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

مژده کریمی [1]، فریده طباطبایی یزدی [1*]، سید علی مرتضوی [1]، ایمان شهابی قهفرخی [2]، جمشیدخان چمنی [3]

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

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

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

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

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 باکتریاها تولید می‌شود که به صورت گسترده در تخمیر غذاها استفاده می‌شوند. در این مطالعه باکتری‌های تولید کننده گابا برای ریز پوشانی به وسیله ی ایزوله پورتئین سویا و آلژینات انتخاب شده و به روش امولسیون‌سازی ریزپوشانی شدند. راندمان ریزپوشانی و میزان به دام افتادن باکتری‌های تولیدکننده گابا در کپسول‌های ایزوله پروتئین سویا و آلژینات به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی 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 (TLC) و کروکاتوگرافی مایع (HPLC) بررسی شد. بر اساس نتایج ثبت شده، *لاکتوباسیلوس برویس* PML1 ایزوله شده از ترخینه و *لاکتوباسیلوس برویس* 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 آلژینات و به دلیل تولید مناسب سلول بهبود یافته است. این مطالعه پتانسیل ریز پوشانی باکتری‌ها همراه با افزایش راندمان تولید گابا با هدف ایجاد یک غذای فراسودمند را نشان می‌دهد.

کلید واژگان: غذای فراسودمند، ریز پوشانی، گاما آمینو بوتریک اسید، *لاکتوباسیلوس برویس*، ایزوله پروتئین سویا

* مسئول مکاتبات: tabatabaei@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]

[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

1- مقدمه

گاما آمینوبوتریک 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، سنتز پروتئین [2]، تنظیم فشار خون [3]، فعالیت کلیه و کبد [4, 5] ایمنی [6, 7]، تنظیم ترشح هورمون‌های تیروئید [8] و تنفس [9, 10] 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 هانتینگتون، پارکینسون، تشنج، آلزایمر و اسکیزوفرنی [16] نقش موثری دارد. گابا از طریق دکربوکسیلاسیون آمینواسید ال- گلوتامیک اسید به وسیله آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز[1] به صورت برگشت‌ناپذیر تولید می‌شود [3]. مطالعات زیادی وجود این آنزیم را در باکتری‌های اسید لاکتیک گزارش می‌دهند [17]. باکتری‌های اسید لاکتیک گروه مهمی از باکتری‌های گرم مثبت هستند که به طور طبیعی در دستگاه گوارش حیوانات، انسان و در سبزیجات توزیع شده‌اند [18-20]. سیستم گلوتامیک اسید کربوکسیلاز در باکتری‌های اسید لاکتیک همانند *لاکتوباسیلوس برویس*[2] به عنوان یک سیستم تعیین‌کننده برای مقاومت اسیدی عمل می‌کند. گابا محصول نهایی دکربوکسیلاسیون اسید آمینه گلوتامیک اسید در باکتری‌های اسید لاکتیک است [17]. *لاکتوباسیلوس برویس* [21-24]، *لاکتوکوکوس لاکتیس*[3] [25, 26]، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*[4][27]، *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس* [26]، *لاکتوباسیلوس بوچنری*[5] [28] و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[6] [29-32] و *لاکتوباسیلوس رامنوس*[7] [33] از جمله گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده گابا هستند و در بین آنها *لاکتوباسیلوس برویس* بیشترین تولید گابا را نشان می‌دهد [34]. تقریبا اکثر گونه‌های باکتری‌های تولیدکننده گابا از غذاهای سنتی تخمیری همانند کیمچی [35-37]، پنیرهای سنتی [38]، نوشیدنی‌های جلبک 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 لاکتیک تولیدکننده گابا می‌باشند [40]. با توجه به تأثیرات مفید گابا، در سال‌های اخیر تلاش‌های بسیاری برای غنی‌سازی غذاهای تخمیر شده با پروبیوتیک‌ها بعنوان تولید کننده‌های اصلی گابا صورت گرفته است (31). جهت افزایش محتوای گابا در محصول غذایی باید سویه های با فعالیت بالای آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز انتخاب شود. همچنین غلظت مونوسدیم گلوتامات در ماده غذایی باید به اندازه کافی بالا باشد. ولی در غیر این صورت می توان 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 جبران کرد [40].

فناوری ریزپوشانی یا کپسوله‌سازی پروبیوتیک‌ها یک زمینه در حال ظهور به منظور تثبیت طیف گسترده ای از میکروارگانیسم‌ها در مواد زیست سازگار با هدف رهایش کنترل شده سلول‌ها است [41]. کپسوله کردن باعث آزاد شدن کنترل شده ی پروبیوتیک‌ها 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 معده در هنگام هضم اطمینان می‌دهد [42]. آلژینات به دلیل سهولت در استفاده، مقرون به صرفه بودن، عدم سمیت، و زیست سازگاری یکی از متداول ترین مواد زیست توده برای کپسوله کردن سلول‌های پروبیوتیکی است.

