویی و همکاران انجام شد مشخص کرد که GABA می‌تواند فعالیت مسیری را که موجب التهاب مفاصل می شود را کاهش دهد [۳]. گابا به صورت طبیعی در منابع گیاهی از جمله غلات، برخی میوه‌ها و حبوبات به میزان کمی وجود دارد. همچنین در انسان توسط دو ایزوفرم آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز وابسته به پیرودوکسال فسفات به میزان نیاز تولید می‌شود ولی کمبود استروژن، روی، برخی ویتامین‌ها یا وجود اسید سالیسیلیک و افزودنی‌های غذایی موجب مهار تولید گابا در بدن می‌شوند [٤].

گابا از طریق دکربوکسیلاسیون گلوتامیک اسید به وسیله آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز به صورت برگشت‌ناپذیر تولید می‌شود. GAD تولید GABA از گلوتامیک اسید را سرعت می‌بخشد و برای تنظیم میزان GABA به ویتامین ب ٦ نیاز دارد. این آنزیم توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها تولید می‌شود. مطالعات زیادی وجود این آنزیم را در باکتری‌های اسید لاکتیک گزارش می‌دهند. گابا محصول نهایی دکربوکسیلاسیون اسید آمینه گلوتامیک اسید در باکتری‌های اسید لاکتیک است [٥].

باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) از مهمترین باکتری‌های موجود در فلور طبیعی بدن می باشد. باکتری‌های اسید لاکتیک معمولاً غیر هوازی و غیر اسپورزا و در کل کوکسی یا باسیلی هستند. این باکتری‌ها بر اساس متابولیسم و مشخصات فیزیکی دسته بندی می‌شوند. این باکتری‌ها در گیاهان بیشتر به عنوان تجزیه کننده‌ها حضور دارند و طی فرایند تخمیر کربو هیدرات‌ها اسید لاکتیک را به عنوان محصول نهایی تولید می‌کنند. مکانیسم‌هایی برای توجیه اثرات پیشگیری کننده و درمانی آن‌ها در بیماری‌های انسان پیشنهاد شده است که از آن جمله می‌توان به تولید ترکیبات مهار کننده باکتری‌ها، تعدیل pH روده، تقویت سیستم ایمنی، بلوک جایگاه های اتصال باکتری‌ها و رقابت برای جذب مواد غذایی اشاره نمود. فعالیت ضد باکتریایی، به دلیل تولید اسیدهای آلی و هیدروژن پراکسید است. باکتریوسین‌های تولیدی توسط باکتری-های اسید لاکتیک کوچک هستند و به صورت پپتیدی یا پروتئینی هستند. همچنین در برخی سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک فعالیت ضد قارچی هم دیده شده است [٦].

گونه‌های غالب این خانواده شامل *ائرومونـاس*، *کرینه باکتر*، *انتروکوک*، *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس*، *لئوکنوستوک*، *پدیوکوکوس* و *استرپتوکوک* می‌باشد.گروه عمده‌ای از باکتری‌های اسید لاکتیک ضمن فواید متعدد تکنولوژیکی و توانایی بالقوه در ایجاد عطر و طعم قادر به بقا و رشد در سیستم گوارشی انسان بوده و اثرات مفیدی بر سلامتی مصرف کنندگان دارند [۷]. این گونه باکتری‌ها و دیگر میکروارگانیسم‌هایی که چنین ویژگی داشته باشند تحت عنوان پروبیوتیک تعریف می‌شوند. به علاوه این باکتری‌ها به طور سنتی در تولید محصولات لبنی تخمیری استفاده می‌شوند و از خصوصیت "به طور کلی ایمن" برخوردار

1. Gamma aminobutyric acid
2. Glutamic acid decarboxylase
3. Parkinson
4. Alzheimer's
5. Schizophrenia
6. Multiple Sclerosis
7. University of California, Los Angeles

می‌باشند. استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک با پتانسیل پروبیوتیکی بهترین انتخاب، نه فقط برای بالا بردن تعداد میکروب‌های مفید در فرآورده‌های غذایی، بلکه به‌عنوان میکروب‌های سازگار طبیعی با محیط روده می‌باشد [۸].

لاکتوکوکوس، گروهی از باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که قبلاً در گروه استرپتوکوک‌ها قرار داشتند. هوموفرمنتاتیو بوده یعنی فقط اسید لاکتیک را از تخمیر گلوکز تولید می‌کنند. با تغییر شرایط محیط کشت مانند pH، غلظت گلوکز و مواد غذایی می‌توان این ویژگی را تغییر داد. *لاکتوکوکوس‌ها*، کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و غیر متحرکی هستند که به شکل تک، جفت یا زنجیره‌ای دیده می‌شوند [۹]. *لاکتوکوکوس* گونه‌هایی دارد که می‌توانند در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد یا پایین تر رشد کنند. از لاکتوکوک‌ها به طور گسترده در صنعت لبنیات برای تولید محصولات تخمیری استفاده می‌شود. این باکتری غیر اسپورزا، غیر متحرک و مزوفیل بوده و از نظر فعالیت، بی هوازی اختیاری است و توسط تخمیر لاکتیکی، کربوهیدرات‌ها را به اسید الکتیک تبدیل می‌کند، علاوه بر تولید فرآورده‌های لبنی در تولید محصولاتی از قبیل نوشیدنی‌ها، سرکه، سوسیس و ... نیز به کار می‌رود [۱۰]. این باکتری برای رشد به آرژینین، متیونین، گلوتامات و والین نیاز دارند و می‌توانند از کربوهیدرات‌ها به عنوان منابع کربن استفاده کند. *لاکتوکوکوس لاکتیس* از معروف‌ترین جنس‌های متعلق به این خانواده می‌باشد که به صورت سنتی در تهیه فرآورده‌هایی نظیر ماست، پنیر، کره تخمیری و کفیر استفاده می‌شود. ژنوم این باکتری کاملا توالی‌یابی شده، GRAS[1] بوده و فاقد اندوتوکسین است [۱۰].

