

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

Somayeh Mohammadkhani¹, Reza Rezaei Mokarram^{2*}, Mahmood Sowti Khiabani³,
Samad Bodbodak⁴

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

ABSTRACT

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

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 ≥ 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

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

سمیه محمدخانی^۱، رضا رضایی مکرم^{۲*}، محمود صوتی خیابانی^۳، صمد بدبدک^۴

^۱ دانشجوی ارشد زیست فناوری 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

^۴ دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی-پژوهشی	سابقه و هدف: گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) به عنوان ترکیب زیست فعال دارای طیف گسترده ای از فعالیت های زیستی است. بنابراین غذاهای فراسودمند غنی شده با گابا به طور گسترده مورد توجه مصرف کنندگان قرار گرفته است. در میان روش های مختلف سنتز گابا، بیوسنتز گابا به روش تخمیر توسط پروبیوتیک ها ساده ترین و امن ترین روش مطرح شده است. آب پنیر مهم ترین ضایعات صنعت پنیر سازی است و به عنوان محیط کشت غنی برای پروبیوتیک ها مطرح می باشد. از این رو هدف این تحقیق، بهبود تولید گابا توسط لاکتوباسیلوس برویس NCL912 در آب پنیر غنی شده با غلظت های مختلف اسید گلوتامیک است.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۵ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۷	مواد و روش ها: بعد از آماده سازی محیط کشت از پودر آب پنیر، غلظت های مختلف اسید گلوتامیک ($0, 250, 500, 1000$) به آن اضافه شد. در ادامه سوسپانسیون سویه لاکتوباسیلوس برویس NCL912 (حاوی 10^8 CFU/g) به نمونه های آب پنیر تلقیح و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت میزان فعالیت آنتی اکسیدانی، فنول کل، گابا و زنده مانی باکتری ها مورد بررسی قرار گرفت.
واژه های کلیدی: گابا لاکتوباسیلوس برویس NCL912 آب پنیر فعالیت آنتی اکسیدانی و فنول کل	یافته ها: نتایج نشان دادند که با گذشت زمان میزان فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یافت اما میزان فنول کل و گابا تا ۴۸ ساعت روند صعودی و سپس تا ۷۲ ساعت روند نزولی داشتند. با افزایش غلظت اسید گلوتامیک میزان فعالیت آنتی اکسیدانی 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 نمونه های غلظت های $0-24$ mg L ⁻¹ صفر تا ۲۴ ساعت ($1/1 \pm 40/1$) و $0-1000$ mg L ⁻¹ و

ساعت ($591/3 \pm 2/6 \text{ mg L}^{-1}$) به دست آمد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که فاکتور زمان اثر معنی داری بر میزان گابا ندارد ($P > 0/05$) اما با افزایش مقدار گلوتامیک اسید مقدار گابا به صورت معنی دار افزایش یافت ($P \leq 0/05$). به طوریکه بیشترین مقدار در غلظت mg L^{-1} ۱۰۰۰ مشاهده شد. بر اساس نتایج آنالیز واریانس و مقایسه میانگین در مقایسه کلی نمونه‌ها از لحاظ میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنول کل، گابا و زنده مانی، اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P > 0/05$) اما تنها در نمونه تیمار شده با غلظت mg L^{-1} صفر اسید گلوتامیک پس از ۲۴ ساعت میزان مهار DPPH و زنده مانی معنی دار ($P \leq 0/05$) 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. (۱۴۰۳). ارزیابی قابلیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو تحت تأثیر هیدرولیز آنزیمی ساده و ترکیبی توسط پیسین و تریپسین. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۶ (۴)، ۲۱-۴۲.



© نویسندگان.

DOI: 10.22069/fppj.2025.23013.1849

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

پساب کارخانه‌های تولیدکننده فرآورده‌های لبنی به‌ویژه صنایع پنیرسازی از دیدگاه زیست‌محیطی مسئله‌ای پراهمیت است. آب پنیر محصول جانبی اصلی پنیرسازی، مایع زردرنگ است که از رسوب و حذف کازئین شیر در فرآیند تولید پنیر حاصل می‌شود (۱). آب پنیر 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 از جمله فرآورده‌های گوشتی، لبنی، نانوازی و تولید نوشیدنی بر پایه آب پنیر استفاده می‌شود (۳). در سالیان اخیر با توجه به بررسی ترکیبات آب پنیر تأثیر مثبت آن به‌عنوان غنی‌کننده در محیط فعالیت باکتری‌های پروبیوتیک به اثبات رسیده است و از آن به‌منظور تحریک رشد باکتری‌های پروبیوتیک استفاده شده است (۴). 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 زیست‌فعال پروتئینی با خواص فراسودمند است که تقریباً در بافت‌های اغلب میکروارگانیسم‌ها، جانوران و گیاهان یافت می‌شود (۷). گابا اسید آمینه غیر پروتئینی ۴ 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 زیست‌فعال در گیاهان و باکتری‌ها نقش متابولیکی در چرخه کربس را ایفای می‌کند و در مهره‌داران به‌عنوان فرستنده سیگنال عصبی عمل می‌کند و نقش مهمی را در

هماهنگی شبکه‌های عصبی موضعی و عملکرد نواحی مغزی ایفای می‌کند (۶). 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 علائم 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). از این‌رو در پزشکی و حتی صنایع غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است.

با افزایش آگاهی عمومی در مورد فرآورده‌های 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).

