مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

شناسایی گاما آمینوبوتیریک اسید تولیدشده توسط باکتری *Lactobacillus brevis* PML1 به روش کروماتوگرافی لایه‌نازک در محیط کشت حاوی مونوسدیم گلوتامات (MSG)

عاطفه غفوریان نسب[۱]، سید علی مرتضوی[۲]*، فریده طباطبایی یزدی[۲]، محبوبه سرابی جماب[۳]

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

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

۳- دانشیار گروه بیوتکنولوژی صنایع غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳

کلمات کلیدی:

گاما آمینوبوتیریک اسید،

Lactobacillus brevis

MSG،

کروماتوگرافی لایه‌نازک.

DOI: 10.52547/fsct.18.120.29

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.120.26.8

* مسئول مکاتبات:

morteza@um.ac.ir

چکیده

گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا) یک ترکیب زیست فعال غیر پروتئینی است که در مهار بسیاری از بیماری‌ها ازجمله آلزایمر، فشارخون، استرس و ... می‌تواند مؤثر واقع شود. محرک اصلی برای تولید گابا، آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD) است که این آنزیم در باکتری‌های اسیدلاکتیک، فعالیت بالایی دارد. همچنین حضور مونوسدیم گلوتامات(MSG)، می‌تواند برای این آنزیم به عنوان سوبسترا عمل کرده و فعالیت آن را تشدید نماید. در این پژوهش پتانسیل تولید گاما آمینوبوتیریک اسید توسط باکتری *Lactobacillus brevis* PML1 در محیط کشت MRS بررسی شد. به‌منظور بهینه‌سازی فرآیند تخمیر، محیط کشت حاوی MSG (۱، ۳ و ۵ درصد) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت و پس از تخمیر، جهت شناسایی گابا تولیدشده توسط باکتری از روش کروماتوگرافی لایه‌نازک استفاده شد. برای کمی سازی باندهای موجود در کروماتوگرافی لایه‌نازک، روش اسپکتروفوتومتری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی‌ها در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد نشان داد تیمار بهینه شامل محیط کشت حاوی ۵ درصد مونوسدیم گلوتامات و زمان ۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C بوده و در این شرایط میزان تولید گابا تقریباً ۳۰۰ ppm گزارش شد؛ بنابراین سویه موردنظر نه‌تنها در شرایط معمولی (نمونه کنترل) پتانسیل تولید گاما آمینوبوتیریک اسید را دارد بلکه با افزودن درصدهای مختلف مونوسدیم گلوتامات به محیط کشت نیز می‌توان مقدار این تولید را افزایش داد.

۱- مقدمه

گاما آمینوبوتیریک اسید[1](GABA) یک آمینواسید غیر پروتئینی است که پس از تولید، به گیرنده‌های ویژه خود در سلول‌های عصبی متصل می‌شود و با جلوگیری از انتقال بعضی پیام‌های عصبی، در ایجاد آرامش، درمان بی‌خوابی، مهار افسردگی، کنترل فشارخون، پیشگیری از آلزایمر، مهار MS و ... می‌تواند مؤثر باشد. اخیراً مشخص‌شده است که گابا روی پوست نیز اثرگذار است و علاوه بر دارا بودن خاصیت ضدالتهابی و التیام زخم‌های پوستی [۱]، می‌تواند به‌عنوان یک عنصر فعال در مواد اولیه لوازم‌آرایشی مورداستفاده قرار گیرد [۲]. گابا به‌صورت طبیعی در منابع گیاهی ازجمله غلات، برخی میوه‌ها، جوانه برنج، چای سبز، حبوبات و ... به میزان کمی وجود دارد. همچنین در انسان توسط دو ایزو فرم 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. این ترکیب به‌صورت شیمیایی نیز در دسترس هست ولی به دلیل عوارض ایجادشده توسط نوع شیمیایی گابا به تولید بیولوژیکی آن روی آورده شده است. امروزه محققان روی باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان یک روش زیستی برای تولید گابا متمرکزشده‌اند. باکتری‌های اسیدلاکتیک، ازجمله مهم‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک هستند که می‌توانند برای سلامتی مفید واقع شوند. این باکتری‌ها علاوه بر ایمن بودن، دارای آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز[2] (GAD) می‌باشند. در بین باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا، *لاکتوباسیلوس*‌ها و در بین *لاکتوباسیلوس*‌ها می‌توان از سویه *Lactobacillus brevis* برای تولید گاما آمینوبوتیریک اسید استفاده کرد [۳]. *Lactobacillus brevis* یک باکتری گرم مثبت و ایمن است که به‌عنوان یک‌سویه پروبیوتیک، به‌طور گسترده‌ای در تولید غذاهای تخمیری کاربرد دارد. همچنین از میان منابع مختلف، منابع ازت به‌خصوص مونوسدیم گلوتامات بر تولید گابا مؤثرتر هستند [٤]. GAD یک آنزیم منحصربه‌فرد است که جداسازی گروه کربوکسیل از گلوتامات را کاتالیز و آن را به فرم گابا تبدیل می‌کند [٥] و موجب تبدیل غیرقابل‌برگشت L- گلوتامات به گابا می‌شود [٦]. به همین دلیل برای تولید گابا، مقادیر بالای گلوتامیک اسید به‌عنوان سوبسترا موردنیاز است که می‌توان از مونوسدیم گلوتامات (MSG) بدین منظور استفاده کرد.

