Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Food Processing and Preservation Journal

Print ISSN: 2423-3544
Online ISSN: 2423-3803

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

Gamma-aminobutyric acid production by Lactobacillus brevis NCL912 in whey enriched with glutamic acid

Somayeh Mohammadkhani[1], Reza Rezaei Mokarram[2*], Mahmood Sowti Khiabani[3], Samad Bodbodak[4]

[1] MSc student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2] Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Email: rmokarram@tabrizu.ac.ir
[3] Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[4] Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2024-11-25
Revised: 2025-1-12
Accepted: 2025-1-16

Keywords:
GABA
Lactobacillus brevis NCL912
Whey
Antioxidant activity
Total phenols

ABSTRACT

Background and Objectives: Gamma-aminobutyric acid (GABA) as a bioactive compound has a wide range of biological activities. Therefore, functional foods enriched with GABA have been widely considered by consumers. Whey is the most important waste product of the cheese-making industry and is considered a rich culture medium for probiotics. Among the various methods of GABA synthesis, GABA biosynthesis by fermentation using probiotics has been proposed as the simplest and safest method. Therefore, the aim of this study is to improve GABA production by Lactobacillus brevis NCL912 in whey enriched with different concentrations of glutamic acid.

Materials & Methods : After preparing the culture medium from whey powder, different concentrations of glutamic acid (0, 250, 500, 1000 mg L^{-1}) were added to it. Then, a suspension of Lactobacillus brevis NCL912 strain (containing 108 CFU/g) was inoculated into the whey samples and placed in an incubator at 37°C, and the antioxidant activity, total phenol, GABA, and bacterial viability were examined at 24, 48, and 72 h.

Results: The results showed that with the passage of time, the antioxidant activity increased, but the total phenol and GABA levels increased up to 48 hours and then decreased up to 72 h. With the increase in the concentration of glutamic acid, the antioxidant activity and GABA levels both increased first and then decreased, but the total phenol level increased. The passage of time and the increase in the concentration of glutamic acid had no effect on survival. Based on the results, the lowest and highest levels of GABA were obtained for samples with concentrations of 0 mg L^{-1} - 24 h (401±1.1 mg L^{-1}) and 1000 mg L^{-1} -72 h (591.3±2.6 mg L^{-1}). The results of the analysis of variance showed that the time factor had no significant effect on the level of GABA ($P < 0.05$), but with the increase in the amount of glutamic acid, the level of GABA increased significantly ($P \geq 0.05$). As the highest value was observed

at a concentration of 1000 mg L^{-1}. Based on the results of analysis of variance and comparison of means, no significant difference was observed in the overall comparison of samples in terms of antioxidant activity, total phenol, GABA, and viability ($P<0.05$), but only in the sample treated with a concentration of 0 mg L-1 of glutamic acid after 24 h, the DPPH inhibition and viability were significant ($P\geq 0.05$).

Conclusion: The results showed that the use of the respective strain in whey containing different concentrations of glutamic acid led to an increase in the amount of GABA. The samples also had better antioxidant activity, total phenols, and shelf life. Therefore, whey can be used to prepare a probiotic fermented drink enriched with this bioactive compound.

Cite this article: Mohammadkhani, S., Rezaei Mokarram, R., Sowti Khiabani, M., Bodbodak, S. 2025. Gamma-aminobutyric acid production by Lactobacillus brevis NCL912 in whey enriched with glutamic acid. *Food Processing and Preservation Journal*, 16(4), 21-42.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/fppj.2025.23013.1849
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

فرآوری و نگهداری مواد غذایی
شاپا چاپی: ۳۵٤٤-۲٤۲۳
شاپا الکترونیکی: ۳۸۰۳-۲٤۲۳

تولید گاما آمینو بوتیریک اسید توسط لاکتوباسیلوس برویس NCL912 در آب پنیر غنی شده با اسید گلوتامیک

سمیه محمدخانی[۱]، رضا رضایی‌مکرم[۲*]، محمود صوتی خیابانی[۳]، صمد بدبدک[٤]

[۱] دانشجوی ارشد زیست‌فناوری مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[۲] دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
رایانامه: rmokarram@tabrizu.ac.ir
[۳] استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[٤] دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/۰۹/۰۵
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۳/۱۰/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۳/۱۰/۲۷

واژه‌های کلیدی:
گابا
لاکتوباسیلوس برویس NCL912
آب پنیر
فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنول کل

چکیده

سابقه و هدف: گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) به‌عنوان ترکیب زیست فعال دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیستی است. بنابراین غذاهای فراسودمند غنی شده با گابا به طور گسترده مورد توجه مصرف‌کنندگان قرار گرفته است. در میان روش‌های مختلف سنتز گابا، بیوسنتز گابا به روش تخمیر توسط پروبیوتیک‌ها ساده‌ترین و امن‌ترین روش مطرح شده است. آب پنیر مهم‌ترین ضایعات صنعت پنیر سازی است و به‌عنوان محیط کشت غنی برای پروبیوتیک‌ها مطرح می‌باشد. ازاین‌رو هدف این تحقیق، بهبود تولید گابا توسط *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* در آب پنیر غنی شده با غلظت‌های مختلف اسید گلوتامیک است.

مواد و روش‌ها: بعد از آماده‌سازی محیط کشت از پودر آب پنیر، غلظت‌های مختلف اسیدگلوتامیک (۰ mg L^{-1}، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰) به آن اضافه شد. در ادامه سوسپانسیون سویه *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* (حاوی 10^8 CFU/g) به نمونه‌های آب پنیر تلقیح و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و در بازه‌های زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنول کل، گابا و زنده مانی باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که با گذشت زمان میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت اما میزان فنول کل و گابا تا ٤۸ ساعت روند صعودی و سپس تا ۷۲ ساعت روند نزولی داشتند. با افزایش غلظت اسید گلوتامیک میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و گابا در هر دو ابتدا افزایش سپس کاهش را نشان دادند اما میزان فنول کل افزایش یافت. گذشت زمان و افزایش غلظت اسید گلوتامیک تاثیری بر زنده مانی نداشت. بر اساس نتایج کمترین و بیشترین میزان گابا به ترتیب مربوط به نمونه‌های غلظت‌های mg L^{-1} صفر –۲٤ ساعت (٤۰۱/۰ ±۱/۱ mg L^{-1}) و ۷۲–۱۰۰۰ mg L^{-1}

ساعت ($mg\ L^{-1}$ ۲/٦± ۵۹۱/۳) به دست آمد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که فاکتور زمان اثر معنی‌داری بر میزان گابا ندارد (P>۰/۰۵) اما با افزایش مقدار گلوتامیک اسید مقدار گابا به‌صورت معنی‌دار افزایش یافت (P≤۰/۰۵). به‌طوریکه بیشترین مقدار در غلظت $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰۰ مشاهده شد.. بر اساس نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین در مقایسه کلی نمونه‌ها ازلحاظ میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنول کل، گابا و زنده مانی، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P> ۰/۰۵) اما تنها در نمونه تیمار شده با غلظت $mg\ L^{-1}$ صفر اسید گلوتامیک پس از ٢٤ ساعت میزان مهار DPPH و زنده مانی معنی‌دار (P≤۰/۰۵) بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که استفاده از سویه مربوطه در آب پنیر حاوی غلظت‌های متفاوت اسید گلوتامیک منجر به افزایش میزان گابا شد. همچنین نمونه‌ها از میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنول کل و زنده مانی بهتری برخوردار بودند. بنابراین می‌توان از آب پنیر برای تهیه نوشیدنی تخمیری پروبیوتیکی غنی شده با این ترکیب زیست فعال استفاده کرد.

استناد: بزی، رؤیا؛ حسینی قابوس، سیدحسین؛ فدوی، ابوالفضل. (١٤٠٣). ارزیابی قابلیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو تحت تأثیر هیدرولیز آنزیمی ساده و ترکیبی توسط پپسین و تریپسین. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ١٦ (٤)، ٢١-٤٢.

DOI: 10.22069/fppj.2025.23013.1849

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

پساب کارخانه‌های تولیدکننده فرآورده‌های لبنی به‌ویژه صنایع پنیرسازی از دیدگاه زیست‌محیطی مسئله‌ای پراهمیت است. آب پنیر محصول جانبی اصلی پنیر سازی، مایع زردرنگ است که از رسوب و حذف کازئین شیر در فرآیند تولید پنیر حاصل می‌شود (۱). آب‌پنیر با توجه به ویژگی‌های تغذیه‌ای (نظیر پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و غیره) و فراسودمندی به‌عنوان ترکیبی مناسب در فرمولاسیون نوشیدنی‌ها و غذا شناخته شده است (۲). به همین دلیل امروزه از آب پنیر و فرآورده‌های آن در فرمولاسیون محصولات غذایی ازجمله فرآورده‌های گوشتی، لبنی، نانوایی و تولید نوشیدنی بر پایه آب پنیر استفاده می‌شود (۳). در سالیان اخیر با توجه به بررسی ترکیبات آب پنیر تأثیر مثبت آن به‌عنوان غنی کننده در محیط فعالیت باکتری‌های پروبیوتیک به اثبات رسیده است و از آن به‌منظور تحریک رشد باکتری‌های پروبیوتیک استفاده شده است (٤). بنابراین استفاده از سویه‌های میکروبی مناسب به‌منظور به‌کارگیری بهینه این منبع ارزان در جهت تولید انواع فرآورده‌های بیولوژیکی در کاهش هزینه‌های تولید و کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی امری ضروری است (۵).

گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) ترکیب زیست فعال پروتئینی با خواص فراسودمند است که تقریباً در بافت‌های اغلب میکروارگانیسم‌ها، جانوران و گیاهان یافت می‌شود(۷). گابا اسیدآمینه غیر پروتئینی ٤ کربنی است. گروه آمین موجود در گابا به‌جای کربن آلفا روی کربن گاما قرار دارد که باعث می‌شود از گابا در سنتز پروتئین استفاده نشود. این ترکیب زیست فعال در گیاهان و باکتری‌ها نقش متابولیکی در چرخه کربس را ایفامی‌کند و در مهره‌داران به‌عنوان فرستنده سیگنال عصبی عمل می‌کند و نقش مهمی را در هماهنگی شبکه‌های عصبی موضعی و عملکرد نواحی مغزی ایفامی‌کند(٦). گابا به‌صورت کلی توسط آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز طی واکنش دکربوکسیلاسیون غیرقابل برگشت ال-گلوتامات تولید می‌شود و جهت انجام این واکنش حضور کوفاکتور پیروکسال فسفات ضروری است (۷). امروزه گابا به‌دلیل پتانسیل زیستی بسیار، کاربردهایی وسیع در توسعه غذاهای فراسودمند پیدا کرده است. این ترکیب در تنظیم فشارخون و ضربان قلب، کنترل احساس درد و هیجان، درمان اختلالات عصبی و کاهش علایم آلزایمر بسیار مؤثر است. همچنین سبب تحریک ترشح انسولین از پانکراس شده و در تنظیم هورمون رشد و بهبود سنتز پروتئین‌های مغز نیز نقش دارد (۸). ازاین‌رو در پزشکی و حتی صنایع غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است.

