

تولید گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا) به وسیله باکتری‌های اسیدلاکتیک

مهسا طاهرزاده^۱(MSc)، ابوالقاسم اسماعیلی^۲(PhD)*، محمد ربانی^۲(PhD)

۱- گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، دانشگاه اصفهان

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

دریافت: ۹۲/۸/۱۹، اصلاح: ۹۲/۱۰/۱۵، پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۵

خلاصه

سابقه و هدف: گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا) یک اسیدآمینو چهار کربنه غیر پروتئینی است که به طور گسترده‌ای در میان موجودات یافت شده و سنتز آن توسط آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز انجام می‌شود. میزان تولید گابا عمدتاً به خواص بیوشیمیایی آنزیم مرتبط می‌باشد. کاهش فشارخون، درمان بی‌خوابی، افسردگی و اثرات ادرار آور از جمله عملکردهای فیزیولوژیکی مهم گاما آمینوبوتیریک اسید است. تعدادی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها قادر به تولید مقادیر قابل توجه گابا می‌باشند. از بین باکتری‌ها، باکتری‌های اسیدلاکتیک بسیار مورد توجه می‌باشند زیرا از نظر فیزیولوژیکی خاص و به طور کلی ایمن می‌باشند. همچنین به طور گسترده در صنایع غذایی استفاده می‌شوند و به عنوان پروبیوتیک در دستگاه گوارش عمل می‌کنند. هدف از این مطالعه شناسایی و معرفی انواع باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا است.

مواد و روشها: در این مطالعه با بهره‌گیری از بانک‌های اطلاعات مانند PubMed و google scholar و واژه‌های کلیدی گونه‌های باکتریایی اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا و منابع جداسازی آن‌ها، عوامل موثر در سنتز گابا، خواص آنزیمی گلوتامات دکربوکسیلاز باکتری‌های اسیدلاکتیک، همسانه سازی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز و تنظیم آن‌ها، کاربردهای بالقوه باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا و روش‌های غربالگری باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا بررسی شده است.

یافته‌ها: یافته‌های به دست آمده از مقالات مختلف نشان می‌دهد که تولید گاما آمینوبوتیریک اسید توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک ایمن و سازگار با محیط‌زیست است و این امر امکان تولید محصولات تخمیری طبیعی جدید غنی‌شده با آن را فراهم می‌کند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه گاما آمینوبوتیریک اسید طبیعی بر روی سلامت انسان بسیار تأثیر دارد و به نظر می‌رسد باکتری‌های اسیدلاکتیک مناسب‌ترین منبع تولید گابا باشند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های اسید لاکتیک، اسید گاما آمینوبوتیریک، فرمانتاسیون، گلوتامات دکربوکسیلاز.

مقدمه

(۱۴)، درمان بیماری‌های مزمن مربوط به مصرف الکل (۱۵)، کاهش التهاب (۱۶ و ۱۷)، محرک سلول‌های ایمنی (۱۸)، مهار دیابت (۱۹ و ۲۰)، خواص ضد توموری (۲۱)، انتشار اسیدهای آمینه آزاد، بهبود سلامت اعصاب و روان انسان (۲۲) درمان ناهنجاری‌های نورولوژیکی مانند صرع، پارکینسون، شیذوفرنی، اسپاسم و آلزایمر (۲۳)، بهبود غلظت پلاسمایی هورمون رشد و افزایش سنتز پروتئین در مغز (۲۴) است. بنابراین از نظر پزشکی دارای اهمیت بسیاری می‌باشد. از این رو است که در پزشکی و حتی در صنایع غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. گابا به طور گسترده‌ای در طبیعت در میان ریزسازواره‌ها، گیاهان و حیوانات وجود دارد. گابای طبیعی برای اولین بار در سیب‌زمینی شناسایی شد (۲۵) و نیز به مقدار کم در تعدادی از منابع گیاهی مانند سبزی‌ها، میوه‌ها و غلات از جمله در اسفناج، کلم بروکلی، گوجه‌فرنگی، سیب، انگور، جو و ذرت یافت شد (۱۵). گزارش‌هایی مبنی بر تولید گابا با افزودن گلوتامات به عنوان پیش‌ساز در

گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا) یک اسیدآمینو چهارکربنه است که در ساختار پروتئین‌ها یافت نمی‌شود و اولین بار در سال ۱۸۸۳ سنتز شد (۱). در سال ۱۹۵۰ مشخص شد که مقدار زیادی از گابا در دستگاه اعصاب مرکزی پستانداران وجود دارد (حدود یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر) ولی عملاً در بافت‌های دیگر یافت نشد (۲). در دهه ۱۹۶۰ بعد از پیشرفت در تکنیک‌های فیزیولوژی گابا به عنوان یک انتقال‌دهنده عصبی مهاری در دستگاه اعصاب مرکزی (۳ و ۴) و همچنین در بافتهای محیطی تعداد زیادی از موجودات به عنوان یک انتقال‌دهنده عصبی پذیرفته شد (۵-۹). گابا توسط آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز طی واکنش دکربوکسیلاسیون غیرقابل برگشت ال گلوتامات تولید می‌شود و نیازمند کوفاکتور پیریدوکسال فسفات است (۱۰ و ۱۱). تعدادی از عملکردهای مهم گابا شامل کاهش فشارخون در انسان و حیوانات آزمایشگاهی (۱۱-۷)، اثرات ادرار آور (۱۲ و ۱)، اثرات آرام‌بخش، درمان بی‌خوابی، افسردگی (۱۳)، بیماری‌های خود ایمنی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۹۰/۹۷۸۸۶ دانشگاه اصفهان می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر ابوالقاسم اسماعیلی

آدرس: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تلفن: ۰۳۱-۳۷۳۲۴۹۰

مفید مواد غذایی را طولانی تر کنند، ایمنی را افزایش دهند و همچنین بافت مواد غذایی را بهبود بخشند. باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای فعالیت‌های فیزیولوژیکی خاص و به طور کلی به عنوان باکتری‌های امن در نظر گرفته می‌شوند و به طور گسترده در صنایع غذایی از جمله محصولات لبنی، نان، سبزی‌ها تخمیری، گوشت، ماهی و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴۸-۴۶ و ۲۴ و ۶).

همچنین این باکتری‌ها به عنوان پروبیوتیک نیز استفاده می‌شوند زیرا اینها دارای خواصی مانند مهار باکتری‌های بیماری‌زا، کنترل هموستاز روده، مقاومت به اسیدیته معده، مقاومت در برابر اسید صفر و نیز فعالیت‌های ضد حساسیت می‌باشند (۵۲-۴۹). در سال‌های اخیر، با توجه به موارد ذکر شده، بسیاری از مطالعات بر روی استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک به عنوان مهم‌ترین منبع سلول باکتریایی در تولید گابا متمرکز شده است (۵۴ و ۵۳ و ۲۴ و ۶).