با افزایش نیاز به منابع انرژی کم هزینه تکنولوژی‌های مختلف در پی حل مشکل کمبود منابع برآمدند. یکی از این راه حل‌ها استفاده از ضایعات کارخانجات مختلف در تولید محصولات مفید و قابل استفاده می باشد. بسیاری از این منابع حاوی ترکیبات مختلف از جمله کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و ... می‌باشند. بنابراین استفاده از ضایعات صنعت غذا برای تولید محصولات با ارزش مانند اسیدهای آمینه راه‌کار مناسبی برای کاهش هزینه‌های تولید و اتلاف منابع غذایی به نظر می‌رسد. از آنجایی که هزینه محیط کشت مناسب جهت تولید متابولیت‌های میکروبی عامل بسیار مهم در فرآیندهای صنعتی می‌باشد، بنابراین استفاده از منابع ارزان‌تر و بهبود بازده تولید محصول با استفاده از بهینه‌سازی شرایط تخمیر امری ضروری می‌باشد [۱۱].

از میان منابع مختلف، منبع کربن مانند لاکتوز، دکستروز، سوکروز، مالتوز، منبع ازت به خصوص گلوتامیک اسید و نمک‌های آن بر تولید گابا موثرتر هستند. در بیشتر پژوهش‌های صورت گرفته از درصدهای مختلف مونوسدیم گلوتامات[2] در محیط کشت‌های مختلف به منظور تولید گابا استفاده شده است [۱۲].

در این پژوهش از باکتری *L. lactis* NZ1330 با پتانسیل پروبیوتیکی جهت تولید اسیدآمینه دارویی گاما آمینو بوتریک اسید استفاده گردید. همچنین به منظور افزایش راندمان تولید از مونوسدیم گلوتامات در فرمولاسیون تخمیر نیز استفاده شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- فعال‌سازی میکروارگانیسم

در پژوهش حاضر به منظور بررسی توانایی تولید گابا از سویه *L. lactis* NZ1330 خریداری شده ازشرکت موبی‌تک موجود در کلکسیون میکروبی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد استفاده شد.

به منظور فعال سازی باکتری لیوفلیزه تحت شرایط استریل زیر هود به محیط کشت استریل M17 Broth انتقال داده شد و در دمای ۳۰ °C به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. میکروارگانیسم فعال شده به سطح محیط کشت M17 آگار حاوی ۱/۵ درصد گلوکز منتقل شد و در همان شرایط قبل گرمخانه‌گذاری شد. از این محیط کشت به‌عنوان محیط ذخیره برای آزمون‌های بعدی استفاده شد [۱۳].

۲-۲- آماده سازی محیط کشت

لجن لبنی ضایعات سپراتور کارخانجات لبنی می‌باشد. سپراتور جداسازی چربی شیر را بر اساس نیروی وزن انجام می‌دهد. شیر ورودی به دستگاه از منافذ تنظیم کننده وارد صفحات سپراتور شده و در اثر نیروی گریز از مرکز گویچه‌های چربی و شیر پس

1. Generally recognized as safe

1. MSG

چرخ جداسازی می‌شوند [١٤]. لجن لبنی مورد استفاده در این پژوهش، از کارخانه پگاه خراسان رضوی تهیه گردید. نمونه‌های لجن لبنی در غلظت‌های ٥، ١٠ و ١٥ درصد آماده سازی شد. pH اولیه در حدود ٦ تنظیم گردید و ٥ min در دمای ٩٠°C به منظور رسوب پروتئین‌های غیر محلول و کاهش بار میکروبی حرارت داده شد. مونوسدیم گلوتامات نیز از شرکت مرک آلمان تهیه شد و در غلظت‌های صفر، ٠/٥ و ١ درصد طبق طرح آماری به محیط کشت اضافه شد. تیمارها در حجم ٥٠ ml آماده سازی شدند و نمونه‌ها به مدت ١٥ min در دمای ١٢١ °C اتوکلاو شدند.

٢-٢- تخمیر و تولید گاما آمینوبوتریک اسید

از سویه *L. lactis* NZ1330 فعال شده میزان ١٠٠ میکرولیتر به فالکون حاوی ٥ ml از محیط کشت آماده شده طبق طرح آماری در pH=٦ انتقال داده شد و در بازه های زمانی مشخص (٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت) در انکوباتور در دمای ٣٢ °C قرار داده شد. نمونه برداری در زمان‌های مذکور انجام شده و تیمار با بالاترین میزان گابا به روش کروماتوگرافی لایه نازک مشخص گردید.

٢-٤- شناسایی گابا به روش کروماتوگرافی لایه نازک

پس از گذشت زمان‌های مشخص شده در طرح آماری، سوپرناتانت با دوری معادل ١٠٠٠٠ rpm در دمای ٤ °C و به مدت زمان ١٠ min سانتریفیوژ شد. آنگاه برای حذف میکروارگانیسم های احتمالی، فاز رویی به وسیله فیلتر ٠/٢٢ µ فیلتر شد. برای ارزیابی تولید گابا از پلیت سیلیکاژل (60 F254) فعال (مرک-آلمان) با ابعاد ٢٠ cm × ٢٠ استفاده شد. بر طبق روش کوک و همکاران (٢٠١٣)، ابتدا پلیت از یک جهت و به فاصله ٢ cm از پایین به طور افقی با مداد خط کشی و با فواصل به طول یک سانتی‌متر نقطه‌گذاری شد. سپس به وسیله لوله موئینه ٢ ماکرولیتر از هر نمونه بر روی پلیت لکه گذاری شد. در این آزمون از محلول‌های گابا خالص و محیط کشت بدون باکتری به طور مجزا به عنوان کنترل استفاده شد [١٥]. کروماتوگرافی لایه نازک با استفاده از حلال‌های بوتانول- اسیداستیک- آب به نسبت‌های ٥: ٣: ٢ حاوی ١/٢ درصد ناینهیدرین[1] به مدت ٩٠ دقیقه انجام شد. عملیات خشک کردن صفحات در دمای ٧٠ به مدت ٨٠ دقیقه صورت گرفت. نقاط به دست آمده از گابا و مونوسدیم‌گلوتامات به راحتی توسط محلول استاندارد آن‌ها تأیید گردید.

