مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بهینه‌سازی و مدل‌سازی شرایط استخراج گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا) از باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* *IBRC۱۰۸۱۸* 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،

اطلاعات مقاله

تاریخ های 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

چکیده

گاماآمینوبوتیریک‌اسید(گابا)، یک اسیدآمینه غیرپروتئینی است که تقریبا در بافت‌های اغلب میکروارگانیسم‌ها، گیاهان، جانوران و انسان‌ها یافت می‌شود. کاهش فشارخون، درمان بی‌خوابی، اضطراب، افسردگی و ادرارآور 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 گاماآمینوبوتیریک اسید، در باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* *IBRC۱۰۸۱۸* مورد بررسی قرارگرفت. برای بهینه‌سازی تولید، میزان مونوسدیم گلوتامات در سه سطح ۱و ۵/۵ و ۱۰ گرم بر لیتر و شوک حرارتی در سه دمای ۴۰ و ۴۵ و ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در فاز تاخیر رشد میکروبی اعمال شد و میزان گاماآمینوبوتیریک اسید تولیدی در بازه زمانی ۱۵، ۴۳/۵ و۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری گردید. بیشترین میزان تولید گابا با افزودن ۳/۹۳۵ گرم بر لیتر مونوسدیم گلوتامات در شوک دمایی ۴۷/۵۶ درجه سانتی گراد و در مدت انکوباسیون ۶۳/۳۷ ساعت در *لاکتوباسیلوس برویس* *IBRC۱۰۸۱۸* اندازه گیری شد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.118.19.7]

[DOI: 10.52547/fsct.18.118.167]

۱- مقدمه

گاماآمینوبوتیریک‌اسید(گابا)[1]، به عنوان یک محصول زیستی در ۱۹۱۰ بوسیله آکرمن[2] و کوشر[3] شناسایی شد. آنها کشف کردند که این ماده از اسید گلوتامیک[4] [۱] ایجاد می‌شود. در ۱۹۵۰ اودنفرد[5] این ماده را در مغز انسان شناسایی کرد [۲].

گابا یک اسیدآمینه ٤ کربنه غیرپروتئینی است که تقریبا 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 [٤]. گابا به صورت کلی و عمدتا در حضور ال-گلوتامات[6] و از طریق آلفا کربوکسیلاسیون[7] کاتالیز شده غیر قابل برگشت به‌وسیله آنزیم گلوتامیک‌اسیددکربوکسیلاز(GAD)[8] [۵] در باکتری‌های اسید لاکتیکی (LAB) سنتز می‌شود[٦]. 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[9]، لاکتوباسیلوس پلانتاروم[10]، لاکتوباسیلوس فرمنتوم[11]، لاکتوباسیلوس روتری[12] و غیره وجود دارد [۹]. آمینواسید 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 [٤].

روش‌های مختلف شیمیایی و بیولوژیک برای تولید آن مورد بررسی قرارگرفته‌است که در میان همه آنها، بیوسنتز گابا، بهترین و ساده‌ترین آنهاست [١٤]. باکتری‌های اسید لاکتیکی، به طور گسترده ای گابا را از طریق تخمیر تولید می‌کنند[۱۵]. در میان این خانواده، *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس بوخنری*[13]، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس رامنوزوس*[14] 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)[15] 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، تنشی را روی میکروارگانیسم تحمیل می‌کند [١٦]. 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 به‌وسیله ساخت مواد مناسب برای بقا یا تلاش برای ایجاد شرایط مقاومت به تنش، انجام می دهند[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 درشرایط سخت پایداری نشان دهند و تغییرات سریع محیطی را تحمل کنند. پاسخ به تنش‌های باکتریایی بر اساس بیان ژن‌هایی‌است 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 HL7*[16] در طول سازگاری با گرما، می‌تواند بقا خود را با سنتز پروتئین‌هایی که با گرما القا می شوند و ۱۰۰ کیلودالتون وزن دارند و احتمالا مرتبط با پروتئین‌های شوک گرمایی HSP100[17] 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 ممانعت کننده‌های HrcA، به توالی اپراتورهای دو

