Archive of SID

(مقاله پژوهشی)

بهینه سازی شرایط تولید شیرسویای غنی شده با گابای تولیدی توسط باکتری پروبیوتیک

سپیده قره‌یخه[۱]، امیرحسین الهامی راد [۲*]، لیلا ناطقی[۳]، کامبیز ورمیرا[۴]

۱- گروه علوم وصنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاداسلامی،کرمانشاه، ایران.

۲- دانشیار،گروه علوم وصنایع غذایی، واحدسبزوار، دانشگاه آزاداسلامی، سبزوار، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم وصنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحدورامین- پیشوا، دانشگاه آزاداسلامی، ورامین، ایران.

۴- مرکز تحقیقات روغن ها و چربی ها، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران..

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۰۹

چکیده

گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) به عنوان یک اسیدآمینه چهارکربنه غیرپروتئینی، در عملکرد بهتر ارگانهای مختلف بدن و مهار بسیاری بیمارهای فیزیولوژیک کاربرد گسترده ای دارد. باکتری های اسید لاکتیک به خوبی در شرایط کنترل شده می‌توانند گابا را در مواد غذایی سنتز کنند. هدف از این تحقیق، تخمیر شیرسویا توسط یک باکتری جدید لاکتیک اسید به نام *Lactobacillus sp. Makhdzir Naser-1 (GQ451633)*و تولید گابا است. ابتدا شرایط بهینه برای حداکثر تولید گابا با در نظر گرفتن فاکتورهای موثری چون زمان تلقیح، pH محیط، غلظت شیر سویا و دمای محیط بدست آمد. شرایط نقطه بهینه بدست آمده عبارتند از: زمان تخمیر ۴۸ ساعت،۵/۳ =pH، غلظت ٪۱۲ شیر سویا و درجه حرارت گرمخانه گذاری۳۷(°C). در نقطه بهینه، با سه بار تکرار، مقدار گابای تولید شده، ۴/۱۷ بدست آمد که با مقدار پیش بینی شده (۴/۱۸۸) اختلاف بسیار ناچیزی دارد. بنابراین دقت معادله پیشنهادی برای پیش بینی مقدار گابا مورد تایید قرار گرفت.

واژه های کلیدی: نوشیدنی فراسودمند پروبیوتیکی، گابا، شیر سویا، بهینه‌سازی، روش سطح پاسخ

[*] مسؤول مکاتبات: gharehyakheh79@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

۱-مقدمه

در سال های اخیر، غذا در بسیاری از کشورها به عنوان تأمین کننده سلامت نقش به سزایی دارد. به طوری که بیشتر اهمیت مواد غذایی به جای نقش اولیه ی خود به عنوان منبع انرژی و رشد به نقش بیولوژیکی غذا روی سلامتی انسان تغییر یافته و بازار تولید و مصرف مواد غذایی بیشتر به سوی تولید غذاهای فراسودمند رفته است (۲۹). غذاهای فراسودمند به فراورده هایی گفته می‌شود که علاوه بر فراهم کردن تغذیه ی پایه باعث افزایش سطح سلامت افراد می‌شوند و با توجه به آگاهی مصرف کنندگان روز به روز در تولید این گونه غذاها پیشرفت های جدیدی به وجود می‌آید (۹). در بین غذاهای فراسودمند، غذاهای حاوی میکروارگانیسم های پروبیوتیک از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند. از آنجا که پروبیوتیک ها روی تعادل میکروبی روده و سلامتی کلی بدن اثر مثبت دارند بازار تولید و مصرف این دسته از غذاها در حال توسعه است. در بین غذاهای مناسب برای افزودن پروبیوتیک ها، به دلایلی مثل عدم تحمل لاکتوز شیر در برخی از افراد و میزان بالای کلسترول فراورده های بر پایه ی پروتئین حیوانی، تقاضا برای فراورده های پروبیوتیک غیرلبنی بر پایه ی پروتئین های گیاهی افزایش یافته است (۲۲). یکیاز ترکیباتپروبیوتیک که باعث افزایش ارزش غذایی مواد خوراکی می‌شود گابا است. گابا (گاما آمینوبوتیریک اسید) به عنوان یک اسیدآمینه غیرپروتئینی، یکی از اعضای مهم منبع اسیدآمینه های آزاد به شمار می‌آید. گابا دارای اثرات فیزیولوژیکی متعددی در مهار و درمان بسیاری از بیماری هاست (۷,۱۷). یک محرک قوی ترشح انسولین از پانکراس می‌باشد و یک ممانعت کننده قوی دیابت است. اخیراً دانشمندان دریافته اند گابا می‌تواند غلظت پلاسمایی هورمون رشد و سرعت سنتز پروتئینی در مغز را بهبود بخشد. در مهار سرطان و در مهار آدنوکارسینومای کوچک ریوی مؤثر می‌باشد (۲۹).تعداد دیگری از عملکردهای مهم گابا عبارتند از : درمان بی خوابی، افسردگی، بیماری های خودایمنی، درمان بیماری های مزمن مربوط به مصرف الکل، کاهش التهاب ، محرک سلول های ایمنی، انتشار اسیدهای آمینه آزاد، بهبود سلامت اعصاب و روان انسان، درمان ناهنجاری های نورولوژیکی مانند صرع، پارکینسون، شیزوفرنی، اسپاسم و آلزایمر، بهبود غلظت پلاسمایی هورمون رشد و افزایش سنتز پروتئین در مغز است. بنابراین از نظر پزشکی دارای اهمیت بسیاری می‌باشد از این رو است که درپزشکی و حتی در صنایع غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است (۳). تاکنون غذاهای فراسودمند متفاوتی تولید شده‌اندکه حاوی گابا هستند که از میان آنها می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد: چای، جوانه گندم ، جوانه برنج قهوه‌ای، شیر سویای تخمیریافته (۲۸ و۱۳،۲۴)، فرآورده‌های لبنی مختلف (۲۶ و۱۹،۱۰،۲۳)، آب تمشک سیاه (۱۱)، پنیر (۲۵و۱۸،۱۴)، نوشیدنی‌های تخمیریافته‌ی نیشکر (۸) و بسیاری موارد دیگر. شیر سویا امولسیون پایداری از روغن، آب و پروتئین می‌باشد که از طریق خیساندن لوبیای سویای خشک در آب و آسیاب کردن و سپس مخلوط کردن آن با آب به نسبت های مختلف (۱:۱۰به طور رایج) و در نهایت جوشاندن آن بدست می‌آید. حرارت دادن برای غیر فعال کردن پروتئاز سویا ضروری است زیرا پانکراس در اثر مصرف پروتئاز موجود در لوبیای سویا دچار تورم می‌شود همچنین حرارت دادن موجب می‌شود آنزیم های مولد طعم لوبیایی از بین بروند. مدت زمان ۲۰-۱۵ دقیقه برای جوشاندن کافی است، سپس محصول از صافی عبور داده می‌شود تا پالپ غیر قابل حل جدا شود. بسیاری از پژوهشگران اثبات کرده اند که سویا و مشتقات آن از جمله شیر سویا به دلیل وجود مقادیر زیاد ایزوفلاوون ها از ایجاد غدد سرطانی در پروستات جلوگیری می‌کند بدین صورت که از ترشح آنزیم هایی که باعث تحریک رشد نامتناسب سلول های تشکیل دهنده غدد سرطانی پروستات می‌شوند جلوگیری می‌کند (۶و۱).اغلب غذاهای پروبیوتیک از شیر گاو تخمیر شده مشتق می‌شوند اما امروزه توصیه می‌شود که از شیر سویا که غنی از پروتئین گیاهی می باشد به این منظور استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

