رساله‌ی دکتری: سپیده قره یخه، ۱۳۹۶

غربالگری باکتریهای اسیدلاکتیک تولید کننده گابا جدا شده از زنبور عسل بهینه سازی محیط کشت و بررسی آنها در شیر سویا و شربت عسل

گاماآمینوبوتیریک اسید (گابا) یک اسیدآمینه چهار کربنه غیرپروتئینی است که به عنوان انتقال¬دهنده عصبی مهار کننده مهمی در سیستم مرکزی عصبی پستانداران نقش بازی می¬کند و توسط آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز سنتز می-شود. این ترکیب دارای چندین اثر فیزیولوژیک مهم از جمله کاهش فشار خون، درمان بی¬خوابی و افسردگی می¬باشد. تعدادی از باکتری¬ها و جلبک¬ها قادر به تولید مقادیر قابل¬توجهی گابا می¬باشند. از بین باکتری¬ها می¬توان به باکتری¬های اسیدلاکتیک اشاره کرد که به طور گسترده در صنعت مواد غذایی استفاده شده است زیرا جزء باکتری¬های ایمن می‌باشند که در این پژوهش غربالگری و بهینه¬سازی تعدادی از باکتری¬های اسیدلاکتیک جدا شده از زنبور عسل جهت تولید گابا و بررسی آنها در شیر سویا و شربت عسل انجام شد. هدف از بخش اول این پژوهش بررسی خواص پروبیوتیکی و مقاومت آنتی¬بیوتیکی پنج باکتری اسید لاکتیک Lactobacillus fermentum (HM027642)، Lactobacillus kunkeei (GQ451631)، Naser-1 (GQ451633) Lactobacillus sp. Makhdzir ، Lactobacillus sp. Taj Naser-1 (GQ451611) ، Lactobacillus pentosus (HM027640))، ایزوله شده از عسل موجود در معده زنبور عسل بوده است. مطابق با نتایج بدست آمده، تمامی باکتریهای ایزوله شده دارای خاصیت پروبیوتیکی مطلوبی از لحاظ مقاومت به اسید، مقاومت به نمک‌های صفراوی، مقاومت به شیره معده (پپسین، تریپسین)، عدم فعالیت همولیتیک، هیدرولیزال آرژنین بودند و عدم مقاومت آنتی-بیوتیکی سویه¬های مذکور نیز تایید شد. در بخش دوم تحقیق، قابلیت تولید گابا توسط باکتریهای مذکور در محیط کشت MRS مایع در pH برابر با 5 و اسیدگلوتامیک 50 میلی¬مولار به مدت 72 ساعت توسط دستگاه HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که باکتری(GQ451633 Lactobacillus sp. Makhdzir Naser-1) بالاترین توانایی تولید گابا (0/6290 میلی مولار) را نشان داد. در بخش سوم تحقیق سینتیک رشد و تولید گابا، همچنین تغییرات pH محیط کشت MRS مایع حاوی اسید گلوتامیک 50 میلی مولار، با pH برابر 5 و در دمای ?C37 هر سه ساعت یک بار، به مدت 72 ساعت انجام شد و مقدار تغییرات رشد در OD=600 nm با استفاده از اسپکتروفتومتر و مقدار تولید گابا توسط دستگاه HPLC همچنین تغییرات pH اندازه گیری گردید. بیشترین مقدار رشد، گابا و pH به ترتیب عبارتند از 1/86 بعد از 18 ساعت، 0/453 میلی¬مولار بعد از 51 ساعت و 4/86 پس از 42 ساعت حاصل شد. در بخش چهارم از آنجا که شرایط بهینه تخمیر میکروارگانیسم¬ها با همدیگر متفاوت بود، فاکتورهای کلیدی مؤثر بر مقدار تولید گابا شامل مقدار اسیدگلوتامیک، دمای محیط کشت، pH اولیه و مدت زمان گرمخانه¬گذاری به طور جداگانه بررسی شدند تا رنج تغییرات هر فاکتور و اثر آن بر مقدار تولید گابا در طی تخمیر مشخص شود. نتایج نشان می¬داد که اسیدگلوتامیک با غلظت 400 میلی¬مولار، pH = 5، دمای ?C 37 به مدت 60 ساعت شرایط بهینه تولید بود و بیشینه مقدار گابای