(۸). اسیدآمینو گلوتامیک به‌عنوان پیش‌ساز گابا حدود ۱۵ درصد ترکیب اسیدهای آمینو پروتئین‌های آب‌پنیر را تشکیل می‌دهد (۱۷). بنابراین حضور این نوع پروتئین‌ها نقش اساسی را در تولید گابا طی تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های مربوطه در استفاده از آب‌پنیر به‌عنوان محیط کشت تخمیر ارائه می‌دهد. زارعی و همکاران (۲۰۲۰) محتوای گابا در نوشیدنی پروبیوتیکی بر پایه پروتئین آب‌پنیر حاوی کنسانتره موز و توت‌فرنگی را بررسی کردند. این محققان گزارش کردند که نوشیدنی پروتئین آب‌پنیر حاوی کنسانتره موز نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بالاترین میزان گابا را دارا بود (۱۸). در نوشیدنی بر پایه آب‌پنیر شیرین غنی شده با *E. malodoratus* SJ25 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 تولیدکننده‌های اصلی گابا انجام شده است. بیوستز 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 آب‌پنیر غنی شده 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 آب‌پنیر

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 به‌طور قابل‌توجهی تحت تأثیر شرایط محیط کشت و ترکیب متوسط آن می‌باشد (۱۲). بنابراین بهینه‌سازی شرایط برای افزایش میزان گابا مهم است. به‌طور 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 ائروموناس، کورینه باکتر، انتروکوک، لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس، لئوکنوستوک، پدیوکوکوس و استرپتوکوک می‌باشد. در بین گونه‌های مختلف لاکتوباسیل‌ها (از جمله لاکتوباسیلوس برویس و لاکتوباسیلوس پلانتروم) از بیشترین میزان تولید گابا برخوردار هستند (۱۴). 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 اسیدلاکتیک به ترتیب در محدوده ۴-۵ و ۲۵-۴۰ درجه سلسیوس گزارش شده است (۱۶). همچنین غلظت گلوتامات در ماده غذایی باید به اندازه 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 هیدرولیزکننده پروتئین در ماده غذایی، کمبود گلوتامیک اسید را در آن جبران کرد

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 (۴/۲ - ۴/۵) 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 (۱۲۰۰×g، ۱۵min) جدا گردید. در ادامه pH سوپرناتانت با محلول سود N 1 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 گوگردار 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 $0, 250, 500 \text{ mg L}^{-1}$ ، ۱۰۰۰ اسید گلوتامیک تهیه شدند (۲۴،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 DPPH - دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده شد. برای این منظور نمونه‌های کشت شده در محیط کشت آب پنیر پس از سانتریفیوژ شدن (۱۵ min, ۱۲۰۰×g) از مایع رویی به میزان mL۱ برداشته و به آن mL۱

(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، اسیتونتریل، هیدروکسید سدیم، اُفتال دی آلدئید، ۲-مرکاپتو اتانول از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

روش مورد استفاده

تهیه پیش کشت: پس از آماده‌سازی محیط کشت MRS برات، پودر لیوفیلیز سویه لاکتوباسیلوس برویس *NCL912* به محیط کشت استریل MRS برات منتقل و توسط شیکر لوله همگن شد. سپس در انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد تا توده سلولی در محیط مایع دیده شود (۲۰).

تلقیح میکروبی: برای تهیه مایه‌های تلقیح اولیه فاکون‌های حاوی کشت‌های باکتریایی با سرعت $12000 \times g$ 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 طول موج ۶۰۰nm قرائت شد. میزان جذب باید برای استاندارد و سوسپانسیون میکروبی تهیه شده بین ۰/۸ - ۰/۱ باشد که برابر با سوسپانسیون باکتریایی معادل $10^8 \times 1/5$ cfu بود (۲۲).

فاز متحرک از دو بافر A (استات سدیم ۰/۰۲M)، pH تنظیم شده روی ۷/۳ با اسید استیک، ۲۰۰ μL تری اتیل آمین در هر ۱۰۰۰ mL (محلول) و بافر B (اسیتونیتریل با درجه کروماتوگرافی) تشکیل شده بود. ۸۰ μL عصاره نمونه‌ها با ۴۰۰ μL از محلول ۰/۴M بافر نمک بورات (pH تنظیم شده روی ۱۰/۴ با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم ۰/۴۰٪) و ۸۰ μL واکنش‌گر مشتق سازی (با حل کردن ۱۰ mg اُفتال دی آلدئید در ۱۰۰ mL محلول ۰/۴M HIRPB-250A، ۵ μm، C18Hichrom، ۲۵۰ mm × ۴/۶)، دستگاه HPLC تزریق شد و با فاز متحرک حاوی بافر A و B (به نسبت ۷/۷:۲۰/۸۰) با سرعت جریان ۰/۸ mL بر دقیقه در ۴۰ درجه سلسیوس عبور داده شد. مقدار گابا با استفاده از دتکتور UV/Vis طول موج ۳۳۸ nm 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 ۲۴ ساعت یکبار) با شمارش باکتریایی نمونه‌ها به روش مرتضویان و همکاران (۲۰۰۶) 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 بی‌هوای انکوباتور شده و شمارش شدند (۲۹).

طرح آماری و نرم افزارهای مورد استفاده: در این مطالعه اثر فاکتورهای زمان (۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) و غلظت گلوتامات سدیم (۰ mg L⁻¹، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰) بر شاخص‌های زنده‌مانی باکتری‌ها، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات زیست‌فعال تولید شده توسط

محلول DPPH اضافه و به مدت زمان ۳۰ min در تاریکی در دمای اتاق استراحت داده شد. برای نمونه شاهد به جای سوپرناتانت از ۱ ml آب استفاده شد. میزان جذب هر کدام از نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico, USA,) (UV-Vis 2100) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۲۶):

اندازه‌گیری فنول کل: برای اندازه‌گیری مقدار فنول کل از روش فولین-سیتوکالتیو استفاده شد. به ۳۰۰ μL مایع رویی، ۴۰۰ μL آب مقطر اضافه شد. بعد هم زدن، ۳۰۰ μL معرف فولین ۱۰٪ اضافه شد. بعد از سپری شدن ۸ min، ۳۰۰ μL کربنات سدیم اشباع (۷/۵٪) اضافه شد. پس از نگهداری مخلوط حاصل به مدت ۳۰ min در محل تاریک و در دمای اتاق، میزان جذب در طول موج ۷۵۰ nm خوانده شد و به صورت μg معادل اسید گالیک در هر mL گزارش شد (۲۷).

