



The Importance of Gamma Aminobutyric Acid Produced by Lactic Acid Bacteria

Seda Yalçınkaya^{1,a,*}, Gülden Başıyigit Kılıç^{2,b}, Aynur Gül Karahan Çakmakçı^{1,c}

¹Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Suleyman Demirel University, 32260 Isparta, Turkey

²Department of Food Engineering, Faculty of Engineering Architecture, Mehmet Akif Ersoy University, 15030 Burdur, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Review Article</i></p> <p>Received : 02/03/2018 Accepted : 22/07/2019</p> <p>Keywords: Gamma aminobutyric acid Lactic acid bacteria Health Functional food development Neurotransmitter</p>	<p>Gamma aminobutyric acid (GABA) is known as an important inhibitory neurotransmitter in the human brain. Recent studies have proved the beneficial effects of GABA on human health. It has been reported that in people who use GABA supplements, the factors affecting the life quality negatively such as psychological problems, insomnia and immune problems have decreased. Studies in this field have shown that lactic acid bacteria (LAB) can produce GABA. For this reason, interest in LAB producing GABA is steadily increasing. It is stated that GABA produced by natural LAB has almost no side effects compared to synthetically created ones. It is also suggested that GABA-producing LAB, which is isolated from especially in Far East countries foods, should be used to develop functional foods. More research needs to be done in order to proceed in this newly developing area, and the undiscovered features of GABA need to be investigated. In this review, the importance of GABA is addressed and the studies about GABA are examined.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(8): 1094-1099, 2019

Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Gamma Aminobütirik Asitin Önemi[#]

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>[#]Bu çalışma Seda Yalçınkaya'nın 25.12.2017 tarihinde sunulan doktora seminerinden hazırlanmıştır.</p> <p><i>Derleme Makale</i></p> <p>Geliş : 02/03/2018 Kabul : 22/07/2019</p> <p>Anahtar Kelimeler: Gamma aminobütirik asit Laktik asit bakterileri Sağlık Fonksiyonel gıda geliştirme Nörotransmitter</p>	<p>Gamma aminobütirik asit (GABA), insan beynindeki önemli bir inhibitör olan nörotransmitter olarak bilinmektedir. Son yıllarda yapılmış çalışmalar GABA'nın sağlık üzerine birçok yararlı etkisi olduğunu göstermektedir. GABA takviyesi kullanan insanlarda, psikolojik sorunlar, uykusuzluk ve bağışıklık problemleri gibi hayatı olumsuz yönde etkileyen faktörlerin azaldığı bildirilmiştir. Bu alanda yapılan çalışmalar laktik asit bakterileri (LAB)'nin GABA üretebildiğini göstermiştir. Bu sebeple GABA üreten LAB'a olan ilgi giderek artmaktadır. LAB tarafından doğal yolla üretilen GABA'nın sentetik olarak üretilenlere kıyasla yan etkilerinin neredeyse hiç olmadığı belirtilmektedir. Özellikle Uzak Doğu ülkelerindeki gıdalardan izole edilmiş GABA üreten LAB'ın fonksiyonel gıda geliştirmede kullanılması da önerilmektedir. Yeni gelişmekte olan bu alanda ilerleyebilmek için daha çok araştırma yapılması ve GABA'nın keşfedilmemiş özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu derlemede GABA'nın öneminden bahsedilmiş ve GABA ile ilgili yapılmış çalışmalar üzerinde durulmuştur.</p>

^a s_seda@msn.com

^b <https://orcid.org/0000-0003-0947-8505>

^c gklic@mehmetakif.edu.tr

^d <https://orcid.org/0000-0003-1211-0568>

^e aynurkarahan@sdu.edu.tr

^f <https://orcid.org/0000-0001-7625-5868>



Giriş

Son yıllarda gıdalardan elde edilen biyoaktif maddeler araştırmacılar için önemli çalışma konularından olmuştur. Biyoaktif bileşenler; besleyici değerlerine bakılmaksızın insanlarda düzenleyici aktivitelerin gerçekleşmesini sağlayabilen, tüketime hazır gıda bileşenleridir (Siragusa ve ark., 2007). GABA, protein yapıda yer almayan bir aminoasittir ve biyoaktif bileşenlere dahil edilmektedir. GABA ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde sağlığa faydalı etkileri olduğu belirlenmiştir. Memelilerin merkezi sinir sistemlerinde sinir iletimini yavaşlatarak inhibitör görevi gören bir nörotransmitter olan GABA ve reseptörleri insan nörolojik rahatsızlıklarının patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (Wong ve ark., 2003; Kalueff ve Nutt, 2007; Mohler, 2012; Auteri ve ark., 2015; Yunes ve ark., 2016).

GABA, beyinde doğal yolla üretilebildiği gibi pirolidon maddesinden yapay olarak da üretilebilmektedir. Günümüzde bağırsak florası, ikinci beyin olarak nitelendirilmektedir ve bağırsak florasında bulunan GABA üreten LAB üzerine yapılan araştırmalar da giderek artmaktadır (Li ve Cao, 2010; Dhakal ve ark., 2012; Linares ve ark., 2017).