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

1. Glutamate decarboxylase
2. *Lactobacillus brevis*
3. *Lactococcus lactis*
4. *Lactobacillus paracasei*
5. *Lactobacillus buchneri*
6. *Lactobacillus plantarum*
7. *Lactobacillus rhamnosus*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]

[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

دانه‌های آلژینات بسیار متخلخل و نفوذ پذیر هستند، از این رو می توانند از سلول‌های زنده در برابر محیط‌های خشن محافظت کنند ولی همین ویژگی ممکن است باعث انتشار همزمان مواد از این دانه ها شود [44]. این مسئله با اصلاح ساختار آلژینات با استفاده از سایر بیوپلیمرها یا پوشش دهی دانه های آلژینات با بیوپلیمرهای کم تخلخل قابل پیشگیری است [45].

ایزوله پروتئین سویا (SPI) دارای ویژگی‌های فرایند پذیری و ارزش غذایی مطلوب است. پروتئین سویا حاوی تمام آمینواسید های ضروری مورد نیاز برای تحقق نیازهای غذایی انسان در رشد، تعادل و مقابله با فشار های 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 کلسترول و جلوگیری از سرطان، دیابت و چاقی و همچنین محافظت در برابر بیماری های روده و کلیه از اثرات تغذیه ای پروتئین سویا است [46]. SPI به عنوان یک ماده فراوان و ارزان، به طور گسترده ای 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 [47, 48] .

یو و همکاران (2011) سیستم حامل پروبیوتیک 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 SPIتوسعه 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 پروبیوتیک در طول معده و قبل از رهایش در روده مفید باشند. پوسته‌های بیوکامپوزیت سنتز شده توسط آلژینات و SPI برای محصور کردن *انتروکوکوس فکالیس* و *لاکتوباسیلوس 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 صفراوی، و همچنین رفتار آزاد شدن سلول‌های محصور شده در مایع شبیه سازی شده روده نتیجه گیری شد که کپسوله سازی با استفاده از کامپوزیت ایزوله پروتئین سویا- آلژینات محافظت مطلوبی را از باکتری‌ها ارائه می‌دهد.

در بهینه سازی تولید گابا توسط میکروارگانیسم ها، اسید گلوتامیک و یا نمک های آن، pH و منبع کربن و نیتروژن در محیط کشت و عواملی که به خواص بیوشیمیایی آنزیم تولیدکننده گابا مرتبط هستند از عوامل اصلی و تعیین کننده تولید گابا محسوب می شوند. [40, 52]. هم چنین در دهه گذشته، بهینه سازی و بهبود تولید گابا از طریق تکنیک‌های مختلف جدید از جملهکاربرد روش های مهندسی ژنتیک و بیان ژن [53] [54]، و یا به کارگیری همزمان کشت های تولید کننده، [55]. فناوری تثبیت سلولی یا فناوری کپسوله سازی گزارش شده است [56, 57]. در این مطالعه، لاکتوباسیلوس‌های تولیدکننده گابا جدا شده از برخی انواع غذاهای تخمیر شده ایرانی شناسایی شد و سپس، اثر میکروکپسولاسیون سویا-آلژینات 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- میکروارگانیسم ها

در این مطالعه از لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از ترخینه (کدهای 16-1) و هویج تخمیری (G39, G42, G160) و سویه‌های استاندارد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 8014، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La5 و *لاکتوباسیلوس‌فرمنتوم* ATCC 14931 به عنوان سویه‌های استاندارد و تجاری برای بررسی پتانسیل تولید گابا استفاده شد. به منظور فعال سازی، ابتدا هر یک از سویه‌ها در محیط MRS آگار به شکل خطی کشت داده شدند. پلیت ها به مدت 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد تا ظهور کلونی در شرایط میکروآئروفیل گرم خانه‌گذاری 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]

[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

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 فالکون‌های حاوی 5 میلی لیتر محیط کشت مذکور تلقیح و به مدت 30 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد.

2-3- 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 سانتی‌گراد و به مدت زمان 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. آنگاه برای حذف میکروارگانیسم‌های 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 سانتریفوژ 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 متشکل 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 13سانتی 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].

2-4- ارزیابی کیفی تولید گابا در غلظت‌های مختلف مونوسدیم گلوتامات

پس از شناسایی سویه‌ها تولید کننده گابا، برای بررسی اثر میزان مونوسدیم گلوتامات بر تولید گابا، سویه‌های منتخب در محیط‌های MRS مایع حاوی مقادیر مختلف مونوسدیم گلوتامات (1، 3، 5 و 7 %) با pH 5/4 به مدت 30 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند.