انواع گونه‌های باکتریایی اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا و منابع جداسازی آن‌ها: اخیراً تعدادی از گونه‌ها و زیرگونه‌هایی از باکتری‌های اسیدلاکتیک گزارش شده‌اند که توانایی تولید مقادیر متفاوتی از گابا را دارند. این‌ها شامل: لاکتوباسیلوس برویس (۵۵ و ۴۴ و ۳۷ و ۱۲ و ۶)، لاکتوکوکوس لاکتیس (۵۸-۵۵ و ۱۲)، لاکتوباسیلوس پاراکازی (۵۹ و ۱۷)، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس (۶۰ و ۱۲)، لاکتوباسیلوس بوشنری (۶۲ و ۶)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۱۲)، لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (۶۳) و استریتوکوس سالیاریوس زیر گونه ترموفیلوس (۳۸) است (جدول ۱). در این میان لاکتوباسیلوس برویس دارای بالاترین میزان تولید گابا است (۶۷) و در میان باکتری‌های اسیدلاکتیک، لاکتوباسیلوس‌ها دارای بالاترین میزان تولید می‌باشند. جالب توجه این که، تقریباً تمام گونه‌های باکتری‌ها از غذاهای سنتی تخمیر شد همانند کیمچی (A traditional fermented food in Korea) (۸ و ۶۵ و ۶۰ و ۸)، پنیر (۶۵ و ۶۲ و ۱۲)، خمیر ترش (۷۰)، پائوکای (۳۷) و جدا شده‌اند. در تمام گزارش‌ها، منابع جداسازی دارای میزان بالایی از گلوتمات است. واضح است که مواد غذایی سنتی تخمیری غنی‌شده با گلوتمات به عنوان مهم‌ترین منابع جداسازی برای غربالگری باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا می‌باشند.

عوامل موثر در سنتز گابا: (افزایش سنتز گابا به وسیله بهینه‌سازی شرایط تخمیر): توانایی تولید گابا به طور گسترده‌ای در میان سویه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک متفاوت است و به طور قابل‌توجهی تحت تأثیر شرایط محیط کشت و ترکیب متوسط آن قرار دارد. بنابراین بهینه‌سازی شرایط برای افزایش میزان تولید گابا مهم است. شرایط مطلوب برای تخمیر گابا در میان سویه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک متفاوت است و عوامل کلیدی و مؤثر در تولید گابا مشخص شده‌اند از جمله منابع کربن، غلظت گلوتمات و کوآنزیم پیروکسال ۵ فسفات، دما محیط کشت و pH (۶۷ و ۶۱ و ۳۸ و ۲۴ و ۸). در میان آن‌ها، pH، دما و غلظت گلوتمات به عنوان رایج‌ترین و مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار برای همه گونه‌ها در نظر گرفته می‌شوند. محتوای گابا داخل سلولی بسیار کم است و خارج شدن آن از سلول بسیار سخت است، از این رو تنها نیاز به سنجش میزان گابا خارج سلولی در طول بهینه‌سازی می‌باشد (۲۴). خواص آنزیمی گلوتمات دکربوکسیلاز باکتری‌های اسیدلاکتیک: گلوتمات دکربوکسیلاز در باکتری‌های اسیدلاکتیک یک آنزیم درون سلولی (۷۲ و ۵۷) است که در پاسخ به استرس اسیدی در این نوع باکتری‌ها القا می‌شود (۳۴ و ۳۲). گلوتمات دکربوکسیلاز به صورت یک شکل بالغ متشکل از زیر واحدهای یکسان با جرم مولکولی در

گیاهان وجود دارد (۲۶). ریزسازواره‌ها مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها توانایی تولید گابا را دارند. مشخص شده است که گابا در این موجودات دارای عملکرد فیزیولوژیک است. برای مثال گابا در جوانه زنی اسپور نوروسپورا کراسا و باسیلوس مگاتریوم نقش دارد (۲۹-۲۷) و در ایجاد مقاومت به pH اسیدی در باکتری‌های مختلفی از جمله: اشیشیا کلی، لاکتوکوکوس زیرگونه لاکتیس، لیستریا مونو کریوزن، میکوباکتریوم و کلستریدیوم پرفرینزوم نقش دارد (۳۲-۳۰). علاوه بر مفید بودن گابا برای انسان‌ها، این اسیدآمین به تحمل باکتری نسبت به تغییرات pH و در تولید ATP برای خود باکتری نیز مفید است. با توجه به این واقعیت که گابا یک ماده سودمند در صنایع غذایی و دارویی است، در نتیجه توسعه غذاهای حاوی گابا بسیار مورد توجه و پیگیری است (۳۴ و ۳۳). غنی‌سازی گابا تا به حال در غذاهای مختلفی با استفاده از افزودن باکتری‌های پروبیوتیک انجام شده است، از جمله: جوانه برنج خیسانده شده در آب، جوانه برنج قهوه‌ای تیمار شده تحت فشار بالا، محصول سویا، گندم جوانه‌زده، برنج تخمیر شده با کپک قرمز، چای سبز تخمیر شده و فرآورده‌های لبنی (۲۴ و ۱۲). گزارش شده است که مصرف غذایی غنی‌شده با گابا باعث کاهش فشارخون در موش‌های دارای فشارخون بالایی سیستمیک شده است (۱۶). گلوتمامیک اسید دکربوکسیلاز مسئول کاتالیز غیرقابل برگشت دکربوکسیلاسیون L-گلوتمات برای تولید گابا است. دکربوکسیلاسیون L-گلوتمات به گابا توسط گلوتمامیک اسید دکربوکسیلاز مطابق با واکنش زیر انجام می‌شود.



فرمول ۱: واکنش شیمیایی تبدیل گلوتمات به گابا (۳۵)

این آنزیم می‌تواند توسط ریزسازواره‌های مختلفی شامل باکتری‌ها (۳۸-۳۶)، قارچ‌ها (۴۱-۳۹) و مخمرها (۴۲) تولید شود. در انسان گابا توسط دو ایزوفرمانزیم گلوتمات دکربوکسیلاز با وزن‌های مولکولی ۶۵ و ۶۷ کیلو دالتون و وابسته به پیروکسال فسفات در مغز تولید می‌شود (۱). در ابتدا اشیشیا کولی برای تولید گابا مورد استفاده قرار گرفت اما خطرهای زیادی در تخمیر توسط اشیشیا کولی به دلیل وجود توکسین شیگلا و بیماری‌زا بودن آن وجود دارد (۸). به همین دلیل در سال‌های اخیر گاما آمینو بوتیریک اسید تولیدشده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک مورد توجه بوده است.