گردد .تخمیر شیر سویا موجب افزایش خواص تغذیه ای و نیز افزایش میزان پذیرش این محصول از طرف مصرف کنندگان می‌شود. لاکتوباسیلوس‌ها باکتری‌های تخمیر کننده هستند و بیشتر محصولات انها اسید لاکتیک است و همچنین دارای خاصیت پروبیوتیکی هستند بنابراین، لاکتوباسیلوس کازئی یکی از باکتری‌های پروبیوتیکی است که پتانسیل کاربردی ویژه‌ای در تولید فراورده‌های شیری پروبیوتیکی مانند ماست دارد. بهترینpH برای رشد لاکتوباسیلوس ۵ تا ۶/۵ است همچنین تراکم ۵ درصد دی‌اکسیدکربن تاثیر بسزایی بر رشد آنها دارد. رشد لاکتوباسیلوس‌ها در محیط MRS بهتر صورت می‌گیرد. دمای بهینه رشد این باکتری‌ها ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراداست و نوع ترموفیل آنها از دمای ۵۲ درجه-سانتیگراد به بالا رشد دارند (۳۱ و۲،۱۲،۲۰). هدف از این تحقیق تولید نوشیدنی فراسودمند شیر سویا ی حاوی گابا با قابلیت پذیرش بالا توسط مصرف کننده است. این عمل با تخمیر شیر سویا توسط باکتری لاکتو باسیلوس در شرایط بهینه انجام شد. ابتدا شرایط بهینه برای حداکثر تولید گابا و رشد باکتری با در نظر گرفتن فاکتورهای موثری چون زمان تلقیح، pH محیط، غلظت شیر سویا و دمای محیط بدست آمد. سپس در شرایط بهینه حداکثر گابای تولیدی اندازه گیری شد.

۲-مواد و روشها

۲-۱-آماده سازی شیر سویا

دانه های سویای خریداری شده پس از شستن در دمای ۲۵ (^oC) به مدت یک شب با آب مقطر به اندازه ۱۰ برابر وزنشان خیسانده شدند. با استفاده از مخلوط کن در سرعت پایین به مدت یک دقیقه هموژنیزه شد سپس پالپ از عصاره با استفاده از فیلتر جدا شد.عصاره در دمای۹۶ (^oC) به مدت ۴۰ دقیقه گرم شد پس از آن در دمای اتاق (۲۵ ^oC) سرد شد.

۲-۲- آماده‌سازی سویه

باکتری *Lactobacillus sp. Makhdzir Naser-1* *(GQ451633)* در محیط MRS broth جهت فعال‌سازی سویه‌به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد (۱۷).

۲-۲- انجام تیمار ها

پس از آماده سازی شیر سویا، نمونه ابتدا با غلظت دلخواه آماده و pH آن تنظیم شد. محدوده غلظت مورد بررسی ٪۱ تا ٪۱۱ و محدوده ی pH ، ۴/۵ تا ۶/۵ در نظر گرفته شد. سپس با تنظیم درجه حرارت گرمخانه، در زمان مورد نظر، نمونه گرمخانه گزاری شد. بر اساس مطالعات انجام شده(۳۱و۲۱، ۱۵، ۴)، محدوده درجه حرارت مورد بررسی ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتیگراد و محدوده زمانی ۲۴ تا ۶۰ ساعت تنظیم شد.

۲-۳- اندازه گیری میزان گابای تولیدی و زنده مانی باکتری ها

برای اندازه گیری مقدار گابا، همانند روش تاج آبادی و همکاران (۲۷)، از دستگاه HPLC آلمانی دارای ستون HPLC – C18که قطر داخلی آن ۴/۶ میکرومتر، قطر خارجی ۵ میکرومتر و به طول ۲۵۰ میلی متر بود، استفاده شد، همچنین مقدار تغییرات رشد باکتری در OD=600 nm با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