2-5- 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) اندازه‌گیری شد. در مرحله اول پس از سانتریفیوژ کردن محیط کشت، فاز رویی با استفاده از معرف فنیل ایزوتیوسیانات (PITC) با روش تان و همکاران (2006) مشتق سازی شد. سپس 20 میکرولیتر از مشتق حاصل فیلتر شده به میکروتیوپ‌های 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 مخلوط متانول- سدیم استات 1 مولار- تری اتیل آمین 2:2:1 (حجمی/حجمی/حجمی) اضافه شد. پس از حل شدن باقیمانده خشک و مجدد حلال اضافه شده تحت خلا خشک شد. 50 میکرولیتر از معرف فنیل ایزوتیوسیانات- متانول- اتانول- تری اتیل آمین- آب 1:6:1:1:1 (حجمی/حجمی/حجمی/حجمی/حجمی) به تیوپ افزوده و به مدت 20 دقیقه به جهت تشکیل فنیل ایزوتیوسیانات –گابا در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت مابقی معرف به وسیله خلا جدا شد [59].

هم چنین استانداردهای گابا در غلظت‌های 125، 500 و 1000 میلی‌گرم بر لیتر آماده شد و با معرف PITC مشتق سازی شد. مشتق حاصل از نمونه ها و نمونه‌های استاندارد در 300 میکرولیتر استونیتریل 60 درصد حل و برای تزریق به دستگاه آماده شد. در هر بار 20 µl نمونه به دستگاه تزریق شد. آنالیز با استفاده از HPLC مجهز به ستون (250 mm, 5 µm × 4.6) C18 انجام شد. فاز متحرک شامل دو فاز A (سدیم استات0/1 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 مخلوط شده اند. فاز متحرک با سرعت جریانی 1 ml/min به ستون تزریق شد. برای شناسایی مواد خروجی از ستون از آشکارساز UV در طول موج 254 نانومتر استفاده شد. [35].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]

[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

2-6- ریزپوشانی باکتری تولید کننده گابا

سویه تولیدکننده گابا در محیط MRS مایع کشت می شود پس از گرم خانه گذاری به مدت 24 ساعت و در دمای 37 درجه سانتی گراد مایع کشت با دور g7000 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 گیری غلظت در OD625 تنظیم شد.

ریزپوشانی با روش زنجانی و همکاران با کمی تغییرات انجام گرفت [60]. برای تهیه ریزکپسول‌های آلژینات/ سویا به طور خلاصه 2 گرم از پروتئین سویا در 40 میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه و به منظور پاستوریزه شدن به مدت 30 دقیقه در دمای 85 درجه سانتی گراد حرارت داده شد. سپس محلول سدیم آلژینات (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 سوسپانسون باکتریایی به محلول تشکیل دهنده دیواره شامل ایزوله پروتئین سویا (مشخصات) و سدیم آلژینات 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 می افتد. پس از 30 دقیقه محلول به قیف دکانتور منتقل 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.

2-7- 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 که 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 آلژینات 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 هوازی و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت انجام و تعداد باکتری‌ها شمارش شدند. 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 پروبیوتیک محصور شده در میکروکپسول‌ها و Xi: مقدار اولیه سلول های پروبیوتیک در فرایند کپسول سازی

2-8- بررسی مورفولوژی و اندازه دانک های تشکیل شده

میکروکپسول‌ها با میکروسکوپ نوری (Olympus BX41 Microscope) مورد بررسی قرار گرفتند. نرم افزار ImageJ (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، Sarabi-Jamab، Ghorani، Kadhodaee، Tromp & 2017) گزارش شد. شکل و ساختار میکروسکوپی میکروکپسول‌ها با میکروسکوپ الکترونی اسکن (لئو VP1450) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها با طلا در آبگرمکن اسپری (SC7620) به مدت 180 ثانیه در 5 میلی آمپر تحت اتمسفر آرگون پوشش داده شده است.

2-9- 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]

[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

معده با حل کردن پپسین 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 هیدروکلریدریک اسید تنظیم شد. شربت روده شبیه سازی شده با حل کردن پانکراتین و نمک صفراوی 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 (سلول های آزاد) به 10 میلی لیتر از هر محیط مایع افزوده و در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت های 30، 60 ، 90 و 120 دقیقه گرم خانه گذاری شدند. باکتری ها بر سطح محیط MRS اگار جامد شمارش شدند.

