



بهینه‌سازی و مدل‌سازی شرایط استخراج گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا) از باکتری لاکتوباسیلوس برویس IBRC10818 تحت تاثیر شوک گرمایی به روش سطح پاسخ

محبوبه رضایی^۱، یونس قاسمی^۲، انوشه شریفان^{۳*}، حسین با خدا^۴

- ۱- دانشجوی دکتری، زیست فناوری مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- ۲- استاد، گروه بیوتکنولوژی دارویی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز.
- ۳- دانشیار، گروه زیست فناوری مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- ۴- استادیار، گروه مکانیزاسیون کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا)، یک اسید آمینه غیر پروتئینی است که تقریباً در بافت‌های اغلب میکروارگانیسم‌ها، گیاهان، جانوران و انسان‌ها یافت می‌شود. کاهش فشارخون، درمان بی‌خوابی، اضطراب، افسردگی و ادرار آور بودن از جمله ویژگی‌های فیزیولوژیکی گاما آمینوبوتیریک اسید است. به دلیل افزایش تقاضا برای مصرف گابا، روش‌های مختلف شیمیایی و زیستی به منظور تولید آن در دست مطالعه است. در میان همه این تلاش‌ها به نظر می‌رسد که بیوسنتز گابا امیدبخش‌ترین و ساده‌ترین روش تولید آن باشد. در این پژوهش اثر شوک حرارتی بر تولید گاما آمینوبوتیریک اسید، در باکتری لاکتوباسیلوس برویس IBRC10818 مورد بررسی قرار گرفت. برای بهینه‌سازی تولید، میزان مونسدیم گلوتامات در سه سطح ۱/۵ و ۱۰ گرم بر لیتر و شوک حرارتی در سه دمای ۴۰ و ۴۵ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در فاز تاخیر رشد میکروبی اعمال شد و میزان گاما آمینوبوتیریک اسید تولیدی در بازه زمانی ۱۵، ۴۳/۵ و ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری گردید. بیشترین میزان تولید گابا با افزودن ۳/۹۳۵ گرم بر لیتر مونسدیم گلوتامات در شوک دمایی ۴۷/۵۶ درجه سانتی‌گراد و در مدت انکوباسیون ۶۳/۳۷ ساعت در لاکتوباسیلوس برویس IBRC10818 اندازه‌گیری شد.

تاریخ‌های مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۳۱

کلمات کلیدی:

تنش،
انکوباسیون،
باکتری لاکتوباسیلوس،
روش سطح پاسخ.

DOI: 10.52547/fsct.18.09.14

* مسئول مکاتبات:

a_sharifan2000@yahoo.com

۱- مقدمه

گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا)^۱، به عنوان یک محصول زیستی در ۱۹۱۰ بوسیله آکرمن^۲ و کوشر^۳ شناسایی شد. آنها کشف کردند که این ماده از اسید گلوتامیک^۴ [۱] ایجاد می‌شود. در ۱۹۵۰ اودنفرد^۵ این ماده را در مغز انسان شناسایی کرد [۲].

گابا یک اسید آمینه^۴ کربنه غیر پروتئینی است که تقریباً در تمام عالم هستی، اعم از میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران و در بدن انسان‌ها یافت می‌شود [۳]. سیب‌زمینی اولین گیاهی بود که گابا به صورت طبیعی در آن کشف شد [۴]. گابا به صورت کلی و عمدتاً در حضور ال-گلوتامات^۶ و از طریق آلفا کربوکسیلاسیون^۷ کاتالیز شده غیر قابل برگشت به وسیله آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD)^۸ [۵] در باکتری‌های اسید لاکتیکی (LAB) سنتز می‌شود [۶]. آنزیم مذکور در گیاهان و حیوانات و میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌های اسید لاکتیکی که از جمله بهترین تولیدکنندگان گابا هستند، موجود است [۷، ۸]. ژنهای رمزگذاری GAD در باکتری‌های لاکتوباسیلوس برویس^۹، لاکتوباسیلوس پلانتاروم^{۱۰}، لاکتوباسیلوس فرمنتوم^{۱۱}، لاکتوباسیلوس روتری^{۱۲} و غیره وجود دارد [۹]. آمینو اسید غیر پروتئینی گابا، نقش مهمی در سیستم اعصاب مرکزی بازی می‌کند و نقش‌های درمانی زیادی دارد [۱۰]. از جمله کاهش فشار خون [۱۱] و ممانعت‌کنندگی از تحریک سیستم ایمنی داشته [۱۲] به جلوگیری از دیابت کمک می‌کند، ادرار آور بوده [۱۳] و باعث کاهش درد و اضطراب می‌شود [۴].

روش‌های مختلف شیمیایی و بیولوژیک برای تولید آن مورد بررسی قرار گرفته است که در میان همه آنها، بیوسنتز گابا، بهترین و ساده‌ترین آنهاست [۱۴]. باکتری‌های اسید لاکتیکی، به طور گسترده‌ای گابا را از طریق تخمیر تولید می‌کنند [۱۵]. در میان این خانواده، لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس بوخنری^{۱۳}،

لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس رامنوزوس^{۱۴} و غیره به عنوان تولیدکننده خوب گابا مطرح هستند. بهینه‌سازی ترکیب محیط برای تولید بهینه گابا ضروری بوده و این تخمیر نیازمند افزودن مونو سدیم گلوتامات (MSG)^{۱۵} است [۳]. میکروارگانیسم‌ها، برای توانایی زیستن در شرایط ایده آل در محیط‌های نرمال، بهینه‌سازی می‌کنند. هر تغییری در شرایط محیط که آن را از حالت بهینه خارج کند، تنش را روی میکروارگانیسم تحمیل می‌کند [۱۶]. اغلب باکتری‌ها، قادر به تحمل تغییرات کوچک در وضعیت‌های محیطی گوناگون هستند و می‌توانند خودشان را به این شرایط سازگار کنند. میکروارگانیسم‌ها، این کار را به وسیله ساخت مواد مناسب برای بقا یا تلاش برای ایجاد شرایط مقاومت به تنش، انجام می‌دهند [۱۷].

باکتری‌های اسید لاکتیکی مانند بسیاری دیگر از باکتری‌ها دارای سیستم درک تنش هستند [۱۸] و در برابر تنش مقاومت می‌کنند [۱۹] که این مورد به آنها اجازه می‌دهد در شرایط سخت پایداری نشان دهند و تغییرات سریع محیطی را تحمل کنند. پاسخ به تنش‌های باکتریایی بر اساس بیان ژن‌هایی است که نقش آنها تقسیم و متابولیسم سلول و ترکیب اجزا غشا برای نقل و انتقال مواد داخل سلولی به خارج از سلول بوده و در هنگام بروز تنش، شرایط را با تولید یا مصرف متابولیت‌ها، پیش‌سازهای آنها و یا تغییر در فعالیت برخی آنزیم‌ها، برای بقا سلول آماده می‌کنند [۲۰].