با افزایش آگاهی عمومی در مورد فرآیندهای طبیعی، استفاده از فناوری‌های غنی‌سازی برای افزایش محتوای گابا در غذاها به‌جای افزودن برون‌زا می‌تواند مقبولیت مصرف کنندگان آگاه از سلامت را افزایش دهد. محققان در مورد تبدیل زیستی گابا تحقیق کرده‌اند و مکانیسم تبدیل زیستی آن را با استفاده از باکتری اسیدلاکتیک به دلیل وضعیت ایمن آن‌ها روشن کرده‌اند همچنین وجود آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز و دارا بودن مکانیسم سنتز گابا در آن‌ها توسط محققان اثبات شده است (۹). باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB) از مهم‌ترین باکتری‌های موجود در فلور طبیعی بدن می‌باشد. باکتری‌های اسیدلاکتیک معمولاً غیر هوازی و غیر اسپورزا و درکل کوکسی یا باسیلی هستند. استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک با پتانسیل پروبیوتیکی بهترین انتخاب، نه‌فقط برای بالا بردن تعداد میکروب‌های مفید در فرآورده‌های غذایی بلکه به‌عنوان میکروب‌های سازگار طبیعی با محیط روده می‌باشد (۱۰).

تقریباً اکثر گونه‌های باکتریایی تولیدکننده گابا از غذاهای سنتی تخمیری همانند کیمچی، پنیرهای سنتی، نوشیدنی‌های جلبک قرمز، خمیرترش گندم، پائوکای و ماهی تخمیری (غذای سنتی ژاپنی) جداسازی شده‌اند که ویژگی مشترک آن‌ها pH اسیدی و غلظت بالای گلوتامات است (۱۱). توانایی تولید گابا، در میان سویه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک متفاوت است و به طور قابل توجهی تحت تأثیر شرایط محیط کشت و ترکیب متوسط آن می‌باشد (۱۲). بنابراین بهینه‌سازی شرایط برای افزایش میزان گابا مهم است. به طور طبیعی، همه سویه‌های موجود در یک‌گونه نمی‌توانند گابا تولیدکنند زیرا توانایی آن به حضور ژن‌های گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز و ضد پورتر گلوتامات/گابا بستگی دارد (۱۳). گونه‌های غالب این خانواده شامل ائرومونـاس، کورینه باکتر، انتروکوک، لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس، لئوکنوستوک، پدیوکوکوس و استرپتوکوک می‌باشد. در بین گونه‌های مختلف لاکتوباسیل‌ها (ازجمله *لاکتو باسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*) از بیشترین میزان تولید گابا برخوردار هستند (١٤). برای افزایش میزان گابا باید سویه‌هایی با میزان فعالیت بالای آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز برای استفاده در تخمیر انتخاب شوند. زمان کشت، غلظت گلوتامات، دمای محیط کشت و pH نیز از عوامل کلیدی و مؤثر در تولید گابا می‌باشند (۱۵). محدوده pH و دمای مؤثر برای تولید گابا توسط باکتری‌های اسید لاکتیک به ترتیب در محدوده ٤-۵ و ۲۵-٤۰ درجه سلسیوس گزارش شده است (١٦). همچنین غلظت گلوتامات در ماده غذایی باید به‌اندازه کافی بالا باشد. اما در غیر این صورت می‌توان 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 را در آن جبران کرد (۸). اسیدآمینه گلوتامیک به‌عنوان پیش ساز گابا حدود ۱۵ درصد ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین‌های آب پنیر را تشکیل می‌دهد(۱۷). بنابراین حضور این نوع پروتئین‌ها نقش اساسی را در تولید گابا طی تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های مربوطه در استفاده از آب پنیر به‌عنوان محیط کشت تخمیر ارائه می‌دهد. زارعی و همکاران (۲۰۲۰) محتوای گابا در نوشیدنی پروبیوتیکی بر پایه پروتئین آب پنیر حاوی کنسانتره موز و توت‌فرنگی را بررسی کردند. این محققان گزارش کردند که نوشیدنی پروتئین آب پنیر حاوی کنسانتره موز نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بالاترین میزان گابا را دارا بود(۱۸). در نوشیدنی بر پایه آب پنیر شیرین غنی شده با *E. malodoratus SJC25* بالاترین میزان تبدیل گلوتامیک اسید به گابا حاصل شد (۱۹).

با توجه به تأثیرات مفید گابا در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای غنی‌سازی غذاهای تخمیر شده با پروبیوتیک‌ها به‌عنوان تولید کننده‌های اصلی گابا انجام شده است. بیوسنتز گابا در مواد غذایی می‌تواند جایگزین سنتز شیمیایی این ترکیب باشد. بنابراین استفاده از سویه‌های پروبیوتیک تولیدکننده گابا به‌عنوان مایه تلقیح در فرآیندهای تخمیری می‌تواند در تولید گابا استفاده شود و محصولی فراسودمند با خواص تغذیه‌ای مطلوب را به مصرف‌کننده ارائه دهد. هدف از این پژوهش تولید گابا توسط سویه *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* در آب پنیر غنی‌شده با غلظت‌های متفاوت اسید گلوتامیک است.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده: محیط کشت Broth MRS (شرکت مرک آلمان)، MRS Agar (شرکت مرک آلمان)، سویه *لاکتوباسیلوس برویس* NCL912 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی، مرکز ذخایر ژنتیکی و صنعتی ایران تهیه شدند. پودر آب پنیر

(کنسانتره پروتئین آب پنیر، بالای ۷۰٪) ساخت شرکت پگاه از بازار خریداری شد. اسید گلوتامیک، کربنات سدیم، معرف فولین، اتانول ۹۵٪، DPPH (۲ و ۲-دی فنیل، ۱-پیکریل هیدرازیل)، تری کلرواستیک، استات سدیم، اسید استیک، تری اتیل آمین، اسیتونیتریل، هیدروکسید سدیم، اُفتال دی آلدهید، ۲-مرکاپتو اتانول از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

روش مورد استفاده

تهیه پیش کشت: پس از آماده‌سازی محیط کشت MRS براث، پودر لیوفیلیز سویه *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* به محیط کشت استریل MRS براث منتقل و توسط شیکر لوله همگن شد. سپس در انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت نگهداری شد تا توده سلولی در محیط مایع دیده شود (۲۰).

تلقیح میکروبی: برای تهیه مایه‌های تلقیح اولیه فالکون‌های حاوی کشت‌های باکتریایی با سرعت ۱۲۰۰۰×g به مدت ۱۰min سانتریفیوژ شدند و باکتری‌های ته‌نشین شده با استفاده از سرم فیزیولوژی دو بار شستشو و از آن سوسپانسیون تولید شد. در نهایت سوسپانسیون میکروبی حاصله به‌عنوان مایه تلقیح به میزان ۲mL از یک کشت بر مبنای استاندارد نیم مک فارلند مورد استفاده قرار گرفت (۲۱).

تعیین میزان تلقیح به روش کدورت سنجی نیم مک فارلند: برای تعیین تعداد باکتری‌ها در محیط کشت آب‌پنیر از روش کدورت سنجی نیم مک فارلند استفاده شد. جذب استاندارد نیم مک فارلند و سوسپانسیون میکروبی در طول‌موج ٦۰۰nm قرائت شد. میزان جذب باید برای استاندارد و سوسپانسیون میکروبی تهیه شده بین ۰/۰۸_ ۰/۱ باشد که برابر با سوسپانسیون باکتریایی معادل 10^8 cfu × ۱/۵ بود (۲۲).

آماده‌سازی پودر آب پنیر به‌عنوان محیط کشت: ۱۰ g پودر آب پنیر دمینرال (میزان پروتئین ۱۰ درصد) توزین و در ۱۰۰ mL آب حل شد. سپس تنظیم pH (٤/۲- ٤/۵) با اسیدسولفوریک ۰/۱N داخل اتوکلاو به مدت ۱۵min در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس حرارت داده شد تا پروتئین‌ها دناتوره شوند. سپس رسوب حاصله با استفاده از سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰×g، ۱۵min) جدا گردید. در ادامه pH سوپرناتانت با محلول سود 1 N و با استفاده از pH متر(Metrohm, 827 pH Lab, UK) روی ۷ تنظیم و مجدداً در ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵min استریل و به‌عنوان محیط کشت استفاده شد. نهایتاً در آب پنیر اتوکلاو شده اگرچه یکسری از پروتئین‌ها دناتوره شدند ولی پروتئین‌های مقاوم به حرارت مانند گلیکوماکروپپتیدها در محیط کشت نهایی باقی می‌مانند بعلاوه طی فرآیند حرارت دهی اسیدهای آمینه گوگرددار آزاد و پتانسیل احیا را کاهش می‌دهند بنابراین محیط مناسب برای رشد و قابلیت زیستی *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* فراهم می‌کنند. سپس به محیط کشت حاصل تحت شرایط استریل اسید گلوتامیک اضافه و محیط کشت‌هایی با غلظت $mg\ L^{-1}$ ۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ اسید گلوتامیک تهیه شدند (۲٤،۲۳). پس از آماده‌سازی محیط کشت آب پنیر، تعداد حدوداً 10^8 باکتری زنده و فعال به‌عنوان مایه تلقیح میکروبی توسط سرنگ استریل به ۱۰ mL محیط کشت اضافه و پس از همگن سازی با شیکر، در انکوباتور(Memmert, Germany) با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد (۲۵).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی: برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی از روش مهار رادیکال ۲,۲ – دی فنیل –۱ پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده شد. برای این منظور نمونه‌های کشت شده در محیط کشت آب پنیر پس از سانتریفیوژ شدن (۱۲۰۰۰×g، ۱۵ min) از مایع رویی به میزان 1mL برداشته و به آن 1mL محلول DPPH اضافه و به مدت‌زمان ۳۰min در

تاریکی در دمای اتاق استراحت داده شد. برای نمونه شاهد به‌جای سوپرناتانت از ۱ml آب استفاده شد. میزان جذب هر کدام از نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۷nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico, USA, UV-Vis 2100) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنتی اکسیدانی به‌عنوان درصد مهار رادیکال آزادDPPH با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۲٦):

$$\text{فعالیت درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH} = \left(1 - \left(\frac{\text{جذب نمونه}}{\text{جذب نمونه شاهد}}\right)\right) * 100$$

اندازه‌گیری فنول کل: برای اندازه‌گیری مقدار فنول کل از روش فولین- سیتوکالتیو استفاده شد. به µL ۳۰۰ مایع رویی، µl ٤۰۰ آب مقطر اضافه شد. بعد هم زدن، µL ۳۰۰ معرف فولین ٪۱۰ اضافه شد. بعد از سپری شدن min ۸، µL ۳۰۰ کربنات سدیم اشباع (۷/۵٪) اضافه شد. پس از نگهداری مخلوط حاصل به مدت ۳۰min در محل تاریک و در دمای اتاق، میزان جذب در طول‌موج ۷۵۰nm خوانده شد و به‌صورت µg معادل اسید گالیک در هر mL گزارش شد (۲۷).