2-10- 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 پپتون 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 شرح داده شده، بررسی شد و مقدار گابا با استفاده از HPLC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

2-11- تحلیل آماری

داده ها 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 در بررسی بین بیش از 20 سویه لاکتوباسیلوس 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 *لاکتوباسیلوس 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 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. از این رو روش‌های غربال‌گری مطلوبی محسوب نمی شوند.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 بوتریک 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 *لاکتوباسیلوس بوچنری* 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 *لاکتوباسیلوس برویس* NCL912 به عنوان تولید کننده گابا معرفی شد [23]. لی و همکاران (2010) با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک تولید گابا را توسط *لاکتوباسیلوس برویس* BJ20 را از بین 22 سویه جداسازی شده از کیمچی گزارش دادند [58]. راتانابور و همکاران (2013)، با استفاده از این روش 4 باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده 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 *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* DM5 جدا

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]

[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

شده از نوشیدنی‌های تخمیری سنتی را گزارش دادند [29]. همچنین 12 سویه لاکتوباسیلوس از 130 سویه جداشده از محصولات تخمیری دریایی 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 *لاکتوباسیلوس برویس* BH2 جدا شده از کیمچی را به عنوان تولید کننده معرفی کردند [65].

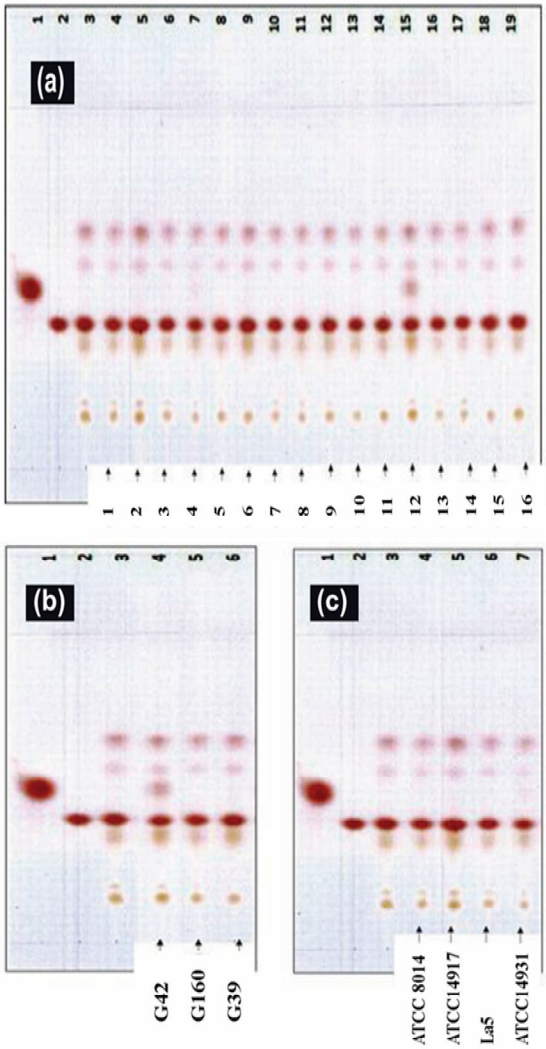

Fig 1 TLCs used in the qualitative assessment of GABA production by (a) lactobacillus isolated from Tarkhineh, (b) Lactobacillus isolated from fermented carrot (c) standard lactobacilli. Lane 1) GABA Standard, Lane 2) Monosodium Glutamate, Lane 3) MRS broth media.

همان طور که در شکل 1 مشخص است. سویه‌های استاندارد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 8014، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC 14917، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* La5 و *لاکتوباسیلوس‌فرمنتوم* ATCC 14931 قادر به تولید گابا نیستند. بنابراین سویه‌ها مذکور فاقد آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز هستند یا ژن مسئول تولید این آنزیم در آن‌ها بیان نشده است [29].

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

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 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 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 [66].

در مقایسه توانایی تولید گابا توسط دو سویه PML1 و G42 در حضور غلظت‌های مختلف مونو سدیم 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 *لاکتوباسیلوس 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 مشاهده شد [68]. افزایش تولید گابا در اثر افزایش غلظت سدیم گلوتامات در *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* [27] و *لاکتوباسیلوس برویس* NCL912 [69] نیز مشاهده شده است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]
[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

همان طور که در شکل 2 مشخص است تولید گابا توسط سویه *لاکتوباسیلوس برویس* G42 از *لاکتوباسیلوس برویس* PML1 در شرایط یکسان کشت بیشتر است. گلوتامات دکربوکسیلاز از زیرواحدهای 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 واکنش کربوکسیلاسیون برای گلوتامات دکربوکسیلاز در باکتری‌های اسید لاکتیک مشابه است اما ساختار اولیه در نواحیN-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].