۲-٤- طراحی آماری

نرم افزار طراحی آزمایشات، روش باکس بنکن برای بررسی همزمان اثرات فاکتور های مهمبر روی حداکثر گابای تولیدی و زنده مانی باکتری ها، مورد استفاده قرار گرفت. متغیرهای مورد نظر عبارت بودند از: زمان (A)، pH (B)، غلظت شیر سویا (C) و دمای گرمخانه گزاری (D)، در حالی که پاسخ ها مقدار گابای تولیدی و زنده مانی باکتری ها بودند. برای تمای متغیر ها، حد بالا و پایین محدوده با ۱+ و ۱- نشان داده می‌شوند و نقطه میانی محدوده با صفر (.). در مجموع، ۲۹ تیمار انجام شد که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است.با استفاده از روش حداقل مربعات، مدل تولیدگابا به صورت

www.SID.ir

Archive of SID

مربع کامل است (معادله ۱). دراین معادله،Y به پاسخ (تولیدگابا) اشاره می‌کند در حالی که ضرایب ثابت به ترتیب زیر است: β_0 به عنوان ضریب رهگیری؛ β_1، β_2و$\beta 3$ عبارات خطی هستند؛ β_{12}، β_{13} و β_{23} ضرایب برهم کنش بین پارامتر ها یا تعامل و β_{11}، β_{22} و β_{33} ضرایب نیزدرجه دوم هستند:

$$Y= \beta_0+\beta_1 A+\beta_2 B +\beta_3 C+ \beta_4 D+ \beta_{12}AB+ \beta_{13}AC+ \beta_{14}AD + \beta_{23}BC+ \beta_{24}BD + \beta_{34}CD+ \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 + \beta_{44}D^2 \quad (۱)$$

۳- بحث و نتایج

۳-۱- تجزیه وتحلیل آماری درمطالعه پارامتریک

۳-۱-۱- تحلیل واریانس(ANOVA)

در جدول ۱، سطوح کد گزاری شده و واقعی همچنین مقادیر بدست آمده برای نتایج هر تیمار در ردیف مربوطه آورده شده است. تجزیه و تحلیل واریانس(ANOVA) برای تعیین سطح اهمیت مدلهای مرتبه دوم استفاده می‌شود. مدل تجربی با استفاده از آزمون آنالیز واریانس با سطح معنی داری ۰/۰۵ وسطح اطمینان ۹۵ درصد برای مدل تجربی بدست آمد که با آزمون ANOVA موردآزمایش قرارگرفت. درمعادله۲، این مدل پیش بینی برای عملکرد باکتری لاکتوباسیلوس در شرایط آزمایش داده می‌شود:

$$GABA\ (mM) = -349.00026 + 0.47941A + 14.60138B + 0.63863C + 16.12185D - 6.66667E - 003AB - 2.08333E\text{-}004AC - 2.41667AE - 003AD - 0.013750BC - 0.013500BD + 2.90000E\text{-}003CD - 3.90085DE - 003A^2 - 1.27638B^2 - 0.054480C^2 - 0.21352D^2 \quad (۲)$$