٢-٥- کمی سازی باندهای TLC

نقاط حاوی گابا بر صفحات، برش داده شد و به همراه ٧٥ درصد حجمی/حجمی اتانول و ٠/٦ درصد سولفات مس به مدت ٦٠ دقیقه در دمای ٤٠ °C با دور ٥٠ rpm بر همزن مخلوط گردید. جذب هر نمونه در ٥١٢ نانومتر خوانده شد با توجه به جذب‌های خوانده شده توسط محلول حاوی گابا خالص و رسم نمودار و معادله مربوطه، مقدار کمی گابای موجود در عصاره تخمیری نمونه‌ها به دست آمد (از نمونه محلول اتانول و سولفات مس برای صفر کردن اسپکتروفتومتر استفاده شد) [١٦].

٢-٦- طرح آماری

در این پژوهش از روش سطح پاسخ با استفاده از طرح مرکب مرکزی به منظور بهینه سازی متغیرهای مؤثر بر متغیر وابسته (تولید گاما آمینوبوتریک اسید) استفاده شد. در این مطالعه اثر متغیرهای مستقل در سه سطح مورد ارزیابی قرار گرفت. شش نقطه مرکزی برای تخمین خطای آزمایش استفاده شد. میانگین اسید آمینه گاما آمینوبوتریک اسید تولید شده از دو مرتبه تکرار هر آزمایش به عنوان متغیرهای وابسته یا پاسخ در نظر گرفته شد. طرح آماری گزینش شده و رابطه مدل مورد استفاده برای پیش‌بینی، برازش شده و مورد ارزیابی قرار گرفت. مدل مورد استفاده در RSM[2] عموماً رابطه‌ی درجه دوم است. در RSM برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید [١٧].

٣- نتایج و بحث

پتانسیل پروبیوتیکی سویه *L. lactis* NZ1330 توسط وسیعی و همکاران در سال ٢٠١٩ بررسی و اثبات گردید [١٣]. جهت اطمینان از خلوص سویه مورد بررسی نیز رنگ‌آمیزی گرم انجام

1. Ninhydrin
2. Response surface method

شد. در شکل ۱، نمایی از سویه *L. lactis* NZ1330 نشان داده شده است.

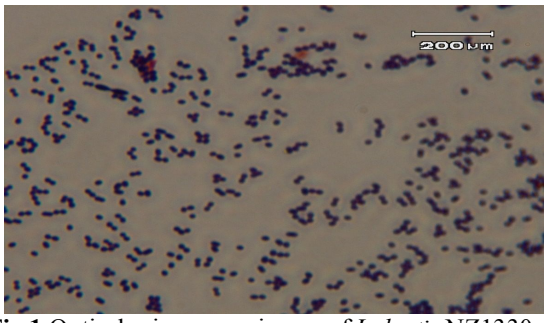

Fig 1 Optical microscope image of *L. lactis* NZ1330.

گاما آمینو بوتیریک اسید مهم‌ترین انتقال دهندهٔ عصبی مهاری در سیستم عصبی مرکزی است و نقش مهمی در هماهنگی شبکه‌های عصبی موضعی و عملکرد نواحی مغزی ایفا می‌کند [۱۸]. انتقال دهندهٔ عصبی GABA در مغز توسط مسیر متابولیکی خاصی به نام GABA shunt ساخته می‌شود و نمی‌تواند از سد خونی-مغزی عبور کند. GABA دارای سه نوع گیرندهٔ GABAA، GABAB و GABAC می‌باشد که به طور کلی در دو گروه یونوتروپیک و متابوتروپیک دسته‌بندی می‌شوند. گیرنده‌های GABAA و GABAC از نوع گیرنده‌های یونوتروپیک هستند که به صورت کانال یونی دریچه‌دار وابسته به لیگاند عمل می‌کنند. با اتصال لیگاند به این گیرنده‌ها، یون کلر وارد سلول عصبی می‌شود، پتانسیل غشای سلول را منفی‌تر می‌کند و در نتیجه مانع از ایجاد پتانسیل عمل جدید می‌شود. گیرنده‌های متابوتروپیک GABAB از طریق پیام بر ثانویه باعث کاهش ورود کلسیم به داخل سلول، افزایش خروج پتاسیم و یا کاهش سطح آدنوزین مونوفسفات[1] حلقوی می‌شوند [۱۹]. تغییرات بیان گیرندهٔ GABA با ترکیب زیر واحد خاصی در نواحی مختلف مغز می‌تواند سبب ایجاد اختلالات عصبی مانند اسکیزوفرنی، صرع، اضطراب، اختلال خواب و اوتیسم شود. مطالعه دیگری که توسط گروه روانپزشکی دانشکده پزشکان و جراحان دانشگاه کلمبیا انجام شد نشان داد که افراد مبتلا به اختلال هراس و سابقه خانوادگی اختلالات خلقی و اضطراب با کاهش غلظت GABA در مغز خود مواجه بودند [۲۰].

باکتری‌های اسید لاکتیک میکروارگانیسم‌های ایمن هستند که برخی از آن‌ها به دلیل داشتن آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز قابل استفاده در فرایند تولید گابا هستند. در پژوهش‌های صورت گرفته مشخص شده است که از بین باکتری‌های اسید لاکتیک لاکتوکوکوس لاکتیس قابلیت تولید گابا را دارد [۲۱]. مسیر کاتابولیسم گلوتامات در LAB توسط یکی از آنزیم‌های آمینوترانسفراز، دهیدروژناز یا دکربوکسیلاز شروع می‌شود. حاصل فعالیت دو آنزیم اول تشکیل آلفا -کتوگلوتارات از گلوتامیک اسید است، درحالی که گابا محصول فعالیت دکربوکسیلازی می باشد. ترکیبات کربوهیدراتی با قرارگیری در چرخه کربس به آلفا کتوگلوتارات و آمونیاک تبدیل شده و سپس در سیتوپلاسم سلول ال گلوتامات تولید می‌شود. ال گلوتامات به دی گلوتامات و در نهایت به پلی‌گلوتامیک اسید تبدیل می‌شود. طی دکربوکسیلاسیون گلوتامیک اسید، گاما آمینوبوتریک اسید تولید می‌شود. تولید گابا در فاز رشد باکتری آغاز شده و نزدیک به فاز سکون به دلیل افزایش فعالیت آنزیم GAD این میزان تولید بیشتر می‌شود. این آنزیم درون سلولی بوده که در پاسخ به شرایط اسیدی تولید می‌شود [۲۲].