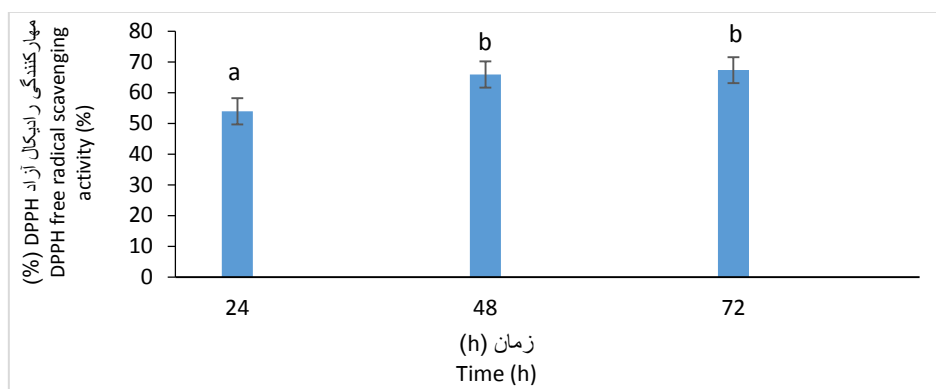
اندازه‌گیری گابا: مقدار گابا توسط روش لیو و همکاران (۲۰۱۴) اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۰/۵ mL نمونه با ۵ mL محلول ۱۰٪ تری‌کلرواستیک اسید مخلوط و به مدت ۱ min هم‌زده شد و سپس به مدت ۲ ساعت در ۴۰ درجه سلسیوس جهت استخراج گابا نگهداری شد و با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ min سانتریفیوژ شد و فاز مایع بالایی با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ μm 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).

میزان فعالیت آنتی اکسیدانی معنی دار ($P \leq 0/05$) بود. نتایج مقایسه میانگین اثر زمان و غلظت اسید گلوتامیک در شکل ۱ آورده شده است. می توان مشاهده کرد که با گذشت زمان تا ۴۸ ساعت فعالیت مهارکنندگی به طور معنی دار افزایش یافت ($P \leq 0/05$)، ولی بین زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معنی دار وجود نداشت ($P > 0/05$) (شکل ۱ الف). همچنین بیشترین مقدار فعالیت مهارکنندگی رادیکال های آزاد DPPH مربوط به تیمار اسید گلوتامیک 500 mg L^{-1} بوده و کمترین مقدار مربوط به نمونه شاهد بود (شکل ۱ ب).

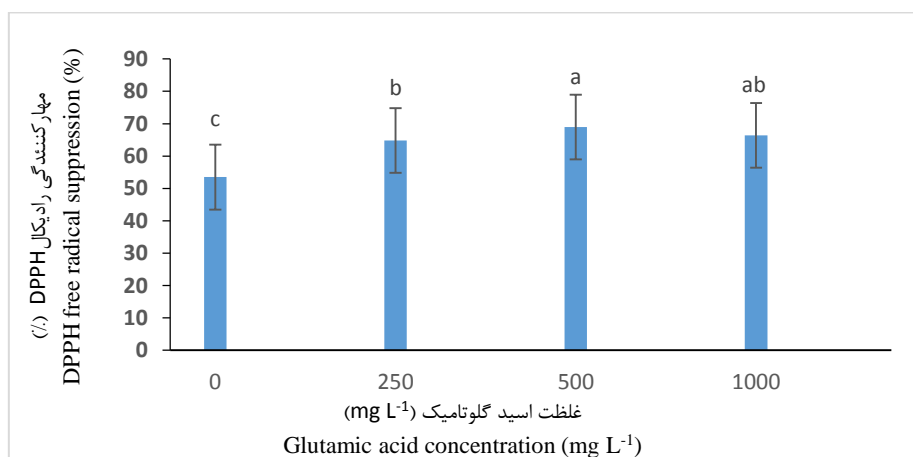
باکتری لاکتوباسیلوس برویس *NCL912* در قالب طرح کاملاً تصادفی به روش آزمایش ها فاکتوریل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همه تیمارها در سه تکرار انجام شد. اثرات اصلی و متقابل فاکتورهای اعمال شده با روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین تیمارها با روش حداقل میانگین مربعات در سطح احتمال ($P < 0/05$) انجام گرفت. آنالیزهای آماری با نرم افزارهای SPSS نسخه ۲۰ و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

فعالیت آنتی اکسیدانی: نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثرات اصلی زمان و غلظت اسید گلوتامیک بر



(الف) (A)



(ب) (B)

شکل ۱- تاثیر (الف) زمان و (ب) غلظت اسید گلوتامیک بر توان مهارکنندگی رادیکال های 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 نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($P \leq 0/05$).

۷۲ ساعت (۷۶/۰۷٪) مشاهده شد. فعالیت مهار DPPH در پژوهش حاصل می‌تواند ناشی از پروتئین‌های آب پنیر از جمله 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).