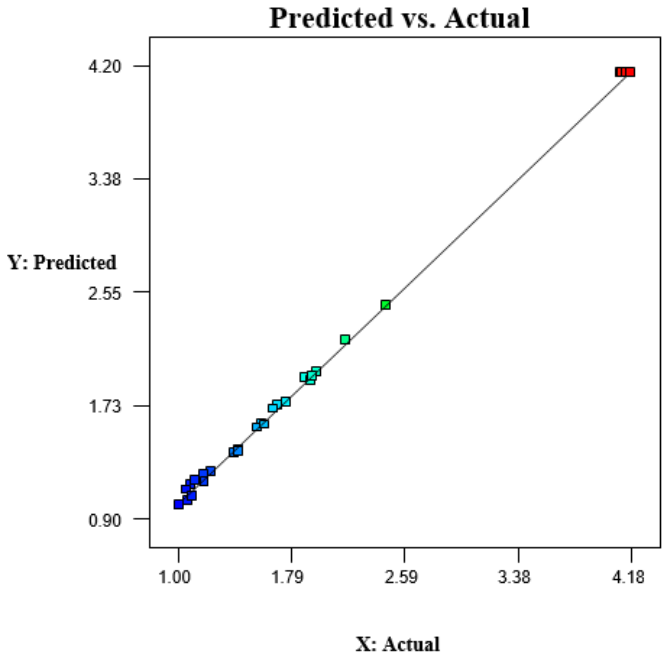
جدول ۱- طراحی آزمایشات همراه با پاسخ ها

تیمار	فاکتور (A)		فاکتور (B)		فاکتور (C)		فاکتور (D)		مقدار گابای تولید شده	میزان زنده مانی باکتری
	زمان (h)	کد شده	مقدار (pH)	کد شده	غلظت شیر سویا (%)	کد شده	درجه حرارت (°C)	کد شده	(mM)	Log CFU/ml
۱	۲۴	-۱	۴/۵	-۱	۶	۰	۳۷/۵	۰	۱/۴۰۰±۰/۰۰۴	۷/۷۰۴±۰/۰۰۱
۲	۶۰	+۱	۴/۵	-۱	۶	۰	۳۷/۵	۰	۲/۴۶۰±۰/۰۰۲	۸/۱۴۴±۰/۰۲۱
۳	۲۴	-۱	۶/۵	+۱	۶	۰	۳۷/۵	۰	۱/۰۱۰±۰/۰۰۵	۷/۵۴۲±۰/۰۱۴
۴	۶۰	+۱	۶/۵	+۱	۶	۰	۳۷/۵	۰	۱/۵۹۰±۰/۰۱۵	۷/۷۸۳±۰/۰۰۵
۵	۴۲	۰	۵/۵	۰	۱	-۱	۳۵	-۱	۱/۵۶۰±۰/۰۰۷	۷/۷۷۱±۰/۰۰۳
۶	۴۲	۰	۵/۵	۰	۱۱	+۱	۳۵	-۱	۱/۶۱۰±۰/۰۰۱	۷/۷۹۱±۰/۰۰۲
۷	۴۲	۰	۵/۵	۰	۳	-۱	۴۰	+۱	۱/۲۳۵±۰/۰۰۹	۷/۶۳۵±۰/۰۱۱
۸	۴۲	۰	۵/۵	۰	۱۱	+۱	۴۰	+۱	۱/۴۳۰±۰/۰۰۱	۷/۷۱۶±۰/۰۰۱
۹	۲۴	-۱	۵/۵	۰	۶	۰	۳۵	-۱	۱/۰۹۵±۰/۰۱۷	۷/۵۷۷±۰/۰۰۴
۱۰	۶۰	+۱	۵/۵	۰	۶	۰	۳۵	-۱	۲/۱۷۵±۰/۰۰۸	۸/۰۲۶±۰/۰۰۸
۱۱	۲۴	-۱	۵/۵	۰	۶	۰	۴۰	+۱	۱/۰۶۰±۰/۰۲۳	۷/۵۶۳±۰/۰۰۱
۱۲	۶۰	+۱	۵/۵	۰	۶	۰	۴۰	+۱	۱/۷۰۵±۰/۰۰۲	۷/۸۳۱±۰/۰۱۲
۱۳	۴۲	۰	۴/۵	-۱	۱	-۱	۳۷/۵	۰	۱/۶۷۵±۰/۰۰۱	۷/۸۱۸±۰/۰۰۹
۱۴	۴۲	۰	۶/۵	+۱	۱	-۱	۳۷/۵	۰	۱/۱۸۵±۰/۰۰۵	۷/۶۱۵±۰/۰۲۳
۱۵	۴۲	۰	۴/۵	-۱	۱۱	+۱	۳۷/۵	۰	۱/۸۹۰±۰/۰۰۴	۷/۹۰۸±۰/۰۰۱
۱۶	۴۲	۰	۶/۵	+۱	۱۱	+۱	۳۷/۵	۰	۱/۱۲۵±۰/۰۰۱	۷/۵۹۰±۰/۰۰۶
۱۷	۲۴	-۱	۵/۵	۰	۱	-۱	۳۷/۵	۰	۱/۰۷۵±۰/۰۰۷	۷/۵۶۹±۰/۰۰۲
۱۸	۶۰	+۱	۵/۵	۰	۱	-۱	۳۷/۵	۰	۱/۹۳۵±۰/۰۰۱	۷/۹۲۷±۰/۰۱۵
۱۹	۲۴	-۱	۵/۵	۰	۱۱	+۱	۳۷/۵	۰	۱/۱۹۰±۰/۰۲۱	۷/۶۱۷±۰/۰۰۶
۲۰	۶۰	+۱	۵/۵	۰	۱۱	+۱	۳۷/۵	۰	۱/۹۷۵±۰/۰۰۹	۷/۹۴۳±۰/۰۰۱
۲۱	۴۲	۰	۴/۵	-۱	۶	۰	۳۵	-۱	۱/۹۴۵±۰/۰۲۳	۷/۹۳۰±۰/۰۰۵
۲۲	۴۲	۰	۶/۵	+۱	۶	۰	۳۵	-۱	۱/۴۲۵±۰/۰۰۱	۷/۷۱۴±۰/۰۲۳
۲۳	۴۲	۰	۴/۵	-۱	۶	۰	۴۰	+۱	۱/۷۶۰±۰/۰۰۲	۷/۸۵۴±۰/۰۰۱
۲۴	۴۲	۰	۶/۵	+۱	۶	۰	۴۰	+۱	۱/۱۰۵±۰/۰۰۷	۷/۵۸۱±۰/۰۰۷
۲۵	۴۲	۰	۵/۵	۰	۶	۰	۳۷/۵	۰	۴/۱۱۰±۰/۰۰۵	۸/۸۲۹±۰/۰۰۴
۲۶	۴۲	۰	۵/۵	۰	۶	۰	۳۷/۵	۰	۴/۱۶۰±۰/۰۰۱	۸/۸۵۱±۰/۰۲۲
۲۷	۴۲	۰	۵/۵	۰	۶	۰	۳۷/۵	۰	۴/۱۲۰±۰/۰۱۵	۸/۸۳۴±۰/۰۰۱
۲۸	۴۲	۰	۵/۵	۰	۶	۰	۳۷/۵	۰	۴/۱۵۰±۰/۰۲۱	۸/۸۴۶±۰/۰۰۵
۲۹	۴۲	۰	۵/۵	۰	۶	۰	۳۷/۵	۰	۴/۱۸۰±۰/۰۱۱	۸/۸۵۹±۰/۰۰۹

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱، پراکنش مقادیر باقی‌مانده که تفاوت بین میزان عددی پیش‌بینی شده توسط مدل و مقدار تجربی را نشان داده که خط مستقیمی را تشکیل می‌دهد و مقادیر باقیمانده به شکل نرمال در دو سمت خط پراکنده‌اند. این نمودار نشان‌دهنده برازش معقول نقطه مورد آزمایش با مقدار پیش‌بینی شده توسط مدل است. برای اعتبارسنجی مدل تجربی، مقدار R^2 درطرح توزیع بایدبیش از ۷۵/. باشد(۳۰). مقدار R^2 برای مدل پیش بینی دراین مطالعه برابر با۹۹۹۲ /۰است؛ به این معنی که٪ ۹۹/۹۲ از تغییرپذیری در داده ها مطابق با مدل است. همان طور که در شکل ۱ مشخص است، تمرکز بر روی خط تقارن زیاد است و این نشان از انطباق بسیار زیاد مدل با داده های تجربی را دارد.بنابراین، معادله (۲) برای پیش بینی اثر متغیرهای مورد بحث بر عملکرد باکتری و تولید گابا بسیار قابل اعتماد است. مقدارF معیاری برای تعیین سطح آماری معنی داری مدلهای مرتبه دوم است. هنگامی که یک مدل از لحاظ آماری معتبراست بدان معنی است که مقدارF محاسبه شده بزرگتر از مقدار جدولی آن است ومقدارP بسیارکم است. همچنین آنالیزANOVA درجدول ۲ ارائه شده است. همان طورکه قبلا ذکر شد، براساس مقدارارزشF، این مدل از لحاظ آماری معنی داراست. با توجه به مقادیر F برای هر کدام از متغیر ها، که در جدول مشاهده می‌شود برای ضرایب A، B، D و C به ترتیب عبارتند از۱۲۱۵/۶۵، ۶۵۹/۴۶، ۱۱۱/۱۶ و ۱۴/۹۲، بدین معنی است که تغییرات زمان و مقدارpH بیشترین تاثیر در مقدار گابای تولیدی را دارند و دما و غلظت در مراتب بعدی اثر بر بازده قرار دارند.