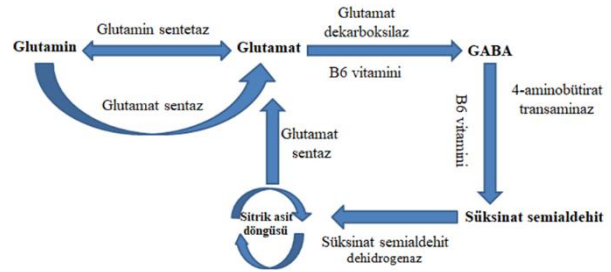
İlk olarak 2013 yılında, psikolojik rahatsızlığı olan hastalarda yeterli miktarda alınması halinde sağlığa faydalı etkiler ortaya çıkaran, yaşayan canlı organizmalar psikobiyotikler kavramı ile tanımlanmıştır. Probiyotik olarak sınıflandırılan bu bakterilerin, bağırsak-beyin ekseninde etkili olan GABA gibi nöroaktif bileşenleri üretebildikleri ifade edilmiştir (Dinan ve ark., 2013). Psikobiyotikler aracılığıyla kurulan beyin-bağırsak iletişim kanallarının enterik sinir sistemini ve bağışıklık sistemini etkilediğinden bahsedilmiştir (Sarkar ve ark., 2016).

Bu derlemede son yılların ilgi çeken bir araştırma konusu olan GABA'nın önemi ve kullanım imkânlarından bahsedilmiştir. GABA'nın sağlıkla ilişkisi ve genellikle fermente gıdalardan izole edilen LAB'ın GABA üretimi üzerinde durulmuştur. GABA'nın sağlığı destekleyici gıda takviyesi olarak etkileri ise *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara değinilerek irdelenmiştir. Bunun yanı sıra GABA takviyeli geliştirilmiş gıdaların gelecek yıllarda kazanacağı önemden söz edilmiştir.

GABA'nın Sağlık Üzerindeki Etkileri

GABA üretimi, bakterilerin yanı sıra bitki ve hayvanların da sahip olduğu bir pridoksal 5' fosfata bağlı bir enzim olan glutamat dekarboksilaz (GAD) tarafından L-glutamik asitin dekarboksilasyonunu içeren bir mekanizmadır (Ueno, 2000; Siragusa ve ark., 2007; Tajabadi ve ark., 2015). Beyinde GABA seviyesinin azalmış veya artmış olması bazı psikolojik ve nörolojik rahatsızlıklara sebep olmaktadır. Ancak GABA'nın kan beyin bariyeri geçirgenliğini etkileyen dozları üzerine henüz bir çalışma yapılmamıştır. Bu sebeple, yapılacak araştırmaların, ağız yoluyla GABA uygulamasının, insan beyindeki GABA düzeyine etkilerinin belirlenmesine dayalı olması önemlidir (Boonstra ve ark., 2015). GABA eksikliğine bağlı olarak beyinde glutamik asitin, GAD enzimi aracılığıyla GABA'ya dönüşümü gerçekleşir. Fazlalığı durumunda ise GABA, GAD gibi pridoksal-5'-fosfata bağımlı bir enzim olan gamma-aminobütirat

transaminaz enzimi tarafından önce süksinat semialdehit ara metabolitine ve bu metabolit de daha sonra gamma-hidroksibütirata indirgenir ve süksinata okside edilir. Süksinat ise sitrik asit döngüsü ile suya ve CO₂'ye dönüştürülür. Bu metabolizmalar sayesinde beyinde GABA dengesi sağlanmış olur (Alternative Medicine, 2007) (Şekil 1).



Şekil 1 GABA oluşum mekanizması (Mo, 2013)
Figure 1 The mechanism of GABA formation

GABA; nörotransmisyon, hipotansiyonu uyarma, diüretik ve sakinleştirici etkiler gibi bazı önemli fizyolojik fonksiyonlarda önemlidir (Li ve Cao, 2010). Yapılan araştırmalar GABA'nın rahatlatma ve uyku düzeni üzerinde olumlu etki yarattığını göstermektedir (Alternative Medicine, 2007; Yamatsu ve ark., 2016). İnsanlarda yapılan bir manyetik rezonans çalışması, GABA'nın analogu gabapentinin beyindeki GABA miktarını %55,7 oranında arttırdığını ortaya koymuştur (Cai ve ark., 2012; Boonstra ve ark., 2015). Zihinsel ve davranışsal bozukluklara sebep olan kalıtsal Huntington hastalığında da hastaların beyinlerindeki GABA miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Bu eksikliğin giderilmesinde GABA takviyesinin yapılmasının belirtilerin azalmasını sağladığı bildirilmiştir (Shoulson ve ark., 1976; Boonstra ve ark., 2015).