تولیدی در بررسی هر فاکتور به ترتیب 1/1، 0/576، 0/563، 0/574 میلی¬مولار بود. در بخش پنجم شرایط تولید گابا توسط باکتری Lactobacillus sp. Makhdzir Naser-1 (GQ451633) با استفاده از فاکتور مستقل زمان، دما، اسیدگلوتامیک و pH توسط روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی به منظور تولید بیشترین مقدار گابا به¬کار گرفته بهینه¬سازی شد. 30 تیمار طراحی گردید و نتایج نشان داد که بسته به شرایط مختلف به کار رفته در حین تخمیر مقدار گابای تولیدی در محدوده 0/87 میلی مولار تا 4/3 میلی مولار متغیر بود. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس نشان داد که اثر هر چهار پارامتر مورد بررسی بر مقدار گابای تولیدی معنی¬دار بود ($p < 0/05$). نقطه بهینه شامل دما ? 37/11 و pH = 5/26 و مقدار اسید گلوتامیک 506/99 و زمان 53 ساعت خواهد بود که مقدار گابای تولیدی در چنین شرایطی 4/3 میلی مولار خواهد بود. در بخش ششم شرایط بهینه به دست آمده به منظور تولید نوشیدنی فراسودمند پروبیوتیکی در شیرسویا و شربت عسل بررسی شد که تیمار برتر شیرسویای 6% با مقدار گابای تولیدی (mM855/3) بود که از نظر آماری با تیمارهای حاوی شیر سویا اختلاف معنی داری (p?0/05) داشت و پایین ترین میزان تولید گابا متعلق به تیمار حاوی شربت عسل با غلظت 12 درصد (mM090/3) بود که از نظر آماری با سایر تیمارها اختلاف معنی داری (p?0/05) داشت. نتایج این تحقیق ثابت کرد با افزایش میزان غلظت شربت عسل و کاهش میزان غلظت شیرسویا میزان پذیرش کلی نمونه¬های مشابه افزایش یافت بطوریکه بالاترین امتیاز پذیرش کلی در روز اول و هفتم تولید متعلق به نمونه شربت عسل 12 درصد و پایین ترین امتیاز پذیرش متعلق به نمونه شیرسویای 12 درصد بود که از نظر آماری اختلاف معنی داری (p?0/05) با یکدیگر داشتند. به طور کلی نوشیدنی فراسودمند پروبیوتیکی شربت عسل 12 درصدی با 3/095 میلی¬مولار گابا و جمعیت میکروبی 437/8 Log cfu/ml به عنوان تیمار بهینه از نظر سلامت¬بخشی و حسی انتخاب شد.

گاماآمینوبوتیریک اسید (گابا) یک اسیدآمینه چهار کربنه غیرپروتئینی است که به عنوان انتقال¬دهنده عصبی مهار کننده مهمی در سیستم مرکزی عصبی پستانداران نقش بازی می¬کند و توسط آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز سنتز می-شود. این ترکیب دارای چندین اثر فیزیولوژیک مهم از جمله کاهش فشار خون، درمان بی¬خوابی و افسردگی می¬باشد. تعدادی از باکتری¬ها و جلبک¬ها قادر به تولید مقادیر قابل¬توجهی گابا می¬باشند. از بین باکتری¬ها می¬توان به باکتری¬های اسیدلاکتیک اشاره کرد که به طور گسترده در صنعت مواد غذایی استفاده شده است زیرا جزء باکتری¬های ایمن می‌باشند که در این پژوهش غربالگری و بهینه¬سازی تعدادی از باکتری¬های اسیدلاکتیک جدا شده از زنبور عسل جهت تولید گابا و بررسی آنها در شیر سویا و شربت عسل انجام شد. هدف از بخش اول این پژوهش بررسی خواص پروبیوتیکی و مقاومت آنتی¬بیوتیکی پنج باکتری اسید لاکتیک Lactobacillus fermentum (HM027642)، Lactobacillus kunkeei (GQ451631)، Naser-1 (GQ451633) Lactobacillus sp. Makhdzir ، Lactobacillus sp. Taj Naser-1 (GQ451611) ، Lactobacillus pentosus HM027640))، ایزوله شده از عسل موجود در معده زنبور عسل بوده است. مطابق با نتایج بدست آمده،