اندازه‌گیری گابا: مقدار گابا توسط روش لیو و همکاران (۲۰۱٤) اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۰/۵mL نمونه با ۵mL محلول ۱۰٪ تری‌کلرواستیک اسید مخلوط و به مدت ۱min هم‌زده شد و سپس به مدت ۲ ساعت در ٤۰ درجه سلسیوس جهت استخراج گابا نگهداری شد و با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵min سانتریفیوژ شد و فاز مایع بالایی با استفاده از فیلتر ۰/٤۵µm صاف شد. غلظت گابا در عصاره استخراج شده توسط دستگاه HPLC (مدل Prominence، ساخت ژاپن) و بعد مشتق سازی با اُفتال دی آلدئید آنالیز شد (۲۸).

فاز متحرک از دو بافر A (استات سدیم 02/M، pH تنظیم شده روی ۷/۳ با اسید استیک، µL ۲۰۰ تری اتیل آمین در هر mL ۱۰۰۰ محلول) و بافر B (اسیتونیتریل با درجه کروماتوگرافی) تشکیل شده بود. µL ۸۰ عصاره نمونه‌ها با µL ٤۰۰ از محلول ۰/٤M بافر نمک بورات (pH تنظیم شده روی ۱۰/٤ با استفاده از محلول هیدروکسیدسدیم ٤۰٪) و µL ۸۰ واکنش‌گر مشتق سازی (با حل کردن ۱۰mg اُفتال دی آلدئید در µL ۲۰ از ۲-مرکاپتواتانول در mL ۲/۵ اسیتونیتریل) در دمای اتاق به مدت ۵min جهت انجام واکنش مخلوط شد. µL ۲۰ از محلول مشتق‌سازی شده با استفاده از سرنگ مخصوص به ستون (C18Hichrom HIRPB-250A، ۵µm، ۲۵۰mm × ٤/٦)، دستگاه HPLC تزریق شد و با فاز متحرک حاوی بافر A و B (به نسبت v/v ۸۰:۲۰) با سرعت جریان mL ۰/۸ بر دقیقه در ٤۰ درجه سلسیوس عبور داده شد. مقدار گابا با استفاده از دتکتور UV/Vis در طول‌موج ۳۳۸nm تعیین شد.

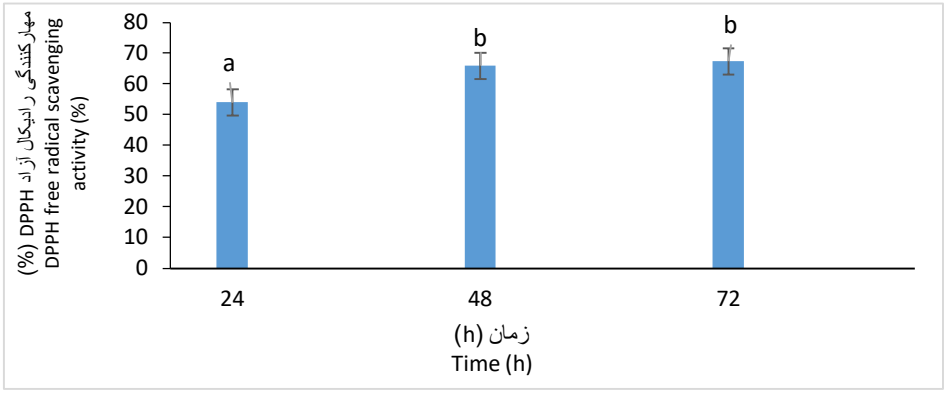
بررسی زنده‌مانی: تعداد سلول‌های زنده مانده باکتری پروبیوتیک در هر یک از نمونه‌ها بلافاصله پس از آماده‌سازی نمونه‌ها طی ۳ روز نگهداری در انکوباتور (هر ۲٤ ساعت یکبار) با شمارش باکتریایی نمونه‌ها به روش مرتضویان و همکاران (۲۰۰٦) اندازه‌گیری شد. در این مجموعه سوپانسیون‌های سلولی توسط کشت پورپلیت رقت مناسب در محیط کشت MRS آگار انجام و پلیت‌ها در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت در شرایط بی‌هوازی انکوباتور شده و شمارش شدند (۲۹).

طرح آماری و نرم افزارهای مورد استفاده: در این مطالعه اثر فاکتورهای زمان (۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت) و غلظت گلوتامات سدیم (L^{-1} mg ۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰) بر شاخص‌های زنده‌مانی باکتری‌ها، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات زیست‌فعال تولید شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* در قالب طرح کاملاً تصادفی به روش آزمایش‌ها فاکتوریل مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. همه تیمارها در سه

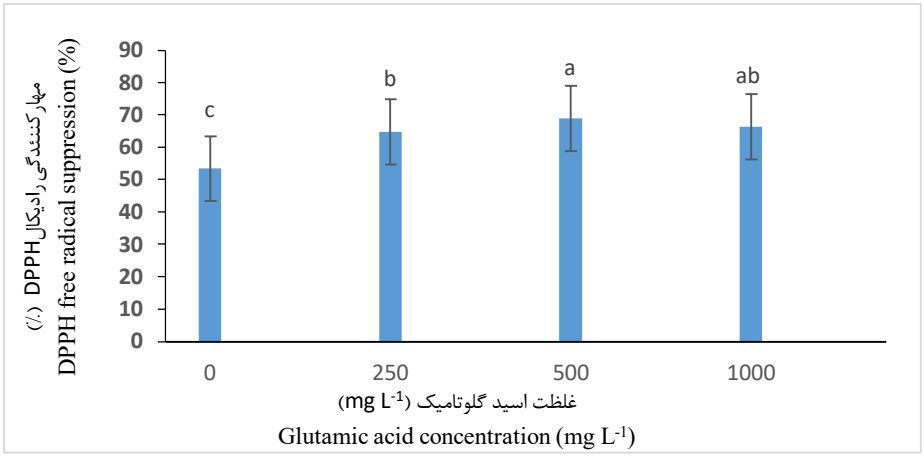
تکرار انجام شد. اثرات اصلی و متقابل فاکتورهای اعمال شده با روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین تیمارها با روش حداقل میانگین مربعات در سطح احتمال (P<۰/۰۵) انجام گرفت. آنالیزهای آماری با نرم افزارهای SPSS نسخه ۲۰ و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثرات اصلی زمان و غلظت اسید گلوتامیک بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی معنی‌دار (P≤۰/۰۵) بود. نتایج مقایسه میانگین اثر زمان و غلظت اسید گلوتامیک در شکل ۱ آورده‌شده‌است. می‌توان مشاهده کرد که با گذشت زمان تا ٤٨ ساعت فعالیت مهارکنندگی به طور معنی‌دار افزایش یافت (P≤۰/۰۵)، ولی بین زمان ٤٨ و ٧٢ ساعت اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (P>۰/۰۵) (شکل ۱ الف). همچنین بیشترین مقدار فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH مربوط به تیمار اسید گلوتامیک ۵۰۰ mg L^{-1} بوده و کمترین مقدار مربوط به نمونه شاهد بود (شکل ۱ ب).



(الف) (A)



(ب) (B)

شکل ۱- تاثیر (الف) زمان و (ب) غلظت اسید گلوتامیک بر توان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

Figure 1. Effect of (A) time and (B) glutamic acid concentration on the scavenging power of DPPH free radicals

حروف لاتین کوچک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P≤۰/۰۵).

نتایج مقایسه میانگین بین تیمارها نشان داد (جدول ۱) که با گذشت زمان در همه غلظت‌های اسید گلوتامیک فعالیت آنتی‌اکسیدانی به طور معنی‌دار افزایش یافت (P≤۰/۰۵). همچنین با افزایش غلظت اسید گلوتامیک تا ۵۰۰ mg L^{-1} در محیط کشت در همه زمان‌های مورد بررسی، فعالیت آنتی اکسیدانی

افزایش و سپس کاهش یافت (جدول ۱). کمترین و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب مربوط به نمونه شاهد- ۲٤ ساعت (٤۲/۵۳ ٪) و ۵۰۰ mg L^{-1} – ۷۲ ساعت (۷٦/۰۷ ٪) مشاهده شد. فعالیت مهار DPPH در پژوهش حاصل می‌تواند ناشی از پروتئین‌های آب پنیر ازجمله لاکتوگلوبولین و لاکتوآلبومین باشد که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند (۳۰). همچنین ترکیبات بیولوژیکی مانند پپتیدهای زیست فعال که در هنگام تخمیر توسط فرآیند پروتئولیتیک تولید می‌شوند. علاوه بر ارزش تغذیه‌ای فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز دارند (۳۱).