در گیاهان وقتی گیاه تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی قرار می‌گیرد، گاما آمینوبوتیریک اسید تشکیل می‌شود و در باکتری‌ها نیز گفته می‌شود که تشکیل گابا، مکانیسم حمایتی بر علیه تنش‌های وارده به باکتری، pH پایین و نیز در زمان جوانه‌زنی باکتری‌ها است [۲۰]. انتروکوکوس فیسیوم^{۱۶} HL7^{۱۷} در طول سازگاری با گرما، می‌تواند بقا خود را با سنتز پروتئین‌هایی که با گرما القا می‌شوند و ۱۰۰ کیلودالتون وزن دارند و احتمالاً مرتبط با پروتئین‌های شوک گرمایی HSP100^{۱۷} هستند، تضمین کنند [۲۱]. در باکتری‌های گرم مثبت که باکتری‌های اسید لاکتیکی نیز از همین گروه است، ۳ گروه از ژنها هستند که میکروارگانیسم را در برابر شوک گرمایی سازگار می‌سازند الف) ژنهای Class I که به وسیله ممانعت‌کننده‌های HrcA، به توالی اپراتورهای دو

1. Gamma Aminobutyric Acid (GABA)
2. Ackermann
3. Koshler
4. Glutamic Acid
5. Odenfred
6. L-Glutamat
7. α carboxylation
8. Glutamic acid decarboxylase (GAD)
9. *Lactobacillus brevis*
10. *Lactobacillus plantarum*
11. *Lactobacillus fermentum*
12. *Lactobacillus reuteri*
13. *Lactobacillus Buchneri*

14. *Lactobacillus rhamnosus*
15. Monosodium glutamate
16. *Enterococcus faecium* HL7
17. Heat Shock Protein100

انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد تا توده سلولی در محیط مایع دیده شود. این لوله‌ها برای انجام مراحل بعدی به مدت یک هفته قابل استفاده بودند [۲۲].

۲-۲- تلقیح میکروبی

برای تهیه مایه‌های تلقیحی اولیه، کشت‌های باکتریایی با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و باکتریهای ته‌نشین شده با استفاده از آب مقطر استریل شستشو گردیده و از آن سوسپانسیون تولید شد. در نهایت سوسپانسیون میکروبی حاصله به عنوان مایه تلقیح به میزان ۰.۴٪ حجمی/حجمی از یک کشت بر مبنای استاندارد نیمه مک فارلند، مورد استفاده قرار گرفت [۲۳].

۲-۳- تعیین میزان تلقیح به روش کدورت‌سنجی

نیمه مک فارلند^{۱۹}

برای کاربرد تعداد باکتری‌ها در محیط مایع از روش کدورت‌سنجی مک‌فارلند استفاده شد. کدورت محیط مایع که حاوی سوسپانسیون میکروبی بود، با استاندارد که کدورت آن با تعداد معینی باکتری تناسب دارد، مقایسه گردید. استاندارد نیمه مک‌فارلند، محلولی شامل ۹/۹۵ میلی لیتر اسید سولفوریک^{۲۰} خالص ۱٪ (۰/۳۶ نرمال) و ۰/۰۵ میلی لیتر، کلرید باریوم ۱/۷۵٪ (۰/۴۸۰ مولار) است. کدورت این استاندارد برابر با سوسپانسیون باکتریایی معادل $10^8 \times 1/5$ CFU/ml^{۲۱} می‌باشد. جذب محلول نیم مک فارلند، در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ۰/۸ است [۲۴]. از پیش‌کشت آماده شده باکتری لاکتوباسیلوس برویس *IBRC10818* بر روی محیط کشت MRS براث در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تلقیح گردیده و اندازه‌گیری میزان گاما آمینوبوتیریک اسید تولید شده ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون^{۲۲} انجام پذیرفت و داده آزمون به عنوان میزان تولید نرمال باکتری ذخیره‌سازی شد.

۲-۴- انجام شوک گرمایی

کشت میکروبی در فاز تاخیر رشد، در حمام آب‌گرم همزن دار، با شرایط مدل‌سازی شده، به مدت ۳۰ دقیقه تحت تیمار شوک

سره CIRCE باند می‌شوند. ب) ژنهای Class II که تحت کنترل فاکتور $B\sigma$ بوده و منجر به بیان ژنهایی می‌شود که تحمل استرس را بالا می‌برد و ج) ژنهای Class III که به وسیله ممانعت‌کننده های ژن تنش دسته ۳ کنترل می‌شوند [۲۰].

با توجه به مواردی که مطرح شد، برخی متغیرهایی که به عنوان محرک استرس می‌توانند مطرح باشند شامل گرما، سرما، تغییر pH، امواج مایکروویو، اولتراسوند و فشار اسمزی هستند. در این پژوهش، بر آن هستیم که اثر تنش گرمایی را در گونه لاکتوباسیلوس برویس *IBRC10818*^{۱۸} و تاثیر بر تولید گاما آمینو بوتیریک اسید مورد بررسی قرار داده و به روش سطح پاسخ، شرایط بهینه تولید آن را مدل‌سازی نماییم.

۲- مواد و روشها

محیط کشت MRS Broth شرکت لیوفیلکم (Liofilchem) (ایتالیا)، مونوسدیم گلوتامات شرکت مرک (Merck) (آلمان)، گاما آمینوبوتیریک اسید سیگما آلدریچ (Sigma-Aldrich) (آلمان). سویه لاکتوباسیلوس برویس *IBRC10818* به صورت کشت فعال شده از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC). بوریک اسید مرک آلمان، هیدروکسید سدیم مرک آلمان، فنل مرک آلمان، قرص رینگر مرک آلمان، هیپوکلریت سدیم مرک آلمان، انکوباتور Angelantoni ساخت کشور ایتالیا، هود لامینار آزمایشگاهی ژال تجهیز ساخت ایران، اتوکلاو هان طب ایران، اسپکتروفوتومتر eppendorf bioPhotometer plus آلمان، حمام آب Memmert آلمان، حمام آب ریحان طب ایران، اسپکتروفوتومتر UV/Vis ساخت تایوان، ترازوی آزمایشگاهی Acculab آمریکا، سانتریفیوژ ۵۸۱ R eppendorf آلمان، سمپلر برند آلمان، دستگاه یخ ساز kw کشور ایتالیا.