تولید گابا در نتیجه ی فرایند تخمیر سوبسترا و فعالیت آنزیم GAD موجود در باکتری لاکتیک اسید صورت می‌گیرد. منابع مورد نیاز باکتری برای تولید گابا شامل منبع اصلی کربن و نیتروژن (گلوتامیک اسید) و عناصر معدنی مانند آمونیوم سولفات، منیزیم سولفات، سدیم استات، منگنز سولفات، فریک سولفات موجب افزایش تولید می‌شوند. pH بهینه تولید ٤ تا ٥ بوده و دمای بهینه ۳۰ °C تا ٤٠ می‌باشد [۲۳]. لی و همکاران (۲۰۱۰)، به شناسایی و معرفی انواع باکتری های لاکتیک اسید تولید کننده گابا پرداختند ومشخص کردند اکثر سویه‌های LAB در محدوده pH ٤ تا ٥ و دمای ۳۰ °C تا ٥٠ و در حضور گلوتامیک اسید، بالاترین میزان بازدهی تولید گابا را داشته‌اند [۲٤]. اسکندری و همکاران (۱۳۹۵)، از لجن لبنی به عنوان محیط کشت برای بهینه سازی تولید اگزو پلی ساکارید توسط *Rhizobium radiobacter* استفاده کردند. متغیرها در این طرح درصد لجن لبنی غلظت کربنات کلسیم و زمان گرمخانه گذاری بوده و به عنوان پاسخ درصد تولید متابولیت و توده سلولی مورد بررسی قرار گرفت [۲۵]. کیم و همکاران در سال ۲۰۰۷ میزان گابای

1. Cyclic adenosine monophosphate

تولیدی در شیر سویای تخمیر شده را ppm ٤٢٦/٦٧ گزارش کردند. همچنین میزان ppm ۹۷/۷۹ گابا طی تخمیر توسط *Lactobacillus acidophilus* ،*Bifidobacterium lactis* و *Streptococcus thermophilus* گزارش شده‌است که علت آن به وجود منبع کربن مناسب به همراه منبع ازت (پروتئین سویا) می‌باشد [٢٦].

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 کارایی 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 [۲۷]. با کمک این روش ضمن اینکه آنالیز در زمان کوتاهی انجام شد، گاما آمینو بوتریک اسید با وضوح خوب و حساسیت بالا جدا شد. در شکل ۲، نمایی از کروماتوگرافی لایه نازک جهت تایید تولید گابا نشان داده شده است.

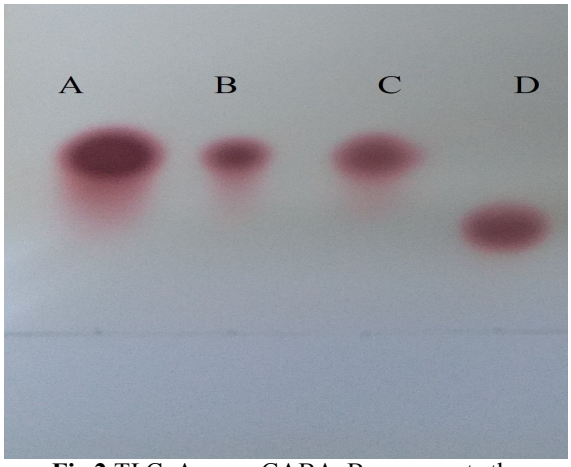

Fig 2 TLC, A: pure GABA, B: represents the production of GABA, C: Optimized software treatment, D: monosodium glutamate.

نتایج آنالیز واریانس[1] تولید گابا در جدول ۱، آورده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود، تأثیر مدل پیشنهادی توسط نرم‌افزار برای تولید گابا معنی‌دار بود. مقادیر بالای F-value و P-value پایین ($p<۰/۰۰۰۱$) نشان می‌دهد که مدل پیشنهادی معنی‌دار است و بیش از ۹۷ درصد (R^2= ۹۷/۰۵٪) تولید گابا می‌تواند با مدل کنونی توضیح داده شود.

Table 1 Statistical analysis production of GABA

Std. Dev.	4.02	R^2	0.9934
Mean	343.97	Adjusted R^2	0.9904
C.V. %	1.17	Predicted R^2	0.9843
		Adeq Precision	62.6528

روش سطح پاسخ مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است و در بهینه سازی فرایندهایی به کار می‌رود که پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تأثیر قرار می‌گیرد. به دلیل اینکه در این پژوهش بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورها مدنظر بود، از این رو طرح آماری سطح پاسخ انتخاب شد. همچنین ارتباط بین متغیرها و پاسخ به دست آمده (میزان گابا) در معادله ۱ (جدول ۲) آورده شده است. در معادله ۱، A، B و C اثرات خطی، A^2، B^2 و C^2 اثرات مربعات و AC، BC و AB اثرات متقابل است.

Table 2: Final equation in terms of coded factors (equation 1)

GABA	=
+368.02	
+36.65	A
+17.55	B
+18.45	C
-0.6875	AB
-8.44	AC
+2.44	BC
-19.53	A^2
-23.53	B^2
+6.97	C^2

نتایج آنالیز آماری تأثیر متقابل سه متغیر درصدهای مختلف لجن لبنی و MSG در سه بازه زمانی بر تولید گابا نشان داد که اثر متقابل این دو متغیر تأثیر معنی‌داری بر گابا تولید شده دارد. شکل ۳، نشان می‌دهد که با افزایش درصدهای مختلف لجن لبنی تولید گابا با شیب ملایمی افزایش یافت؛ و به دنبال آن با افزایش درصد لجن لبنی تا حدود ١٤ درصد روند افزایش تولید گابا بیشتر بود که به دلیل تاثیر منبع کربن بر افزای بازده تخمیر می‌باشد.