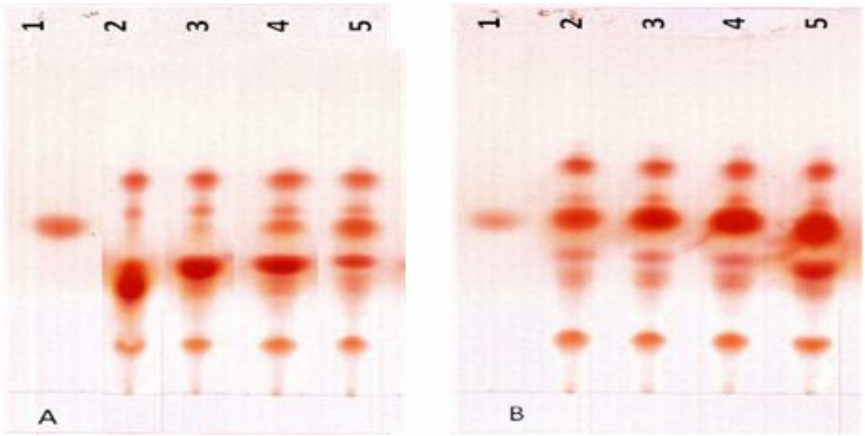

Fig 2 The TLC plates used in GABA quality evaluation by (a) *Lactobacillus brevis* PML1 and (b) *Lactobacillus brevis* G42 at 1% concentrations (Lane 2), 3% (Lane 3), 5% (Lane 4) and 7% (Lane 5) of monosodium glutamate in a liquid MRS medium, GABA standard (Lane 1)

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

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.

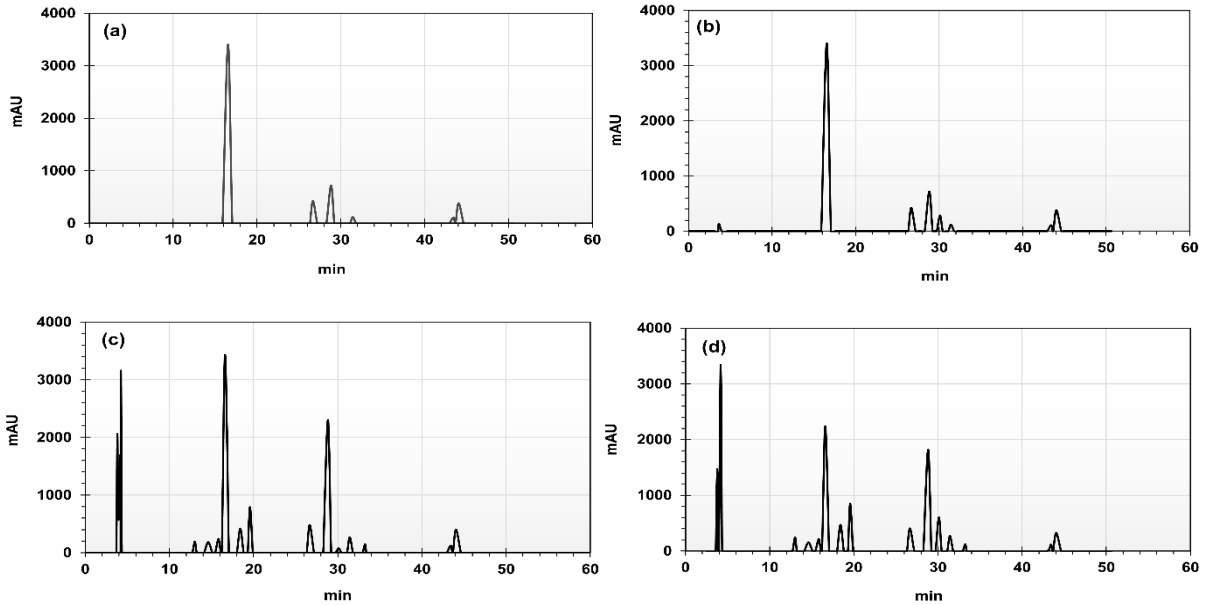

Fig 3 Monitoring the GABA production by HPLC Chromatograms. (a) The blank sample, (b) GABA standard solution (1000 mg/l), (c) fermented culture broth in the presence the strain PML1, (d) fermented culture broth in the presence the strain G42.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]

[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

درکروماتوگرام‌ها تعدادی پیک 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 غلظت‌های مختلف گابا منحنی استاندارد و به تبع از آن معادله رگرسیون خطی $y = 2.6278x - 30.146$ با ضریب تشخیص $R^2 > 0.9997$ تعیین شد.

همان گونه که در شکل 3 مشخص است مقدار تولید گابا توسط باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* G42 به طور چشمگیری بیشتر از *لاکتوباسیلوس برویس* PML1 بوده است. به این ترتیب مقدار گابا تولید شده به وسیله *لاکتوباسیلوس برویس* G42 و *لاکتوباسیلوس 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 میلی‌گرم بر لیتر تخمین زده شد. این نتایج موئید ارزیابی های کیفی تولید گابا هستند (شکل 3).