مواد و روشها

در این مطالعه با بهره‌گیری از بانک‌های اطلاعات مانند PubMed و google scholar و واژه‌های کلیدی گونه‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا، روش‌ها و منابع جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا، راه‌هایی برای افزایش تولید گابا، خواص آنزیمی گلوتمامیک اسید دکربوکسیلازها و مطالعات مولکولی مرتبط با آن‌ها و کاربردهای بالقوه باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا مرور شده است. باکتری‌های اسیدلاکتیک: باکتری‌های اسیدلاکتیک به عنوان یک گروه مهمی از باکتری‌های گرم مثبت می‌باشند که غالباً در مواد غذایی تخمیر شده مانند انواع سبزی‌ها و همچنین در روده انسان و حیوانات یافت می‌شوند (۴۵-۴۳). انواع بسیاری از محصولات مهم از جمله اسیدلاکتیک، اسید لینولئیک مزدوج، ویتامین B6 و B12، ترکیبات معطر، باکتریوسین‌ها و آنزیم‌ها توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک تولید می‌شوند. باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌توانند عمر

محدوده از ۵۴ تا ۶۲ کیلو دالتون تولید می‌شود که ریشه‌های اسیدآمینه کاتالیزوری آن شامل یک ریشه لیزین و بسیار حفاظت شده است. گلوتامات دکربوکسیلاز از انواع باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسده و خواص بیوشیمیایی آن‌ها مشخص شده است (۷۳ و ۷۱ و ۶۴). اگرچه واکنش دکربوکسیلاسیون برای گلوتامات دکربوکسیلاز باکتری‌های اسیدلاکتیک مشابه است اما ساختار اولیه در نواحی-N-ترمینال و مناطق-C-ترمینال به میزان قابل توجهی متفاوت است. اختلاف در این ساختار اولیه آنزیم می‌تواند در توانایی آن در تولید گابا تأثیر بگذارد (۷۱). در اغلب باکتری‌های اسیدلاکتیک، شکل فعال گلوتامات دکربوکسیلاز به صورت دایمر می‌باشد ولی شکل فعال این آنزیم در لاکتوباسیلوس برویس IFO12005 به صورت تترامر است (۱۰). این اولین گزارش از گلوتامات دکربوکسیلاز به صورت تترامر در میان ریزسازواره‌ها می‌باشد. فعالیت گلوتامات دکربوکسیلاز به وسیله اضافه کردن یون‌های سولفات افزایش می‌یابد. در بررسی‌های انجام‌شده اضافه شدن مواد مختلف در فعال کردن آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز طبق معادله زیر انجام می‌شود:

آمونیم سولفات < سدیم سولفات < منیزیم سولفات

ترتیب این معادله نشان می‌دهد که هرچه پیوند آب‌گریزی بین زیرواحدها قوی‌تر باشد، فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد (۷۲). علاوه بر این افزودن آمونیم سولفات باعث ایجاد تغییرات چشمگیری در ساختار نمی‌شود ولی آن می‌تواند باعث تغییرات جزئی ساختاری در جایگاه فعال، احتمالاً در مجاورت ریشه‌های کاتالیزوری شود (۱۰). میزان pH بهینه برای حفظ فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز در محدوده ۴ تا ۵ است. در سویه‌های لاکتوباسیلوس پاراکازی NFRI 7415 (۷۱) و لاکتوباسیلوس برویس IFO 12005 (۷۲) که دارای بالاترین میزان تولید گابا می‌باشند، فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز در محدوده ۴ تا ۵.۵ می‌باشد و در pH ۴ میزان فعالیت آنزیم بسیار پایین است و در pH ۵.۵ این آنزیم فاقد فعالیت در برخی باکتری‌های اسیدلاکتیک مانند لاکتوکوکوس لاکتیس (۶۵) است. این نتایج نشان می‌دهد که محدوده pH بر روی فعالیت آنزیم و میزان تولید گابا موثر است. دمای بهینه برای فعالیت این آنزیم در محدوده ۳۰ تا ۵۰ درجه است. چندین نوع سوبسترا برای عمل آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز لاکتوباسیلوس برویس بررسی شد که این‌ها شامل اسیدهای آمینه آلانین، آرژنین، اسید اسپارتیک، سیترویلین، سیستئین، گلوتامیک‌اسید، گلوتامین، گلیسین، هیستیدین، هموسرین، ایزولوسیون، لوسین، لیزین، متیونین، اورنیتین، تیروزین و والین می‌باشد. در میان این‌ها تنها محصول دکربوکسیلاسیون برای گلوتامیک اسید مشاهده شد (۷۲). آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز لاکتوکوکوس زیرگونه لاکتیس نیز در میان ۲۰ آمینواسید تنها با گلوتامات واکنش داد (۵۸). این نتایج نشان می‌دهد که آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز در باکتری‌های اسیدلاکتیک تنها بر روی گلوتامات به عنوان سوبسترا واکنش انجام می‌دهد.

همسانه سازی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز و تنظیم آن‌ها: طول کامل ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از لاکتوباسیلوس پاراکازی NFRI 7415 (۷۱)، لاکتوباسیلوس پلانتروم KCTC3015 (۷۳)، لاکتوباسیلوس برویس-OPK-3 (۶۴)، لاکتوباسیلوس برویس IFO12005 (۱۰) و لاکتوکوکوس لاکتیس 01-7 (۵۸) و قطعات اصلی از ژن گلوتامات دکربوکسیلاز B از لاکتوباسیلوس پاراکازی PF6 (accession number EF174473)، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر

گونه بولگاریکوس (accession number EF174472)PR1، لاکتوباسیلوس لاکتیس PU1 (accession number EF174474) و لاکتوباسیلوس پلانتروم C48 (accession number EF174475) همسانه‌سازی و تعیین توالی شدند (۱۲) و در سال ۱۹۹۱، گلوتامات دکربوکسیلاز انسان از کروموزوم ۱۰ جداسازی شد (۷۴). علاوه بر این ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از لاکتوباسیلوس پلانتروم KCTC3015 (۷۳) و لاکتوباسیلوس برویس-OPK-3 (۶۹) به طور موفقیت‌آمیزی در باکتری اشرشیاکولی بیان شدند و همچنین ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از باکتری لاکتوباسیلوس برویس-OPK-3 به طور موفقیت‌آمیزی در باسیلوس سابیتلیس بیان شد (۷۵). لاکتوکوکوس لاکتیس تنها دارای یک ژن گلوتامات دکربوکسیلاز B می‌باشد (۵۸).