با افزایش غلظت مونوسدیم گلوتامات در محیط تخمیر شدت تولید گابا افزایش یافت که با نتایج وو و همکاران (۲۰۱۵)، همخوانی داشت [۲۸]. این نتایج در مطالعه ژانگ و همکاران (۲۰۱۵)، نیز مشاهد شد. افزایش تولید گابا در اثر افزایش غلظت

1. Analysis of variance

سدیم گلوتامات در برخی سویه‌های LAB نیز مشاهده شده است [۲۹]. همچنین چانگ و همکاران (۲۰۱۰)، بیان کردند که فعالیت این آنزیم با افزایش گلوتامیک اسید افزایش یافته و این عامل مهمی در افزایش تولید گابا می‌باشد [۳۰]. کو و همکاران (۲۰۱۳)، نیز تولید مقادیر بیشتر گابا در شیر سویا و شیر سویای سیاه نسبت به سویای قرمز را به دلیل وجود مقادیر بالاتر گلوتامیک اسید در این دو نوع پروتئین نسبت دادند [۳۱].

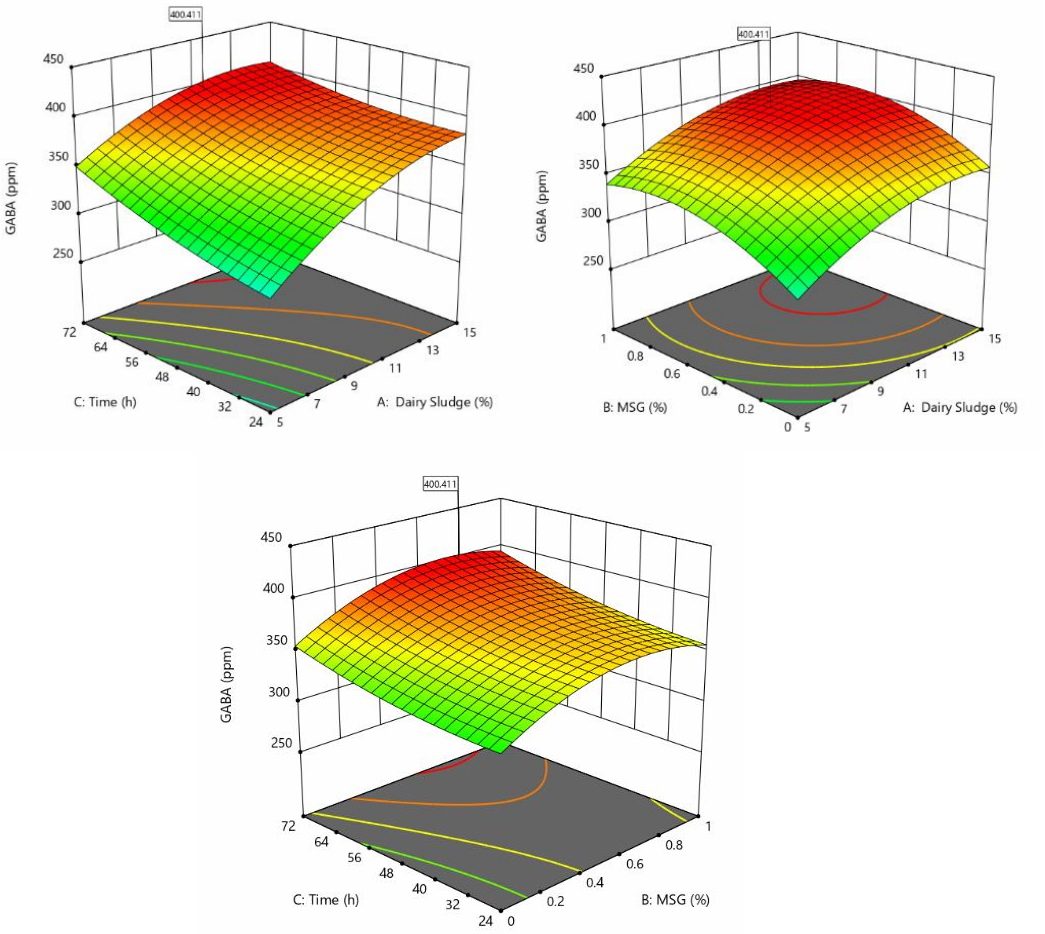

Fig 3 Three-dimensional images of the effects of variables on GABAergic production.

همان طور که در شکل ۳، مشاهده می‌شود در غلظت لجن لبنی پایین، میزان راندمان به طور قابل‌توجهی پایین می‌باشد در حالی که با افزایش غلظت لجن لبنی، سبب افزایش تولید شد به گونه‌ای که حداکثر تولید در این حالت در زمان تخمیر (۷۰ ساعت) مشاهده شد. در این حالت فاز تولید طولانی گردید و تولید آن با افزایش درصد لجن لبنی بهبود یافت. با توجه به اینکه لجن لبنی انرژی و جزء اصلی برای تولید را فراهم می‌نماید، به نظر می‌رسد تولید بالاتر با افزایش درصد لجن لبنی به مصرف لجن لبنی در بخش بعدی از کشت (فاز سکون) مرتبط می‌باشد [۳۲].