۲-۱- تهیه پیش کشت

برای تهیه پیش کشت به وسیله لوپ استریل در نزدیکی شعله از پرگنه‌های کشت فعال خریداری شده لاکتوباسیلوس برویس *IBRC10818*، برداشته و به ارلن‌های حاوی محیط کشت استریل MRS broth منتقل و همگن‌سازی شد و سپس در لوله‌های آزمایش توزیع گردید. آنگاه لوله‌های آزمایش در

19. McFarland Turbidity measurement
20. Sulfuric acid
21. Colony Forming Unite
22. Incubation

18. Lactobacillus brevis IBRC10818

استفاده مکعب مرکزی و از نرم افزار Design Expert نسخه ۱۲ برای بهینه‌سازی استفاده شد. آنالیز واریانس متغیرهای مستقل بر مدل ارائه شده به روش anova و با p value (۰/۰۵) انجام شد. برای ارزش سنجی شرایط پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار، نمونه بهینه از فرمول پیشنهادی نرم افزار Design Expert در سه تکرار کشت شده و مقدار متابولیت تولیدی با مقدار پیش‌بینی شده نرم‌افزار جهت تایید صحت آن با آزمون t مقایسه شده و برای مقایسه از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی متغیرهای موثر بر تولید گابا و

مدل‌سازی فرمولاسیون

در سال‌های اخیر، توانایی تولید گابا در برخی سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیکی، ارزیابی و نشان داده شده‌است که رشد سلول و تولید گابا، شدیداً تحت تاثیر شرایط کشت مثل pH و دماست [۱۴]. چرا که برای تولید بیشینه گابا نیازمند دانسیته بالای سلولی هستیم و دما نقش اساسی در رشد توده سلولی دارد [۲۶]. جهت افزایش تولید گاما آمینوبوتیریک اسید شرایط محیط کشت باکتری و اعمال شوک گرمایی بهینه‌سازی شد و تجزیه و تحلیل واریانس مدل آن مطابق با جدول ۱ گزارش گردید. نتایج نشان می‌دهد که فاکتورهای زمان انکوباسیون و میزان مونسدیم گلوتامات (MSG) بر میزان تولید گابا اثر گذار است که با نتایج زارعی و همکاران (۲۰۲۰) [۲۷]، Binh و همکاران (۲۰۱۴) [۲۸] و Chunlung و همکاران (۲۰۱۳) [۲۹] مطابقت داشت. جهت تعیین روند تغییرات تولید گاما آمینوبوتیریک اسید و بررسی اثر هر یک از متغیرهای مستقل، در ابتدا نیاز به تعیین مناسب‌ترین مدل جهت برازش داده‌های آزمون می‌باشد. از نظر آماری مدلی مناسب است که آزمون عدم برازش آن معنی دار نبوده، R^2 و R^2 اصلاح شده^{۲۵} دارای بالاترین مقدار باشد. نزدیکی R^2 به ۱۰۰ درصد نشان‌گر همبستگی مناسب مدل تجربی و داده‌های به دست آمده از آزمون‌ها بود و تفاوت کمتر از ۲ واحد، R^2 و Adjusted R^2 تایید کردند که مدل ارائه شده، مدل قابل قبولی بوده و درستی نتایج پیش‌گفت تایید شد.

گرمایی قرار داده‌شد، سپس در یخ برای ۵ دقیقه سرد شده و پس از هم‌دما شدن با دمای محیط برای ادامه انکوباسیون، به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شده و پس از طی شدن زمان لازم انکوباسیون، میزان گابای تولیدی اندازه گیری شد [۲۱]. محلول گابا، با غلظتهای ۳۰۰، ۲۵۰، ۲۰۰، ۱۵۰ و ۵۰ قسمت در میلیون از یک محلول مادر ۵۰۰ قسمت در میلیون، به وسیله پودر مرجع گابا تهیه شد و برای آن منحنی کالیبراسیون رسم شده و برای تعیین مقدار محتوای گابا در نمونه‌ها، مورد استفاده قرار گرفت [۲۵].

۲-۵- تعیین مقدار گابای تولید شده در

محیط کشت

در یک لوله آزمایش در پیچ دار به مقدار ۰/۱ میلی لیتر سوپرناتانت^{۲۳} میکروبی (محلول تهیه شده از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ نمودن لوله آزمایش حاوی کشت میکروبی، تحت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد)، مخلوطی از محلول شامل ۰/۲ میلی لیتر بافر بورات ۰/۲ مولار (۳/۵ حجم از محلول اسید بوریک ۰/۲ مولار با یک حجم از محلول هیدروکسید سدیم ۰/۲ مولار) و ۱ میلی لیتر واکنشگر فنول ۶٪ (۶ گرم از پودر فنل که به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده می‌شود) افزوده و پس از افزودن ۰/۴ میلی لیتر سدیم هیپوکلریت ۷/۵٪ محتوای لوله آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و به مدت ۵ دقیقه در آب و یخ به سرعت سرد شد و OD^{۲۴} آن در ۶۳۰ نانومتر وسیله اسپکتروفوتومتر UV/Vis خوانده شد. سپس با بررسی این اطلاعات و مقایسه با منحنی کالیبراسیون نمونه استاندارد، میزان گابا در محیط کشت تعیین مقدار شد [۲۵]. با مقایسه مقدار متابولیت با شرایط مدل سازی نرم افزار در تیمارهای ارائه شده و نتایجی که در پیش تیمار کسب شده از نمونه کنترلی بدون تیمار، حاصل شد، نمونه بهینه توسط نرم افزار انتخاب گردید.

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بهینه‌سازی شرایط استخراج گاما آمینوبوتیریک اسید، با هدف رسیدن به بالاترین میزان متابولیت از سه متغیر دما (تیمار شوک حرارتی) ۴۵، ۴۰، ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، بر روی محیط کشت‌هایی با میزان متفاوت مونسدیم گلوتامات ۱، ۵/۵ و ۱۰ گرم بر لیتر، در فاز تاخیر رشد میکروبی و زمان انکوباسیون ۱۵ و ۴۳/۵ و ۷۲ ساعت استفاده شد. طرح مورد

25. Adjusted R

23. Supernatant
24. Optical Density

Table 1 Model variance analysis quadratic

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value | |
|------------------------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|-------------|
| Model | 28691.11 | 9 | 3187.90 | 16.33 | 0.0211 | significant |
| A-MSG | 3200.00 | 1 | 3200.00 | 16.39 | 0.0271 | |
| B-Time of incubation | 6050.00 | 1 | 6050.00 | 30.98 | 0.0114 | |
| C-Temperature of heat shock | 50.00 | 1 | 50.00 | 0.2561 | 0.6477 | |
| AB | 8.33 | 1 | 8.33 | 0.0427 | 0.8496 | |
| AC | 8.33 | 1 | 8.33 | 0.0427 | 0.8496 | |
| BC | 2408.33 | 1 | 2408.33 | 12.33 | 0.0391 | |
| A² | 4921.95 | 1 | 4921.95 | 25.21 | 0.0152 | |
| B² | 913.33 | 1 | 913.33 | 4.68 | 0.1193 | |
| C² | 313.33 | 1 | 313.33 | 1.60 | 0.2947 | |
| Residual | 585.81 | 3 | 195.27 | | | |
| Lack of Fit | 585.81 | 1 | 585.81 | | | |
| Pure Error | 0.0000 | 2 | 0.0000 | | | |
| Cor Total | 29276.92 | 12 | | | | |
| C.V% | 10.21 | | | | | |
| R² | 0.9800 | | | | | |
| Adjusted R² | 0.9200 | | | | | |