در این پژوهش از باکتری *Lactobacillus brevis* PML1 جدا شده از ترخینه جهت تولید ترکیب زیست فعال گاما آمینوبوتیریک اسید استفاده گردید. ترخینه محصول تخمیری بر پایه غلات بوده که به‌عنوان میان وعده در برخی کشورها مانند ترکیه، عراق، یونان و... با نام های مختلف وجود دارد. در ایران محصول اصلی استان‌های غربی کشور ازجمله کرمانشاه بوده که سویه مورد استفاده در این پژوهش نیز توسط [۷]، از ترخینه این استان جداسازی و شناسایی‌شده است. ترخینه منبع بسیار خوبی از پروتئین، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و مواد معدنی است. همچنین به‌منظور افزایش راندمان تولید از درصدهای مختلف مونوسدیم گلوتامات در فرمولاسیون تخمیر استفاده شد.

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر حضور درصدهای مختلف مونوسدیم گلوتامات موجود در محیط کشت MRS broth بر میزان گابا تولیدشده توسط باکتری *Lactobacillus brevis* PML1 به کمک روش کروماتوگرافی لایه‌نازک(TLC) است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- فعال‌سازی میکروارگانیسم

در پژوهش حاضر به‌منظور بررسی توانایی تولید گابا از سویه *Lactobacillus brevis* PML1 موجود در کلکسیون میکروبی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران استفاده شد. برای فعال‌سازی، باکتری لیوفیلیزه تحت شرایط استریل و زیر هود به محیط کشت استریل MRS broth انتقال داده شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری گردید.

1. Gamma AminoButyric Acid
2. Glutamic Acid Decarboxylase

۲-۲-آماده‌سازی نمونه‌ها

سوسپانسیون سویه *Lactobacillus brevis* PML1 فعال‌شده، بر اساس نیم مک فارلند تهیه گردید و میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون به هرکدام از فالکون‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت استریل MRS broth با غلظت‌های متفاوت مونوسدیم گلوتامات (۱، ۳ و ۵ درصد) تهیه‌شده از شرکت مرک آلمان، افزوده شد و در بازه‌های زمانی مشخص (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) در دمای ۳۷°C قرار داده شد. یک نمونه نیز به‌عنوان نمونه کنترل (فاقد MSG) در نظر گرفته شد و تیمار با بالاترین میزان تولید گابا به روش کروماتوگرافی لایه‌نازک مشخص گردید.

۲-۳-شناسایی گابا به روش کروماتوگرافی لایه‌نازک

بعد از انجام عمل تخمیر به‌منظور بررسی مقدارگابای تولیدشده، سوسپانسیون‌های موردنظر سانترفیوژ شده (۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) و از سوپرناتانت آن برای تشخیص گابای تولیدشده استفاده شد. به‌منظور ارزیابی میزان تولید گابا به روش کروماتوگرافی لایه‌نازک، از پلیت سیلیکا ژل (60 F254) فعال (مرک-آلمان) به‌عنوان فاز ثابت و از حلال مخصوص گابا (استیک اسید، بوتانول، آب مقطر) و همچنین گابای خالص به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد[۲]. بعد از آماده‌سازی نمونه‌ها، به‌وسیله لوله موئینه ۲ میکرو لیتر از هر نمونه روی صفحه پلیت با فاصله ۲ سانتی‌متر نقطه‌گذاری صورت گرفت. سپس صفحه داخل تانک دستگاه که حاوی حلال مخصوص هست، قرار داده شد. هنگامی‌که سطح حلال روی صفحه به ارتفاع مشخص رسید صفحه را خارج کرده و عملیات خشک‌کردن صفحات در آون ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸۰ دقیقه صورت گرفت. درنهایت با کمک محلول نایهیدرین آشکارسازی با توجه به نمونه شاهد به‌طور کیفی انجام گرفت.