1. Gamma Aminobutyric Acid(GABA)
2. Ackermann
3. Kosher
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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.118.19.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.118.167]

سره CIRCE باند می‌شوند. ب) ژنهای Class II که تحت کنترل فاکتور B σ 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 IBRC۱۰۸۱۸* [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)، گاماآمینوبوتیریک اسید سیگماآلدریچ (Sigma-Aldrich) (آلمان). سویه *لاکتوباسیلوس برویس IBRC۱۰۸۱۸* 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 IBRC۱۰۸۱۸* ، 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 انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد تا توده سلولی در محیط مایع دیده‌شود. 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 ٤٪ 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 کدورت سنجی مک‌فارلند استفاده شد. کدورت محیط مایع که حاوی سوسپانسیون میکروبی بود، با استانداردی 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٪ (۰/۳٦نرمال) و ۰/۰۵میلی لیتر، کلرید باریوم۱/۷۵٪ (۰/٤۸۰ مولار) است. کدورت این استاندارد برابر با سوسپانسیون باکتریایی معادل $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ml[21] می‌باشد. جذب محلول نیم مک فارلند، در طول موج ٦۰۰ نانومتر،۰/۱ است [٢٤]. از پیش‌کشت آماده شده باکتری *لاکتوباسیلوس برویس IBRC۱۰۸۱۸*، 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.

۲-٤- 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

18. Lactobacillus brevis IBRC10818

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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.118.19.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.118.167]

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 ۳۰۰و۲۵۰و۲۰۰و۱۵۰و۵۰ قسمت در میلیون از یک محلول مادر ۵۰۰ قسمت در میلیون، به‌وسیله 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 درپیچ دار به مقدار ۰/۱ میلی لیتر سوپرناتانت[23] میکروبی (محلول تهیه شده از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ نمودن لوله آزمایش حاوی کشت میکروبی ، تحت ٤۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد)، مخلوطی از محلول شامل ۰/۲ میلی لیتر بافربورات 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 ٦٪ (٦ گرم از پودر فنل که به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده می‌شود) افزوده و پس از افزودن ۰/٤ 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[24] آن در ٦۳۰ 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.

۲-٦- تجزیه وتحلیل آماری

به منظور بهینه‌سازی شرایط استخراج گاماآمینوبوتیریک اسید، با هدف رسیدن به بالاترین میزان متابولیت از سه متغیر دما (تیمار شوک حرارتی) ٤۰،٤۵و ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه، بر روی محیط کشت‌هایی با میزان متفاوت مونوسدیم گلوتامات ۱، ۵/۵ و ۱۰ گرم بر لیتر، در فاز تاخیر رشد میکروبی و زمان انکوباسیون ۱۵ و ٤۳/۵ و ۷۲ ساعت استفاده شد. طرح مورد 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 (۰/۰۵) *p* value 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 (نسخه۲۱) 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 داده‌شده‌است که رشد سلول و تولید گابا، شدیدا تحت تاثیر شرایط کشت مثل pH و دماست [١٤]. چرا که برای تولید بیشینه گابا نیازمند دانسیته بالای سلولی هستیم و دما نقش اساسی در رشد توده سلولی دارد [٢٦]. 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 مونوسدیم گلوتامات (MSG) بر میزان تولید گابا اثر گذار است که با نتایج زارعی و همکاران (۲۰۲۰) [۲۷]، Binh و همکاران (۲۰۱٤) [۲۸] و Chunlung و همکاران (۲۰۱۳)[۲۹] مطابقت داشت. جهت تعیین روند تغییرات تولید گاماآمینوبوتیریک اسید و بررسی اثر هر یک از متغیرهای مستقل، در ابتدا نیاز به تعیین مناسب‌ترین مدل جهت برازش داده‌های آزمون می‌باشد. از نظرآماری مدلی مناسب است که آزمون عدم برازش آن معنی دار نبوده، R2 و R2 اصلاح شده[25] دارای بالاترین مقدار باشد. نزدیکی R^2 به ۱۰۰ درصد نشان‌گر همبستگی مناسب مدل تجربی و داده‌های به‌دست 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.