تخمیر باکتری‌های اسیدلاکتیکی، بر تولید گابا اثرگذار است اما مقادیر بیشتر آن باعث کاهش تولید گاماآمینو بوتیریک اسید می‌گردد چرا که فشار اسمزی بالایی که با افزایش غلظت گلوتامات ایجاد می‌شود بر روی متابولیسم باکتریایی اثر گذارده و باعث کاهش تولید متابولیت می‌گردد [۳]. همچنین فلاح و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند که فعالیت آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسلاز با افزایش گلوتامیک اسید افزایش یافته و این عامل مهمی در افزایش تولید گابا می‌باشد [۳۲]. Binh و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهشی نشان دادند که با افزایش مونوسدیم گلوتامات از ۴ به ۶ درصد وزنی/حجمی میزان تولید گابا در لاکتوباسیلوس برویس افزایش معنی داری از ۲۷ mg/ml به ۳۱ mg/ml داشته ولی در بالای ۸ درصد تولید گابا کاهش یافت به گونه ای که در ۱۰ درصد مونوسدیم گلوتامات میزان گابا به ۲۴ mg/ml رسیده و مقادیر بیشتر اثر ممانعتی بر تولید گابا داشته‌است [۲۸]. Zhong و همکاران (۲۰۱۸) در تحقیقی از تخمیر پودر توت به وسیله باکتری‌های اسید لاکتیکی در میزان ۱ درصد مونوسدیم گلوتامات بیشترین میزان گابا را گزارش کردند و این در حالیست که کم‌ترین میزان گابا بدون حضور مونوسدیم گلوتامات گزارش شد و در مقادیر بیشتر از ۱ درصد، تولید گابا کاهش یافت [۳۳]. زارعی و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که تولید گابا در شیرسویای تخمیر شده به وسیله

در شرایط بدون شوک گرمایی، در حضور ۰.۵٪ مونوسدیم گلوتامات، و در دمای انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی گراد، پس از ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، ۱/۱۶۵ قسمت در میلیون گابا حاصل شد که با نتایج Li و همکاران (۲۰۱۰) مبنی بر تولید ۲۸/۱۷۵ قسمت در میلیون گابا در لاکتوباسیلوس برویس ۹۱۲ NCL [۳۰] و نیز زارعی و همکاران (۲۰۱۸) مبنی بر تولید ۴/۱۷۰ ppm گابا بدون بهینه‌سازی شرایط تولید و ۴/۱۷۰ ppm گابا در *L. plantarum* [۳۱] تحت شرایط بهینه‌سازی رشد هم‌خوانی داشت.

۳-۱-۱- تاثیر میزان مونوسدیم گلوتامات بر تولید گابا

همان‌گونه که شکل ۱-A و جدول ۱ نشان داده‌است، میزان مونوسدیم گلوتامات بر میزان تولید گاماآمینوبوتیریک اسید تاثیر معنی‌دار داشته‌است ($P \leq 0.05$). به گونه‌ای که با افزایش مونوسدیم گلوتامات تا ۴ درصد، بیشترین میزان تولید متابولیت گابا در باکتری لاکتوباسیلوس برویس IBRC10818 مشاهده شد (۱۷۵ ppm). هم‌چنین با استناد به شکل ۱-A با افزایش بیشتر میزان مونوسدیم گلوتامات، راندمان تولید متابولیت گابا کاهش داشته‌است به گونه ای که در محتوای ۱۰ درصد مونوسدیم گلوتامات، میزان تولید گابا حداقل بوده‌است (۱۵۰ ppm). نتایج این پژوهش منطبق با نتایج Chua و همکاران (۲۰۱۹) است که نشان دادند، افزودن مکمل گلوتامات در طول

گابا موجب افزایش pH و مختل شدن فعالیت آنزیم می‌گردد و تولید کاهش می‌یابد [۳۸]. Dhakal و همکاران (۲۰۱۲) زمان لازم برای تولید میزان بهینه تولید گابا در لاکتوباسیلوس پلانتروم را ۷۲ ساعت گزارش کرده‌اند [۴].

۳-۱-۳- بررسی اثر شوک حرارتی بر میزان تولید

مطابق شکل 1-C اثر مستقل دمای شوک حرارتی در میزان تولید گابا معنی دار نبود ($P > 0.05$)، نتایج مندرج در جدول ۱ مشخص کرد که تاثیر همزمان دمای شوک حرارتی و مدت زمان انکوباسیون بر میزان تولید متابولیت گابا تاثیر معنادار داشته‌است ($P \leq 0.05$). به نظر می‌رسد که اعمال شوک حرارتی در فاز تاخیر، باعث پدید آمدن استرس بر باکتری شده که گذشت زمان و سازگار شدن باکتری با شرایط و بقای بیشتر باکتری و نیز افزایش میزان پروتئین‌های القاگر شوک حرارتی، منجر به افزایش تولید، هم‌زمان با افزایش زمان انکوباسیون شده است. نتایج Broadbent و همکاران (۱۹۹۷) نشان داد که ۲۰ دقیقه تحمل شوک حرارتی ۶۳-۵۴ درجه سانتیگراد در لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ^{۲۷}NCFM و لاکتوباسیلوس کازنی IC301²⁸ و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس LH212^{۲۹} باعث بهبود در توانایی رشد در فاز لگاریتمی باکتری‌ها به ترتیب ۵ و ۱۱ و ۲۷ برابر گردید [۱۶]. توانایی بیشتر برای رشد در فاز لگاریتمی می‌تواند باعث افزایش تعداد سلول باکتری گردد که در نهایت میزان متابولیت را افزایش می‌دهد. Esteves و همکاران (۲۰۱۹) پاسخ شوک حرارتی را در پیروکوکوس فوروسوس^{۳۰} تحت بررسی قرار دادند و با اندازه‌گیری ۳۷ متابولیت از جمله مونوزیل گلیسرانها، برخی استیل گلوکزآمینها و ترکیبات سازنده دیواره سلولی، که در طی شوک حرارتی تخریب شده‌اند نشان دادند که افزایش قابل ملاحظه‌ای در این متابولیت‌ها وجود داشته و تخریب مواد حاصل از بیوسنتز و نقل و انتقال آمینواسیدها، می‌تواند باعث دسترسی‌پذیری به برخی اسیدهای آمینه باشد [۳۹]. تغییراتی که در دیواره سلولی طی تخریب در شوک حرارتی به وجود می‌آید می‌تواند باعث بهبود نقل و انتقال مواد لازم برای ایجاد یک متابولیت گردد. Fiocco و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که افزایش سه نوع از پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک، در اثر

لاکتوباسیلوس برویس با افزایش میزان مونوسدیم گلوتمات از ۲۷۰-۰ mM افزایش یافته است [۳۴].