شکل ۱- نمایش پراکنش مقادیر واقعی و پیش‌بینی شده میزان تولید گابا

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲-تجزیه و تحلیل واریانس(ANOVA)برای تولید گابا

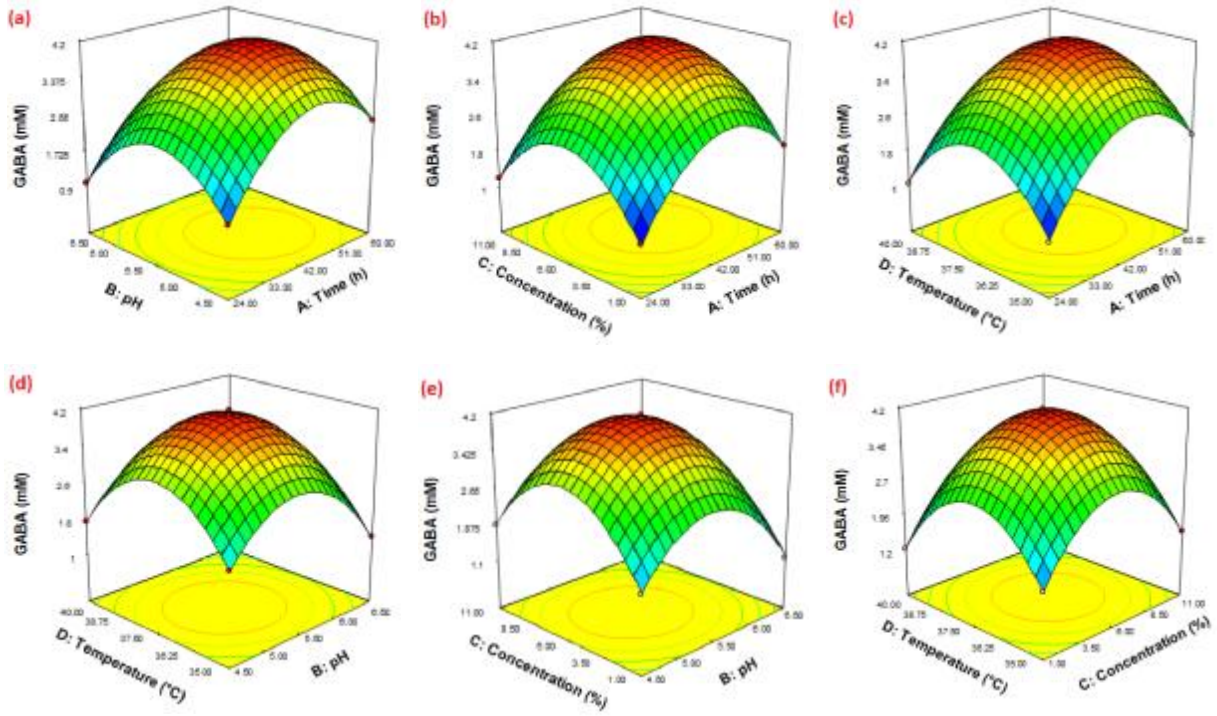
منبع تغییر	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P	
مدل	۳۲/۰۰	۱٤	۲/۲۹	۱۳۲۸/٤۲	<۰/۰۰۰۱	معنی دار
A-زمان (ساعت)	۲/۰۹	۱	۲/۰۹	۱۲۱۵/٦۵	<۰/۰۰۰۱	
pH-B	۱/۱۳	۱	۱/۱۳	٦۵۹/٤٦	<۰/۰۰۰۱	
C-غلظت(%)	۰/۰۲٦	۱	۰/۰۲٦	۱٤/۹۲	<۰/۰۰۱۷	
D-دما (°C)	۰/۱۹	۱	۰/۱۹	۱۱۱/۱٦	<۰/۰۰۰۱	
AB	۰/۰۵۸	۱	۰/۰۵۸	۳۳/٤۸	<۰/۰۰۰۱	
AC	۰/۰۰۱٤	۱	۰/۰۰۱٤	۰/۸۲	۰/۳۸۱۳	
AD	۰/۰٤۷	۱	۰/۰٤۷	۲۷/٤۹	<۰/۰۰۰۱	
BC	۰/۰۱۹	۱	۰/۰۱۹	۱۰/۹۹	۰/۰۰۵۱	
BD	۰/۰۰٤۵	۱	۰/۰۰٤۵	۲/٦۵	۰/۱۲٦۰	
CD	۰/۰۰۵۲	۱	۰/۰۰۵۲	۳/۰۵	۰/۱۰۲٤	
A^2	۱۰/۳٦	۱	۱۰/۳٦	٦۰۲۱/۸۷	<۰/۰۰۰۱	
B^2	۱۰/۵۷	۱	۱۰/۵۷	٦۱٤۱/۵۸	<۰/۰۰۰۱	
C^2	۱۲/۰۳	۱	۱۲/۰۳	٦۹۹۳/۲۳	<۰/۰۰۰۱	
D^2	۱۱/۵۵	۱	۱۱/۵۵	٦۷۱۳/٦۸	<۰/۰۰۰۱	
باقیمانده	۰/۰۲٤	۱٤	۰/۰۰۱۷۲			
عدم برازش مدل	۰/۰۲۱	۱۰	۰/۰۰۲۰۷	۲/۵۰	۰/۱۹۵۳	غیر معنی دار
خطای محض	۰/۰۰۳۳۲	٤	۰/۰۰۸۳			