23. Supernatant
24. Optical Density
25. Adjusted R

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.118.19.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.118.167]

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-Temprature 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	
A^2	4921.95	1	4921.95	25.21	0.0152	
B^2	913.33	1	913.33	4.68	0.1193	
C^2	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						
R^2	0.9800					
Adjusted R^2	0.9200					

در شرایط بدون شوک گرمایی، در حضور ۵٪ مونوسدیم گلوتامات، و در دمای انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی گراد، پس از ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، ۱۶۵/۱ قسمت در میلیون گابا حاصل شد که با نتایج Li و همکاران (۲۰۱۰) مبنی بر تولید ۱۷۵/۲۸ قسمت در میلیون گابا در *لاکتوباسیلوس برویس* ۹۱۲ *NCL* [۳۰] و نیز زارعی و همکاران (۲۰۱۸) مبنی بر تولید ppm ۲٤/ ۱۱۵ گابا بدون بهینه‌سازی شرایط تولید و ppm ۱۷۰/٤ گابا در *L. plantarum* [۳۱] تحت شرایط بهینه‌سازی رشد هم‌خوانی داشت.

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

همان‌گونه که شکل 1-A و جدول ۱ نشان داده‌است، میزان مونوسدیم گلوتامات بر میزان تولید گاماآمینوبوتیریک اسید تاثیر معنی‌دار داشته‌است ($P\leq0.05$). به گونه‌ای که با افزایش مونوسدیم گلوتامات تا ٤ درصد، بیشترین میزان تولید متابولیت گابا در باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* *IBRC۱۰۸۱۸* مشاهده‌شد(ppm ۱۷۵). هم‌چنین با استناد به شکل 1-A با افزایش بیشتر میزان مونوسدیم گلوتامات، راندمان تولید متابولیت گابا کاهش داشته است به گونه ای که در محتوای ۱۰ درصد مونوسدیم گلوتامات، میزان تولید گابا حداقل بوده‌است (ppm ۱۵۰). نتایج این پژوهش منطبق با نتایج Chua و همکاران (۲۰۱۹) است که نشان دادند، افزودن مکمل گلوتامات در طول تخمیر باکتری‌های‌اسیدلاکتیکی، برتولید 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) بیـان کردنـد کـه فعالیت آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسلاز با افزایش گلوتامیک اسـید افـزایش یافتـه و ایـن عامل مهمی در افزایش تولید گابا می‌باشـد [۳۲]. Binh و همکاران (۲۰۱٤) در پژوهشی نشان دادند که با افزایش مونوسدیم گلوتامات از ٤ به ٦ درصد وزنی/حجمی میزان تولید گابا در لاکتوباسیلوس برویس افزایش معنی داری از mg/ml ۲۷ به mg/ml ۳۱ داشته ولی در بالای ۸ درصد تولید گابا کاهش یافت به گونه ای که در ۱۰ درصد مونوسدیم گلوتامات میزان گابا به mg/ml ۲٤ 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.118.19.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.118.167]

لاکتوباسیلوس برویس با افزایش میزان مونوسدیم گلوتامات از mM ۲۷۰-۰ افزایش یافته است [۳٤].