۳-۱-۲- اثر مدت زمان گرمخانه‌گذاری بر تولید گابا

با توجه به نتایج ارائه شده در شکل 1-B، نشان داده‌شد که با افزایش مدت زمان انکوباسیون، تولید گاما آمینوبوتیریک اسید افزایش معنی‌دار داشته‌است ($P \leq 0.05$). با استناد به شکل 1-B، با افزایش زمان انکوباسیون از ۱۵ تا ۷۲ ساعت، میزان تولید گابا به ترتیب از ۶۷ ppm به ۱۷۳ ppm افزایش یافته‌است. این نتیجه می‌تواند به دلیل افزایش توده سلولی و در نتیجه بهبود تبدیل گلوتامیک اسید موجود در محیط توسط آنزیم‌های گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز باشد که با افزایش رشد و تعداد باکتری و نیز کاهش pH محیط شرایط بهینه برای آنزیم ایجاد شده و تولید افزایش می‌یابد. البته به مرور زمان و ورود به فاز مرگ و نیز عدم وجود شرایط مناسب رشد باکتری از میزان تولید کاسته می‌شود. نتایج فلاح و همکاران (۲۰۲۰) بر روی تولید گابا توسط باکتری لاکتوباسیلوس لاکتیس 1330 Nz^{۲۶} نشان می‌دهد که با افزایش زمان تخمیر از ۲۴ ساعت به ۷۲ ساعت بر میزان تولید گاما آمینوبوتیریک اسید افزوده‌شده که دلیل آن افزایش تعداد باکتری و بهبود بازده تبدیل مونوسدیم گلوتمات به گاباست [۳۲]. Kim و همکاران (۲۰۱۸) [۳۵] در پژوهشی بر روی باکتری *L. brevis* BJ-20 و بررسی تولید گابا نشان دادند که تولید گابا یک فرایند وابسته به زمان بوده و با افزایش زمان تخمیر به میزان تولید گابا افزوده شده‌است. Kook و همکاران در سال (۲۰۱۳) گزارش کردند که میزان گابا از ۸ تا ۴۸ ساعت انکوباسیون افزایش می‌یابد و دلیل آن را افزایش سطح و تعداد سلولهای زنده دانستند [۳۶]. Cagno و همکاران (۲۰۱۰) افزایش تولید گابا بوسیله لاکتوباسیلوس پلانتروم را به صورت فزاینده‌ای تا ۷۲ ساعت انکوباسیون گزارش کرده‌اند [۱]. Josefina و همکاران (۲۰۱۶) تولید گابا را یک فرایند وابسته به زمان دانسته و بیشترین میزان تولید را بعد از ۴۸ ساعت گزارش کردند که سلول وارد فاز رشد لگاریتمی شده و pH کاهش یافته و شرایط بهینه برای فعالیت کاتالیزت فراهم شده است [۳۷]. به عقیده Hiraga و همکاران (۲۰۰۸) در ادامه تخمیر تولید

27. *Lactobacillus acidophilus* NCFM

28. *Lactobacillus casei* LC301

29. *Lactobacillus helveticus* LH212

30. *Pyrococcus furiosus*

26. *Lactobacillus Lactis* Nz1330

باکتریها شامل گونه‌های پروبیوتیکی است که زنده‌مانی آنها عمدتاً تحت تاثیر توانایی آنها تحت شرایط و تنش‌هایی است که در طی مراحل گوناگون تخمیر با آن روبه‌رو می‌شوند. سازگار شدن میکروارگانیسم به تنش، می‌تواند با در معرض قرارگیری آنها در شرایط تنش زیر حد کشنده به وجود آید [۲۱]. میکروارگانیسم‌ها، برای شرایط ایده آل در محیط‌های فیزیولوژیک نرمال، بهینه‌سازی میکنند. هر تغییری در شرایط محیط از حالت بهینه، یک تنش روی ارگانیسم تحمیل می‌کند. اغلب باکتری‌ها، قادر به تحمل تغییرات کوچک در پارامترهای محیطی هستند و می‌توانند خودشان را دائماً با شرایط سازگار کنند. میکروارگانیسم‌ها این کار را با تغییر در بازدهی و ساخت مواد مناسب برای بقا یا تلاش برای مقاومت به تنش انجام می‌دهند [۱۷].

با استناد به شکل (a) ۲ مشخص شد که افزایش مونسدیم گلوتامات تا میزان ۴ گرم بر لیتر به ترتیب منجر به افزایش و بعد از آن کاهش تولید متابولیت شده‌است و با افزایش مدت زمان انکوباسیون، راندمان تولید متابولیت گابا افزایش یافته‌است. مطابق با نتایج گزارش شده به صورتی که شکل (a) ۲ نشان می‌دهد، بیشترین میزان تولید متابولیت در بالاترین زمان انکوباسیون (۷۲ ساعت) و میزان مونسدیم گلوتامات ۵ گرم بر لیتر بوده‌است و برهمکنش متغیر دمای شوک حرارتی و محتوای مونسدیم گلوتامات، بر راندمان تولید متابولیت اثر معنی‌داری نداشته‌است ($P > 0.05$). در شکل (b) ۲ نیز گزارش شد که تاثیر ترکیب مدت زمان گرمخانه‌گذاری و شوک حرارتی بر راندمان تولید متابولیت گابا تاثیر معنی‌دار نداشته‌است و بیشترین راندمان تولید گابا، در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد شوک حرارتی و بیشترین مدت زمان گرمخانه‌گذاری بوده‌است ($p \leq 0.05$). در شکل (c) ۲ و جدول ۱ گزارش شد که تاثیر ترکیبی دو متغیر محتوای مونسدیم گلوتامات و شوک حرارتی بر محتوای متابولیت گابا تولید شده تاثیر معنی‌دار نداشته‌است ($P > 0.05$). این یافته‌ها با نتایج پژوهش Cui و همکاران (۲۰۲۰) مبنی بر افزایش تولید گابا با افزایش میزان مونسدیم گلوتامات و کاهش تولید گابا با مقادیر اضافه تر آن [۴۶] و نتایج Cagno و همکاران (۲۰۱۰) مبنی بر تولید بیشترین میزان گابا در زمان انکوباسیون ۹۶-۷۲ ساعت [۱] مطابقت دارد.