منبع کربن به دلیل اثر مستقیم آن بر بازده تولید، ترکیبات، ساختار و ویژگی‌های باکتریایی، مهم‌ترین ترکیب محیط کشت مورد استفاده برای تولید متابولیت میکروبی است. لاکتوز کربوهیدرات اصلی موجود در لجن لبنی است که اصلی‌ترین عامل مغذی برای رشد و تولید است و به‌عنوان منبع کربن جایگزین جهت رشد و تولید می‌باشد. به نظر می‌رسد علت اثر منبع کربن بر تولید، نیازمندی زیاد سویه به منبع کربن می‌باشد. کوک و همکاران

(۲۰۱٤)، با مقایسه منابع مختلف تولید کننده گابا به این نتیجه رسیدند که استفاده از دانه سویا و مونو سدیم گلوتامات و کربوهیدرات‌هایی مثل (گلوکوز، مانوز و لاکتوز) به عنوان محیط پایه برای رشد LAB منجر به تولید میزان بالای گابا می‌شود. در این طرح برای آنالیز تولید گابا از روش کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد [۳۳]. شن و وانگ (۲۰۱۰)، تاثیر ترکیبات محیط کشت را بر رشد باکتری LAB بررسی کردند. بیشترین میزان تولید در محیط کشت حاوی منبع کربن (ملاس)، مونو سدیم گلوتامات ۵ درصد و سولفات منیزیوم بوده و میزان تولید در ٦۰ ساعت تخمیر و pH اولیه ۵/۵ در دمای°C ۳۲ حدود ppm ٤۰ بود [۳٤].

براساس نتایج به دست آمده لجن لبنی محیط مناسبی جهت رشد باکتری بوده که می‌توان از آن در کشت‌های تخمیری نیز استفاده نمود. لاکتوز ترکیب عمده موجود در لجن لبنی است که اصلی‌ترین عامل مغذی برای رشد سلول باکتری بوده است. بنابراین این ترکیب می‌تواند به عنوان محیط کشت پایه جهت رشد و تولید متابولیت سویه مورد استفاده قرار گیرد. اسکندری و همکاران (۱۳۹۵)، از لجن لبنی برای رشد *R. radiobacter* استفاده کردند و تولید اگزوپلی ساکارید را در این محیط کشت بررسی کردند. میزان استفاده از لجن لبنی برای رشد باکتری ۵۰ درصد بود. در پژوهش فلاح و همکاران در سال ۱۳۹۸ نیز با ۱٤ درصد پودر لجن لبنی در محیط کشت مخلوط حدود ٤۰۰ ppm گابا تولید شد. ماکزیمم تولید اسید آمینه در فاز لگاریتمی رشد سلولی مشاهده می شود. بعد از آن باکتری وارد فاز سکون شده و میزان تولید کمتر می شود. محدودیت کربن، نیتروژن، فسفات و اکسیژن از عوامل مؤثر بر تبدیل منبع کربن به اسید آمینه است. هرچه نسبت کربن به نیتروژن کمتر باش تجزیه سوبسترا بیشتر صورت می‌گیرد. لاکرو و همکاران (۲۰۱۳)، لجن لبنی را به‌عنوان یک محیط کشت جایگزین برای رشد *Rhizobium* مورد بررسی قرار دادند. حداکثر رشد همه سویه‌ها در غلظت لجن‌لبنی ٦۵ درصد مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست آمده این پژوهشگران بیان کردند، لجن لبنی شامل کازئین، لاکتوز، چربی، فسفر، نیتروژن، پتاسیم و مواد آلی می‌باشد و نسبت به ملاس و لجن فاضلاب که قبلاً برای رشد *ریزوبیوم* استفاده شده بود، دارای سطح پایین‌تری از فلزات و ترکیبات مضر است.

افزودنی اصلی اضافه شده به محیط به‌منظور تولید بیشتر گابا شامل مونوسدیم گلوتامات می‌باشد. گلوتامات در لاکتیک-اسیدباکتری‌ها به وسیلهٔ آنزیم گلوتامیک‌اسیددکربوکسیلاز به گابا تبدیل می‌شود. بنابراین لازم است این ترکیب به‌منظور افزایش تولید گابا به محیط یا مادهٔغذایی افزوده شود. با این حال، مقادیر بسیار بالای گلوتامیک‌اسید به دلیل افزایش بیش از حد فشار اسمزی، منجر به توقف متابولیسم باکتری و کاهش تولید گابا می‌گردد. همچنین زمان استفاده از این افزودنی در طول تخمیر بر میزان گابای تولیدی مؤثر می‌باشد و براساس گزارش‌های مختلف مشخص شده است که بهترین زمان استفاده از آن در ابتدای تخمیر (زمان صفر) می‌باشد [۳۵]. طبق گزارش لی و همکاران (۲۰۱٦)، افزایش مونوسدیم‌گلوتامات بین صفر تا ٤/۵ درصد منجر به تولید صفر تا ۲۷۰ میلی‌مول گابا شد. بنابراین، در این پژوهش از درصدهای صفر، ۰/۵ و ۱ درصد مونوسدیم گلوتامات استفاده گردید. ساخت گابا در باکتری‌های اسید لاکتیک 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 لاکتیک القا می‌شود و تنها بر گلوتامات به عنوان سوبسترا واکنش انجام می‌دهد و در طی این فرآیند آن را به گابا و دی اکسید کربن تبدیل می‌کند. گلوتامات به عنوان سوبسترای 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 [۳٦].

زمان تخمیر عامل دیگری است که نقش کلیدی در تولید گابا دارد. نتایج شکل ۳، نشان می‌دهد که با افزایش زمان تخمیر از ۲٤ ساعت به ۷۲ ساعت میزان گابای تولیدی نیز افزایش یافت. این امر می‌تواند به‌دلیل افزایش تعداد باکتری و افزایش بازده تبدیل مونوسدیم‌گلوتامات به گابا باشد. نتایج مطالعه حاضر با پژوهش کیم و همکاران (۲۰۱۷)، مطابقت داشت. فلاح و همکاران (۱۳۹۸)، گزارش کردند که در زمان ۱۲۰ ساعت تخمیر در محیط کشت حاوی لجن لبنی بیشترین میزان گابا تولید می‌شود.