گلوتامات دکربوکسیلاز B و C (گلوتامات دکربوکسیلاز C یک آنتی پورتر که بسیار آگزیز بوده که شامل ۱۲ دومین (Domain) می‌باشد و مسئول آنتی پرت گابا و گلوتامات است). تشکیل اپرون گلوتامات دکربوکسیلاز CB را می‌دهند. این اپرون مسئول رونویسی از پروموتور وابسته به کلراید P_{gad} می‌باشد و بیان آن وابسته به گلوتامات است. GadR به عنوان فعال‌کننده اپرون gadCB می‌باشد و توسط یک ژن واقع در بالادست P_{gad} کد می‌شود (۳۲). Komatsuzaki و همکارانش ژن gadB از لاکتوباسیلوس پاراکازی را همسانه سازی کردند و یک توالی محافظت شده متصل شونده به ریزوزوم در بالادست ژن gadB را شناسایی کردند (GGAGG) ولی هیچ‌گونه توالی پروموتوری مشاهده نکردند. آن‌ها بر این باورند که gadB و ژن‌های دیگر بالادست آن ممکن است به صورت یک اپرون باشند. تا به امروز، معلوم نشده است که آیا gadC به عنوان بالادست gadB در لاکتوباسیلوس پاراکازی وجود دارد یا نه (۷۱). از جمله اهداف همسانه سازی ژن gad علاوه بر تأیید مولکولی وجود این ژن استفاده از آن برای تولید باکتری‌های نوترکیب است که به استفاده از آن‌ها امکان تولید گابا بیشتر وجود خواهد داشت. از موارد دیگر کاربرد آن‌ها امکان کشت باکتری‌های است که مواد بی‌ارزش را به مواد باارزش تبدیل می‌کنند. به عنوان مثال اگر باکتری از سوبسترای ارزان و قابل‌دسترس و از نظر اقتصادی بی‌ارزش استفاده کند می‌توان با انتقال ژن gad به این باکتری سوبسترای مورد نظر را به گابا باارزش تبدیل کرد. تعدادی از گونه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک نمی‌توانند گابا تولید کنند: همان‌گونه که تعدادی از باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا می‌باشند ولی تعدادی از آن‌ها نمی‌توانند گابا تولید کنند (۵۷). مطالعه انجام شده بر روی لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس (تولیدکننده گابا) و لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه کرموریس (فاقد تولید گابا) به درک ما در این زمینه کمک می‌کند. Nomura و همکاران تأیید کردند که ژن‌های gadCB نیز در لاکتوکوکوس زیر گونه کرموریس وجود دارد و در آن‌ها اضافه شدن یا حذف شدن در قطعات بزرگ رخ نداده است اگرچه یک حذف باز آدنین و یک اضافه شدن باز تیمین در ناحیه کد کننده رخ داده که باعث جهش تغییر چهارچوب (frame shift mutations) شده و همین تغییر کوچک سبب شده پروتئین تولیدشده عملکردی نباشد. مناطق اطراف این دو جهش متعاقباً در دیگر گونه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه کرموریس تعیین توالی شده است و اثبات شد که این جهش در میان آن‌ها مشترک است. این نتایج نشان می‌دهد که تنها بر اساس PCR نمی‌توان تعیین کرد که کدام باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا می‌باشند (۷۶).

جدول ۱. فهرست باکتری‌های تولیدکننده گابا، منابع جداسازی و میزان تولید گابا توسط آن‌ها

گونه‌ها	منبع جداسازی	میزان گابا	محیط کشت	منابع
لاکتوباسیلوس برویس NCL912	پاٹوکای	۳۴۵.۸۳ میلی مولار	محیط کشت Nutrient ¹	(۳۵)
لاکتوباسیلوس برویس OPY-1	کیمچی	۸ میلی مولار	محیط کشت MRS ²	(۲۶)
لاکتوباسیلوس پاراکازئی NFRI 7415	ماهی تخمیر شده	۳۰۲ میلی مولار	محیط کشت MRS	(۲۴)
لاکتوباسیلوس برویس IFO-12005	گزارش نشده	۱۰۱۸ میلی مولار	محیط کشت GYP ³	(۵۴)
لاکتوباسیلوس برویس PM17	پنیر	۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم	بافر سدیم استات	(۱۲)
لاکتوباسیلوس برویس GABA 100	کیمچی	۲۶.۹ میلی گرم بر میلی لیتر	محیط کشت MRS	(۶)
لاکتوباسیلوس پلانناروم C48a	پنیر	۱۶ میلی گرم بر کیلوگرم	بافر سدیم استات	(۱۲)
لاکتوباسیلوس پلانناروم DSM19463	پنیر	۴۹۸.۱ میلی گرم بر لیتر	شیر و آب انگور	(۳۱)
لاکتوباسیلوس پاراکازئی PF6a	پنیر	۹۹.۹ میلی گرم بر کیلوگرم	بافر سدیم استات	(۱۲)
لاکتوباسیلوس بوشنری MS	کیمچی	۲۵۱ میلی مولار	محیط کشت MRS	(۶۱)
لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بوگاریکوس PR1a	پنیر	۶۳ میلی گرم بر کیلوگرم	بافر سدیم استات	(۱۲)
لاکتوباسیلوس برویس OPK-3	کیمچی	۸۴.۲۹۲ میلی گرم بر لیتر	محیط کشت MRS	(۶۴)
لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس 01-7	پنیر	۲۷.۱ ماکروگرم بر میلی لیتر	شیر	(۶۵)
لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس B	کیمچی	۶.۴۱ گرم بر لیتر	برنج قهوه‌ای، شیر و سویا	(۸)
لاکتوکوکوس لاکتیس PU1a	پنیر	۳۶ میلی گرم بر کیلوگرم	بافر سدیم استات	(۱۲)
استرپتوکوکوس سالیاروس زیرگونه ترموفیلوس Y2	گزارش نشده	۷۹۸۴.۷۵ میلی گرم بر لیتر	محیط کشت Nutrient	(۶۶)

1.A source of amino acids and nitrogen

2.The Man, Rogosa and Sharpes

3.Glucose Yeast Peptone

کاربردهای بالقوه باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا: به عنوان