۲-۴-کمی سازی باندهای TLC

نقاط حاوی گابا بر صفحات TLC، خراشیده شد و همراه ۷۵ درصد حجمی-حجمی اتانول و ۰/۶ درصد سولفات مس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۰°C با دور ۵۰۰۰ دور دقیقه در انکوباتور شیکردار مخلوط گردید. بعد از ۶۰ دقیقه، جذب هر نمونه به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتری در ۵۱۲ نانومتر خوانده شد (از محلول اتانول و سولفات مس به‌منظور صفر کردن اسپکتروفوتومتر استفاده شد). با توجه به جذب‌های به‌دست‌آمده توسط محلول حاوی گابا خالص و رسم نمودار و معادله مربوطه، مقدار کمی گابا موجود در هر نمونه به دست آمد[۸].

۲-۵-طرح آماری

در این پژوهش از روش سطح پاسخ با استفاده از طرح مرکب مرکزی به‌منظور بهینه‌سازی متغیرهای مؤثر بر متغیر وابسته (تولید گاما آمینوبوتریک اسید) استفاده شد. میانگین تولید اسیدآمینه گاما آمینوبوتریک اسید از دومرتبه تکرار هر آزمایش به‌عنوان متغیرهای وابسته یا پاسخ در نظر گرفته شد. طرح آماری گزینش‌شده و رابطه مدل مورداستفاده برای پیش‌بینی، برازش شده و مورد ارزیابی قرار گرفت. در RSM برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر هر متغیر جداگانه بیان می‌کند[۹].

۳- نتایج و بحث

گاما آمینوبوتیریک اسید یک اسیدآمینه طبیعی است که در اثر تغییرات گلوتامین به وجود می‌آید و در مغز به‌عنوان یک نوروترنسمیتر عمل می‌کند. نوروترنسمیترها پیام‌رسان‌های شیمیایی هستند که در انتقال پیام‌های عصبی در مغز فعالیت می‌کنند. گابا در دسته نوروترنسمیتر های بازدارنده است که در پیشگیری و بازدارندگی بعضی از پیام‌های مغزی و کاهش فعالیت سیستم عصبی نقش دارد. با اتصال گابا به پروتئین گیرنده گابا در مغز، اثر آرام‌بخشی گابا مشاهده می‌شود که می‌تواند در کنترل احساس اضطراب، استرس، ترس و در بعضی موارد در بهبود تشنج نیز مؤثر باشد به همین دلیل هدف این پژوهش افزایش میزان تولید گابا است [۱]. توانایی تولید گابا به‌طور گسترده‌ای در میان سویه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک متفاوت است و به‌طور قابل‌توجهی تحت تأثیر شرایط محیط کشت، شرایط رشد

باکتری، تنش‌های واردشده به باکتری و ... قرار دارد؛ بنابراین بهینه‌سازی شرایط برای افزایش میزان تولید گابا مهم است. ایجاد شرایط بهینه برای تولید گابا به عوامل کلیدی مانند منابع کربن، گلوتامات، دما، pH، کوآنزیم پیرودکسال ۵-فسفات بستگی دارد که در میان این‌ها، pH، دما و غلظت گلوتامات به‌عنوان رایج‌ترین و مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار برای همه گونه‌ها در نظر گرفته می‌شود [۱۰]. منابع موردنیاز 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 ۵ بوده و دمای بهینه نیز ۳۰ تا ٤۰ درجه سانتی‌گراد است[۱۱].

تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که باکتری‌های اسیدلاکتیک پتانسیل تولید گابا را دارند و می‌توانند در افزایش میزان تولید این ترکیب زیست فعال، مؤثر واقع شوند که این پتانسیل توسط [۱۲] بررسی و اثبات گردید. این محققان اثر دو شرایط مختلف را بر میزان تولید گابا توسط باکتری *لاکتوباسیلوس برویس CGMCC 1306* موردمطالعه قراردادند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که میزان تولید گابا در pH=٤/۵، دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد و مدت‌زمان ۷۲ ساعت تخمیر، نسبت به pH=۵، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۲ ساعت تخمیر، بیشتر بود. در این پژوهش به کمک روش HPLC، مقدار گابا به‌صورت کمی اندازه‌گیری و ٤۷٤/۷۹ میلی‌مول بر لیتر گابا برای شرایط اول و ۳۹۸/٦ میلی‌مول بر لیتر گابا برای شرایط دوم گزارش شد. پارک و اوه (۲۰۰۷)، با افزودن باکتری *لاکتوباسیلوس برویس OPY-1* استخراج‌شده از کیمچی به محیط کشت حاوی عصاره سویای تخمیر شده و شیر پس چرخ و شیر کامل، مقدار تولید گابا را موردبررسی قراردادند در این پژوهش از محیط MRS broth و یک درصد مونوسدیم گلوتامات استفاده شد. این محققان نتیجه گرفتند که روش فوق، علاوه بر ایجاد خواص تغذیه‌ای مفید در محصول، بازدهی تولید گابا را نیز افزایش می‌دهد. با استفاده از روش HPLC، میزان گابا محاسبه و ۲/۵ گرم بر لیتر گزارش شد.

