

Investigating the Effect of Shahani Grape Juice and Shahani Grape Drink Containing *Lactobacillus Plantarum* Paraprobiotic on Reducing Stress in Management Field Students

Mohammad Mahdi Gholian¹,
Arash Babaei²,
Fatemeh Zendehtoodi³,
Amir Mohammad Mortazavian⁴,
Vahid koushki⁵

¹ PhD Student in Food Science and Technology, Research Institute for Grapes and Raisin, Malayer University, Malayer, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Malayer University, Malayer, Iran

³ PhD in Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵ PhD in Food Science and Technology, Research Institute for Grapes and Raisin, Malayer University, Malayer, Iran

(Received August 20, 2023; Accepted January 27, 2024)

Abstract

Background and purpose: Stress is a behavioral process that helps humans to increase survival. Stress refers to any biological response to an internal or external stimulator. Stress is difficult to study because of its widespread effect on different parts of the body. A good diet is essential for maintaining mental and physical health. During stress time, eating habits are greatly disrupted and this can cause nutritional deficiencies that may lead to more stress on the body. In stressful situations, the body uses more nutrients than usual. So a good diet is required, as a poor diet causes deficiencies that lead to more stress and health problems. Since 2004, many scientific studies have proven the functional and health-promoting properties of non-living probiotics. In recent years, research has been conducted on the consumption of deactivated cells of probiotics (paraprobiotics) whose positive effects have been proven in some studies. In the current research, *Lactobacillus plantarum* paraprobiotic cells have been used in Shahani grape drinks to reduce stress in master's degree students.

Materials and methods: The production of paraprobiotics is done in different ways, including heating, applying ultrasound, ultraviolet radiation, infrared radiation, ionizing rays, applying high hydrostatic pressure, and using some chemical compounds. Each of these inactivation methods cause changes in the structure and functional characteristics of non-living probiotic cells. High-power ultrasound was used for deactivation. The suspension containing parapsychobiotic was evaluated for the amount of the active ingredient gamma-aminobutyric acid using a high-performance liquid chromatography. Inactivated cells were added to the reconstituted Shahani grape juice. 32 healthy students consumed a control drink and a drink containing paraprobiotics daily for 10 weeks during the end-of-semester exams.

Results: The use of paraprobiotics obtained from inactivation methods is useful when the health-giving compounds and metabolites are not completely reduced or destroyed under the influence of the inactivation method. Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the most important inhibitory neurotransmitter in the central nervous system and plays an important role in coordinating brain function and reducing anxiety and stress. The results showed that the amount of gamma-aminobutyric acid in the suspension of parapsychobiotics was higher than in the suspension of live bacteria. Subjects who consumed a grape juice drink containing parapsychobiotics had higher general health scores than the control group during exams. The use of paraprobiotics in drinks improved the quality of sleep. At the end of the test, the amount of cortisol in the saliva of the control group was higher than the parapsychobiotic treated group.

Conclusion: The results of this research showed that *Lactobacillus plantarum* paraprobiotic has potential benefits for improving mental health. Based on the results of this research, paraprobiotics, by affecting the human brain axis, reduce the secretion of stress hormones such as cortisol and, as a result, increase mental stability during the final semester exams of students.

(Clinical Trials Registry Number: IRCT20240128060833N1)

Keywords: paraprobiotic, grape juice, cortisol, central nervous system, *Lactobacillus plantarum*

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 34 (233): 125-137 (Persian).

Corresponding Author: Arash Babaei - Faculty of Sciences, Malayer University, Malayer, Iran. (E-mail: a.babaei@malayeru.ac.ir)

بررسی اثر آب انگور شاهانی و نوشیدنی انگور شاهانی حاوی پاراپروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر کاهش استرس دانشجویان رشته مدیریت

محمد مهدی قلیان^۱آرش بابایی^۲فاطمه زنده بودی^۳سید امیر محمد مرتضویان^۴وحید کوشکی^۵

چکیده

سابقه و هدف: استرس یا تنیدگی یک فرآیند رفتاری است که به انسان در افزایش بقا کمک می‌کند. در واقع استرس به هر پاسخ بیولوژیکی به محرک‌های درونی یا بیرونی اطلاق می‌شود. مطالعه استرس به دلیل تأثیر گسترده آن بر قسمت‌های مختلف بدن دشوار است. استرس شامل مجموعه‌ای از رویدادها است که در بدن یک موجود زنده جهت سازگاری با یک موقعیت نامطلوب ایجاد می‌شود. عوامل درونی و بیرونی بر ساختار درونی یک موجود زنده تأثیر می‌گذارد. یک رژیم غذایی خوب برای حفظ سلامت روحی و جسمی ضروری است. در هنگام استرس، عادات غذایی بسیار مختل می‌شود و این می‌تواند باعث کمبودهای تغذیه‌ای شود که ممکن است منجر به استرس بیش‌تری در بدن شود. در شرایط استرس‌زا بدن بیش‌تر از حد معمول از مواد مغذی استفاده می‌کند، بنابراین یک رژیم غذایی خوب در این هنگام مورد نیاز است، زیرا یک رژیم غذایی ضعیف باعث کمبودهایی می‌شود که منجر به استرس بیش‌تر و مشکلات سلامتی می‌شود. از سال ۲۰۰۴، بسیاری از پژوهش‌های علمی خواص عملکردی و سلامتی‌بخشی پروبیوتیک‌های غیر زنده را به اثبات رساندند. در سال‌های اخیر تحقیقاتی در مورد مصرف سلول‌های غیرفعال‌شده پروبیوتیک‌ها (پاراپروبیوتیک‌ها) انجام شده که اثرات مثبت آن‌ها در برخی تحقیقات به اثبات رسیده است. در پژوهش حاضر از سلول‌های پاراپروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم در نوشیدنی انگور شاهانی جهت کاهش استرس در دانشجویان مقطع کارشناسی ارشد استفاده شده است.

مواد و روش‌ها: تولید پاراپروبیوتیک به روش‌های مختلفی از جمله حرارت‌دهی، اعمال فراصوت، تابش اشعه فرابنفش، تابش اشعه فروسرخ، پرتوهای یونیزه‌کننده، اعمال فشار هیدرواستاتیک بالا و استفاده از برخی ترکیبات شیمیایی انجام می‌شود. هر یک از این روش‌های غیرفعال‌سازی موجب تغییراتی در ساختار و خصوصیات عملکردی سلول پروبیوتیک غیرزنده می‌شوند. در این مطالعه پژوهشی بالینی جهت غیرفعال‌سازی از روش فراصوت با توان بالا استفاده شد. سوپانسیون حاوی پاراسایکوبیوتیک از نظر میزان ماده موثره گاما آمینو بوتیریک اسید به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌های غیرفعال‌شده به آرمیوه بازسازی شده انگور شاهانی افزوده شد. ۳۲ دانشجوی سالم در دوران امتحانات پایان‌ترم، روزانه به مدت ۱۰ هفته نوشیدنی شاهد و نوشیدنی حاوی پاراپروبیوتیک مصرف کردند.