شروع‌کننده کشت‌های تخمیری: در حال حاضر مصرف‌کننده‌ها توجه زیادی به استفاده از مواد غذایی مفید برای سلامت می‌کنند و با توجه به رشد قابل توجه این تقاضا، بازار مواد غذایی مفید برای سلامت انسان رونق پیدا کرده است. گابا به عنوان یک فعال زیستی دارای پتانسیل کاربردی زیادی در صنایع غذایی عملکردی می‌باشد. با این حال، علاوه بر این اضافه کردن گابا به عنوان یک ماده شیمیایی به غذا غیرطبیعی و ناامن در نظر گرفته می‌شود و این کار در کشورها غیرقانونی است (۶۰۹). باکتری‌های اسیدلاکتیک نقش محوری در فرآیندهای تخمیری بازی می‌کنند و تاریخ طولانی و امنی در کاربرد و مصرف غذا و نوشیدنی‌های تخمیر شده دارند (۴۸). استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا به عنوان کشت‌های شروع‌کننده فرایندهای تخمیری می‌تواند به دستیابی سنتز زیستی گابا کمک کند. از این راه می‌توان گابا طبیعی را جایگزین گابا شیمیایی کرد. این روش همچنین هزینه‌های تولید را کاهش می‌دهد زیرا اضافه کردن گابا اضافی را حذف می‌کند. با این حال، تشکیل گابا به توانایی تولید گابا در باکتری‌های اسیدلاکتیک و غلظت گلوتامیک اسید در ماتریکس غذایی محدود شده است. برای افزایش میزان گابا در محصولات تخمیر شده باید سویه‌هایی با میزان فعالیت بالای آنزیم گلوتامیک اسید دکرکسیلاز برای استفاده در تخمیر انتخاب شوند. علاوه بر آن، غلظت گلوتامیک اسید در ماتریکس مواد غذایی به عنوان پیش ساز در تولید گابا باید به اندازه کافی بالا باشد. غلظت اسید گلوتامیک را می‌توان با سه روش: (۱) اضافه کردن اسید گلوتامیک اگزوژن (برون

زاد) (۶۰۹، ۶۰۶، ۶۰۷، ۶۰۸، ۶۰۹) اضافه کردن پروتئاز برای کمک به هیدرولیز پروتئین‌ها و تولیداسید گلوتامیک (۷۷)، (۳) با استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک که توانایی هیدرولیز پروتئین را دارند به عنوان کمک کشت (co-cultures) برای فرآیندهای تخمیر استفاده شوند (۷۸) افزایش داد.

به عنوان پروبیوتیک: پروبیوتیک‌ها تنها در صورتی می‌توانند موثر باشند که بتوانند در عبور از معده و روده مقاوم باشند و از بین نروند (۵۰۳، ۵۰۴). دکرکسیلاسیون گلوتامات در سلول‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک، یک پروتون داخل سلولی مصرف می‌کند. این مورد به حفظ pH خنثی سیتوپلاسمی کمک می‌کند. با توجه به نقش آن‌ها در مقاومت در مقابل pH، باکتری‌های اسیدلاکتیک با فعالیت بالای آنزیم گلوتامیک اسید دکرکسیلاز به صورت بالقوه به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته می‌شوند. Siragusa و همکاران در سال ۲۰۰۷ سه سویه لاکتوباسیلوس جدا کردند که می‌تواند تحت شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده زنده بمانند و گابا سنتز کنند. این نشان می‌دهد که باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا به عنوان پروبیوتیک می‌توانند در دستگاه گوارش ساکن شوند و در همان جا گابا تولید کنند. از این رو باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا که به عنوان پروبیوتیک هستند از دو جهت مفید می‌باشند: (۱) به دلیل پروبیوتیک بودن دارای خواصی مانند مهار باکتری‌های بیماری‌زا، اثرهای ضد سرطانی، تقویت و تحریک دستگاه ایمنی و ... می‌باشند. (۲) می‌توانند گابا تولید کنند (۱۲).

برای استفاده کامل از محصولات در صنایع غذایی: برخی از محصولات در صنایع غذایی را می‌توان به عنوان سوبستراهای ارزان قیمت برای سنتز گابا

توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک برای تولید غذاهای مفید برای سلامتی انسان یا نوشیدنی‌ها استفاده کرد. به نظر می‌رسد که این فرایند یک روند اقتصادی بهینه در تولید گابای طبیعی است. به عنوان مثال، در سال ۲۰۰۲ از لاکتوباسیلوس برویس IFO-12005 برای تولید گابا از پسماندهای کارخانه‌ها تولید مشروبات الکلی استفاده شد. تقریباً همه گلوتامیک اسید آزاد (۱۰۵۰ میلی مولار) در پسماندهای کارخانه‌ها به گابا (۱۰۱۸ میلی متر) تبدیل می‌شود. بعد از سانتریفوژ محلول رویی حاوی گابا است که مناسب برای انواع نوشیدنی‌ها است (۷۷). Di Cagno و همکارانش در سال ۲۰۱۰ آب انگور غنی‌شده با گابا تولید کردند که از تخمیر لاکتوباسیلوس پلانتروم DSM19463 به دست آمده بود. در مورد این نوشیدنی اثر بالقوه ضد فشارخون بالا و حفاظت در برابر بیماری‌های پوستی گزارش شده است (۳۱). از این رو، استفاده از این نوع محصولات بر اساس ظرفیت بالای باکتری‌های اسیدلاکتیک برای سنتز گابا دیدگاه جدیدی در تولید محصولات غنی‌شده با گابا ایجاد کرده است.

روش‌های جداسازی گابا: روش‌های متعدد مناسبی برای تشخیص گابا در مایعات بیولوژیکی، از قبیل تجزیه و تحلیل اسید آمینه (۲۴ و ۳۹)، گاز کروماتوگرافی (GC) (Gas chromatography) (۷۹)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (High performance liquid chromatography) (۸۰ و ۸۱)، کروماتوگرافی مایع مویرگی/ روش طیف سنجی جرمی پشت سر هم (۸۱) و روش تجزیه و تحلیل تزریق جریان (Capillary liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method) (۸۲) وجود دارد. با این حال، این روش‌ها نیاز به مراحل آماده سازی متعدد نمونه و زمان‌بر است و تنها در هر زمان تجزیه و تحلیل یک نمونه را می‌توان انجام داد. واضح است که این مدل روش‌های غربالگری با توجه به دلایل ذکر شده، مطلوب نمی‌باشند. کروماتوگرافی پلانار (Planar chromatography) (۸۴ و ۸۵ و ۸۶ و ۸۷) و روش شاخص pH (pH indicator method) (۸۴ و ۸۵ و ۸۶ و ۸۷) (PIM) (۶۶) نیاز به تجهیزات گران قیمت ندارد و مناسب برای تجزیه و تحلیل همزمان تعداد زیادی از نمونه‌ها می‌باشد و در نتیجه برای غربالگری تعداد زیادی از سویه‌های مولد گابا مورد استفاده قرار می‌گیرد.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به اثرات فیزیولوژیکی گفته شده برای گابا و با توجه به اینکه گابا دریافتی می‌تواند در درمان ناهنجاری‌های نورولوژیکی متعددی مثل صرع،