Bağışıklık sistemi ile ilgili hücrelerin uyarılmasında da GABA'nın etkili olduğu belirtilmiştir (Oh ve Oh, 2003; Siragusa ve ark., 2007). Konu ile ilgili olarak Abdou ve ark. (2006)'nın çalışmasında GABA'yı gıda takviyesi olarak kullanarak sağlıklı ve akrofobi geçmişine sahip hastalar üzerinde plasebo kontrollü çalışmalar yapılmıştır. Ticari bir GABA takviyesi kullanılarak yapılan bir çalışmada yüksekten korkan katılımcılar uzun bir köprü üzerinde yürütülmüştür. Köprü'nün yarısında katılımcıların tükürük örnekleri alınmış ve kan basınçlarına bakılmıştır. Tükürük salgısında önemli bir antikor grubu olan immünoglobulin A (IgA) miktarı incelenmiştir. Stresli zamanlarda tükürük salgısındaki IgA düzeyinde bazen hızlı bazen de yavaş bir düşme gözlenmektedir. Araştırmada plasebo kullanan grupta IgA seviyesi köprüyü geçme süresince düşerken, GABA takviyesi kullanan grubun tükürüklerindeki IgA seviyesinin artış gösterdiği tespit edilmiştir (Anonim, 2011). Bu durum GABA'nın, stres durumunda bağışıklık hücrelerini uyardığını göstermektedir.

Son yıllarda bağırsak mikrobiyotasının da beyin işlevlerine etkileri üzerine araştırmalar yoğunluk kazanmıştır. Yapılan deneylerin sonuçları beyin ile bağırsak arasında güçlü bir bağ olabileceğini kanıtlamıştır. Yapılan sınırlı sayıda çalışmada *Bifidobacterium* türlerinin

GABA üretme yeteneklerinin LAB'tan daha düşük olduğu belirtilmekle birlikte (Park ve ark., 2005; Barrett ve ark., 2012; Linares ve ark., 2017), Yunes ve ark. (2016)'nın çalışmasında bunun aksini kanıtlayan bulgular elde edilmiştir. Bu çalışmada 135 insan kaynaklı *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşunun monosodyum glutamat (MSG)'ı substrat olarak kullanıp GABA üretme yetenekleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda 58 suşun GABA ürettiği belirlenmiştir. En yüksek GABA üretimi *Bifidobacterium* suşlarında tespit edilmiştir. Bu suşların aynı zamanda DNA dizilimi yapılmış, *gadB* ve *gadC* genleri tanımlanmıştır. Elde edilen veriler GABA üretme yeteneğini sağlayan *gad* genlerinin *L. plantarum*, *L. brevis*, *B. adolescentis*, *B. angulatum* ve *B. dentium* türlerinde bulunduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde bağırsak mikrobiyotasının GABA üretme yeteneklerinin psikobiyotik özellikteki suş seçiminde önemli bir özellik olduğu ifade edilmiştir (Yunes ve ark., 2016).

GABA Üreten LAB'ın Gıda Endüstrisinde Kullanımı

GABA üreten LAB incelediğinde, bu bakterilerin genel olarak kültür koleksiyonundan elde edildikleri ya da bazı gıdalardan izole edildikleri görülmektedir. GABA üreten LAB'ın, yeni fermente ürün geliştirmede fonksiyonel başlatıcı kültürler olarak kullanılabilmesi imkânlarının olabileceği belirtilmektedir (Wu ve Shah, 2016). Yapılan çalışmalar incelendiğinde GABA üreten LAB'ın peynir, geleneksel fermente balık ürünleri, karides, geleneksel Kore yemeği olan kimçi, turşu, adzuki fasulyesi, kinoa ekşi hamuru gibi çeşitli gıdalardan izole edildiği görülmüştür.

Süt ve Süt Ürünlerinde GABA

LAB'ın GABA sentezleme özelliklerinin saptanması GABA ile zenginleştirilmiş süt ürünleri üretimi konusuna yeni bir bakış açısı getirmiştir. Doğal kazeinlerin, aminoasit oranının yüksek olmasından dolayı, süt fermentasyonu ve proteoliz süresince teorik olarak yüksek miktarda L-glutamat'ın serbest bırakılabileceği ve bu durumun da GABA'ya dönüşüme etkili olarak, ürün geliştirmede avantaj sağlayacağı öne sürülmektedir (Nomura ve ark., 1998; Nomura ve ark., 1999a; Nomura ve ark., 1999b; Leroy ve Vuyst, 2004; Siragusa ve ark., 2007). Japonya'da yapılan bir çalışmada peynir olgunlaşması süresince kullanılan 9 adet başlatıcı kültürün GABA üretimi incelenmiştir. Kültürlerin 6 adedinde GABA üretimi belirlenirken, bu suşların *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* oldukları tespit edilmiştir (Nomura ve ark., 1998).