یافته‌ها: استفاده از پاراپروبیوتیک‌های حاصل از روش‌های غیرفعال‌سازی زمانی مفید است که ترکیبات و متابولیت‌های سلامتی‌بخش تحت تأثیر روش غیرفعال‌سازی دچار کاهش یا نابودی کامل نشده باشند. گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) مهم‌ترین انتقال‌دهنده عصبی مهارتی در سیستم عصبی مرکزی است و نقش مهمی در هماهنگی عملکرد مغز و کاهش اضطراب و استرس دارد. نتایج نشان داد که میزان گاما آمینو بوتیریک اسید در سوپانسیون پاراسایکوبیوتیک‌ها بیش‌تر از سوپانسیون باکتری زنده بود. ارزیاب‌هایی که نوشیدنی حاوی پاراسایکوبیوتیک‌ها را مصرف کردند در دوران امتحانات پایان‌ترم امتیاز سلامت عمومی بیش‌تر نسبت به گروه شاهد داشتند. استفاده از پاراپروبیوتیک در نوشیدنی موجب بهبود کیفیت خواب شد. در پایان آزمون میزان کورتیزول موجود در بزاق گروه شاهد بیش‌تر از گروه پاراسایکوبیوتیک بود.

استنتاج: نتایج این تحقیق نشان داد که پاراپروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم دارای مزایای بالقوه‌ای برای بهبود سلامت روان است. براساس نتایج حاصل از این پژوهش پاراپروبیوتیک‌ها با اثر بر محور مغزی انسان موجب کاهش ترشح هورمون‌های استرسی نظیر کورتیزول و در نتیجه افزایش پایداری روانی در زمان امتحانات پایان‌ترم دانشجویان می‌شود.

شماره ثبت کارآزمایی بالینی: IRCT20240128060866N1

واژه‌های کلیدی: پاراپروبیوتیک، آب انگور، کورتیزول، سیستم عصب مرکزی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم

E-mail: a.babaei@malayeru.ac.ir

مؤلف مسئول: آرش بابایی - ملایر: دانشگاه ملایر، دانشکده علوم پایه

۱. دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده انگور و کشمش، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

۳. دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۵. دکتری علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده انگور و کشمش، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۱/۱۹ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۱/۱۷

مقدمه

استرس شامل مجموعه‌ای از رویدادها است که در بدن یک موجود زنده جهت سازگاری با یک موقعیت نامطلوب ایجاد می‌شود. عوامل درونی و بیرونی بر ساختار درونی یک موجود زنده تاثیر می‌گذارد. هر موجود زنده با استفاده از سه مرحله متوالی شامل هشدار، سازگاری و بهبودی یا خستگی به استرس پاسخ می‌دهد. در شرایط معمول بدن انسان از راه تولید هورمون بتا اندورفین موجب کاهش عوارض ناشی از استرس می‌شود. این هورمون موجب آرامش و بهبود اعصاب و رفتار می‌شود. اندورفین‌ها (مورفین‌ها) در واکنش به محرک‌های مختلف نظیر استرس، ترس و درد از نورون‌های هیپوتالاموس و از غده هیپوفیز در خون آزاد می‌شود (۱، ۲). برخی اثرات عمده استرس بر بدن عبارتند از: اثر بر سیستم گوارشی (چاقی، یبوست، دیابت)، اختلالات گردش خون (بیماری‌های قلبی عروقی، کلسترول بالا)، سرکوب کردن سیستم ایمنی (تضعیف سیستم ایمنی و افزایش عوارض بیماری‌های مربوط به سیستم ایمنی)، پوکی استخوان، ابتلا به انواع سرطان، کاهش رشد در افراد جوان، اختلالات جنسی در مردان و اختلالات رفتاری (۳).

براساس پژوهش‌های علمی میکروبیوتای دستگاه گوارش نقش مهمی را در افزایش سلامت و کیفیت زندگی انسان ایفا می‌کنند. به دلیل اثرات سلامتی بخشی این گروه از میکروارگانیسم‌ها، به میکروارگانیسم‌های مفید دستگاه گوارش پروبیوتیک اطلاق می‌شود. اغلب باکتری‌ها و قارچ‌هایی را که می‌توان در دسته پروبیوتیک‌ها جای داد از گونه‌های لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتر، ساکارومایسس و برخی از باسیلوس‌ها، استرپتوکوکوس‌ها، ائروتوکوکوس‌ها، پروپیونی باکترها، لاکونوستاک و اکرومانسیا است (۴). از سال ۲۰۰۴، بسیاری از پژوهش‌های علمی خواص عملکردی و سلامتی بخشی پروبیوتیک‌های غیر زنده را به اثبات رسانده‌اند. براین اساس در سال ۲۰۱۱، Taverniti و

Guglielmetti واژه پاراپروبیوتیک را برای مشخص کردن سلول‌های غیرزنده و اجزای سلولی باکتری‌هایی بکار بردند که قادر به ایجاد سلامتی در میزبان بود (۵). در سال ۲۰۱۳، Dinan و همکاران واژه سایکوبیوتیک را به عنوان دسته‌ای جدید از پروبیوتیک‌ها پیشنهاد دادند که قادر به درمان بیماری‌های روانی هستند. براساس این تعریف سایکوبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به میزان کافی مصرف شود موجب افزایش سلامت روانی میزبان می‌شوند. این دستاورد جدید به عنوان روشی نوین برای پیشگیری و درمان بیمارهای روانی معرفی شده است (۶). مکانیزم عمل سایکوبیوتیک‌ها ممکن است از راه تنظیم انتقال دهنده‌های عصبی و پروتئین‌ها شامل گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA)، سروتونین، گلوتامات و فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز است، که این ترکیبات نقش مهمی در کنترل تعادل عصبی، رفتار، عملکرد شناختی، یادگیری و حافظه دارند (۷). برخی از محققین نقش حیاتی میکروبیوتای دستگاه گوارش و محور HPA را ثابت کرده‌اند. تحقیقات نشان داده است که تولید سروتونین در دستگاه گوارش توسط میکروارگانیسم‌ها تنظیم می‌شود. به‌طور مثال یافته‌های محققین نشان داده است که باکتری‌های اسپورزای دستگاه گوارش قادر به تحریک دستگاه گوارش جهت تولید سروتونین هستند (۸). با توجه به مزایای پاراپروبیوتیک‌ها در درمان بیماری‌ها به‌ویژه افزایش سلامت روانی استفاده از آن‌ها می‌تواند به عنوان جایگزین بسیار مناسبی برای داروهای شیمیایی با عوارض جانبی باشد. یکی از بهترین حامل‌های پاراپروبیوتیک‌ها به بدن انسان مواد غذایی است.

ترکیبات مغذی فراوان در آب‌میوه موجب شده است که بتوان از آن به عنوان بستری برای انتقال ترکیبات مغذی نظیر پروبیوتیک‌های زنده و غیرزنده استفاده نمود. آب انگور یک مایع شفاف یا کدر استخراج شده از میوه انگور است. این فراورده، غیر تخمیری و بدون الکل است که دارای ویژگی‌های مخصوص رنگ (زرد یا

قرمز یا صورتی رنگ)، رایحه (وابسته به واریته انگور متفاوت است) و مزه است. آب انگور را می‌توان از هر نوعی از انگور که فرآیند رسیدن آن کامل شده باشد، استحصال نمود. آب انگور به دلیل حضور ترکیبات زیست فعال فراوان به ویژه فنولیک‌ها در جهان مورد توجه قرار گرفته که که اثرات فراوان آنتی اکسیدانی و ضد سرطان دارد (۹). با توجه به مقادیر بالای پلی‌فنل‌ها در انگورهای سیاه‌رنگ می‌توان از آن‌ها به عنوان محیطی مناسب برای انتقال پاراپروبیوتیک‌ها استفاده نمود.