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 آنتی‌اکسیدانی افزایش و سپس کاهش یافت (جدول ۱). کمترین و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب مربوط به نمونه شاهد- ۲۴ ساعت (۴۲/۵۳٪) و ۵۰۰ mg L⁻¹ -

جدول ۱- اثر غلظت اسید گلوتامیک و زمان بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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

غلظت اسید گلوتامیک (mg L ⁻¹)				زمان (h)	نوع باکتری (Type of bacteria)
Glutamic acid concentration (mg L ⁻¹)					
۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	.	Time (h)	
۵۳/۷۰ ± ۰/۸۳ ^d	۵۹/۵۰ ± ۲/۵۱ ^{cde}	۵۹/۹۷ ± ۱/۸۲ ^{cde}	۴۲/۵۳ ± ۲/۷۶ ^{†*}	۲۴	<i>NCL912</i> لاکتوباسیلوس برویس (<i>Lactobacillus brevis</i> <i>NCL912</i>)
۶۶/۲۷ ± ۰/۳۳ ^{bc}	۶۹/۶۰ ± ۲/۲۷ ^{ab}	۶۶/۰۳ ± ۴/۱۳ ^{bcd}	۵۷/۷۳ ± ۲/۶۴ ^{de}	۴۸	
۶۹/۸۳ ± ۰/۸۸ ^{ab}	۷۶/۰۷ ± ۴/۱۸ ^a	۶۶/۶۰ ± ۲/۸۱ ^{bc}	۵۶/۸۷ ± ۳/۷۲ ^d	۷۲	

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

علاوه بر این افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طول تخمیر به علت آزادسازی آگیلون 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

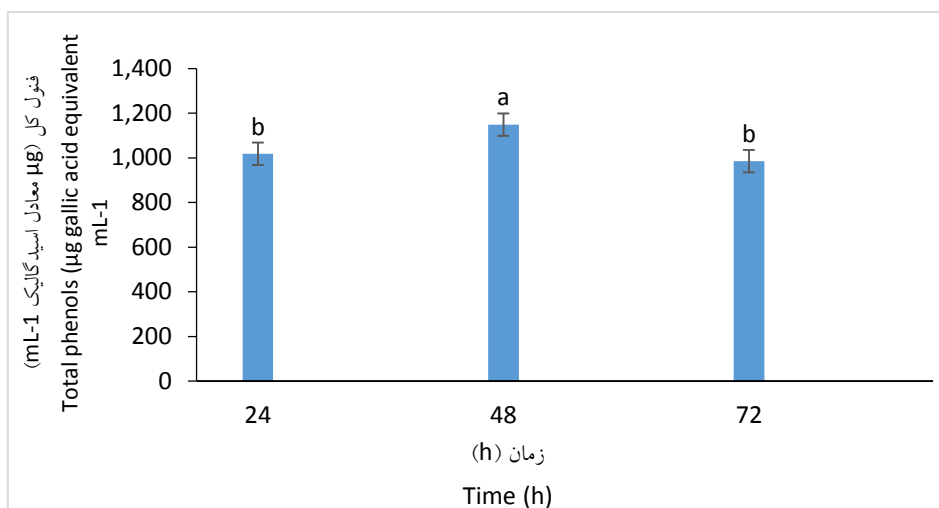
علاوه به متابولیت‌های واسط دیگری تبدیل و وارد چرخه اسیدسیتریک می‌شود که در نهایت می‌تواند باعث افزایش سنتز ترکیبات فنولی شود و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد. از طرف دیگر کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس مهار رادیکال DPPH بعد از ۴۸h تخمیر را می‌توان به تجزیه توالی‌های آنتی‌اکسیدانی (ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و پپتیدهای زیست فعال) در طی فرآیند تخمیر نسبت داد (۴۶). کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طول زمان تخمیر به افزایش تخریب ترکیبات فنولی نسبت داده می‌شود همچنین می‌تواند به علت افزایش واکنش بین پروتئین‌ها و پلی‌فنول‌ها باشد (۳۴). در تحقیقی روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماست تهیه شده از شیر سویا و گردوی آمریکایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاترین ماست نسبت به نمونه شاهد به وجود فعالیت

فعالیت آنتی اکسیدانی در حین تخمیر شیر حاوی فندق، تجمع فنل و پروتئولیز بیان شد (۴۴).

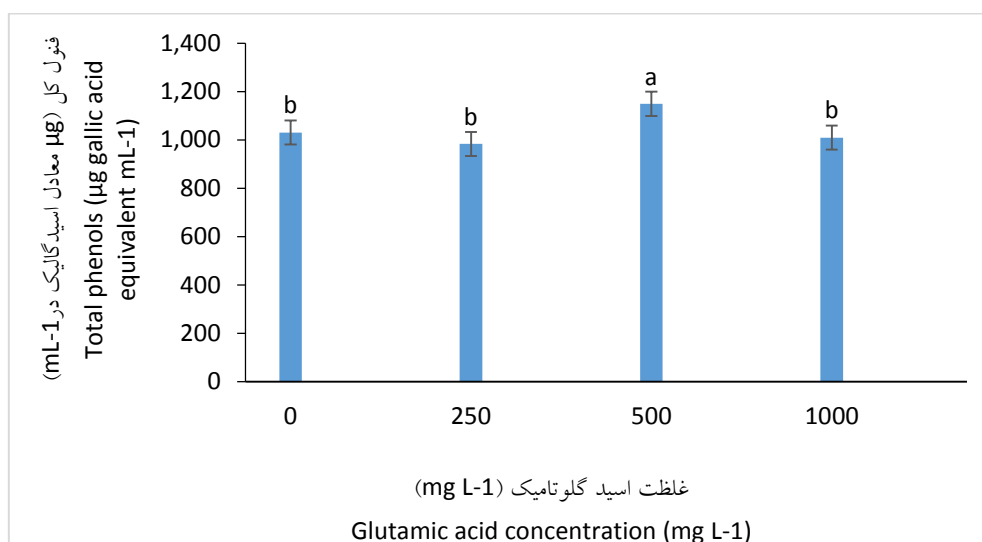
کرباسی و همکاران (۲۰۱۵) در تولید نوشیدنی تخمیری پروبیوتیکی بر پایه شیر خرم نشان دادند که با افزایش زمان تخمیر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها افزایش یافته است (۳۸). چون در شرایط pH اسیدی به علت پلیمریزاسیون ترکیبات پلی فنولی و همچنین آنزیم‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک پیتیدهای کوچک با فعالیت آنتی اکسیدانی ایجاد می‌گردد. کیتی بونچاکول و همکاران (۲۰۲۱)، در تولید نوشیدنی پروبیوتیکی تخمیری حاوی سویه لاکتوباسیلوس پتوسوس D39 پس از نگهداری ۳۰ روزه اشاره کردند که فعالیت مهارای FRAP و ORAC (به ترتیب $58/33 \mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$ و $431/14$) به طور قابل توجهی کاهش یافت درحالی که فعالیت مهار رادیکال DPPH ($0/05 \mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$) بدون تغییر باقی ماند. برای این که که برخی از گونه‌های لاکتوباسیلوس می‌توانند از آنتی اکسیدان‌های فنولیک به‌عنوان سویسترا استفاده کنند (۳۹).