جدول۱- اثر غلظت اسید گلوتامیک و زمان بر فعالیت آنتی اکسیدانی *محیط کشت* آب پنیر حاوی *لاکتوباسیلوس برویس NCL912*

Table 1. Effect of glutamic acid concentration and time on the antioxidant activity of whey culture medium containing *Lactobacillus brevis NCL912*

نوع باکتری (Type of bacteria)	زمان(h) Time (h)	غلظت اسید گلوتامیک (mg L^{-1}) Glutamic acid concentration (mg L^{-1})			
		۰	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
لاکتوباسیلوس برویس NCL912 (Lactobacillus brevis NCL912)	۲٤	٤۲/۵۳ ±۲/۷٦ f*	۵۹/۹۷ ±۱/۸۲ cde	۵۹/۵۰ ±۲/۵۱ cde	۵۳/۷۰ ±۰/۸۳ d
	٤۸	۵۷/۷۳ ±۲/٦٤ de	٦٦/۰۳ ±٤/۱۳ bcd	٦۹/٦۰ ±۲/۲۷ ab	٦٦/۲۷ ±۰/۳۳ bc
	۷۲	۵٦/۸۷ ±۳/۷۲ d	٦٦/٦۰ ±۲/۸۱ bc	۷٦/۰۷ ±٤/۱۸ a	٦۹/۸۳ ±۰/۸۸ ab

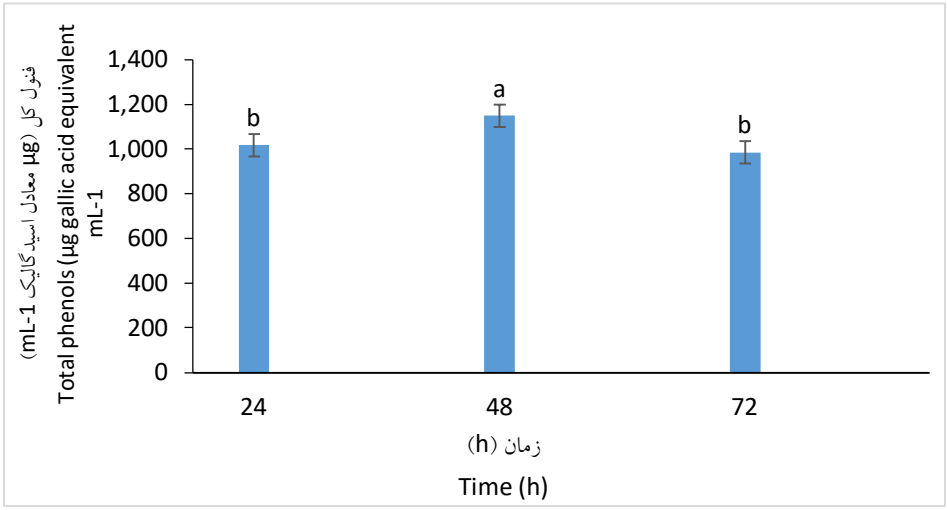
* حروف لاتین کوچک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P≤۰/۰۵).

علاوه بر این افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طول تخمیر به‌علت آزادسازی آگلیکون ایزوفلاون‌ها از طریق عمل کاتالیزوری فعالیت بتا-گلوکوزیداز و همچنین آنتی‌اکسیدانی‌های درون‌سلولی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (۳۲). اسیدلاکتیک تولید شده در طول زمان تخمیر و رشد و زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها عامل اصلی تفاوت در میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد در طی فرآیند تخمیر گزارش شده است. به عبارتی هرچه میزان اسیدلاکتیک تولید شده و زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها بیشتر باشد در نهایت ترکیبات فنولی بیشتری آزاد می‌شوند در نتیجه سبب افزایش میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد می‌گردد (۳۳). علاوه بر این پس از تبدیل گلوتامیک اسید به گاما آمینو بوتیریک اسید در داخل سلول، گاما آمینو بوتیریک اسید به متابولیت‌های واسط دیگری تبدیل و وارد چرخه اسیدسیتریک می‌شود که در نهایت می‌تواند باعث افزایش سنتز ترکیبات فنولی شود و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد. ازطرف‌دیگر کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس مهار رادیکال DPPH بعد از ٤۸h تخمیر را می‌توان به تجزیه توالی‌های آنتی‌اکسیدانی (ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و پپتیدهای زیست فعال) در طی فرآیند تخمیر نسبت داد (٤٦). کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طول زمان تخمیر به افزایش تخریب ترکیبات فنولی نسبت داده می‌شود همچنین می‌تواند به‌علت افزایش واکنش بین پروتئین‌ها و پلی‌فنول‌ها باشد (۳٤). در تحقیقی روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماست تهیه شده از شیر سویا و گردوی آمریکایی، فعالیت آنتی اکسیدانی بالاترین ماست نسبت به نمونه شاهد به وجود فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره گردو نسبت داده شده است(۳۵). ماست سین بیوتیک (حاوی *لاکتیکازی باسیلوس پاراکازی* و جلبک اسپرولینا) بالاترین فعالیت مهار رادیکال را نشان داد. فعالیت مهار رادیکال ماست تولید شده عمدتاً به‌علت حضور ترکیبات زیست فعال ازجمله کاروتنوئیدها، آلفا

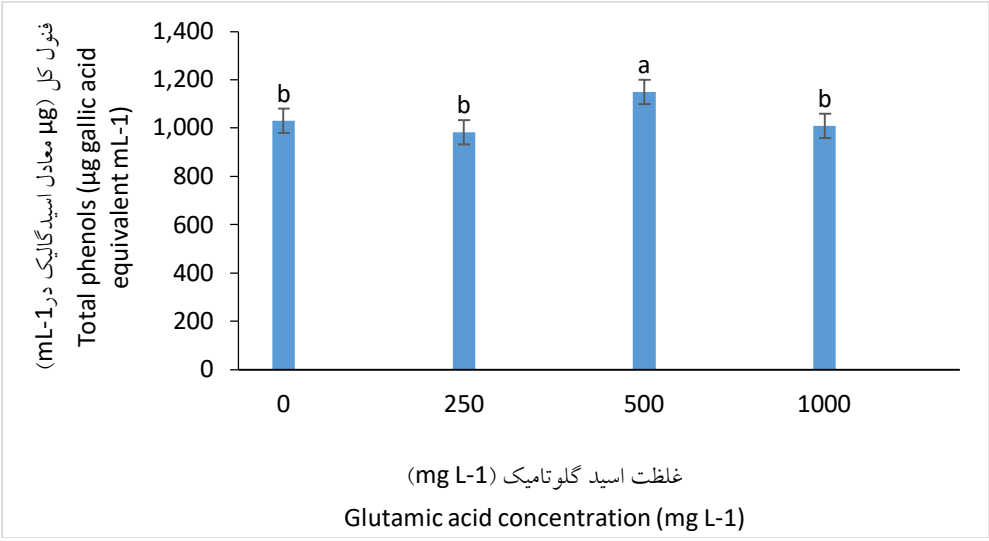
توکوفرول، کلروفیل اسپرولینا می‌باشد(۳۶). موسوی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که تخمیر اسید لاکتیکی توسط دوسویه پروبیوتیکی(*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*) در آب انار، فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به طور قابل توجهی بهبود بخشید. آن‌هااظهار کردند که گلوکز موجود در ساختار آنتوسیانین‌ها احتمالاً توسط باکتری‌ها به‌عنوان منبع انرژی مصرف می‌شود. در نتیجه اگلیکون‌های مرتبط با اثر مهار رادیکال بالاتر تولید می‌شود که منجر به تولید برخی متابولیت‌ها با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طی تخمیر می‌شود (٤٥). طی بررسی تأثیر تخمیر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط سویه‌های *لاکتوباسیلوس آپیس* و *ساکارومایسس سرویزیه*، در سبوس برنج مشخص شد که فعالیت مهارکنندگی DPPH و ABTS در نمونه‌های تخمیر شده به دلیل تولید متابولیت‌های خاص مانند اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه، پپتیدها و کتون‌ها افزایش یافت. این افزایش به ترکیبات فیتوکمیکال نسبت داده شد که از فرم متصل به فرم آزاد مانند اسیدهای فنولیک آزاد تبدیل شدند (۳۷). ملکی همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که فرآیند تخمیر، دمای فرآیند و حجم مایه تلقیح اثر معنی‌داری بر مهار رادیکال DPPH دارد. همچنین دلیل افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی در حین تخمیر شیر حاوی فندق، تجمع فنل و پروتئولیز بیان شد (٤٤).

کرباسی و همکاران (۲۰۱۵) در تولید نوشیدنی تخمیری پروبیوتیکی بر پایه شیره خرما نشان دادند که با افزایش زمان تخمیر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها افزایش یافته است(۳۸). چون در شرایط pH اسیدی به‌علت پلیمریزاسیون ترکیبات پلی فنولی و همچنین آنزیم‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک پپتیدهای کوچک با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایجاد می‌گردد. کیتی بونچاکول و همکاران (۲۰۲۱)، در تولید نوشیدنی پروبیوتیکی تخمیری حاوی سویه *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* D39 پس از نگهداری ۳۰ روزه اشاره کردند که فعالیت مهاری FRAP و ORAC (به ترتیب ۵۸/۳۳ µmol TE/100 mL و ٤٣١/١٤) به طور قابل توجهی کاهش یافت درحالی‌که فعالیت مهار رادیکال DPPH (۰/۰۵ µmol TE/100 mL) بدون تغییر باقی ماند. برای این که برخی از گونه‌های لاکتوباسیلوس می‌توانند از آنتی‌اکسیدان‌های فنولیک به‌عنوان سوبسترا استفاده کنند(۳۹).

فنول کل: نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر فاکتور زمان و غلظت اسید گلوتامیک بر میزان فنول معنی‌دار بود ($P\leq$ ۰/۰۵). همانطور که در شکل ۲ الف مشاهده می‌شود با گذشت زمان تا ٤٨ ساعت میزان فنول کل افزایش و سپس کاهش یافته است. همچنین با افزایش غلظت اسید گلوتامیک تا ۵۰۰ mg L^{-1} مقدار فنول کل افزایش و سپس کاهش یافت (شکل ۲ ب).



