مقاله مروری

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره شانزدهم، شمارهٔ ۸، مرداد ۱۳۹۳، صفحه ۵۶-۴۶

تولید گاما آمینوبوتریک اسید (گابا) به وسیله باکتری‌های اسیدلاکتیک

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

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 آمینو بوتیریک اسید (گابا) یک اسیدآمینه 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 عمدتا 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 قابل‌توجه 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 بانک های اطلاعات مانند PubMed و google scholar و واژه های 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.

یافته ها: 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.

نتیجه گیری: 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.

واژه های کلیدی: باکتریهای اسید لاکتیک، اسید گاماآمینوبوتیریک، فرمانتاسیون، گلوتامات دکربوکسیلاز.

مقدمه

گاماآمینوبوتیریک اسید(گابا) یک اسیدآمینه 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 (۴و۳) و همچنین در بافتهای محیطی تعداد زیادی از موجودات به عنوان یک انتقال‌دهنده عصبی پذیرفته شد (۹-۵). گابا توسط آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز طی واکنش دکربوکسیلاسیون غیرقابل‌برگشت ال‌گلوتامات تولید می‌شود و نیازمند کوفاکتور پیریدوکسال فسفات است (۱۰و۹و۶). تعدادی از عملکردهای مهم گابا شامل کاهش فشارخون در انسان و حیوانات آزمایشگاهی (۱۱-۹و۷)، اثرات ادرار آور (۱۲و۱)، اثرات آرام‌بخش، درمان بی‌خوابی، افسردگی (۱۳)، بیماری‌های خود ایمنی (۱۴)، درمان بیماری‌های مزمن مربوط به مصرف الکل (۱۵)، کاهش التهاب (۱۷و۱۶)، محرک سلول‌های ایمنی (۱۸)، مهار دیابت (۲۰و۱۹)، خواص ضد توموری (۲۱)، انتشار اسیدهای آمینه آزاد، بهبود سلامت اعصاب و روان انسان (۲۲) درمان ناهنجاری‌های نورولوژیکی مانند صرع، پارکینسون، شیزوفرنی، اسپاسم و آلزایمر (۲۳)، بهبود غلظت پلاسمایی هورمون رشد و افزایش سنتز پروتئین در مغز (۲۴) است. بنابراین از نظر پزشکی دارای اهمیت بسیاری می باشد. از این رو است که در پزشکی و حتی در صنایع غذائی 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 شناسائی 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

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۹۰/۹۷۸۸۶ دانشگاه اصفهان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر ابوالقاسم اسماعیلی
آدرس: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تلفن: ۰۳۱-۳۷۳۲۴۹۰
e-mail:aesmaeili@sci.ui.ac.ir

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: اشریشیا کلی، لاکتوکوکوس زیرگونه لاکتیس، لیستریا مونو کریوژنز، میکوباکتریوم و کلستردیوم پرفرینژزم نقش دارد (۳۲-۳۰). علاوه بر مفید بودن گابا برای انسان‌ها، این اسیدآمینه در تحمل باکتری نسبت به تغییرات pH و در تولید ATP برای خود باکتری نیز مفید است. با توجه با 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 (۳۴و۳۳). 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 (۲۴و۱۲). گزارش شده است که مصرف غذاهایی غنی‌شده با گابا باعث کاهش فشارخون در موش‌های دارای فشارخون بالای سیستولیک شده است (۱۶). گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز مسئول کاتالیز غیرقابل برگشت دکربوکسیلاسیون L-گلوتامات برای تولید گابا است. دکربوکسیلاسیون L-گلوتامات به گابا توسط گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز مطابق با واکنش زیر انجام می‌شود.

$$\text{L-glutamate} + H \longrightarrow \text{GABA} + CO_2$$

فرمول ۱ : واکنش شیمیایی تبدیل گلوتامات 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 ایزوفرم آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز با وزن‌های ملکولی ۶۵ و ۶۷ کیلو دالتون و وابسته به پیرودوکسال فسفات در مغز تولید می‌شود (۱). در ابتدا اشرشیا کولی برای تولید گابا مورد استفاده قرار گرفت اما خطرهای زیادی در تخمیر توسط اشرشیا 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 بانک های اطلاعات مانند PubMed و google scholar و واژه های کلیدی گونه‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا، روش‌ها و منابع جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا، راه‌هایی برای افزایش تولید گابا، خواص آنزیمی گلوتامیک 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 مفید مواد غذایی را طولانی‌تر 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 می گیرند (۴۸-۴۶و۲۴و۶).

همچنین این باکتری‌ها به عنوان پروبیوتیک نیز استفاده می‌شوند زیرا اینها دارای خواصی مانند مهارباکتری‌های بیماری‌زا، کنترل هموستاز روده، مقاومت به اسیدیته معده، مقاومت در برابر اسید صفرا 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 (۵۴و۵۳و۲۴و۶).