تمامی باکتریهای ایزوله شده دارای خاصیت پروبیوتیکی مطلوبی از لحاظ مقاومت به اسید، مقاومت به نمک‌های صفراوی، مقاومت به شیره معده (پپسین، تریپسین)، عدم فعالیت همولیتیک، هیدرولیزال آرژنین بودند و عدم مقاومت آنتی-بیوتیکی سویه¬های مذکور نیز تایید شد. در بخش دوم تحقیق، قابلیت تولید گابا توسط باکتریهای مذکور در محیط کشت MRS مایع در pH برابر با 5 و اسیدگلوتامیک 50 میلی¬مولار به مدت 72 ساعت توسط دستگاه HPLC مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که باکتری(Lactobacillus sp. Makhdzir Naser-1 (GQ451633 بالاترین توانایی تولید گابا (0/6290 میلی مولار) را نشان داد. در بخش سوم تحقیق سینتیک رشد و تولید گابا، همچنین تغییرات pH محیط کشت MRS مایع حاوی اسید گلوتامیک 50 میلی مولار، با pH برابر 5 و در دمای ?C37 هر سه ساعت یک بار، به مدت 72 ساعت انجام شد و مقدار تغییرات رشد در OD=600 nm با استفاده از اسپکتروفتومتر و مقدار تولید گابا توسط دستگاه HPLC همچنین تغییرات pH اندازه گیری گردید. بیشترین مقدار رشد، گابا و pH به ترتیب عبارتند از 1/86 بعد از 18 ساعت، 0/453 میلی¬مولار بعد از 51 ساعت و 4/86 پس از 42 ساعت حاصل شد. در بخش چهارم از آنجا که شرایط بهینه تخمیر میکروارگانیسم¬ها با همدیگر متفاوت بود، فاکتورهای کلیدی مؤثر بر مقدار تولید گابا شامل مقدار اسیدگلوتامیک، دمای محیط کشت، pH اولیه و مدت زمان گرمخانه¬گذاری به طور جداگانه بررسی شدند تا رنج تغییرات هر فاکتور و اثر آن بر مقدار تولید گابا در طی تخمیر مشخص شود. نتایج نشان می¬داد که اسیدگلوتامیک با غلظت 400 میلی¬مولار، pH = 5، دمای ?C 37 به مدت 60 ساعت شرایط بهینه تولید بود و بیشینه مقدار گابای تولیدی در بررسی هر فاکتور به ترتیب 1/1، 0/576، 0/563، 0/574 میلی¬مولار بود. در بخش پنجم شرایط تولید گابا توسط باکتری (Lactobacillus sp. Makhdzir Naser-1 (GQ451633 با استفاده از فاکتور مستقل زمان، دما، اسیدگلوتامیک و pH توسط روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی به منظور تولید بیشترین مقدار گابا به¬کار گرفته بهینه¬سازی شد. 30 تیمار طراحی گردید و نتایج نشان داد که بسته به شرایط مختلف به کار رفته در حین تخمیر مقدار گابای تولیدی در محدوده 0/87 میلی مولار تا 4/3 میلی مولار متغیر بود. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس نشان داد که اثر هر چهار پارامتر مورد بررسی بر مقدار گابای تولیدی معنی¬دار بود ($p < 0/05$). نقطه بهینه شامل دما ? 37/11 و pH = 5/26 و مقدار اسید گلوتامیک 506/99 و زمان 53 ساعت خواهد بود که مقدار گابای تولیدی در چنین شرایطی 4/3 میلی مولار خواهد بود. در بخش ششم شرایط بهینه به دست آمده به منظور تولید نوشیدنی فراسودمند پروبیوتیکی در شیرسویا و شربت عسل بررسی شد که تیمار برتر شیرسویای 6% با مقدار گابای تولیدی (mM855/3) بود که از نظر آماری با تیمارهای حاوی شیر سویا اختلاف معنی داری)p?0/05(داشت و پایین ترین میزان تولید گابا متعلق به تیمار حاوی شربت عسل با غلظت 12 درصد (mM090/3) بود که از نظر آماری با سایر تیمارها اختلاف معنی داری)p?0/05(داشت. نتایج این تحقیق ثابت کرد با افزایش میزان غلظت شربت عسل و کاهش میزان غلظت شیرسویا میزان پذیرش کلی نمونه¬های مشابه افزایش یافت بطوریکه بالاترین امتیاز پذیرش کلی در روز اول و هفتم تولید متعلق به نمونه شربت عسل 12 درصد

و پایین ترین امتیاز پذیرش متعلق به نمونه شیرسویای 12 درصد بود که از نظر آماری اختلاف معنی داری (p?0/05) با یکدیگر داشتند. به طور کلی نوشیدنی فراسودمند پروبیوتیکی شربت عسل 12 درصدی با 3/095 میلی¬مولار گابا و جمعیت میکروبی 437/8 Log cfu/ml به عنوان تیمار بهینه از نظر سلامت¬بخشی و حسی انتخاب شد.