(الف) (A)



(ب) (B)

شکل ۲-تاثیر (الف) زمان و (ب) غلظت اسید گلوتامیک بر مقدار فنول کل تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* در محیط کشت آب پنیر

Figure 2. Effect of (A) time and (B) glutamic acid concentration on the amount of total phenols produced by *Lactobacillus brevis NCL912* in whey culture medium

*حروف لاتین کوچک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P≤۰/۰۵).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در تمام زمان‌ها با افزایش غلظت اسید گلوتامیک تا L^{-1} mg ۵۰۰، مقدار فنول کل افزایش و سپس با افزایش غلظت به L^{-1} mg ۱۰۰۰ مقدار فنول کل کاهش یافت (جدول ۲). همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود در همه غلظت‌های اسید گلوتامیک اضافه شده به محیط کشت تا ٤۸ ساعت اول میزان فنول کل افزایش و در ادامه تا رسیدن به ۷۲ ساعت مقدار آن کاهش یافت. بیشترین و کمترین میزان فنول کل به ترتیب مربوط به نمونه شاهد- زمان ۷۲ ساعت (۹۰۲/۳ µg معادل اسید گالیک در mL^{-1}) و نمونه L^{-1} mg ۵۰۰-زمان ٤۸ ساعت(۱۲۸۵ µg معادل اسید گالیک در mL^{-1}) مشاهده شد. تحقیقات مختلفی تولید این ترکیبات توسط باکتری‌های اسید لاکتیکی در محیط تخمیری

ثبت کرده است. طبق نظر کورهونن (۲۰۰۹) پروتئولیز فرآورده‌های لبنی ممکن است سبب آزاد شدن آمینواسیدهای با زنجیر جانبی فنول مثل تیروزین شود و مقدار ترکیبات فنول کل را افزایش دهد(٤٠). علت افزایش ترکیبات فنولی در طول زمان تخمیر ممکن است به دلیل آنزیم‌های هیدرولیتیک ترشح شده توسط برخی سویه‌های اسیدلاکتیک باشد که ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی متصل را به‌صورت محلول و نامحلول آزاد می‌کند. علاوه بر این محیط اسیدی ایجاد شده توسط باکتری اسیدلاکتیک اکسیداسیون این ترکیبات را کاهش می‌دهند و باعث حفاظت از آن‌ها در طول تخمیر می‌شوند (٤١). علت کاهش ترکیبات فنولی در برخی از نمونه‌های تیمار شده می‌تواند ناشی از اکسیداسیون و پلیمریزاسیون ترکیبات فنولی در طول تخمیر باشد. همچنین گزارش شده است که تخریب میکروبی ممکن است باعث برش و هیدروکسیل شدن حلقه آروماتیک در پلی‌فنول‌ها و کاهش ترکیبات فنولی شود (٤٢).

جدول ۲- اثر غلظت اسید گلوتامیک و زمان بر مقدار فنول کل تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* در محیط کشت آب پنیر

Table 2. Effect of glutamic acid concentration and time on the amount of total phenols produced by *Lactobacillus brevis NCL912* in whey culture medium

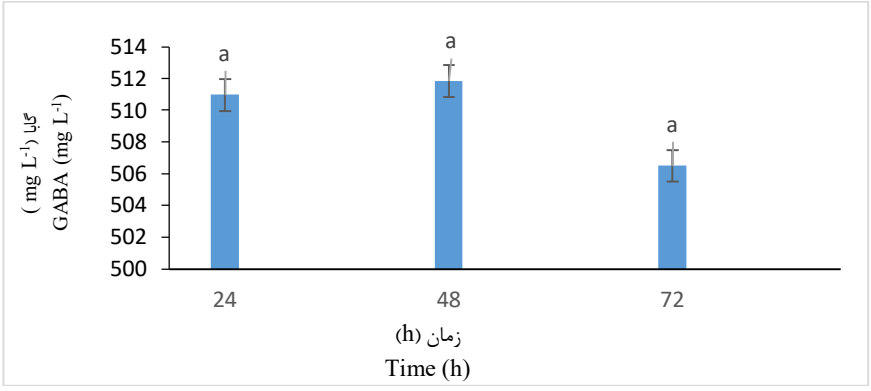
نوع باکتری (Type of bacteria)	زمان (h) (Time (h))	غلظت اسید گلوتامیک ($mg\ L^{-1}$) Glutamic acid concentration ($mg\ L^{-1}$)			
		۰	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
لاکتوباسیلوس برویس NCL912	۲٤	۹٤۳/۳ ±۱۳۵/۱^{cd*}	۹٤٤/۸ ±٤۷/۹^{c}	۱۰۸۱/٤ ±۵۲/۷^{b}	۹۷۱/٦ ±۷۳/٤^{b}
Lactobacillus brevis (NCL912)	٤۸	۹۳٤/۰ ±٤۹/۳^{cd}	۱۰۱۰/۰ ±٤۸/٤^{b}	۱۲۸۵/۷ ±۱۱۳/۷^{a}	۱۱۱۵/۳ ±٤٤/۹^{b}
	۷۲	۹۰۲/۳ ±۹/٦^{d}	۹۸۸/٦ ±۱۰/۹^{c}	۱۰٤٦/۵ ±۳۸/۰^{b}	۹۲۲/۵ ±۲۵/۷^{cd}

*حروف لاتین کوچک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P\leq$۰/۰۵).

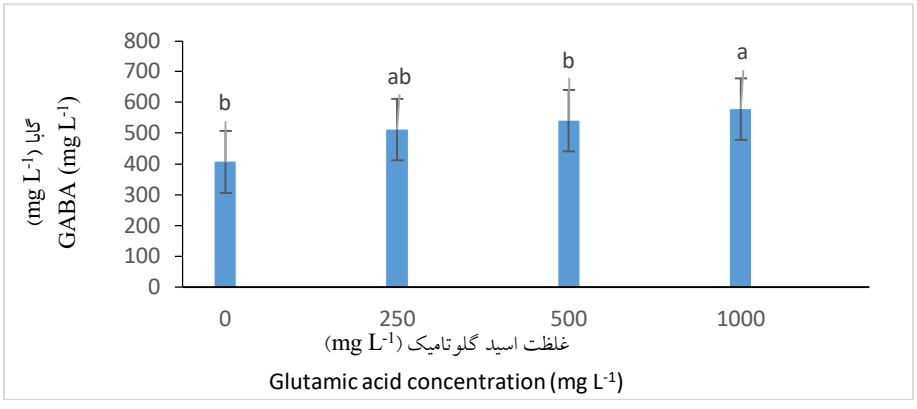
جعفری و صارم نژاد (۲۰۲۰) گزارش کردند که اثر تخمیر همزمان شیر با کشت‌های آغازگر ماست و *لاکتوباسیلوس ساکئی* منجر به افزایش فنول‌های نمونه تخمیر شده نسبت به شاهد شد. متابولیسم میکروبی ترکیبات فنولی و همچنین تولید اسیدهای فنولیک جدید در طی فرآیند اسیدی شدن ماست به‌عنوان عامل احتمالی افزایش ترکیبات فنولی گزارش شد(٤٣). Maleki و همکاران (۲۰۱۵) اظهار کردند که مقدار محتوای فنول کل ترکیبات فنولی شیر فندق تخمیر شده در طی تخمیر توسط دانه‌های کفیر کاهش‌یافته و بعد از ٤٨ ساعت تخمیر از ۱۳۰/٤۲ ± ۱/٤۲ mg of GAE/100 mL به ۹۱/۷۵ ± ۳/۳۳ mg of GAE/100 mL کاهش یافت (٤٤). آن‌هامتابولیسم ترکیبات فنولی توسط میکروارگانیسم‌های دانه کفیر را علت این کاهش دانستند. نتایج مشابهی توسط کیتی بونچاکول و همکاران (۲۰۲۱) و موسوی‌و همکاران (۲۰۱۳) به ترتیب در نوشیدنی تخمیری بر پایه شیر برنج قهوه‌ای و آب انار گزارش کردند(٤۵،۳۹). ماست سین بیوتیکی تهیه شده با سویه *لاکتیکازی باسیلوس پاراکازی* و جلبک اسپرولینا بالاترین سطح فنول کل را نسبت به سایر نمونه‌ها نشان دادند (۳٦). این محققان افزایش فنول در ماست سین بیوتیکی به دلیل فعالیت تخمیری باکتری‌های پروبیوتیکی نسبت دادند. تغییرات در محتوای پلی فنول‌ها در طول تخمیر ممکن است به دلیل تخریب، تبدیل و سنتز آن‌ها در طول رشد و فرآیندهای متابولیکی میکروارگانیسم‌ها باشد.

بررسی میزان گابا: نتایج آنالیز واریانس نشان داد که فاکتور زمان اثر معنی‌داری بر میزان گابا ندارد (۰/۰۵ >P) هرچند که تا ٤٨ ساعت مقدار گابا افزایش ولی درادامه در ۷۲ ساعت مقدار آن کاهش یافت. با

افزایش مقدار گلوتامیک اسید مقدار گابا به‌صورت معنی‌دار افزایش یافت (P≤۰/۰۵). طوریکه بیشترین مقدار در غلظت ۱۰۰۰ mg L^{-1} مشاهده شد(شکل ۳). ترکیب مواد مغذی ازجمله افزودنی محیطی مثل گلوتامات از عوامل اصلی مؤثر بر تولید گابا در طی تخمیر است. چون میکروارگانیسم سوبسترای لازم برای تولید گابا از طریق آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز در طی مدت‌زمان تخمیر در دسترس دارند. افزایش میزان گابا با افزایش غلظت اسید گلوتامیک در آب پنیر را می‌توان به دکربوکسیلاسیون اسید گلوتامیک توسط آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز نسبت داد. در طی زمان گاما آمینو بوتیریک اسید توسط یک حامل به داخل میتوکندری منتقل شده و به سوکسینیک سمی آلدئید تبدیل و پس از تبدیل آن به سوکسینات وارد چرخه اسیدسیتریک می‌شود و در نهایت می‌تواند مجدداً به گلوتامیک اسید تبدیل شود (٤٦). بااین‌حال در این بررسی حضور گابا در نمونه‌های شاهد (فاقد اسید گلوتامیک) مشاهده شد. علت آن را می‌توان به حضور سویه *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* و وجود آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز در این میکروارگانیسم نسبت داد. علاوه بر این در پودر آب پنیر اسید گلوتامیک حدود ۱۵٪ اسیدهای آمینه موجود را تشکیل می‌دهد که می‌تواند به‌عنوان سوبسترا برای این آنزیم مطرح باشد. مکانیسم سنتز گابا از مسیر آلفا-دکربوکسیلاسیون ال-گلوتامات در این سویه میکروبی تأیید شده است (۹).