۳-۱-۲- تاثیر برهم کنش متغیرهای مستقل بر روی میزان تولید گابا

شکل ۲به طور واضح اثرات متغیرهای مورد مطالعه و تعامل آن ها بر روی پاسخ را به صورت نمودارهای گرافیکی نشان می‌دهد. در نمودارa اثر تغییر همزمان pH و زمان بر روی گابا بررسی شده است. مقادیر غلظت و دما در نقطه مرکزی محدوده ی خود یعنی ٪۶ و ۳۷/۵ درجه سانتی گراد قرار دارند. همانطور که از شکل واضح است زمان اثر بیشتری نسبت به pH بر روی گابا را دارد. همچنین ماکزیمم مقدار با زمان به نیمه دوم محدوده کشیده شده است در حالی که در محور pH تقارن بیشتری دیده می‌شود. نمودار b تاثیر تغییرات زمان و غلظت را در دمای ۳۷/۵ درجه سانتی گراد و pH ، ۵/۵ نشان می‌دهد. همانند نمودار قبلی، تقارن از سمت غلظت دیده شده و تاثیر بیشتر زمان دیده می‌شود. با افزایش مقادیر دو متغیر از سطح کم تا مقدار بهینه، مقدار گابا ابتدا افزایش سپس کاهش می‌یابد. آنچه که در نمودارc دیده می-شود،تغییرات همزمان زمان و دما و اثر آن بر تولید گاباست. دو متغیردیگر در نقطه مرکزی خود قرار دارند و تغییرات بازده همچون نمودار قبلی است.همچنین نمودارd تغییرات دما و pH، نمودار eتغییرات غلظت وpH، نمودارf تغییرات غلظت و دما و اثر آنها بر روی بازده تولید گابا را نشان می‌دهند.دراین گرافها نیززمان در نقطه مرکزی خود یعنی ۴۲ ساعت قرار دارد. تعامل دو فاکتور مورد مطالعه سبب بوجود آمدن نقطه ماکزیممی در تولید شده است که در گراف به سمت رنگ قرمز تیره کشیده شده است. در نتیجه تمام متغیرهای در نظرگرفته شده دراین مدل بهینه سازی با ایجاد نقطه ماکزیممی در تولید گابا، قابل توجه و با اهمیت هستند.

www.SID.ir

Archive of SID



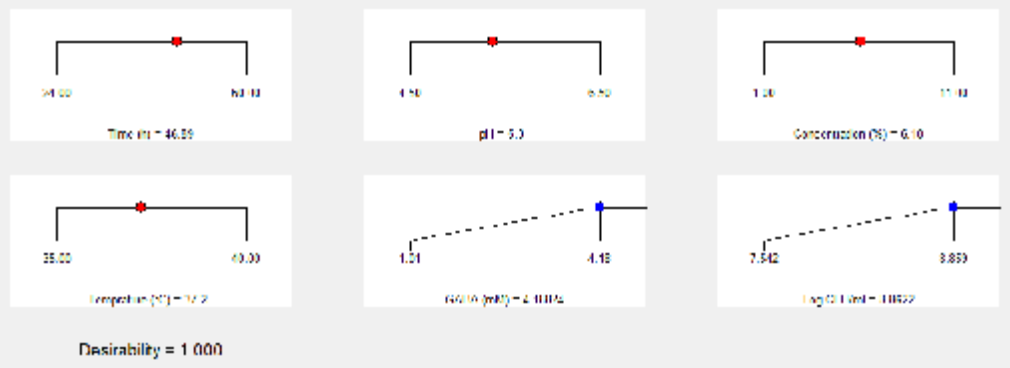
شکل ۲- نمودار گرافیکی سطح پاسخ تولید گابا به عنوان تابعی از a) pH و زمان، نمودار b) زمان و غلظت، نمودار c) زمان و دما، نمودارd) دما و pH، نمودار e) غلظت وpH، نمودارf) غلظت و دما

۳-۱-۳- بررسی نقطه بهینه برای حداکثر گابای تولیدی و زنده مانی باکتری

با استفاده از نرم افزارآماری و مدل تجربی بدست آمده از داده های تجربی، با توجه به شکل ۳، شرایط بهینه پیش بینی شده برای ماکزیمم گابای تولیدی برای زمان، pH، غلظت و دما به ترتیب است: ۴۷ ساعت، ۵/۳، ٪۶ و ۳۷ درجه سانتی گراد. در نقطه بهینه با تکرار سه تیمار، میزان متوسط گابای تولیدی ۴/۱۷ بدست آمد که با مقدار پیش بینی شده توسط مدل تجربی، ۴/۱۸۸ به میزان بسیار کمی تفاوت وجود دارد، بنابراین صحت مدل کاملا تایید می‌شود. هم چنین در نقطه بهینه میزان زنده مانی باکتری(Log CFU/ml) اندازه گیری شد و مقدار ۸/۵۳۸ بدست آمد که با مقدار پیش بینی شده توسط مدل (۸/۸۶۲) اختلاف بسیار ناچیزی دارد. زنده مانی حداکثر باکتری ها در این شرایط بر تولید حداکثر گابا صحه می گذارد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- شرایط پیش بینی شده توسط مدل تجربی