پارکینسون، شیزوفرنی و غیره موثر باشد، همچنین شواهدی وجود دارد که گابا می‌تواند در تنظیم دستگاه قلبی عروقی مثل فشارخون و ضربان قلب و نیز در احساس درد و خستگی موثر باشد، در نتیجه این ماده می‌تواند به عنوان یک جزئیست فعال در غذاها و داروها به کار رود. افزودن مستقیم گابای شیمیایی به غذاها غیر ایمن می‌باشد و ممکن است مشکلاتی به وجود آورد. بنابراین با افزودن باکتری‌هایی که توانایی تولید گابا را داشته باشند، مثل باکتری‌های اسیدلاکتیک، می‌توان غذا داروهایی تولید کرد که علاوه بر دارا بودن خاصیت پروبیوتیکی، باعث اثرات آرام‌بخشی نیز شود. از آنجایی که تولید گابا در بین سویه‌های تولید کننده متفاوت می‌باشد، بنابراین به دست آوردن سویه مناسب که دارای توانایی زیاد در تولید گابا باشد، برای کاربرد در مواد غذایی و دارویی بسیار کارآمد می‌باشد. با توجه به مقالات موجود و کارهای انجام‌شده، باکتری‌های اسیدلاکتیک توانایی مختلفی در تولید گابا دارند (۷). Siragusa و همکارانش گزارش می‌کنند که بهترین گونه‌های تولیدکننده گابا شامل لاکتوباسیلوس پاراکازی PF6، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس PR1، لاکتوکوکوس لاکتیس PU1 و لاکتوباسیلوس برویس PM17 جداسازی از پنیر می‌باشند که دارای بیش‌ترین میزان و غلظت گابا می‌باشند (۱۲). Nomura و همکارانش بیان کردند که لاکتوکوکوس زیرگونه لاکتیس جداسازی از پنیر داری سطح بالایی از گابا می‌باشد (۶۷). اگرچه بسیاری از سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا جداسازی و شناسایی شده‌اند ولی نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه‌ها می‌باشد زیرا غربالگری انواع باکتری‌های اسیدلاکتیک برای تولید گابا در صنایع غذایی بسیار مهم می‌باشد (۲۴). باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا فرصت خوبی برای توسعه و ارائه محصولات تخمیری بهداشتی فراهم کرده است. اگر چه برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا برای پیدا کردن گونه‌های مناسب برای تخمیرهای مختلف جداسازی شده‌اند اما غربالگری بیشتر باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا، به خصوص گونه‌های پربازده، ضروری است.

روش‌های غربالگری با توان عملیاتی بالا ما را قادر به جداسازی سریع و راحت باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا کرده است. توضیح مکانیسم مولکولی و نقش آن در تولید گابا، دانش مادر مورد تنظیم تولید گابا و درک عمیق فیزیولوژی سلول‌های تولید کننده گابا افزایش داده است و ابزارهای لازم جهت افزایش عملکرد گابا در سطوح ژنتیکی و متابولیکی را فراهم کرده است. به بیانی دیگر بیان ژن گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز باکتری‌های اسیدلاکتیک در دیگر میکروب‌ها در آینده کاربرد باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا را افزایش می‌دهد.

Gamma Aminobutyric Acid (GABA) Production Using Acid Lactic Bacteria

M. Taherzadeh (MSc)¹, A. Esmaili (PhD)^{2*}, M. Rabbani (PhD)²

1. Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran

J Babol Univ Med Sci; 16(8); Aug 2014; pp: 46-56

Received: Nov 10th 2013, Revised: Jan 5th 2014, Accepted: Mar 6th 2014.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a non-protein amino acid that can be found broadly in all organisms. GABA is synthesized by glutamate decarboxylase (GAD). Therefore, GABA production depends on biochemical properties of this enzyme. GABA has several physiological functions such as hypotensive activity, insomnia, depression, as well as diuretic effects. Bacteria, fungi and yeast produce considerable amount of GABA. Among bacteria, acid lactic bacteria due to their physiological and safety properties have been considered. These bacteria are used in food industry and act as probiotics in digestive system. The aim of this study was to identify and introduce GABA producing acid lactic bacteria.

METHODS: In this paper using data banks such as PubMed and Google scholar and key words such as GABA producing acid lactic bacteria, isolation sources of them, factors that affect GABA production, acid lactic bacteria glutamate decarboxylase properties, glutamate decarboxylase gene cloning and regulation of them, the potential applications of GABA producing acid lactic bacteria and strain screenings have been reviewed.

FINDINGS: Data from variety of papers showed that production of GABA using acid lactic bacteria is safe and biocompatible. This may lead to GABA rich fermented products.

CONCLUSION: Results of this study showed that natural GABA has significant effects on human health. Therefore it seems acid lactic bacteria are the most suitable sources for GABA production.

KEY WORDS: Acid lactic bacteria, Gamma-aminobutyric acid, Fermentation, Glutamate decarboxylase.

Please cite this article as follows:

Taherzadeh M, A. Esmaili A, Rabbani M. Gamma aminobutyric acid (GABA) production using acid lactic bacteria. J Babol Univ Med Sci 2014;16(8):46-56.

* Corresponding Author; A. Esmaili (PhD)