(A) (الف)



(B) (ب)

شکل ۳- تاثیر (الف) زمان و (ب) غلظت اسید گلوتامیک بر مقدار گابا تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* در محیط کشت آب پنیر

Figure 3. Effect of (A) time and (B) glutamic acid concentration on the amount of GABA produced by *Lactobacillus brevis NCL912* in whey culture medium

*حروف لاتین کوچک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P≤۰/۰۵).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در یک‌زمان مشخص مقدار گابا با افزایش غلظت گلوتامیک اسید به طور معنی‌دار افزایش یافت (P≤۰/۰۵)، بطوری‌که بیشترین مقدار گابا مربوط به نمونه‌های حاوی ۱۰۰۰ mg L^{-1} اسید گلوتامیک بود. همچنین در یک غلظت مشخص با افزایش زمان تا ٤٨ ساعت مقدار گابا بطور معنی‌دار افزایش ولی در زمان ۷۲ ساعت کاهش یافت (جدول ۳). کمترین و بیشترین میزان گابا به ترتیب مربوط به نمونه‌های غلظت‌های mg L^{-1} صفر –٢٤ ساعت (٤٠١/٠ ±١/١ mg L^{-1}) و mg L^{-1} ۱۰۰۰–۷۲ ساعت (٥٩١/٣ ±٢/٦ mg L^{-1}) به دست آمد. گابا به طور طبیعی در شیر و فرآورده‌های آن یافت می‌شود زیرا کازئین شیر غنی از اسید گلوتامیک است. مقادیر گابا بسته به پروتئولیز کازئین تغییر می‌کند. زیرا اسید گلوتامیک آزاد می‌شود و فعالیت متابولیکی میکروبی را تغییر می‌دهد (٤٧). علت کاهش گابا در نمونه‌های آب پنیر می‌تواند ناشی از تغییرات pH (٤/٥) باشد. میزان گابا در pH پایین مانند ٤ کاهش می‌یابد زیرا این pH باعث کاهش فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز می‌شود اما در محدوده pH بهینه شده بسته به نوع و شرایط محصول فرآوری به‌علت این که این آنزیم حداکثر فعالیت را دارد بیشترین میزان گابا حاصل می‌شود (٤٨). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که با افزایش زمان تخمیر میزان گابای تولیدی نیز افزایش می‌یابد این امر می‌تواند به دلیل افزایش تعداد باکتری و افزایش بازده تبدیل سوبسترا به گابا باشد. البته به‌مرور زمان و ورود به فاز مرگ و نیز عدم وجود شرایط مناسب رشد باکتری از میزان تولید کاسته می‌شود (٤٩). تولید گابا در فاز رشد باکتری آغاز شده و نزدیک به فاز سکون به دلیل افزایش فعالیت آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز این میزان تولید بیشتر می‌شود. افزایش غلظت سوبسترا تا نقطه بهینه منجر به بیشترین میزان گابا می‌شود اما پس از نقطه بهینه موجب کاهش گابا می‌شود (٥٠).

جدول ۳-اثر غلظت اسید گلوتامیک و زمان بر مقدار گابا تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* در محیط کشت آب پنیر

Table 3. Effect of glutamic acid concentration and time on the amount of GABA produced by Lactobacillus brevis NCL912 in whey culture medium

نوع باکتری (Type of bacteria)	زمان (h) (Time (h))	غلظت اسید گلوتامیک (mg L^{-1}) Glutamic acid concentration (mg L^{-1})			
		۰	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
لاکتوباسیلوس برویس	٢٤	٤٠١/٣ ±٢/٩ d*	٥٠١/٣ ±٢/٦ c	٥٥٠/٣ ±١٠/٨ b	٥٩١/٠ ±٣/٢ a
NCL912(	٤٨	٤١٣/٧ ±٢/٣ d	٥٢٠/٣ ±٤/٢ bc	٥٣١/٧ ±٦/١ b	٥٨١/٧ ±١/٤ a
Lactobacillus brevis NCL912	٧٢	٤٠٧/٠ ±١/١ d	٥١٤/٠ ±١/٥ c	٥٤١/٠ ±٦/٠ b	٥٦٤/٠ ±٣/٢ ab

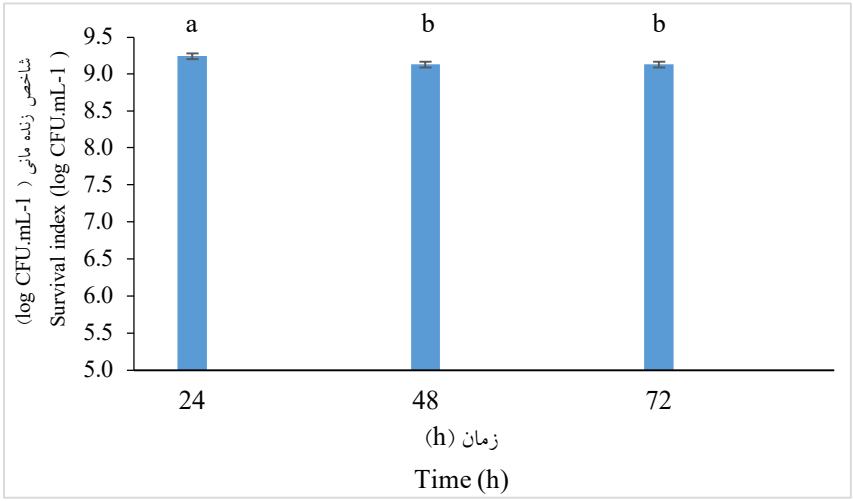
*حروف لاتین کوچک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P≤۰/۰۵)

کریمی(۲۰۲۰)، بیان کرد که *لاکتوباسیلوس برویس G42* میکروکپسوله شده در مدت‌زمان ۱۲۰ ساعت ٣٢٤/٩ mg/L گابا تولید کرد. درحالی‌که در محیط MRS در مدت‌زمان مشابه گابای تولید شده توسط سلول‌های آزاد ٢٤١/١٨ mg/L گزارش شد(٥١). افزایش تولید گابا می‌تواند به دلیل اضافه شدن پری–بیوتیک‌های اینولین به آلژینات باشد که منجر به افزایش پایداری *لاکتوباسیلوس برویس G42* تثبیت شده و افزایش بهره‌وری گابا شود. کیم و همکاران (۲۰۰۷) میزان گابای تولیدی شیر سویای تخمیر شده را ppm ٤٢٦/٦٧ گزارش کردند که علت آن به وجود منبع کربن مناسب به همراه منبع ازت پروتئین می‌باشد (٥٢)

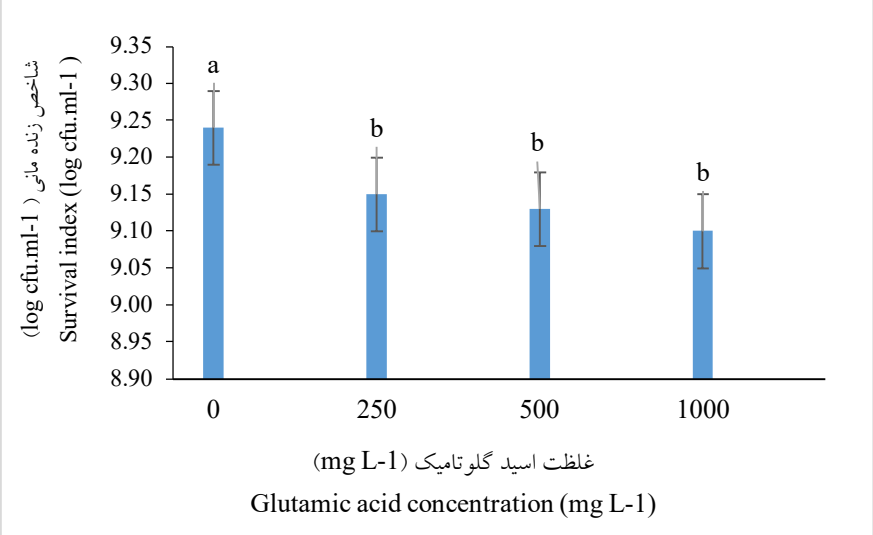
فلاح و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که با افزایش زمان تخمیر از ۲٤h به ۷۲ h میزان گابا تولیدی نیز افزایش یافت (۵۳). این امر می‌تواند به دلیل افزایش تعداد باکتری و افزایش بازده تبدیل مونوسدیم گلوتامات به گابا باشد که بامطالعه کیم و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت داشت(۵۲). در تحقیق الهامی راد و همکاران (۲۰۲۱) میزان بهینه غلظت شیر سویا ٦٪ به دست آمد و دیده شد که با افزایش غلظت تا نقطه بهینه مقدار گابا نیز افزایش می‌یابد. اما پس‌ازآن موجب کاهش گابا می‌گردد(٥٤). این نتیجه می‌تواند ازآنجا ناشی شود که غلظت بیش‌ازحد در محیط تخمیر موجب وارد آوردن فشار اسمزی بالا و توقف متابولیسم باکتری و در نتیجه غلظت گابای تولیدی کاهش یابد. در ماست سین بیوتیکی حاوی جلبک اسپرولینا بالاترین سطح گابا را در پایان ذخیره‌سازی مشاهده شد که علت آن را محتوای بالای اسید گلوتامیک جلبک اسپرولینا و pH ٤/٥ ایجاد شده ناشی از تخمیر که منجر به فعالیت بالایی اسید گلوتامیک دکربوکسیلاز می‌شود دانستند (۳٦).