جدول 1 نمونه‌هایی از مقادیر تولید شده گابا از سویه‌های مختلف را نشان می‌دهد. همان طور که نشاده داده می‌شود 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 باکتری‌های 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
Lactobacillus brevis PM17	Cheeses	Sodium acetate buffer	15	[26]
Lactobacillus brevis 12005		20% wheat flour dissolution	85.6	[71]
Lactobacillus brevis CECT 8183	Cheeses	20% wheat flour dissolution	100	[71]
Lactobacillus brevis CECT 8181	Cheeses	20% wheat flour dissolution	97	[71]
Lactobacillus brevis CECT8182	Cheeses	20% wheat flour dissolution	102	[71]
Lactobacillus brevis TCCC13007		MRS broth containing 7% of MSG	38000	[68]
Lactobacillus brevis K203	Kimchi	6 % L-glutamic acid, 4 % maltose, 2 % yeast extract, 1 % NaCl, 1 % CaCl2, 2 g Tween 80/l, and 0.02 mM pyridoxal 50-phosphate	44400	[21]
Lactobacillus brevis BH2	Kimchi	MRS broth containing 5% of MSG	20005	[65]
Lactobacillus brevis NCL912	Paocai	Nutrient medium	35662	[69]
Lactobacillus brevis NCL912	Paocai	Nutrient medium	103719.1	[34]

3-4- بازده ریزپوشانی و مورفولوژی میکروکپسول‌ها

میانگین عملکرد کپسوله سازی 91/15 درصد محاسبه شده است که نشان دهنده موفقیت روش استفاده شده برای میکروکپسولاسیون سویه *لاکتوباسیلوس برویس* G42 است. هادزیوا و همکاران (2017) میکروکپسول‌های ایزوله پروتئین سویا و آلژینات را با روش خشک کردن پاششی با حداکثر عملکرد کپسوله سازی 64٪ تولید کردند [51]. همچنین، لی و همکاران (2016) نشان دادند که عملکرد میکروکپسولاسیون برای ایزوله پروتئین سویا کراسلینک شده با ترانس گلوتامیناز برای باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوس* 67/4 درصد است [72].

شکل 4 میکروگراف SEM و تصاویر OM از میکروکپسول‌ها را نشان می‌دهد.

میکروگراف‌ها ذرات کروی یکنواخت را نشان می‌دهند که به طور مؤثر باکتری‌ها را محاصره کرده اند. اندازه میکروکپسول‌ها عامل مهمی برای کاربرد آنهاست و تحت تأثیر فرایندهای ریزپوشانی قرار می‌گیرد. در روش کواسرواسیون و جداسازی فازی، اندازه تقریبی ذرات 5- 5000 میکرومتر است. مطابق شکل، میانگین قطر میکروکپسول‌ها 78/06 میکرومتر برآورد شده است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]

[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

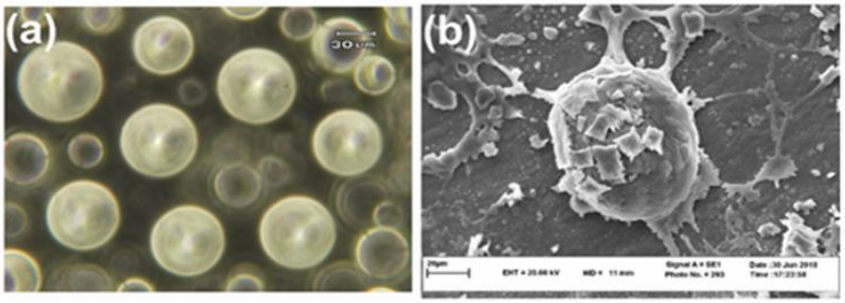

Fig 4 (a) OM (×40) and (b) SEM micrographs of the capsules surrounding the strain *L. brevis* G42.

5-3- بقای باکتری‌های آزاد و میکرو کپسوله 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. باکتری‌های 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 $1/2\times 10^6$ باکتری در هر میلی لیتر اندازه گیری شد، که درصد زنده ماندن آن 17 درصد است. با این حال، سلول های G42 میکروکپسوله شده پس از 120 دقیقه $6/2\times 10^6$ باکتری در هر میلی لیتر محاسبه شد که 45٪ درصد زنده ماندنی را نشان می‌دهد.

بدیهی است که میکروکپسوله 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 *انتروکوکوس فکالیس* HZNU P2 [50] و *لاکتوباسیلوس کازئی* [51] در شیره شبیه سازی شده معده پس از کپسوله شدن توسط ایزوله پروتئین سویا را نشان دادند. در اینجا، افزایش تعداد باکتری‌های زنده می تواند به دلیل افزودن اینولین، به عنوان یک پریبیوتیک باشد. آلژینات و پری بیوتیک‌ها یا الیگوساکاریدها به صورت هم افزایی کار می‌کنند تا شبکه‌های ژل تشکیل دهند که باعث بهبود و نگهداری سلول‌های باکتریایی شود [73-75].