Park ve Oh (2007)'un yaptığı bir çalışmada ise, çimlenmiş soya fasulyesi ekstraktı ve *L. brevis* OPY-1 suşu kullanılarak GABA ile zenginleştirilmiş yoğurt üretimi yapılmıştır. Yapılan uygulamanın yoğurt dışında diğer süt ürünlerine de uygun olduğu ve besleyici değeri yüksek olan bu fonksiyonel ürünlerin, tüketicilerin ilgisini çekebileceği vurgulanmıştır. Siragusa ve ark. (2007) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise teknolojik özellikleri farklı 22 adet İtalyan peynirinde GABA konsantrasyonu saptanmış ve peynirlerden GABA üreten LAB izole edilmiştir. Daha sonra GABA üreten bu suşların GAD enzimlerinin kısmi genetik dizilimleri belirlenmiş ve gastrointestinal şartlar altında GABA sentezi incelenmiştir. Çalışmada tüm peynir

örneklerinden toplamda 440 LAB izole edilmiştir. Sadece 61 izolat GABA üretim kapasitesi göstermiş ve 16S rRNA gen dizileme ile kısmi tanımlamaları yapılmıştır. Rekonstitüe sütte en iyi GABA üreten suşlar, *L. paracasei* PF6, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) PR1, *Lac. lactis* PU1, *L. plantarum* C48 ve *L. brevis* PM17 olarak tespit edilmiştir. *L. plantarum* C48 dışında bütün suşlar yüksek konsantrasyonda GABA içeren peynirlerden izole edilmiştir. Üç laktobasil suşu gastrointestinal sisteme izole edilmiştir. Üç laktobasil suşu sentezleyebilirken, *Lac. lactis* PU1 sentez gerçekleştirilememiştir. Çalışmada elde edilen bulguların sonucunda, GABA üreten laktobasil suşlarının kullanılmasıyla GABA ile zenginleştirilmiş sağlığı destekleyici süt ürünlerinin geliştirilebileceği ifade edilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada ise, İtalya'da Alp Dağları'na özgü geleneksel bir peynir olan ve çiğ inek sütünden yapılan Nostrano peynirinden LAB izole edilmiştir. İzolatların GABA üretme yetenekleri incelenmiştir. Toplam 1059 LAB izolatı, rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) kullanılarak taranmış ve 583 kümeye ayrılmıştır. 583 kümeden 97'sinde GABA üreten suşlar tespit edilmiştir ve suşların GABA üretimleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile incelenmiştir. İzole edilen türler çoğunlukla *L. paracasei*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*Str. thermophilus*) ve *Leuconostoc mesenteroides* olarak tespit edilmiştir. En çok GABA üreten türün *L. paracasei* olduğu belirlenirken, *Lac. lactis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Str. thermophilus* suşlarının da GABA üretme yeteneği saptanmıştır. *Str. thermophilus*'un bir suşu 80,0±2,7 mg/kg ile en yüksek GABA üreten suş olmuştur. Çalışma sonucunda çiğ süttten elde edilen peynirler, faydalı mikrobiyal çeşitlilik ve sağlığı destekleyici yeni LAB suşlarının kaynağı olarak tanımlanmıştır. Proteolitik aktivite ile kazeinden bol miktarda glutamat açığa çıkarılmıştır ve açığa çıkan glutamat da mikroorganizmaların sahip olduğu enzimler sayesinde GABA'ya dönüştürülmüştür (Franciosi ve ark., 2015).

Uzak Doğu'ya Özgü Fermente Gıdalarda GABA

Son yıllarda yapılan araştırmalarda süt ürünleri dışındaki fermente gıdalarda bulunan ve GABA üreten LAB önemli hale gelmiştir. Özellikle Uzak Doğu ülkelerinde sıkça tüketilen fermente gıdalardan izole edilen LAB ve LAB'ın sahip olduğu özelliklerle ilgili çalışmalar giderek artmaktadır. Örneğin, Komatsuzakia ve ark. (2005)'nin araştırmasında Japonya'nın geleneksel fermente balık ürünü olan tuna-suşiden izole edilmiş ve moleküler tekniklerle *L. paracasei* olarak tanımlanan *Lactobacillus* 7415 suşunun yüksek seviyede GABA ürettiği belirlenmiştir. Aynı zamanda kültür ortamına pridoksal fosfat ilavesi ve ortamın pH'sının 5,0 olarak ayarlanması ile sağlanan optimum koşullarda, 302 mM GABA üretimi tespit edilmiştir.

Cho ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, geleneksel Kore yemeği olan Kore'ye özgü geleneksel bir ferment ürün olan kimçiden izole edilmiş LAB suşlarının GABA üretimi ve GABA'nın nöron hücreleri üzerindeki nörokoruyucu etkisi araştırılmıştır. En yüksek GABA üretme yeteneğine sahip suşların tanısı yapılmıştır.

Çalışmada MS suşu, Gram özelliği, metabolik karakteristiği ve 16S rDNA dizi analizine dayanarak *L. buchneri* olarak tanımlanmıştır. GABA üretimi için en uygun koşullar; %5 MSG, %1 NaCl ve %1 glikoz içeren pH değeri 5,0 olan MRS sıvı besiyerinde 30°C’ de 36 saat inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir. Çalışmada, *L. buchneri* MS özütünün, nörotoksik etkiye bağlı hücre ölümlerine karşı nöron hücrelerini kısmen ya da tamamıyla koruduğu ifade edilmiştir. Araştırma sonucunda, kimyasal maddeler tarafından tetiklenen hücre ölümlerine karşı nöroprotektif etkileri belirlenmiştir. Bu suşun gıda endüstrisi açısından önemli olacağı vurgulanmıştır (Cho ve ark., 2007). Japonya’da yapılan bir çalışmada da geleneksel turşulardan izole edilen bir suş *L. senmaizukei* olarak tanımlanmış ve GABA ürettiği belirlenmiştir (Hiraga ve ark., 2008). Kim ve Kim (2012)’in yaptığı bir başka çalışmada ise 20 kimçi örneğinden 230 adet LAB izole edilmiş ve izolatların GABA sentezleme yetenekleri araştırılmıştır. Çalışmada, 55 adet *L. plantarum*, 6 adet *L. brevis*, 4 adet *Leu. mesenteroides*, 1 adet *Leu. lactis* ve 2 adet *Weissella viridescens* olmak üzere toplam 68 izolatın GABA sentezlediği belirlenmiştir.