انواع گونه‌های باکتریایی اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا و منابع جداسازی آن‌ها: اخیراً تعدادی از گونه‌ها و زیرگونه‌هایی از باکتری‌های اسیدلاکتیک گزارش‌شده‌اند که توانایی تولید مقادیر متفاوتی از گابا را دارند. این‌ها شامل: لاکتوباسیلوس برویس (۵۵و۵۴و۴۴و۳۷و۱۲و۶)، لاکتوکوکوس لاکتیس (۵۸-۵۶و۱۲)، لاکتوباسیلوس پاراکازی (۵۹و۱۷)، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس (۶۰و۱۲)، لاکتوباسیلوس بوشنری (۶۲و۶۱)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۱۲)، لاکتوباسیلوس هلوتیکوس (۶۳) و استرپتوکوس سالیواریوس 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 باکتری ها از غذاهای سنتی تخمیر شد همانند کیمچی (A traditional fermented food in Korea) (۶۹و۶۸و۶۵و۸)، پنیر (۶۵و۶۲و۱۲)، خمیرترش (۷۰)، پائوکای (۳۷) و .... جدا شده‌اند. در تمام گزارش‌ها، منابع جداسازی دارای میزان بالایی از گلوتامات است. واضح است که مواد غذایی سنتی تخمیری غنی‌شده با گلوتامات 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 شده اند از جمله منابع کربن، غلظت گلوتامات و کوآنزیم پیرودکسال ۵ فسفات، دما محیط کشت وpH (۶۷و۶۱و۳۸و۲۴و۸). در میان آن‌ها، pH، دما و غلظت گلوتامات به عنوان رایج‌ترین و مهم‌ترین عوامل تاثیرگذاربرای 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 گلوتامات دکربوکسیلاز باکتری‌هایاسیدلاکتیک: گلوتامات دکربوکسیلاز در باکتری‌های اسیدلاکتیک یک آنزیم درون سلولی (۷۲و۷۱و۵) است که در پاسخ به استرس اسیدی در این نوع باکتری‌ها القا می‌شود (۳۴و۳۲). گلوتامات دکربوکسیلاز به صورت یک شکل بالغ متشکل از زیر واحدهای یکسان با جرم مولکولی در

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 جداشده و خواص بیوشیمیایی آن‌ها مشخص شده است (۷۳و۷۱و۶۴و۱۰). 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:

آمونیوم سولفات>سدیم سولفات> منیزیم سولفات

ترتیب این معادله نشان می‌دهدکه هرچه پیوندآب گریزی بین زیرواحدها قوی‌تر باشد، فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد (۷۲). علاوه بر این افزودن آمونیوم 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 پاراکازیی 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 درpH بالای ۵.۵ این آنزیم فاقد فعالیت دربرخی 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، سیترولین، سیستئین، گلوتامیکاسید، گلوتامین، گلیسین، هیستیدین، هموسرین، ایزولوسیون، لوسین، لیزین، متیونین، اورنیتین، تیروزین و والین می باشد. در میان این‌ها تنها محصول دکربوکسیلاسیون برای گلوتامیک اسید مشاهده شد (۷۲). آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز لاکتوکوکوس زیرگونه لاکتیس نیز درمیان 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 پاراکازیی NFRI 7415 (۷۱)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم KCTC3015 (۷۳)، لاکتوباسیلوس برویس OPK-3 (۶۴)، لاکتوباسیلوس برویس IFO12005(۱۰) و لاکتوکوکوس لاکتیس 7-01 (۵۸) و قطعات اصلی از ژن گلوتامات دکربوکسیلازB از لاکتوباسیلوس پاراکازیی PF6(accession number EF174473)، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس PR1(accession number EF174472)، لاکتوباسیلوس لاکتیس PU1(accession numberEF174474)و لاکتوباسیلوس پلانتاروم C48(accession number EF174475) همسانه‌سازی و تعیین توالی شدند (۱۲) و در سال۱۹۹۱، گلوتامات دکربوکسیلاز انسان از کروموزوم ۱۰ جداسازی شد (۷۴). علاوه بر این ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از لاکتوباسیلوس پلانتاروم 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 موفقیت آمیزی در باسیلوس سابتیلیس بیان شد (۷۵). لاکتوکوکوس لاکتیس تنها دارای یک ژن گلوتامات دکربوکسیلاز Bمی‌باشد (۵۸).