تولید گابا در باکتری‌های اسیدلاکتیک به ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز وابسته است. تولید گابا در فاز رشد سلول صورت می‌گیرد ولی در ابتدای فاز سکون فعالیت آنزیم حداکثر است. فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز در پاسخ به کاهش pH در باکتری‌های اسیدلاکتیک افزایش یافته طی فرآیند دکربوکسیلاسیون، گلوتامیک اسید را به گابا و دی‌اکسید کربن تبدیل می‌کنید.گلوتامات به عنوان سوبسترای آنزیم، یکی از پارامترهای مهم تخمیر و تولید گابا می‌باشد. بنابراین افزودن ترکیب حاوی گلوتامات به محیط، امری ضروری محسوب می‌شود [۱۳].

باکتری‌های اسیدلاکتیک، میکروارگانیسم‌های ایمنی هستند که برای تولید گابا نیازمند فعال‌سازی آنزیم GAD هستند. GAD یک آنزیم منحصربه‌فرد است که جداسازی گروه کربوکسیل از گلوتامات را کاتالیز و آن را به فرم گابا تبدیل می‌کند [۵] و موجب تبدیل غیرقابل‌برگشت L- گلوتامات به گابا می‌شود [٦]. 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 درون‌سلولی بوده که در پاسخ به شرایط اسیدی تولید می‌شود. به همین دلیل برای تولید گابا، مقادیر بالای گلوتامیک اسید به‌عنوان سوبسترا موردنیاز است که می‌توان از مونوسدیم گلوتامات (MSG) بدین منظور استفاده کرد.

شن و وانگ (۲۰۱۰) [١٤]، برای باکتری *لاکتوباسیلوس برویس CC-W11* ایزوله شده از ماست سنتی چینی، شرایط بهینه را با استفاده از ۵ درصد مونوسدیم گلوتامات در محیط MRS مهیا کردند و گزارش کردند که pH بهینه تولید ۵ تا ۵/۵ بوده و دمای بهینه ۳۲ درجه سانتی‌گراد است. آن‌ها پس از ٦۰ ساعت تخمیر، به ۳/٦۷ گرم بر لیتر گابا دست یافتند. [۲]، منابع مختلف تولیدکننده گابا را مورد مقایسه قراردادند. آن‌ها با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه‌نازک، میزان تولید گابا را بررسی کرده و به این نتیجه رسیدند که استفاده از محیط کشت حاوی مونوسدیم گلوتامات می‌تواند راندمان تولید گابا را توسط باکتری *لاکتوباسیلوس برویس*، افزایش دهد.

روش‌های متعددی مانند کروماتوگرافی گازی، الکتروفورز، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، روش‌های طیف‌سنجی و اسپکتروفوتومتری برای تشخیص کیفی تولید گابا وجود دارد ولی

به علت داشتن هزینه زیاد و زمان‌بر بودن، مطلوب نمی‌باشند[۱۵]. کروماتوگرافی لایه‌نازک، برای بررسی هم‌زمان تعداد زیادی نمونه مناسب است این در حالی است که به تجهیزات گران‌قیمت نیز نیاز ندارد به همین دلیل برای آنالیز میزان تولید گابا پیشنهاد می‌شود. بسیاری از محققان به‌منظور غربال‌سازی اولیه، از روش کروماتوگرافی لایه‌نازک استفاده کردند.

بسیاری از محققان روش کروماتوگرافی لایه‌نازک را برای غربال‌سازی اولیه مورد استفاده قرار داده‌اند. [۱۶]، ۲۳ سویه از بین ۱۰۰۰ سویه ایزوله شده از پائوکای را بر مبنای تولید گابا بر اساس روش TLC غربالگری کردند و در نهایت *L.brevis NCL911* را به عنوان سویه با بالاترین میزان تولید گابا معرفی کردند. [۷]، با استفاده از کروماتوگرافی لایه‌نازک، تولید گابا را توسط *L.brevis BJ20* جدا شده از کیمچی گزارش دادند.