در پژوهش حاضر میزان اثر آب انگور شاهانی خالص و آب انگور حاوی سلول‌های پاراپروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانٹاروم بر کاهش میزان استرس دانشجویان مقطع کارشناسی ارشد مدیریت در دوره امتحانات پایان ترم نیمسال دوم تحصیلی ۱۴۰۲-۱۴۰۱ بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه با عنوان بررسی امکان تولید نوشیدنی غیرالکلی انگور فراسودمند حاوی پاراسایکوبیوتیک‌ها با قابلیت کاهش استرس در دانشگاه ملایر بررسی و با شناسه اخلاقی IR.MALAYERU.REC.1400.012 مصوب گردید.

طرح کلی پژوهش

هدف از پژوهش حاضر استفاده از آب انگور شاهانی منطقه ملایر و یک نوع پاراسایکوبیوتیک (غیر فعال شده با روش حرارتی) در تولید یک نوشیدنی فراسودمند با قابلیت کاهش استرس بود. جهت بررسی اثر نوشیدنی حاوی پاراسایکوبیوتیک و حذف اثر آب انگور بر میزان استرس، از روش مقایسه‌ای استفاده شد. این مطالعه از نوع کار آزمایشی بالینی (IRCT20240128060833N1) دو سو کور و دارای طرح دو گروه قبل و بعد بود. حجم نمونه براساس مطالعه Almada و همکاران (۱۰) محاسبه گردید. معیارهای ورود به آزمون شامل رضایت شرکت در مطالعه، سن بین ۲۰ تا ۳۰ سال، عدم مصرف الکل، عدم ابتلا به اختلال عملکرد مختلف عصبی، قلبی،

فشارخون و دیابت و عدم مصرف داروهای موثر بر استرس و سیستم عصبی و فشارخون سیستول در محدوده نرمال یا ۱۳۹-۱۲۰ و دیاستول در محدوده نرمال یا ۸۹-۸۰ میلی‌متر جیوه بود.

مواد/ولیه

کسناتره آب انگور (تولید شده در کارخانه بهنوش ایران) و کشت فعال باکتری لاکتوباسیلوس پلانٹاروم از مرکز ذخایر ژنتیک ایران (IBRC-M 10944) تهیه شد. همه مواد شیمیایی مورد استفاده دارای درجه آزمایشگاهی بودند.

فعال‌سازی و جداسازی پروبیوتیک‌ها قبل از غیرفعال‌سازی فعال‌سازی سویه خشک شده انجمادی تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیک ایران، در شرایط استریل طبق دستور گفته شده همراه با آمپول انجام شد. بدین صورت که با ایجاد یک خراش عرضی آن را شکسته و محتویات باکتری انتهای آمپول به محیط کشت افزوده شد. جهت فعال‌سازی هر یک از سویه‌ها، محتویات بسته به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت Broth MRS حاوی ۲ درصد آب انگور شاهانی تلقیح شد و به خوبی مخلوط گردید و جهت رشد در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی (با استفاده از گاز پک) گرمخانه‌گذاری شد. این امر موجب فعال شدن باکتری و ورود به مرحله لگاریتمی می‌شود. پس از گذشت این مدت زمان، ۵ میلی‌لیتر محیط حاوی باکتری فعال شده به ۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت تازه تلقیح شد و به جهت رشد و ازدیاد تعداد باکتری‌ها (تا رسیدن به میزان معین) به مدت ۷۲ ساعت در دمای 37°C در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شد. جهت تعیین تعداد باکتری‌ها در محیط مایع از روش کدروت سنجی مک‌فارلند و هم‌چنین کشت رقت‌های سریالی باکتری استفاده شد. پس از دستیابی به تعداد معین سلول باکتری‌ها از محیط جدا شدند. جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت با استفاده از

دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C انجام شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی جدا شد و باکتری‌های ته‌نشین شده با استفاده از Normal Saline (سرم فیزیولوژی) استریل دو بار سانتریفیوژ شد و کاملاً شستشو انجام شد و از آن سوسپانسیون تهیه شد و از سوسپانسیون حاصل جهت تهیه پاراسایکوبیوتیک‌ها استفاده شد (۱۱).

تولید پاراسایکوبیوتیک‌ها

جهت تولید پاراسایکوبیوتیک‌ها، سوسپانسیون حاوی 10^9 CFU/mL از سویه فعال به وسیله روش فراصوت غیرفعال سازی شد. روش فراصوت با استفاده از دستگاه فراصوت پروبی مجهز به سیرکولاتور آب سرد (جهت جلوگیری از افزایش دما در حین فرآیند) با اعمال توان ۵۰ وات در مدت زمان ۱۰ دقیقه انجام شد (۱۰). بلافاصله پس از تیمار، سوسپانسیون در باکس یخ قرار می‌گرفت و سریعاً به دمای ۴°C رسانده می‌شد.

قابلیت رشد باکتری‌ها پس از تیمارهای غیرفعال سازی

نمونه تیمار شده و شاهد در محلول استریل فسفات بافر (pH=۷) به صورت سریالی رقیق شد (به نسبت ۱ به ۱۰). سپس هریک از رقت‌ها به روش پورپلیت در محیط کشت جامد MRS غنی شده با ۰/۵ درصد عصاره مخمر تلقیح شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C در شرایط بی‌هوازی (در حضور گاز پک) گرمخانه‌گذاری شد. پس از مدت زمان گرمخانه‌گذاری، هریک از پلیت‌ها از نقطه نظر وجود یا عدم وجود پرگنه باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. جهت تولید پاراپروبیوتیک عدم رشد و عدم پرگنه باکتری پس از گرمخانه‌گذاری الزامی است (۱۲).

حضور گاما آمینوبوتیریک اسید در سوسپانسیون باکتری‌ها به روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)

برای بررسی کمی گابا در هریک از سوسپانسیون‌ها، ابتدا بوسیله سانتریفیوژ (۳۵۰۰ rpm) به مدت ۵ دقیقه مایع

روبی (سوپرناتانت) از رسوب پاراپروبیوتیک جدا شد و برای تعیین میزان گابا در سوپرناتانت ابتدا مشتق‌سازی با فتال‌دی آلدئید (OPA) قبل از استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با فاز معکوس (RP-HPLC) انجام شد. ۷۵ μ L از محلول OPA و ۱۵ μ L از سوپرناتانت پاراپروبیوتیک مخلوط شد و سپس به مدت ۲ دقیقه قبل از تزریق به ستون در دمای محیط قرار داده شد. با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع مجهز به شکارساز فلورسنت استفاده شد. ستون مورد استفاده ستون فاز معکوس C18 بود. جداسازی مشتقات OPA با استفاده از فاز متحرک A (۳۵۰ میلی‌لیتر آب mili-Q، ۹۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۰/۱ مولار) و فاز متحرک B (استونیتریل) انجام شد. برنامه شیب خروج به صورت ۱۳ درصد از محلول B در مدت ۵ دقیقه، سپس ۵۰ درصد از محلول B در مدت ۴۰ دقیقه و در آخر ۸۵ درصد از محلول B در مدت ۶۰ دقیقه تنظیم شد و تا پایان هر مرحله با جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه انجام شد. شناسایی توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۳۰ نانومتر و ۴۴۰ نانومتر صورت پذیرفت (۱۳).