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 ($P\leq0.05$). با استناد به شکل 1-B، با افزایش زمان انکوباسیون از ۱۵ تا ۷۲ ساعت، میزان تولید گابا به ترتیب از ppm ٦۷ به ppm ۱۷۳ 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[26] نشان می‌دهد که با افزایش زمان تخمیر از ۲٤ ساعت به ۷۲ ساعت بر میزان تولید گاما آمینوبوتیریک اسید افزوده‌شده که دلیل آن افزایش تعداد باکتری و بهبود بازده تبدیل مونوسدیم گلوتامات 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 ٤۸ ساعت انکوباسیون افزایش می‌یابد و دلیل آن را افزایش سطح و تعداد سلولهای زنده دانستند [۳٦]. Cagno و همکاران (۲۰۱۰) افزایش تولید گابا بوسیله لاکتوباسیلوس پلانتاروم را به صورت فزاینده ای تا ۷۲ ساعت انکوباسیون گزارش کرده اند [۱]. Josefina و همکاران (۲۰۱٦) تولید گابا را یک فرایند وابسته به زمان دانسته و بیشترین میزان تولید را بعد از ٤۸ ساعت گزارش کردند که سلول وارد فاز رشد لگاریتمی شده و pH کاهش یافته و شرایط بهینه برای فعالیت کاتالیست فراهم شده است [۳۷]. به عقیده Hiraga و همکاران (۲۰۰۸) در ادامه تخمیر تولید 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 پلانتاروم را ۷۲ ساعت گزارش کرده‌اند [٤].

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 ($P\leq0.05$). 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 ٦۳-٥٤ درجه سانتیگراد در لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس NCFM[27] و لاکتوباسیلوس کازئی lC301 [28] و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس LH212[29] باعث بهبود در توانایی رشد در فاز لگاریتمی باکتری‌ها به ترتیب ۱۱و۵ و۲۷ برابر گردید [۱٦]. 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 فوریوسوس[30] تحت بررسی قرار دادند و با اندازه گیری ۳۷ متابولیت از جمله مونوزیل گلیسراتها، برخی استیل گلوکزآمینها و ترکیبات سازنده دیواره سلولی، که در طی شوک حرارتی تخریب شده‌اند نشان دادند که افزایش قابل ملاحظه ای در این متابولیت‌ها وجود داشته و تخریب مواد حاصل از بیوسنتز و نقل‌وانتقال آمینواسیدها، میتواند باعث دسترسی‌پذیری به برخی اسیدهای‌آمینه باشد [۳۹]. تغییراتی که در دیواره سلولی طی تخریب در شوک حرارتی به وجود می‌آید می‌تواند باعث بهبود نقل وانتقال مواد لازم برای ایجاد یک متابولیت گردد. Fiocco و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که افزایش سه نوع از پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک، در اثر

26. *Lactobacillus Lactis Nz1330*

27. *Lactobacillus acidophilus NCFM*
28. *Lactobacillus casei* LC301
29. *Lactobacillus helveticus* LH212
30. *Pyrococcus furiosus*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.118.19.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.118.167]

سازگاری به شوک حرارتی ۳۷ و ۴۰ درجه سانتی گراد در لاکتوباسیلوس پلانتاروم 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 دناتوره شدن آنها در طی اعمال شوک حرارتی جلوگیری می‌کنند [۴۱]. Kangو همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که ژن‌های پاسخ شوک حرارتی، وقتی بیان می‌شود از دناتوره 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 لاکتوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس HE-1 [31] 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 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 به‌کارگیری 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 پلانتاروم افزایش شدیدی داشتند [۴۴]. همچنین wang و همکاران (۲۰۱۹) اعلام کردند، با انتقال ژن‌های پروتئین‌های شوک حرارتی به باسیلوس سابتیلیس ۴۴۶[32] افزایش دانسیته سلولی در ۴۸-۴۴ درجه سانتیگراد و و کاهش مرگ سلولی در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد مشاهده شده‌است [۴۵] .خانواده‌های لاکتیک اسید باکتریها شامل گونه‌های پروبیوتیکی است که زنده‌مانی آنها عمدتا 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 به‌وجود 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 دائما با شرایط سازگار کنند. میکروارگانیسم‌ها این کار را با تغییر دربازدهی 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 مونوسدیم 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 مونوسدیم گلوتامات ۵ گرم بر لیتر بوده‌است و برهمکنش متغیر دمای شوک حرارتی و محتوای مونوسدیم گلوتامات، بر راندمان تولید متابولیت اثر معنی‌داری نداشته‌است($P>0.05$). در شکل (b) ۲ نیز گزارش شد که تاثیر ترکیب مدت زمان گرمخانه گذاری و شوک حراتی بر راندمان تولید متابولیت گابا تاثیر معنی‌دار داشته‌است و بیشترین راندمان تولید گابا، در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد شوک حرارتی و بیشترین مدت زمان گرمخانه‌گذاری بوده‌است ($p\leq0.05$). در شکل (c) ۲ و جدول ۱ گزارش شد که تاثیر ترکیبی دو متغیر محتوای مونو سدیم گلوتامات و شوک حرارتی بر محتوای متابولیت گابا تولید شده تاثیر معنی‌دار نداشته‌است ($P>0.05$). این یافته ها با نتایج پژوهش Cui و همکاران (۲۰۲۰) مبنی بر افزایش تولید گابا با افزایش میزان مونوسدیم 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.