در این پژوهش مقدار کمی گابا بعد از خراش دادن باندهای تشکیل‌شده روی ورق TLC و خواندن جذب هر نمونه به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتری در طول‌موج ۵۱۲ نانومتر، به دست آمد. به کمک روش TLC، نه‌تنها آنالیز نمونه‌ها در مدت‌زمان کوتاهی انجام شد بلکه گاما آمینوبوتیریک اسید نیز با سطوح خوب و حساسیت بالا جداسازی شد. در شکل ۱، نمایی از کروماتوگرافی لایه‌نازک جهت تائید تولید گابا نشان داده‌شده است.

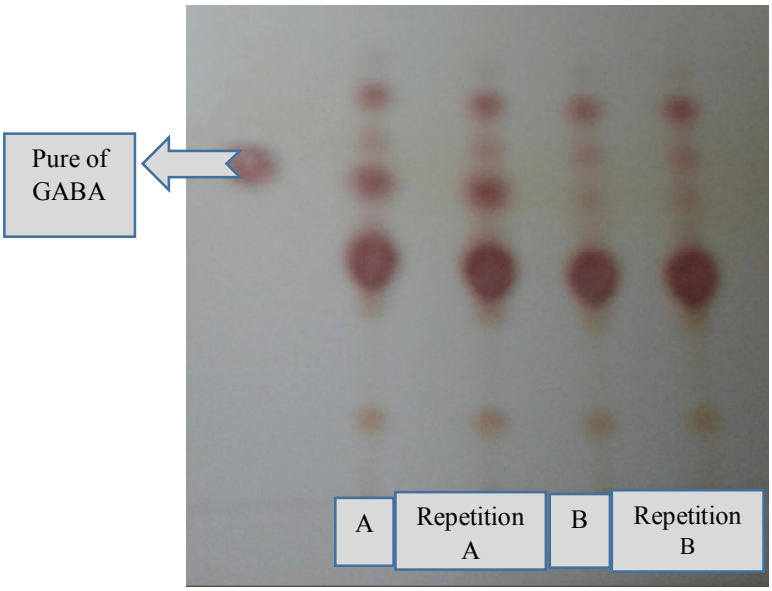

Fig 1 Thin layer choromatography to evaluate the production of GABA in two different culture media
A: GABA production in MRS broth medium containing 5% MSG
B: GABA production in MRS broth medium containing 1% MS

نتایج آنالیز واریانس[3] تولید گابا در جدول ۱، آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، مقادیر P-value پایین ($P<0.0003$) و R^2=0.94 نشان می‌دهد که مدل پیشنهادی معنی‌دار بوده و درنتیجه مدل پیشنهادی توسط نرم‌افزار، به‌خوبی می‌تواند داده‌ها را آنالیز نماید.

Table 1 Statistical analysis production of GABA

STD Dev.	21.76	R^2	0.94
Mean	77.22	Adjusted R^2	0.90
C.V %	28.18		

روش سطح پاسخ مجموعه‌ای از تکنیک‌های ریاضی و تجربی مفید برای بررسی تأثیر چند متغیر بر عملکرد و کیفیت فرایند یا

3. Analysis of variance

محصول تحت بررسی باهدف مدل‌سازی و بهینه یابی فرایندهای پیچیده است. روش سطح پاسخ به دلیل پیش‌بینی بهینهٔ روند طبیعی بهینه‌سازی و کاهش روش‌های پرهزینهٔ بهینه‌سازی بسیار مورداستفاده است. این روش جهت توصیف اثرات منفرد و متقابل متغیرهای مستقل بر پاسخ‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرد. این روش در بهینه‌سازی فرآیندهایی به کار می‌رود که پاسخ موردنظر تحت تأثیر تعدادی از متغیرها قرار می‌گیرد. با توجه به اینکه در این پژوهش بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورها مدنظر بود، به همین دلیل روش آماری سطح پاسخ انتخاب شد. همچنین ارتباط بین متغیرها و پاسخ به‌دست‌آمده در جدول ۲ آورده شده است که A, B اثرات خطی، A^2, B^2 اثرات مربعات و AB اثرات متقابل است.