Sanchart ve ark. (2016)’nın yaptığı çalışmada GABA üreten başlatıcı kültürleri geliştirmek için Tayland’a özgü fermente karides ürünü olan Kung-Som’dan izole edilen *L. futsaii* CS3 ve CS5 suşlarının teknolojik özelliklerinin ve güvenilirliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Araştırma sonucunda her iki her iki suşun da >8 mg/ml düzeyinde GABA ürettiği belirlenmiştir. Aynı zamanda her iki suş gıda kaynaklı patojen ve bozulmaya neden olan bakterilere karşı inhibitör etki göstermiştir. Suşlar ayrıca proteolitik aktivite ve mukoz hücrelerine adezyonu sağlayan hücre yüzeyi hidrofobitesini özelliklerine sahip bulunmuştur. Suşlarda virülens gen veya biyojen amin üretme yeteneği tespit edilmemiştir. Buna karşın, CS3 suşu gastrointestinal sisteme benzer koşullarda 8 saatten fazla süren inkübasyon sürecinde sadece 1,5 log birim azalma göstermiş ancak CS5’e göre canlılığını daha iyi korumuştur. Aynı zamanda *L. futsaii* CS3 72 saat içinde MSG’yi GABA’ya dönüştürmede en etkili suş olmuştur. Çalışma sonucuna göre *L. futsaii* CS3’ün iyi bir GABA üreticisi olduğu ve fermente gıdaların üretiminde kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Çeşitli İçeceklerde GABA

GABA, LAB aracılığıyla doğal yollarla üretilebildiği gibi bazı bitkisel kaynaklı ürünlerde de doğal olarak bulunmaktadır.

Hou (2011) tarafından yapılan çalışmada, Pu-Erh çay yapraklarında bulunan GABA’nın etkisi *in vivo* ve *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. Çalışma sonucunda çay yapraklarındaki GABA miktarı 177±35 µg/g olarak tespit edilmiştir. Takatoshi ve Yuko (2008), GABA içerdiği düşünülen turunçgillere örnek olarak 18 farklı meyve suyu ile çalışmıştır. Konsantr turunç suyundan hazırlanan içeceklerde 7-40 mg/100 g GABA belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, tüketime hazır içeceklerdeki GABA seviyesinin depolama koşullarında kararlı olduğunu ispatlamıştır. Ancak yaygın eğilim süt ve süt ürünleri ve Uzak Doğu’ya özgü fermente gıdalarda olduğu gibi GABA üreten LAB ile içeceklere fonksiyonel özellik kazandırılmasıdır. Bu yaklaşımın esas alındığı çalışmalar

bulunmaktadır. Örneğin Kim ve ark. (2009)’nın çalışmasında, siyah ahududu suyu *L. brevis* GABA 100 ile 25, 30 ve 37°C’ de ve 3,5; 4, 4,5; 5, 5,5; 6 pH’da 15 gün fermente edilmiştir. Fermantasyon boyunca meyve suyundaki GABA konsantrasyonu HPLC ile izlenmiştir. Elde edilen bulgular bakteri canlılığında belirgin bir azalma gözlendiğini, fakat GABA’nın sürekli olarak artmaya devam ettiğini göstermiştir. 30°C’ de, 25 ve 37°C sıcaklıktaki fermantasyona kıyasla, 25 ve 37°C sıcaklıktaki fermantasyona kıyasla daha yüksek GABA üretimi saptanmıştır. 12. günde 30°C’ de fermente edilen meyve suyundaki GABA konsantrasyonunun 27,6 mg/ml ile maksimum seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar değerlendirilerek siyah ahududu meyve sularının LAB kullanılarak GABA ile zenginleştirilebileceği belirtilmiştir.

Cagno ve ark. (2010) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, fonksiyonel üzüm şırası elde etmek amacıyla GABA sentezleyen *L. plantarum* DSM 19463 kullanılmıştır. Araştırmada tarımsal faaliyet sonucu oluşan artık ürünler substrat olarak değerlendirilmiş; *L. plantarum* DSM 19463 üzüm şırasına ve peyniraltı suyuna inoküle edilip, 30°C’ de 72 saat fermantasyona bırakılmıştır. Çalışma sonucunda üzüm şırasına peyniraltı suyuna kıyasla 4,83 mM ile daha yüksek GABA sentezlendiği belirlenmiştir.