بررسی زنده‌مانی: نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر هر دو فاکتور زمان و غلظت اسید گلوتامیک بر شاخص زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* معنی‌دار است (P≤ ۰/۰۵). بیشترین مقدار زنده مانی مربوط به زمان ۲٤ ساعت و غلظت $mg\ L^{-1}$ ۰ اسید گلوتامیک است و با افزایش زمان و افزایش غلظت اسید گلوتامیک زنده‌مانی کاهش می‌یابد (۰/۰۵ ≥P) (شکل ٤). زنده‌مانی از $9/24\ \log cfu.\ ml^{-1}$ در ۲٤ ساعت به $9/13\ \log cfu.\ ml^{-1}$ در ٤۸ و ۷۲ ساعت کاهش‌یافته که مقدار ناچیزی است علاوه بر این تولید، تجمع گابا و مصرف آن در چرخه اسیدسیتریک بر مقدار نهایی گابا در هر زمان (۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت) تأثیرگذار بود. آب پنیر به دلیل داشتن سطح بالای قند لاکتوز (بالای ۷۰ درصد)، پروتئین‌های محلول در آب (بتا لاکتوگلوبولین و آلفا لاکتوآلبومین) منبع بسیار خوبی جهت فعالیت باکتری‌های پروبیوتیک است. حضور پروتئین‌های محلول در آب به علت قابل تجزیه بودن توسط باکتری‌های پروبیوتیک و همچنین جلوگیری از کاهش شدید pH باعث شده است، آب پنیر به‌عنوان ترکیب افزایش دهنده رشد و قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک نقش موثری ایفا بکند (۵۵).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین و کمترین مقدار شاخص زنده‌مانی به ترتیب مربوط به نمونه $mg\ L^{-1}$ ۰ اسید گلوتامیک-۲٤ ساعت ($cfu.\ mL^{-1}$ ۹/۷۰±۰/۲٦) و $mg\ L^{-1}$ ۱۰۰۰ اسید گلوتامیک- ۲٤ ساعت ($cfu.\ mL^{-1}$ ۹/۰۷ ±۰/۰۳) بود (جدول ٤). زنده‌مانی و بقای باکتری‌های اسیدلاکتیک در محصولات لبنی پروبیوتیکی به عوامل مختلفی بستگی دارد که از مهم‌ترین آن‌هامی‌توان به شرایط کشت، میزان اکسیژن محلول، سطح تلقیح و گونه‌های پروبیوتیکی به‌کاربرده اشاره کرد (٥٦). تفاوت در رشد باکتری‌های پروبیوتیکی در طول تخمیر به خصوصیات ساختاری باکتری مربوط می‌باشد. یعنی بسته به نوع سویه به‌کاربرده شده در یک محیط تخمیر هر کدام بقا و زنده‌مانی متفاوتی را نشان می‌دهند (۵۷). با افزایش زمان تخمیر (در مرحله‌ی ابتدایی تخمیر) جمعیت باکتری‌ها افزایش می‌یابد ولی با ادامه روند تخمیر جمعیت باکتری‌ها کاهش می‌یابد. محققان دلیل این امر را اینگونه بیان کردند که با افزایش زمان تخمیر، کاهش مواد مغذی از یک‌طرف و تولید اسید و کاهش pH ازطرف دیگر زنده مانی این نوع باکتری‌ها را می‌یابد (۵۵).



(الف) (A)



(ب) (B)

شکل ٤- تاثیر (الف) زمان و (ب) غلظت اسید گلوتامیک بر زنده مانی باکتری

Figure 4. Effect of (A) time and (B) glutamic acid concentration on bacterial survival

*حروف لاتین کوچک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P≤۰/۰۵)

جدول ٤- اثر غلظت اسید گلوتامیک و زمان بر مقدار گابا تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* در محیط کشت آب پنیر

Table 4. Effect of glutamic acid concentration and time on the amount of GABA produced by *Lactobacillus brevis NCL912* in whey culture medium

نوع باکتری (Type of bacteria)	زمان (h) (Time (h))	غلظت اسید گلوتامیک (mg L^{-1}) Glutamic acid concentration (mg L^{-1})			
		۰	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰
لاکتوباسیلوس برویس NCL912 *Lactobacillus brevis NCL912*	۲٤	۹/۷۰ ±۰/۲٦^{a}	۹/۰۹ ±۰/۰٤^{b}	۹/۱۰ ±۰/۰۵^{b}	۹/۰۷ ±۰/۰۳^{b}
	٤۸	۹/۰۸ ±۰/۰٦^{b}	۹/۱۸ ±۰/۰۲^{b}	۹/۱۸ ±۰/۰٤^{b}	۹/۰۹ ±۰/۰٤^{b}
	۷۲	۹/۱۱ ±۰/۰٦^{b}	۹/۱۸ ±۰/۰۱^{b}	۹/۱۰ ±۰/۰٤^{b}	۹/۱٤ ±۰/۰۳^{b}

*حروف لاتین کوچک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P≤۰/۰۵)

در بررسی سویه و زمان نگهداری بر روی زنده مانی بیفیدوباکتریوملاکتیس (BB-12) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (la-5) در تولید کره لاکتیکی مشاهده شد که زمان بر زنده مانی باکتری‌های بیفیدوباکتریوملاکتیس (BB-12) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (la-5) در روزهای ۱۵ و ۳۰ تأثیر معنی داری دارد و در سایر زمان‌های مورد بررسی تأثیر معنی‌داری مشاهده نکردند (٥٦).

گراوند و همکاران (۲۰۲۲)، اشاره کردند که در ماست سین بیوتیکی حاوی جلبک اسپرولینا زنده‌مانی سویه مربوطه در نمونه در طول دو هفته اول نگهداری حالت صعودی را نشان داد و بعد از دو هفته حالت نزولی در نمونه ماست سین بیوتیکی مشاهده شد. همچنین در نمونه‌ها قابلیت زنده‌مانی کاهش یافت که علت آن را اسیدی بیشتر ماست به دلیل نرخ بالاتر تخمیر دانستند(۳٦). چون متابولیت‌های مثل اسیدهای آلی pH را به حد بحرانی کاهش می‌دهند که باعث مهار یا کند شدن رشد باکتری می‌گردد. در بررسی تأثیر عصاره پوست انار بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در آبمیوه انار مشاهده شد که بعد از دو هفته نگهداری بیشترین تعداد باکتری زنده برای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* به ترتیب با میزان $٤/٧ \times ١٠^{٦}$ cfu. mL $^{-1}$ و ٤×١٠^{٦} cfu. ml $^{-1}$ حاصل شد (٥٨). این محققان اشاره کردند که ترکیبات فنولی موجود در عصاره پوست انار نقش اثرگذاری در رشد و زنده‌مانی سویه‌ها اعمال کرده است.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اثرات فیزیولوژیکی گابا در درمان ناهنجاری‌های نورولوژیکی متعدد، می‌توان از آن به‌عنوان یک ترکیب زیست فعال در غذاها استفاده کرد. ازآنجایی‌که افزودن مستقیم گابای سنتز شده شیمیایی به غذاها غیر ایمن تلقی می‌شود. بنابراین با استفاده از باکتری‌های که توانایی تولید گابا را داشته‌باشند مانند باکتری *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* میتوان غذاهای فراسودمند با خواص تغذیه‌ای مطلوب تولید کرد. ازطرف‌دیگر آب پنیر به‌عنوان فراوان‌ترین ضایعات حاصل از صنعت پنیر سازی است اما به‌علت دارا بودن ترکیبات باارزش تغذیه‌ای محصولی مناسب برای کاربرد در صنایع غذایی و محیط کشت باکتری‌های پروبیوتیکی است. بنابراین هدف پژوهش حاضر بهینه‌سازی تولید گابا توسط *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* در غلظت‌های مختلف اسیدگلوتامیک در آب پنیر انجام شد. احتمال تولید گابا توسط HPLC سنجیده شد و نتایج نشان داد که استفاده توأم از اسید گلوتامیک و باکتری *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* و یا کاربرد *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* به تنهایی منجر به افزایش میزان گابا در نمونه‌ها شد. همچنین میزان ترکیبات فنولی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و زنده مانی باکتری پروبیوتیکی را در محیط آب پنیر در هر دو حالت، افزایش یافتند. با توجه به نتایج حاصل امکان تولید نوشیدنی تخمیری بر پایه آب پنیر تقویت شده با گابا توسط *لاکتوباسیلوس برویس NCL912* وجود دارد.

منابع

1. Sady, M., Jaworska, G., Grega, T., Bernas, E., & Domagala, J. 2013. Application of acid whey in orange drink production. Food Technology and Biotechnology, 51(2), 266.
2. Bensmira, M., & Jiang, B. 2012. Effect of some operating variables on the microstructure and physical properties of a novel Kefir formulation. Journal of Food Engineering, 108(4), 579-584.
3. Bekiş, P. 2019. Peynir altı suyunun kefirde kullanım olanaklarının araştırılması (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).

4. Pescuma, M., Hébert, E. M., Mozzi, F., & De Valdez, G. F. 2010. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. International journal of food microbiology, 141(1-2), 73-81.
5. Ebrahimi, N., & Nejati, F. 2018. Production of beta-galactosidase from whey using Kluyveromyces marxianus. Journal of Food Microbiology, 5(2), 53-62.
6. 6.Mazur, R., Kovalovská, K., & Hudec, J. 2011. Changes in selectivity of gamma-aminobutyric acid formation effected by fermentation conditions and microorganisms' resources. Journal of microbiology, biotechnology and food sciences, 1(2), 164-171.
7. Hou, D., Tang, J., Feng, Q., Niu, Z., Shen, Q., Wang, L., & Zhou, S. 2023. Gamma-aminobutyric acid (GABA): A comprehensive review of dietary sources, enrichment technologies, processing effects, health benefits, and its applications. Critical reviews in food science and nutrition, 1-23.
8. Lee, E. J., & Lee, S. P. 2014. Novel bioconversion of sodium glutamate to γ-amino butyric acid by co-culture of Lactobacillus plantarum K154 in Ceriporia lacerata culture broth. Food Science and Biotechnology, 23, 1997-2005.
9. Santos-Espinosa, A., Beltrán-Barrientos, L. M., Reyes-Díaz, R., Mazorra-Manzano, M. Á., Hernández-Mendoza, A., González-Aguilar, G. A., ... & González-Córdova, A. F. 2020. Gamma-aminobutyric acid (GABA) production in milk fermented by specific wild lactic acid bacteria strains isolated from artisanal Mexican cheeses. Annals of Microbiology, 70(1), 1-11.
10. Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S. A., & Noorbakhsh, H. 2018. Diversity and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from horreh, a traditional Iranian fermented food. Probiotics and antimicrobial proteins, 10, 258-268.
11. Li, H., Qiu, T., Huang, G., & Cao, Y. 2010. Production of gamma-aminobutyric acid by Lactobacillus brevis NCL912 using fed-batch fermentation. Microbial Cell Factories, 9, 1-7.
12. Parsapour, P., Nateghi, L., & Rajaei, P. 2021. Investigating the possibility of producing GABA in yogurt using Lactobacillus brevis.
13. Chua, J. Y., Koh, M. K. P., & Liu, S. Q. 2019. Gamma-aminobutyric acid: a bioactive compound in foods. Sprouted grains, 25-54.
14. Shan, Y., Man, C. X., Han, X., Li, L., Guo, Y., Deng, Y., ... & Jiang, Y. J. 2015. Evaluation of improved γ-aminobutyric acid production in yogurt using Lactobacillus plantarum NDC75017. Journal of dairy science, 98(4), 2138-2149
15. Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., Bayer, E. A., & Pessione, E. 2014. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. Biotechnology Advances, 32(7), 1216-1236.
16. Yang, S. Y., Lü, F. X., Lu, Z. X., Bie, X. M., Jiao, Y., Sun, L. J., & Yu, B. 2008. Production of γ-aminobutyric acid by Streptococcus salivarius subsp. thermophilus Y2 under submerged fermentation. Amino acids, 34, 473-478.
17. 17-Greenwood, M., Kalman, D. S., Antonio, J., & Rasmussen, C. J. 2008. Nutritional supplements for endurance athletes. Nutritional supplements in sports and exercise, 369-407.
18. 18-Zarei, F., Nateghi, L., Eshaghi, M. R., & Abadi, M. E. T. 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.
19. 19-Cunha, D. S., Coelho, M. C., Ribeiro, S. C., & Silva, C. C. 2022. Application of Enterococcus malodoratus SJC25 for the manufacture of whey-based beverage naturally enriched with GABA. Foods, 11(3), 447.
20. Dogahe, M. K., Khosravi-Darani, K., Tofighi, A., Dadgar, M., & Mortazavian, A. M. 2014. Effect of process variables on survival of bacteria in probiotics enriched pomegranate juice. British Biotechnology Journal, 5(1), 37-50.
21. KETABCHI, M., IESSAZADEH, K., & MASSIHA, A. 2017. EVALUATE THE INHIBITORY ACTIVITY OF ZNO NANOPARTICLES AGAINST STANDARD STRAINS AND ISOLATES OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM FOOD SAMPLES.