تأثیر شیره شبیه‌سازی شده روده بر روی زنده‌مانی سلول‌های میکروپسوله شده و آزاد در شکل 6 ارائه شده است.

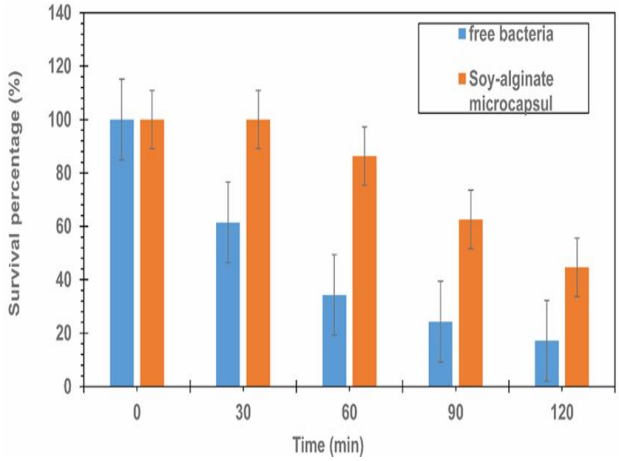

Fig 5 Survival of the free and microencapsulated *Lactobacillus brevis* G42 in the simulated gastric juice

همانطور که مشاهده می‌شود، با افزایش زمان تماس تعداد سلول-های آزاد و محصور کاهش می‌یابد. همانند شیره معده، سلول محصور شده در مقایسه با سلول های آزاد زنده ماندن بسیار بالاتری را نشان دادند. تعداد سلول‌های *لاکتوباسیلوس برویس* G42 آزاد پس از 120 دقیقه 1×10^6 باکتری در هر میلی لیتر و درصد زنده مانی 26 درصد بود، در حالی که برای سلول های میکرو کپسوله شده، درصد زنده ماندن 41 درصد محاسبه شد. این نشان دهنده اثربخشی ایزوله پروتئین سویا-آلژینات در محافظت از سلول‌های باکتریایی در شیره شبیه سازی شده روده است. این نتایج مطابق با نتایج گزارش شده توسط ژانگ و همکاران است که نشان دهنده افزایش بقای باکتری‌های پروبیوتیک محاصره شدن با آلژینات سویا در محیط معده و روده است [50].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]
[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

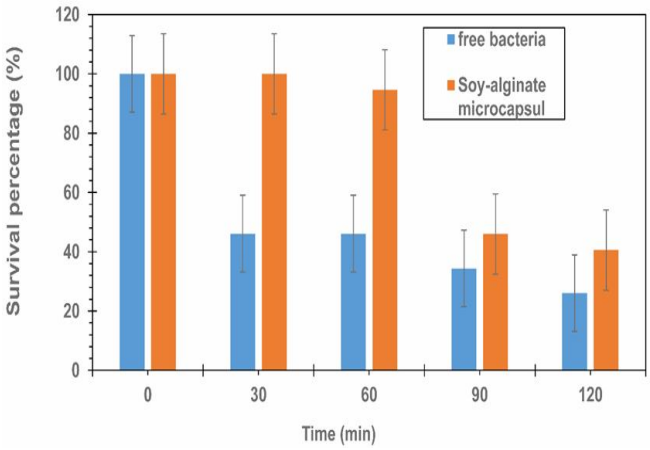

Fig 6 Survival of the free and microencapsulated *Lactobacillus brevis* G42 in the simulated intestinal juice

3-6- تولید گابا پس از ریزپوشانی

شکل‌های 7-9 کروماتوگرام فرآیند تولید گابا توسط *لاکتوباسیلوس برویس* G42 را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، تولید گابا به دلیل ریزپوشانی شدن *لاکتوباسیلوس 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.