دمای گرمخانه‌گذاری عامل مهمی در تولید بیشترین میزان گابا می‌باشد. علاوه بر ثبات و فعالیت بیولوژیکی آنزیم، دما بر تعادل ترمودینامیکی واکنش نیز مؤثر می‌باشد. بیشترین میزان تبدیل

گلوتامات به گابا نیازمند بیشترین تراکم سلولی و دمای مناسب محیط.گزارش شده است که در دمای ۲۵-۴۰ °C بیشترین میزان گابا تولید می‌گردد. بنابراین در تمام مراحل این پژوهش از دمای ۳۲ °C استفاده شد.

نتایج فرآیند بهینه سازی نشان داد حداکثر تولید گابا ppm ۴۰۰ بوده که ازشرایط بهینه ۱۱/۲درصد لجن لبنی،۰/۷ درصد مونوسدیم گلوتامات و زمان ۷۰ ساعت تخمیر در دمای ۳۲ °C به دست آمد.

٤- نتیجه گیری

در این پژوهش، مشخص شد که روش سطح پاسخ می‌تواند برای یافتن شرایط بهینه سامانه، با در نظر گرفتن متغیرهای مؤثر بر پاسخ به کار رود. تولید بسیاری از اسیدهای آمینه با روش‌های مختلف شیمیایی، آنزیمی و ... هزینه‌بر بوده بنابراین در صورت استفاده از مواد خام ارزان قیمت به روش بیولوژیکی، می‌توان هزینه تولید را تا حد زیادی کاهش داد. به دلیل ماهیت بیولوژیکی گابای تولید شده در این پژوهش و استفاده از سویه پروبیوتیکی جدید می‌توان با خالص‌سازی این اسیدآمینه زمینه را برای جایگزینی با نوع شیمیایی در داروسازی فراهم نمود. علاوه بر این استفاده منطقی از پسماند صنعتی می‌تواند به کاهش اثرات زیست محیطی ناشی از صنایع لبنی کمک می‌کند.

٥- تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی مصوب با کد ٤٩٦٥١ در دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

٦- منابع

[1] Lener MS, Niciu MJ, Ballard ED, Park M, Park LT, Nugent AC. Glutamate and gamma-aminobutyric acid systems in the pathophysiology of major depression and antidepressant response to ketamine. Biological Psychiatry. 2017; 81(10): 886-897.

[2] Castroviejo A, Rosenstein RE, Romeo H, Cardinali D. Changes in gamma-aminobutyric acid high affinity binding to cerebral cortex membranes after pinealectomy or melatonin administration to rats. Neuroendocrinology. 1986; 43(1): 24-31.

[3] Cui B, Su D, Li W, She X, Zhang M, Wang R. Effects of chronic noise exposure on the microbiome-gut-brain axis in senescence-accelerated prone mice: implications for Alzheimer's disease. Journal of Neuroinflammation. 2018; 15(190):1-15.

[4] Thomas P, Phillips J, Delanty N, O'Connor W. Elevated extracellular levels of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid within the intraoperative, spontaneously epileptiform human hippocampus. Epilepsy Research. 2003; 54(1): 73-79.

[5] Rashidi A, Ahmadi S. Subunits of gamma-aminobutyric acid receptors and their roles in neuropsychological disorders. Shefaye Khatam. 2014; 2(2):70-80.

[6] Falah F. Evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus brevis* and optimization of gamma amino butyric acid production by this strain in dairy sludge base medium. Mashhad: Ferdowsi University Of Mashhad; 2019.

[7] Vasiee A, Yazdi TF, Mortazavi A, Edalatian M. Isolation, identification and characterization of probiotic Lactobacilli spp. from Tarkhineh. International Food Research Journal. 2014; 21(6): 2487-2492.

[8] Vasiee A, Alizadeh Behbahani B, Yazdi FT, Mortazavi SA, Noorbakhsh H. Diversity and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from horreh, a traditional Iranian fermented food. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2018;10(2):258-268.

[9] Tabatabaei Yazdi F, Vasiee A.R., Alizadeh Behbahani B, Mortazavi S.A. Diversity of lactic acid bacteria isolated from yellow zabol kashk using 16S rRNA gene sequence analysis. Journa of Food Science and Technology. 2016; 13(59): 25-36. (full text in Persian).

[10] Song AA-L, In LL, Lim SHE, Rahim RA. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. Microbial Cell Factories. 2017;16(55): 1-15.