22.Swakhi, F., Far, R. S., Nejad, S. P., & Dadkhah, A. 2017. Evaluation of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis and their effect on the physical properties of apple juice.
23.Amiri, S., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Bari, M. R., & Khaledabad, M. A. 2019. Exopolysaccharides production by Lactobacillus acidophilus LA5 and Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB12: optimization of fermentation variables and characterization of structure and bioactivities. International journal of biological macromolecules, 123, 752-765.
24.Salla, A. C. V., Margarites, A. C., Seibel, F. I., Holz, L. C., Brião, V. B., Bertolin, T. E., ... & Costa, J. A. V. 2016. Increase in the carbohydrate content of the microalgae Spirulina in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. Bioresource Technology, 209, 133-141.
25.22. Mortazavi, S. A., & Sarabi Jamab, M. 2021. Identification of gamma aminobutyric acid produced by Lactobacillus brevis PML1 by Thin layer chromatography method in culture medium containing monosodium glutamate (MSG). Journal of food science and technology (Iran), 18(120), 379-387.
26.Jayaprakasha, G. K., & Patil, B. S. 2007. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. Food chemistry, 101(1), 410-418.
27.Abdel-Hamid, M., Huang, Z., Suzuki, T., Enomoto, T., Hamed, A. M., Li, L., & Romeih, E. 2020. Development of a multifunction set yogurt using Rubus suavissimus S. Lee (Chinese sweet tea) extract. Foods, 9(9), 1163.
28.Liu, Z. P., Song, C., Wang, M., He, Y., Xu, X. B., Pan, H. Q., ... & Pan, B. X. 2014. Chronic stress impairs GABAergic control of amygdala through suppressing the tonic GABAA receptor currents. Molecular Brain, 7, 1-14.
29.Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Reinheimer, J. A., Emamdjomeh, Z., Sohrabvandi, S., & Rezaei, K. 2006. Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment and incubation temperature on the viability of the probiotic micro-organisms in freshly made yogurt. International Journal of Dairy Technology, 59(1), 8-11.
30.Prasantha, B. R., & Wimalasiri, K. M. S. 2019. Effect of HTST Thermal Treatments on End-Use Quality Characteristics of Goat Milk. International Journal of Food Science, 2019(1), 1801724.
31.Solieri, L., Rutella, G. S., & Tagliazucchi, D. 2015. Impact of non-starter lactobacilli on release of peptides with angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities during bovine milk fermentation. Food microbiology, 51, 108-116.
32.Wang, Y. C., Yu, R. C., & Chou, C. C. 2006. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food microbiology, 23(2), 128-135.
33.Shobharani, P., Nanishankar, V. H., Halami, P. M., & Sachindra, N. M. 2014. Antioxidant and anticoagulant activity of polyphenol and polysaccharides from fermented Sargassum sp. International journal of biological macromolecules, 65, 542-548.
34.34.Kim, S. K. (Ed.). 2013. Marine proteins and peptides: biological activities and applications. John Wiley & Sons.
35.Ye, M., Ren, L., Wu, Y., Wang, Y., & Liu, Y. 2013. Quality characteristics and antioxidant activity of hickory-black soybean yogurt. LWT-Food Science and Technology, 51(1), 314-318.
36.Garavand, F., Daly, D. F., & Gomez-Mascaraque, L. G. 2022. Biofunctional, structural, and tribological attributes of GABA-enriched probiotic yoghurts containing Lacticaseibacillus paracasei alone or in combination with prebiotics. International Dairy Journal, 129, 105348.
37.37.Ghamry, M., Ghazal, A. F., Al-Maqtqri, Q. A., Li, L., & Zhao, W. (2022). Impact of a novel probiotic Lactobacillus strain isolated from the bee gut on GABA content, antioxidant activity, and potential cytotoxic activity against HT-29 cell line of rice bran. Journal of Food Science and Technology, 59(8), 3031-3042.
38.Karbasi, M., Mousavi, S. M., & Yarmand, M. S. 2015. Production and packaging of fermented functional beverage from date syrup by lactobacillus rhamnosus. Food Processing and Preservation Journal, 7(2), 17-38.

39. Kittibunchakul, S., Yuthaworawit, N., Whanmek, K., Suttisansanee, U., & Santivarangkna, C. 2021. Health beneficial properties of a novel plant-based probiotic drink produced by fermentation of brown rice milk with GABA-producing Lactobacillus pentosus isolated from Thai pickled weed. Journal of Functional Foods, 86, 104710.
40. Korhonen, H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. Journal of functional foods, 1(2), 177-
41. Wu, C., Li, T., Qi, J., Jiang, T., Xu, H., & Lei, H. 2020. Effects of lactic acid fermentation-based biotransformation on phenolic profiles, antioxidant capacity and flavor volatiles of apple juice. Lwt, 122, 109064.
42. 42. Shahidi, F., & Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. Molecules, 21(9), 1216.
43. Jafari, N., & Saremnezhad, S. 2020. Production of gamma-aminobutyric acid ontaining yogurt by using Lactobacillus sakei and brown rice malt extract. Journal of food science and technology (Iran), 17(98), 97-108.
44. Maleki, N., Khodaiyan, F., & Mousavi, S. M. 2015. Antioxidant activity of fermented Hazelnut milk. Food Science and Biotechnology, 24, 107-115.
45. Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Hadinejad, M., Emam-Djomeh, Z., & Mirzapour, M. 2013. Effect of fermentation of pomegranate juice by Lactobacillus plantarum and Lactobacillus acidophilus on the antioxidant activity and metabolism of sugars, organic acids and phenolic compounds. Food Biotechnology, 27(1), 1-13.
46. Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G.& Fernie, A.R., 2008. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. Trends in plant science, 13(1), 14-19.
47. Yilmaz-Ersan, L., Sahin, S., Ozcan, T., Akpinar-Bayizit, A., Usta-Gorgun, B., Ciniviz, M., & Keser, G. 2022. Interaction of probiotic activity, antioxidative capacity, and gamma-amino butyric acid (GABA) in chestnut milk-fortified yogurt. Journal of Food Processing and Preservation, 46(12), e17266
48. Yakheh, S. G., Rad, A. H. E., Nateghi, L., & Varmira, K. 2021. Optimization of production conditions of soy milk GABA produced by probiotic bacteria.
49. Sharifan, A. 2021. Optimization and Modeling of Gamma Aminobutyric Acid (GABA) Extraction Conditions from Lactobacillus brevis IRBC10818 Affected by Heat Shock by Response Surface Methodology. Journal of food science and technology (Iran), 18(118), 167-180.
50. Zareie, Z., Tabatabaei Yazdi, F., & Mortazavi, S. A. 2019. Optimization of gamma-aminobutyric acid production in a model system containing soy protein and inulin by Lactobacillus brevis fermentation. Journal of Food Measurement and Characterization, 13, 2626-2636.
51. 51. Karimi, M. 2020. Improvement of GABA production and survival of Lactobacillus brevis G42 in simulated gastrointestinal conditions by soy-alginate microcapsulation. Journal of food science and technology (Iran), 17(105), 47-62.
52. Kim, T. J., Sung, C. H., Kim, Y. J., Jung, B. M., Kim, E. R., Choi, W. S., ... & Yoo, S. H. 2007. Effects of a soaking-fermentation-drying process on the isoflavone and γ-aminobutyric acid contents of soybean. Food Science and Biotechnology, 16(1), 83-89.
53. Falah, F., Vasiee, A., & Mortazavi, S. A. 2020. Gamma-aminobutyric acid Synthesis by Lactococcus lactis strain Nz1330 in Dairy sludge medium with Monosodium glutamate. Journal of food science and technology (Iran), 16(97), 89-100.
54. Elhami Rad, A. H., Nateghi, L., & Varmira, K. 2021. Optimization of Production Conditions of Soy Milk GABA Produced by Probiotic Bacteria. Journal of Innovation in Food Science & Technology, 13(2).
55. Marhamatizadeh, M. H., Ehsandoost, E., Gholami, P., & Mohaghegh, M. D. 2013. Effect of olive leaf extract on growth and viability of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum for production of probiotic milk and yoghurt. International Journal of Farming and Allied Sciences, 2(17), 572-578.

56. Kargar Motlagh, D., & Sharifan, A. 2022. Evaluation of probiotic lactic butter production: effect of strain and storage time on probiotic viability, physicochemical, microbiological and organoleptic properties. Journal of food science and technology (Iran), 19(124), 39-51.
57. Tahmasbi, R., Mirzaei, M., & Khani, M. R. 2021. Effect of fermentation by Lactobacillus reuteri and Lactobacillus acidophilus on antioxidant activity of quinoa extract.
58. Dogahe, M. K., Towfighi, A., Khosravi-Darani, K., Dadgar, M., Mortazavian, A. M., & Ahmadi, N. 2013. Influence of pomegranate peel on viability of probiotic bacteria in pomegranate juice.