فنول کل: نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر فاکتور زمان و غلظت اسید گلوتامیک بر میزان فنول معنی‌دار بود ($P \leq 0/05$). همانطور که در شکل ۲ الف مشاهده می‌شود با گذشت زمان تا ۴۸ ساعت میزان فنول کل افزایش و سپس کاهش یافته است. همچنین با افزایش غلظت اسید گلوتامیک تا 500 mg L^{-1} مقدار فنول کل افزایش و سپس کاهش یافت (شکل ۲ ب).

آنتی اکسیدانی 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 به علت حضور ترکیبات زیست فعال از جمله کاروتنوئیدها، آلفا توکوفرول، کلروفیل اسپرولینا می‌باشد (۳۶). موسوی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که تخمیر اسید لاکتیکی توسط دوسویه پروبیوتیکی (لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) در آب انار، فعالیت آنتی اکسیدانی را به طور قابل توجهی بهبود بخشید. آن‌ها اظهار کردند که گلوکز موجود در ساختار آنتوسیانین‌ها احتمالاً توسط باکتری‌ها به‌عنوان منبع انرژی مصرف می‌شود. در نتیجه آگلیکون‌های مرتبط با اثر مهار رادیکال بالاتر تولید می‌شود که منجر به تولید برخی متابولیت‌ها با فعالیت آنتی اکسیدانی در طی تخمیر می‌شود (۴۵). طی بررسی تأثیر تخمیر بر فعالیت آنتی اکسیدانی 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، پیتیدها 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



(الف) (A)



(ب) (B)

شکل ۲-تاثیر (الف) زمان و (ب) غلظت اسید گلوتامیک بر مقدار فنول کل تولید شده توسط *Lactobacillus brevis* *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 نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($P \leq 0.05$).

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 ۵۰۰ mg L⁻¹-زمان ۴۸ ساعت (۱۲۸۵ µg معادل اسید گالیک در mL⁻¹) مشاهده شد. تحقیقات مختلفی تولید این ترکیبات توسط باکتری‌های اسید لاکتیکی در محیط تخمیری

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در تمام زمان‌ها با افزایش غلظت اسید گلوتامیک تا ۵۰۰ mg L⁻¹، مقدار فنول کل افزایش و سپس با افزایش غلظت به ۱۰۰۰ mg L⁻¹ 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 ۴۸ ساعت اول میزان فنول کل افزایش و در ادامه

ایجاد شده توسط باکتری اسیدلاکتیک اکسیداسیون این ترکیبات را کاهش می دهند و باعث حفاظت از آنها در طول تخمیر می شوند (۴۱). علت کاهش ترکیبات فنولی در برخی از نمونه های تیمار شده می تواند 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 پلی فنول ها و کاهش ترکیبات فنولی شود (۴۲).

ثبت کرده است. طبق نظر کورهونن (۲۰۰۹) پروتئولیز فرآورده های لبنی ممکن است سبب آزاد شدن آمینواسیدهای با زنجیر جانبی فنول مثل تیروزین شود و مقدار ترکیبات فنول کل را افزایش دهد (۴۰). علت افزایش ترکیبات فنولی در طول زمان تخمیر ممکن است به دلیل آنزیم های هیدرولیتیک ترشح شده توسط برخی سویه های اسیدلاکتیک باشد که ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی متصل را به صورت محلول و نامحلول آزاد می کند. علاوه بر این محیط اسیدی

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

غلظت اسید گلوتامیک (mg L ⁻¹)				زمان (h) (Time (h))	نوع باکتری (Type of bacteria)
۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۰		
۹۷۱/۶ ± ۷۳/۴ ^b	۱۰۸۱/۴ ± ۵۲/۷ ^b	۹۴۴/۸ ± ۴۷/۹ ^c	۹۴۳/۳ ± ۱۳۵/۱ ^{cd*}	۲۴	<i>NCL912</i> لاکتوباسیلوس برویس
۱۱۱۵/۳ ± ۴۴/۹ ^b	۱۲۸۵/۷ ± ۱۱۳/۷ ^a	۱۰۱۰/۰ ± ۴۸/۴ ^b	۹۳۴/۰ ± ۴۹/۳ ^{cd}	۴۸	<i>Lactobacillus brevis</i>)
۹۲۲/۵ ± ۲۵/۷ ^{cd}	۱۰۴۶/۵ ± ۳۸/۰ ^b	۹۸۸/۶ ± ۱۰/۹ ^c	۹۰۲/۳ ± ۹/۶ ^d	۷۲	<i>NCL912</i>

*حروف لاتین کوچک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها است (P ≤ ۰/۰۵).