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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.118.19.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.118.167]

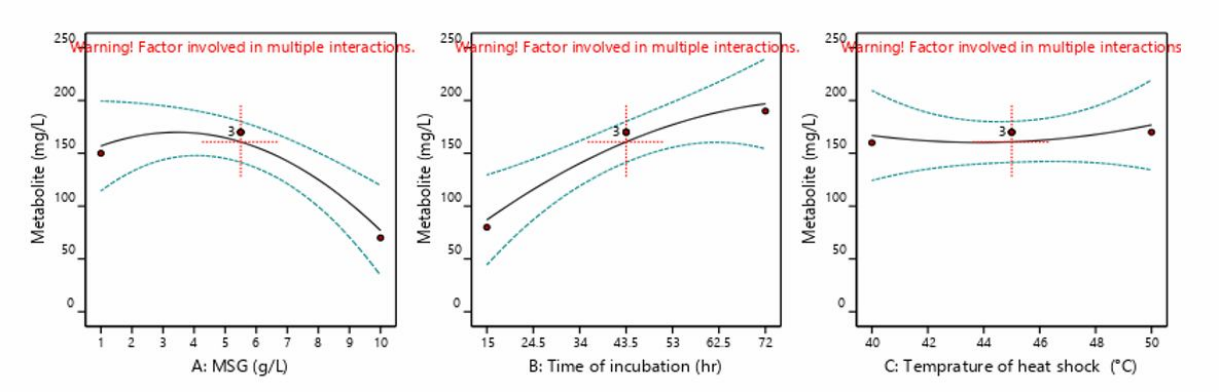
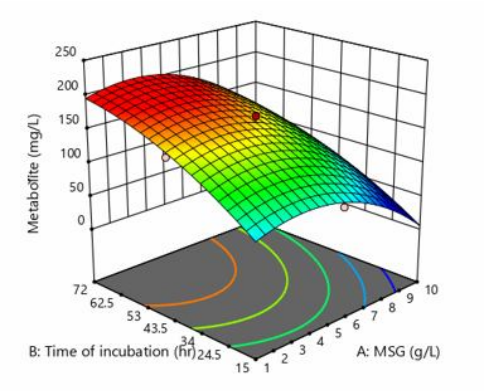


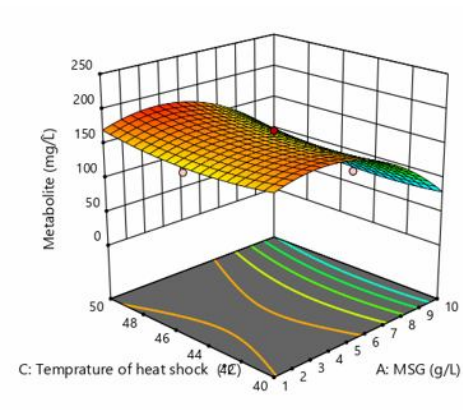
Fig 1 Variables Analysis of Gamma aminobutyric acid Production
(A): MSG is Mono sodium glutamate and metabolite in each section is gamma aminobutyric acid that reported in quantitative terms in part per milion(ppm), variable analysis of monosodium glutamate showed that this substance has an effect on 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.