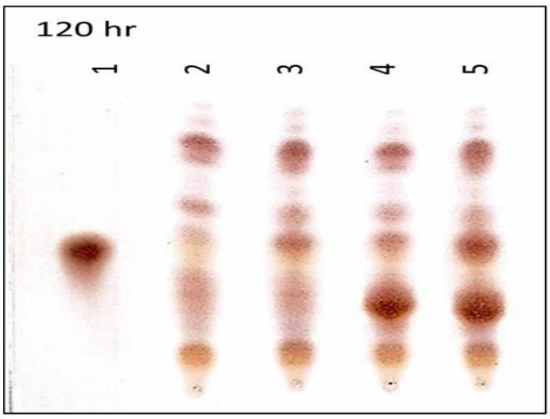

Fig 7TLC chromatogram showing GABA producing ability of *L.brevis* G42 in MRS medium. Lane 1: GABA standard (1 mg/ml), Lane 2 and Lane 3: Filter sterilized cell-free supernatant of *L.brevis* G42 and soy-alginate microencapsulated *L.brevis* G42 in MRS broth. Lane 4 and Lane 5: Filter sterilized cell-free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

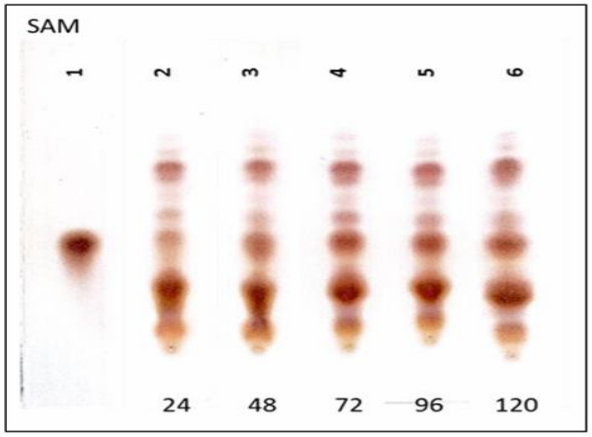

Fig 8 TLC chromatogram showing GABA producing ability of microencapsulated *L.brevis* G42 at different times (h) in MRS broth.

لاکتوباسیلوس برویس G42 میکروکوپسوله شده در مدت زمان 120 ساعت 32416,9 میلی‌گرم 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 تثبیت شده *لاکتوباسیلوس برویس* در دانه‌های ژل کلسیم آلژینات برای بیوسنتز گابا پایدار و کارآمد بودند [57] . همچنین، یک سیستم نیمه پیوسته تثبیت سلول ساخته شده از آلژینات حاوی لاکتوباسیلوس 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 پریبیوتیک‌های اینولین به آلژینات باشد که منجر به افزایش پایداری *لاکتوباسیلوس برویس* تثبیت شده و افزایش بهره وری گابا شود [56].

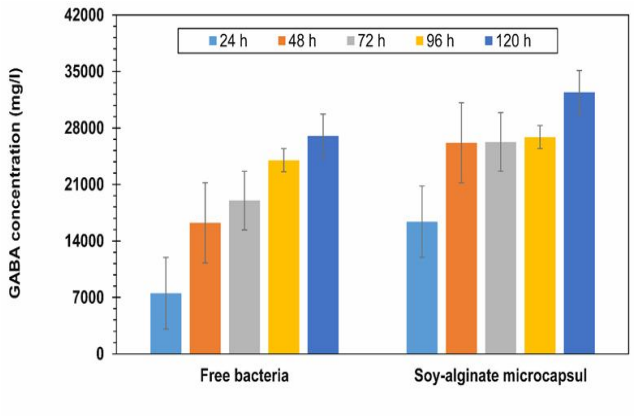

Fig 9 Production of GABA by encapsulated *Lactobacillus brevis* G42 in different forms growth in MRS broth

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]

[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

4- نتیجه گیری

در این پژوهش توانایی تولید گابا از لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از غذاهای تخمیر شده توسط کروماتوگرافی TLC و HPLC مورد بررسی قرار گرفت. *لاکتوباسیلوس برویس* PML1 جدا شده ازترخینه و *لاکتوباسیلوس 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-آلژینات برای کپسوله کردن لاکتوباسیلوس برویس G42 مورد استفاده قرار گرفت و میکروکپسول‌ها از نظر توانایی تولید گابا مورد بررسی قرار گرفت. به نظر می رسد که ریزپشانی در محافظت از *لاکتوباسیلوس 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 سلول‌ها بطور قابل توجهی بهبود یافت. نتایج ما نشان می‌دهد که ریزپوشانی ایزوله پروتئین سویا -آلژینات حامل مفیدی برای انتقال مولکول‌های فعال زیستی تولید شده توسط پروبیوتیک‌ها و خود پروبیوتیک‌ها از طریق دستگاه گوارش و تحویل 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.

[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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]

[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

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 :(۱)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-producingLactobacillus 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]

[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

[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 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. 1647-16.53
[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 ofEnterococcus 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 $\gamma-Aminobutyric $ Acid (GABA) Production Using Cell Entrapment of

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]

[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

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,2(72)2008. : 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.۵۶۸-۵۶۲ .

[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 fromLactobacillus brevis BH2. Biotechnology

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]

[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

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

Karimi, M.[1], Tabatabaee 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 BranchIslamic 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-07]

[DOI: 10.52547/fsct.17.105.47]

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