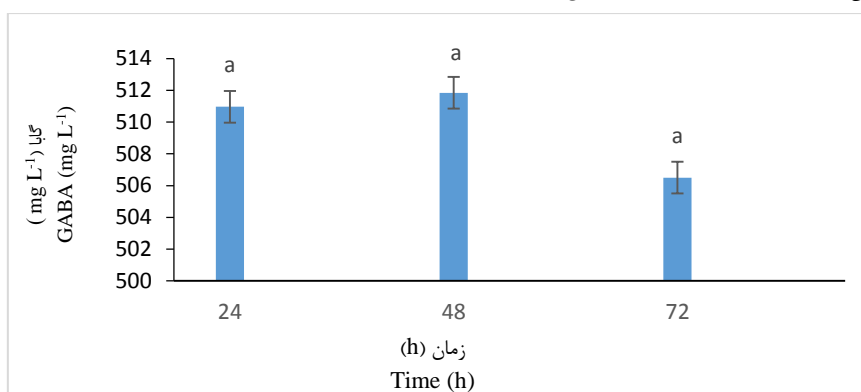
همکاران (۲۰۲۱) و موسوی و همکاران (۲۰۱۳) به ترتیب در نوشیدنی تخمیری بر پایه شیر برنج قهوه ای و آب انار گزارش کردند (۴۵،۳۹). ماست سین بیوتیکی تهیه شده با سویه لاکتیکازی باسیلوس پاراکازی و جلبک اسپرولینا بالاترین سطح فنول کل را نسبت به سایر نمونه ها نشان دادند (۳۶). این محققان افزایش فنول در ماست سین بیوتیکی به دلیل فعالیت تخمیری باکتری های پروبیوتیکی نسبت دادند. تغییرات در محتوای پلی فنول ها در طول تخمیر ممکن است به دلیل تخریب، تبدیل و سنتز آن ها در طول رشد و فرآیندهای متابولیکی میکروارگانیسم ها باشد.

بررسی میزان گابا: نتایج آنالیز واریانس نشان داد که فاکتور زمان اثر معنی داری بر میزان گابا ندارد (۰/۰۵ > P) هرچند که تا ۴۸ ساعت مقدار گابا افزایش ولی در ادامه در ۷۲ ساعت مقدار آن کاهش یافت. با

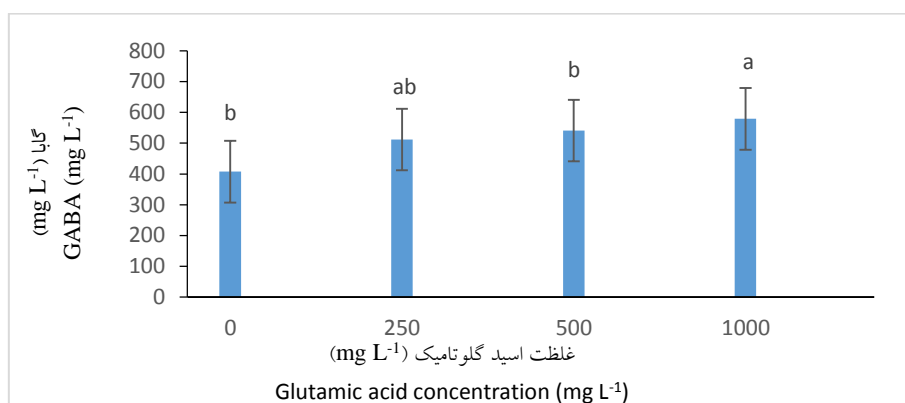
جعفری و صارم نژاد (۲۰۲۰) گزارش کردند که اثر تخمیر همزمان شیر با کشت های آغازگر ماست و لاکتوباسیلوس ساکنی منجر به افزایش فنول های نمونه تخمیر شده نسبت به شاهد شد. متابولیسم میکروبی ترکیبات فنولی و همچنین تولید اسیدهای فنولیک جدید در طی فرآیند اسیدی شدن ماست به عنوان عامل احتمالی افزایش ترکیبات فنولی گزارش شد (۴۳). Maleki و همکاران (۲۰۱۵) اظهار کردند که مقدار محتوای فنول کل ترکیبات فنولی شیر فندق تخمیر شده در طی تخمیر توسط دانه های کفیر کاهش یافته و بعد از ۴۸ ساعت تخمیر از ۱۳۰/۴۲ ± ۱/۴۲ mg of GAE/100 mL به ۹۱/۷۵ ± ۳/۳۳ GAE/100 mL کاهش یافت (۴۴). آن ها متابولیسم ترکیبات فنولی توسط میکروارگانیسم های دانه کفیر را علت این کاهش دانستند. نتایج مشابهی توسط کیتی بونچاکول و

تبدیل و پس از تبدیل آن به سوکسینات وارد چرخه اسیدسیتریک می‌شود و در نهایت می‌تواند مجدداً به گلوتامیک اسید تبدیل شود (۴۶). با این حال در این بررسی حضور گابا در نمونه‌های شاهد (فاقد اسید گلوتامیک) مشاهده شد. علت آن را می‌توان به حضور سویه *Lactobacillus brevis* 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 سوسترا برای این آنزیم مطرح باشد. مکانیسم سنتز گابا از مسیر آلفا-دکربوکسیلاسیون ال-گلوتامات در این سویه میکروبی تأیید شده است (۹).

افزایش مقدار گلوتامیک اسید مقدار گابا به‌صورت معنی‌دار افزایش یافت ($P \leq 0/05$). طوریکه بیشترین مقدار در غلظت 1000 mg L^{-1} مشاهده شد (شکل ۳). ترکیب مواد مغذی از جمله افزودنی محیطی مثل گلوتامات از عوامل اصلی مؤثر بر تولید گابا در طی تخمیر است. چون میکروارگانیسم سوسترای 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



(A) الف



(B) ب

شکل ۳- تاثیر (الف) زمان و (ب) غلظت اسید گلوتامیک بر مقدار گابا تولید شده توسط *Lactobacillus brevis* 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 ($P \leq 0/05$).