۳-۲- بهینه‌سازی فرمولاسیون

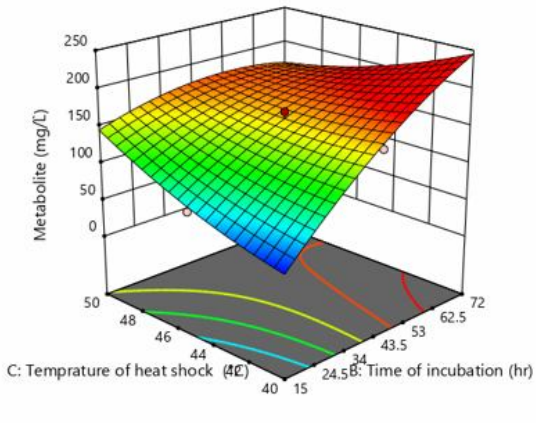
تولید حداکثری متابولیت گابا به عنوان هدف بهینه‌سازی شرایط تولید گابا در نظر گرفته شد و نتایج نشان داد که استفاده از ۳/۹۳۵ گرم بر لیتر مونوسدیم گلوتامات و شوک حرارتی معادل ٤٧/٥٦٢ درجه سانتی گراد در مدت ۳۰ دقیقه در فاز تاخیر، منجر به تولید ppm ۱۹۸ /۱۱۸ متابولیت گابا خواهد شد.



(a)



(b)



(c)

Fig 2 3D GABA production variables analysis

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.118.19.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.118.167]

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	

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، معادل۲/۵ ± ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به دست آمد که با مقدار پیش بینی شده اختلاف معنی‌دار نداشته‌است ($p>0.05$) و با مقدار حاصل از شرایط بدون هر گونه تیمار(۱۶۵/۱)، اختلاف معنی‌داری داشته‌است ($p\leq0.05$) 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 IBRC۱۰۸۱۸* دارد.

با استفاده از روش سطح پاسخ و داده های 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):

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

٤-نتیجه گیری

مطابق نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، اعمال شوک حرارتی که تاکنون اثر آن بر تولید این متابولیت بررسی نشده‌است، در جهت افزایش تولید متابولیت گاماآمینوبوتیریک اسید با توجه به پتانسیل خوب تولید زیستی این محصول از باکتری‌های خانواده لاکتیک اسید که اغلب پروبیوتیک نیز می باشند 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 نشده‌است. پیشنهاد می‌شود با کاربرد متغیرهای بیشتری همچون منابع قند و نیتروژن مصرفی و کاربرد دماهای متفاوت گرمخانه‌گذاری و خوراک دهی پلکانی مونوسدیم گلوتامات برای ایجاد شرایط پایدار تولید گابا، که قبلا 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.

٥-قدردانی

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

٦-منابع

[1] Cagno, DR., Mazzacane, F., Rizzello, C., Angelis, M., Giuliani, G., Meloni, M., Servi, B., Gobbetti, 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.118.19.7]

[DOI: 10.52547/fsct.18.118.167]

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., Gobbetti, 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., Tofighi, 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 apprars 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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.118.19.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.118.167]

[24] Sokouti, R., Shavakhi, F., Dadkhah, SA. 2017. Survival of Lactobacillus Acidophillus & 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.

[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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.118.19.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.118.167]

[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 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).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-19]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.118.19.7]
[DOI: 10.52547/fsct.18.118.167]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-04-19]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.118.19.7]

[DOI: 10.52547/fsct.18.118.167]

Optimization and Modeling of Gamma Aminobutyric Acid (GABA) Extraction Conditions from Lactobacillus brevisIBRC10818 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 Pharmacutical Biotechnology and Pharmacutical science Reaserch Center,Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
3. Assosiated 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.

ARTICIE INFO

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

ABSTRACT

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 brevisIBRC10818 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 .