[11] Zhang Y, Wang XC, Cheng Z, Li Y, Tang

821.
[21] Diana M, Quílez J, Rafecas M. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. Journal of Functional Foods. 2014; 10:407-420.
[22] Lu X, Chen Z, Gu Z, Han Y. Isolation of γ-aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. Biochemical Engineering Journal. 2008; 41(1):48-52.
[23] Tamura T, Noda M, Ozaki M, Maruyama M, Matoba Y, Kumagai T. Establishment of an efficient fermentation system of gamma-aminobutyric acid by a lactic acid bacterium, Enterococcus avium G-15, isolated from carrot leaves. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2010; 33(10):1673-1679.
[24. Li H, Qiu T, Gao D, Cao Y. Medium optimization for production of gamma-aminobutyric acid by Lactobacillus brevis NCL912. Amino Acids. 2010; 38(5):1439-1445.
[25] Eskandari Elham MSA, Kozaki Arash, Tabatabai Farideh. Optimization of Exopolysaccharide Production by *Rhizubium radiobacter* PTCC 1654 in Dairy Sludge Using Response Surface Methodology. Journa of Food Science and Technology. 2018;15(81): 201-215. (full text in Persian).
[26] Kim T-J, Sung C-H, Kim Y-J, Jung B-M, Kim E-R, Choi W-S. Effects of a soaking-fermentation-drying process on the isoflavone and gamma aminobutyric acid contents of soybean. Food Science and Biotechnology. 2007;16(1):83-89.
[27] Han S-m, Jeon S-J, Lee H-B, Lee J-s. Screening of γ-aminobutyric acid (GABA)-producing wild yeasts and their microbiological characteristics. The Korean Journal of Mycology. 2016; 44(2):87-93.
[28] Jung WY, Kim SG, Kim HK, Lee JS, Han SI, Choe S. Effect of GABA Extract of Black Sticky Rice with Giant Embryo on Alcohol□Related Indices After Acute Alcohol Intake in Social Drinkers. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 2015;39(7):1212-1218.
[29] Lee H-L, Kang K-W, Seo D-H, Jung J-H, Jung D-H, Kim G-W, et al. Diversity of lactic acid bacteria (LAB) in makgeolli and their production of γ-aminobutyric acid. Korean J. Effect of fermentation liquid from food waste as a carbon source for enhancing denitrification in wastewater treatment. Chemosphere. 2016;144:689-696.
[12] Zhuang K, Jiang Y, Feng X, Li L, Dang F, Zhang W. Transcriptomic response to GABA-producing *Lactobacillus plantarum* CGMCC 1.2437 T induced by L-MSG. PloS one. 2018;13(6):e0199021.
[13] Vasiee A, Mortazavi SA, Sankian M, Yazdi FT, Mahmoudi M, Shahidi F. Antagonistic activity of recombinant *Lactococcus lactis* NZ1330 on the adhesion properties of Escherichia coli causing urinary tract infection. Microbial Pathogenesis. 2019; 133:103547.
[14] Yadav SK, Juwarkar AA, Kumar GP, Thawale PR, Singh SK, Chakrabarti T. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by Jatropha curcas L.: impact of dairy sludge and biofertilizer. Bioresource Technology. 2009;100(20):4616-4622.
[15] Kook M-C, Cho S-C. Production of GABA (gamma amino butyric acid) by lactic acid bacteria. Korean Journal for Food Science of Animal Resources. 2013;33(3):377-389.
16. Sethi ML. Enzyme inhibition X: colorimetric method for determining gabase activity and its comparison with a spectrophotometric method. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 1993;11(7):613-617.
[17] Jo M-H, Hong S-J, Lee H-N, Ju J-H, Park B-R, Lee J-h. Gamma-Aminobutyric Acid Production from a Novel Enterococcus avium JS-N6B4 Strain Isolated from Edible Insects. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2019; 29(6): 933-943.
[18] Casalia ML, Howard MA, Baraban SC. Persistent seizure control in epileptic mice transplanted with gamma□aminobutyric acid progenitors. Annals of Neurology. 2017;82(4):530-542.
[19] Harris RA, Allan AM. Functional coupling of gamma-aminobutyric acid receptors to chloride channels in brain membranes. Science. 1985; 228(4703):1108-1110.
[20] Mann JJ, Oquendo MA, Watson KT, Boldrini M, Malone KM, Ellis SP, et al. Anxiety in major depression and cerebrospinal fluid free gamma□aminobutyric acid. Depression and Anxiety. 2014; 31(10):814-

Journal of Food Science and Technology. 2015;47(2):204-210.

[30] Chong W, Jianxin L. Preparation and Stability of Rumen Protected γ-aminobutyric Acid [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition. 2010;5.

[31] Ko CY, Lin H-TV, Tsai GJ. Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by Lactobacillus brevis FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model. Process Biochemistry. 2013;48(4):559-568.

[32] Lacroix N, St-Gelais D, Champagne C, Vuillemard J. Gamma-aminobutyric acid-producing abilities of lactococcal strains isolated from old-style cheese starters. Dairy Science & Technology. 2013;93(3):315-327.

[33] Kook M-C, Cho S-C, Kang J, Song Y, Park H. Effect of gamma-aminobutyric acid produced by Lactobacillus sakei B2-16 on diet and exercise in high fat diet-induced obese rats. Food Science and Biotechnology. 2014;23(6):1965-1970.

[34] Wang HK, Dong C, Chen YF, Cui LM, Zhang HP. A new probiotic cheddar cheese with high ACE-inhibitory activity and γ-aminobutyric acid content produced with koumiss-derived Lactobacillus casei Zhang. Food Technology and Biotechnology. 2010;48(1):62-70.

[35] Zareie Z, Yazdi FT, Mortazavi SA. Optimization of gamma-aminobutyric acid production in a model system containing soy protein and inulin by Lactobacillus brevis fermentation. Journal of Food Measurement and Characterization. 2019; 13:2626-2636.

[36] Lee H-S, Kwon S-Y, Lee S-O, Lee S-P. Production of fermented Omija (Schizandra chinensis) beverage fortified with high content of gamma-amino butyric acid using Lactobacillus plantarum. Korean Journal of Food Preservation. 2016; 23(3):326-334.

Gamma aminobutyric acid synthesis by *Lactococcus lactis* NZ1330 in dairy sludge medium with monosodium glutamate

Alizadeh Behbahani, B. [1], Falah, F. [2], Vasiee, A. [3], Tabatabaei Yazdi, F. [4*], Mortazavi, S. A. [4], Afsharian, Sh.[5]

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
2. Ph.D Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Ph.D graduate, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
5. MSc graduate, Food Microbiology Laboratory, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(Received: 2019/11/12 Accepted:2020/01/25)

Gamma Aminobutyric Acid (GABA) is a bioactive molecule with different physiological roles in the body that inhibits neuronal stimulation and inhibits the delivery of stress-containing messages, has a calming effect and is used to treat diseases. Different has an effective role. In the present study, the possibility of producing this amino acid by *Lactococcus lactis* NZ1330 was investigated. In order to optimize the fermentation process three levels of dairy sludge (5, 10 and 15%), monosodium glutamate (0, 0.5 and 1%) were selected at 24, 48 and 72 hours after fermentation. The presence of GABA in the culture medium was investigated by thin layer chromatography. Spectrophotometric method was used to quantify the bands present in thin-layer chromatography. Optimization results at 95% significance level showed that the optimum treatment consisted of medium containing 11.2% dairy sludge, 0.7% monosodium glutamate and 70 hours fermentation at 32 °C and under these conditions, GABA production was ppm. It's 400. Therefore, this combination of media can be used as a suitable substrate for the production of valuable GABA drug and bioactive compounds.

Keywords: GABA, *Lactococcus lactis*, Dairy sludge, Monosodium glutamate.

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