سازگاری به شوک حرارتی ۳۷ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد در لاکتوباسیلوس پلانٹاروم باعث افزایش بقا باکتری در حضور حلال‌هایی مثل اتانول و بوتانول گردید [۴۰]. در طی شوک حرارتی دیواره سلولی آسیب می‌بیند و نقل و انتقال مواد به داخل سلول تسهیل می‌شود با این حال پروتئین‌های شوک حرارتی با ایجاد تاخوردگی در پروتئین‌های ساختاری از دنا توره شدن آنها در طی اعمال شوک حرارتی جلوگیری می‌کنند [۴۱]. Kang و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که ژن‌های پاسخ شوک حرارتی، وقتی بیان می‌شود از دنا توره شدن پروتئین‌ها در سلول حفاظت کرده و باعث ۲-۳ برابر شدن پروتئین‌ها و بالارفتن بقای سلول‌ها همراه با افزایش دمای غیر کشنده شده‌است. در این خصوص باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس HE-1^{۳۱} که در معرض شوک حرارتی ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه قرار گرفته‌بود، وقتی کشت داده‌شد، در مقایسه با گروه شاهد که هیچ رشدی در آن مشاهده نشد، دارای $\log \text{CFU/ml}$ ۵/۵۳ بود [۴۲]. Kim و همکاران (۲۰۰۹) اعلام کردند که برای تولید بیشینه گابا، نیازمند دانسیته سلولی بالا هستیم که این خود تابع دما و زمان انکوباسیون است [۲۶] و نتایج پورآذرنگ و همکاران (۲۰۰۷) مبنی بر این‌که اندازه‌گیری شاخص‌های pH، ویسکوزیته و زمان تخمیر ماست توسط استارترهای لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس در محصول نهایی در مقایسه با نمونه شاهد نشان می‌دهد که ثبات pH و کوتاه شدن زمان تخمیر در محصول نهایی و در طی زمان نگهداری در اثر ایجاد تغییراتی در ساختار و ترکیبات دیواره و غشاء سلولی باکتری‌های آغازگر در طی اعمال شوک سرما و گرما بوده و مدلینگ تغییرات زمان ایجاد شوک گرما گویای این است که به کارگیری ۵ تا ۸ دقیقه شوک حرارتی باعث افزایش میزان شاخص رشد CFU می‌گردد [۴۳]. Russ و همکاران (۲۰۱۲) اعلام کردند که در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد پروتئین‌های شوک حرارتی Hsp1 و Hsp3 در لاکتوباسیلوس پلانٹاروم افزایش شدیدی داشتند [۴۴]. همچنین wang و همکاران (۲۰۱۹) اعلام کردند، با انتقال ژن‌های پروتئین‌های شوک حرارتی به باسیلوس سابیتیلیس^{۳۲} افزایش دانسیته سلولی در ۴۸-۴۴ درجه سانتی‌گراد و کاهش مرگ سلولی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده‌است [۴۵]. خانواده‌های لاکتیک اسید

31. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HE-1
32. *Bacillus subtilis* 446

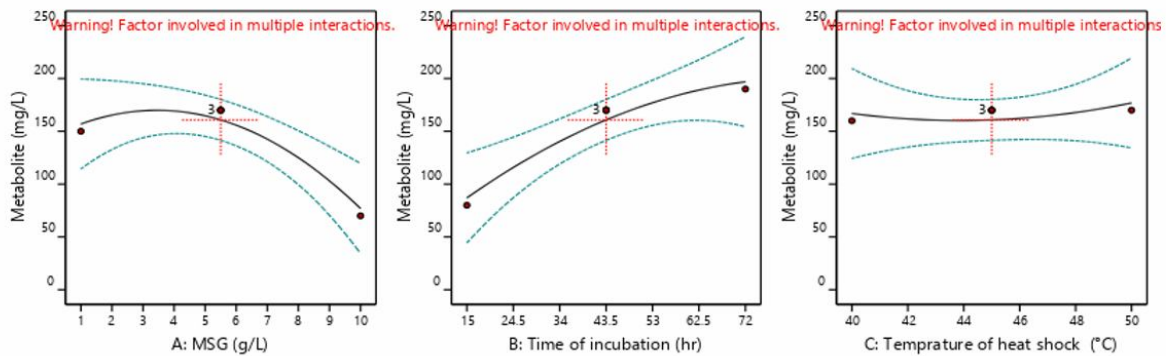


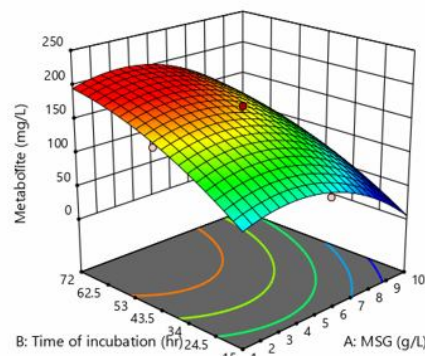
Fig 1 Variables Analysis of Gamma aminobutyric acid Production

(A): MSG is Mono sodium glutamate and metabolite in each section is gamma aminobutyric acid that reported in quantitative terms in part per million(ppm), variable analysis of monosodium glutamate showed that this substance has an effect on production rate up to 5.5% and with further increase, no more GABA will be produced.(B): As incubation time increases from 15 to 72 hours, GABA production is increased.(C): Thermal shock temperature in contrast to the incubation period has been effective and significant on the production of the metabolite.

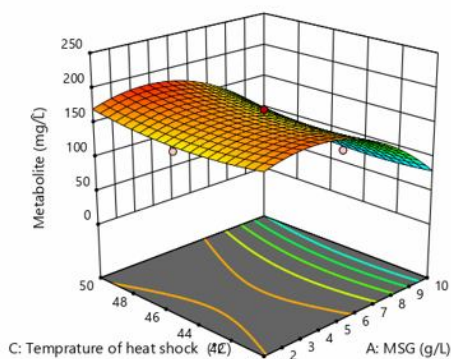
۳/۹۳۵ گرم بر لیتر مونوسدیم گلوتامات و شوک حرارتی معادل ۴۷/۵۶۲ درجه سانتی گراد در مدت ۳۰ دقیقه در فاز تاخیر، منجر به تولید ۱۹۸/۱۱۸ ppm متابولیت گابا خواهد شد.

۲-۳- بهینه‌سازی فرمولاسیون

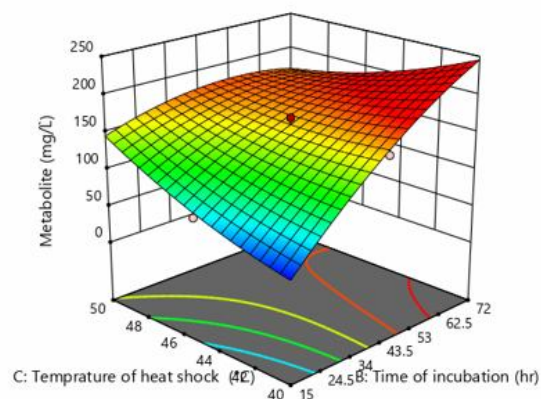
تولید حداکثری متابولیت گابا به عنوان هدف بهینه‌سازی شرایط تولید گابا در نظر گرفته شد و نتایج نشان داد که استفاده از



(a)



(b)



(c)

Fig 2 3D GABA production variables analysis

Table 2- Formule for the best GABA production conditions

| Number | MSG | Incubation time | Thermal shock temprature | Metabolit | Desirability | |
|--------|-------|-----------------|--------------------------|-----------|--------------|----------|
| 1 | 3.935 | 63.376 | 47.562 | 190.118 | 1.000 | Selected |
| 2 | 2.500 | 68.411 | 46.259 | 194.756 | 1.000 | |
| 3 | 4.800 | 50.889 | 40.852 | 191.884 | 1.000 | |
| 4 | 3.500 | 66.089 | 43.333 | 212.848 | 1.000 | |
| 5 | 3.417 | 68.927 | 47.717 | 190.302 | 1.000 | |

کاربرد دماهای متفاوت گرمخانه‌گذاری و خوراک دهی پلکانی مونوسدیم گلوتامات برای ایجاد شرایط پایدار تولید گابا، که قبلاً توسط پژوهشگران دیگر انجام شده است، تاثیر این موارد هم‌زمان با اعمال شوک حرارتی برای تولید بیشتر این محصول زیستی با ارزش، مورد بررسی قرار گیرد.