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran

Tel: + 98 31 3732490

E-mail: aesmaili@sci.ui.ac.ir

References

1. Kheiri Yegane Azar B, Esmaeili A, Rabbani M. Cloning of glutamate decarboxylase and production of γ -aminobutyric acid from *Lactobacillus brevis*. *Res Pharm Sci* 2012;7(5):S421.
2. Florey E. GABA: history and perspectives. *Can J Physiol Pharmacol* 1991;69(7):1049-56.
3. Esmaeili A. GABAA receptor subunits in rat testis and sperm. *Int J Fertil Steril* 2008;2(3):121-4.
4. Zaker SR, Esmaeili A, Bouzari M, Shirani E. Quantitative analysis of GABAA gamma receptor subunits in the developing embryonic chick forebrain. *Iran J Basic Med Sci* 2012;15(5):1097-101.
5. Huang J, Mei L, Sheng Q, Yao S, Lin D. Purification and characterization of glutamate decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 isolated from fresh milk. *Chinese J Chem Eng* 2007;15(2):157-61.
6. Kim JY, Lee MY, Ji GE, Lee YS, Hwang KT. Production of gamma-aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *Int J Food Microbiol* 2009;130(1):12-16.
7. Li H, Cao Y. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids* 2010;39(5):1107-16.
8. Lu X, Chen Z, Gu Z, Han Y. Isolation of γ -aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. *Biochem Eng J* 2008;41(1):48-52.
9. Mazur R, Kovalovská K, Mazur JR, Hudec J. Changes in selectivity of gamma-aminobutyric acid formation effected by fermentation condition s and microorganisms resources. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 2011;1(2):164-71.
10. Hiraga K, Ueno Y, Oda K. Glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: activation by ammonium sulfate. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;72(5):1299-306.
11. Lin Q, Yang S, Lü F, Lu Z, Bie X, Jiao Y, Zou X. Cloning and expression of glutamate decarboxylase gene from *Streptococcus thermophilus* Y2. *J Gen Appl Microbiol* 2009;55(4):305-10.
12. Siragusa S, De Angelis M, Di Cagno R, Rizzello CG, Coda R, Gobbetti M. Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(22):7283-90.
13. Esmaeili A, Lynch JW, Sah P. GABAA receptors containing gamma1 subunits contribute to inhibitory transmission in the central amygdala. *J Neurophysiol* 2009;101(1):341-9.
14. Okada T, Sugishita T, Murakami T, et al. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, J Japanese Soc Food Sci Technol* 2000;47(8):596-603.
15. Oh SH, Soh JR, Cha YS. Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. *J Med Food* 2003;6(2):115-21.
16. Hayakawa K, Kimura M, Kasaha K, Matsumoto K, Sansawa H, Yamori Y. Effect of a gamma-aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Br J Nutr* 2004;92(3):411-17.
17. Kelley JM, Hughes LB, Bridges SL. Does gamma-aminobutyric acid (GABA) influence the development of chronic inflammation in rheumatoid arthritis. *J Neuroinflammation* 2008;5:1.
18. Oh SH, Oh CH. Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food Sci Biotechnol* 2003;12(3):248-52.
19. Taneera J, Jin Z, Jin Y, et al. γ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in human pancreatic islets is altered in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2012;55(7):1985-94.
20. Yan PM, Xue WT, Tan SS, Zhang H, Chang XH. Effect of inoculating lactic acid bacteria starter cultures on the nitrite concentration of fermenting Chinese paocai. *Food Control* 2008;19(1):50-5.
21. Wu TY, Tsai CC, Hwang YT, Chiu TH. Effect of antioxidant activity and functional properties of Chingshey purple sweet potato fermented milk by *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, and *L. gasseri* strains. *J Food Sci* 2012;77(1):2-8.

- 22.Parvez S, Malik K, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J Appl Microbiol 2006;100(6):1171-85.
- 23.Esmaeili A, Ghaedi K. GABAA receptors as novel drug targets for treatment of mental disorders. J Paramed Sci 2010;1(3):50-61.
- 24.Komatsuzaki N, Shima J, Kawamotoa S, Momosed H, KimurabT. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. Food Microbiol 2005;22(6):497-504.
- 25.Chew BL, Seymour GB. The effects of glutamate decarboxylase (GAD) RNAi knockout in tissue cultured transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). Plant Omics J 2013;6(1):13-17.
- 26.Park KB, Oh SH. Production and characterization of GABA rice yogurt. Food Sci Biotech 2005;14(4):518-22.
- 27.Foester CW, Foester HF. Glutamic acid decarboxylase in spores of *Bacillus megaterium* and its possible involvement in spore germination. J Bacteriol 1973;114(3):1090-8.
- 28.Foester HF. G-aminobutyric acid as a required germinant for mutant spores of *Bacillus megaterium*. J Bacteriol 1971;108(2):817-23.
- 29.Kubicek CP, Hampel W, Rohr M. Manganese deficiency leads to elevated amino acid pools in critic acid accumulating *Aspergillus niger*. Arch Microbiol 1979;123(1):73-9.
- 30.Castanie-Cornet MP, Penfound TA, Smith D, Elliott JF, Foster JW. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1999;181(11):3525-35.
- 31.Di Cagno R, Mazzacane F, Rizzello CG, et al. Synthesis of γ - aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications. Appl Microbiol Biotechnol 2010;86(2):731-41.
- 32.Sanders JW, Leenhouts K, Burghoorn J, Brands JR, Venema G, Kok J.A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. Mol Microbiol 1998;27(2):299-310.
- 33.Higuchi T, Hayashi H, Abe K. Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. J Bacteriol 1997;179(10):3362-4.
- 34.Small PL, Waterman SR. Acid stress, anaerobiosis and gadCB: lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. Trends Microbiol 1998 6(6):214-16.
- 35.Li H, Qiu T, Huang G, Cao Y. Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. Microb Cell Fact 2010;9:85-90.
- 36.Capitani G, De Biase D, Aurizi C, Gut H, Bossa F, Grutter MG. Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. EMBO J 2003;22(16):4027-37.
- 37.Li H, Cao Y, Gao D, Xu H. A high γ -aminobutyric acidproducing ability *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese traditional paocai. Ann Microbiol 2008;58(4):649-53.
- 38.Yang SY, Lu ZX, Lu FX, Bie XM, Sun LJ, Zeng XX. A simple method for rapid screening of bacteria with glutamate decarboxylase activities. J Rapid Methods Autom Microbiol 2006;14(3):291-8.
- 39.Kono I, Himeno K. Changes in gamma-aminobutyric acid content during beni-koji making. Biosci Biotechnol Biochem 2000;64(3):617-19.
- 40.Rhyu MR, Kim EY, Kim HY, Ahn BH, Yang CB. Characteristics of the red rice fermented with fungus *Monascus*. Food Sci Biotechnol 2000;9(1):21-6.
- 41.Su YC, Wang JJ, Lin TT, Pan TM. Production of the secondary metabolites gamma-aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. J Ind Microbiol Biotechnol 2003;30(1):41-6.
- 42.Masuda K, Guo XF, Uryu N, Hagiwara T, Watabe S. Isolation of marine yeasts collected from the Pacific Ocean showing a high production of gamma-aminobutyric acid. Biosci Biotechnol Biochem 2008;72(12):3265-72.