تهیه نوشیدنی

به منظور تهیه نوشیدنی، از کنسانتره انگور شاهانی استفاده شد. کنسانتره انگور به نسبت ۷:۱ با آب مخلوط شد و سپس در دمای ۹۰°C به مدت ۳۰ ثانیه پاستوریزه شد. پس از فرایند پاستوریزاسیون سلول‌های پاراسایکوبیوتیک لاکتوباسیلوس پلاتناروم با غلظت 2×10^9 cell/mL به آبمیوه بازسازی شده افزوده شد. دو نوشیدنی تهیه شده حاوی پاراسایکوبیوتیک‌ها و آبمیوه انگور شاهانی تا زمان انجام آزمون‌های فیزیکوشیمیایی در دمای ۴°C نگهداری شد.

بررسی اثرنوشیدنی بر شاخص‌های استرس افراد

انتخاب ارزیاب‌ها جهت شرکت در آزمون

به منظور انجام این آزمون، دانشجویان با سن ۲۰ تا ۳۰ سال انتخاب شدند. در ابتدا جهت انتخاب ارزیاب‌ها،

افراد داوطلب شرکت در این آزمایش از نظر مصرف سیگار و داروهای موثر بر سیستم عصبی پایش شدند و افرادی که از ۹۰ روز پیش از شروع این پایش از این دو ماده استفاده نکرده بودند قادر به شرکت در آزمون بودند. هم چنین افراد داوطلب از نظر مشکلات روحی و روانی، فیزیکی و آلرژی های غذایی بررسی شدند و از شرکت افرادی که هر یک از این ویژگی ها را داشتند در آزمون ممانعت به عمل آمد. در انتها براساس پایش های صورت گرفته ۳۲ دانشجو انتخاب شدند. این ۳۲ نفر طبق جدول شماره ۱ به دو گروه تقسیم شدند. در واقع در این پژوهش متغیر اصلی نوع نوشیدنی و متغیر ثانویه (تعدیل کننده) جنسیت افراد مصرف کننده در نظر گرفته شده است.

جدول شماره ۱: گروه بندی افراد (دانشجویان) شرکت کننده در آزمون جهت سنجش پارامترهای استرسی براساس ارزیابی پرسشنامه ای و سطح کورتیزول در بزاق هر یک از آنها

نام گروه	نوع نوشیدنی مصرفی توسط ارزیاب ها	میانگین سن	نفر جمعیت (زن/مرد)
شاهد	نوشیدنی شاهد	۲۵/۳۰	۱۶ (۱۰/۶)
P	نوشیدنی حاوی پاراسایکوبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم	۲۵/۳۲	۱۶ (۱۰/۶)

از هر یک از افراد مصرف کننده خواسته شد که روزانه ۲۵۰ میلی لیتر از نوشیدنی را به مدت ۱۰ هفته مصرف کنند. افراد مصرف روزانه خود را در یک سالنامه ثبت می کردند تا میزان انطباق مصرف را تأیید کند. در طول کار آزمایی، از ارزیاب ها خواسته شد با اجتناب از مصرف سایر محصولات تخمیری، پروبیوتیک یا پری بیوتیک (به عنوان متغیر مخدوش کننده)، محدودیت های غذایی را رعایت کنند. در صورت وقوع این رویدادها، در سالنامه ثبت می شد. رضایت نامه کتبی آگاهانه از همه افراد قبل از ثبت نام اخذ شد. لازم به ذکر است که زمان آزمون بالینی دو هفته قبل از آغاز آزمون های پایان ترم تابستان همه ارزیاب ها بود. جهت بررسی اثر این نوشیدنی ها بر ویژگی های روانی و میزان کورتیزول قبل و پس از دوره مصرف نوشیدنی، آزمون های زیر انجام شد.

کیفیت خواب و وضعیت روانی و استرس

ویژگی های روانی ارزیاب ها یک روز قبل از انجام آزمون و یک روز پس از پایان دوره مصرف نوشیدنی با استفاده از پرسشنامه های سلامت عمومی ۲۸ سوالی و پرسشنامه خود اظهاری افسردگی و کیفیت خواب پیتزبورگ بررسی شد (۱۰). هم چنین طبق شاخص کیفیت خواب پیتزبورگ که کیفیت خواب و خواب پریشی در طی ۱۰ هفته را بررسی می کند، کیفیت خواب شب به ویژه در ایام امتحانات پس از مصرف نوشیدنی مورد بررسی قرار گرفت. این پرسشنامه ها در زمان جمع آوری بزاق قبل و پس از آزمون و در هفته پنجم در اختیار ارزیاب ها قرار گرفت و تفاوت بین پاسخ ها بین این دو زمان آنالیز شد.

میزان کورتیزول در بزاق

بزاق هر یک از ارزیاب ها توسط ظروف مخصوص بزاق به مدت ۲ دقیقه در یک زمان معین (ساعت ۱۶ تا ۱۷) جمع آوری شد تا از بروز خطای زمان نمونه برداری جلوگیری شود و سپس تا زمان آزمایش در دمای 8°C - نگهداری شد. آنالیز کورتیزول بزاق با استفاده از کیت مخصوص انجام شد. تفاوت بین میزان کورتیزول در بزاق افراد قبل و پس از تیمار ۱۰ هفته ای با نوشیدنی انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

انتخاب گروه سنی افراد جهت بررسی میزان تغییرات شاخص های استرس قبل و پس از مصرف نوشیدنی ها به گونه ای صورت گرفت که میزان انحراف معیار میانگین سنی افراد کم تر از ۱۰ درصد بود. این امر به جهت کاهش اختلاف متغیرهای تعدیل کننده بین دو گروه و امکان انجام مقایسه داده های حاصل انجام شد. در این طرح پژوهشی متغیر مستقل نوع نوشیدنی و متغیر وابسته شاخص های استرس بود. تمامی اندازه گیری ها در سه بار تکرار انجام شد و داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شدند. داده های حاصل از آزمایش های مختلف بالینی در قالب آزمایش فاکتوریل، به صورت طرح

کاملاً تصادفی و به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پس از آنالیز واریانس، میانگین داده‌های مربوطه با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ درصد مقایسه شدند.

یافته‌ها

اثر روش‌های غیر فعال سازی بر قابلیت رشد

بر اساس نتایج حاصل، روش فراصوت موجب غیر فعال سازی لاکتوباسیلوس پلانتروم شد.

بررسی میزان گاما آمینو بوتیریک اسید در سوسپانسیون حاوی باکتری‌های غیر فعال شده توسط کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (HPLC)

توجه به هدف پژوهش حاضر در تولید نوشیدنی کاهش دهنده استرس، وجود و میزان ماده انتقال دهنده عصبی موثر در کاهش استرس به نام گابا در سوسپانسیون پاراپروبیوتیک‌های حاصل از روش غیر فعال سازی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد بررسی قرار گرفت. در شکل شماره ۱ نمایی از کروماتوگرام استخراج شده از دستگاه جهت تایید حضور گابا در سوسپانسیون پاراپروبیوتیک‌ها نشان داده شده است. یکی از تفاوت‌هایی که در تصویر قابل مشاهده است اختلاف در مساحت زیر منحنی ایجاد شده توسط نمونه شاهد و نمونه حاوی پاراسایکوبیوتیک است که حاکی از اختلاف در میزان غلظت گابا در هر یک از نمونه‌ها است. همانطور که در نمودار شماره ۱ مشخص است میزان نسبی گابا نیز در نمونه‌ها با همدیگر متفاوت است.