Ratanaburee ve ark. (2011)’nin yaptığı bir diğer çalışmada ise GABA üreten *L. plantarum* DW12 başlatıcı kültür olarak kullanılarak fonksiyonel fermente kırmızı deniz yosunu suyu elde edilmiştir. %1 MSG, %6 sakkaroz ve pH 6 ile optimum olarak ayarlanan fermantasyon ortamına %5 başlatıcı kültür ilave edilmiştir. Eklenen kültür sonucunda 4000 mg/l ile en yüksek GABA üretimi gerçekleşmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde fermente kırmızı deniz yosunu suyunun MSG ve GABA üreten *L. plantarum* DW12’nin ilavesi ile GABA açısından zenginleştirilebileceği sonucuna varılmıştır.

GABA ile İlgili Optimizasyon Çalışmaları

GABA üretiminde maksimum verim elde edebilmek için GABA üretimini etkileyen bazı faktörlerin en uygun hale getirilmesi gerekmektedir. Bunun için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Villegas ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada kinoa ekşi hamurundan izole edilmiş GABA üreten LAB’ın kesikli fermantasyon koşullarının optimizasyonu araştırılmıştır. Çalışmada, 19 adet LAB izole edilmiştir. İzolatların GABA üretimi; inkübasyon sıcaklığı ve süresi, MSG konsantrasyonu gibi kültür şartlarının optimize edilmesi ile incelenmiştir. *L. brevis* CRL 1942 53 mM MSG’yi GABA’ya dönüştürmede en etkili suş olarak belirlenmiştir. 0 mM’dan 270 mM’a artış gösteren MSG konsantrasyonunda GABA üretim veriminin de kademeli olarak arttığı gözlenmiştir. Buna ilaveten 30°C’ de 48 saatlik inkübasyon sonucunda MSG’nin yaklaşık %90’ının GABA’ya dönüşümü gerçekleşmiş ve maksimum üretim 255 mM olarak tespit edilmiştir. MSG ilavesinin hücre gelişimine etki etmediği, GABA seviyesindeki farklılığın spektrofotometre ile belirlenen hücre yoğunluğundaki değişimle ilişkisinin olmadığı belirlenmiştir. Buna karşın glutamat eklenmesinin canlılığı arttırdığı, GABA üretimi ile canlılık arasında bir korelasyon olduğu ifade edilmiştir.

Lim ve ark. (2017)'nın yaptığı çalışmada ise kimçiden izole edilen *L. brevis* HYE1'in GABA üretimi üzerine; karbon ve azot kaynaklarının çeşidi, MSG miktarı, başlangıç pH'sı gibi kültür şartlarının etkileri araştırılmıştır. En uygun karbon kaynağını belirlemek için her bir karbon kaynağından (glukoz, laktoz, sükröz, ksiloz, früktoz, maltoz, galaktoz, arabinoz, rafinoz, mannitol) %2 ve %1 MSG içeren besiyerinde 30°C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. %2 glukoz içeren standart MRS besiyerinde 2,13 mM, früktoz içeren besiyerinde 2.02 mM, galaktoz içeren ise 2,06 mM GABA üretimi gerçekleşmiştir. En iyi karbon kaynağı 3,04 mM GABA üretimi sağlayan maltoz olarak belirlenmiştir. Daha sonra azot kaynaklarının etkisini belirlemek için %2 maltoz, %1 MSG ve %2,5 oranında farklı azot kaynaklarını (sığır ekstraktı, tripton, proteoz pepton) içeren MRS besiyeri kullanılmıştır. Azot kaynağı olarak sığır ekstraktı ve proteoz peptona kıyasla, tripton içeren besiyerinde maksimum GABA üretimi 16,47 mM olarak bulunmuştur. Buna ilaveten 18,97 mM GABA üretiminde optimal MSG konsantrasyonu %1 ve başlangıç pH'sı 5 olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde GABA üretimi için en önemli faktörün pH olduğu belirlenmiştir. Maksimum GABA üretimi için ise optimal kültür koşulları; %2,14 (w/v) maltoz, %4,01 (w/v) tripton, %2,38 (w/v) MSG ve başlangıç pH'sı 4,74 olarak önerilmiştir. Bu optimum koşullarda 18,76 mM GABA üretimi gerçekleşmiştir.

Song ve Yu (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, fermente edilmiş adzuki fasulyesi sütünde yüksek GABA üretimi için koşulların optimize edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada süt ürünlerinin fermente edilmesinde yaygın olarak kullanılan *L. rhamnosus*, GABA üretimi için adzuki fasulyesi sütüne inoküle edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde fermantasyondan 36 saat sonra *L. rhamnosus* eklenen adzuki fasulyesi sütündeki GABA içeriğinin 0,05 mg/ml'den 0,44 mg/ml'ye artış gösterdiği belirlenmiştir. Galaktoz, MSG ve pridoksin ilavesinin ise GABA içeriğini sırayla %23-38, %24-68, %8-36 oranlarında arttırdığı gözlenmiştir. Optimal kültür koşulları altında adzuki fasulyesi sütünün fermantasyonunda üretilen GABA miktarı, kontrol grubuna kıyasla (0,05 mg/100 ml) yaklaşık 22,4 kat artış göstererek 1,12 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Sonuç