- 43.Omar NB, Ampe F, Raimbault M, Guyot JP, Tailliez P. Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia). *Syst Appl Microbiol* 2000;23(2):285-91.
- 44.Gardner NJ, Savard T, Obermeier P, Caldwell G, Champagne CP. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int J Food Microbiol* 2001;64(3):261-75.
- 45.Satokari RM, Vaughan EE, Smidt H, Saarela M, Matto J, de Vos WM. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Syst Appl Microbiol* 2003; 26(4):572-84.
- 46.Karahan AG, Basyigit Kilic G, Kart A, et al. Genotypic identification of some lactic acid bacteria by amplified fragment length polymorphism analysis and investigation of their potential usage as starter culture combinations in Beyaz cheese manufacture. *J Dairy Sci* 2010;93(1):1-11.
- 47.Lee JY, Kim CJ, Kunz B. Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application of as starter culture in the production fermented sausages. *Meat Sci* 2006;72(3):437-45.
- 48.Leroy F, Vuyst LD. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol* 2004;15(2):67-78.
- 49.Hwanhlem N, Watthanasakphuban N, Riebroy S, Benjakul S, H-Kittikun A, Maneerat S. Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria. *Int J Food Sci Technol* 2010; 45(3):594-601.
- 50.Nishida S, Michinaka A, Nakashima K, Iino H, Fujii T. Evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paracasei* KW3110 based on in vitro tests and oral administration tests in healthy adults. *J Gen Appl Microbiol* 2008;54(6):267-76.
- 51.Tannock GW. A special fondness for lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(6):3189-94.
- 52.Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov Today* 2003;8(15):692-700.
- 53.Chou LS, Weimer B. Isolation and characterization of acid and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci* 1992;75(1):23-31.
- 54.Yokoyama S, Hiramatsu J, Hayakawa K. Production of gamma-aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005. *J Biosci Bioeng* 2002;93(1):95-7.
- 55.Kim SH, Shin BH, Kim YH, Nam SW, Jeon SJ. Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus brevis* BH2. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2007;12(6):707-12.
- 56.Lu X, Xie C, Gu Z. Optimisation of fermentative parameters for GABA enrichment by *Lactococcus lactis*. *Czech J Food Sci* 2009;27(6):433-42.
- 57.Nomura M, Kimoto H, Someya Y, Suzuki I. Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* from subsp. *cremoris*. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49(1):163-6.
- 58.Nomura M, Nakajima I, Fujita Y, et al. *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene. *Microbiology* 1999;145(6):1375-80.
- 59.Rossetti V, Lombard A. Determination of glutamate decarboxylase by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996;681(1):63-7.
- 60.Taherzadeh M, Esmaili A, Rabanni M. Identification of Glutamate decarboxylase gene in *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus*. 1st Tabriz International Life Science Conference & 12th Iran Biophysical Chemistry Conference. Tabriz, Iran 2013.
- 61.Cho YR, Chang JY, Chang HC. Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J Microbiol Biotechnol* 2007;17(1):104-9.

62. Park KB, Oh SH. Isolation and characterization of *Lactobacillus buchneri* strains with high gamma-aminobutyric acid producing capacity from naturally aged cheese. *Food Sci Biotechnol* 2006;15(1):86-90.
63. Sun TS, Zhao SP, Wang HK, Cai CK, Chen YF, Zhang HP. ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from Xinjiang koumiss in China. *Eur Food Res Technol* 2009; 228(4):607-12.
64. Li H, Qiu T, Gao D, Cao Y. Medium optimization for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912. *Amino acids* 2010;38(5):1439-45.
65. Park KB, Oh SH. Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. *Bioresour Technol* 2007;98(8):1675-9.
66. Seok JH, Park KB, Kim YH, Bae MO, Lee MK, Oh SH. Production and characterization of kimchi with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid. *Food Sci Biotechnol* 2008;17(5):940-6.
67. Nomura M, Kimoto H, Someya Y, Furukawa S, Suzuki I. Production of gamma-aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. *J Dairy Sci* 1998;81(6):1486-91.
68. Rizzello CG, Cassone A, Di Cagno R, Gobbetti M. Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and gamma-aminobutyric acid (GABA) during sourdough fermentation by selected lactic acid bacteria. *J Agric Food Chem* 2008;56(16):6936-43.
69. Park KB, Oh SH. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. *Bioresour Technol* 2007;98(2):312-19.
70. Yang SY, Lu FX, Lu ZX, et al. Production of gamma-aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* Y2 under submerged fermentation. *Amino Acids* 2008;34(3):473-8.
71. Komatsuzaki N, Nakamura T, Kimura T, Shima J. Characterization of glutamate decarboxylase from a high gamma-aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;72(2):278-85.
72. Ueno Y, Hayakawa K, Takahashi S, Oda K. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997;61(7):1168-71.
73. Park KB, Oh SH. Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum*. *J Food Sci Nutr* 2004;9(4):324-9.
74. Karlsen AE, Hagopian WA, Grubin CE, et al. Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(19):8337-41.
75. Park KB, Oh SH. Enhancement of gamma-aminobutyric acid production in Chungkukjang by applying a *Bacillus subtilis* strain expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnol Lett* 2006;28(18):1459-63.
76. Nomura M, Kobayashi M, Ohmomo S, Okamoto T. Inactivation of the glutamate decarboxylase gene in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(5):2235-7.
77. Zhang H, Yao HY, Chen F. Accumulation of gamma-aminobutyric acid in rice germ using protease. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;70(5):1160-5.
78. Inoue K, Shirai T, Ochiai H, et al. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing gamma-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur J Clin Nutr* 2003;57(3):490-5.
79. Kagan IA, Coe BL, Smith LL, Huo CJ, Dougherty CT, Strickland JR. A validated method for gas chromatographic analysis of gamma-aminobutyric acid in tall fescue herbage. *J Agric Food Chem* 2008; 56(14):5538-43.
80. Taherzadeh M, Esmaili A, Rabanni M. GABA producing probiotic can be used for treatment of anxiety. 13th Iranian Congress of Biochemistry and 5th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Yazd, Iran 2013.

- 81.Song Y, Shenwu M, Dhossche DM, Liu YM. A capillary liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the quantification of gamma-aminobutyric acid in human plasma and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;814(2):295-302.
- 82.Horie H, Rechnitz GA. Enzymatic flow-injection determination of gamma-aminobutyric-acid. *Anal Lett* 1995; 28(2):259-66.
- 83.Li H, Qiu T, Cao Y, Yang J, Huang Z. Pre-staining paper chromatography method for quantification of gamma-aminobutyric acid. *J Chromatogr A* 2009;1216(25):5057-60.
- 84.Sethi ML. Enzyme inhibition XI: glutamate decarboxylase activity relationship with the reaction products as determined by the colorimetric and radioisotopic methods. *J Pharm Biomed Anal* 1999;19(6):847-54.