می‌باید زیرا این pH باعث کاهش فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز می‌شود اما در محدوده pH بهینه شده بسته به نوع و شرایط محصول فرآوری به علت این که این آنزیم حداکثر فعالیت را دارد بیشترین میزان گابا حاصل می‌شود (۴۸). 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 به مرور زمان و ورود به فاز مرگ و نیز عدم وجود شرایط مناسب رشد باکتری از میزان تولید کاسته می‌شود (۴۹). 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 (۵۰).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در یک زمان مشخص مقدار گابا با افزایش غلظت گلوتامیک اسید به طور معنی‌دار افزایش یافت ($P \leq 0/05$)، بطوری‌که بیشترین مقدار گابا مربوط به نمونه‌های حاوی 1000 mg L^{-1} اسید گلوتامیک بود. همچنین در یک غلظت مشخص با افزایش زمان تا ۴۸ 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 1 mg L^{-1} صفر-۲۴ ساعت ($1/1 \pm 40/1 \text{ mg L}^{-1}$) و $1000-72$ ساعت ($2/6 \pm 591/3 \text{ mg L}^{-1}$) 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 (۴۷). علت کاهش گابا در نمونه‌های آب پنی می‌تواند ناشی از تغییرات pH (۴/۵) باشد. میزان گابا در pH پایین مانند ۴ کاهش

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

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

غلظت اسید گلوتامیک (mg L^{-1})				زمان (h) (Time (h))	نوع باکتری (Type of bacteria)
Glutamic acid concentration (mg L^{-1})					
۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	.		
$591/0 \pm 3/2^a$	$550/3 \pm 10/8^b$	$501/3 \pm 2/6^c$	$401/3 \pm 2/9^{d*}$	۲۴	لاکتوباسیلوس برویس
$581/7 \pm 1/4^a$	$531/7 \pm 6/1^b$	$520/3 \pm 4/2^{bc}$	$413/7 \pm 2/3^d$	۴۸	<i>NCL912</i>
$564/0 \pm 3/2^{ab}$	$541/0 \pm 6/0^b$	$514/0 \pm 1/5^c$	$407/0 \pm 1/1^d$	۷۲	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>NCL912</i>

*حروف لاتین کوچک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P \leq 0/05$)

بیوتیک‌های اینولین به آلزینات 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 $426/67$ گزارش کردند که علت آن به وجود منبع کربن مناسب به همراه منبع ازت پروتئین می‌باشد (۵۲)

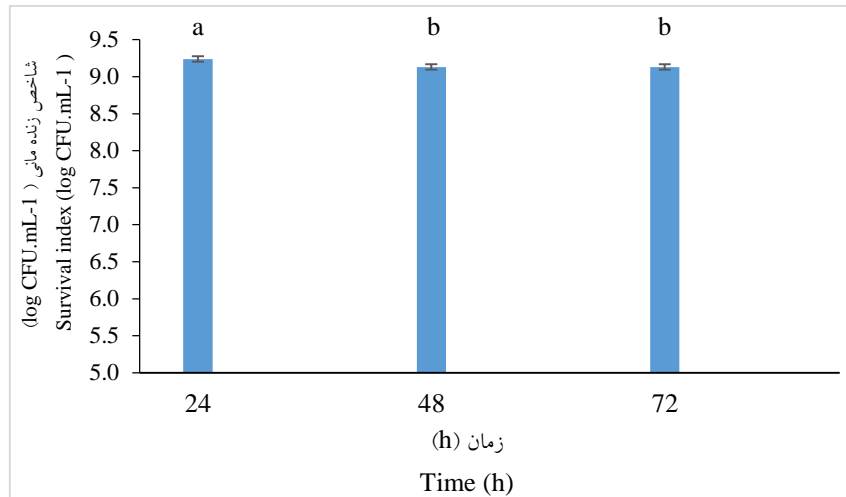
کریمی (۲۰۲۰)، بیان کرد که لاکتوباسیلوس برویس *G42* میکروکپسوله شده در مدت زمان ۱۲۰ ساعت $324/9 \text{ mg/L}$ گابا تولید کرد. در حالی که در محیط MRS در مدت زمان مشابه گابای تولید شده توسط سلول‌های آزاد $241/18 \text{ mg/L}$ گزارش شد (۵۱). افزایش تولید گابا می‌تواند به دلیل اضافه شدن پری-

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).

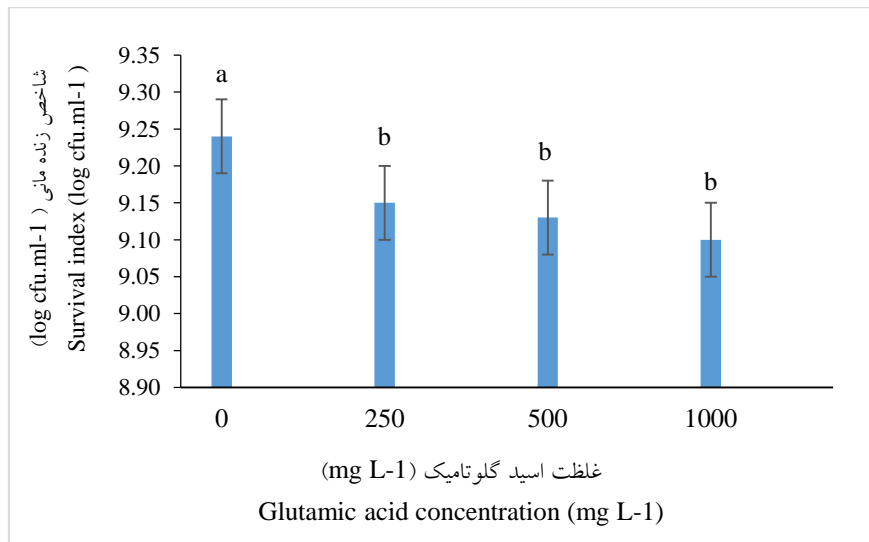
نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین و کمترین مقدار شاخص زنده‌مانی به ترتیب مربوط به نمونه 0 mg L^{-1} اسید گلوتامیک-۲۴ ساعت (cfu. mL) $9/70 \pm 0/26^{-1}$ و 1000 mg L^{-1} اسید گلوتامیک-۲۴ ساعت ($9/07 \pm 0/03 \text{ cfu. mL}^{-1}$) بود (جدول ۴). زنده‌مانی و بقای باکتری‌های اسیدلاکتیک در محصولات لبنی پروبیوتیکی به عوامل مختلفی بستگی دارد که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به شرایط کشت، میزان اکسیژن محلول، سطح تلقیح و گونه‌های پروبیوتیکی به‌کاربرده اشاره کرد (۵۶). 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 یک طرف و تولید اسید و کاهش pH از طرف دیگر زنده‌مانی این نوع باکتری‌ها را می‌یابد (۵۵).