۵-قدردانی

به این وسیله مراتب قدردانی از پرسنل و کارشناسان آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، اعلام می‌گردد.

۶-منابع

- [1] Cagno, DR., Mazzacane, F., Rizzello, C., Angelis, M., Giuliani, G., Meloni, M., Servi, B., Gobetti, M. 2010. Synthesis of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86(2):731-41 .
- [2] Elliott, K., Jasper, HH. 1959. Gamma-aminobutyric acid. *Physiological reviews*, 39(2):383-406.
- [3] Chua, JY., Koh, MKP., Liu, SQ. 2019. Gamma-aminobutyric acid: a bioactive compound in foods. *Sprouted grains*, 25-54.
- [4] Dhakal, R., Bajpai, V.K., Baek KH. 2012. Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43:1230-1241.
- [5] 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.
- [6] Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momosed, H., Kimura, T. 2005. Production of

برای تایید فرمول حاصل، با استفاده از شرایط بهینه، میزان گابای تولیدی در سه تکرار بررسی شد و نتایج نشان داد که تولید متابولیت گابا در این شرایط، معادل $2/5 \pm 200$ میلی گرم بر کیلوگرم به دست آمد که با مقدار پیش بینی شده اختلاف معنی‌دار نداشته است ($p > 0.05$) و با مقدار حاصل از شرایط بدون هر گونه تیمار (۱/۱۶۵)، اختلاف معنی‌داری داشته است ($p \leq 0.05$) که نشان از تاثیر اعمال شوک حرارتی، محتوای مونوسدیم گلوتامات و مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری بر میزان تولید و استخراج متابولیت گاما آمینوبوتیریک اسید توسط باکتری لاکتوباسیلوس برویس *IBRC 10118* دارد.

با استفاده از روش سطح پاسخ و داده‌های حاصل از آزمایشها مدلی ارائه شده که معادله آن در زیر آورده شده است (معادله شماره ۱). در این معادله، X، مقدار پیش بینی شده متابولیت (گابا) است و ارتباط تجربی میان راندمان تولید گابا و متغیرهای مستقل با اعداد حقیقی را نشان میدهد.

(معادله ۱):

$$X = 162.05 - 40A + 54.5B - 42.25BC - 45.09A^2$$

۴-نتیجه گیری

مطابق نتایج به دست آمده از این پژوهش، اعمال شوک حرارتی که تاکنون اثر آن بر تولید این متابولیت بررسی نشده است، در جهت افزایش تولید متابولیت گاما آمینوبوتیریک اسید با توجه به پتانسیل خوب تولید زیستی این محصول از باکتری‌های خانواده لاکتیک اسید که اغلب پروبیوتیک نیز می‌باشند و ایجاد یک محصول GRAS برای مصارف انسانی می‌تواند ایده مناسبی باشد در این مقاله فقط اعمال شوک حرارتی بررسی شد و بهینه سازی برای سایر متغیرها انجام نشده است. پیشنهاد می‌شود با کاربرد متغیرهای بیشتری همچون منابع قند و نیتروژن مصرفی و

- gamma-aminobutyric acid (GABA) producing lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish (Plaa-som) in Nong Khai and its application in Thai fermented vegetables (Som-pak). *Food Science and Technology*, 490-483;(2)40
- [16] Broadbent, JR., Kleijn, R., Colzato, LS., Alkemade, A., Forstmann, BU., Nieuwenhuis, S. 1997. Attributes of the Heat Shock Response in Three Species of Dairy *Lactobacillus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 20(1):12-19.
- [17] Beales, N. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1):1-20.
- [18] Papadimitriou, K., Alegria, A., Bron, P.A., Angelis, M., Gobetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J.A., Linares, DM., Ross, P., Stanton, C., Turroni, F., Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zuniga, M, Tsakalidou, E., Kok, J. 2016. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010. 80(3): p. 837-90.
- [19] Cardoso, K., Gandra, R.F., Wisniewski, ES., Osaku, CA., Kadowaki, MK., Felipach, V., Haus, LFA., Simao, RCG. 2010. DnaK and GroEL are induced in response to antibiotic and heat shock in *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol*, 59(Pt 9):1061-1068.
- [20] Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, SD., Maguin, E. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1):187-216.
- [21] Shin, Y., Kang, CH., Kim, W., So, JS. 2019. Heat Adaptation Improved Cell Viability of Probiotic *Enterococcus faecium* HL7 upon Various Environmental Stresses. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 11(2):618-626.
- [22] Dogahe, MK., Khosravi, K., Tofghi, A., Dadgar, M., Mortazavian, A. 2015. Effect of process variables on survival of bacteria in probiotics enriched pomegranate juice. *Biotechnology Journal International*, 5(1):37-50.
- [23] Ketabchi, M., Iessazadeh, K., Massiha, A. 2017. Evaluate the inhibitory activity of ZnO nanoparticles against standard strains and isolates of *Staphylococcus aureus* and γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology*, 22(6):497-504.
- [7] Yunes, R., Poluektova, EU., Vasileva, EV., Odorskaya, MV., Marsova, MV., Kovalev, GI., Danilenko, VN. 2020. A multi-strain potential probiotic formulation of GABA-producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with antidepressant effects. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(3):973-979.
- [8] Ueno, H. 2000. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(1-3): 67-79.
- [9] Wu, Q., Shah, NP. 2017. High γ -aminobutyric acid production from lactic acid bacteria: emphasis on *Lactobacillus brevis* as a functional dairy starter. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(17):3661-3672.
- [10] Wong, CG., Bottiglieri, TO., Snead, C. 2003. 3rd, GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann Neurol*, 54 Suppl 6:3-12.
- [11] Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, Kimura, M., Sansawa, H. 2003. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European journal of clinical nutrition*, 57(3):490-495.
- [12] Zhang, Q., Zeng, L., Tan, X., Tang, J., Xiang, W. 2017. An Efficient γ -Aminobutyric Acid (GABA) Producing and Nitrite Reducing Ability of *Lactobacillus plantarum* BC114 Isolated from Chinese Paocai. *Food Science and Technology Research*, 23(5):749-755.
- [13] Chen, L., Zhao, H., Zhang, C., Lu, Y., Zhu, X., Lu, Z. 2016. γ -Aminobutyric acid-rich yogurt fermented by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophiles* fmb5 appears to have anti-diabetic effect on streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of Functional Foods*, 20:267-275.
- [14] Watanabe, Y., Hayakawa, K., Ueno, H. 2011. Effects of co-culturing LAB on GABA production. *J. Biol. Macromol*, 11:3-13.
- [15] Tanamool, V., Hongsachart, P., Soemphol., W. 2020. Screening and characterisation of