Son yıllarda çeşitli hastalıkların tedavi sürecinde ve sağlığın korunması amacıyla bazı biyoaktif bileşenlerle takviye edilmiş gıda maddelerinin üretimi teşvik edilmekte ve bu tür ürünlere tüketici talebi hızla artmaktadır. Biyoaktif bileşenlerin doğal kaynaklardan elde edilmesi, sentetik olarak üretilen ilaçların getirdiği yan etkilerin azaltılması konusunda alternatif olarak görülmektedir. GABA, ilaç endüstrisinde uzun zamandır anksiyete, epilepsi, uyku bozuklukları gibi bazı nörolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır. GABA ile zenginleştirilmiş gıdaların geliştirilmesiyle ilgili çalışmaların, tüketicilerin doğal ürünlere olan ihtiyacını karşılaması beklenmektedir. Dolayısıyla sağlığın korunması açısından faydalı bakterilerin fermantasyonuyla GABA ile zenginleştirilmiş gıdaların üretilmesi, ilaç kullanımına doğal bir alternatif olarak görülmektedir.

Ülkemizde bu alandaki çalışmalar henüz yenidir. Geleneksel fermente gıdalarda zengin olan ülkemizde, LAB florası oldukça çeşitlilik göstermektedir. Suşa özgü bir özellik olan GABA üretimine yönelik araştırmaların önemli olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde başlatıcı kültür ve probiyotik çalışmalarına olan ilgi her geçen gün artmakla birlikte bu tip çalışmaların desteklenmesine yönelik kaynakların azlığı çalışmaların hızla yayılmasını engellemektedir. Bu bakımdan bu tip çalışmaların öncelikli alanlar içine almasında yarar bulunmaktadır.

Kaynaklar

- Abdou AM, Higashiguchi S, Horie K, Kim M, Hatta H, Yokogoshi H. 2006. Relaxation and immunity enhancement effects of g-aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *Biofactors.*, 26: 201–208. doi: 10.1002/biof.5520260305.
- Alternative Medicine. 2007. Gamma-Aminobutyric Acid (GABA). *Altern Med Rev.*, 12, 3.
- Anonim. 2011. PharmaGABA: Natural Support for Stress, Anxiety and Insomnia. *Bioclinic Naturals.*
- Auteri M, Zizzo MG, Serio R. 2015. GABA and GABA receptors in the gastrointestinal tract: from motility to inflammation. *Pharmacol.*, 93: 11-21.
- Barrett E, Ross, RP, O'Toole PW, Fitzgerald GF, Stanton C. 2012. g-Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J. Appl. Microbiol.*, 113: 411-417. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05344.x
- Boonstra E, Kleijn RD, Colzato LS, Alkemade A, Forstmann BU, Nieuwenhuis S. 2015. Neurotransmitters as food supplements: the effects of GABA on brain and behavior. *Front Psychol.*, 6: 1520.
- Cagno R, Mazzacane F, Rizzello CG, Angelis M, Giuliani G, Meloni M, Servi B, Gobetti M. 2010. Synthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86: 731–741.
- Cai K, Nanga RPR, Lamprou L, Schinstine C, Elliott M, Hariharan H. 2012. The impact of gabapentin administration on brain GABA and glutamate concentrations: a 7 T1H-MRS study. *Neuropsychopharmacology.*, 37: 2764–2771. doi:10.1038/npp.2012.142.
- Cho YR, Chang JY, Chang HC. 2007. Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchmeri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 104-109.
- Dhakal R, Bajpai VK, Baek KH. 2012. Production of gaba (g-aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Braz. J. Microbiol.*, 43: 1230–1241. doi: 10.1590/S1517-83822012000400001.
- Franciosi E, Carafa I, Nardin T, Schiavon S, Poznanski E, Cavazza A, Larcher R, Tuohy KM. 2015. Biodiversity and γ -aminobutyric acid production by lactic acid bacteria isolated from traditional Alpine raw cow's milk cheeses. *Biomed Res Int.*, vol. 2015, Article ID 625740, 11 pages, *Biomed Res Int.* http://dx.doi.org/10.1155/2015/625740
- Hiraga K, Ueno Y, Sukontasing S, Tanasupawat S, Oda K. 2008. *Lactobacillus senmaizukei* sp. Nov., isolated from japanese pickle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 1625–1629.
- Hou CW. 2011. Pu-Erh tea and GABA attenuates oxidative stress in kainic acid-induced status epilepticus. *Hou J Biomed Sci.*, 18:75
- Kalueff AV, Nutt DJ. 2007. Role of GABA in anxiety and depression. *Depress Anxiety.*, 24(7): 495-517.