Table 2 Final Equation in Terms of Coded Factors

GABA	=
51.31 +	
53.88 +	A
66.02 +	B
32.52 +	A*B
40.89 +	A^2
15.26 +	B^2

نتایج آنالیز آماری تأثیر متقابل دو متغیر درصدهای مختلف مونوسدیم گلوتامات در سه بازه زمانی بر تولید گابا نشان داد که اثر متقابل این دو متغیر، تأثیر معنی‌داری بر مقدار تولید گابا دارد. در شکل ۲ مشاهده می‌شود که با افزایش درصدهای مختلف مونوسدیم گلوتامات، تولید گابا با شیب ملایمی افزایش‌یافته است که با نتایج [۱٤]، مطابقت داشت. این نتایج در مطالعه [۱۷] نیز مشاهده شد. افزایش میزان تولید گابا در اثر افزایش غلظت مونوسدیم گلوتامات در برخی سویه‌های باکتری اسیدلاکتیک نیز مشاهده‌شده است [۱۲]. همچنین [۵] نیز بیان کردند که میزان فعالیت آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز با افزودن گلوتامیک اسید به محیط کشت به‌عنوان سوبسترا، افزایش می‌یابد که این عامل مهمی در افزایش تولید گابا است. [٤] نیز بیان کردند که از میان منابع مختلف، منابع ازت به‌خصوص مونوسدیم گلوتامات بر میزان تولید گابا مؤثرتر هستند.

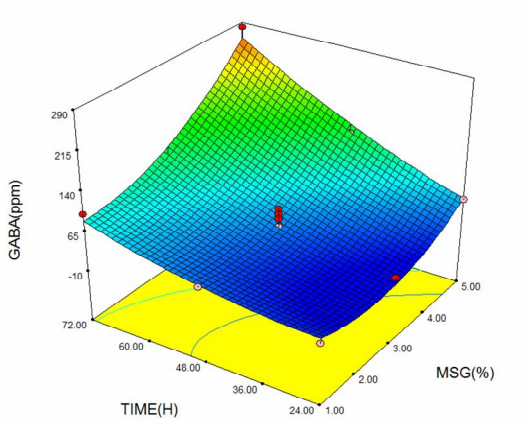

Fig 2 Interactive effect of monosodium glutamate and time on GABA production by *Lactobacillus brevis*.

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در غلظت مونوسدیم گلوتامات پایین، میزان راندمان تولید گابا به‌طور قابل‌توجهی پایین است درحالی‌که با افزایش غلظت مونوسدیم گلوتامات، می‌توان راندمان تولید گابا را افزایش داد به‌گونه‌ای که حداکثر تولید در این حالت، در زمان تخمیر ۷۲ ساعت مشاهده شد. مهم‌ترین ترکیب مورداستفاده در محیط کشت برای تولید متابولیت میکروبی، کربن است. [۲]، منابع مختلف تولیدکننده گابا را مورد مقایسه قراردادند و به این نتیجه رسیدند که استفاده از مونو سدیم گلوتامات به‌عنوان محیط پایه برای رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک، می‌تواند منجر به افزایش راندمان تولید گابا شود. در این پژوهش برای آنالیز تولید گابا، روش کروماتوگرافی لایه‌نازک مورداستفاده قرار گرفت. [۱٤]، با بررسی اثر ترکیبات محیط کشت بر رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک به این نتیجه رسیدند که بیشترین میزان تولید بعد از ٦۰ ساعت تخمیر، در محیط کشت حاوی منبع کربن و مونوسدیم گلوتامات ۵ درصد صورت گرفت.

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، با افزودن مونوسدیم گلوتامات به محیط کشت، محیط مناسبی را جهت رشد باکتری می‌توان فراهم کرد. کربن ترکیب عمده موجود در مونوسدیم گلوتامات است که ماده مغذی مؤثری برای رشد سلول باکتری محسوب می‌شود؛ بنابراین این ترکیب می‌تواند به‌عنوان ماده افزودنی به محیط کشت جهت رشد باکتری و تولید متابولیت توسط آن، مورداستفاده قرار گیرد. باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای آنزیم گلوتامیک اسید