٤- نتایج

تخمیر شیرسویا توسط یک باکتری جدید لاکتیک اسید به نام *Lactobacillus sp. Makhdzir Naser-1 (GQ451633)*در شرایط بهینه انجام و حداکثر گابا در نوشیدنی شیر سویا تولید شد. با در نظر گرفتن متغیرهای زمان تلقیح، pH محیط، غلظت شیر سویا و دمای محیط بهینه سازی انجام و نقطه حداکثر تولید بدست آمد. مدت زمان بهینه تخمیر،۴۸ ساعت بدست آمد. با توجه به نتایجی که در زمینه بررسی زمان بهینه بدست آمده، فرایند تولید گابا وابسته به زمان است ودر مدت زمان های کوتاه نمی توان به نتایج چشمگیر دست یافت. در پژوهشی (۴) برای سنتز گابا در تخمیر آب انگور با لاکتوباسیلوس، مدت زمان بهینه ۷۲ ساعت بدست آمد و در تخمیر شیر توسط گروهی از باکتری های لاکتیک اسید و رسیدن به حداکثر گابای تولیدی، زمان بهینه ۱۲۰ ساعت بود (۱۹). به این ترتیب زمان بهینه بدست آمده، جزء زمان های متوسط محسوب میشود و یکی از مزایای کار است. pH بهینه ۵/۳ بود. کمترین مقادیر گابا مربوط به pH ابتدایی و انتهایی بازه یعنی ۴/۵ و ۶/۵ بود. یکی از دلایل افزایش گابا با افزایش pH می تواند مربوط به حداکثر فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز در این محدوده باشد. محققان (۲۷) در تولید گابا توسط باکتری*L. plantarum Taj-Apis362* متوجه شدند که با افزایش مقدار pH به تدریج از ۴ تا ۵/۵ مقدار بیومس و گابا افزایش می‌یابد که بیشترین نتیجه ی تولید گابا و رشد سلولی در pH= ۵/۵ بدست آمد که در شرایط مشابه با رشد سلولی باکتری مورد پژوهش دراین کار بود. همچنین بعضی نتایج (۱۲و ۲، ۱۳) نشان می‌دهد که میزان گابا در pH پایین مانند ۴، کاهش می‌یابد زیرا این pH باعث کاهش فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز که مسئول انجام چنین واکنشی است، می‌شود همچنین برای لاکتوباسیلوس پلانتاروم بهترین pH تولید گابا ۵/۵ بود. دمای بهینه در این پژوهش ۳۷ درجه سانتی گراد بدست آمد و در این دما آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز بهترین فعالیت را داشت. افزایش ملایم دما از کم تا دمای بهینه، موجب افزایش فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلازمی‌شود اما در دماهای بسیار بالابه دلیل کاهش رشد سلول، به طور واضح مقدار گابای تولیدی نیزکاهش می‌یابد. این نتیجه توسط محقیق دیگر نیز بدست آمده است (۱۱و ۱۰). به طور مشابه رشد باکتری*Lactobacillus brevis NCL912* با افزایش دما افزایش یافت آنچنان که بیشترین رشد را در ۳۵ ^{o}C دارا بود، که در دماهای بالاترکاهش یافت (۱۶). *Lactobacillus plantarum DSM19463* بیشترین

www.SID.ir

Archive of SID

مقدار گابا را در دمای بین ^{o}C ۳۰ تا^{o}C ۳۵ تولید کرد (۴). باکتری*Lactobacillus paracasei NFRI 7415* بیشترین گابا را در ^{o}C ۳۷ تولید کرد (۱۲). در این پژوهش میزان بهینه غلظت شیرسویا ٪۶ بدست آمد و دیده شد که با افزایش غلظت تا نقطه بهینه مقدار گابا نیز افزایش می‌یابد اما پس از آن موجب کاهش گابا شد. این نتیجه می تواند از آنجا ناشی شود که غلظت بیش از حد در محیط تخمیر، موجب وارد آوردن فشار اسمزی بالا و توقف متابولیسم باکتری شود و در نتیجه غلظت گابای تولیدی کاهش یابد (۱۲). همچنین نتایج تحقیقی نشان داد که در غلظت های پایین ، افزایش گلوتامات احتمالاسبب افزایش سوبسترا در مجاورت گلوتامات دکربوکسیلاز سیتوزولیشده که سبب می‌شودفعالیت آنزیم تحریک شده و مقدار گابای تولیدی نیز به تدریج افزایش - یابد(۳۰). پس از یافتن شرایط بهینه، در این نقطه، با سه بار تکرار، مقدار گابای تولید شده، ۴/۱۷ بدست آمد که با مقدار پیش بینی شده (۴/۱۸۸) اختلاف بسیار ناچیزی دارد. بنابراین دقت معادله پیشنهادی برای پیش بینی مقدار گابا مورد تایید قرار گرفت. در نقطه بهینه میزان زنده مانی باکتری (Log CFU/ml) اندازه گیری شد و مقدار ۸/۵۳۸ بدست آمد که با مقدار پیش بینی شده توسط مدل (۸/۸۶۲) اختلاف بسیار ناچیزی دارد. زنده مانی حداکثر باکتری ها در این شرایط بر تولید حداکثر گابا صحه می‌گذارد.

۵- منابع

1. Applegate, C.C., Rowles III, J.L., Ranard, K.M., Jeon, S. and Erdman Jr, J.W. 2017. Soy consumption and the risk of prostate cancer in men: an updated systematic review and meta-analysis. *The FASEB Journal*, 31(1_supplement):790-35.
2. Cho, Y.R., Chang, J.Y. and Chang, H.C. 2007. Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by Lactobacillus buchneri isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1):104-109.
3. Diana, M., Quílez, J. and Rafecas, M. 2014. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *Journal of functional foods*, 10: 407-420.
4. Di Cagno, R., Mazzacane, F., Rizzello, C.G., De Angelis, M., Giuliani, G., Meloni, M., De Servi, B. and Gobbetti, M. 2010. Synthesis of γ-aminobutyric acid (GABA) by Lactobacillus plantarum DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(2):731-741.
5. Haaland, P.D., 1989. Experimental design in biotechnology(Vol. 105). CRC press.
6. Hebert, J.R., Hurley, T.G., Olendzki, B.C., Teas, J., Ma, Y. and Hampl, J.S. 1998. Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(21):1637-1647.
7. Heldman, D.R., Hoover, D.G. and Wheeler, M.B. eds. 2010. *Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food (Print)*. CRC Press.
8. Hirose, N., Ujihara, K., Teruya, R. and Maeda, G. 2008. Development of GABA-enhanced Lactic Acid Beverage using Sugar.
9. Howard, L.R. and Wildman, R.E. 2016. Antioxidant vitamin and phytochemical content of fresh and processed pepper fruit (Capsicum annuum). In Handbook of nutraceuticals and functional foods, . CRC Press, pp. 173-199
10. Kim, J.E., Kim, J.S., Song, Y.C., Lee, J. and Lee, S.P. 2014. Novel bioconversion of sodium glutamate to γ-poly-glutamic acid and γ-amino butyric acid in a mixed fermentation using Bacillus subtilis HA and Lactobacillus plantarum K154. *Food Science and Biotechnology*, *23*(5):1551-1559.
11. Kim, J.Y., Lee, M.Y., Ji, G.E., Lee, Y.S. and Hwang, K.T. 2009. Production of γ-aminobutyric acid in black

www.SID.ir

Archive of SID

milk enriched of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ-amino butyric acid (GABA). *LWT-food science and technology*, *51*(1):183-189.

20. Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A. and Soccol, C.R. 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, *41*(2):111-123.
21. Rekha, C.R. and Vijayalakshmi, G. 2011. Isoflavone phytoestrogens in soymilk fermented with β-glucosidase producing probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food sciences and nutrition*, *62*(2):111-120.
22. Roberfroid, M.B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?–. *The American journal of clinical nutrition*, 71(6):1682S-1687S.
23. Seo, M.J., Nam, Y.D., Park, S.L., Lee, S.Y., Yi, S.H. and Lim, S.I. 2013. γ-aminobutyric acid production in skim milk co-fermented with Lactobacillus brevis 877G and Lactobacillus sakei 795. *Food Science and Biotechnology*, *22*(3):751-755.
24. Shimakawa, Y., Matsubara, S., Yuki, N., Ikeda, M. and Ishikawa, F. 2003. Evaluation of Bifidobacterium breve strain Yakult-fermented soymilk as a probiotic food. *International journal of food microbiology*, *81*(2):131-136.
25. Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C.G., Coda, R. and Gobbetti, M. 2007. Synthesis of γ-aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and environmental microbiology*, *73*(22):7283-7290.
26. Sun, T., Zhao, S., Wang, H., Cai, C., Chen, Y. and Zhang, H. 2009. ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by Lactobacillus helveticus isolated from Xinjiang koumiss in China. *European Food Research and Technology*, *228*(4):607-612.

raspberry juice during fermentation by Lactobacillus brevis GABA100. *International Journal of Food Microbiology*, 130(1):12-16.

12. Komatsuzaki, N., Nakamura, T., Kimura, T. and Shima, J., 2008. Characterization of glutamate decarboxylase from a high γ-aminobutyric acid (GABA)-producer, Lactobacillus paracasei. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *72*(2):.278-285.
13. Ko, C.Y., Lin, H.T.V. and Tsai, G.J., 2013. Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by Lactobacillus brevis FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model. *Process Biochemistry*, *48*(4): 559-568.
14. Lacroix, N., St-Gelais, D., Champagne, C.P. and Vuillemard, J.C., 2013. Gamma-aminobutyric acid-producing abilities of lactococcal strains isolated from old-style cheese starters. *Dairy Science and Technology*, *93*(3):315-327.
15. Li, H. and Cao, Y. 2010. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino acids*, *39*(5):1107-1116.
16. Li, H., Qiu, T., Huang, G. and Cao, Y., 2010. Production of gamma-aminobutyric acid by Lactobacillus brevis NCL912 using fed-batch fermentation. *Microbial Cell Factories*, *9*(1):85.
17. Mitsuoka T. 2000. Significance of dietary modulation of intestinal flora and intestinal environment. *Bioscience and microflora*, 19(1):15-25.
18. Møller, K.K., Rattray, F.P., Høier, E. and Ardö, Y. 2012. Erratum to: Manufacture and biochemical characteristics during ripening of Cheddar cheese with variable NaCl and equal moisture content. *Dairy science & technology*, *92*(5):541-568.
19. Nejati, F., Rizzello, C.G., Di Cagno, R., Sheikh-Zeinoddin, M., Diviccaro, A., Minervini, F. and Gobbetti, M. 2013. Manufacture of a functional fermented

www.SID.ir

Archive of SID

27. Tajabadi, N., Ebrahimpour, A., Baradaran, A., Rahim, R.A., Mahyudin, N.A., Manap, M.Y.A., Bakar, F.A. and Saari, N. 2015. Optimization of γ-aminobutyric acid production by Lactobacillus plantarum Taj-Apis362 from honeybees. *Molecules*, *20*(4):6654-6669.
28. Tsai, J.S., Lin, Y.S., Pan, B.S. and Chen, T.J. 2006. Antihypertensive peptides and γ-aminobutyric acid from prozyme 6 facilitated lactic acid bacteria fermentation of soymilk. *Process Biochemistry*, *41*(6):1282-1288.
29. Tujioka, K., Ohsumi, M., Horie, K., Kim, M., Hayase, K. and Yokogoshi, H. 2009. Dietary γ-aminobutyric acid affects the brain protein synthesis rate in ovariectomized female rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, *55*(1):75-80.
30. Villegas,J. M., L. Brown, G. S. de Giori and E. M. Hebert. 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.
31. Woraharn, S., Lailerd, N., Sivamaruthi, B.S., Wangcharoen, W., Sirisattha, S., Peerajan, S. and Chaiyasut, C. 2016. Evaluation of factors that influence the L-glutamic and γ-aminobutyric acid production during Hericium erinaceus fermentation by lactic acid bacteria. *CyTA-Journal of Food*, *14*(1):47-54.

www.SID.ir

Archive of SID

(Original Research Paper)

Optimization of Production Conditions of Soy Milk GABA Produced by Probiotic Bacteria

Sepideh Ghareh yakheh[1], Amir Hossein Elhami Rad[2*], Leyla Nateghi[3], Kambiz Varmira[4]

1-Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, KermanshahP, Iran.
2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
4-Research Center of Oils and Fats, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

Received: 06/10/2018 Accepted:30/12/2018

Abstract

Gamma-amino butyric acid (GABA) as a non-protein amino acid has a widespread application in the body's various organs and inhibition of many physiologic diseases. Lactic acid bacteria are able to GABA synthesis in many foods. The purpose of this study was to ferment the soymilk by a new lactic acid bacterium called *Lactobacillus sp. Makhdzir Naser-1 (GQ451633).* At first, optimum conditions for maximum GABA production were obtained with regard to effective factors such as inoculation time, pH, soy milk concentration and ambient temperature. The optimum conditions are: fermentation time 48 hours, pH 5.3, 12% soy milk and warming temperature 37 ° C. At optimum point, with three repeats of treatment, the produced GABA was 4.17, which has not very significant difference with the predicted value (4.188). Therefore, the accuracy of the proposed equation for predicting GABA value was confirmed.

Key words: Probiotic Beverage, GABA, Soy Milk, Optimization, Response Surface Methodology (RSM)

*Corresponding Author: gharehyakheh79@yahoo.com

www.SID.ir