اثر مصرف نوشیدنی بر وضعیت روانی ارزیاب‌ها و تفاوت پاسخ‌ها بین زنان و مردان شرکت کننده

نتایج داده‌های حاصل از پرسشنامه‌ها در هفته اول قبل از شروع آزمایش در جدول شماره ۲ آورده شده است. میانگین امتیاز سلامت عمومی در هفته صفر، پنجم و دهم پس از انجام آزمون در نمودار شماره ۲ نشان داده

شده است. همان‌طور که در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است استفاده از نوشیدنی پاراپروبیوتیک موجب تغییرات آماری معنی‌دار در امتیاز سلامت عمومی ارزیاب‌ها شده است ($P < 0/05$). در گروهی که نوشیدنی آب انگور بدون پاراپروبیوتیک را مصرف کرده‌اند (گروه شاهد) امتیاز سلامت عمومی کاهش یافت. از مقایسه اثر نوشیدنی‌ها پاراپروبیوتیک بر زنان و مردان، می‌توان گفت نوشیدنی‌های پاراپروبیوتیک بر تقویت وضعیت روحی و روانی زنان شرکت کننده اثر بهتری داشت که نشان دهنده این است که ممکن است یک تفاوت معنی‌دار بین واکنش بدن زنان و مردان در پاسخ به نوشیدنی پاراپروبیوتیک وجود داشته باشد.

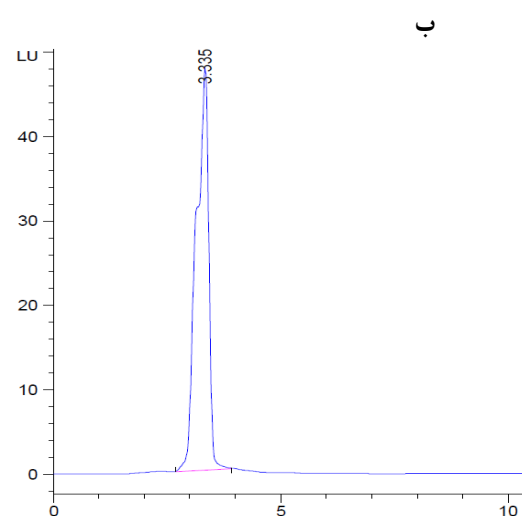
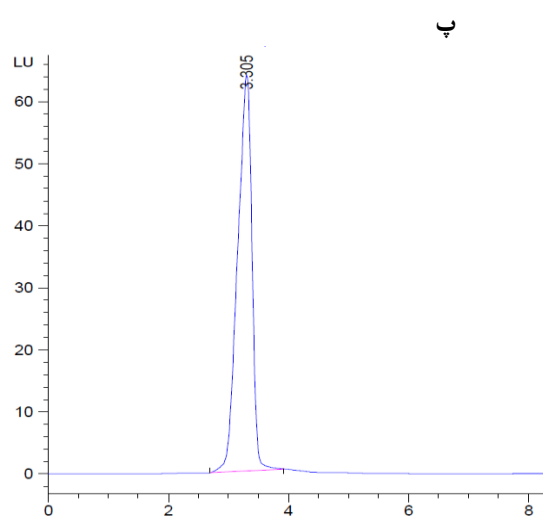
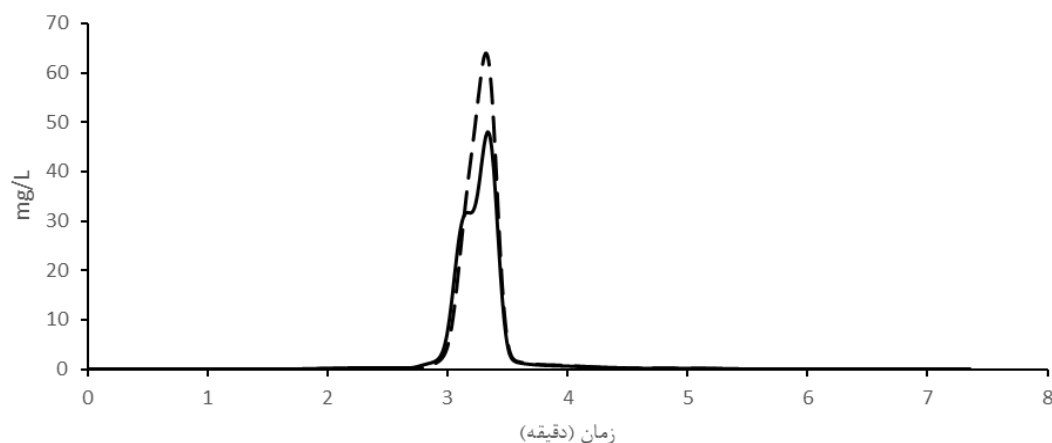
بررسی نتایج حاصل از پرسشنامه بررسی کیفیت خواب شرکت کنندگان در نمودار شماره ۳ نشان داد که استفاده از پاراپروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم در نوشیدنی موجب بهبود کیفیت خواب شد. در گروه مصرف کننده نوشیدنی پاراپروبیوتیک میانگین عددی از ۵/۴۳ به ۳/۹۳ کاهش یافت. تقویت و بهبود کیفیت خواب در بین شرکت کنندگان مرد مشاهده شد و شرکت کنندگان زن تغییر معناداری نداشتند. به طور کلی قبل از شروع آزمایش (هفته صفر) اعداد گزارش شده طبق پرسشنامه‌ها بالاتر از حد مجاز بودند و نشان دهنده استرس، کیفیت پایین خواب و سلامت عمومی پایین بود. امتیاز پارامترهای مختلف در زنان بالاتر از مردان بود که نشان دهنده کیفیت روانی پایین تر آنان بود با این حال استفاده از نوشیدنی پاراپروبیوتیکی موجب بهبود وضعیت روانی معنی‌دار در زنان شد که در مردان معنادار نبود.

۱۲-۴- اثر نوشیدنی پاراپروبیوتیک بر میزان کورتیزول در بزاق

در پژوهش حاضر میزان کورتیزول بزاقی قبل از مصرف نوشیدنی‌ها تا پایان زمان آزمایش در سه دوره اندازه گیری شد. همان‌طور که در نمودار شماره ۴ نشان داده شده است در هفته پنجم آزمایش میزان کورتیزول

گروه مصرف کننده نوشیدنی پاراپروبیوتیک کم تر از میزان اولیه بود، این درحالی است که میزان کورتیزول بزاقی گروه شاهد در انتهای آزمایش (پس از ۱۰ هفته) بیش تر از روز اول آزمایش بود.