- Kim JY, Lee MY, Ji GE, Lee YS, Hwang KT. 2009. Production of gamma-aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *Int. J. Food Microbiol.*, 130(1): 12-6.
- Kim MJ, Kim KS. 2012. Isolation and Identification of γ -Aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria from Kimchi. *J Korean Soc Appl Biol Chem.*, 55(6):777-785.
- Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Monose H, Kimura T. 2005. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol.*, 22: 497-504.
- Leroy F, Vuyst LD 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol.*, 15: 67-78.
- Li H, Cao Y. 2010. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids*, 39(5): 1107-1116.
- Lim HS, Cha IT, Roh SW, Shin HH, Seo MJ. 2017. Enhanced Production of Gamma Aminobutyric Acid by Optimizing Culture Conditions of *Lactobacillus brevis* HYE1 Isolated from Kimchi, a Korean Fermented Food. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 27(3): 450-459.
- Linares DM, Arboleya S, Ross RP, Stanton C. 2017. Complete genome sequence of the gamma-aminobutyric acid-producing strain *Streptococcus thermophilus* APC151. *Genome Announc.*, 5, 00205-17. doi: 10.1128/genomeA.00205-17
- Linares DM, Gómez C, Renes E, Fresno JM, Tornadijo ME, Ross RP, Stanton C. 2017. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria with Potential to design Natural Biofunctional Health-Promoting Dairy Foods. *Front Microbiol.*, 8, 846.
- Mo Sarah. 2013. GABA and glutamate: The balancing act of the nervous system. *The NEI Connection*.
- Mohler H. 2012. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential, *Neuropharmacology.*, 62, 42-53.
- Nomura M., Kimoto H, Someya Y, Furukawa S, Suzuki I. 1998. Production of gamma-aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *J. Dairy Sci.*, 81: 1486-1491.
- Nomura M, Kimoto H, Someya Y, Furukawa S, Suzuki I. 1999a. Novel characterization for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 163-166.
- Nomura M, Nakajima I, Fujita Y, Kobayashi M, Kimono H, Suzuki I, Aso H. 1999b. *Lactococcus lactis* contains only glutamate decarboxylase gene. *Microbiolog.*, 154: 1375-1380.
- Oh SH, Oh CH. 2003. Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food Sci. Biotechnol.*, 12: 248-252. 37.
- Park KB, Ji GE, Park MS, Oh SH. 2005. Expression of rice glutamate decarboxylase in *Bifidobacterium longum* enhances gamma-aminobutyric acid production. *Biotechnol. Lett.*, 27: 1681-1684.
- Park KB, Oh SH. 2007. Production of yoghurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. *Bioresour. Technol.*, 98: 1675-1679.
- Ratanaburee A, Kantachote D, Charernjiratrakul W, Penjamras P, Chaiyasut C. 2011. Enhancement of γ -aminobutyric acid in a fermented red seaweed beverage by starter culture *Lactobacillus plantarum* DW12. *Electron. J. Biotechnol.*, 14, 3.
- Sanchart C, Rattanaporn O, Haltrich D, Phukpattaranont P, Maneerat S. 2016. Technological and safety properties of newly isolated GABA-producing *Lactobacillus futsaii* strains. *J. Appl. Microbiol.*, 121(3): 734-45.
- Sarkar A, Lehto SM, Harty S, Dinan TG, Cryan JF, Burnet PWJ. 2016. Psychobiotics and the manipulation of bacteria-gut-brain signals. *Trends Neurosci.*, 39(11): 763-781
- Shoulson I, Kartzinel R, Chase TN. 1976. Huntington's disease:treatment with dipropylacetic acid and gamma-aminobutyric acid. *Neurology.*, 26: 61-63. doi:10.1212/WNL.26.1.61.
- Siragusa S, Angelis MD, Cagno RD, Rizzello CG, Coda R, Gobbetti M. 2007. Synthesis of gamma-aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian Ccheeses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 22.
- Song HY, Yu RC. 2017. Optimization of culture conditions for gamma-aminobutyric acid production in fermented adzuki bean milk. *J Food Drug Anal.*, 1-8.
- Takatoshi S, Yuko S. 2008. Stability of gamma-aminobutyric acid in fruit juice during storage. *Food Preservation Science.*, 34, 3.
- Tajabadi N, Baradaran A, Ebrahimpour A, Rahim RA, Bakar FA, Manap MYA, Mohammed, AS, Saari N. 2015. Overexpression and optimization of glutamate decarboxylase in *Lactobacillus plantarum* Taj-Apis362 for high gamma-aminobutyric acid production. *Microb Biotechnol.*, 8(4): 623-632.
- Ueno H. 2000. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *J. Mol. Catal.*, 10: 67-79.
- Villegas JM, Brown L, Giori GS, Hebert EM. 2016. Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough. *LWT - Food Sci. Technol.*, 67: 22-26.
- Wong CG, Bottiglieri T, Snead OC. 2003. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann. Neurol.*, 54(6): S3-S12.
- Wu Q, Shah NP. 2016. High γ -aminobutyric acid production from lactic acid bacteria: Emphasis on *Lactobacillus brevis* as a functional dairy starter. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 57(17): 3661-3672
- Yamatsu A, Yamashita Y, Pandharipande T, Maru I, Kim M. 2016. Effect of oral γ -aminobutyric acid (GABA) administration on sleep and its absorption in humans. *Food Sci. Biotechnol.*, 25(2): 547-551
- Yunes RA, Poluektova EU, Dyachkova MS, Klimina KM, Kovtun AS, Averina, OV, Orlova VS, Danilenko VN. 2016. GABA production and structure of gadB/gadC genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota. *Anaerobe.*, 42: 197-204. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.10.011.