شماره‌ی پایان‌نامه: ۱۲۷۵۰۴۰۲۹۳۱۰۳۷
تاریخ دفاع: ۱۳۹۶/۱۱/۱۲
رشته‌ی تحصیلی: علوم و صنایع غذایی - تکنولوژی مواد غذایی
دانشکده: کشاورزی و دامپزشکی
استادان راهنما: دکتر امیرحسین الهامی‌راد و دکتر لیلا ناطقی
استاد مشاور: کامبیز ورمیرا

Ph.D. Dissertation:

Screening Newly GABA-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Honey bee and Its Optimization and Application in soy Milk and Honey Juice

Gamma-aminobutyric acid (GABA), a four-carbon non-protein amino acid, is an inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system. It can be abundantly found in nature and is synthesized by glutamic acid decarboxylase. It serves several important physiological functions, including reduction in blood pressure and treatment of insomnia and depression. A number of bacteria and algae can produce significant amounts of GABA, among which lactic acid bacteria are widely used in food industries considering their nontoxicity.

In the present study, a number of lactic acid bacteria, isolated from honeybees, were screened and optimized to produce GABA; then, they were examined in soy milk and honey syrup. The purpose of the first phase of the study was to investigate the probiotic characteristics and antibiotic resistance of 5 lactic acid bacteria isolated from honey in the honeybee gut. According to the results, all the isolated bacteria had desirable probiotic characteristics, including acid resistance, resistance to bile salts, resistance to gastric juice (pepsin & trypsin), inhibition of hemolytic activity, and hydrolysis of L-arginine. Furthermore, their non-resistance to antibiotics was confirmed. In the second section of the study, the potential of GABA production by bacteria was evaluated in the MRS agar at pH of 5 with 50 mM glucose for 72 hours. The results showed that the bacteria had the greatest ability to produce GABA (0.6290 mM).

In the third phase of the study, synthetic growth and GABA production, as well as pH changes in the MRS agar containing 50 mM glutamic acid (pH, 5; temperature, 37°), were performed every 3 hours for 72 hours. The growth rates were measured at OD= 600 nm by a spectrophotometer, GABA production was evaluated via high-performance liquid chromatography (HPLC), and pH changes were determined by a pH meter. The highest

growth rate, GABA production, and pH were 1.86 after 18 hours, 0.453 mM after 51 hours, and 4.86 after 42 hours, respectively.
In the fourth phase, as the optimal conditions for fermentation of microorganisms were different, the key factors affecting the amount of GABA production, including the level of glutamic acid, ambient temperature, initial pH, and duration of incubation, were investigated independently to determine the changing range of each factor and its effect on GABA production during fermentation. The 400 mM glutamic acid at pH of 5 and temperature of 37°C for 60 hours was optimal. Moreover, the maximum amount of the produced GABA was 1.1, 0.576, 0.563, and 0.574 mM, respectively in each analysis.
In the fifth phase, the conditions for bacteria-producing GABA were optimized using the independent factors of time, temperature, glutamic acid and pH using a central composite design in order to produce the highest amount of GABA. A total of 30 treatments were designed, and the results showed that the amount of produced GABA varied from 0.87 to 4.3 mM, depending on the conditions during fermentation. The results of variance analysis showed that the effects of all 4 parameters on the amount of produced GABA were significant. For 4.3 mM production of GABA, the optimal conditions are as follows: temperature, 37.71?; pH, 5.26, glutamic acid level, 506.99; duration, 53 hours.
In the sixth phase, the optimal conditions for the production of functional probiotic beverages in soy milk and honey syrup were investigated. The best treatment included soy milk producing 6% GABA, which was statistically significant compared to other treatments with soy milk. The lowest production rate was reported with the honey syrup with 12% concentration (3.090 mM), which was significantly different from other treatments.
The results of this study showed that by increasing the concentration of honey syrup and decreasing the concentration of soy milk, the overall acceptance of similar samples increased, as the highest total acceptance scores on the first and seventh days of production were attributed to the 12% honey syrup sample and the lowest to 12% soy milk, which were statistically significant. In general, the functional probiotic beverage of honey syrup 12% with 3.095 mM GABA and microbial population of 8.437 was the optimal sensory and mental treatment.