- [33] Zhong, Y., Wu, S., Chen, F., He, M., Lin, J. 2019. Isolation of high gamma-aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and fermentation in mulberry leaf powders. *Exp Ther Med*, 18(1):147-153.
- [34] Zareie, Z., Tabatabaei yazdi, F., Mortazavi, SA. 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.
- [35] Kim, DH., Dasagrandhi, C., Park, SK., Eom, SH., Huh, MK., Mok, JS., Kim, YM. 2018. Optimization of gamma-aminobutyric acid production using sea tangle extract by lactic acid bacterial fermentation. *Lwt*, 90:636-642.
- [36] Kook, MC., Cho, SC. 2013. Production of GABA (gamma amino butyric acid) by Lactic Acid Bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 33(3):377-389.
- [37] Villegas, JM., Brown, L., Giori, GS., Hebert, EM. 2016. Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough. *LWT-Food Science and Technology*, 67:22-26.
- [38] Hiraga, K., Ueno, Y., Oda, K. 2008. Glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: activation by ammonium sulfate. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 0803250825-0803250825.
- [39] Esteves, A.M., Graca, G., Peyriga, L., Torcato, I.M., Borges, N., Portais, J.C., Santos, H. 2019. Combined transcriptomics-metabolomics profiling of the heat shock response in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Extremophiles*, 23(1):101-118.
- [40] Fiocco, D., Capozzi, V., Goffin, P., Hols, P., Spano, G. 2007. Improved adaptation to heat, cold, and solvent tolerance in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 77(4):909-15.
- [41] Suo, Y., Luo, S., Zhang, Y., Liao, Z., Wang, J. 2017. Enhanced butyric acid tolerance and production by Class I heat shock protein-overproducing *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 44(8):1145-1156.
- Escherichia coli isolated from food sample. *JFM*, 4(1):63-74.
- [24] Sokouti, R., Shavakhi, F., Dadkhah, SA. 2017. Survival of *Lactobacillus Acidophilus* & *BifidoBacterium lactis* and their effect on apple juice. *Inovation in food science*, 9(4):10-31.
- [25] Le, PH., Verscheure, L., Thien, T., Verheust, Y., Raes, K. 2020. Implementation of HPLC Analysis for γ -Aminobutyric Acid (GABA) in Fermented Food Matrices. *Food Analytical Methods*, 13(5):1190-1201.
- [26] Kim, JY., Lee, MY., Ji, GE., Lee, Y.S., Hwang, KT. 2009. Production of gamma-aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *Int J Food Microbiol*, 130(1):12-6.
- [27] Zarei, F. 2020. Production of Gamma-Aminobutyric Acid (Gaba) in Whey Protein Drink during Fermentation by *Lactobacillus Plantarum*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(6):1087-1092.
- [28] Binh, T.T., Ju, WT., Jung, WJ., Park, RD. 2014. Optimization of gamma-amino butyric acid production in a newly isolated *Lactobacillus brevis*. *Biotechnol Lett*, 36(1):93-8.
- [29] Chunlong, P., HUANG, J., Sheng, H., Weirui, Z., Shanjing, Y., Lehe, M. 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.
- [30] Li, H., Cao, Y. 2010. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids*, 16-1107;7(5)39.
- [31] Zarei, F., Nateghi, L., Eshraghi, MR., Tajabadi, M. 2018. Optimization of gamma-aminobutyric acid production in probiotics extracted from local dairy products in west region of Iran using MRS broth and whey protein media. *Applied Food Biotechnology*, 5(4):233-242.
- [32] Falah, F., Vasiee, A., Mortazavi, SA. Gamma-aminobutyric acid Synthesis by *Lactococcus lactis* strain Nz1330 in Dairy sludge medium with Monosodium glutamate. *Food Science and Technology*, 16(97):89-100.

- DeltactsR mutant strains under physiological and heat stress conditions. *Int J Mol Sci*, 13(9):10680-96.
- [45] Wang, J., Wang, S., Liu, H., Zhang, D., Wang, Y., Ji, H. 2019. Improvement of stress tolerance and riboflavin production of *Bacillus subtilis* by introduction of heat shock proteins from thermophilic bacillus strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(11):4455-4465.
- [46] Cui, Y., Miao, K., Niyaphorn, S., Qu, X. 2020. Production of Gamma-Aminobutyric Acid from Lactic Acid Bacteria: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*, 21(3).
- [42] Kang, GS., Siziya, IN., Seo, DH. 2020. Production of LAB-Fermented Rice Beverage with Enhanced GABA Content. *Current Topic in Lactic Acid Bacteria and Probiotics*, 2(6):56-63.
- [43] Poor azarang, H., Tabatabaei yazdi, F., MORTazavi, A. Nasiri mahalati, M. 2007. Modeling of the effect of thermal shock (cold and heat) on the growth of starter bacteria and investigation of physicochemical properties of the product. *Agricultural Sciences and Industries*, 20(6): 227-232.
- [44] Russo, P., Mohedano, M., Capozzi, V., Palencia, PF., Lopez, P. Spano, G., Fiocco, D. 2012. Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and



Optimization and Modeling of Gamma Aminobutyric Acid (GABA) Extraction Conditions from *Lactobacillus brevis* IBRC10818 Affected by Heat Shock by Response Surface Methodology

Rezaei, M. ¹, Ghasemi, Y. ², Sharifan, A. ^{3*}, Bakhoda, H. ⁴

1. PhD. Student, Department of Food Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology and Pharmaceutical science Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
3. Associated Professor, Department of Food Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Mechanization, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received 2021/02/21
Accepted 2021/08/22

Keywords:

Stress,
incubation,
Lactobacillus,
Response Surface Method.

DOI: 10.52547/fsct.18.09.14

*Corresponding Author E-Mail:
a_sharifan2000@yahoo.com

Gamma aminobutyric acid is a non-protein amino acid found in the tissues of microorganisms, plants, animals, and humans. Lower blood pressure, therapy for insomnia, anxiety, depression, and diuretics are some of the physiological properties of gamma aminobutyric acid. Due to the increasing demand for GABA, various chemical and biological methods of its production are under study. Among all these efforts, GABA biosynthesis seems to be the most promising and easiest method of production. In this study, the effect of heat shock on the production of gamma aminobutyric acid in *Lactobacillus brevis* IBRC10818 was investigated. For optimizing production, the amount of monosodium glutamate was applied at three levels of 1, 5.5, and 10 % and used heat shock at three temperatures of 40, 45, and 50 °C for 30 minutes in the lag phase of microbial growth. What measured the amount of GABA produced in the interval time at 15, 43/5, and 72 hours with incubation in 37° C. The highest GABA production was measured in *Lactobacillus Brevis* IBRC10818 with 3/935% of monosodium glutamate at heat shock in 47.56 °C 63.37 hours of incubation .