دکربوکسیلاز هستند که این آنزیم گلوتامات موجود در محیط را به گابا تبدیل می‌کند. مونوسدیم گلوتامات از ترکیباتی است که می‌تواند به‌عنوان منبع گلوتامات به محیط کشت باکتری اضافه شود و زمینه افزایش تولید گابا را برای باکتری فراهم کند [۱۴]. بااین‌حال استفاده از مقادیر بالای گلوتامیک اسید، فشار اسمزی را افزایش می‌دهد که این افزایش می‌تواند منجر به توقف متابولیسم باکتری و کاهش مقدار تولید گابا شود. همچنین زمان استفاده از این افزودنی نیز مهم است و بیشترین تأثیر زمانی حاصل می‌شود که در ابتدای فرآیند تخمیر از این افزودنی استفاده شود [۱۸]. طبق گزارش[۱۴]، افزودن ۵ درصد مونوسدیم گلوتامات به محیط کشت، منجر به تولید ۳/۶ گرم بر لیتر گابا شد؛ بنابراین در این پژوهش از درصدهای ۱، ۳ و ۵ درصد مونوسدیم گلوتامات استفاده شد. تولید گابا در باکتری‌های اسیدلاکتیک، توسط آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز کاتالیز شده و تولید این ترکیب زیست فعال، به ویژگی‌های آنزیم GAD وابسته است. این آنزیم در پاسخ به شرایط اسیدی توسط باکتری تولید می‌شود و تنها با گلوتامات به‌عنوان سوبسترا وارد واکنش می‌شود که حاصل این واکنش، تولید گابا و دی‌اکسید کربن است. پارامتر اصلی بر تولید گابا در طول فرآیند تخمیر، وجود گلوتامات به‌عنوان سوبسترای آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز است؛ بنابراین افزودن گلوتامات به محیط تخمیر، تولید گابا را توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک افزایش می‌دهد [۱۹].

عامل دیگری که در مقدار تولید گابا نقش کلیدی دارد، زمان تخمیر است. نتایج شکل ۲ نشان می‌دهد که با افزایش مدت‌زمان تخمیر از ۲۴ ساعت به ۷۲ ساعت، مقدار تولید گابا نیز افزایش یافت که این امر می‌تواند به علت افزایش تعداد باکتری *Lactobacillus brevis* PML1 در طی فرآیند تخمیر و همچنین افزایش راندمان تبدیل مونوسدیم گلوتامات به گابا باشد این نتیجه با پژوهش [۱۲] نیز که گزارش کردند میزان تولید گابا بعد از ۷۲ ساعت تخمیر نسبت به ۳۲ ساعت تخمیر بیشتر بود، مطابقت داشت. نتایج این پژوهش نشان داد که حداکثر تولید گابا ۳۰۰ppm بوده که از شرایط بهینه ۵ درصد مونوسدیم گلوتامات و زمان ۷۲ ساعت تخمیر در دمای $37^{\circ}C$ به دست آمد.

۴-نتیجه‌گیری

در این پژوهش با افزودن درصدهای مختلف MSG به محیط کشت، مقدار تولید گابا توسط سویه *لاکتوباسیلوس برویس*، مورد مطالعه قرار گرفت و احتمال تولید این اسیدآمینه به روش کروماتوگرافی لایه‌نازک بررسی شد. در این تحقیق، تولید گابا توسط کروماتوگرافی لایه‌نازک تائید شد و نتایج پژوهش نشان داد که میزان تولید گابا توسط باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* در محیط کشت حاوی درصدهای مختلف مونوسدیم گلوتامات، نسبت به محیط کشت فاقد مونوسدیم گلوتامات بیشتر بوده و باند بزرگ‌تری روی ورق TLC مشاهده شد (شکل ۱). پیشنهاد می‌گردد در پژوهش‌های آتی ویژگی‌های گابا و شرایط بهینه برای افزایش میزان تولید این ترکیب زیست فعال، موردبررسی قرار گیرد تا بتوان از آن در صنایع غذایی و صنعت دارویی بهره‌مند شد.

۵-تشکر و قدردانی

مقاله علمی‌پژوهشی حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب در گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد با کد ۳/۵۱۷۸۹ می‌باشد. لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به جهت مساعدت‌های مالی در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی کنند.

۶- منابع

[1] Diana, M., Quílez, J., & Rafecas, M. (2014). Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *Journal of Functional Foods*, *10*, 407-420.

[2] 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*(3), 377-389.

[3] Wu, Q., & Shah, N. P. (2018). Restoration of GABA production machinery in *Lactobacillus*

& Lehe, M. E. I. (2013). A two-stage pH and temperature control with substrate feeding strategy for production of gamma-aminobutyric acid by Lactobacillus brevis CGMCC 1306. Chinese Journal of Chemical Engineering, 21(10), 1190-1194.

[13] Taherzadeh, M. J., Esmaeili, A., & Rabbani, M. (2014). Gamma aminobutyric acid (GABA) production using acid lactic bacteria. Journal of Babol University of Medical Sciences, 16(8), 46-56.

[14] Chen, W., & Wang, X. (2010, June). Effect of Cultivating Conditions on gamma-Aminobutyric Acid Production *by Lactobacillus brevis*. In *2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering* (pp. 1-3). IEEE.