گلوتامات دکربوکسیلاز B وC (گلوتامات دکربوکسیلاز C یک آنتی پورتر که بسیار آبگریز 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 Pgad می‌باشد و بیان آن وابسته به گلوتامات است. GadR به عنوان فعال‌کننده اپرون gadCB می‌باشد و توسط یک ژن واقع در بالادست Pgad کد می‌شود (۳۲). Komatsuzaki و همکارانش ژن gadB از لاکتوباسیلوس پاراکازیی را همسانه سازی کردند و یک توالی محافظت شده متصل شونده به ریبوزوم در بالادست ژن gadB را شناسایی کردند (GGAGG) ولی هیچ‌گونه توالی پروموتری 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 پاراکازیی 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 لاکتوکوس 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 ژن‌هایgadCB 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 دیگرگونه‌های 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	پائوکای	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 کشتMRS	(۲۴)
لاکتوباسیلوس برویس IFO-12005	گزارش نشده	۱۰.۱۸ 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	محیط کشت MRS	(۶)
لاکتوباسیلوس پلانتاروم C48a	پنیر	۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم	بافر سدیم استات	(۱۲)
لاکتوباسیلوس پلانتاروم DSM19463	پنیر	۴۹۸.۱ میلی‌گرم بر لیتر	شیر و آب انگور	(۳۱)
لاکتوباسیلوس پاراکازئی PF6a	پنیر	۹۹.۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم	بافر سدیم استات	(۱۲)
لاکتوباسیلوس بوشنری MS	کیمچی	۲۵۱ میلی مولار	محیط کشت MRS	(۶۱)
لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بوگاریکوس PR1a	پنیر	۶۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم	بافر سدیم استات	(۱۲)
لاکتوباسیلوس برویس OPK-3	کیمچی	۸۴.۲۹۲ میلی‌گرم بر لیتر	محیط کشت MRS	(۶۴)
لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس01-7	پنیر	۲۷.۱ ماکروگرم بر میلی‌لیتر	شیر	(۶۵)
لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس B	کیمچی	۶.۴۱ گرم بر لیتر	برنج قهوه‌ای، شیر و سویا	(۸)
لاکتوکوکوس لاکتیس PU1a	پنیر	۳۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم	بافر سدیم استات	(۱۲)
استرپتوکوکوس سالیواریوس زیرگونه ترموفیلوس Y2	گزارش نشده	۷۹۸۴.۷۵ میلی‌گرم 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 قابل‌توجه 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 (۶۹و۶). باکتری‌های اسیدلاکتیک نقش محوری در فرآیندهای تخمیری بازی می‌کنند، و تاریخ طولانی و امنی در کاربرد و مصرف غذاها 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 دکربوکسیلاز 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) (۶۹و۶۵و۲۶و۶)، ۲) 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 می‌تواند موثر باشند که بتوانند در عبور از معده و روده مقاوم باشند و از بین نروند (۵۳و۵۰). دکربوکسیلاسیون 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 مقابلpH، باکتری‌های اسیدلاکتیک با فعالیت بالای آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز 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 پسمانده‌های کارخانه‌ها تولید مشروبات الکلی استفاده شد. تقریباً همه گلوتامیک اسید آزاد (۱۰.۵۰ میلی مولار) در پسمانده‌های کارخانه‌ها به گابا (۱۰.۱۸ 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 لاکتوباسلوس پلانتاروم 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 (۳۹و۲۴)، گاز کروماتوگرافی (Gas chromatography)(GC) (۷۹)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High performance liquid chromatography) (HPLC) (۸۰و۲۹و۶و۱)، 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) (FIA) (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 تحلیلیک نمونه را می‌توان انجام داد. واضح است که این مدل روش‌های غربالگری با توجه به دلایل ذکر شده، مطلوب نمی‌باشند. کروماتوگرافی پلانار (Planar chromatography) (۸۴و۸۳و۶۱و۵۴و۳۷) و روش شاخص pH (pH indicator method) (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 جززیست 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 بسیارکارآمد می‌باشد. با توجه به مقالات موجود و کارهای انجام‌شده، باکتری‌هایاسیدلاکتیک توانایی مختلفی در تولید گابا دارند (۷). Siragusa و همکارانش گزارش می‌کنند که بهترین گونه‌های تولیدکننده گابا شامل لاکتوباسیلوس پاراکازیی PF6، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس PR1، لاکتوکوکوس لاکتیس PU1 و لاکتوباسیلوس برویس PM17 جداشده از پنیر می‌باشند که دارای بیش‌ترین میزان و غلظت گابا می‌باشند (۱۲). Nomura و همکارانش بیان کردند که لاکتوکوکوس زیرگونه لاکتیس جداشده از پنیر داری سطح بالایی از گابا می‌باشد (۶۷). اگرچه بسیاری از سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا جداسازی و شناسایی‌شده‌اند 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 میکرب‌ها در آینده کاربرد باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده گابا را افزایش می‌دهد.

Gamma Aminobutyric Acid (GABA) Production Using Acid Lactic Bacteria

M. Taherzadeh (MSc) [1], A. Esmaeili (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. Esmaeili 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. Esmaeili (PhD)**

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

Tel: + 98 31 3732490

E-mail: aesmaeili@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 acidenriched 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 acidand bile-tolerant isolates from strains of Lactobacillus acidophilus. J Dairy Sci 1992;82(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, Esmaieli 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 ecarboxylase 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 Nadl 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, Esmaieli 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.