در همه گروه ها افزایش یافته است. اما با این حال میزان کورتیزول موجود در بزاق گروه شاهد بیش تر از گروه تیمار شده با پاراپروبیوتیک بود. با توجه به نمودار شماره ۴ میزان کورتیزول بزاقی پس از ۱۰ هفته در

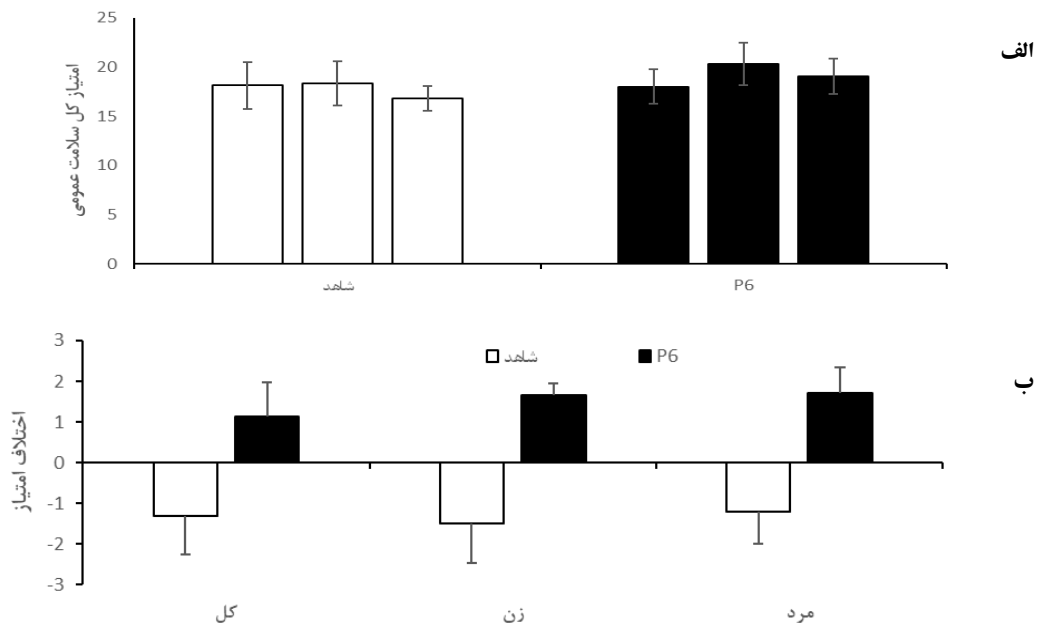


نمودار شماره ۱: الف) مقایسه غلظت گاما آمینوبوتیریک اسید موجود در تیمارهای شاهد (—) و غیر فعال سازی شده با فراصوت (---). کروماتوگرام حاصل از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا؛ ب) تیمار شاهد و پ) غیر فعال سازی شده با فراصوت.

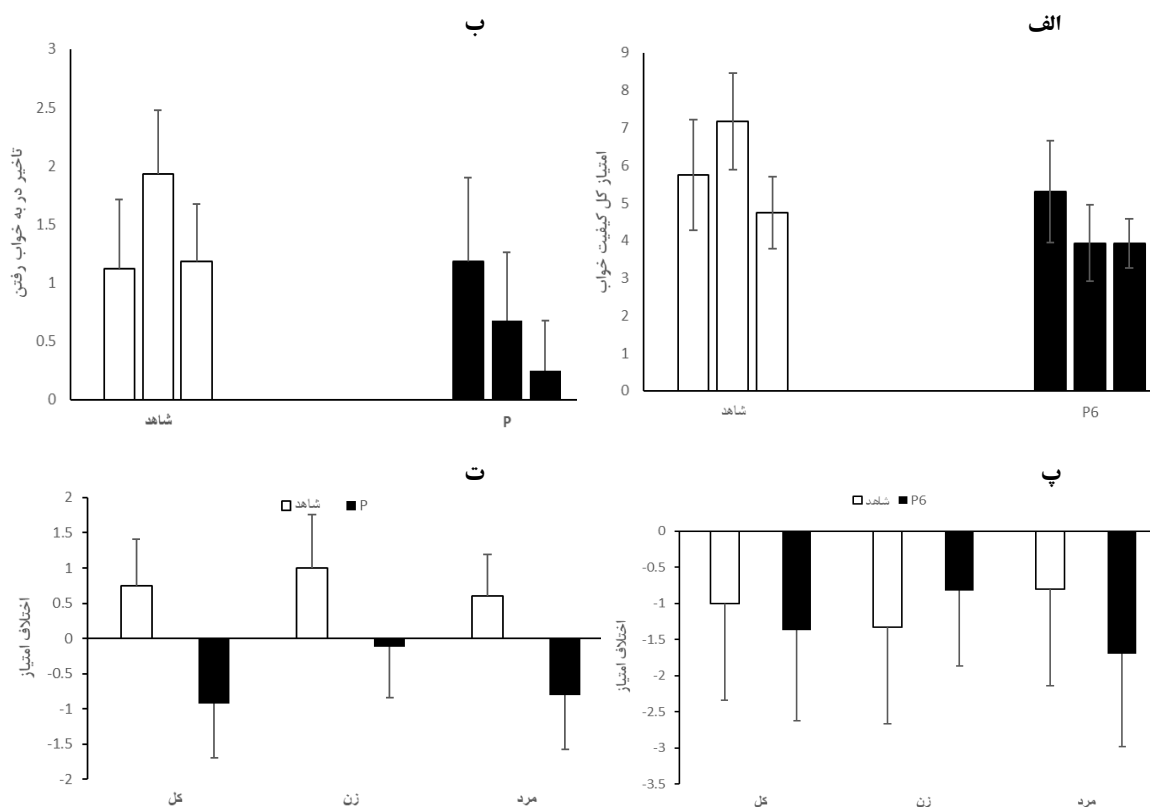
جدول شماره ۲: خصوصیات بالینی اولیه افراد شرکت کننده قبل از شروع مصرف نوشیدنی ها براساس پاسخ های داده شده به پرسشنامه های سلامت عمومی، خوداظهاری اضطراب و افسردگی و خواب پیتزبورگ

مقیاس ها	شاهد			تیمار P6		
	زن	مرد	کل	زن	مرد	کل
جمعیت	۱۶	۱۰	۱۶	۱۶	۱۰	۱۶
پرسشنامه سلامت عمومی	$19/00 \pm 2/60$	$17/6 \pm 2/22$	$18/12 \pm 2/39$	$18/50 \pm 1/51$	$17/70 \pm 1/88$	$18/00 \pm 1/75$
پرسشنامه خوداظهاری اضطراب و افسردگی	$7/66 \pm 1/21$	$5/30 \pm 1/41$	$6/18 \pm 1/75$	$7/33 \pm 1/36$	$5/90 \pm 1/37$	$6/53 \pm 1/50$
افسردگی	$6/66 \pm 1/63$	$5/80 \pm 1/68$	$6/12 \pm 1/66$	$7/16 \pm 1/47$	$6/10 \pm 1/91$	$6/40 \pm 1/78$
پرسشنامه خواب پیتزبورگ	$5/83 \pm 1/47$	$5/70 \pm 1/63$	$5/75 \pm 1/52$	$4/33 \pm 1/36$	$5/80 \pm 1/68$	$5/33 \pm 1/69$

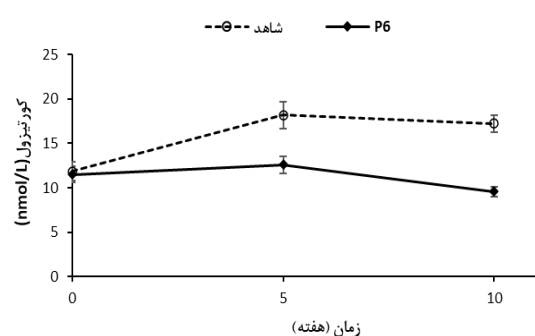
داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش داده شده است.