[15] Han, S. M., Jeon, S. J., Lee, H. B., & Lee, J. S. (2016). Screening of γ-aminobutyric acid (GABA)-producing wild yeasts and their microbiological characteristics. The Korean Journal of Mycology, 44(2), 87-93.

[16] Li, H., Qiu, T., Cao, Y., Yang, J., & Huang, Z. (2009). Pre-staining paper chromatography method for quantification of γ-aminobutyric acid. Journal of Chromatography A, 1216(25), 5057-5060.

[17] Park, K. B., & Oh, S. H. (2007). Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. Bioresource Technology, 98(8), 1675-1679.

[18] Zareie, Z., Yazdi, F. T., & Mortazavi, S. A. (2019). 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*, *13*(4), 2626-2636.

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

brevis by accessible carbohydrates, anaerobiosis and early acidification. *Food microbiology*, *69*, 151-158.

[4] Yokoyama, S., Hiramatsu, J. I., & Hayakawa, K. (2002). Production of γ-aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis IFO-12005*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(1), 95-97.

[5] Dutta, S., Ray, S., & Nagarajan, K. (2013). Glutamic acid as anticancer agent: An overview. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *21*(4), 337-343.

[6] Yu, K., Lin, L., Hu, S., Huang, J., & Mei, L. (2012). C-terminal truncation of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis CGMCC 1306* extends its activity toward near-neutral pH. *Enzyme and microbial technology*, 50(4-5), 263-269.

[7] Vasiee, A. R., Yazdi, T. F., Mortazavi, A., & Edalatian, M. R. (2014). Isolation, identification and characterization of probiotic Lactobacilli spp. from Tarkhineh. *International Food Research Journal*, *21*(6), 2487.

[8] Sethi, M. L. (1993). Enzyme inhibition X: colorimetric method for determining gabase activity and its comparison with a spectrophotometric method. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *11*(7), 613-617.

[9] Ueno, S., Shigematsu, T., Murakami, M., Narahara, Y., & Fujii, T. (2007). Engineering studies on high-pressure induced transformation of rice. *High Pressure Bioscience and Biotechnology*, *1*(1), 308-314.

[10] Mazur, R., Kovalovská, K., & Hudec, J. (2021). Changes in selectivity of gamma-aminobutyric acid formation effected by fermentation conditions and microorganisms resources. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2021, 164-171

[11] Singh, A. K., Singh, G., Gautam, D., & Bedi, M. K. (2013). Optimization of dairy sludge for growth of Rhizobium cells. BioMed research international, 2013.

[12] Chunlong, P. E. N. G., HUANG, J., Sheng, H. U., Weirui, Z. H. A. O., Shanjing, Y. A. O.,

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Identification of gamma aminobutyric acid produced *By Lactobacillus brevis* PML1 by Thin layer chromatography method In culture medium containing monosodium glutamate (MSG)

Ghafourian Nasab, A. [1], Mortazavi, S. A. [2 *], Tabatabaee Yazdi, F. [2], Sarabi Jamab, M. [3]

1. Master student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Associate Professor, Department of Food Technology Biotechnology, Food Science and Technology Research Institute, Mashhad, Iran.

ARTICIE INFO

Article History:

Received 2021/ 08/ 02
Accepted 2021/ 09/ 14

Keywords:

Gamma aminobutyric acid,
Lactobacillus brevis,
MSG,
Thin layer chromatography.

DOI: 10.52547/fsct.18.120.29

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.120.26.8

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

ABSTRACT

Gamma aminobutyric acid (GABA) is a non-protein bioactive compound that can be effective in controlling many diseases such as Alzheimers, hypertension, stress, etc. The main stimulus for the production of GABA is the enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD), which is highly active in lactic acid bacteria. Also, the presence of monosodium glutamate (MSG) can act as a substrate for this enzyme and increase its activity. In this study, the production potential of gamma aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* PML1 in MRS medium was investigated. In order to optimize the fermentation process, culture medium containing MSG (1, 3 and 5%) was examined at 24, 48 and 72 hours. after fermentation, thin layer chromatography (TLC) method was used to identify GABA produced by bacteria. Spectrophotometric method was used to quantify the bands in thin layer chromatography. The results of studies at the level of 95% significance showed that the optimal treatment included a culture medium containing 5% monosodium glutamate and a time of 72 hours at 37 ° C, in which the amount of GABA production was approximately 300 ppm; Therefore, the desired strain not only has the potential to produce gamma aminobutyric acid under normal conditions (control sample) but also by adding different percentages of monosodium glutamate to the culture medium, the amount of this production can be increased.