فلاح و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که با افزایش زمان تخمیر از ۲۴h به ۷۲h میزان گابا تولیدی نیز افزایش یافت (۵۳). این امر می‌تواند به دلیل افزایش تعداد باکتری و افزایش بازده تبدیل مونوسدیم گلوتمات به گابا باشد که با مطالعه کیم و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت داشت (۵۲). در تحقیق الهامی راد و همکاران (۲۰۲۱) میزان بهینه غلظت شیر سویا ۶٪ به دست آمد و دیده شد که با افزایش غلظت تا نقطه بهینه مقدار گابا نیز افزایش می‌یابد. اما پس‌از آن موجب کاهش گابا می‌گردد (۵۴). این نتیجه می‌تواند از آنجا 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 اسپروولینا بالاترین سطح گابا را در پایان ذخیره‌سازی مشاهده شد که علت آن را محتوای بالای اسید گلوتامیک جلبک اسپروولینا و pH ۴/۵ ایجاد شده ناشی از تخمیر که منجر به فعالیت بالایی اسید گلوتامیک دکربوکسیلاز می‌شود دانستند (۳۶).

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 ($P \leq 0/05$). بیشترین مقدار زنده‌مانی مربوط به زمان ۲۴ ساعت و غلظت 0 mg L^{-1} اسید گلوتامیک است و با افزایش زمان و افزایش غلظت اسید گلوتامیک زنده‌مانی کاهش می‌یابد ($0/05$). ($P \leq$ شکل ۴). زنده‌مانی از $9/24 \log \text{ cfu. ml}^{-1}$ در ۲۴ ساعت به $9/13 \log \text{ cfu. ml}^{-1}$ در ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش یافته که مقدار ناچیزی است علاوه بر این تولید، تجمع گابا و مصرف آن در چرخه اسیدسیتریک بر مقدار نهایی گابا در هر زمان (۲۴، ۴۸ و ۷۲



(الف) (A)



(ب) (B)

شکل ۴- 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 ۴- 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

غلظت اسید گلوتامیک (mg L ⁻¹)				زمان (h) (Time (h))	نوع باکتری (Type of bacteria)
۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۰		
۹/۰۷ ± ۰/۰۳ ^b	۹/۱۰ ± ۰/۰۵ ^b	۹/۰۹ ± ۰/۰۴ ^b	۹/۰۷ ± ۰/۰۶ ^a	۲۴	<i>Lactobacillus brevis</i> NCL912
۹/۰۹ ± ۰/۰۴ ^b	۹/۱۸ ± ۰/۰۴ ^b	۹/۱۸ ± ۰/۰۲ ^b	۹/۰۸ ± ۰/۰۶ ^b	۴۸	
۹/۱۴ ± ۰/۰۳ ^b	۹/۱۰ ± ۰/۰۴ ^b	۹/۱۸ ± ۰/۰۱ ^b	۹/۱۱ ± ۰/۰۶ ^b	۷۲	

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

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اثرات فیزیولوژیکی گابا در درمان ناهنجاری‌های نورولوژیکی متعدد، می‌توان از آن به‌عنوان یک ترکیب زیست‌فعال در غذاها استفاده کرد. از آنجایی که 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 *Lactobacillus* برویس *NCL912* میتوان غذاها را فراسودمند با خواص تغذیه‌ای مطلوب تولید کرد. از طرف دیگر 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 *Lactobacillus* 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 *Lactobacillus* برویس *NCL912* و یا کاربرد *Lactobacillus* برویس *NCL912* به تنهایی منجر به افزایش میزان گابا در نمونه‌ها شد. همچنین میزان ترکیبات فنولی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و زنده‌مانی 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 *Lactobacillus* برویس *NCL912* وجود دارد.

در بررسی سویه و زمان نگهداری بر روی زنده‌مانی بیفیدوباکتریوملاکتیس (BB-12) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (Ia-5) در تولید کره لاکتیکی مشاهده شد که زمان بر زنده‌مانی باکتری‌های بیفیدوباکتریوملاکتیس (BB-12) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (Ia-5) در روزهای ۱۵ و ۳۰ تأثیر معنی‌داری دارد و در سایر زمان‌های مورد بررسی تأثیر معنی‌داری مشاهده نکردند (۵۶).

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 (۳۶). 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 *Lactobacillus* پلانتروم و *Lactobacillus* دلبروکی به ترتیب با میزان 4×10^6 cfu. ml⁻¹ و $4/7 \times 10^6$ cfu. mL⁻¹ شد (۵۸). این محققان اشاره کردند که ترکیبات فنولی موجود در عصاره پوست انار نقش اثرگذاری در رشد و زنده‌مانی سویه‌ها اعمال کرده است.

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. 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. 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. 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. 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 GABA_A 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 *Lactobacillus 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. 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 containing 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. 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. Doghe, 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.