نمودار شماره ۲: تغییر در رفتارهای مرتبط با استرس تعیین شده با استفاده از پرسشنامه سلامت عمومی. (الف) تغییر در امتیاز سلامت عمومی. اختلاف امتیاز شاخص‌های پرسشنامه سلامت عمومی بین قبل و بعد از ۱۰ هفته مصرف هر تیمار در نمودار (ب) نشان داده شده است.



نمودار شماره ۳: تغییر در کیفیت خواب. (الف) تغییر در امتیاز کلی پرسشنامه خواب. در هر تیمار ستون اول، دوم و سوم به ترتیب نشان‌دهنده هفته اول، هفته پنجم و هفته دهم آزمایش است. (ب) تغییر در امتیاز تاخیر در به خواب رفتن. اختلاف امتیاز شاخص‌های خواب بین قبل و بعد از ۱۰ هفته مصرف هر تیمار نشان داده شده است: اختلاف امتیاز کیفیت خواب در نمودار (پ)، اختلاف امتیاز تاخیر در به خواب رفتن در نمودار (ت).



نمودار شماره ۴: غلظت کورتیزول بزاقی در مصرف کنندگان نوشیدنی های شاهد (—)، نوشیدنی حاوی پاراپروبیوتیک (—) طی ۱۰ هفته مصرف

بحث

براساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر پاراپروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم یکی از منابع حاوی انتقال دهنده مهاری عصبی می باشد که براساس تحقیقات اثر فراوانی در تعدیل استرس در افراد دارد (۱۴). به طور کلی تشخیص حضور گابا تایید کننده توانایی لاکتوباسیلوس پلانتروم در تولید این انتقال دهنده مهاری عصبی است. در پژوهش های مختلفی نیز توانایی این سویه در تولید گابا (در حضور و عدم حضور مونوسدیم گلوتمات به عنوان پیش ساز گابا) تایید شده است (۱۵، ۱۶). بیش تر تحقیقات توانایی فراوان این سویه را در تولید این ماده تایید کرده اند و به گونه ای که این سویه را به عنوان یک پروبیوتیک غنی کننده مواد غذایی جهت کاهش افسردگی و اضطراب پیشنهاد داده اند (۱۷). میزان بالای گابا در این تیمار نشان دهنده مناسب بودن آن جهت غنی سازی آبمیوه است. اعمال فراصوت در مدت زمان ۱۰ دقیقه در شدت ۵۰ وات موجب استخراج محتویات درونی سلول از جمله گابا شده است. اعمال فراصوت موجب افزایش انتشار درون سلولی به بیرون و محیط خارجی شده است (۱۸). این ماده موثره در زمان غیرفعال سازی نیز در سوسپانسیون حاوی پاراپروبیوتیک ها حفظ شده است و براساس مطالعات انجام شده عوامل محیطی اثرات زیادی بر ماندگاری این ماده ندارد (۱۹).

یکی از تفاوت هایی که در کروماتوگرام قابل مشاهده است اختلاف در مساحت زیرین منحنی ایجاد شده توسط نمونه های مختلف است که حاکی از اختلاف در میزان غلظت گابا در هر یک از نمونه ها است.

در این پژوهش براساس پرسشنامه های سلامت عمومی استفاده از نوشیدنی پاراپروبیوتیک موجب تغییرات آماری معنی دار در امتیاز سلامت عمومی ارزیاب ها شده است. در گروهی که نوشیدنی آب انگور بدون پاراپروبیوتیک را مصرف کرده اند (گروه شاهد) امتیاز سلامت عمومی کاهش یافت. از مقایسه اثر نوشیدنی ها پاراپروبیوتیک بر زنان و مردان، می توان گفت نوشیدنی های پاراپروبیوتیک بر تقویت وضعیت روحی و روانی زنان شرکت کننده اثر بهتری داشت که نشان دهنده این است که ممکن است یک تفاوت معنی دار بین واکنش بدن زنان و مردان در پاسخ به نوشیدنی پاراپروبیوتیک وجود داشته باشد. با توجه به این که شرکت کنندگان از بین دانشجویان در زمان امتحانات پایان ترم انتخاب شدند؛ نظم خواب و کیفیت خواب این افراد به طور معمول از بین می رود، اما استفاده از نوشیدنی پاراپروبیوتیک موجب بهبود کیفیت خواب شد که در گروه شاهد این بهبود مشاهد نشد و افراد گروه شاهد از بی خوابی و تاخیر در بخواب رفتن گلایه داشتند. کیفیت خواب فاکتوری است که می تواند تغییرات شرایط فیزیکی و فیزیولوژیکی بدن انسان را نشان دهد و بهبود این فاکتور با مصرف پاراپروبیوتیک ها می تواند نشان دهنده بهبود وضعیت جسمی و فیزیولوژیکی بدن انسان باشد. پیش از این استفاده از پروبیوتیک های زنده موجب بهبود کیفیت خواب دانشجویان شده بود. هم چنین براساس تحقیق Nishida و همکاران استفاده از پاراپروبیوتیک لاکتوباسیلوس گاسری موجب بهبود کیفیت خواب در دانشجویان رشته پزشکی شده بود (۲۰). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان دهنده توانایی پاراپروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم در تقویت سلامت روحی است. Nishida و همکاران نشان دادند که استفاده روزانه از

پاراپروبیوتیک‌ها موجب افزایش سرعت فعالیت عصب‌های سمپاتیک می‌شود. این مکانیزم دارای اثر کاهش‌دهندگی استرس در افراد می‌شود. در واقع پاراپروبیوتیک‌ها با افزایش سرعت فعالیت عصب‌های پاراسمپاتیکی، موجب تقویت و بهبود عملکرد دستگاه گوارش می‌شود و هم‌چنین از افزایش سطح کورتیزول در زمان برگزاری امتحانات جلوگیری می‌کند.

براساس نتایج حاصل از این آزمایش، مصرف پاراپروبیوتیک‌ها موجب سرکوب ترشح کورتیزول شد که با داده‌های حاصل از پایش سلامت عمومی و خواب پیتربورگ همسو بود. به‌طور کلی شرایط استرس‌زا موجب افزایش ترشح سطح کورتیزول در پلاسمای انسان می‌گردد که خود به عنوان یک شاخص بیولوژیکی برای اندازه‌گیری میزان استرس به شمار می‌رود. با توجه به این که میزان کورتیزول به‌ویژه در مصرف‌کنندگان نوشیدنی‌های پاراپروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم پایین‌تر از گروه شاهد بود احتمال می‌رود که پاراپروبیوتیک‌ها موجب کاهش فعالیت محور HPA و متعاقباً موجب کنترل پاسخ‌های کورتیزولی ناشی از استرس شود و غلظت آن در پلاسمای در سطح عادی نگه دارد. تحقیقات فراوانی اثرات مثبت میکروبیوتای دستگاه گوارش بر تنظیم محور HPA را به اثبات رسانده است و یکی از مکانیزم‌های احتمالی خاصیت ضدالتهابی و تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی توسط این میکروب‌های مفید ذکر است. پیش از این در برخی تحقیقات اثرات ضدالتهابی و تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی پاراپروبیوتیک‌ها بر بدن موجودات زنده نشان داده شده است به همین دلیل احتمال می‌رود این خاصیت پاراپروبیوتیک مکانیزم دیگر اثرگذار بر کاهش استرس باشد. براساس این پژوهش در محیط حاوی پاراپروبیوتیک‌ها حضور گابا به اثبات رسید که این ماده یکی از ترکیبات مهم در کاهش استرس می‌باشد. براساس مطالعات صورت گرفته و نتایج این پژوهش پاراپروبیوتیک‌ها موجب افزایش عملکرد پروبیوتیک‌ها می‌شوند، در نتیجه این

احتمال می‌رود که علاوه بر این که گابا از طریق نوشیدنی وارد بدن مصرف‌کنندگان شده است، مصرف پاراپروبیوتیک‌ها نیز موجب بهبود عملکرد میکروبیوتای روده و افزایش سنتز ترکیبات و اسیدهای آمینه اساسی نظیر گابا توسط این میکروارگانیسم‌ها شده است که در نهایت از ارسال پیام‌های استرس‌زا در بدن و افزایش کورتیزول خون جلوگیری کرده است.

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که بررسی اثر نوشیدنی‌های شاهد و پاراپروبیوتیک بر شاخص‌های استرس تفاوت معنادار بین این شاخص‌ها در افراد مصرف‌کننده نوشیدنی شاهد و پاراپروبیوتیک را نشان می‌دهد. شاخص سلامت عمومی افرادی که نوشیدنی پاراپروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم را مصرف کردند پس از ۱۰ هفته بالاترین امتیاز را داشتند. براین اساس می‌توان گفت که نوشیدنی پاراپروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم می‌تواند بر محور عصب مرکزی اثر نماید و از انتقال پیام‌های استرسی جلوگیری نماید. میزان کورتیزول بزاقی در افراد گروه مصرف‌کننده نوشیدنی پاراپروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم کم‌ترین میزان در بین سایر افراد شرکت‌کننده بود. نتایج این تحقیق نشان داد که پاراپروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم دارای مزایای بالقوه برای ارتقای سلامت روان است. امید است در آینده با انجام پژوهش‌های بیش‌تر در زمینه اثر روش‌های غیر فعالسازی بر فعالیت پاراسایکوبیوتیک‌های حاصل و بررسی توانایی پاراسایکوبیوتیک‌ها در درمان‌های بیماری‌های وابسته به روان گام‌های موثری در معرفی پاراسایکوبیوتیک‌های برداشته شود. از جمله محدودیت‌های مطالعه ما این است که با اینکه از ارزیابان درخواست شد از مصرف ترکیبات پروبیوتیک خودداری کنند اما اثر احتمالی استفاده محصولات تخمیری را نمی‌توان حذف کرد. علاوه بر این، اثر لاکتوباسیلوس پلانتاروم با سایر سویه‌های پروبیوتیک مقایسه و بررسی نشده است که در مطالعات آینده انجام خواهد گرفت.

References

1. Sharma DK. Physiology of stress and its management. *J Med Stud Res* 2018; 1(001): 1-5.
2. Yaribeygi H, Panahi Y, Sahraei H, Johnston TP, Sahebkar A. The impact of stress on body function: A review. *Excli J* 2017; 16: 1057-1072.
3. Cool J, Zappetti D. The physiology of stress. *Medical Student Well-Being: An Essential Guide*. New York: Springer: 2019.
4. Zendeboodi F, Khorshidian N, Mortazavian AM, da Cruz AG. Probiotic: conceptualization from a new approach. *Curr Opin Food Sci* 2020; 32: 103-123.
5. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr* 2011; 6(3): 261-274.
6. Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biol Psychiatry* 2013; 74(10): 720-726.
7. Toyoda A, Kawase T, Tsukahara T. Effects of dietary intake of heat-inactivated *Lactobacillus gasseri* CP2305 on stress-induced behavioral and molecular changes in a subchronic and mild social defeat stress mouse model. *Biomed Res* 2020; 41(2): 101-111.
8. Hara T, Mihara T, Ishibashi M, Kumagai T, Joh T. Heat-killed *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 promotes colonic serotonin synthesis in mice. *J Funct Foods* 2018; 47: 585-589.
9. Schön C, Allegrini P, Engelhart-Jentzsch K, Riva A, Petrangolini G. Grape seed extract positively modulates blood pressure and perceived stress: A randomized, double-blind, placebo-controlled study in healthy volunteers. *Nutrients* 2021; 13(2): 654.
10. Almada CND. Paraprobiotics: Impact of inactivation methods on efficacy, food stability and beneficial health effects. Thesis. Brazilian Institute of Information in Science and Technology. 2017.
11. Naissinger da Silva M, Tagliapietra BL, Flores Vda, Pereira dos Santos Richards NS. In vitro test to evaluate survival in the gastrointestinal tract of commercial probiotics. *Curr Res Food Sci* 2021; 4: 320-325.
12. Barros CP, Grom LC, Guimarães JT, Balthazar CF, Rocha RS, Silva R, et al. Paraprobiotic obtained by ohmic heating added in whey-grape juice drink is effective to control postprandial glycemia in healthy adults. *Food Res Int* 2021; 140: 109905.
13. Sanchart C, Rattanaporn O, Haltrich D, Phukpattaranont P, Maneerat S. *Lactobacillus futsaii* CS3, a new GABA-producing strain isolated from Thai fermented shrimp (Kung-Som). *Indian J Microbiol* 2017; 57(2): 211-217.
14. Hepsomali P, Groeger JA, Nishihira J, Scholey A. Effects of oral gamma-aminobutyric acid (GABA) administration on stress and sleep in humans: A systematic review. *Front Neurosci* 2020; 14: 923.
15. Yunes R, Poluektova E, Vasileva E, Odorskaya M, Marsova M, Kovalev G, et al. A multi-strain potential probiotic formulation of GABA-producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with antidepressant effects. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2020; 12(3): 973-979.
16. Díez-Gutiérrez L, San Vicente L, Barron LJR, del Carmen Villaran M, Chávarri M. Gamma-aminobutyric acid and probiotics: Multiple health benefits and their future in

- the global functional food and nutraceuticals market. *J Funct Foods* 2020; 64: 103669.
17. Rezaei M, ghasemi Y, Sharifan A, Bakhoda H. Producing and analyzing gamma-aminobutyric acid containing probiotic black grape juice using *Lactobacillus plantarum plantarum* IBRC (10817) and *Lactobacillus brevis* IBRC (10818). *Measurement: Food* 2022; 8: 100056.
18. Behzadnia A, Moosavi-Nasab M, Ojha S, Tiwari BK. Exploitation of ultrasound technique for enhancement of microbial metabolites production. *Molecules* 2020; 25(22): 5473.
19. Cheng-Chih T, Tsai-Hsin C, Cheng-Ying H, Pei-Pei L, Tsung-Yen WJAJoMR. Effects of anti-hypertension and intestinal microflora of spontaneously hypertensive rats fed gamma-aminobutyric acid-enriched Chingshey purple sweet potato fermented milk by lactic acid bacteria. *Afr J Microbiol Res* 2013; 7(11): 932-940.
20. Nishida K, Sawada D, Kawai T, Kuwano Y, Fujiwara S, Rokutan K. Para-psychobiotic *Lactobacillus gasseri* CP 2305 ameliorates stress-related symptoms and sleep quality. *J Appl Microbiol* 2017; 123(6): 1561-1770.